Utjecaj kroničnog stresa i ovarijektomije na antioksidacijski status jetre odraslih štakora

Tomašević, Matea

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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:181:144763

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

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

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Preddiplomski studij biologije

Matea Tomašević

Utjecaj kroničnog stresa i ovarijektomije na antioksidacijski status jetre odraslih štakora

Završni rad

Mentorica: doc. dr. sc. Rosemary Vuković

Osijek, 2017. godina

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Završni rad

Odjel za biologiju

Preddiplomski studij biologije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

UTJECAJ KRONIČNOG STRESA I OVARIJEKTOMIJE NA ANTIOKSIDACIJSKI STATUS JETRE ODRASLIH ŠTAKORA

Matea Tomašević

Rad je izrađen: Laboratorij za biokemiju, Odjel za biologiju, Osijek

Mentorica: dr. sc. Rosemary Vuković, docent

Oksidacijski stres može nastati dugotrajnim izlaganjem organizma stresu, a očituje se povećanjem reaktivnih kisikovih jedinki, koje su u niskim koncentracijama korisne u nekim fiziološkim procesima, dok veće koncentracije uzrokuju oksidacijska oštećenja stanica i tako igraju veliku ulogu u patogenezi različitih ljudskih bolesti. S ciljem istraživanja utjecaja kroničnog stresa na razvoj oksidacijskog stresa i antioksidacijski odgovor jetre neovarijektomiranih (NE-OVX) i ovarijektomiranih (OVX) ženki, odrasle ženke štakora, soja Sprague-Dawley, podvrgnute su protokolu kroničnog stresa. Kao pokazatelj antioksidacijskog odgovora, mjerena je aktivnost antioksidacijskih enzima katalaze (CAT), glutation-reduktaze (GR) i superoksid-dismutaze (SOD). Rezultati su pokazali utjecaj kroničnog stresa na značajno povećanje aktivnosti CAT u skupini OVX ženki. Ovarijektomija je uzrokovala smanjenje aktivnosti GR dok je aktivnost SOD ostala nepromijenjena uslijed kroničnog stresa, kao i uslijed ovarijektomije. Dobiveni rezultati pokazuju kako i kronični stres i manjak estrogena, pojedinačno ili u kombinaciji, kod odraslih ženki štakora, utječu na promjenu antioksidacijskog statusa jetre. Takve promjene upućuju na povećanu proizvodnju reaktivnih kisikovih jedinki koje su uzrok staničnih oštećenja te se povezuju s brojnim patološkim stanjima jetre.

Broj stranica: 23

Broj slika: 5

Broj literaturnih navoda: 49

Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: kronični stres, oksidacijski stres, antioksidacijski enzimi, ovarijektomija, jetra štakora

DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

BSc thesis

Undergraduate Study of Biology

Department of Biology

Scientific area: Natural science

Scientific field: Biology

EFFECT OF CHRONIC STRESS AND OVARIECTOMY ON LIVER ANTIOXIDATIVE STATUS OF ADULT RATS

Matea Tomašević

Thesis performed et: Laboratory of Biochemistry, Department of Biology, Osijek

Supervisor: Ph.D. Rosemary Vuković, assistant professor

Oxidative stress can be caused by prolonged exposure of the body to stress, and is reflected by the increase in reactive oxygen species that are at low concentrations useful in some physiological processes, whereas higher concentrations cause oxidative cell damage and thus play a major role in the pathogenesis of various human diseases. With the aim of elucidating the impact of chronic stress on the oxidative stress development and antioxidative response in liver of non-ovariectomized (NE-OVX) and ovariectomized (OVX) female, Sprague-Dawley adult female rats were exposed to chronic stress protocol. As an indicators of antioxidative response, the activity of antioxidative enzymes catalase (CAT), glutathione-reductase (GR) and superoxide-dismutase (SOD) was measured. Results showed that chronic stress caused a significant increase in CAT activity in the OVX group. The ovariectomy significantly reduced GR activity while SOD activity remained unchanged due to ovariectomy and exposure to chronic stress. The obtained results showed that both chronic stress and estrogene deficiency, either alone or in a combination, could affect antioxidative liver status of adult female rats. Such changes point to increased production of reactive oxygen species that could cause cell damage and could be associated with numerous pathological conditions of liver.

Number of pages: 23

Number of figures: 5

Number of references: 49

Original in: Croatian

Key words: antioxidative enzymes, chronic stress, oxidative stress, ovariectomy, rat liver

Sadržaj

1. UVOD 1
1.1 Kronični stres 1
1.2. Oksidacijski stres 2
1.2.1. Utjecaj na jetru 2
1.2.2. Antioksidacijski enzimi 3
1.2.3. Stres i spolni hormoni 4
1.3. Ciljevi 5
2. MATERIJALI I METODE 6
2.1. Pokusne životinje 6
2.1.1. Protokol kroničnog stresa 7
2.1.2. Kontrolne skupine 8
2.2. Priprema enzimskih ekstrakata 9
2.3. Određivanje aktivnosti katalaze u jetri štakora 9
2.4. Određivanje aktivnosti glutation-reduktaze u jetri štakora 10
2.5. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze u jetri štakora 10
2.6. Određivanje koncentracije ukupnih topljivih proteina 11
2.7. Statistička obrada podataka 11
3. REZULTATI 12
3.1. Aktivnost katalaze 12
3.2. Aktivnost glutation-reduktaze 13
3.3 Aktivnost superoksid-dismutaze 14
4. RASPRAVA 15
5. ZAKLJUČAK 18
6. LITERATURA 19

1. UVOD

1.1 Kronični stres

Svi živi organizmi tijekom čitavog svog životnog razdoblja suočeni su s brojnim promjenama u okolišu. Općenito, preživljavanje znači održavanje složene dinamičke ravnoteže ili homeostaze koja je stalno izložena raznim unutarnjim ili vanjskim štetnim čimbenicima koje nazivamo stresorima (Chrousos, 2009). Fluktuacije u razini kisika, temperature i redoks stanja, primjer su okidača za molekularne događaje koji omogućuju organizmima ne samo da prežive već da se i uspješno prilagode te reproduciraju. Pored ovih svakodnevnih vanjskih stresora, organizmi doživljavaju i stres povezan s morfogenezom i promjenama unutar njih samih tijekom normalnog razvoja (Kagias i sur., 2012). Stres stoga predstavlja stanje ugrožene homeostaze putem bilo kojeg neželjenog stresora koji može biti psihološki, okolišni ili fiziološki, a sposobnost nekog organizma da se 'nosi' s takvim stresorima predstavlja odlučujući korak u održavanju zdravlja i nastanku bolesti (Nadeem i sur., 2006).

