

# Utjecaj inervacije na ekspresiju neuralne sintetaze dušikova monoksida u skeletnim mišićima štakora

---

Šoić-Vranić, Tamara

Doctoral thesis / Disertacija

2002

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:188:587694>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-24**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET

Tamara Šoić-Vranić

**UTJECAJ INERVACIJE NA EKSPRESIJU NEURALNE  
SINTETAZE DUŠIKOVA MONOKSIDA U SKELETNIM  
MIŠIĆIMA ŠTAKORA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Rijeka, 2002.

**Mentor: Doc.dr.sc. Romana Jerković**

Doktorska disertacija obranjena je dana..... na Medicinskom fakultetu u Rijeci pred povjerenstvom u sastavu:

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.

UDK klasifikacija: 611.73:611-018(043)

*Neizmjernu zahvalnost dugujem svom mentoru doc.dr.sc. Romani Jerković na bezgraničnoj pomoći, razumijevanju i podršci tijekom izrade ovog rada.*

*Iskrenu zahvalnost dugujem prof.dr.sc. Dragici Bobinac na dragocjenoj pomoći.*

*Zahvalnost upućujem i svim ostalim članovima Zavoda za anatomiju koji su mi u bilo kojem trenutku pritekli u pomoć i pomogli da ovaj rad dođe svome kraju.*

## SAŽETAK

**CILJ** Cilj ovog istraživanja bio je proučiti ekspresiju neuralne sintetaze dušikova monoksida (nNOS) u brzim i sporim skeletnim mišićima štakora s obzirom na tip mišićnih vlakana. Također smo željeli utvrditi utjecaj denervacije i električne stimulacije na ekspresiju nNOS-a u brzim i sporim mišićima te proučiti na koji način proces regeneracije utječe na ispoljavanje nNOS-a.

**MATERIJAL I METODE** U ovom radu korišteni su Wistar štakori, a imunohistokemijska metoda te Western blot analiza primjenjena je na brzim (m. extensor digitorum longus i m. tibialis anterior) i sporim (m. soleus) skeletnim mišićima. U jednoj pokusnoj skupini izvršena je denervacija mišića presijecanjem n. ischiadicusa proksimalno od njegova grananja. U drugoj pokusnoj skupini denervirani mišići su električki stimulirani pomoću implantiranih elektroda. U trećoj skupini životinja proces regeneracije induciran je ubrizgavanjem lokalnog anestetika bupivakaina u mišić.

**REZULTATI** Imunohistokemijskom metodom pokazali smo da je nNOS najjače ispoljen u brzim vlaknima tipa IIA i IIX, puno slabije u vlaknima tip I dok uopće nije prisutan na sarkolemi vlakana tipa IIB. Western blot analizom dokazali smo značajno smanjenje ekspresije nNOS-a na sarkolemi denerviranih sporih i brzih mišića. Također smo pokazali da je električnom stimulacijom sporog mišića moguće pobuditi ispoljavanje nNOS-a do vrijednosti kao i u brzom mišiću. Konačno, uočili smo prolaznu inhibiciju nNOS ekspresije tijekom procesa regeneracije u skeletnom mišiću. Deset dana nakon injekcije bupivakaina vrijednosti nNOS-a vraćaju se na normalne vrijednosti.

**ZAKLJUČAK** Rezultati pokazuju da je ispoljavanje nNOS-a u skeletnom mišiću ovisno o tipu mišićnog vlakna. Glavni zaključak koji iz ovog rada proizlazi je da inervacija tj. živčana aktivnost regulira ekspresiju nNOS-a u skeletnom mišiću. Ova činjenica mogla bi biti doprinos u razumijevanju patogeneze neuromišićnih oboljenja.

**Ključne riječi:** Neuralna sintetaza dušikova monoksida; Mišić, skeletni; Denervacija; Regeneracija; Western blot; Imunohistokemija.

## SUMMARY

**OBJECTIVES** The aim of this study is to investigate the fiber type specific expression of neuronal isoform of nitric oxide synthase (nNOS) in both fast and slow rat skeletal muscles. The goal of our investigation is also to explore the influence of denervation and electrical stimulation on nNOS expression in fast twitch and slow-twitch muscles. Finally, in order to determine nNOS expression during muscle regeneration we have injected local anesthetic in skeletal muscle.

**MATERIAL AND METHODS** All experiments were performed on male Wistar rats. Immunohistochemical and Western blot analysis were performed on fast (m. tibialis anterior and m. extensor digitorum longus) and slow (m. soleus) skeletal muscles. In one group of animals denervation of rat skeletal muscles was performed by unilateral right sciatic nerve transection proximally to its branching. In second group of animals muscles were stimulated through electrodes implanted on muscle for direct activation. In third experiment regeneration process was induced by injection of local anesthetic, bupivacain.

**RESULTS** By immunohistochemical analysis of muscle cryosections of EDL and TA rat skeletal muscles we demonstrated that the staining for nNOS expression was similar in type IIA and IIX at the lower level in type I, while it was absent in IIB muscle fibers. By Western blot analysis we have shown a significant downregulation of nNOS on sarcolemma of fast and slow denervated muscles. We have also demonstrated that electrical stimulation is able to induce upregulation of nNOS expression. Induction of muscle regeneration caused a transient downregulation of nNOS but reestablishment of neuromuscular junction restored a normal levels of nNOS.

CONCLUSION Our results are showing that nNOS expression is fiber type specific. The main conclusion of our investigation is that neural activity is important for regulation of nNOS expression which could be involved in pathogenesis of neuromuscular disorders.

Key words: Neuronal nitric oxide synthase; Muscle, skeletal; Denervation; Regeneration; Blotting, Western; Immunohistochemistry.



## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. SKELETNO MIŠIĆNO TKIVO</b> .....	1
1.1.1. GRAĐA SKELETNIH MIŠIĆNIH VLAKANA.....	1
1.1.2. MEHANIZAM KONTRAKCIJE SKELETNOG MIŠIĆA.....	6
1.1.3. HETEROGENOST SKELETNIH MIŠIĆA.....	9
1.1.4. PLASTIČNOST SKELETNIH MIŠIĆIH VLAKANA.....	13
1.1.5. MIOGENEZA SKELETNOG MIŠIĆA.....	15
1.1.6. REGENERACIJA SKELETNOG MIŠIĆA.....	18
<b>1.2. DUŠIKOV MONOKSID I SINTETAZE DUŠIKOVA MONOKSIDA</b> .....	20
1.2.1. DUŠIKOV MONOKSID – NOVA VRSTA SIGNALNE MOLEKULE.....	20
1.2.2. SINTETAZE DUŠIKOVA MONOKSIDA.....	23
1.2.2.1. Nomenklatura NOS-a.....	23
1.2.2.2. Stanični mehanizmi regulacije NOS-a.....	25
1.2.2.3. Subcelularna lokalizacija NOS-a i biološka uloga NO-a.....	27
<b>1.3. NOS U SKELETNOM MIŠIĆU</b> .....	31
1.3.1. LOKALIZACIJA I EKSPRESIJA nNOS-a.....	32
1.3.2. REGULACIJA nNOS EKSPRESIJE.....	35
1.3.3. nNOS U RAZVOJU SKELETNOG MIŠIĆA.....	38
1.3.4. nNOS U PATOLOŠKIM STANJIMA.....	40
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	45
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	46
<b>3.1. MATERIJALI</b> .....	46
<b>3.2. METODE</b> .....	48

3.2.1. IMUNOHISTOKEMIJSKO DOKAZIVANJE TEŠKIH LANACA MIOZINA.....	48
3.2.2. IMUNOHISTOKEMIJSKO DOKAZIVANJE nNOS-a.....	49
3.2.3. HISTOKEMIJSKA METODA HEMALAUN EOZIN.....	49
3.2.4. WESTERN BLOT ANALIZA.....	50
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>52</b>
4.1. IMUNOHISTOKEMIJSKO DOKAZIVANJE nNOS-a U ZDRAVIM SKELETNIM MIŠIĆIMA ŠTAKORA.....	52
4.1.1. EKSPRESIJA nNOS-a U BRZIM MIŠIĆIMA.....	53
4.1.2. EKSPRESIJA nNOS-a U SPOROM MIŠIĆU.....	56
4.1.3. WESTERN BLOT ANALIZA nNOS-a U ZDRAVIM SKELETNIM MIŠIĆIMA ŠTAKORA.....	58
4.2. EKSPRESIJA nNOS-a TIJEKOM DENERVACIJE BRZIH I SPORIH MIŠIĆA.....	60
4.2.1. EKSPRESIJA nNOS-a U MIŠIĆU EXTENSOR DIGITORUM LONGUSU 7 TJEDANA NAKON DENERVACIJE.....	61
4.2.2. EKSPRESIJA nNOS-a U MIŠIĆU TIBIALIS ANTERIORU 7 TJEDANA NAKON DENERVACIJE.....	63
4.2.3. EKSPRESIJA nNOS-a U MIŠIĆU SOLEUSU 7 TJEDANA NAKON DENERVACIJE.....	65
4.2.4. WESTERN BLOT BRZIH I SPORIH MIŠIĆA 7 TJEDANA NAKON DENERVACIJE.....	67
4.2.5. PROUČAVANJE nNOS EKSPRESIJE U RAZLIČITIM VREMENSKIM PERIODIMA DENERVACIJE.....	68
4.3. EKSPRESIJA nNOS-a NAKON ELEKTRIČNE STIMULACIJE.....	70
4.3.1. EKSPRESIJA nNOS-a U EDL-u.....	71
4.3.2. EKSPRESIJA nNOS-a u SOL-u.....	72

4.4. EKSPRESIJA nNOS-a U MIŠIĆIMA EXTENSOR DIGITORUM LONGUS I SOLEUSU TIJEKOM PROCESA REGENERACIJE.....	73
4.5. WESTERN BLOT EDL-a I SOLEUSA 1., 3., 7. i 10. DANA OD IZAZIVANJA PROCESA REGENERACIJE.....	78
5. RASPRAVA .....	79
6. ZAKLJUČCI.....	95
7. LITERATURA.....	96
ŽIVOTOPIS	

# **1. UVOD**

## **1.1. SKELETNO MIŠIĆNO TKIVO**

Skeletni mišići se međusobno razlikuju po svojim funkcionalnim osobitostima kao što su razvoj snage, otpornost na zamor i energetske metabolizam koji ide od sporokontraahirajućeg aerobičnog do brzokontraahirajućeg anaerobičnog mišića. Pored toga skeletni mišić pokazuje visoku plastičnost koja se temelji na činjenici da mišićna vlakna podliježu promjenama koje mijenjaju njihovu građu i ekspresiju specifičnih izoformi mišićnih proteina.

Promjene u mišićnim vlaknima se mogu dogoditi kao odgovor na različite podražaje kao što su faktori rasta i diferencijacije, hormoni, živčani impulsi ili vježba.

### **1.1.1. GRAĐA SKELETNIH MIŠIĆNIH VLAKANA**

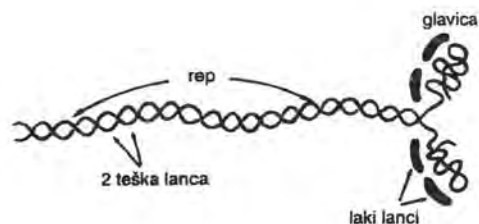
Skeletno mišićno tkivo se sastoji od mišićnih vlakana. To su dugačke multinuklearne stanice u kojima su jezgre smještene u obilnoj citoplazmi (sarkoplazmi). Ovalne jezgre nalaze se na periferiji mišićnog vlakna ispod stanične membrane koju zovemo plazmalema ili sarkolema. Sarkoplazma mišićnih vlakana ispunjena je dugim, cilindričnim snopovima filamenata koji se nazivaju miofibrile ili mišićna vlakanca (1).

Miofibrile, strukture koje su odgovorne za proces kontrakcije i relaksacije, sadrže funkcionalne jedinice tzv. sarkomere, a karakterističnim slaganjem sarkomera cijelo

mišićno vlakno poprima poprečno isprugani izgled. Sarkomera je sačinjena od debelih i tankih filamenata koji leže usporedo s uzdužnom osi mišićnih vlaknaca. Tanki filamentu su sastavljeni od aktina, tropomiozina i troponina dok su debeli filamentu sačinjeni uglavnom od miozina. Miozinske i aktinske niti djelomično ulaze jedne između drugih, pa se zbog toga u miofibrilama naizmjenice vide svjetle i tamne pruge. Svjetle pruge, koje sadrže samo aktinske niti, zovu se I-pruge, jer su izotropne za polariziranu svjetlost. Tamne pruge sadrže miozinske niti i krajeve aktinskih niti koji se preklapaju s miozinskim nitima. Te se pruge zovu A-pruge, jer su anizotropne za polariziranu svjetlost. Krajevi aktinskih niti pričvršćeni su za tzv. Z-ploču. Od te se ploče aktinske niti protežu na obje strane i ulaze između miozinskih niti. Prostor između dviju susjednih Z-ploča naziva se sarkomera koja ujedno predstavlja najmanji funkcionalni odsječak mišićnog vlakna. Poblжим promatranjem A-pruge otkriva se u njezinoj sredini svjetlija zona, H-pruga. Ona odgovara području sastavljenom samo od srednjih, štapićastih dijelova debelog filamenta tj. molekula miozina (2).

Aktin je dug, nitast (filamentozni, F-aktin) polimer sastavljen od dviju niti kuglastih (globularnih, G-aktin) monomera ovijenih jedan oko drugog u obliku dvostruke uzvojnice. Svaki monomer G-aktina sadržava mjesto na koje se veže miozin (2).

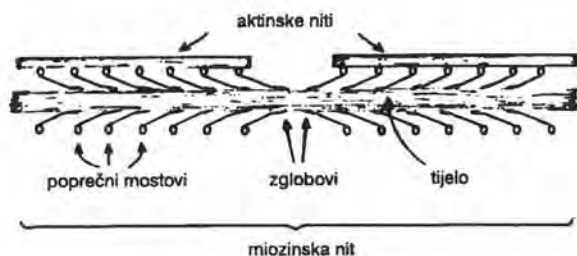
Miozin sa može rastaviti na dva jednaka teška lanca i dva para lakih lanaca. Teški lanci miozina su tanke štapićaste molekule, građene od dva lanca, omotana jedan oko drugoga (3) (Slika 1).



**Slika 1.** Laki i teški lanci molekule miozina.

Mali kuglasti izdanci na jednom kraju svakoga teškog lanca čine glavice, koje imaju mjesto za vezivanje ATP, sposobnost za enzimatsku hidrolizu ATPa (aktivnost ATP-aze) i sposobnost vezanja za aktin. S glavicom su udružena četiri laka lanca.

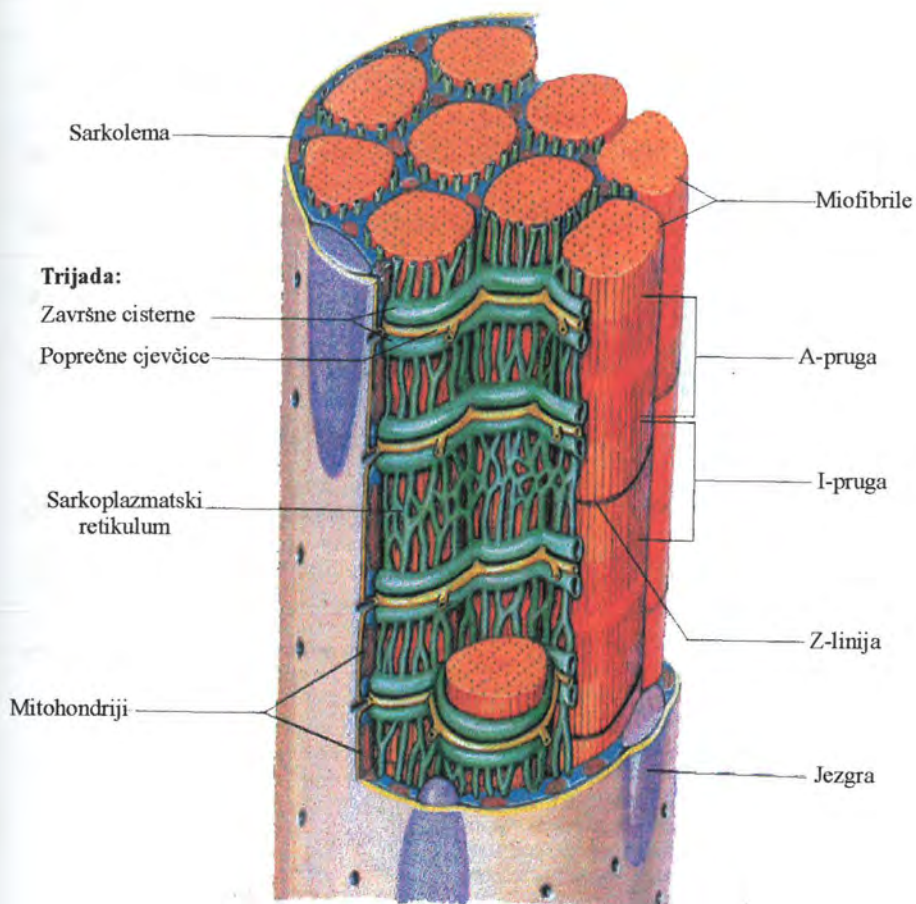
Analize poprečno ispruganog mišićnog tkiva pomoću elektronskog mikroskopa pokazuju da su tanki i debeli filamenti povezani poprečnim mostićima. Čine ih glavica molekule miozina i kratki odsječak njezina štapićastog dijela. Smatra se da ti mostići neposredno sudjeluju u pretvaranju kemijske energije u mehaničku (Slika 2). Miozin i aktin čine zajedno 55% od ukupne količine proteina skeletnog mišića (2).



**Slika 2.** Spajanje velikog broja molekula miozina u miozinsku nit. Vide se poprečni mostovi te međusobni odnos glavica poprečnih mostova i susjednih aktinskih niti.

Osim miofibrila i jezgara u sarkoplazmi nalazimo i mitohondrije, zrnca glikogena, sustav poprečnih cjevčica (transverzalni ili T-tubuli) te sarkoplazmatsku mrežicu. T-tubuli su cjevasta uvrnuća sarkoleme i čine složenu mrežu cjevčica koje anastomoziraju na razini granice sarkomera u svakoj miofibrili (2) (Slika 3).

Uz svaki T-tubul s obje strane prijanjaju proširene završne cisterne sarkoplazmatske mrežice (SR, engl. *sarcoplasmic reticulum*). Sarkoplazmatska mrežica se sastoji od uzdužnih cjevčica koje idu usporedo sa miofibrilama i od završnih cisterni koje priliježu uz T tubule. Taj specijalizirani kompleks, u sastavu: SR-T-tubul-SR naziva se trijada. Na njoj se depolarizacija započeta na sarkolemi prenosi s T-tubula na sarkoplazmatsku mrežicu. U skeletnim mišićima sisavaca svaka sarkomera sadrži dva sustava T tubula koji su smješteni blizu završetaka miozinskih niti. Upravo na tim mjestima stvaraju se mehaničke sile za kontrakciju mišića (3).



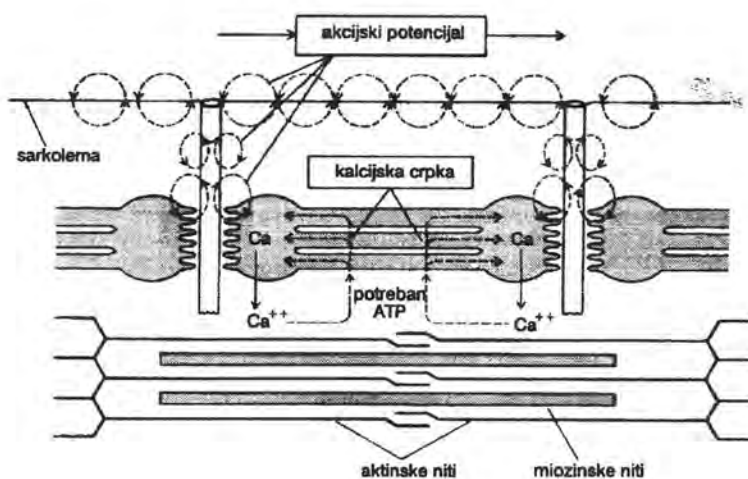
**Slika 3.** Sustav poprečnih cjevčica i sarkoplazmatskog retikula. Vide se uzdužne cjevčice koje završavaju u velikim cisternama. Cisterne priliježu uz poprečne cjevčice. Također se vidi da poprečne cjevčice komuniciraju s vanjskom stranom stanične membrane.



### 1.1.2. MEHANIZAM KONTRAKCIJE SKELETNOG MIŠIĆA

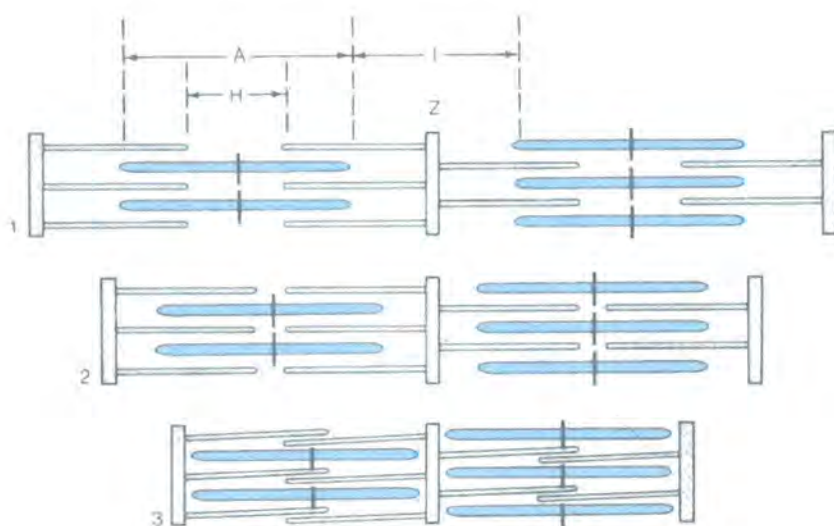
Mišićnu kontrakciju pobuđuju motorički živci koji su u kontaktu sa mišićnim vlaknima preko motoričke ploče ili neuro-mišićne spojnice. U aksonskom završetku ima mnogo mitohondrija i sinaptičkih mjehurića, koji sadrže neurotransmiter acetilkolin. Kad akcijski potencijal dosegne motoričku ploču, acetilkolin se oslobodi iz aksonskog završetka u sinaptičku pukotinu i veže se za acetilkolinske receptore na sarkolemi. Vezanje transmitera povećava propusnost sarkoleme za natrij pa dolazi do depolarizacije membrane.

Depolarizacija započeta na motoričkoj ploči širi se po površini mišićnog vlakna duboko u njegovu unutrašnjost kroz sustav poprečnih cjevčica. Depolarizacijski signali započeti na površini mišićnog vlakna, izazivaju oslobađanje  $\text{Ca}^{2+}$  iz cisterna endoplazmatske mrežice (Slika 4).



**Slika 4.** Sprega podraživanja i kontrakcije mišića. Vidi se akcijski potencijal koji uzrokuje oslobađanje kalcijevih iona iz sarkoplazmatskog retikula i njihovo vraćanje kalcijском crpkom.

U većim mišićnim vlaknima širenje depolarizacijskog podražaja dovodi do kontrakcijskog vala, u kojemu se periferne miofibrile kontrahiraju prije negoli miofibrile smještene u sredini (3). Kada dođe do kontrakcije, nastaje kemijska promjena i afinitet između debelih i tankih filamenata. Posljedica je da se miozinski filamenti pružaju, tj. klize duboko u prostore između aktinskih filamenata. Pri tome oni vuku svojim bočnim hvataljkama aktinske niti prema sredini. Kako se aktinske niti hvataju na Z-linije, ove se linije međusobno približe, tj. sarkomera se skрати. Pri tome se svjetla I-područja i H-područja veoma stanje ili sasvim izgube (2) (Slika 5).



**Slika 5.** Model kontrakcije aktinskih i miozinskih niti. (1) Relaksirani mišić, (2) djelomično kontrahirani mišić, (3) snažno kontrahirani mišić. Plavo obojane su niti miozina, a zeleno niti aktina.

Da bi kontrakcija bila jednakomjerna, skeletno mišićno vlakno ima poprečne cjevčice (3). Značajka SR je što u mjehuričastim cjevčicama sadrži veliku koncentraciju kalcijevih iona. U trenutku depolarizacije SR, ioni kalcija se pasivno ispuštaju u blizinu prekrivanja aktinskih i miozinskih niti. Kada se depolarizacija membrane završi, SR djeluje kao sustav za aktivno odvođenje kalcija, te kontrakcija prestaje (2,3) (Slika 4).

### 1.1.3. HETEROGENOST SKELETNIH MIŠIĆA

Skeletni mišić sisavaca je izrazito heterogeno tkivo građeno od različitih tipova vlakana. Postoje četiri osnovna tipa mišićnih vlakana. To su vlakna tipa I, IIA, IIX i IIB. Tipizacija vlakana se bazira na njihovoj metaboličkoj aktivnosti, brzini kontrakcije te vrsti miofibrilarnih proteina koje posjeduju. S obzirom na brzinu kontrakcije i metabolička svojstva, mišićna vlakna su klasificirana u tri tipa: brzokontraahirajuća glikolitička, brzokontraahirajuća oksidativno-glikolitička i sporokontraahirajuća oksidativna mišićna vlakna (4) (Tablica 1).

**Tablica 1.** *Glavne karakteristike tipova vlakana u odraslih skeletnih mišića malih glodavaca.*

Tip vlakna	Brzina kontrakcije	MyHC izoforma	Metabolizam
I	sporokontraahirajuća	I	oksidativni
II	brzokontraahirajuća	IIA	oksidativno-glikolitički
II	brzokontraahirajuća	IIX	oksidativno-glikolitički
II	brzokontraahirajuća	IIB	glikolitički

Klasifikacija skeletnih mišićnih vlakana se bazira s obzirom na njihova kontraktilna svojstva koja su dijelom određena i ekspresijom teških lanaca miozina (engl. *myosin heavy chain*, MHC) (4,5). Spori mišići sisavaca dominantno ekspimiraju spori tip I MHC izoforme sa nešto vlakana tipa IIA, najsporijom izoformom od brzih MHC-a (5,6,7,8,9,10).

Primjeri su m. soleus i m. vastus intermedius, mišići koji imaju važnu antigravitacijsku ulogu. Brzi mišići malih sisavaca kao što su gastrocnemius, plantaris, EDL i tibialis anterior, dominantno ispoljavaju dvije brze izoforme, IIX i IIB, u različitim omjerima ovisno o životinji, mišiću ili regiji mišića (6,7,8,11) (Slika 6).



**Slika 6.** *Imunohistokemijski prikaz heterogenosti skeletnog mišića.*

*Tamno obojana mišićna vlakna prikazana protutijelom za sporu izoformu MHC predstavljaju spora mišićna vlakna, dok su neobojana brza mišićna vlakna.*

Miozin je najzastupljeniji protein u skeletnim mišićnim stanicama i čini oko 25% ukupnih proteina. Miozin je molekula sastavljena od 2 teška lanca (engl. *myosin heavy chain*, MHC) i 2 laka lanca (engl. *myosin light chain*, MLC). On je ujedno i strukturalni i

regulatorni protein (enzim). Kao strukturalni protein čini kostur sarkomera uključenih u kontraktilni aparat. Što se tiče njegove regulatorne uloge, u interakciji sa drugim sarkomernim proteinom, aktinom, djeluje kao motor provodeći preko svoje ATPazne aktivnosti, kemijsku energiju u mehaničku (12).

Gledajući sa biološkog i funkcionalnog stanovišta svojstva mišića značajno ovise o postojanju MHC genske familije gdje specifični geni kodiraju izoforme MHC proteina. Ove izoforme imaju različita ATP-azna svojstva i brzinu kontrakcije, upućujući na činjenicu da pojedina mišićna vlakna gdje se oni eksprimiraju pokazuju međusobnu heterogenost.

Postoji devet izofomi MHC-a u srcu i skeletnim mišićima, a to su: 1) embrionalna, 2) neonatalna, 3) srčana ili  $\alpha$ , 4) srčana  $\beta$  ili spora, 5) brza tip IIA, 6) brza tip IIX/IID, 7) brza tip IIB, 8) ekstraokularna i 9) mandibularna ili mastikatorna izoforma (m-MHC) (5).

Embrionalna i neonatalna izoforma su u najvećoj mjeri eksprimirani tijekom razvoja mišića, ali se isto tako nalaze i u odraslom mišiću regenerirajućih vlakana (13), kao i u m.masseteru i ekstraokularnim mišićima (5).  $\beta$  MHC (tip I) se ne nalazi samo u srčanom mišiću, nego i u skeletnim mišićima embrija, ali je prisutna i kao glavna izoforma koja se ispoljava u odraslom sporokontrahirajućem skeletnom mišiću (5,14). Odrasli skeletni mišići eksprimiraju pored tipa I i u različitim omjerima IIA, IIX i IIB izoforme. Ekstraokularna izoforma MHC se nalazi poglavito u oku i mišićima grkljana, dok se mMHC izoforma ispoljava u mišićima žvakačima (5).

Histokemijskom metodom za dokazivanje aktivnosti miozinske ATPaze određena vlakana predstavljaju populaciju koja ekspirira samo jednu izoformu teških lanaca miozina, pa se ona smatraju čistim tipovima vlakana. Međutim, pojedina vlakna postoje i u mišiću tijekom razvoja, kao i u odraslom mišiću kao hibridna vlakna (15,16,17,18).

Hibridna vlakna se javljaju u slijedećim kombinacijama MHCIIb+MHCIIx, MHCIIx+MHCIIa ili MHCIIa+MHCI (15,19,20,21). Ona predstavljaju prijelaze koji idu od vlakana tipa IIB u tip I i obratno. Hibridna vlakna koja sadrže u malom omjeru jednu MHC izoformu i većem omjeru drugu izoformu, ne mogu se histokemijski razlikovati od čistih vlakana. Također to nije moguće u mišiću u kojem je izazvan proces regeneracije, u vlaknima u kojima je potaknut proces transformacije (17), u humanom m.masseteru (22,23,24), odnosno u intrafuzalnim vlaknima (25,26,27).

Heterogenu ekspresiju MHC izoformi u pojedinim vlaknima opisali su i Caiozzo i sur. u m.soleusu (19). Naime, analiza je pokazala da 70% otpada na tip I, 5-10% na tip IIA, a ostatak na hibridna vlakna tipa I/IIa koja koekspimiraju tip I i IIA MHC izoforme.

Značenje heterogenosti MHC izoformi pojedinih vlakana nije jasno. Možda je to preduvjet za učinkovitiju pretvorbu vlakana tijekom promijenjenih uvjeta u kojima se mišić trenutno nalazi (15,19,20).

#### 1.1.4. PLASTIČNOST SKELETNIH MIŠIĆNIH VLAKANA

Skeletna mišićna vlakna nisu postojane jedinice već predstavljaju prilagodljive dinamičke strukture sa sposobnošću mijenjanja načina ekspresije prilagođavajući se promijenjenim fiziološkim zahtjevima. Posljedica toga je promjena njegova fenotipa. Promjene tipova vlakana se ne događaju trenutno, već postepeno i stupnjevito. Na molekularnom nivou, najbolji primjer su promjene miofibrilarnih izoformi teških lanaca miozina (MHC). Ta promjena se odvija po specifičnom i uvijek istom obrascu izmjenom izoformi, što i prikazujemo formulom  $IIB \leftrightarrow IIX \leftrightarrow IIA \leftrightarrow I$  (28).

Promjene koje mijenjaju fenotip mišića su: razvoj (29,30,31), promjene u inervaciji mišića (4,5), hormonalni utjecaj (31) i uslijed promjena u opterećenju (10,32).

Što se tiče ekspresije gena koji kodiraju MHC izoforme, rođenjem su još nediferencirani i spori i brzi mišići. Npr., u glodavaca *m. soleus*, koji je predodređen da se sastoji uglavnom od spore izoforme, tipa I, 50% mišića čine vlakna u kojima su ekspimirane embrionalne i neonatalne izoforme (29,30,33,34). U brzom mišiću stupanj nediferenciranih vlakana je još veći, čak 90% vlakana ekspimiraju embrionalnu i neonatalnu izoformu (15,29). Međutim, nakon 4 tjedna života, i spori i brzi mišići se izdiferenciraju u odrasle MHC fenotipove (15,29,34).

Promjene u inervaciji mišića se događaju tijekom procesa denervacije i/ili regeneracije, križne inervacije i električne stimulacije. Studija pomoću križne inervacije Bullera i sur. (35) je ukazala na veliku važnost koju ima neuralni utjecaj u determiniranju fenotipa skeletnog mišića. Naime, mišići koji su stimulirani niskofrekventnom strujom (10Hz) mijenjaju fenotipska svojstva koja su slična sporom mišiću, dok mišići stimulirani visokofrekventnom strujom (100Hz) ostvaruju fenotipove sličnim u brzih mišića. Isto tako



Lomo i sur. (14) su pronašli da se denervirani soleus stimuliran sa 100 Hz razvija u brzi mišić, dok oni stimulirani sa 10 Hz u sporokontrahirajuće mišiće. Kasnije je utvrđeno da visoka frekvencija i u soleusu (36,37) i EDL-u (29) povećava ispoljavanje brze MHC izoforme.

U posljednja dva desetljeća, veliki je interes izazvao tiroidni hormon (T3). Uočeno je da ima značajan utjecaj na ekspresiju MHC gena (32,38,39). Promijenjena količina T3 jednako kao i mehaničko opterećenje izazivaju slične promjene u ekspresiji MHC gena u skeletnom mišiću. Npr., tijekom hipotiroidizma ili povećanog mehaničkog opterećenja mišića, svi mišići prelaze u sporije fenotipove. Obim promjena ovisi o tipu mišića. U sporim mišićima IIA i IIX prelaze u tip I MHC, dok u brzim mišićima dolazi do prijelaza IIB/IIX u IIA/I (32). Suprotno tome, hipertireoidizam (+T3) i smanjeno mehaničko opterećenje uzrokuju promjenu u brži tip mišića. Naime, dolazi do smanjenja ekspresije MHC tipa I i povećanja brzih izoformi, IIX/IIB (32). U soleusu npr., tip IIA se eksprimira kao odgovor na T3, dok IIX je povećan tijekom smanjenog opterećenja (19,20).

### 1.1.5. MIOGENEZA SKELETNOG MIŠIĆA

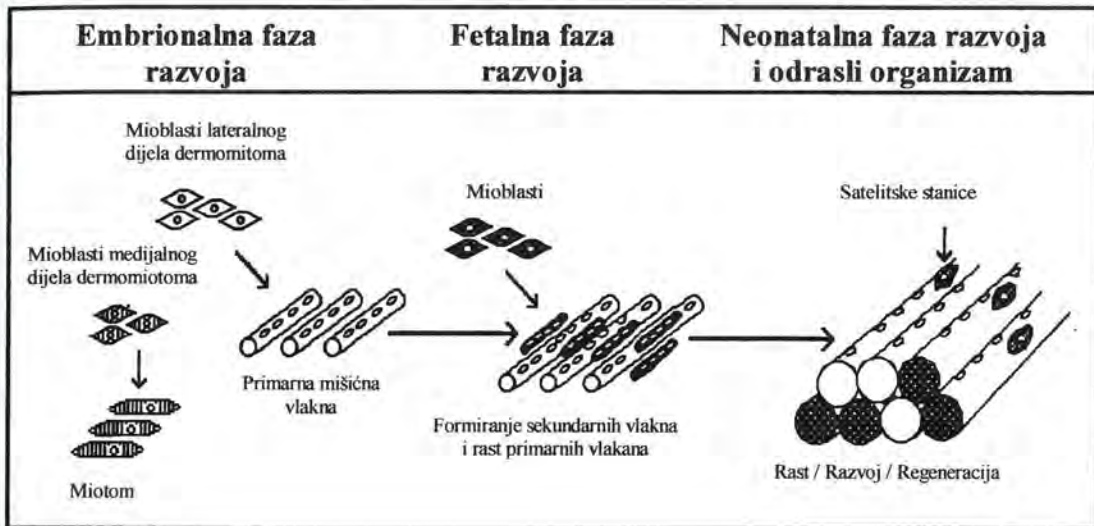
Razvoj skeletnih mišića sisavaca prolazi kroz nekoliko faza: stvaranje mioblasta, njihova migracija u područje budućih mišića i diferencijacija u mišićna vlakna. Prekursori skeletnih mišićnih stanica zovu se mioblasti. Oni potječu iz somita koji su sferične nakupine mezodermalnih stanica smještenih lateralno uz neuralnu cijev tijekom embrionalnog razvoja. Iz somita nastaje sklerotom i dermomyotom. Sklerotom se razvije u skeletne strukture, a iz dermomyotoma nastanu koža i mišić. Mioblasti se formiraju na krajevima dermomyotoma kada stanice steknu miogeni potencijal. Iz lateralnih dijelova mioblasti odlaze u pupoljke budućih ekstremiteta, a iz medijalnog dijela se formira myotom, osnova za ostale skeletne mišiće.

Nakon perioda dijeljenja stanice, mioblasti izlaze iz staničnog ciklusa, udružuju se formirajući multinuklearno mišićno vlakno, myotubu. Ovo je prvi stadij miogeneze gdje se tijekom embrionalnog razvoja formiraju primarna mišićna vlakna. Tijekom fetalnog razvoja formiraju se uz primarna i sekundarna mišićna vlakna. Ona poput rozete okružuju primarno vlakno. Važno je napomenuti da se tijekom embriogeneze svi mioblasti ne diferenciraju u myotube. Određeni broj stanica ostane sa jednom jezgrom i nazivaju se satelitske stanice (40) (Slika 7).

Satelitske stanice su nediferencirane, mononuklearne stanice smještene unutar bazalne membrane mišićnog vlakna. Nalaze se u G-fazi staničnog ciklusa u normalnom odraslom mišiću.

Kao odgovor na stimulaciju, satelitske stanice ulaze u mitotički ciklus, proliferiraju i fuzioniraju se doprinoseći rastu, obnavljanju i hipertrofiji postnatalnog skeletnog mišića (41). Kada ulaze u mitozu i diferenciraju se, satelitske stanice prolazno eksprimiraju mišić-

specifične molekule kao što je npr., transkripcijski faktor MyoD familije, razvojno regulirana izoforma teškog lanca miozina, i intermedijarni protein dezmin, koji oboje *in vitro* i *in vivo* eksperimentalno induciraju regeneraciju mišića (40).



**Slika 7.** Shematski prikaz miogeneze u sisavaca. Vide se različiti tipovi mioblasta u početnim fazama formacije primarnih i sekundarnih mišićnih vlakana.

Usporedo sa razvojem miotuba, započinje i ekspresija izoformi teških lanaca miozina. Postoji nekoliko izoformi teških lanaca miozina tijekom razvoja. Prijelaz jedne izoforme u drugu se događa za vrijeme razvoja skeletnih mišića još u ranim mioblastima i pod utjecajem je živca, hormona i faktora okoline (42,43,44,45,46).

U tijeku razvoja mišića sisavaca postoje najmanje dva tipa primarnih miotuba, primarni spori i primarni brzi tip, i dva tipa sekundarnih miotuba (43). Primarne spore miotube ekspimiraju embrionalnu i sporu MHC izoformu (33,43,44,47). Prijelaz od

embrionalne do spore izoforme ide u primarnim sporim mišićnim vlaknima, dok u sekundarnim mišićnim vlaknima slijedi prijelaz od embrionalne do neonatalne izoforme i zatim ka odrasloj brzjoj ili sporij MHC izofomi (44,46,47).

### 1.1.6. REGENERACIJA SKELETNOG MIŠIĆA

Za proučavanje procesa regeneracije na skeletnom mišiću koriste se eksperimentalni modeli ishemične nekroze (48), injekcije bupivakaina (49,50) i transplantacije presadaka mišića (51). Pritom veliku ulogu imaju način i veličina oštećenja samoga mišića. Svaku regeneraciju prate procesi fagocitoze, revaskularizacija, a zatim procesa reinervacije i miogeneze kako bi došlo do regeneracije mišića (52). Sva stanična i molekularna zbivanja su jednaka embrionalnoj miogenezi izuzev fagocitoze.