Ovisno o trajanju i jačini izloženosti organizma nekom stresoru, razlikujemo akutni i kronični stres koji mogu dovesti do raznih patoloških tjelesnih i mentalnih stanja. Akutni stres je stanje organizma koje nastaje kratkotrajnim i svakodnevnim izlaganjima nekom stresoru te kod kojeg dolazi do reakcije „borba ili bijeg“ (engl. *fight or flight*) dok je kronični stres puno dugotrajniji i može dovesti do puno težih bolesti i stanja (Chrousos, 2009). Istraživanja pokazuju da gotovo svaki tjelesni sustav može biti pod utjecajem kroničnog stresa. Ako se izloženost stresu nastavi i nakon početne reakcije „borba ili bijeg“, kronični stres potiskuje imunološki sustav i na kraju se očituje kao bolest (Salleh, 2008). Kada govorimo o kroničnom stresu, bitno je spomenuti i hormone stresa te druge posrednike stresa kao što su neurotransmiteri i citokini, a koji su bitni za prilagodbu na izazove svakodnevnog života koja uključuje borbu protiv velikih životnih stresora svakog pojedinca. Taj proces je poznat pod nazivom 'alostaza' koji označava održavanje stabilnosti ili homeostaze u procesu izloženosti organizma promjenama. Kada se alostatski posrednici, poput kortizola i adrenalina, oslobađaju kao odgovor na stresore ili na različite faktore životnog stila (prehrana, spavanje, vježbanje), njihovo djelovanje dovodi do promoviranja prilagodbe, te tako imaju koristan učinak. No, kada se djelovanje ovih posrednika ne isključuje pri prestanku stresa, ili nije adekvatno uključeno za vrijeme izloženosti stresu, ili kada su isti prekomjerno korišteni od strane raznih stresora, tada nastaju kumulativne promjene koje vode do stanja 'alostatskog opterećenja' (McEwen, 1998). 'Alostatsko opterećenje' odnosi

se na cijenu koju tijelo plaća zbog prisiljavanja da se prilagodi nepovoljnim psihosocijalnim ili fizičkim situacijama, a predstavlja ili prisutnost previše stresa ili neučinkovito djelovanje hormonalnog sustava odgovornog za stres koji se mora uključiti i zatim se ponovno isključiti nakon što stresna situacija završi (McEwen, 2000).

1.2. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres odnosi se na povišene stanične razine reaktivnih kisikovih jedinki (ROS) koje uzrokuju oštećenje lipida, proteina i DNA (Schieber i Chandel, 2014). ROS nastaje iz molekularnog kisika kao rezultat normalnog staničnog metabolizma te se može podijeliti u dvije skupine: slobodni radikali i ne-radikali. Slobodni radikali su kemijski reaktivne molekule čija reaktivnost proizlazi iz toga što sadrže jedan ili više nesparenih elektrona, a najznačajniji za nastanak oksidacijskog stresa su superoksidni anion ($O_2^{\bullet-}$), hidroksilni radikal ($HO^{\bullet}$) te vodikov peroksid (H_2O_2) (Birben i sur., 2012). Zbog takvih posebnih kemijskih svojstava, ROS može inicirati lipidnu peroksidaciju, oštećenja DNA te neselektivno oksidirati gotovo sve molekule bioloških membrana i tkiva što rezultira ozljedom, ali isto tako, organizmu je potreban do određene razine budući da sudjeluje u obavljanju važnih fizioloških funkcija kao što su stanična signalizacija, obrana od invazivnih mikroorganizama te genska ekspresija. Kada koncentracija ROS-a prijeđe razinu do koje je esencijalni posrednik u normalnom funkcioniranju stanice, dolazi do stanja neravnoteže u proizvodnji i uklanjanja istih, a to stanje se definira kao stanje oksidacijskog stresa (Li i sur., 2015).

Važnost oksidacijskog stresa obično se naglašava u patogenezi raznih degenerativnih bolesti, kao što su dijabetes, rak, kardiovaskularni poremećaji ili neurodegenerativne bolest, a koje nedvojbeno mogu biti povezane sa stanjem kroničnog stresa (Cichoż-Lach i Michalak, 2014).

1.2.1. Utjecaj na jetru

Jetra je glavni organ kojeg napada ROS, a jetreni hepatociti primarne su stanice podvrgnute ozljedama uzrokovanim oksidacijskim stresom. Glavni izvori ROS-a u tim stanicama su mitohondriji, mikrosomi i peroksisomi. S obzirom na današnji način života, mnoštvo čimbenika rizika, uključujući alkohol, lijekove, zagađivače okoliša i zračenje mogu potaknuti pojavu oksidacijskog stresa u jetri što zauzvrat rezultira teškim bolestima jetre, kao

što su kronični virusni hepatitis, alkoholna bolest jetre te nealkoholni steatohepatitis (Li i sur., 2015). Klinička izvješća sugeriraju na bliske interakcije između stresora (osobito onih dugotrajnih) i bolesti jetre za koje se pretpostavlja da nastaju putem nakupljanja ROS-a (Đorđević i sur., 2010).

Kod sisavaca je razvijen sofisticirani antioksidacijski sustav za održavanje redoks homeostaze u jetri. Kada dođe do prekomjernog nakupljanja ROS-a, homeostaza će biti poremećena što rezultira oksidacijskim stresom koji igra ključnu ulogu u nastanku jetrenih bolesti i drugih kroničnih i degenerativnih poremećaja. Oksidacijski stres ne samo da uzrokuje oštećenja jetre induciranjem ireverzibilnih promjena lipida, proteina i DNA, nego sudjeluje i u moduliranju puteva koji kontroliraju normalne biološke funkcije. Budući da ti putevi reguliraju transkripciju gena, ekspresiju proteina i staničnu apoptozu, oksidacijski stres smatra se jednim od glavnih patoloških mehanizama zadužen za inicijaciju i progresiju raznih bolesti jetre. Čak štoviše, sustavni oksidacijski stres nastao tijekom bolesti jetre može uzrokovati oštećenja mozga kao i oštećenje i zatajenje bubrega (Li i sur., 2015).

Upravo zbog svoje središnje metaboličke uloge koja uključuje pohranu glikogena, raspadanje eritrocita, sintezu proteina, detoksikaciju te brojne druge, jetra u tijelu pokazuje najveći antioksidacijski enzimski kapacitet u odnosu na ostale organe te je stoga važan dio sustava u borbi protiv oksidacijskog stresa (Navarro-Arevalo i Sanchez-Del-Pino, 1998).

1.2.2. Antioksidacijski enzimi

Aerobni organizmi posjeduju integrirane antioksidacijske sustave koji uključuju enzimske i neenzimske antioksidanse, koji su obično učinkoviti u blokiranju štetnih učinaka ROS-a (Birben i sur., 2012).

Katalaza (CAT) je enzim koji je uglavnom prisutan u peroksisomima stanica sisavaca (Scibior i Czeczot 2006). Jedan je od najučinkovitijih enzima u borbi protiv oksidacijskog stresa, a stanice štiti od H_2O_2, razgrađujući ga na vodu i molekularni kisik. Iako CAT nije esencijalan za neke vrste stanica u normalnim uvjetima, igra važnu ulogu u stjecanju tolerancije na oksidacijski stres u adaptivnom odgovoru stanice (Hunt i sur., 1998).

Glutation-reduktaza (GR) je krucijalni enzim u kataliziranju redukcije glutation-disulfida (GSSH) na glutation (GSH) uz pomoć NADPH (Williams, 1976). Najvećim dijelom je lokaliziran u citosolu, mitohondrijima i kloroplastima (Schirmer i sur., 1939). Određivanje

staničnog omjera GSH i GSSG značajno je u brojnim istraživanjima gdje se koristi kao marker oksidacijskog stresa (Zitka i sur., 2012).

Superoksid- dismutaza (SOD) je enzim koji katalizira dismutaciju $O_2^{\bullet-}$ u kisik i H_2O_2 (Abreu i Cabelli, 2010). Zapravo se radi o skupini enzima SOD koji se kod sisavaca pojavljuje u tri izooblika: citoplazmatski Cu/Zn-SOD (SOD1), mitohondrijski Mn-SOD (SOD2) i izvanstanični EC-SOD (SOD3), a zajednička im je svojstvo aktivacija metalnim ionom (Cu ili Mn). Različita stanična lokacija izooblika SOD osobito je važna za kompartmentaliziranu redoks signalizaciju unutar same stanice (Fukai i Ushio-Fukai, 2011).

Prema modernim konceptima, dokazana je povezanost razvoja patoloških bolesti s pretjeranom proizvodnjom ROS-a te s iscrpljivanjem antioksidacijskog sustava (Ithayaraja, 2011). U ovom radu ispituje se utjecaj kroničnog stresa na antioksidacijski odgovor jetre odraslih ženki štakora koji se očituje u promjenama aktivnosti CAT, GR i SOD. Većina dosadašnjih studija ispitivala je utjecaj akutnog stresa na antioksidacijski obrambeni sustav dok su literaturni podaci o utjecaju kroničnog stresa rijetki (Kaushik i Kaur, 2003).

1.2.3. Stres i spolni hormoni

Mnogo je istraživanja provedeno kako bi se ispitalo djelovanje spolnih hormona u obrani organizma protiv stresa. Smatra se da je odgovor na stres spolno specifičan te je reguliran gonadnim steroidnim hormonima (Kudielka i Kirschbaum, 2005; Goldstein, 2006).

Unatoč postojanju značajne korelacije između stresa i spolnih hormona, mehanizmi pomoću kojih estrogen, testosteron i progesteron obavljaju svoju zaštitnu ulogu u stresnim okolnostima nisu u potpunosti istraženi. Poznato je da je testosteron aktiviran tijekom stresnog odgovora kod štakora i ljudi (Retana-Márqueza i sur., 2003; Hermans i sur., 2007), te da se njegova aktivnost za vrijeme stresnog odgovora povećava više kod muškaraca nego kod žena (Bergman i Brismar, 1994). Posebnu pozornost, kada se govori o povezanosti stresa i spolnih hormona, ima estrogen budući da su žene općenito manje osjetljive na kronični stres od muškaraca, sve do razdoblja menopauze, upravo zbog prisutnosti zaštitnih spolnih hormona (Kudielka i sur., 1999). Djelovanje estrogena ovisi o njegovoj koncentraciji i kemijskoj strukturi. Naime, kod visokih koncentracija, estrogen ima blagotvoran antioksidacijski učinak, dok pri niskim koncentracijama djeluje kao pro-oksidans. U menopauzi, izostanak dostatne razine estrogena,

koja predstavlja djelotvornu antioksidacijsku zaštitu, dovodi do oksidacijskog stresa u različitim tkivima uslijed nakupljanja ROS-a. Oksidacijski stres i u ovom slučaju dovodi do razvoja različitih patoloških stanja karakterističnih za razdoblje menopauze (Doshi i Agarwal, 2013).

Ovarijektomija (kirurško uklanjanje jajnika) predstavlja široko korišten eksperimentalni model ljudske menopauze. Budući da glodavci postaju anovulatorni u zreloj dobi (10-12 mjeseci starosti) te za razliku od žena u tom razdoblju zadržavaju bazalnu estrogensku sekreciju, ovarijektomija kod tih životinja postala je dobar model za oponašanje gubitka hormona u ljudskim jajnicima (Nelson, 2008). Stoga, ne iznenađuje činjenica da je tijekom posljednjih godina došlo do povećanja broja objavljenih radova s naglaskom na posljedice ovarijektomije, uglavnom u ženki štakora, na različite fiziološke funkcije i sustave koji uključuju središnji živčani sustav, kardiovaskularni sustav, jetrene hepatocite, koštani sustav, kožu te brojne imunološke funkcije (Baeza i sur, 2010).

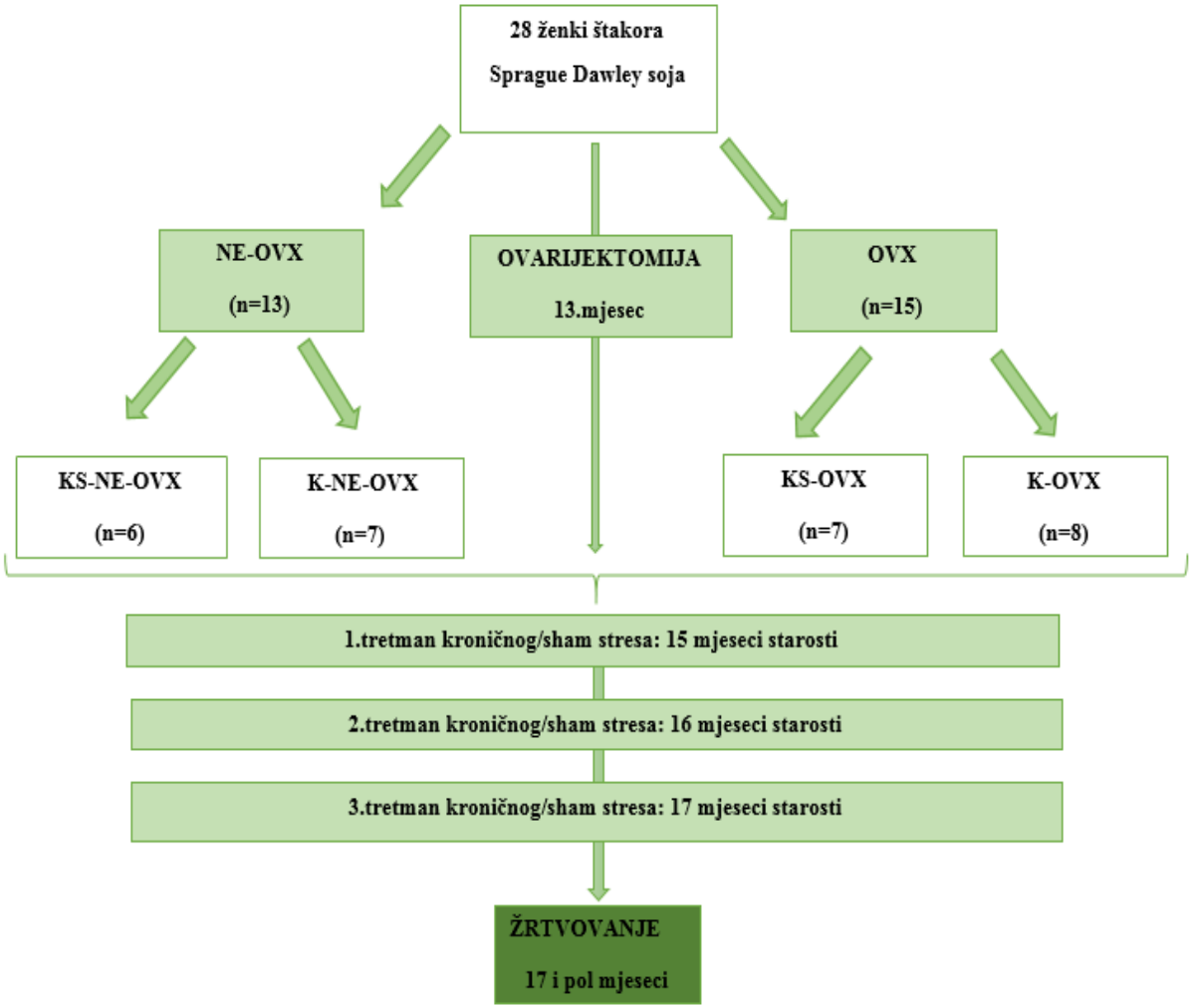
1.3. Ciljevi

1. Odrediti utjecaj kroničnog stresa na antioksidacijski odgovor jetre odraslih ženki štakora
2. Odrediti utjecaj ovarijektomije na antioksidacijski odgovor jetre odraslih ženki štakora
3. Ustanoviti postoje li razlike u antioksidacijskom odgovoru jetre na kronični stres između neovarijektomiranih i ovarijektomiranih odraslih ženki štakora