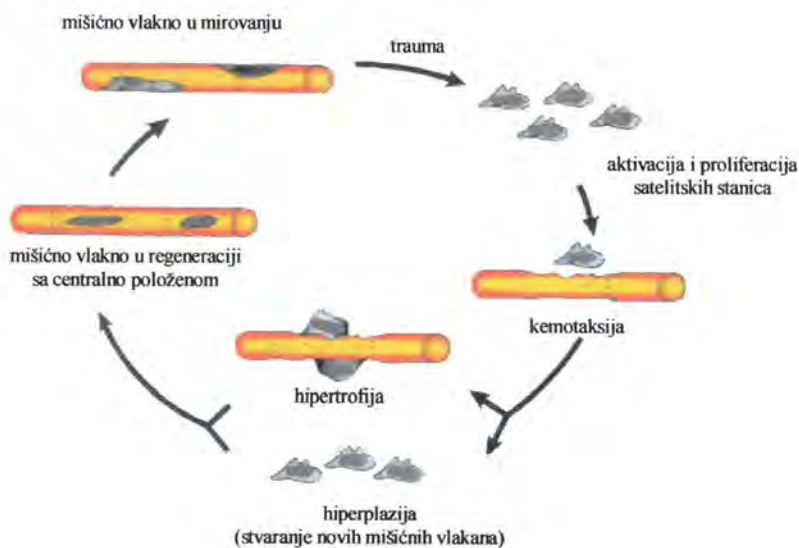
Jedan od modela mišićne regeneracije je uništenje mišića izazvano intramuskularnom injekcijom bupivakaina čime dolazi do raspadanja sarkoleme, a time i do rapidne nekroze mišićnog vlakna. Međutim, bazalna membrana, satelitske stanice, intramuskularni živci i krvne žile ostaju neoštećene što je preduvjet da bi se stvorile nove mišićne stanice (53) (Slika 8).

Tijekom razvoja, rasta i starenja mijenja se sposobnost mišića za regeneracijom. Npr., u embriju i mladom štakoru, hormoni rasta doprinose mišićnom rastu i time je regenerativna sposobnost mišića veća. Naprotiv, zreloj mišićnoj stanici potrebna je niska ekspresija hormona i faktora rasta za njezino održanje (54). Tome u prilog ide i činjenica da tijekom starenja mišića dolazi do njegove atrofije zbog promjena u unutarstaničnom i izvanstaničnom prostoru. Naime, dolazi do smanjenja kapaciteta mišića da održi ekspresiju neuromuskularnih proteina. To je djelomično zbog intrinzičnog programa, a u većem dijelu zbog egzogenih faktora koji djeluju na mišić kao što je aktivnost mišića, razina hormona i faktora rasta, kao i djelovanje samog živca na mišić (55).

U mladih štakora nakon injekcije bupivakaina, satelitske stanice proliferiraju, diferenciraju se i fuzioniraju u miotubule tako da do oporavka mišića dolazi unutar 21 dan.

(56,57). Diferencijacija miogenih stanica tijekom embriogeneze je regulirana pomoću gena koji kodiraju mnoge miogene faktore. Do povećanja njihove ekspresije dolazi tijekom denervacije mišića (58,59) i tijekom regeneracije skeletnih mišića tri mjeseca starih štakora (60,61,62).

U skeletnim mišićima starih štakora primijećena je oslabljena regeneracija (49,50,51). Naime, zbog nedostatnog obnavljanja proteina u mišiću starih štakora kao i zbog oslabljene reinervacije, miogeneza je također nedostatna tijekom starenja (55).



**Slika 8.** *Odgovor satelitskih stanica na traumau. Kao odgovor na ozljedu, satelitske stanice se aktiviraju i započinju svoju proliferaciju, a zatim migriraju do oštećenog mišićnog tkiva. Obzirom na veličinu ozljede ili se fuzioniraju sa postojećim vlaknom ili produciraju nova mišićna vlakna. U mišićnim vlaknima u regeneraciji jezgre su centralno postavljene.*

## 1.2. DUŠIKOV MONOKSID I SINTETAZE DUŠIKOVA MONOKSIDA

### 1.2.1. DUŠIKOV MONOKSID – NOVA VRSTA SIGNALNE MOLEKULE

U središnjem i perifernom živčanom sustavu otkrivena je nova vrsta signalne molekule – jednostavni plin dušikov monoksid (NO). To otkriće dovelo je do prave eksplozije istraživanja nakon čega je vodeći znanstveni časopis "Science" 1992. godine NO proglasio molekulom godine.

Dušikov monoksid vrlo je neobična signalna molekula. To je zapravo plin: mala, električki nenabijena (apolarna) molekula s jednim nesparenim elektronom. Zbog toga što je vrlo malen i apolaran, NO brzo i slobodno difundira kroz stanične membrane. Uslijed činjenice da ima nespareni elektron NO je vrlo reaktivan (radikal), s poluvijekom od 2-30 sekundi (u živom tkivu obično 4-6 sekundi) i čim prenese signal spontano se raspada te nastaju nitriti.

NO se ne može uskladištiti u sinaptičke mjehuriće, niti oslobađati ekzocitozom poput ostalih neurotransmitera, niti se vezati za postsinaptičke receptore. Pa ipak, NO je signalna molekula i postavlja se pitanje: kako NO i pod kojim okolnostima nastaje u neuronima, te postoje li neki specifični NO receptori?

Danas je poznato da kad se glutamat veže na NMDA (N-metil-D-aspartat) receptore, kroz njih u neuron prodiru  $Ca^{2+}$  i aktiviraju poseban enzim (sintetazu dušičnog monoksida tj. NO-sintetazu, NOS). Taj enzim pretvara L-arginin u L-citrulin i pri tom se

oslobađaju stehiometrijske količine NO. NO brzo difundira iz stanice i veže se na hem skupinu enzima sGC (solubilna gvanilil ciklaza). Enzim sGC smješten je uglavnom u presinaptičkim završecima neurona i služi kao receptor za NO. sGC je heterodimer što sadrži hem; kad se NO veže za  $Fe^{2+}$  u porfirinskom prstenu hem skupine,  $Fe^{2+}$  iskoči iz ravnine porfirinskog prstena, promijeni se konfiguracija cijele molekule i enzim se aktivira. Aktivirana sGC stvara cGMP, a taj potom djeluje na ionske kanale, mijenja aktivnost fosfodiesteraza ili aktivira protein kinazu G (PKG).

Glavni učinak aktivacije sGC u presinaptičkim aksonima vjerojatno je poticanje pojačane egzocitoze glutamata a i time facilitacije sinaptičkog prijenosa. Drugim riječima, NO nastaje u aktiviranom postsinaptičkom elementu, a potom difundira i djeluje na receptor u presinaptičkom elementu, dakle, NO djeluje kao povratni glasnik (63). Štoviše, NO slobodno difundira pa može djelovati na sve okolne elemente iz svoje neposredne blizine. Postoji pretpostavka da emisija NO-a iz jednog izvora tijekom 1-10s ima dijametar djelovanja od oko  $200\mu m$  (64).

Kao suprotnost uobičajenih biosignalnih molekula koje djeluju preko specifičnih receptornih molekula, NO djeluje na specifičan način mnogobrojnim kemijskim reakcijama koje kontroliraju aktivnost enzima, ionskih kanala, transkripcijskih gena, kao i respiratorni ciklus mitohondrija. Također, NO može uzajamno djelovati sa radikalima kisika stvarajući visokoreaktivne supstance (65,66,67).

Postoje dokazi koji ukazuju na to da NO posreduje u mnogobrojnim funkcijama u živčanom sustavu, kao što je sinaptička transmisija, regulacija cerebralnog krvotoka te prilikom hiperalgezije (68,69).

NO je uključen i u razvoj tolerancije i odvikavanja od morfija (70,71) i alkohola (72). Važno je naglasiti da NO nije signalna molekula samo u živčanom sustavu nego i u



nizu drugih organa – primjerice krvožilnom sustavu, imunološkom te spolnom sustavu. U krvožilnom sustavu je posrednik u aktivnoj vazodilataciji, djeluje kao regulator krvnog optoka, te sudjeluje u mehanizmima hipertenzije i vazospazma.

U imunološkom sustavu inducirani makrofazi sintetiziraju veliku količinu NO-a što potom ubija patogene uzročnike ili koči njihov rast i množenje dok u spolnom sustavu sudjeluje u mehanizmima erekcije. Nadalje, NO se sintetizira i u skeletnom mišiću gdje regulira metabolizam i mišićnu kontrakciju.

Dakle, put biosinteze od L-arginina do dušikova monoksida uključen je u brojne fiziološke procese kao što su vazodilatacija, pamćenje, neuroprotekcija, peristaltika i imunološka obrana, a svoje djelovanje ispoljava u različitim sustavima kao što su kardiovaskularni, živčani, reproduktivni i imunološki sustav. Za odvijanje ovih fizioloških procesa dovoljne su male količine NO-a, dok prekomjerna sinteza NO-a u sisavaca može dovesti do oštećenja ili čak smrti stanice (73). Tako NO može biti impliciran u cerebralnim poremećajima uzrokovanim hipoksijom ili ishemijom, u migreni, Parkinsonovoj bolesti i demenciji uslijed AIDS-a (74,75).

## 1.2.2. SINTETAZE DUŠIKOVA MONOKSIDA

### 1.2.2.1. Nomenklatura NOS-a

U sisavaca postoje tri izoforme NOSa: neuralna NOS (nNOS ili NOS1), inducirana NOS (iNOS ili NOS2) i endotelna NOS (eNOS ili NOS3). Sam naziv svake pojedine izoforme odražava karakteristike njene aktivnosti ili tkiva u kojima je enzim prvo opisan. Međutim, danas znamo da je svaka izoforma ispoljena u različitim tkivima i tipovima stanica. Produkt svake od tri spomenute izoforme sintetaza dušikova monoksida je NO (76).

Početna nomenklatura NOS-a bazirala se na razlikovanju dviju glavnih izoformi: konstitutivne, cNOS i inducibilne, iNOS. cNOS se ispoljava u karakterističnim tipovima stanica (neuralna, endotelna), dok imunoaktivacija dovodi do ispoljavanja iNOS-a. Međutim, danas znamo da se stupnjevi genske ekspresije i eNOS-a i nNOS-a mogu također potaknuti u različitim fiziološkim uvjetima (hemodinamski stres ili ozljeda živca) i da, naprotiv, iNOS može djelovati kao konstitutivni enzim u fiziološkim uvjetima kod nekih stanica (77). Široko prihvaćena je nomenklatura po Moncadi (76) koja jasno definira tri izoforme NOS-a u sisavaca, nazvane nNOS, iNOS i eNOS prema tkivu u kojem su cDNA originalni proteini prvi izolirani.

Kao što i sam prefiks označava, nNOS je prvobitno izoliran i kloniran u živčanom tkivu. Dakako, za nNOS se danas zna da je mnogo šire rasprostranjen, sa značajnim stupnjem ispoljenosti u skeletnom mišiću. iNOS je prvobitno dobiven i kloniran u imunoreaktivnim makrofazima, da bi do danas bio izoliran u nebrojeno puno stanica

sisavaca (srčani mišić, trombociti, u hipokampusu). Humani geni za izoforme NOS-a koje kodiraju nNOS, iNOS i eNOS su službeno nazvane NOS1, NOS2 i NOS3 (76).

Ista izoforma NOS-a može imati sasvim različitu biološku ulogu kada je ispoljena u drugom tkivu. Tako npr., nNOS mRNA proizvodi različiti protein kada je enzim ispoljen u neuronima, odnosno u skeletnom mišiću (nNOS $\mu$ ) (78). Jednako tako tkivno specifična regulacija je i kod eNOS-a endotelnih stanica, odnosno srčanih mišićnih stanica (79).

### 1.2.2.2. Stanični mehanizmi regulacije NOS-a

Klasični neurotransmiteri su uskladišteni u sekretornim vezikulama i otpuštaju se na sinaptičkim membranama, a kraj signaliranja je posredovan enzimima i pumpama koji uklanjaju aktivni transmitter iz sinapse.

Regulacija NO signaliranja je kompleksnija zbog njegovih fizioloških svojstava, kao npr. nemogućnost njegovog uskladištenja u lipidnim vezikulama, odnosno odsustvo enzima njegove degradacije. Njegova pretjerana produkcija je toksična za sve stanice. Zbog toga NO signaliranje mora biti brzo i strogo lokalizirano sa neposrednim završetkom biosinteze. Stroga kontrola NO signaliranja je regulirana njegovom biosintezom, a NOS proteine ubrajamo među najbolje regulirane enzime (80).

NOS enzimi se međusobno razlikuju obzirom na njihovu regulaciju kalcijem. U mozgu, stimulus je glutamat koji djeluje na NMDA receptore. To dovodi do ulaska  $Ca^{2+}$  koji se vežu na kalmodulin, a kalmodulin potom aktivira NOS. Ovaj način aktivacije objašnjava sposobnost glutamatne neurotransmisije za stimuliranje stvaranja NO-a u sekundi.

U krvnim žilama i skeletnim mišićima, acetilkolin djeluje na muskarinske receptore endotelnih i skeletnih mišićnih stanica čime se otvaraju kalcijски kanali i ulazi  $Ca^{2+}$ . Kalcij se veže za kalmodulin koji zatim aktivira NOS. nNOS i eNOS se inhibiraju antagonistima kalmodulina, kao što je npr. trifluoperazin (81).

iNOS makrofaga i drugih stanica nije stimulirana pomoću  $Ca^{2+}$  niti se ne blokira antagonistima kalmodulina. Ipak iNOS enzimi imaju mjesto za prepoznavanje kalmodulina. Nathan i suradnici (82) su pokazali da je kalmodulin vrlo tijesno vezan za iNOS iako nema kalcija.

U normalnim uvjetima makrofazi ne ispoljavaju proteine NOS-a. Djelovanjem interferona- $\gamma$  i lipopolisaharida dolazi do *de novo* sinteze NOS proteina kroz 2-4 sata, stvarajući NO kao odgovor na upalnu promjenu. Nekada se smatralo da samo makrofazi posjeduju iNOS. Međutim, djelovanjem endotoksina, iNOS aktivnost je prikazana u raznim tkivima životinja kojima nedostaju makrofazi (82,83).

NOS se također može regulirati fosforilacijom. Sekvence za fosforilaciju sa cAMP-ovisnom protein kinazom su prisutne u nNOS, eNOS i iNOS jetre, dok ih u iNOS makrofaga nema.

Biokemijska istraživanja su pokazala da se nNOS može fosforilirati sa cAMP ovisnom protein kinazom, protein kinazom C, cGMP ovisnom protein kinazom i  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin-ovisnom protein kinazom (84,85,86). Fosforilacijom sa ovim enzimima opada njegova katalitička aktivnost (84). Time je ovaj enzim reguliran na više razina. Npr.  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulin može direktno aktivirati enzim, a fosforilacijom  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin ovisne protein kinaze, inhibirati njegovu aktivnost.  $\text{Ca}^{2+}$  zajedno sa lipidima također aktivira protein kinazu C, a NOS je inhibira. NO stimulira GC za stvaranje cGMPa, čime će cGMP ovisna protein kinaza inhibirati NOS.

Michel i suradnici (87) su pronašli da se u intaktnoj endotelnoj stanici eNOS vrlo brzo fosforilira kao odgovor na bradikinin čime prelazi sa membrane u citosol. Citosolni eNOS je katalitički neaktivan i samim time NO se neće proizvoditi. Umjesto toga, katalitički aktivan, nefosforilirani eNOS je lokaliziran na plazmalemi gdje proizvodi NO koji zatim odlazi u ekstracelularni prostor.

### 1.2.2.3. Subcelularna lokalizacija NOS-a i biološka uloga NO-a

Svoju biološku ulogu NO, kao vrlo labilna molekula, može izvršiti kako u stanici u kojoj je sintetiziran tako i kroz interakcije sa susjednim stanicama i molekulama (88). Upravo zbog činjenice da NO kroz interakcije sa različitim unutarstaničnim ili izvanstaničnim kemijskim tvarima može biti stabiliziran ili degradiran, pretpostavljamo da lokalizacija NOS-a, enzima koji stvara NO, unutar stanice može značajno utjecati na biološku ulogu i sudbinu NO-a.

Smatra se da svaka stanična organela, od plazmaleme do stanične jezgre, može biti potencijalno mjesto za sintezu NO-a. Međutim, rezultati brojnih istraživanja vrlo su kontradiktorni, ponekad čak i unutar istih laboratorija, što vjerojatno odražava različitost eksperimentalnih pristupa ovoj problematici. Postavlja se pitanje da li NOS doista možemo naći bilo gdje u stanici? Vjerojatno je odgovor na ovo pitanje: da, ali dokazi koji govore tome u prilog značajno se razlikuju kako u kvantiteti tako i u kvaliteti.

NOS u staničnoj jezgri. Nekoliko istraživanja donose dokaze o utjecaju NO-a na gensku transkripciju, međutim, regulatorne molekule za koje se mislilo da su posrednici u mijenjanju razine transkripcije su u većini slučajeva citoplazmatski proteini (npr. I-kappa B, gvanilat ciklaza) (89).

Iako su brojne imunohistokemijske studije ukazivale na to da su NOS izoforme lokalizirane u staničnoj jezgri do danas ne postoji ni jedan čvrst dokaz o tome (90). Pretpostavka je da NOS-a nema u staničnoj jezgri upravo zbog potencijalne toksičnosti NO-a i mogućnosti oštećenja DNA. Neposredna regulacija transkripcije od strane NO-a i NOS-a unutar stanične jezgre mogla bi dovesti do genske zaraze (91).

NOS u endoplazmatskom retikulumu. Većina nNOS imunoreaktivnosti u neuronima udružena je s hrapavim endoplazmatskim retikulumom i specijaliziranim sinaptičkim membranskim strukturama. Premda sinteza NOS proteina bez sumnje uključuje ove stanične organele manje je jasno da endoplazmatski retikulum predstavlja konačan cilj za NOS izoforme (92).

NOS u mitohondriju. Nekoliko studija je pokazalo da NO koji potječe iz farmakoloških izvora i primjenjen u farmakološkim dozama može inhibirati respiracijski ciklus mitohondrija (93). Nejasno je, međutim, da li su izoforme NOS-a doista prisute u mitohondriju (94).

Nekoliko autora pokazalo je pomoću imunohistokemijske analize obojenje mitohondrija pomoću antitijela koja prepoznaju sve tri izoforme NOS-a. Iako se čini vjerojatnim da NOS u mitohondriju može regulirati oksidativnu fosforilaciju preostaje da se utvrdi o kojoj se točno izoformi radi (95).

NOS u Golgijevom aparatu. Brojna istraživanja su pokazala da je od sve tri izoforme NOS-a u Golgijevom aparatu prisutna eNOS. Međutim nije lako sa sigurnošću interpretirati ove rezultate iz jednostavnog razloga što se imunohistokemijsko obojenje Golgijevih markera vrlo lako miješa s uzorkom obojenja karakterističnima za plazmalemske kaveole (96).

NOS u citoskeletu. Iako je u početku nNOS smatran citoplazmatskim proteinom, danas znamo da je u skeletnom mišiću udružen sa membranom stanice tj. sarkolemom i to pomoću citoskeletnog distrofinskog kompleksa (97,98). Ovaj pronalazak predstavlja odličan primjer kako jedna izoforma NOS-a podliježe tkivno-specifičnoj regulaciji. Što se

tiče eNOS-a nije poznato da li se enzim eNOS-a veže direktno za citoskeletne proteine, ili je to udruživanje kompliciranije, a odražava vezu između citoskeleta i plazmalemalne kaveole.

NOS u specijaliziranim unutarstaničnim organelama. U živčanom tkivu nNOS, koji ima vrlo važnu ulogu u neurotransmisiji, lokaliziran je u postsinaptičkim strukturama (98). eNOS je pronađen u hipokampalnim neuronima, međutim, nije poznato za koju se specifičnu, subcelularnu frakciju veže.

Postojanje i NOS-a također je dokazano u živčanom tkivu. Prisustvo iNOS-a u unutarstaničnim vezikulama kao npr. fagosomima vjerojatno govori o lokalnom tj. direktnom, NO-ovisnom neutraliziranju unutarstaničnih mikroorganizama (99).

NOS u plazmalemi i kaveolama. eNOS ne sadrži hidrofobnu transmembransku domenu i stoga ne može biti vezan za membranu poput nNOS-a u skeletnoj mišićnoj stanici. Brojna istraživanja ukazuju da je eNOS vezan za plazmalemalne kaveole (100).