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Pokusne životinje

Istraživanje je provedeno na životinjama uzgojenim u vivariju Sveučilišta u Szegedu u Mađarskoj. Eksperiment je uključivao 28 ženki štakora, Sprague-Dawley soja, koje su bile podijeljene u dvije glavne skupine: neovarijektomirane ženke (NE-OVX) i ovarijektomirane ženke (OVX). Obje skupine bile su podijeljene na dvije podskupine: kontrolnu skupinu (K) izloženu lažnom (engl. *sham*) stresu i skupinu podvrgnutu kroničnom stresu (KS). Kontrolna skupina izložena lažnom stresu (K-NE-OVX) sastojala se od 7 ženki, dok je u kontrolnoj skupina ovarijektomiranih ženki (K-OVX) bilo 8 jedinki. Skupina izložena kroničnom stresu (KS-NE-OVX) sastojala se od 6 ženki, a skupina ovarijektomiranih ženki (KS-OVX) od 7 jedinki (Slika 1). Ovarijektomija je provedena na ženkama (n=15) u 13. mjesecu starosti. Životinje su bile smještene u standardne kaveze pri sobnoj temperaturi, a standardna laboratorijska hrana i voda bili su dostupni *ad libitum* (neograničeno).



Slika 1. Shema tijeka eksperimenta.

2.1.1. Protokol kroničnog stresa

Nakon uzgoja u vivariju, sve životinje bile su premještene u životinjski eksperimentalni laboratorij. Trinaest jedinki (6 KS-NE-OVX ženki i 7 KS-OVX), nakon navršenih 15 mjeseci starosti, podvrgnuto je tretmanima kroničnog stresa koji su bili ponavljani tri puta tijekom desetodnevnog izlaganja stresu. Razlika između svakog tretmana bila je 2 tjedna, a cijeli protokol je završen kada su jedinke dosegle starost od 17 mjeseci. Stresori korišteni u eksperimentu bili su: 60 minuta stješnjavanja u metalnim cijevima pri +4 ºC, svjetlo upaljeno tijekom noći, zvukovi tijekom noći (alarm mobilnog telefona podešen u nepravilnim vremenskim intervalima), test plivanja (3 minute prisilnog plivanja u hladnoj vodi), rotacija

kaveza (3 minute) te test tolerancije na glukozu (GTT) (Slika 2). Po završetku protokola kroničnog stresa, ženke štakora su anestezirane kombinacijom ketamina (30 $mg \times kg^{-1}$) intramuskularno i inhalacijom izoflurana te potom žrtvovane u dobi od 17 i pol mjeseci. Uzorak jetre zamrznut je u tekućem dušiku te pohranjen na -80 °C do analize.



Slika 2. Oblici stresiranja štakora. A- stješnjavanje u metalnim cijevima; B- rotacija kaveza; C- test plivanja. (Fotografirala: Marta Balog)

2.1.2. Kontrolne skupine

Kontrolne skupine životinja (7 K-NE-OVX i 8 K-OVX) podvrgnute su lažnom (*sham*) stresu. Lažni stres podrazumijeva iste uvjete okoliša i rukovanja kao kod skupina životinja podvrgnutih kroničnom stresu, ali s izostavljenim stresorima. Protokol je uključivao *sham* verziju kada su npr. KS skupine bile izložene stresu stješnjavanja u metalnim cijevima (60 minuta pri +4ºC), K skupine su smještene u isti okoliš, ali pri sobnoj temperaturi i s metalnim cijevima širom otvorenim ili npr. kada su KS skupine bile podvrgnute prisilnom plivanju u

hladnoj vodi 3 min, K skupine bile su stavljene u identične prazne kontejnere 3 minute. Protokol je također ponavljan 3 puta tijekom desetodnevnog izlaganja lažnom stresu sve dok životinje nisu navršile 17 i pol mjeseci kada su bile žrtvovane i pripremljene za daljnje analize. Skupina od 13 neovarijektomiranih ženki štakora (NE-OVX) također je lažno operirana kako bi se postigli isti uvjeti okoliša i rukovanja te predstavlja kontrolnu skupinu naspram skupine 15 ovarijektomiranih ženki (OVX).

2.2. Priprema enzimskih ekstrakata

Zamrznuti uzorci jetre prvo su bili vagani te stavljeni u epice od 2 mL. Za određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima te koncentracije ukupnih topljivih proteina, jetreno tkivo homogenizirano je u 100 mM Na-fosfatnom puferu (pH 7.0) koji je sadržavao 1 mM EDTA pomoću Ultra turrax T10 homogenizatora (1300 rpm; IKA, Königswinter, Njemačka). Dobiveni homogenati su zatim bili raspodijeljeni u epice od 1.5 mL te držani na ledu 10 minuta nakon čega su bili centrifugirani 15 min pri 20 000 g na 4 ºC. Dobiveni supernatanti korišteni su za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima CAT, GR i SOD te za određivanje koncentracije ukupnih topljivih proteina.

2.3. Određivanje aktivnosti katalaze u jetri štakora

Aktivnost CAT određena je spektrofotometrijski koristeći H_2O_2 kao supstrat, metodom po Aebiju (1984; jednadžba (1)). Reakcijska smjesa za mjerenje aktivnosti CAT sastojala se od 50 mM Na-fosfatnog pufera (pH=7.0) i 0.036% otopine H_2O_2 (A_{240} 0,550-0,520). Reakcija započinje dodavanjem 50 µL enzimskog ekstrakta prethodno razrijeđenog 50× u 1450 µL reakcijske smjese. Pad apsorbancije uslijed razgradnje H_2O_2 praćen je svakih 10 sekundi tijekom 3 minute pri valnoj duljini od 240 nm u UV-kiveti. Jedna jedinica aktivnosti CAT definirana je kao količina razgrađenog H_2O_2 (µmol) po minuti po miligramu proteina, odnosno aktivnost CAT izražena je u enzimskim jedinicama (U) po miligramu proteina ($U \times mg^{-1}$ proteina; $U = \mu mol \times min^{-1}$proteina).

$$2H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2H_2O + O_2 \qquad (1)$$

2.4. Određivanje aktivnosti glutation-reduktaze u jetri štakora

Aktivnost GR u enzimskim ekstraktima određena je prema metodi koju su opisali Dolphin i suradnici (1989). Metoda se temelji na redukciji GSSG-a uz prisustvo GR-a te NADPH kao reducensa (jednadžba (2)). U UV-kivetu dodano je 400 μL reakcijskog pufera (100 mM Na-fosfatni pufer pH 7.5, 1 mM EDTA) 500 μL 2 mM otopine oksidiranog glutationa (GSSG), 50 μL enzimskog ekstrakta koji je prethodno razrijeđen 2× te 50 μL 2 mM otopine NADPH. Enzimska reakcija započinje odmah nakon dodatka NADPH, a prati se pad apsorbancije na 340 nm, svakih 10 sekundi kroz 2 minute, koji se javlja zbog oksidacije NADPH, odnosno smanjenja količine NADPH. Jedna jedinica enzima reducira 1 μmol GSSG po minuti pri pH 7.6 i 25 °C. Specifična aktivnost GR izražena je kao količina (μmol) NADPH po minuti po gramu proteina, odnosno aktivnost GR izražena je u enzimskim jedinicama (U) po gramu proteina ($U \times g^{-1}$proteina; $U = \mu mol \times min^{-1}$).

$$\beta - NADPH + GSSG \xrightarrow{GR} \beta - NADP + 2\,GSH \qquad (2)$$

2.5. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze u jetri štakora

Aktivnost SOD u enzimskim ekstraktima određena je prema metodi koju su opisali Flohe i Otting (1971; jednadžba (3), (4), (5)). Aktivnost je mjerena kao stupanj inhibicije redukcije citokroma C superoksidnim radikalom ($O_2^{\bullet -}$), 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 pripremana je u VIS kiveti, a sastojala se od 1450 μL reakcijskog koktela (0.05 mM otopina citokroma C, 1 mM otopinom ksantina), 25 μL enzimskog ekstrakta koji je prethodno razrijeđen 20× sa 100 mM Na-fosfatnim puferom (pH 7.0) koji je sadržavao 1 mM EDTA, a 25 μL XOD koncentracije 0.1 $U \times mL^{-1}$ dodano je neposredno prije mjerenja. Porast apsorbancije praćen je na 550 nm tijekom 3 minute, svakih 30 sekundi. Jedinica SOD-a definirana je kao količina enzima potrebnog za 50-postotnu inhibiciju redukcije citokroma C, a aktivnost SOD-a izražena je kao $U \times mg^{-1}$ proteina.

$$\text{Ksantin} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{XOD}} \text{mokraćna kiselina} + O_2^{\bullet -} + H^+ \quad (3)$$

$$\text{Citokrom}^{3+}\text{ C (oksidirani)} + O_2^{\bullet -} \longrightarrow \text{Citokrom}^{2+}\text{ C (reducirani)} + O_2 \quad (4)$$

$$2\ O_2^{\bullet -} + 2\ H^+ \xrightarrow{\text{SOD}} O_2 + H_2O_2 \quad (5)$$

2.6. Određivanje koncentracije ukupnih topljivih proteina

Koncentracija ukupnih topljivih proteina određena je metodom po Bradford-u (1976) koja se temelji na brzom pomaku maksimuma apsorbancije od 465 nm na 595 nm, kada se boja Coomassie briljant plavo veže na proteine u kiseloj otopini. Kao proteinski standard korišten je albumin goveđeg seruma.

Uzorci su prije mjerenja razrijeđeni 100× pomoću 100 mM Na-fosfatnog pufera (pH 7.0) koji je sadržavao 1 mM EDTA te je 100 µL razrijeđenog uzorka dodano u po dvije epice za svaki uzorak. Nakon dodavanja 1 mL reagensa Bradford, epica se vorteksira. Slijedi inkubacija od 5 min pri sobnoj temperaturi nakon čega se sadržaj epice prebacuje u kivetu te se mjeri apsorbancija pri 595 nm.

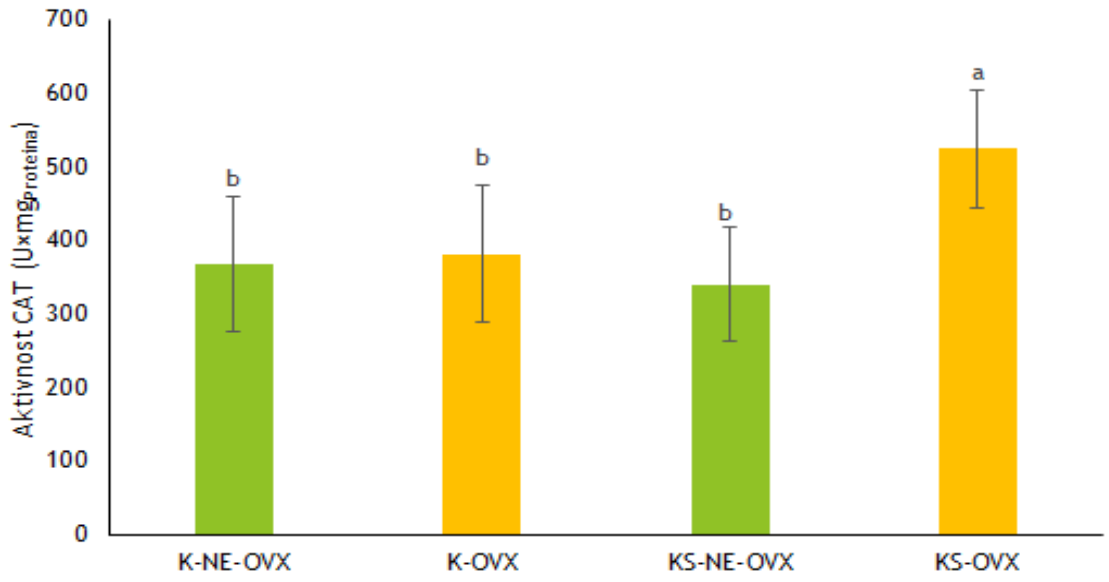
2.7. Statistička obrada podataka

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

3. REZULTATI

3.1. Aktivnost katalaze

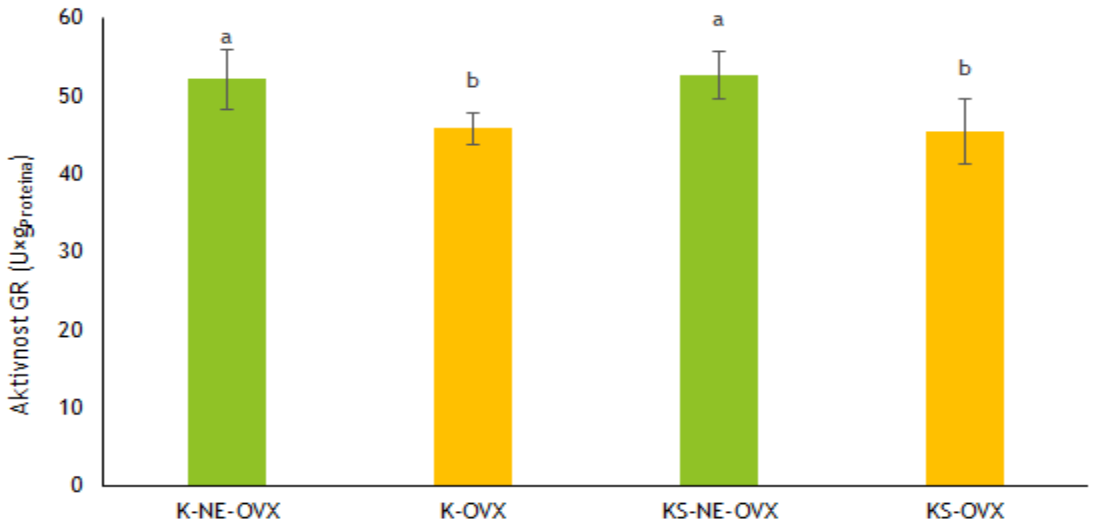
Kod neovarijektomiranih ženki koje su bile izložene kroničnom stresu (KS-NE-OVX) nije zabilježena značajna promjena aktivnosti CAT u odnosu na kontrolu K-NE-OVX. Kod skupine ovarijektomiranih ženki (KS-OVX) kronični stres značajno je utjecao na povećanje aktivnosti CAT u odnosu na kontrolu K-OVX. Kronični stres utjecao je na povećanje aktivnosti CAT za 27.41 % u odnosu na K-OVX. Ovarijektomija nije značajno utjecala na aktivnost CAT u kontrolnoj skupini K-OVX u odnosu na kontrolnu skupinu K-NE-OVX.