Kaveole su male invaginacije u plazmalemi za koje je karakterističan transmembranski protein kaveolin (96,101). Plazmalemalne kaveole predstavljaju značajno obilježje plazmaleme endotelne stanice, a također su prisutni i u mnogim drugim stanicama kao što su srčane mišićne stanice. U mnogim tkivima kaveole služe kao mjesta za sekvestraciju signalnih molekula (102) kao što su receptori, G-proteini, protein kinaze, i konačno eNOS. Postoje dva tipa G protein-udruženih receptora (muskarinski m2 i bradikinin B2 receptor) koji se skupljaju na kaveolama nakon stimulacije njihovih agonista (103). Ova dva receptora započinju signalirajuću kaskadu koja vodi stvaranju NO-a u nekoliko tipova stanica uključujući endotelne i srčane mišićne stanice. Prisustvo ovih



receptora unutar kaveola potiče aktivaciju eNOS-a. Plazmalemalne kaveole imaju specifičan lipidni sastav, jako bogat kolesterolom i glikosfingolipidima, međutim, ne sadrže fosfolipide. Promjene u lipidnom sastavu mogu narušiti strukturu i funkciju kaveola. Kaveole su prisutne u skeletnom mišiću i vjeruje se da postoji interakcija nNOS-a, koji se u skeletnom mišiću ispoljava, i mišićno specifične izoforme kaveolin 3 (95).

### 1.3. NOS U SKELETNOM MIŠIĆU

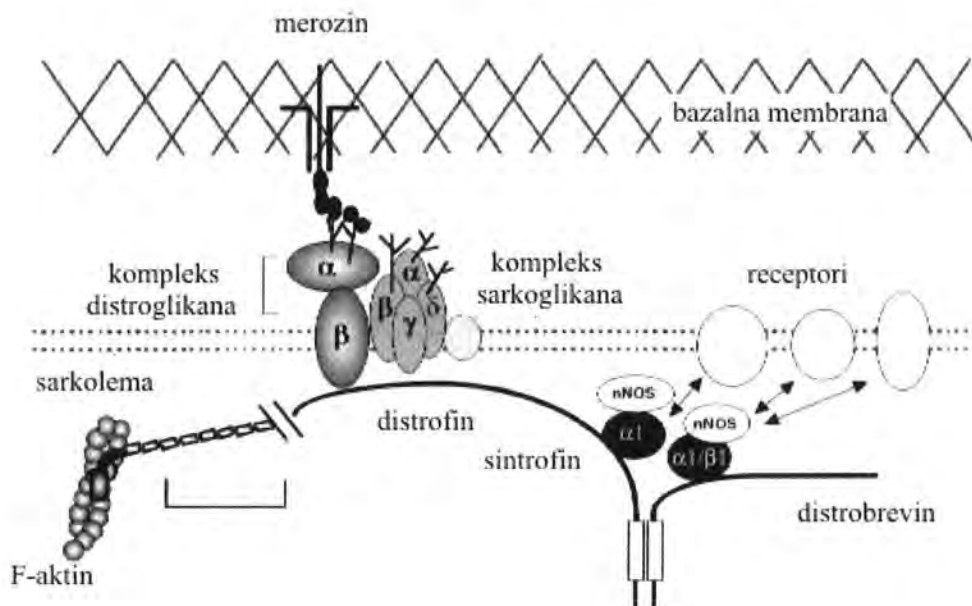
Normalni skeletni mišić ispoljava sve 3 izoforme NOS-a. Dvije izoforme, eNOS i nNOS su tzv. konstitutivne izoforme koje mišić konstantno ispoljava. Treća izoforma, iNOS, smatra se inducibilnom izoformom koju mišić ispoljava samo u specifičnim, patološkim uvjetima. Tako je ekspresija iNOSa značajno povećana u srčanim mišićnim stanicama pacijenata sa popuštanjem srca (104) ili autoimunim miopatijama (105), kao i u životinja kojima su administrirani endotoksin *Escherichia coli* (106), lipopolisaharidi ili citokini (107).

eNOS je u skeletnim mišićima štakora prisutan, iako u niskom stupnju ekspresije, pretežno u vlaknima tipa I (108). Imunološkim metodama eNOS je dokazan na sarkolemalnoj kaveoli srčanog mišića (100) kao i na mitohondrijima skeletnih mišićnih vlakana (94).

U skeletnim mišićima je najrasprostranjeniji nNOS.

### 1.3.1. LOKALIZACIJA I EKSPRESIJA nNOS-a

nNOS je vezan za membranu mišićne stanice tj. sarkolemu pomoću glikoproteinskog kompleksa distrofina (98). Glikoproteinski kompleks distrofina čine merozin,  $\alpha$ - i  $\beta$ -distroglikan,  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  i  $\beta 2$  sintrofin, te distrofin.  $\alpha$ -distroglikan se nalazi na sarkolemi, s njezine vanjske strane. On povezuje transmembranski protein  $\beta$ -distroglikan sa merozinom, proteinom koji se nalazi u vanstaničnom matriksu. Nadalje,  $\beta$ -distroglikan je povezan sa distrofinom. Distrofin je veliki citoskeletni protein, oblika štapa, za koji se nadalje vežu  $\alpha 1$ -sintrofin, distrobrevin i F-aktin, čineći tako vezu citoskeleta za sarkolemu (109) (Slika 9).



**Slika 9.** Model distrofin-glikoproteinskog kompleksa na sarkolemi mišićnog vlakna.

nNOS i  $\alpha$ 1-sintrofin su međusobno u kontaktu preko svojih PDZ domena koje se nalaze blizu njihovih NH<sub>2</sub> terminalnih krajeva (98).  $\alpha$ 1-sintrofin je neophodan za vezivanje nNOS-a na ekstrasinaptičkom, kao i na sinaptičkom dijelu membrane.

Pored navedenih proteina, nNOS se veže i za caveolin-3, komponente specijalnih invaginacija sarkoleme, nazvane kaveole. Kaveole su bogate glikosfingolipidima i kolesterolom. Caveolin-3 je glavna komponenta mišićne kaveole i ne igra primarnu ulogu u hvatanju nNOSa za sarkolemu jer je nNOS odsutan u sarkolemi mišićnih vlakana kojima nedostaje distrofin.

U glodavaca nNOS je koncentriran na membrani vlakana tipa II, dok tip I pokazuje slabije imunohistokemijsko obojenje. Ova opažanja su upotpunjena sa biokemijskim istraživanjima koja pokazuju veću NOS aktivnost u brzim mišićima tj. mišićima u kojima dominiraju vlakna tipa II (npr. m. extensor digitorum longus, m. gastrocnemius, m. plantaris), negoli u mišićima u kojima dominiraju spora vlakna tj. vlakna tipa I (npr. m. soleus) (82,98,110,111,112,113).

Međutim, postoje razlike u ispoljavanju nNOS-a kako između pojedinih mišića unutar iste vrste tako i između pojedinih vrsta. Npr. u mimičnim mišićima štakora, u ekstrasfuzalnim i intrafuzalnim vlaknima ovaca, sarkolemalna nNOS imunoreaktivnost vidljiva je kako u mišićnim vlaknima tipa I tako i u vlaknima tipa II.

U čovjeka je, također, nNOS ispoljen u jednakoj mjeri u oba tipa mišićnih vlakana što je dokazano imunohistokemijskom i histokemijskom analizom. S druge strane, Frandsen i sur. (114) su u m.vastus lateralis čovjeka uočili jaču ekspresiju nNOS-a u citoplazmi i sarkolemi tipa I negoli u vlaknima tipa II. Dok u glodavaca postoji korelacija između ekspresije nNOS-a i aktivnosti nNOS-a kod čovjeka ta korelacija nije do kraja istražena.

U odraslih mišića, nNOS je snažno ispoljen u području neuromišićne spojnice, na spoju između mišića i tetive te na kostamerama. Capanni i sur. (115) su imunohistokemijskom metodom pokazali da je nNOS u 24 mjesecnog štakora u sarkoplazmi raspoređen granularno i difuzno.

### 1.3.2. REGULACIJA nNOS EKSPRESIJE

nNOS je regulatorni protein i kao takav je uvijek prisutan u skeletnim mišićnim vlaknima. Početkom 90-ih godina se smatralo da je nNOS strukturni protein i kao takav ne podliježe promjenama niti u ekspresiji niti u aktivnosti. Međutim, Ogilvie i Weiner sa suradnicima (116,117) su to opovrgli uočavanjem da se promjene događaju tijekom razvoja i rasta te da su ovisne o hormonalnom statusu. Isto tako u odraslim skeletnim mišićima dolazi do povećanja nNOS aktivnosti za vrijeme povećane mišićne aktivnosti (118), električne stimulacije (113), kao i tijekom starenja (115).

nNOS sudjeluje u kontroli kontrakcije mišića, utječe na ulazak glukoze u mišićno vlakno te regulira respiratorni ciklus mitohondrija i aktivnost kreatin kinaze. Regulacija mišićne kontrakcije ide preko cGMP-ovisnih i cGMP-neovisnih procesa. cGMP-ovisni procesi uključuju djelovanje cGMP-a kao drugog glasnika NO-a. Naime, stvoreni NO u stanici stimulira gvanilat ciklazu koja stvara cGMP. cGMP preko cGMP-ovisne protein kinaze smanjuje kontrakciju mišića (119).

Mehanizam djelovanja cGMP-a u mišićnom vlaknu je još uvijek nejasan, odnosno udio koji on čini je vrlo maleni. Stoga se došlo do zaključka da postoji i drugi mehanizam, djelovanja preko cGMP-neovisnih procesa, koji uključuju direktno djelovanje na regulatorne proteine reverzibilnim redoks procesima (120).

Jedan od mehanizama direktnog djelovanja NO-a je regulacija otpuštanja kalcija iz rianodinskih receptora. Poznato je da NO ima bifazičan utjecaj na otpuštanje kalcija. U malim koncentracijama NO sprječava otvaranje kanala, a u većim koncentracijama oksidira podjedinice kalcijevih kanala i omogućava njihovo otvaranje (119).

Nadalje, NO utječe na spregu podraživanja i kontrakcije direktno regulirajući procese koji su redoks osjetljivi. Oni uključuju održavanje potencijala membrane u mirovanju (121), otpuštanje kalcija iz sarkoplazmatskog retikuluma (122) i međusobnu interakciju aktina i miozina (123).

Ulazak glukoze u mišićno vlakno može biti regulirano inzulinom, ali i pomoću NO-a. Naime, prilikom vježbanja aktivira se NO ovisni put koji je reguliran povišenom koncentracijom NO-a. On djeluje na specifični sarkolemalni protein, GLUT-4, koji svojom aktivnošću stimulira ulazak glukoze (124).

nNOS regulira respiratorni ciklus mitohondrija inhibirajući citokrom-c oksidazu, proces koji smanjuje stanični ATP, a povećava ADP, AMP, GDP i  $P_i$ . Ti metaboliti reguliraju različite stanične procese kao što su transport iona, sinteza proteina i mišićna kontrakcija (120).

Poznato je da tijekom starenja dolazi do promjena u veličini vlakana što predstavlja uobičajenu pojavu tijekom starenja (125). Naime, dolazi do progresivnog gubitka kontraktilnih proteina što vodi atrofiji. Istovremeno degeneracija aksona sa posljedičnom regeneracijom dovodi do grupiranja vlakana u mišićima sa miješanim tipovima vlakana (126).

Capanni i suradnici (115) su uočili da dolazi do povećanja ekspresije nNOS-a u skeletnom mišiću tijekom starenja. Međutim, ono nije posljedica degeneracije aksona. Naime, neurogene bolesti, jednako kao i u eksperimentalnim modelima prerezanja živca, dolazi do smanjenja ekspresije nNOS-a ili je ona nepromijenjena (127,128,129). Objašnjenje vjerojatno postoji u nNOS transkripciji.

Transkripcija nNOS-a je specifično modulirana u različitim tkivima i tijekom razvoja. Regulacijski proces zahtijeva mnogobrojne korake za koje se smatra da su ovisni o alternativnom splajsinu i mnogobrojnim transkripcijskim faktorima (130,131).

Tijekom kronične električne stimulacije m.tibialis anterior i m.extensor digitorum longus (EDL) dolazi do transformacije vlakana tipa II u vlakna tipa I. Reiser i sur. (113) su proučavali utjecaj povećane aktivnosti mišića pomoću električne stimulacije na promjene u nNOS ekspresiji. Nakon tri tjedna aktivnost nNOS-a se povećala za 100%, što je i u korelaciji sa povećanom ekspresijom nNOSa. Ovi rezultati upućuju da je ekspresija nNOS-a u skeletnom mišiću regulirana mišićnom aktivnošću i da ta regulacija ne slijedi transformaciju vlakana, budući da se zna da brza vlakna ispoljavaju nNOS.



### 1.3.3. nNOS U RAZVOJU SKELETNOG MIŠIĆA

Pored već poznate lokalizacije u odraslom skeletnom mišiću (111,119) NOS se eksprimira i u skeletnim mioblastima u diferencijaciji i u skeletnom mišiću tijekom razvoja (132).

Lee i suradnici (133) su pokazali da tijekom formiranja mioblasta i miotuba u embrionalnim mišićnim stanicama pilića dolazi do povećanja koncentracije iona kalcija, kalmodulina i cGMP-a. Pretpostavku da je za to zaslužan nNOS i NO, potvrdila su daljnja istraživanja. Balon i Nadler (134) su dokazali otpuštanje NO-a u inkubiranim skeletnim mišićnim vlaknima, a Blottner i Luck (132) su imunohistokemijski dokazali nNOS u mioblastima tijekom diferencijacije i u skeletnim mišićnim vlaknima tijekom razvoja.

U suprotnosti sa činjenicom da u odraslim skeletnim mišićnim vlaknima postoji tipično imunohistokemijsko bojenje, poput prstenova oko poprečnih presjeka vlakana (110,119), prisustvo nNOS-a u citosolu upućuje na značajnu razvojno reguliranu translokaciju nNOSa od prenatalnog ka postnatalnom stupnju mišićnog razvoja.

U skeletnim mišićima nNOS je lokaliziran na sarkolemi u kompleksu sa distrofinom (97). nNOS aktivnost je snižena ukoliko nema distrofina (97,112). Međutim postojanje distrofina ipak nije glavni faktor koji determinira stupanj nNOS aktivnosti u mišiću.

Chang i sur (112) su pokazali da miševi 2 tjedna starosti imaju vrlo nisku nNOS aktivnost u usporedbi sa divljim tipom i u *mdx* miševa.

U završnom stadiju mišićne diferencijacije važna je uloga motoneurona (135,136). Uzorak odraslog mišića još nije uspostavljen sa rođenjem. Motorne jedinice u EDL se definitivno uspostavljaju nakon 2 tjedna (137). Lincoln i Harb (138) su i pokazali da u

štakora starih dva tjedna dolazi do povećanja i nNOS aktivnosti u EDL-u. Time pretpostavljaju da je u brzim mišićima povećanje ekspresije NOS-a regulirano živcem.

Kobzik i sur. (119) su prvi pokazali da ne postoje značajne razlike između brzih i sporih mišića u ranom postnatalnom periodu od 1. do 2. tjedna života. Razlika u NOS aktivnosti je značajna u odraslog EDL-a i SOL-a (m. soleus). Naime, NOS aktivnost počinje značajno rasti u EDL-u u 2. tjednu, dok u soleusu NOS aktivnost ostaje na istom stupnju tijekom čitavog razvoja.

#### 1.3.4. nNOS U PATOLOŠKIM STANJIMA

U fiziološkim uvjetima NO je prisutan posvuda u tijelu u vrlo niskim koncentracijama. Nivo stvorenog NO-a strogo je kontroliran od strane konstitutivnih enzima eNOS-a i nNOS-a. Međutim, koncentracija NO može se naglo povećati hiperaktivacijom nNOS-a u patološkim stanjima kao što su ishemična oštećenja i glutamatom posredovana neurodegenerativna oboljenja centralnog živčanog sustava.

U patološkim uvjetima, kao što je upala, značajno se povećava koncentracija NO uslijed pojačane ekspresije iNOSa. U ovom kontekstu, NO možemo smatrati mačem s dvije oštrice. S jedne strane, može imati povoljan učinak na organizam djelujući antivirusno, antibakterijski, tumoricidno i antiparazitski, a s druge strane, visoke koncentracije NO, ukoliko nisu pod kontrolom, za organizam mogu biti vrlo škodljive.

Nepovoljan učinak NO-a događa se, jer perzistirajuća visoka koncentracija NO može stupiti u reakciju s anionima superoksida uslijed čega nastaju visoko toksične supstancije kao što su peroksinitriti i hidroksi radikali. Na sreću organizam posjeduje mehanizme koji kontroliraju ekspresiju iNOS-a pomoću nekoliko endogenih i egzogenih molekula. Potonje mogu djelovati kao induktori ekspresije iNOSa (npr. bakterijski lipopolisaharidi ili citokini) ili kao supresori istih (npr. deksamezaon, interleukin-4) (74). Zahvaljujući uravnoteženom djelovanju ovih molekula, tijekom upale se događa, vremenski i prostorno ispravna, ekspresija iNOS-a koja vodi eliminaciji inflamatornih faktora sa minimalnim oštećenjem tkiva ili čak i bez njega.

Mišićne distrofije su nasljedna degenerativna oboljenja mišića koja nastaju mutacijom gena koji kodiraju stanične proteine. Usprkos brojnih proteina sa različitim

staničnim funkcijama, sve mišićne distrofije imaju zajedničke patološke karakteristike, a vjerojatno i zajednički mehanizam nastanka koji je još uvijek nepoznat.

Najčešća mišićna distrofija u čovjeka je Duchenn-ova mišićna distrofija koja nastaje zbog odsutstva distrofina, subsarkolemalnog proteina koji veže F-aktin sa grupom transmembranskih glikoproteina.

U Duchenn-ovoj mišićnoj distrofiji dolazi do gubitka skeletnih mišićnih vlakana, što dovodi do regeneracije vlakana i fibroze koja progresivno nadomještava degenerirana vlakna (139).

Najšire izučavan eksperimentalni model je na *mdx* miševima, gdje zbog mutacije gena koji kodira distrofin dolazi do njegovog nedostatka u skeletnim mišićnim vlaknima (97).

U distrofin-deficijentnih miševa nestaje sarkolemalna nNOS, što je vidljivo u imunohistološkim preparatima (97,139). Međutim, nNOS je dokazan u citosolu, iako smanjene aktivnosti.

Pod pretpostavkom da NO igra ulogu u patogenezi mišićne distrofije, moglo bi se objasniti kao njegovo smanjenje u protektivnoj ulozi. Naime, Thomas i Victor (140) su pronašli da NO nastao iz skeletnog mišića nije dovoljan da održi zadovoljavajuću prokrvljenost za vrijeme mišićne kontrakcije. Mišići u funkcionalnoj ishemiji dovode do mišićne nekroze.

Defekti glikoproteinskog kompleksa distrofina dovode do biokemijskih promjena kojima mišićna vlakna postaju osjetljiva na različita oštećenja. Rando i sur. (141) su utvrdili da u distrofin deficijentnih miševa postoji veća osjetljivost mišićnih vlakana na oksidativni stres.

U *mdx* miševa, oksidativni stres dovodi do nekroze mišićne stanice (142). Međutim, nekoliko istraživanja je proučavalo mišiće miševa koji su bili nNOS (143,144), kao i alfa1-sintrofin deficijentni (145). Uočena je aktivnost i lokalizacija nNOS-a bila slična kao i u *mdx* miševa, međutim nije došlo do razvoja mišićne distrofije.

Ta povećana osjetljivost mišića distrofin deficijentnih miševa na oksidativna oštećenja nije zbog nedostatka NOS-a (146), jer je upitan antioksidativni efekt NO-a u tim slučajevima (147). Objašnjenje vjerojatno postoji u činjenici da pomakom nNOS-a sa sarkoleme u većim mišićnim vlaknima rezultira abrentnom produkcijom NO-a, jer su membranski regulatorni proteini previše daleko da ispravno reguliraju nNOS (143).

Smanjena perfuzija i rezultirajuća funkcionalna ishemija zbog smanjenog nNOS-a, može biti jedan od mehanizma koji vodi do apoptoze i nekrotične smrti stanice u distrofičnim bolestima (148,149). Naime, da li će mišićno vlakno otići u apoptozu ili u nekrozu ovisi o intenzitetu oksidativnog stresa (150).

Tijekom denervacije dolazi do gubitka nNOS-a u mišićnim vlaknima (129). Smanjena ekspresija sarkolemalnog nNOS-a dovodi do promicanja aksonalne regeneracije i privlačenje aksona mišićnom vlaknu čime dolazi do formiranja novih motornih ploča i reinervacije.