Slika 3. Aktivnost katalaze (CAT) u jetri odraslih ženki štakora izloženih kroničnom stresu (neovarijektomirane ženke - zeleni stupići, ovarijektomirane ženke - žuti stupići). K-NE-OVX: kontrolna skupina ženki izložena lažnom stresu; K-OVX: kontrolna skupina ovarijektomiranih ženki izložena lažnom stresu; KS-NE-OVX: skupina ženki izložena kroničnom stresu; KS-OVX: skupina ovarijektomiranih ženki izložena kroničnom stresu. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Razlike između skupina testirane su Newman-Keuls *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

3.2. Aktivnost glutation-reduktaze

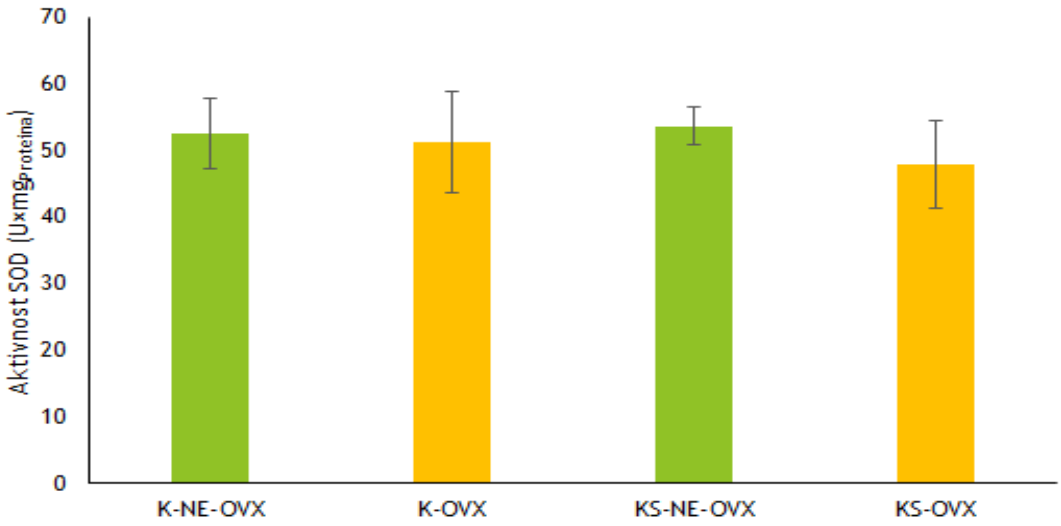
Aktivnost GR u skupini neovarijektomiranih ženki (KS-NE-OVX) nije se značajno promijenila nakon izlaganja kroničnom stresu u odnosu na kontrolu K-NE-OVX, kao niti kod ovarijektomiranih ženki (KS-OVX) u odnosu na kontrolu K-OVX. Ovarijektomija je pak uzrokovala značajno smanjenje aktivnosti GR u kontrolnoj skupini K-OVX u odnosu na kontrolnu skupinu K-NE-OVX.



Slika 4. Aktivnost glutation-reduktaze (GR) u jetri odraslih ženki štakora izloženih kroničnom stresu (neovarijektomirane ženke - zeleni stupići, ovarijektomirane ženke - žuti stupići). K-NE-OVX: kontrolna skupina ženki izložena lažnom stresu; K-OVX: kontrolna skupina ovarijektomiranih ženki izložena lažnom stresu; KS-NE-OVX: skupina ženki izložena kroničnom stresu; KS-OVX: skupina ovarijektomiranih ženki izložena kroničnom stresu. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Razlike između skupina testirane su Newman-Keuls *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

3.3 Aktivnost superoksid-dismutaze

Aktivnost SOD nije se statistički značajno promijenila u ispitivanim skupinama niti nakon izlaganja jedinki kroničnom stresu niti nakon ovarijektomije te nije uočena statistički značajna razlika među skupinama.



Slika 5. Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) u jetri ženki štakora izloženih kroničnom stresu (neovarijektomirane ženke - zeleni stupići, ovarijektomirane ženke - žuti stupići). K-NE-OVX: kontrolna skupina ženki izložena lažnom stresu; K-OVX: kontrolna skupina ovarijektomiranih ženki izložena lažnom stresu; KS-NE-OVX: skupina ženki izložena kroničnom stresu; KS-OVX: skupina ovarijektomiranih ženki izložena kroničnom stresu. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Razlike između skupina testirane su Newman-Keuls *post hoc* testom.

4. RASPRAVA

Svrha ovog istraživanja bila je utvrditi utjecaj kroničnog stresa i ovarijektomije na aktivnost antioksidacijskih enzima CAT, GR i SOD kod ženki odraslih štakora te ustanoviti postoji li razlika u antioksidacijskom odgovoru između starijih i mlađih ženki štakora na iste uvjete stresa. Oksidacijski stres predstavlja poremećaj ravnoteže između proizvodnje ROS-a i antioksidacijske obrane (Betteridge, 2000). Zbog svoje metaboličke aktivnosti, koja je od velike važnosti za cijeli organizam, jetra je organ koji je posebno osjetljiv na oksidacijski stres, a poznato je da kronične bolesti jetre gotovo uvijek obilježava povećan oksidacijski stres, bez obzira na uzrok poremećaja (Cichoż-Lach i Michalak, 2014). Kao zaštitu od oštećenja uzrokovanih slobodnim radikalima i srodnim reaktantima, organizmi su razvili nekoliko obrambenih mehanizama za brzo i učinkovito uklanjanje ROS-a iz unutarstaničnog okruženja. Antioksidacijski obrambeni sustavi mogu se općenito klasificirati u neizravne enzimske antioksidacijske enzime i u molekule male molekulske težine koje izravno uklanjaju slobodne radikale i srodne reaktante. Antioksidacijski enzimi predstavljaju prvu liniju obrane protiv tih toksičnih reaktanata njihovim metaboliziranjem na neškodljive nusprodukte (Rodriguez i sur., 2004).

Kronično izlaganje stresu mijenja normalnu homeostazu organizma i dovodi do razvoja raznih patoloških stanja koja mogu uključivati promjene u antioksidacijskom obrambenom sustavu (Kaushik i Kaur, 2003). Oksidacijska oštećenja koja pri tome nastaju mogu biti rezultat prevelike proizvodnje i nakupljanja ROS-a u stanicama, ali isto tako i smanjene aktivnosti antioksidacijskih enzima. U našem istraživanju, jedino je smanjena aktivnost enzima (GR) uočena kod ženki štakora prethodno podvrgnutima ovarijektomiji (K-OVX) u odnosu na kontrolnu neovarijektomiranu skupinu (K-NE-OVX). To se može povezati s manjkom estrogena nastalog ovarijektomijom budući da estrogeni imaju antioksidacijska svojstva koja su u skladu s njihovom sposobnošću da se vežu na estrogenske receptore i na taj način reguliraju ekspresiju antioksidacijskih enzima putem unutarstaničnih signalnih puteva (Borrás i sur., 2010). U skupinama neovarijekotmiranih i ovarijektomiranih ženki koje su bile izložene kroničnom stresu (KS-NE-OVX i KS-OVX), aktivnost GR nije se značajno promijenila u odnosu na njihove kontrolne skupine što nije u skladu s nekim prethodnim istraživanjima u kojima se nakon izlaganja akutnom ili kroničnom stresu aktivnost GR znatno smanjuje ili povećava (Đorđević i sur., 2010; Vuković i sur., 2014). Slični rezultati dobiveni su i nakon mjerenja aktivnosti SOD-a budući da se ona nije statistički značajno mijenjala u ispitivanim skupinama niti nakon izlaganja jedinki kroničnom stresu niti nakon ovarijektomije. Objašnjenje

bi mogla biti moguća enzimska adaptacija na povećano stvaranje radikala nakon ovarijektomije i izlaganja stresu, koja predstavlja važan mehanizam pomoću kojeg se stanice nose s negativnim fiziološkim i okolišnim uvjetima koji pridonose nastanku oksidacijskog stresa u organizmu, te na taj način održavaju naizgled narušenu homeostazu, koja djelovanjem takvog mehanizma ostaje očuvana (Pickering i sur., 2013). Nepromijenjenost aktivnosti SOD-a mogla bi se objasniti i činjenicom da su i nakon ovarijektomije neke životinje još uvijek sposobne za sintezu estrogena u perifernim tkivima. Naime, sam postupak može izazvati hiperfagiju (povećan apetit) koji zauzvrat rezultira znatnim povećanjem tjelesne mase (Gale i Sclafani, 1977). Povećanje tjelesne mase samo po sebi predstavlja značajan izvor estrogena budući da je periferno tkivo sposobno pretvoriti adrenalinski sintetizirane androgene prekursore u estrogen (Brodie, 1991; Simpson, 1999). Takav oblik estrogena, koji je 'sačuvan' uslijed ove neobične posljedice ovarijetkomije, bi u našem primjeru mogao biti zaslužan za održavanje konstantne razine aktivnosti SOD-a i uslijed izlaganja kroničnom stresu, budući da nije uočena statistički značajna razlika između ispitivanih skupina. Nasuprot smanjene aktivnosti GR-a kod ovarijektomiranih ženki i nepromijenjene aktivnosti SOD-a unutar svih ispitanih skupina, kronični stres je kod ovarijektomiranih ženki uzrokovao značajno povećanje aktivnosti CAT. Ovaj rezultat potvrđuje istraživanje Kankofera i sur. (2007) koji su utvrdili povećanje ukupnog antioksidacijskog kapaciteta u OVX štakorima, što bi moglo upućivati na veće zahtjeve organizma za antioksidacijsku zaštitu uslijed nakupljanja ROS-a.

Ako bismo ove rezultate usporedili s rezultatima dobivenima u istraživanju na ženkama mlađih štakora (Vuković, 2016), uočili bismo neke značajne razlike. Naime, kronični stres je u jetri mlađih neovarijektomiranih ženki uzrokovao pojavu oksidacijskog stresa, ali uz značajno smanjenje aktivnosti CAT. Isto tako, ovarijektomija je također uzrokovala pojavu oksidacijskog stresa, ali se u jetri mlađih ovarijektomiranih ženki značajno smanjila aktivnost sva tri antioksidacijska enzima čija aktivnost je ispitivana i ovdje (CAT, GR, SOD), a sam odgovor ovarijektomiranih ženki na kronični stres znatno se razlikovao u odnosu na neovarijektomirane ženke.

Iz navedenog možemo zaključiti da postoje određene razlike u antioksidacijskom odgovoru jetre ženki štakora na kronični stres i ovarijektomiju između mlađih i starijih jedinki, a logično traženje uzroka takvim razlikama leži u samom procesu starenja. Iako su brojne studije pokazale korelaciju između *in vivo* oksidacijskog oštećenja i procesa starenja, posebna pozornost se i dalje pridodaje procjeni izravnih učinaka antioksidacijskih sustava na procese starenja koja uključuje procjene antioksidacijskih profila starijih u usporedbi s mlađim

organizmima. S jedne strane, razumno je pretpostaviti da povećanje oksidacijskog stresa i oštećenja staničnih sastojaka povezanih sa starenjem mogu biti posljedica smanjenja efikasnosti antioksidacijskih obrambenih sustava, ali takva pretpostavka se u istraživanjima nad mnogim organizmima i njihovim pripadajućim tkivima nije pokazala dosljednom. Sigurno je da postoje studije koje podupiru ideju da sa starenjem dolazi do smanjenja antioksidacijskog odgovora (Hagen, 2003), ali postoje i značajni podaci koji upućuju na to da nema općenitog smanjenja aktivnosti pojedinih antioksidacijskih enzima. Jedno od takvih istraživanja objavili su Rikans i sur. (1991) koji su utvrdili da u jetri ženki štakora sa starenjem dolazi do povećanja aktivnosti CAT. Takav nedostatak dosljednosti u smanjenju aktivnosti antioksidacijskih enzima sugerira na to da antioksidacijski mehanizmi zajedno s pripadajućim enzimima ne mogu predstavljati primarni faktor koji ograničava stupanj staničnog oksidacijskog oštećenja koje nastupa sa starenjem (Kregel i Zhang, 2007). Vodeći se tim saznanjima, kao i dobivenim rezultatima ovog istraživanja koja su pokazala povećanu aktivnost CAT u skupini ovarijekotmiranih ženki nakon izlaganja stresu, zaključili bismo da se i ovdje radi o puno većim zahtjevima organizma za antioksidacijskom zaštitom, budući da kombinacija ovarijektomije i kroničnog stresa dovodi do nastanka puno većih količina ROS-a nego primjerice samo izlaganje kroničnom stresu. Isto tako, nepromijenjenost aktivnosti SOD-a i GR-a između ispitivanih skupina ovog istraživanja, upućuje na to da procesom starenja još više jača enzimska adaptacija na povećano stvaranje radikala te tako značajno doprinosi smanjenju njihovih štetnih učinaka. Ovoj pretpostavci u korist ide i pojam tzv. pozitivnog oksidacijskog stresa, koji se odnosi na nusprodukte proteinske i lipidne oksidacije za koje postoje sve brojniji dokazi da mogu biti korisni u induciranju adaptivnog odgovora stanica i njihovo očuvanje. Iako je poznato da visoka stopa oksidacijske ekspresije često dovodi do oksidacijskog oštećenja i stanične smrti, umjerena razina oksidacijskog stresa koja se u ovom slučaju naziva pozitivnim oksidacijskim stresom, izazvana različitim stresorima, može dati pozitivne učinke na prilagodljive stanične reakcije uslijed patoloških izazova u starenju i toleranciji bolesti (Yan, 2014).