U reinerviranom mišiću nNOS je ponovno pojačano ispoljen. Njegova pojačana ekspresija se događa prije nego što završi reinervacija. NO djeluje kao početni reverzibilni retrogradni vijesnik koji pobuđuje događaje kao što su strukturalne promjene i genska ekspresija odgovorna za neuromuskularnu sinaptogenezu. Reekspresija nNOS-a se događa kada i ekspresija stres proteina i proteina udruženih za denervaciju, regeneraciju i apoptotične stanice dođu u fiziološke omjere (151).

Glavna fiziološka funkcija NO-a je prevencija polineuralne inervacije mišićnih vlakana eliminiranjem sinapsi izvan neuromišićne spojnice. Time je pojačana ekspresija nNOS indikator regularno inerviranog mišićnog vlakna.

Smanjena ekspresija nNOS-a dovodi do oksidativnog oštećenja redukcijom superoksidnih aniona. S druge strane smanjena ekspresija smanjuje citotoksični potencijal NO-a na slobodne radikale (152).

Slobodni radikali igraju vrlo važnu ulogu u oštećenju mišićnih vlakana u neuromišićnim bolestima (65). Nadalje, oksidativni stres dovodi do apoptoze (153), što rezultira gubitkom mišićnih vlakana u denerviranim mišićima (151).

Mehanizam umiranja stanica ovisi o koncentraciji NO-a. Pri manjim količinama NO-a dolazi do apoptoze, a pri većim dolazi do nekroze mišićnih vlakana (150,154). Tijekom denervacije, uslijed smanjenja nNOS-a, glavni mehanizam odumiranja mišićnih vlakana je apoptoza (129).

Diabetes mellitus tipa I je inzulin ovisan i karakterizira ga poremećaj u metabolizmu glukoze i endotelijalna disfunkcija. Skeletni mišić je glavno mjesto gdje inzulin djeluje na ulazak glukoze i na protok krvi.

U istraživanju Perreault i sur. (155) na streptozotocin dijabetičnim miševima (STZ), u skeletnim mišićima dolazi do značajnog smanjenja NOS aktivnosti, te posljedično smanjene produkcije NO-a. nNOS proteinska koncentracija pada nakon 2 tjedna od induciranja dijabetesa.

Smanjenjem ekspresije nNOS-a u mišićnim vlaknima i na neuromuskularnim spojnica dolazi do slabljenja kontrakcijske sposobnosti mišića. Naime, dugotrajni dijabetes smanjuje kontraktilnu sposobnost ometajući presinaptičku kontrolu NO-a na

razini neuromišićne spojnice (156). Također postoje podaci da dijabetes direktno djeluje na kontraktilni i regulatorni sustav u brzokontraahirajućim vlaknima (157,158).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj je ovog istraživanja proučiti ekspresiju neuralne izoforme sintetaze dušikova monoksida (nNOS) u skeletnom mišiću s obzirom na tip mišićnih vlakana te utvrditi utjecaj promjena u inervaciji na ekspresiju nNOSa. Specifični ciljevi ovog istraživanja su:

1. proučiti distribuciju nNOS-a kako u sporim tako i u brzim skeletnim mišićima štakora pomoću imunohistokemijske metode, tj. ustanoviti da li sva četiri tipa mišićnih vlakana ispoljavaju nNOS na sarkolemi.
2. pomoću Western blot analize kvantificirati nNOS i time utvrditi fiziološki nivo nNOS-a u zdravim, brzim i sporim skeletnim mišićima štakora.
3. ispitati utjecaj živca na ispoljavanje i distribuciju nNOS-a pokusima denervacije sporih i brzih skeletnih mišića te utvrditi pomoću Western blot analize da li presijecanje živca dovodi do istih promjena u sporom i u brzom skeletnom mišiću.
4. provesti »time course« studiju kako bi ustanovili točno vrijeme nastanka promjena u ispoljavanju nNOS-a u ranim fazama denervacije pomoću Western blot analize.
5. pojasniti pojam o živcu ovisne regulacije pomoću pokusa koji podrazumijevaju električku stimulaciju, prethodno denerviranih, sporih i brzih skeletnih mišića obrascima koji imitiraju brzi i spori živac.
6. »time course« studijom ustanoviti promjene u nNOS ispoljavanju tijekom procesa regeneracije nakon injekcije lokalnog anestetika u skeletni mišić.



### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI

U ovom istraživanju koristili smo mužjake štakora Wistar starosti 2 mjeseca (200-250g). Istraživanja su provedena na sporim (m.soleus) i brzim mišićima (m.extensor digitorum longus i m. tibialis anterior). Metodom imunohistokemije proučavali smo ispoljavanje sporih i brzih izoformi teških lanaca miozina i neuralne sintetaze dušikova monoksida (nNOS), a Western blot analizu upotrijebili smo za dokazivanje nNOS proteina. Pokus je podijeljen u 4 skupine.

U prvoj skupini od 6 štakora, prikazali smo izoforme teških lanaca miozina i nNOS-a prisutnih u odraslom m.soleus, m.extensor digitorum longus i m. tibialis anterioru. Mišići su smrznuti tekućim dušikom, a potom pohranjeni na  $-80^{\circ}\text{C}$  do daljnje analize.

U drugoj skupini proučavali smo utjecaj denervacije na ispoljavanje nNOS-a. 48 štakora smo podijelili u šest podskupina. Denervacija skeletnih mišića izazvana je presijecanjem desnog n.ischiadicusa proksimalno od njegovog grananja. Spontana reinervacija spriječena je odstranjenjem segmenta živca od 0,5 cm i privezivanjem njegovih krajeva za susjedne mišiće (159). Žrtvovanje životinja je učinjeno nakon 1., 3., 7., 10., 15. dana te 7 tjedana nakon denervacije. Proučavali smo ekspresiju nNOS-a u SOL-u i EDL-u denervirane noge. Istoimeni mišići lijeve noge služili su kao kontrola. Mišići su zamrznuti dušikom te pohranjeni na  $-80^{\circ}\text{C}$ .

U trećoj skupini su mišići električki stimulirani pomoću implantiranih elektroda na zdravim i denerviranim mišićima. Na osam štakora učinjena je denervacija presijecanjem

desnog n.ischiadicusa proksimalno od njegovog grananja. Stimulacija je započela trećeg dana nakon učinjene denervacije i nastavila se do desetog dana. Upotrijebljena su 2 načina stimulacije: "brzi" koji imitira brzi živac, a sastoji se od 60 impulsa pri frekvenciji od 100 Hz svakih 60s i "spori" koji imitira spori živac, a sastoji se od 200 impulsa pri frekvenciji od 20 Hz svakih 30s (36). SOL i EDL mišići su zamrznuti tekućim dušikom desetog dana od izvršene denervacije i pohranjeni ma -80°C do daljnje analize.

U četvrtoj skupini proučavan je utjecaj regeneracije na ispoljavanje nNOS-a. 32 štakora je podijeljeno u 4 podskupine. Proces regeneracije induciran je ubrizgavanjem 0,5ml 0,5%-tnog lokalnog anestetika bupivakaina (Marcain) inzulinskom iglom u EDL i SOL desne noge (160). Mišići su izvađeni i proslijeđeni na daljnju analizu nakon 1, 3, 7 i 10 dana od izazivanja procesa regeneracije.

## **3.2. METODE**

### **3.2.1. IMUNOHISTOKEMIJSKO DOKAZIVANJE TEŠKIH LANACA MIOZINA**

Serijski rezovi na želatiniziranim stakalcima obojani su sa protutijelima specifičnim za teške lance miozina. Upotrijebili smo protutijelo BA-D5 za vlakna tipa I, SC-71 za vlakna tipa 2A, BF-F3 za vlakna tipa 2B i BF-35 za sva vlakna osim 2X. Protutijela su proizvedena na Odjelu za eksperimentalna istraživanja Biološkog instituta u Padovi, Italija. Kriostatiski rezovi, debljine 8 $\mu$ , inkubirani su 30 minuta na 37°C s monoklonskim protutijelima prethodno razrijeđenim u PBS-u. Zatim se višak protutijela ispiru kroz desetminutna ispiranja u PBS-u na sobnoj temperaturi.

Rezovi se nakon toga inkubiraju kroz 30 minuta na 37°C sekundarnim protutijelom koje je konjugirano sa peroksidazom (DAKO EnVision™, Peroxidase, Mouse; USA). Nakon inkubacije, rezovi se ponovno ispiru kroz 10 minuta u PBS-u na sobnoj temperaturi. Potom se stakalca prekrivaju otopinom za otkrivanje AEC+ (DAKO, USA) i stavljaju se na tamno mjesto tijekom 10 minuta. Nakon toga, reakcija se blokira uranjanjem u PBS i ispiru pod tekućom vodom. Slijedi uklapanje u kanada balzam (Merck, Njemačka).

### **3.2.2. IMUNOHISTOKEMIJSKO DOKAZIVANJE nNOS-a**

Poprečni rezovi se fiksiraju u hladnom acetonu (4°C) tijekom 2 minute. Slijedi ispiranje u PBS-u tri puta kroz 10 minuta. Nakon toga, stakalca idu u pretretman sa 2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u metanolu kroz 5 minuta. Rezovi se ponovno ispiru u PBS-u, tri puta kroz 10 minuta. Slijedi nakapavanje primarnog protutijela nNOS i ostavlja se preko noći na 4°C. Slijedi ispiranje u PBS-u 10 minuta u tri puta. Zatim se inkubiraju kroz 60 minuta na 37°C sekundarnim protutijelom koje je konjugirano sa peroksidazom (DAKO EnVision™, Peroxidase, Rabbit; USA).

Nakon inkubacije, rezovi se ponovno ispiru kroz 10 minuta u PBS-u na sobnoj temperaturi. Potom se stakalca inkubiraju u 0,05M TRIS-u kroz 5 minuta. Slijedi prekrivanje otopinom za otkrivanje AEC+ (DAKO, USA) i stavljaju se na tamno mjesto tijekom 10 minuta. Nakon toga, reakcija se blokira uranjanjem u PBS i ispire pod tekućom vodom. Slijedi uklapanje u kanada balzam (Merck, Njemačka).

### **3.2.3. HISTOKEMIJSKA METODA HEMALAUN EOZIN**

Metoda hemalaun eozin je histološka metoda za prikaz strukture mišića. Stakalca se suše 10 minuta na zraku, a zatim se izvrši fiksacija u hladnom acetonu (4°C). Potom se preparati dehidriraju u različitim koncentracijama alkohola (100%, 96% i 75%). U hematoksilinu se ostavi 10 minuta, a zatim se ispire vodom te se ostavi kroz nekoliko sekundi u HCl alkoholu da bi se isprao višak boje. Nakon ispiranja u tekućoj vodi boji se u eozinu 5 minuta. Zatim se ispire u destiliranoj vodi te se na kraju dehidrira u alkoholu

različitih koncentracija (75%, 96% i 100%). Na kraju se uklapa u kanada balzam (Merck, Njemačka).

### **3.2.4. WESTERN BLOT ANALIZA**

Western blot analiza se radi na homogenatima mišića u otopini 250 mM sukroze, 10 mM TRIS HCl, 0,1 mM EGTA (pH 7,4) koja sadrži inhibitor proteaze (Complete, GmbH). Homogenati se centrifugiraju na 12000 RPM kroz 10 min. Dobiveni supernatant se analizira na protein pomoću metode po Bredford-u. Potom se uzima po 50µg proteina iz mišića koji se ispituju i stavljaju na odvajanje elektroforezom na 7,5% SDS-poliakrilamidnom gelu. Zatim se pomoću standardnog molekularnog markera (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) utvrđuje imunoreaktivni produkt. Gel je na konstantnih 20 mA. Immunoblot analiza se radi pomoću nitrocelulozne membrane, a prijenos traje 3 sata na 80 V. Membrane se blokiraju sa 5% nemasnim suhim mlijekom u 20 mM TRIS-u, 500 mM NaCl-u i 1% Tween-20 (pH 7,5) tijekom 1 h. Membrane se zatim inkubiraju preko noći na 4°C sa primarnim poliklonalnim zečjim anti-nNOS protutijelom. Nakon ispiranja, vezana protutijela se vizualiziraju inkubacijom sa sekundarnim protutijelom (svinja anti-zečje protutijelo) konjugirano sa peroksidazom (1:2000, DAKO). Imunoreaktivne linije se vizualiziraju sa SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, USA) u skladu sa specifikacijom proizvođača. Densitet linija proteina se kvantificiraju denzitometrijski pomoću kompjuterskog programa Sigma Plot.

Poprečni presjeci obrađeni su pomoću svjetlosnog mikroskopa Opton 20 Standard (Germany) pri povećanju od 100x i 200x. Mikroskop je putem video kamere spojen s računalom u kojem su instalirani programi za kvantitativnu analizu slike SFORM (V.A.M.S., Hrvatska). Kvantitativna obrada podataka obavljena je uz pomoć kompjuterskih programa Sigma plot i Excel (Microsoft Office).

## 4. REZULTATI

### 4.1. IMUNOHISTOKEMIJSKO DOKAZIVANJE nNOS-a U ZDRAVIM SKELETNIM MIŠIĆIMA ŠTAKORA

Skeletni mišić građen je od sporih (tip I) i brzih (tip IIA, IIX i IIB) vlakana. Svaki pojedini tip mišićnog vlakna može se dokazati imunohistokemijskom metodom koristeći monoklonska protutijela specifična za izoformu teških lanaca miozina tipa I, IIA, IIX i IIB.

Mišić extensor digitorum longus (EDL) i tibialis anterior (TA) pripadaju skupini brzih mišića tj. većina njihovih vlakana intenzivno se boji protutijelima specifičnim za brze izoforme teških lanaca miozina.

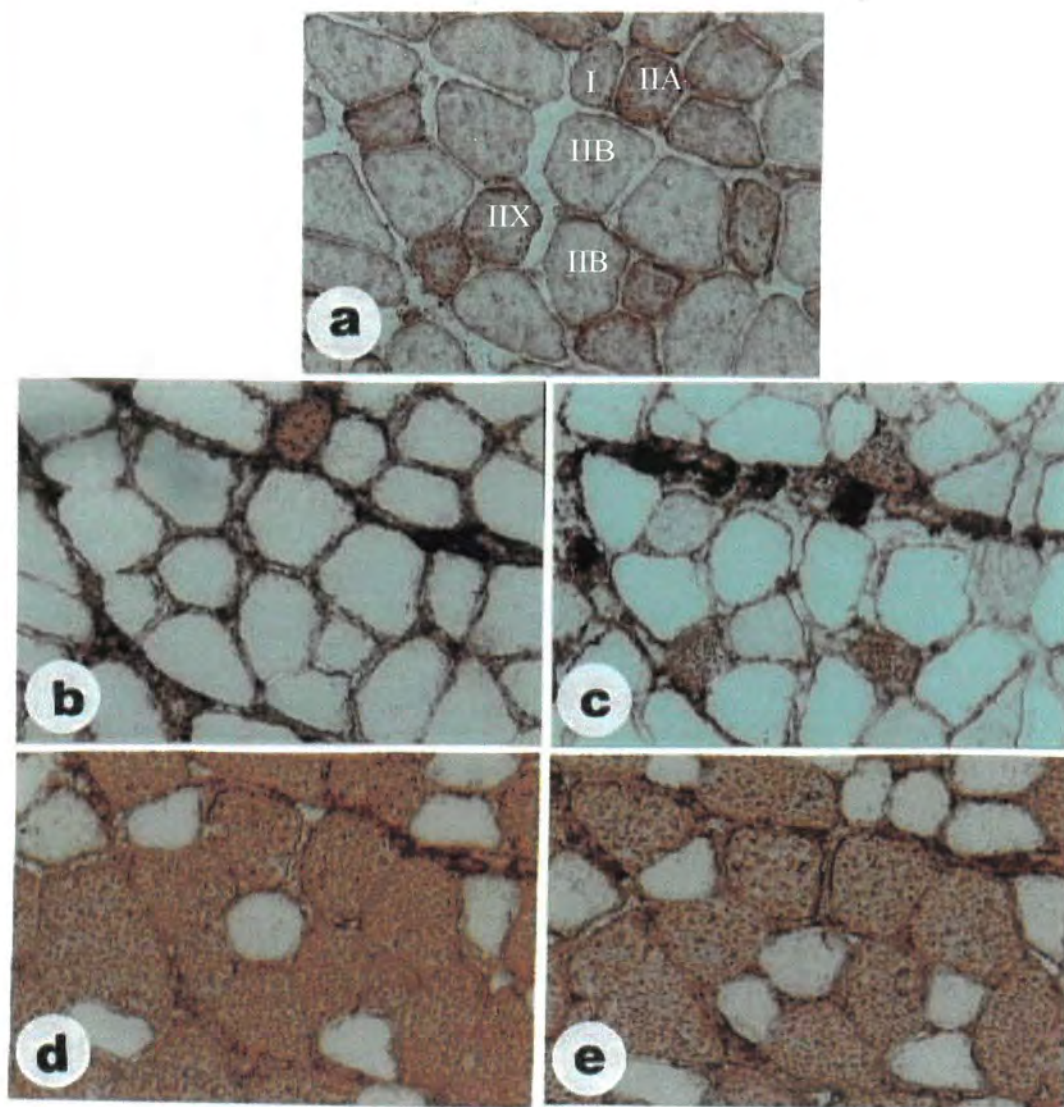
Mišić soleus (SOL) građen je od brojnih vlakana koja se boje monoklonskim protutijelima specifičnim za sporu izoformu teških lanaca i stoga ga ubrajamo u skupinu sporih mišića.

#### 4.1.1. EKSPRESIJA nNOS-a U BRZIM MIŠIĆIMA

M.extensor digitorum longus pripada skupini brzih mišića. Sastoji se od oko 95% vlakana koja se boje monoklonskim protutijelima specifičnim za brze izoforme miozina (Slika 10C, D i E) i oko 5% vlakana pozitivnih na sporu izoformu teških lanaca miozina (Slika 10B). Imunohistokemijska analiza poprečnih presjeka pokazuje da nNOS ispoljavaju svi brzi tipovi vlakana osim mišićnih vlakana tipa IIB. Vlakna tipa I smatramo intermedijarnim vlaknima koja pokazuju reakciju na nNOS protutijela slabijeg intenziteta u usporedbi sa vlaknima tipa IIA i IIX (Slika 10A).