5. ZAKLJUČAK

1. Kronični stres uzrokovao je jedino značajnu promjenu aktivnosti enzima CAT u skupini ovarijekotmiranih ženki u kojoj je došlo do povećanja aktivnosti CAT u odnosu na kontrolnu skupinu.
2. Ovarijektomija, odnosno manjak estrogena, uzrokovala je smanjenje aktivnosti GR, dok nije imala učinka na aktivnosti drugih antioksidacijskih enzima.
3. Dobiveni rezultati pokazuju kako i kronični stres i manjak estrogena, pojedinačno ili u kombinaciji, kod odraslih ženki štakora, djelomično utječu na promjenu antioksidacijskog statusa jetre. Takve promjene upućuju na moguću povećanu proizvodnju reaktivnih kisikovih jedinki koje su uzrok staničnih oštećenja te se povezuju s brojnim patološkim stanjima jetre. S druge strane, neznatan utjecaj kroničnog stresa i ovarijektomije na aktivnosti mjerenih antioksidacijskih enzima u skladu je s nekim istraživanjima koja su pokazala da uslijed procesa starenja i izlaganja dugoročnom stresu ne mora nužno doći do smanjenja ukupnog antioksidacijskog kapaciteta i stvaranja oksidacijskog stresa.
4. Odgovor starijih ženki na kronični stres i ovarijektomiju znatno se razlikuje u odnosu na mlađe ženke što bi se moglo objasniti jačanjem mehanizma enzimske adaptacije na stvaranje radikala sa starenjem, ali i prisustvom određene količine zaštitnih estrogena nakon postupka ovarijektomije koji se stvara u perifernim tkivima uslijed povećanja tjelesne mase.

6. LITERATURA

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.

Baeza I, De Castro NM, Giménez-Llort L, De la Fuente M. 2010. Ovariectomy, a model of menopause in rodents, causes a premature aging of the nervous and immune systems. *J Neuroimmunol.* 219(1-2):90-9.

Bergman B, Brismar B. 1994. Hormone levels and personality traits in abusive and suicidal male alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res.* 18:311-6.

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

Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 5(1):9-19.

Borrás C, Gambini J, López-Grueso R, Pallardó FV, Viña J. 2010. Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1802:205–211

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

Brodie A. 1991. Aromatase and its inhibitors—an overview. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 40:255–261.

Chrousos GP. 2009. Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol.* 5:374-381.

Cichoż-Lach H, Michalak A. 2014. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J Gastroenterol.* 20:8082-8091.

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

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

Đorđević J, Đorđević A, Adžić M, Niciforović A, Radojčić MB. 2010. Chronic Stress Differentially Affects Antioxidant Enzymes and Modifies the Acute Stress Response in Liver of Wistar Rats. *Physiol Res.* 59:729-736.

Flohé L, Ötting F. 1971. Superoxide dismutase assays. *Method Enzymol.* 105:93-104.

Fukai T, Ushio-Fukai M. 2011. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxid Redox Signal.* 15(6):1583-606.

Gale SK, Sclafani A. 1977. Comparison of ovarian and hypothalamic obesity syndromes in the female rat: effects of diet palatability on food intake and body weight. *J Comp Physiol Psychol.* 91:381–392.

Goldstein I, editor. 2006. Women's sexual function and dysfunction: study, diagnosis and treatment. London: Taylor & Francis; 760p

Hagen TM**.** 2003. Oxidative stress, redox imbalance, and the aging process. *Antioxid Redox Signal.* 5: 503–506,

Hermans EJ, Putmanc P, Baasa JM, Gecksa NM, Kenemansa JL, Honka J. 2007. Exogenous testosterone attenuates the integrated central stress response in healthy young women. *Psychoneuroendocrinology.* 32:1052-61

Hunt C, Sim JE, Sullivan SJ, Featherstone T, Golden W, Kapp-Herr CV, Hock RA, Gomez RA, Parsian AJ, Spitz DR. 1998. Genomic instability and catalase gene amplification induced by chronic exposure to oxidative stress. *Cancer Res.* 58:3986–3992.

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

Kagias K, Nehammer C, Pocock R. 2012. Neuronal responses to physiological stress. *Front Genet.* 3:222

Kankofer M, Radzki RP, Bienko M, Albera E. 2007. Anti-oxidative/oxidative status of rat liver after ovariectomy. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 54:225–9.

Kaushik S, Kaur J. 2003. Chronic cold exposure affects the antioxidant defense system in various rat tissues. *Clin Chim Acta.* 333:69-77.

Kregel KC, Zhang HJ. 2007. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *American Journal of Physiology* vol. 292 no. 1 R18-R36

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.

Kudielka BM, Kirschbaum C. 2005. Sex differences in HPA axis responses to stress: a review. *Biol Psychol.* 69:113-32.

Li S, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW, Feng Y. 2015. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *Int J Mol Sci.* 16(11):26087-124.

McCord JM, Fridovich I. 1969. *J Bioi Chem.* 244:6049-6055.

McEwen, BS. 1998. Protective and damaging effects of stress mediators. *N Engl J Med.* 338: 171–179.

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

Nadeem A, Masood A, Masood N, Afzal Gilani R, Ahmad Shah Z. 2006. Immobilization stress causes extra-cellular oxidant-antioxidant imbalance in rats: Restoration by L-NAME and vitamin E. *Eur Neuropsychopharmacol.* 16:260-267.

Navarro-Arevalo A, Sanchez-Del Pino MJ. 1998. Age and exercise-related changes in lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in liver and soleus muscle tissues of rats. *Mech Ageing Dev.* 104:91-102.

Nelson HD. 2008. Menopause. *Lancet* 371, 760–770

Pickering AM, Vojtovich L, Tower J, Davies KJA. 2013. Oxidative stress adaptation with acute, chronic and repeated stress. *Free Radic Biol Med.* 55:109–118.

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.* 44:327-37.

Rikans LE**,** Moore DR, Snowden CD. 1991. Sex-dependent differences in the effects of aging on antioxidant defense mechanisms of rat liver. *Biochim Biophys Acta.* 1074:195–200.

Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, Reiter RJ. 2004. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res.* 36:1-9

Salleh MR. 2008. Life event, stress and illness. *Malays J Med Sci.* 15(4):9-18.

Schieber M, Chandel NS. 2014. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol.* 24(10):R453-62.

Schirmer RH, Krauth-Siegel RL, Schulz GE. 1939. Glutathione reductase. In: Dolphin D, Poulson R, Avramovic O (eds) Glutathione: chemical, biochemical and medical aspects, Part A. Wiley, New York, pp 553–596

Scibior D, Czeczot H. 2006. Catalase: structure, properties, functions. *Postepy Hig Med Dosw.* 60:170-180.

Simpson E, Rubin G, Clyne C, Robertson K, O'Donnell L, Davis S, Jones M. 1999. Local estrogen biosynthesis in males and females. *Endocr Relat Cancer.* 6:131–137.

Vuković R, Blažetić S, Oršolić I, Heffer M, Vari SG, Gajdoš M, Krivošikova Z, Kramárová P, Kebis A, Has-Schön E. 2014. Impact of ovariectomy, high fat diet, and lifestyle modifications on oxidative/antioxidative status in the rat liver. *Croat Med J.* 55:218-227.

Vuković A. 2016. Sex-specific oxidative and antioxidative status in the liver of the chronically and acutely stressed rats.

Williams CH Jr. 1976. Flavin-containing dehydrogenases. In: Boyer PD (ed) The enzymes, vol 13. Academic Press, Inc., New York, pp 90–173

Yan LJ. 2014. Positive oxidative stress in aging and aging-related disease tolerance. *Redox Biol.* 2:165-9.

Zitka O, Skalickova, 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.