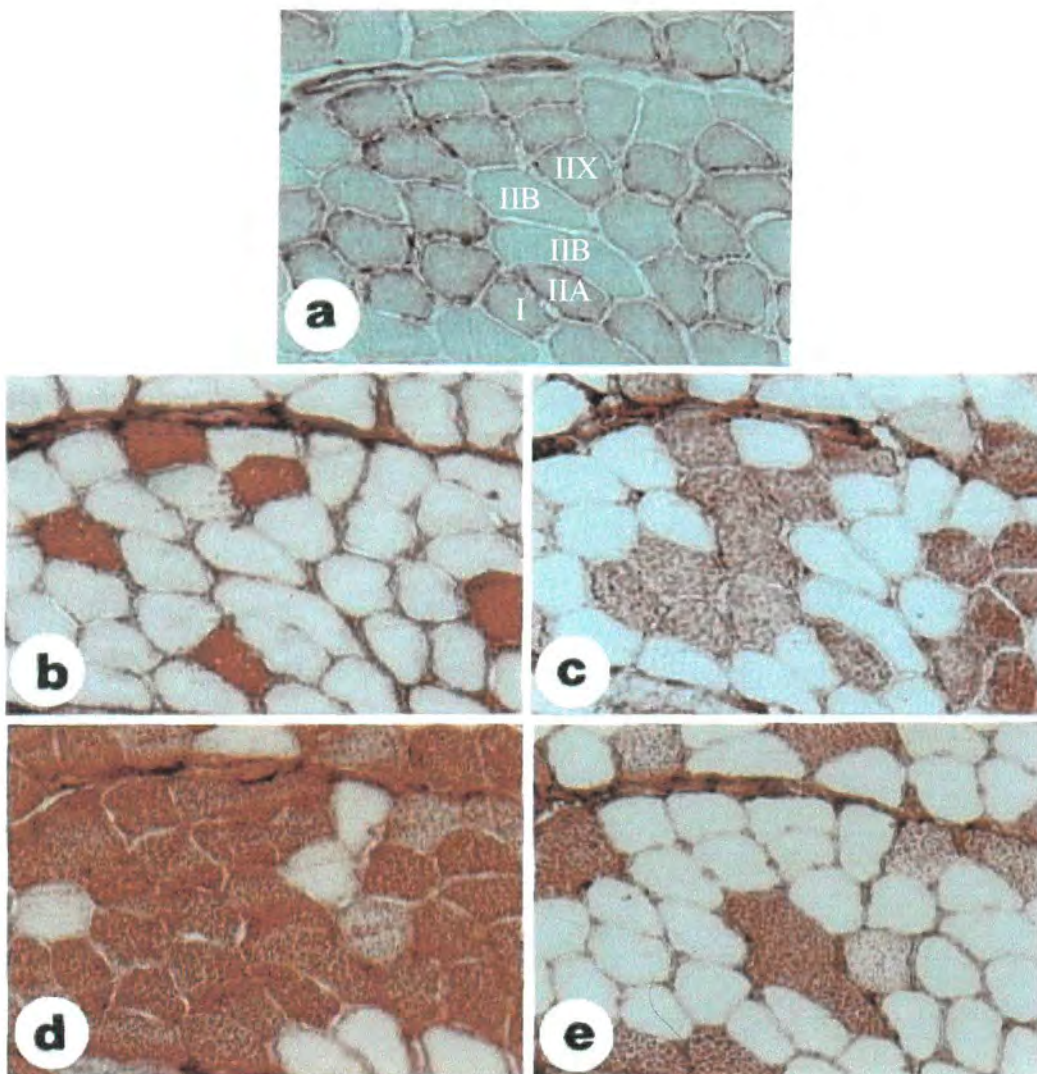
Mišić tibialis anterior je također iz skupine brzih mišića. Većina njegovih vlakana (90%) eksprimira brze izoforme (Slika 11C, D i E), dok samo 10% vlakana je pozitivno na sporu izoformu teških lanaca miozina (Slika 11B). Imunohistokemijska analiza poprečnih presjeka pokazuje da nNOS ispoljavaju svi brzi tipovi vlakana osim mišićnih vlakana tipa IIB. Vlakna tipa I smatramo intermedijarnim vlaknima koja pokazuju vrlo slabu reakciju na nNOS protutijela (Slika 11A).





**Slika 10.** Ekspresija nNOS- a i teških lanaca miozina u odraslom mišiću extensor digitorum longusu štakora. Imunohistokemijska metoda. Svjetlosni mikroskop, povećanje 200x.

Poprečni presjeci odraslog mišića extensor digitorum longus obojani protutijelima specifičnim za nNOS (A) i pojedine izoforme teških lanca miozina (MHC): tip I (B), tip IIA (C), sve osim tipa IIX (D) i IIB (E). Ekspresija nNOS-a vidljiva je u vlaknima tipa I, IIA i IIX, dok vlakna tipa IIB pokazuju negativnu reakciju.

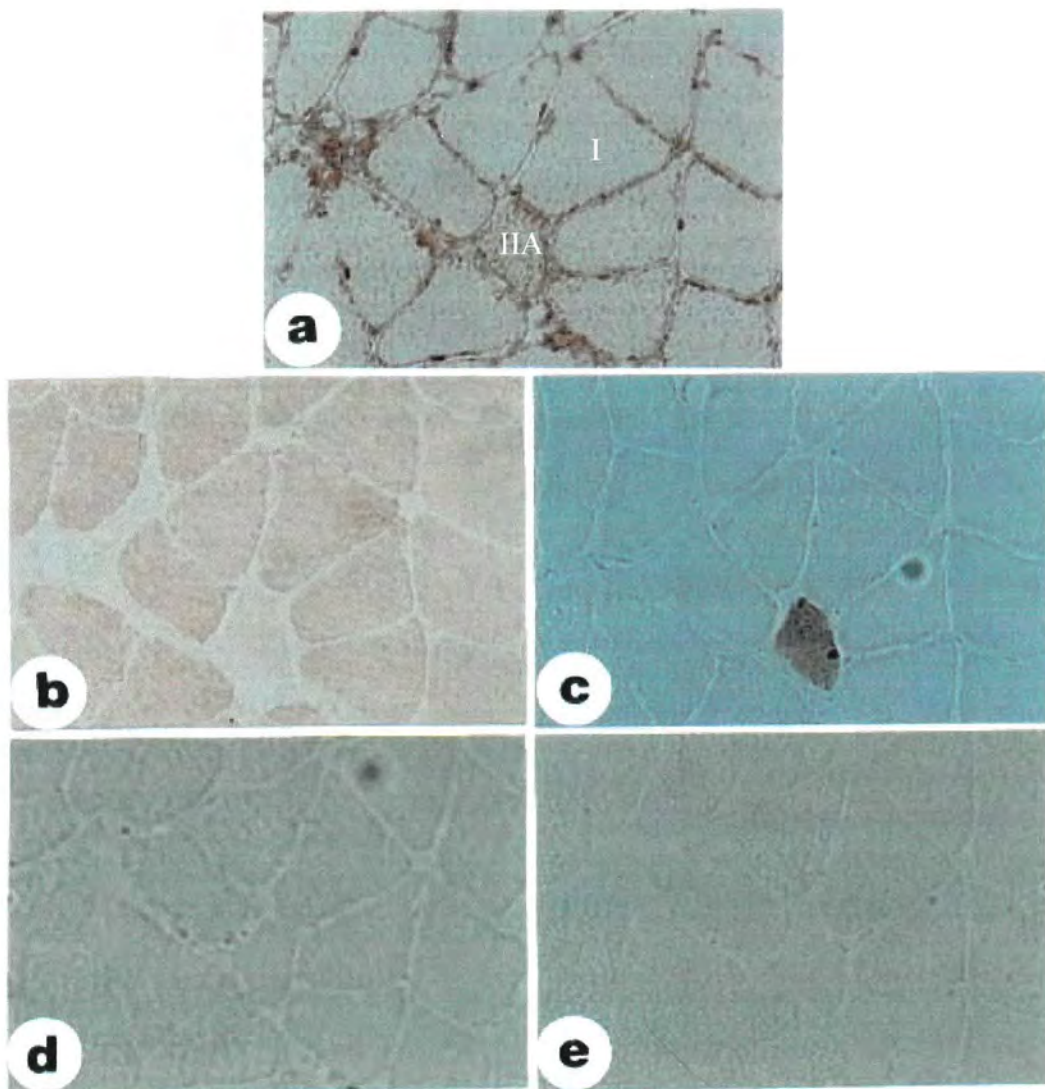


**Slika 11.** Ekspresija nNOS-a i teških lanaca miozina u odraslom mišiću tibialis anterioru štakora. Imunohistokemijska metoda. Svjetlosni mikroskop, povećanje 200x.

Poprečni presjeci odraslog mišića tibialis anterior obojani protutijelima specifičnim za nNOS (A) i pojedine izoforme teških lanca miozina (MHC): tip I (B), tip IIA (C), sve osim tipa IIX (D) i IIB (E). Uočava se da najveća vlakna u m.tibialis anterioru, vlakna tipa IIB su negativna na poliklonalno nNOS protutijelo.

#### 4.1.2. EKSPRESIJA nNOS-a U SPOROM MIŠIĆU

M.soleus je predstavnik sporih mišića u kojem dominiraju spora mišićna vlakna. Naime čak 90% vlakana pripada najsporijoj izoformi teških lanaca miozina, tipu I (Slika 12B), dok 10% vlakana pripada brznoj izoformi, vlaknima tipa IIA (Slika 12C). Imunohistokemijska analiza poprečnih presjeka pokazuje vrlo slabu obojenost nNOS protutijelima vlakana tipa I, dok pozitivnu reakciju pokazuje vlakno tipa IIA. Ekspresija nNOS-a u vlaknima tipa I je vidljiva na sarkolemi, dok je u vlaknu tipa IIA reakcija prisutna i subsarkolemalno (Slika 12A).



**Slika 12.** Ekspresija nNOS-a i teških lanaca miozina u odraslom mišiću soleusu štakora. Imunohistokemijska metoda. Svjetlosni mikroskop, povećanje 200x.

Poprečni presjeci odraslog mišića soleus obojani protutijelima specifičnim za nNOS (A) i pojedine izoforme teških lanca miozina (MHC): tip I (B), tip IIA (C), sve osim tipa IIX (D) i IIB (E). U m.soleusu postoji vrlo slaba ekspresija nNOS-a u vlaknima tipa I, dok vlakno tipa IIA je pozitivno na nNOS izoformu.

#### 4.1.3. WESTERN BLOT ANALIZA nNOS-a U ZDRAVIM SKELETNIM MIŠIĆIMA ŠTAKORA

U svrhu proučavanja promjena u ekspresiji nNOS-a tijekom različitih patoloških stanja vrlo je važno utvrditi fiziološki nivo ispoljavanja nNOS-a u skeletnom mišiću. Western blot analiza je pogodna metoda kod koje je intenzitet dobivenih linija moguće kvantificirati pomoću denzitometrije (Slika 13). Rezultat se izražava u tzv. relativnim jedinicama koje predstavljaju količinu nNOS proteina.



**Slika 13.** *Western blot analiza nNOS-a u skeletnim mišićima tibialis anterioru, ekstensor digitorum longusu i soleusu.*

Iz tablice 2A je vidljivo da u EDL-u ima 41% vlakana tipa IIB veoma velike površine ( $4913,4\mu\text{m}^2$ ), dok u TA-u ima nešto veći postotak vlakana tipa IIB (49%), ali sa puno manjom površinom,  $3028\mu\text{m}^2$ . Western blot analiza homogenata mišića i naknadna denzitometrija potvrđuju rezultate dobivene imunohistokemijskom metodom. Naime, TA pokazuje najjaču ekspresiju nNOS-a, nešto slabiju pokazuje EDL, dok su relativne vrijednosti nNOS-a u mišiću soleusu vrlo niske (Tablica 2B).

**Tablica 2.** Dokazivanje neuralne izoforme NOS-a u zdravim mišićima TA, EDL i SOL.

A) Tipovi vlakana u TA-u, EDL-u i SOL-u izraženi u postocima i njihove površine. B)

Denzitometrijska metoda kvantifikacije Western blot analize istih mišića.

A

	TA		EDL		SOL	
	%	$\mu\text{m}^2 \pm \text{SD}$	%	$\mu\text{m}^2 \pm \text{SD}$	%	$\mu\text{m}^2 \pm \text{SD}$
<b>tip I</b>	5	1240,2 $\pm$ 233	4	1586,1 $\pm$ 427	94	3125 $\pm$ 344
<b>tip IIA</b>	15	1370 $\pm$ 128	32	1841,6 $\pm$ 447	6	1628,3 $\pm$ 298
<b>tip IIX</b>	31	1548 $\pm$ 336	23	2391 $\pm$ 461	-	-
<b>tip IIB</b>	49	3028 $\pm$ 253	41	4913,4 $\pm$ 1123	-	-

B

Mišić	Relativne vrijednosti nNOS-a $\pm$ SD
M. tibialis anterior	3570 $\pm$ 980 (n=5)
M. extensor digitorum longus	2650 $\pm$ 410 (n=5)
M. soleus	251 $\pm$ 29 (n=5)

#### 4.2. EKSPRESIJA nNOS-a TIJEKOM DENERVACIJE BRZIH I SPORIH MIŠIĆA

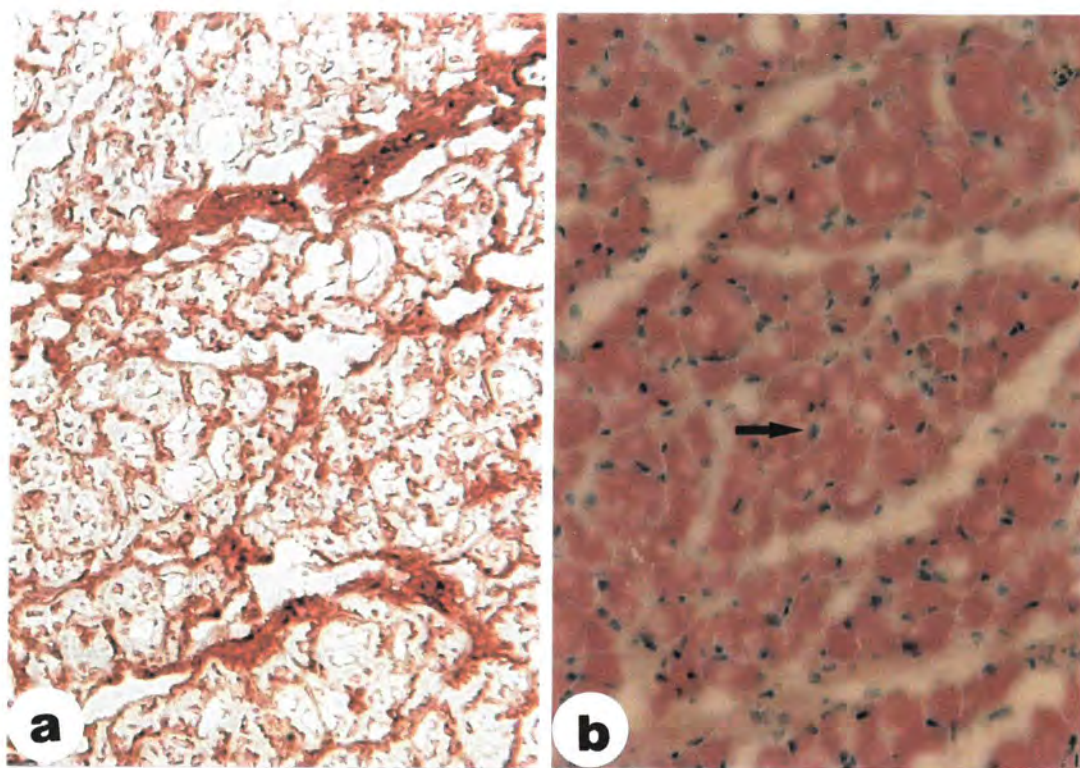
Kao što je već spomenuto postoje značajne intrinzičke različitosti između sporih i brzih mišićnih vlakana. Neke od tih različitosti proizlaze iz inervacije koja za spori i brzi mišić nije ista. Denervacija tj. presijecanje n. ischiadicusa dovodi do promjena u genskoj ekspresiji skeletnog mišića ali te promjene, posebno u ranoj fazi denervacije, nisu jednake u sporom i brzom mišiću. Kako je ekspresija nNOS-a različita u sporim i brzim mišićima željeli smo vidjeti na koji način presijecanje živca, “brzog” i “sporog” dovodi do promjena u ekspresiji nNOS-a.

#### **4.2.1. EKSPRESIJA nNOS-a U MIŠIĆU EXTENSOR DIGITORUM LONGUSU 7 TJEDANA NAKON DENERVACIJE**

Na slici 14A prikazan je m. extensor digitorum longus 7 tjedana nakon učinjene denervacije. Uočava se promijenjena struktura mišića uz oskudan endomizij i perimizij. Mišićna vlakna nisu pravilnih struktura, već su skvrčena, sa mnogobrojnim vakuolama. Vidljiva je jača sarkolemalna obojenost pojedinih mišićnih vlakana protutijelom na nNOS izoformu. Uočavaju se i vlakna sa jačom obojenošću sarkoplazme.

Na slici 14B preparat je obojan metodom hemalaun eozin. Uočavaju se mišićna vlakna različitih veličina. Pojedina vlakna su malena, atrofična, sa centralno položenom jezgrom. Njih okružuju vlakna većeg poprečnog presjeka s malenim jezgrama na periferiji.





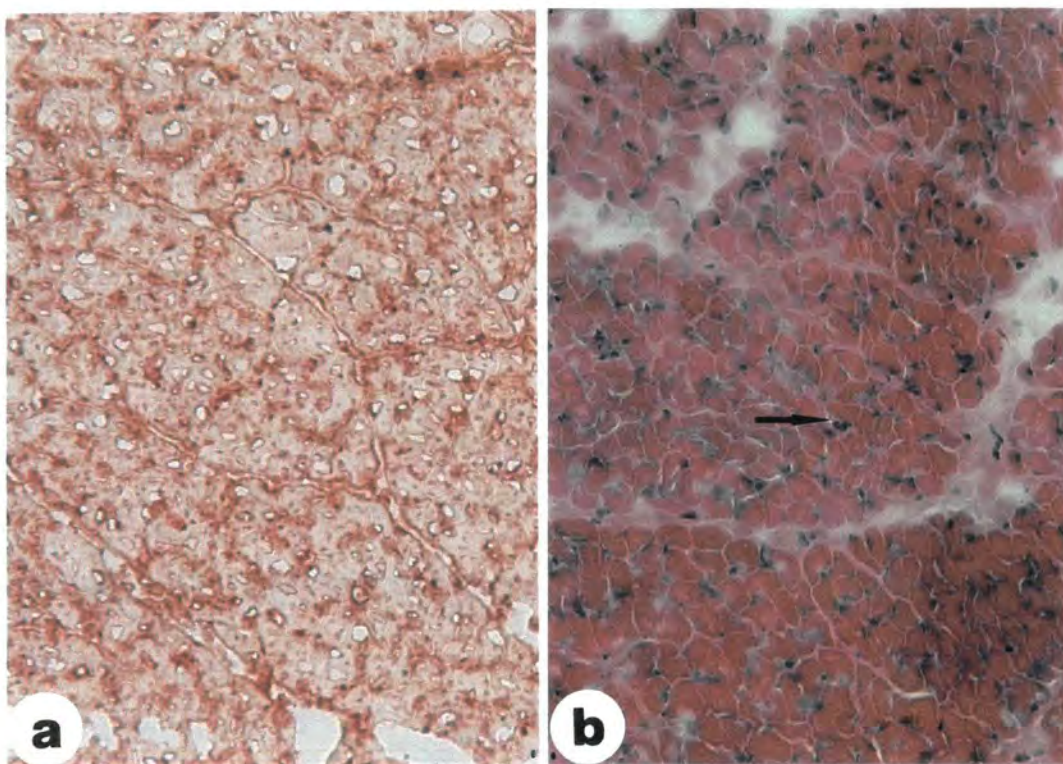
**Slika 14.** *Mišić extensor digitorum longus* štakora 7 tjedana nakon izvršene denervacije. Imunohistokemijska i histološka metoda. Svjetlosni mikroskop, povećanje 200x.

A) Imunohistokemijsko dokazivanje nNOS-a na poprečnom presjeku EDL-a. Uočava se da sva vlakna pokazuju slabiju reakciju na nNOS, iako se na sarkolemi nekih vlakana pokazuje jače obojenje. B) Poprečni presjek mišića obojanog metodom hemalaun-eozin. Strelicom je označeno nezrelo mišićno vlakno sa velikom jezgrom.

#### **4.2.2. EKSPRESIJA nNOS-a U MIŠIĆU TIBIALIS ANTERIORU 7 TJEDANA NAKON DENERVACIJE**

Na histološkom preparatu m. tibialis anteriora 7. tjedana nakon denervacije vidljiva je očuvana struktura mišića sa konturama endomizija i perimizija. Mišićnih vlakana različitog su oblika i veličine. Sarkoplazma pokazuje pozitivnu reakciju na poliklonalno protutijelo nNOS-a. Pojedini dijelovi sarkoleme pokazuju jaču ekspresiju nNOS-a (Slika 15A).

Na preparatu obojenom metodom hemalaun-eozin vidljiva su velika vlakna sa periferno položenom jezgom. Malena vlakna su okružena većima i u sebi imaju centralno položenu jezgru (Slika 15B).



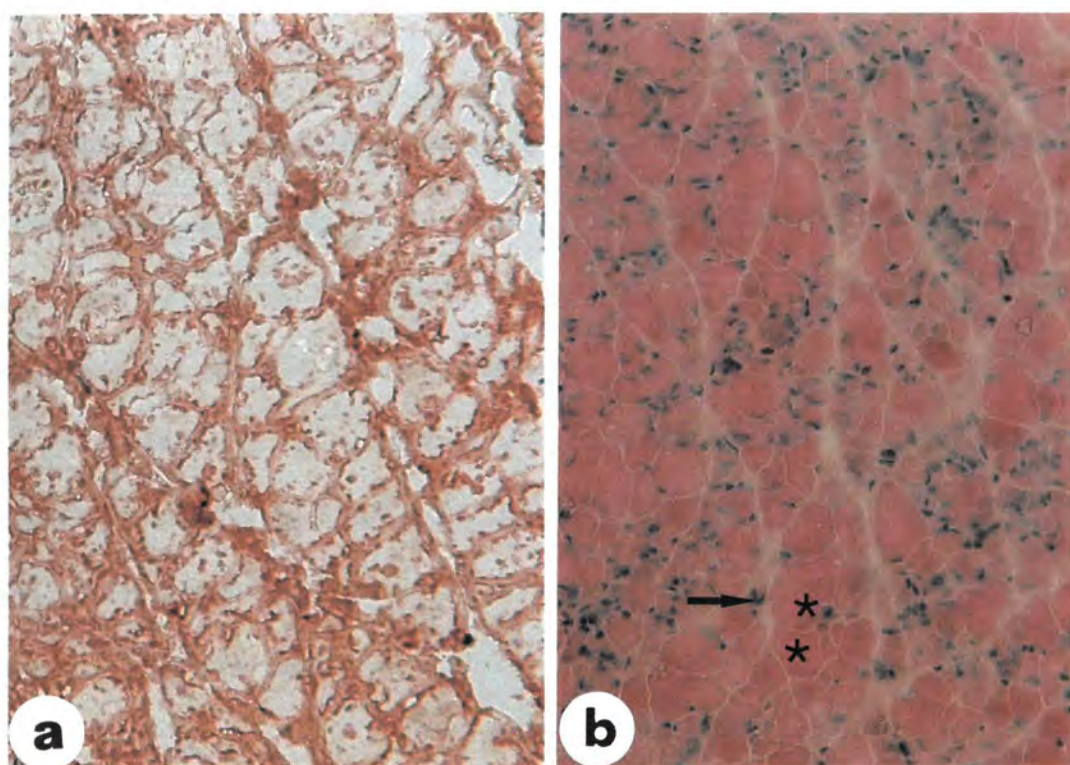
**Slika 15.** *Mišić tibialis anterior štakora 7 tjedana nakon izvršene denervacije. Imunohistokemijska i histološka metoda. Svjetlosni mikroskop, povećanje 200x.*

A) Imunohistokemijsko dokazivanje nNOS-a na poprečnom presjeku m. tibialis anteriora. Vidljiva je ekspresija nNOS-a u većim mišićnim vlaknima. Pojedini dijelovi sarkoleme pokazuju jače obojenje na nNOS izoformu. B) Mišić obojan metodom hemalaun-eozin. Strelicom je označeno nezrelo mišićno vlakno sa velikom jezgrom.

#### **4.2.3. EKSPRESIJA nNOS-a U MIŠIĆU SOLEUSU 7 TJEDANA NAKON DENERVACIJE**

Na slici 16A prikazana je ekspresija nNOS-a u m. soleusu 7 tjedana nakon izvršene denervacije. Vidljiva su mišićna vlakna većih i manjih površina. Manja vlakna pokazuju nNOS prisutan granularno u sarkoplazmi, dok u većim vlaknima imamo ograničena obojenja sarkoleme.

Slika 16B prikazuje isti mišić obojan hemalaun miozin metodom. Uočava se raznolikost u veličini vlakana. U pojedinim vlaknima velikih površina ne uočava se jezgra, dok vlakna malih površina imaju centralno smještene velike jezgre.



**Slika 16.** Ekspresija nNOS-a u mišiću soleusu štakora nakon 7 tjedana od učinjene denervacije. Imunohistokemijska metoda. Svjetlosni mikroskop, povećanje 200x.

A) Imunohistokemijsko dokazivanje nNOS-a na poprečnom presjeku m. soleus-a. Vidljiva je ekspresija nNOS-a u manjim vlaknima raspoređena granularno u sarkoplazmi, a veća vlakna pokazuju ograničena obojenja sarkoleme. B) Mišić obojan metodom hemalaun eozin. Strelicom su označena nezrela mišićna vlakna sa velikom jezgrom. Zvezdicom su prikazana vlakna bez jezgara.

#### 4.2.4. WESTERN BLOT BRZIH I SPORIH SKELETNIH MIŠIĆA 7 TJEDANA NAKON DENERVACIJE

Brzi (EDL) i spori (SOL) mišići su denervirani presijecanjem n. ischiadicusa s ciljem proučavanja promjena u nNOS ekspresiji. Sedam tjedana nakon izvršene denervacije homogenati denerviranih mišića analizirani su Western blot metodom nakon čega je denzitometrijom kvantificirano ispoljavanje nNOS-a.

Iz tablice 3 je uočljivo smanjeno ispoljavanje nNOS-a u EDL-u i soleusu nakon sedam tjedana denervacije. Međutim, dok je u soleusu vrijednost nNOS-a pala za 3 puta, u EDL-u je nakon denervacije relativna vrijednost nNOS proteina za oko 14 puta manja u odnosu na kontrolu.

**Tablica 3.** Dokazivanje neuralne izoforme NOS-a u mišićima EDL i SOL 7 tjedana nakon učinjene denervacije Western blot analizom te denzitometrijskom metodom kvantifikacije (\*  $p < 0,001$ ).

Mišić	Relativne vrijednosti nNOS-a $\pm$ SD	
	Denervirani mišić	Kontrola
EDL	181 $\pm$ 19 (n=8)*	2600 $\pm$ 380 (n=8)
SOL	78 $\pm$ 9 (n=8)*	248 $\pm$ 29 (n=8)

#### 4.2.5. PROUČAVANJE nNOS EKSPRESIJE U RAZLIČITIM VREMENSKIM PERIODIMA DENERVACIJE

Prethodni pokus Western blota i kvantifikacije nNOS-a sedam tjedana od učinjene denervacije pokazao je da u nedostatku živca tj. akcijskih potencijala dolazi do izrazitog smanjenja nNOS proteina u skeletnoj mišićnoj stanici. Željeli smo proučiti ispoljavanje nNOS-a u različitim vremenskim periodima tijekom denervacije tj. napraviti tzv. "time-course" studiju nNOS ekspresije. Stoga su životinje žrtvovane 1., 3., 7. i 15. dana nakon presijecanja živca ischiadicusa. Pripravljene su homogenati denerviranih i kontrolnih mišića nakon čega su podvrgnuti Western blot analizi i kvantifikaciji nNOS proteina pomoću denzitometrijske metode.

Iz tablice 4 je vidljivo da se ispoljavanje nNOS-a mijenja tijekom rane faze denervacije. Naime, 24 sata nakon presijecanja živca ischiadicusa relativne vrijednosti nNOS proteina kako u brzom tako i u sporom mišiću opadaju, ali još uvijek razlika nije statistički značajna. Trećeg dana od denervacije vrijednosti nNOS-a su i u EDL-u i SOL-u smanjene na polovicu kontrolnih vrijednosti, a razlika je statistički značajna. Sedmog dana od denervacije ekspresija nNOS izražena je u vrlo niskim vrijednostima, kako u EDL-u tako i u SOL-u, i statistički je značajna u odnosu na vrijednosti nNOS-a dobivenim u kontrolnim mišićima. Vrijednosti nNOS-a dobivene 7-og i 15-og dana u brzim i sporim mišićima usporediva je s vrijednostima dobivenim sedam tjedana nakon denervacije.

**Tablica 4.** Dokazivanje neuralne izoforme NOS-a u «time course» studiji na denerviranim EDL i SOL mišićima 1, 3, 7 i 15 dana od učinjene denervacije, Western blot analizom te denzitometrijskom metodom kvantifikacije (\*  $p < 0,001$ ).

	<i>Relativne vrijednosti nNOS-a tijekom denervacije ±SD</i>			
	<b>EDL</b>		<b>SOL</b>	
	<i>denervacija</i>	<i>kontrola</i>	<i>denervacija</i>	<i>kontrola</i>
<i>1. dan</i>	2010±360 (n=5)	2376±250 (n=5)	251±31 (n=5)	291±35 (n=5)
<i>3. dan</i>	1133±210* (n=5)	2453±150 (n=5)	127±20* (n=5)	301±40 (n=5)
<i>7. dan</i>	380±26* (n=5)	2776±350 (n=5)	91±24* (n=5)	259±37 (n=5)
<i>15. dan</i>	320±23* (n=5)	2399±200 (n=5)	87±18* (n=5)	265±66 (n=5)



### 4.3. EKSPRESIJA nNOS-a NAKON ELEKTRIČNE STIMULACIJE

Radi utvrđivanja važnosti živčane aktivnosti u regulaciji nNOS ekspresije brzi (EDL) i spori (SOL) mišići, prethodno denervirani, podvrgnuti su električnoj stimulaciji. Brzi mišić je stimuliran pomoću obrasca (20 Hz) za koji je poznato iz literature da će dovesti do promjene u genskoj ekspresiji mišića i konačno promijeniti njegov fenotip u spori. Spori mišić je, naprotiv, stimuliran obrascem (100 Hz) koji imitira brzi živac i koji mijenja fenotip sporog mišića u brzi. Električna stimulacija je trajala do desetog dana denervacije nakon čega su životinje žrtvovane. Mišići su homogenizirani te je učinjena Western blot analiza i kvantifikacija nNOS-a pomoću denzitometrije.

#### 4.3.1. EKSPRESIJA nNOS-a U EDL-u

U prethodnim pokusima pomoću imunohistokemijske metode i Western blot analize pokazali smo da je nNOS jače ispoljen u brzim mišićima kao što je EDL i TA. Mišić extensor digitorum longus, prethodno denerviran, stimuliran je obrascem koji imitira spori živac (20 Hz). Deset dana nakon izvršene denervacije mišići su analizirani Western blot metodom.

Rezultati pokazuju da se vrijednosti nNOS-a statistički značajno smanjuju ukoliko brzi mišić stimuliramo s 20 Hz tj. vrijednosti postaju slične vrijednostima normalnog sporog mišića. Stimulacija EDL-a pomoću brzog obrasca od 100 Hz, koji zapravo imitira njegov vlastiti živac, ne mijenja značajno nNOS ekspresiju (Tablica 5).

**Tablica 5.** Dokazivanje neuralne izoforme NOS-a u EDL-u nakon električne stimulacije Western blot analizom te denzitometrijskom metodom kvantifikacije (\*  $p < 0,001$ ).

Mišić	Relativne vrijednosti nNOS-a u denervaciji $\pm$ SD		
	100 Hz	20 Hz	kontrola
EDL	2343 $\pm$ 44 (n=8)	212 $\pm$ 37 (n=8)*	2443 $\pm$ 444 (n=8)

#### 4.3.2. EKSPRESIJA nNOS-a U SOL-u

Mišić soleus spori je skeletni mišić koji ispoljava vrlo male količine nNOS-a. Stoga smo ga nakon izvršene denervacije električki stimulirali pomoću obrasca koji imitira brzi živac (100 Hz). Deset dana nakon izvršene denervacije mišići su analizirani Western blot metodom.

Iz tablice 6 vidljivo je da električna stimulacija m. soleusa pomoću obrasca koji imitira brzi živac dovodi do povećanja nNOS ekspresije. Razlika je statistički značajna u odnosu na kontrolnu skupinu i približava se vrijednostima koje nalazimo u normalnim brzim skeletnim mišićima.

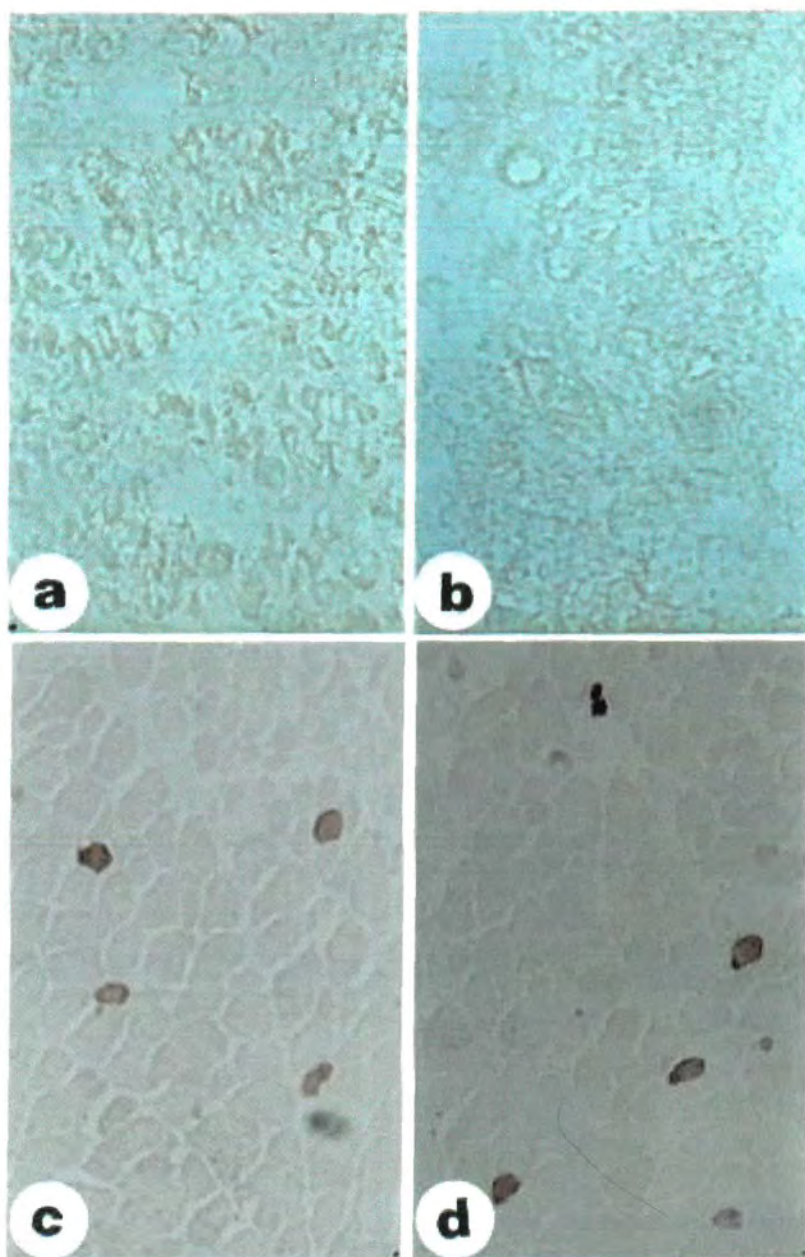
**Tablica 6.** Dokazivanje neuralne izoforme NOS-a u soleusu nakon električne stimulacije Western blot analizom te denzitometrijskom metodom kvantifikacije (\*  $p < 0,001$ ).

Mišić	Relativne vrijednosti nNOS-a u denervaciji $\pm$ SD		
	100 Hz	20 Hz	kontrola
SOL	1855 $\pm$ 309 (n=8)*	185 $\pm$ 15 (n=8)	266 $\pm$ 19 (n=8)

#### 4.4. EKSPRESIJA nNOS-a U MIŠIĆIMA EKSTENSOR DIGITORUM LONGUSU I SOLEUSU TIJEKOM PROCESA REGENERACIJE

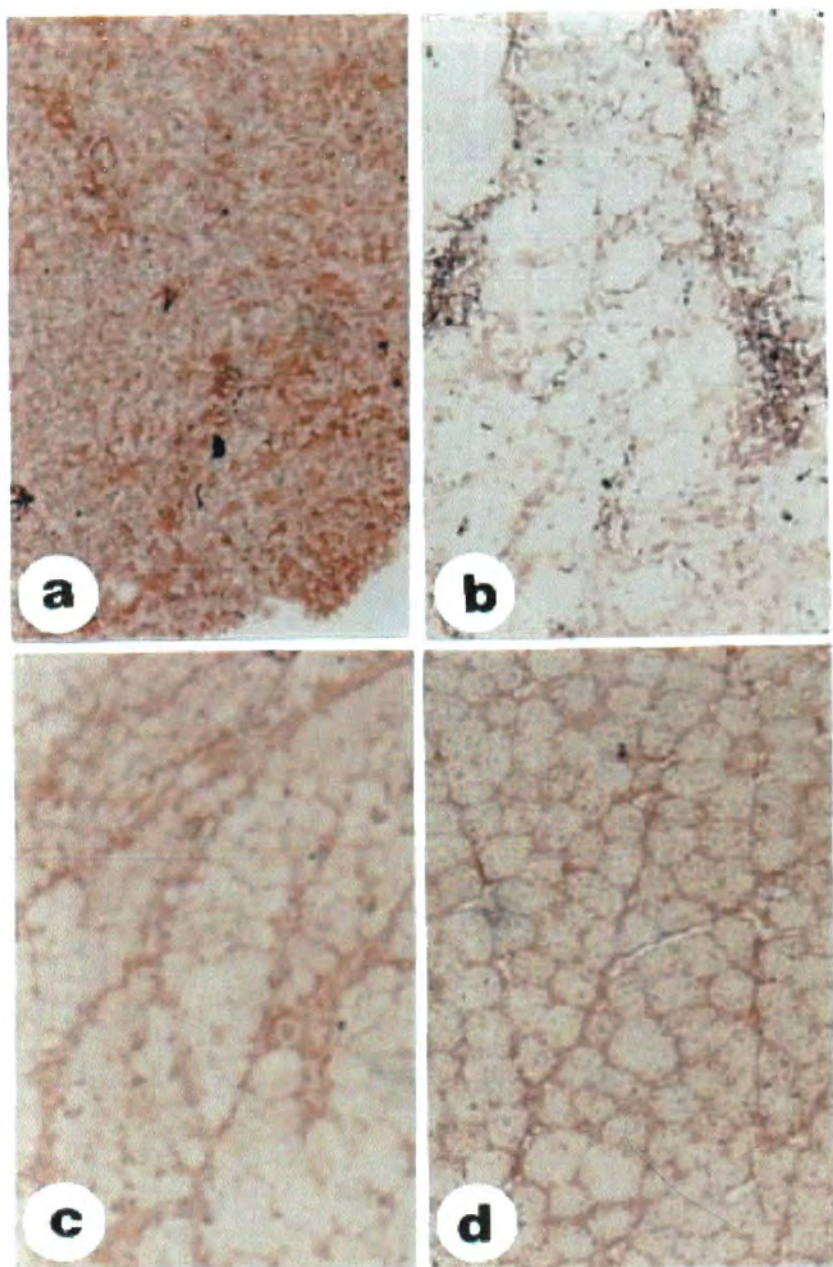
Regeneracijski proces u mišićnom tkivu EDL-a i SOL-a izazvan je injiciranjem lokalnog anestetika bupivakaina. Prvog i trećeg dana struktura oba mišića je narušena, odnosno ne uočavaju se mišićna vlakna. Sedmog dana pojedina vlakna su pozitivna na sporu izoformu teškog lanca miozina. U EDL-u sporih vlakana ima manje, dok ih u soleusu ima jako puno. Morfološke osobitosti su slične onima u zdravom mišiću. Naime, vide se mišićna vlakna i vezivno tkivo među njima. Desetog dana i EDL i SOL pokazuju fenotip koji odgovara odraslom mišiću (Slika 17,19)

Pored toga prikazali smo i ekspresiju nNOS-a. Prvog dana mišići iako su narušene strukture pokazuju izraziti pozitivitet na poliklonalno protutijelo specifično za nNOS. Trećeg dana dolazi do izrazitog smanjenja reakcijena nNOS. Desetog dana u mišićnim vlaknima se uočava granularno raspoređen nNOS u sarkoplazmi (Slika 18,20).



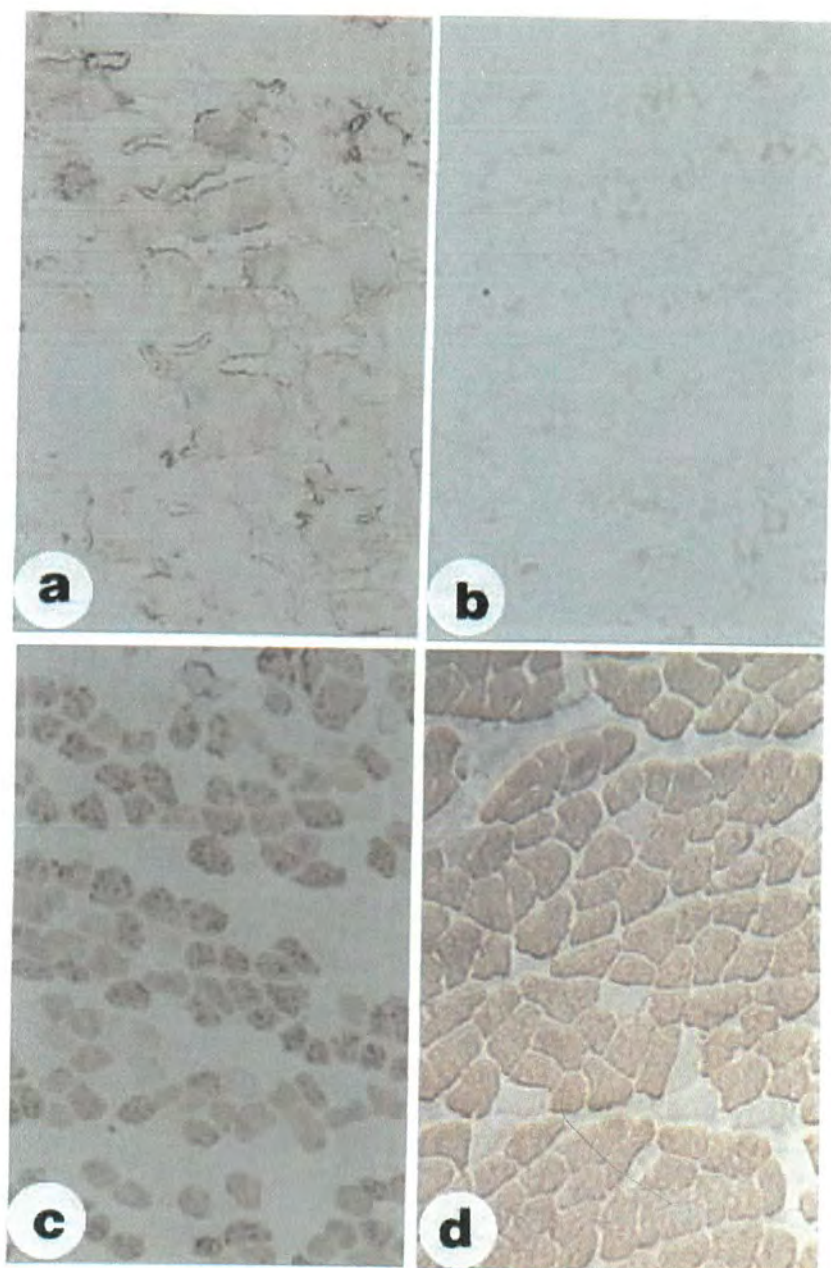
**Slika 17.** *Ekspresija sporih izoformi teških lanaca miozina tijekom regeneracije u mišiću extensor digitorum longusu štakora. Imunohistokemijska metoda. Svjetlosni mikroskop, povećanje 100x.*

Poprečni presjeci mišićnog tkiva tijekom regeneracije EDL-a prvog (A), trećeg (B), sedmog (C) i desetog dana (D) nakon tretmana lokalnim anestetikom obojenim protutijelima specifičnim na sporu izoformu teških lanaca miozina.



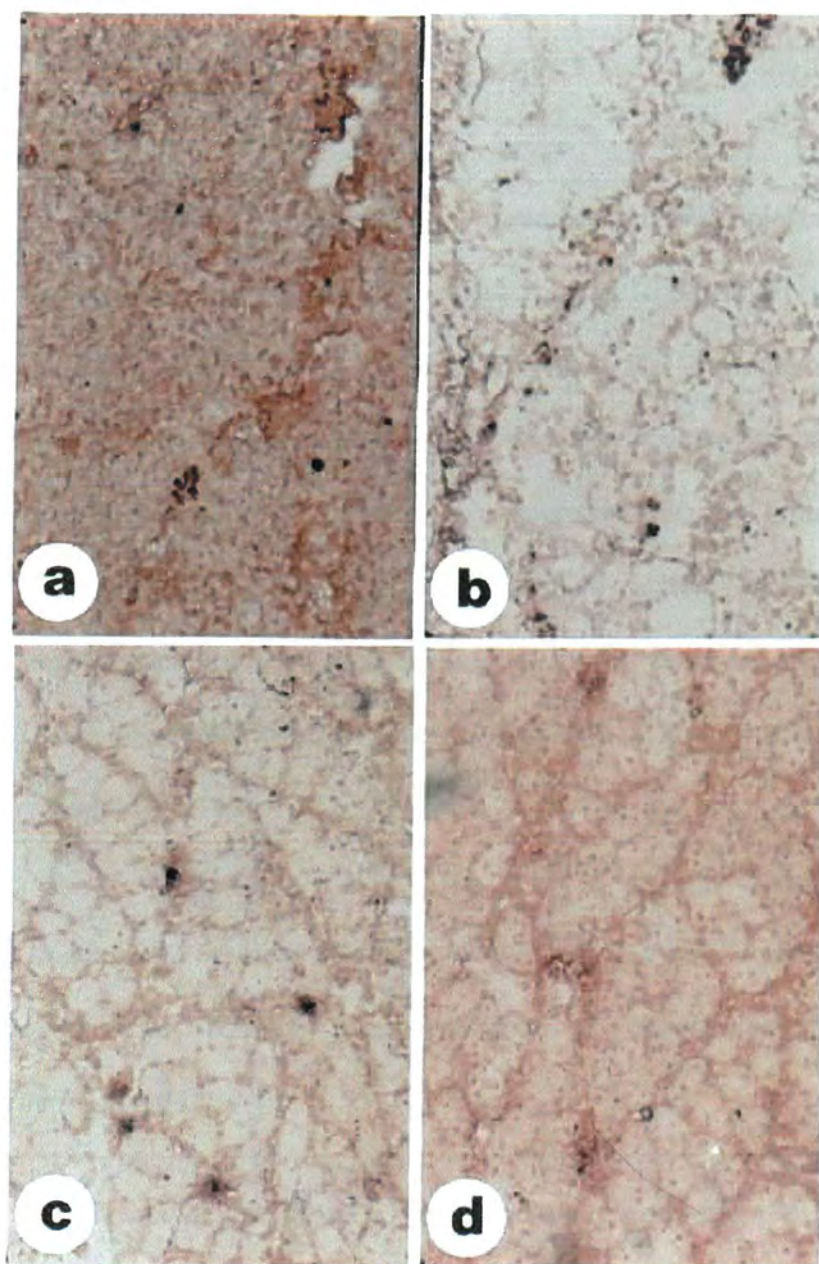
**Slika 18.** Ekspresija nNOS-a tijekom regeneracije u mišiću *extensor digitorum longusu* štakora. Imunohistokemijska metoda. Svjetlosni mikroskop, povećanje 100x.

Poprečni presjeci mišićnog tkiva tijekom regeneracije EDL-a prvog (A), trećeg (B), sedmog (C) i desetog dana (D) nakon tretmana lokalnim anestetikom obojenim protutijelima specifičnim na nNOS izoformu.



**Slika 19.** *Ekspresija spore izoforme teških lanaca miozina tijekom regeneracije u mišiću soleusu štakora. Imunohistokemijska metoda. Svjetlosni mikroskop, povećanje 100x.*

Poprečni presjeci mišićnog tkiva tijekom regeneracije soleusa prvog (A), trećeg (B), sedmog (C) i desetog dana (D) nakon tretmana lokalnim anestetikom obojenim protutijelima specifičnim na sporu izoformu teških lanaca miozina.



**Slika 20.** Ekspresija nNOS-a tijekom regeneracije u mišiću soleusu štakora.

*Imunohistokemijska metoda. Svjetlosni mikroskop, povećanje 100x.*

Poprečni presjeci mišićnog tkiva tijekom regeneracije soleusa prvog (A), trećeg (B), sedmog (C) i desetog dana (D) nakon tretmana lokalnim anestetikom obojenim protutijelima specifičnim na nNOS izoformu.



#### 4.5. WESTERN BLOT EDL-a I SOLEUSA 1., 3., 7. I 10. DANA OD IZAZIVANJA PROCESA REGENERACIJE

Regeneracija mišića postignuta je intramuskularnom injekcijom lokalnog anestetika bupivakaina. Mišići su uzeti na analizu 1, 3, 7 i 10 dana nakon što je pobuđen proces regeneracije u mišiću. Iz tablice 7 je vidljivo da dolazi do prolaznog smanjenja u ekspresiji nNOS-a i to između trećeg i sedmog dana. Neposredno nakon izazivanja procesa mišićne regeneracije ni u brzom ni u sporom mišiću ne dolazi do značajne promjene u ispoljavanju nNOS-a. Zapravo vidljivo je tek neznatno povećanje vrijednosti nNOS ekspresije koje, međutim, nije statistički značajno. Deset dana nakon injekcije lokalnog anestetika vrijednosti nNOS-a vraćaju se na normalnu razinu kako u brzom tako i u sporom mišiću.

**Tablica 7.** Dokazivanje neuralne izoforme NOS-a u EDL-u i soleusu nakon izazivanja procesa regeneracije Western blot analizom te denzitometrijskom metodom kvantifikacije (\*  $p < 0,001$ ).

	<i>Relativne vrijednosti nNOS-a tijekom denervacije <math>\pm</math>SD</i>			
	EDL		SOL	
	<i>regeneracija</i>	<i>kontrola</i>	<i>regeneracija</i>	<i>kontrola</i>
<i>1. dan</i>	2760 $\pm$ 450 (n=8)	2566 $\pm$ 350 (n=8)	316 $\pm$ 45 (n=8)	282 $\pm$ 39 (n=8)
<i>3. dan</i>	670 $\pm$ 150* (n=8)	2356 $\pm$ 180 (n=8)	88 $\pm$ 22* (n=8)	261 $\pm$ 37 (n=8)
<i>7. dan</i>	580 $\pm$ 126* (n=8)	2356 $\pm$ 400 (n=8)	94 $\pm$ 24* (n=8)	239 $\pm$ 32 (n=8)
<i>10. dan</i>	1990 $\pm$ 400 (n=8)	2322 $\pm$ 207 (n=8)	230 $\pm$ 38 (n=8)	255 $\pm$ 42 (n=8)

## 5. RASPRAVA

Skeletni mišić sisavaca je izuzetno heterogeno tkivo građeno od različitih tipova vlakana. S obzirom na ekspresiju teških lanaca miozina, vlakna su podijeljena u četiri osnovna tipa: tip I, tip IIA, IIX i IIB.

Sporokontrahirajući mišići kao što je m. soleus (SOL) dominantno ekspimiraju sporu izoformu miozina ili tip I MHC dok m. tibialis anterior (TA) i m. extensor digitorum longus (EDL) kao predstavnici brzokontrahirajućih mišića dominantno ekspimiraju brze izoforme miozina tj. tip IIB MHC, IIX MHC i IIA MHC.

Sintetaza dušikova monoksida (NO-sinetaza, NOS) je enzim odgovoran za sintezu dušikova monoksida (NO). Postoje tri izoforme NOS-a: nNOS, eNOS i iNOS. Ispoljavanje nNOS izoforme dokazano je osim u mozgu i u skeletnom mišićnom tkivu, a budući skeletna muskulatura predstavlja oko 40% ukupne tjelesne težine smatra se da je skeletni mišić tkivo s najvišim sadržajem nNOS izoforme.

Imunohistokemijska istraživanja su pokazala da se nNOS konstitutivno ispoljava na sarkolemi skeletnih mišićnih vlakana u mladim i odraslim sisavaca (78,110,111,114,115,119,128) dok u starijoj dobi prelazi sa stanične membrane u citosol tj. u sarkoplazmu (115). Također je dokazano da se nNOS najjače ispoljava u području neuromišićne spojnice (110,127,139).

nNOS je u skeletnom mišiću prisutan u tzv.  $\mu$ NOS izoformi. Naime, nNOS je kloniran iz cDNA knjižnice mozga pomoću specifičnih peptidnih sekvencija dobivenih iz pročišćenih proteina mozga (84) nakon čega je dokazano alternativno izrezivanje (engl. *alternative splicing*) nNOS mRNA. Izrezivanje se događa između 839-840 aminokiseline nNOS proteina. Važno je naglasiti da između tri izoforme NOS-a postoji velika homologija, čak više od 50%. Značajne razlike uočene su u području između

832-875 nNOS-a. Interesantno je primjetiti da se izrezivanje događa upravo u ovom području koje je značajno drugačije od drugih NOS izoformi (78). Posljedica alternativnog izrezivanja je nešto "teži" nNOS mozga što mu daje 102 parova baza (34 aminokiseline) alternativno izrezanog segmenta između egzona 16 i 17.  $\mu$ NOS pokazuje katalitičku aktivnost vrlo sličnu nNOS-u koji nalazimo u mozgu. Ekspresija  $\mu$ NOS izoforme ograničena je samo na skeletni mišić i srčanu muskulaturu.

Prva istraživanja vezana za ispoljavanje nNOS-a u skeletnom mišiću su pokazala da je ispoljavanje nNOS-a specifično za određeni tip mišićnih vlakana. Pojedini autori navode da je nNOS imunoreaktivnost prisutna samo na mišićnim vlaknima tipa II, dakle brzim mišićnim stanicama (98,111,112,113,119,128) dok je drugi prikazuju na svim tipovima vlakana (114). Osim što su rezultati kontradiktorni, ni jedna skupina autora nije utvrdila da li postoje različitosti u ispoljavanju nNOS-a unutar skupine brzih tipova vlakana.

U našem istraživanju, imunohistokemijskom metodom, potvrdili smo prisustvo nNOSa na sarkolemi i u subsarkolemalnom dijelu skeletnih mišićnih vlakana. Međutim, za razliku od drugih autora pokazali smo da se nNOS ne ispoljava jednako u svim tipovima brzih mišićnih vlakana. Naime, u TA i EDL-u prisutna je podjednaka ekspresija nNOS-a u vlaknima tipa IIA i IIX, vlakna tipa I pokazuju slabiju ekspresiju, dok se vlakna tipa IIB ne boje protutijelima specifičnim za nNOS. Što se tiče m.soleusa, pomoću imunohistokemijske analize pokazali smo da ne posjeduje vlakna tipa IIB, dok je ispoljavanje u vlaknima tipa I i IIA istovjetno rezultatima na brzim mišićima.

Potvrdu imunohistokemijske analize dobili smo Western blot metodom. Naime, dokazivanjem nNOS proteina uočili smo da je najzastupljeniji u TA, manje u EDL-u, dok je u SOL-u prisutan u značajno manjoj količini. TA i EDL, predstavnici skupine brzih mišića pokazuju razliku u ekspresiji nNOS-a. Razlog tome leži u činjenici da se

razlikuju u postotku i površinama mišićnih vlakana tipa IIB. Naime, u EDL-u ima 41% vlakana tipa IIB veoma velike površine ( $4913,4\mu\text{m}^2$ ), dok u TA-u ima nešto veći postotak vlakana tipa IIB (49%), ali sa puno manjom površinom,  $3028\mu\text{m}^2$  (161). Isto tako TA ima 31% vlakana tipa IIX koja pokazuju pozitivnu reakciju na protutijelo nNOS-a, dok ih u EDL-u ima manje, 23%. U prilog ovome ide istraživanje Hussain i sur. (162) kojim pokazuju da nNOS aktivnost u štakora korelira sa proporcijom vlakana tipa IIX, a negativno sa vlaknima tipa I.

Kapur i suradnici (163) su imunohistokemijskom metodom na primjeru EDL-a pokazali da je ekspresija nNOS-a jače izražena vlaknima tipa IIB nego u vlaknima tipa I i IIA. Ovi podaci se značajno razlikuju od naših rezultata iz dva razloga. Prvo, metoda koju su koristili za dokazivanje nNOS pozitivnih mišićnih vlakana - NADPH diaforaza - nespecifična je metoda koja može prikazati aktivnost i nekih drugih enzima. Drugo, metodom pomoću NADPH diaforaze nije moguće razlikovati tri izoforme NOS-a.

Drugim riječima, obzirom da se u fiziološkim uvjetima, dakle, u normalnom mišiću štakora i čovjeka ne ispoljava iNOS izoforma možemo zaključiti da metoda koja je korištena u spomenutom radu ne može razlikovati enzimsku aktivnost između eNOS i nNOS izoforme pa prema tome ni rezultati ovom metodom postignuti ne mogu biti vjerodostojni.

Iako značaj bilo koje izoforme NOS-a u reguliranju skeletne mišićne funkcije još uvijek nije u potpunosti jasan, novije studije ukazuju na važnu ulogu NO-a u kontroli snage mišićne kontrakcije. Za ovu regulaciju se smatra da je posredovana cGMP-ovisnim i cGMP-neovisnim procesima koji uključuju otpuštanje  $\text{Ca}^{2+}$  iz rianodinskih receptora i inhibiciju kontraktilnih proteina (164).

Pored toga, NO sudjeluje u regulaciji respiratornog ciklusa mitohondrija u skeletnom mišiću inhibirajući citokrom-oksidadazu, proces koji vjerojatno smanjuje

stanični ATP i povećava ADP, AMP, GDP i Pi. Nadalje, NO također utječe na ulazak glukoze u skeletni mišić (118) i aktivnost kreatin kinaze (165).

Mehanizmi koji reguliraju ispoljavanje nNOS-a u skeletnom mišiću nisu u potpunosti jasni. Poznato je, međutim, da se ispoljavanje i aktivnost nNOS-a mijenja pod utjecajem različitih razvojnih i humoralnih faktora (116,117).

Dokazano je da povećanje u ispoljavanju nNOS-a dolazi tijekom pojačanog mehaničkog opterećenja (166), pojačane mišićne aktivnosti (118) i tijekom starenja štakora (115).

Tews i suradnici su proučavali ulogu inervacije u regulaciji nNOS ekspresije (129). Pokazali su da nakon presijecanja živca tj. denervacije dolazi do značajnog smanjenja u nNOS ispoljavanju na sarkolemi mišićnih vlakana. Uočili su da 2 tjedna nakon učinjene denervacije mimičnih mišića štakora do 60% mišićnih vlakana na svojoj sarkolemi nema ispoljen nNOS, a nakon 7 tjedana smanjenje nNOS ekspresije još je izraženije.

Ovaj rad je interesantan jer dovodi u direktnu vezu živac i nNOS ispoljavanje, ali je i nepotpun iz dva razloga. Prvo, ispoljavanje nNOS-a nije kvantificirano već je analiza izvršena imunohistokemijskom metodom. Drugo, nije poznato što se događa u početnoj fazi denervacije budući su mišiće analizirali tek dva tjedna nakon presjecanja živca. Isto tako, studija je rađena samo na mimičnoj muskulaturi i nije poznato da li na jednak način reagiraju i drugi skeltni mišići te da li postoji razlika između brzih i sporih mišića.

Denervacija skeletnog mišića zbog odsutstva motorne i regulatorne kontrole živca uzrokuje mnogobrojne funkcionalne i morfološke promjene. Promjena dugotrajno denerviranih skeletnih mišića su atrofija mišićnih vlakana, smanjeni broj jezgara i satelitskih stanica te promijena fenotipa mišića (28).

Tijekom prva dva tjedana denervacije, satelitske stanice uspijevaju održati normalan broj mišićnih vlakana, štoviše, uslijed kompenzatornih mehanizama broj mišićnih vlakana može se i povećati. Međutim, kasnije, uslijed učestalih ciklusa degeneracije i regeneracije te odsutstva neurotrofičnih faktora koji su važni u njihovoj homeostazi, dolazi do smanjenja njihovog broja (167). Opskrba mišića krvlju sve je slabija uslijed nestanka krvnih žila (168), a posljedica toga je opsežna fibroza mišića (169).

Borisov i suradnici (170) su pretpostavili da se proces miogeneze u denerviranom mišiću aktivira kada mišićna vlakna dosegnu kritičan stupanj atrofije. Jedan od odlučujućih faktora za opsežnost atrofije u denervaciji je tip mišićnih vlakana. Naime, tijekom prva dva mjeseca denervacije spora mišićna vlakna značajno sporije atrofiraju od brzih vlakna.

Razlike u otpornosti na atrofiju između sporih i brzih vlakana mogli bismo potražiti u činjenici da postoje značajne razlike u enzimatskoj aktivnosti unutarstaničnih signalnih puteva te ovisnosti terminalne diferencijacije brzih vlakana o živčanoj kontroli (171). Naime, diferencijacija sporih vlakana tijekom razvoja mišića, za razliku od brzih vlakana, može se događati i u odsustvu živca (172). Međutim, važno je naglasiti da četiri mjeseca nakon izazvane denervacije razlika u atrofiji između sporih i brzih mišićnih vlakana nestaje iz čega proizlazi da je atrofija sporih mišićnih vlakana u periodu od dva do četiri mjeseca ubrzana. Mehanizmi koji kontroliraju pojačanu atrofiju sporih vlakana u spomenutom periodu još uvijek se istražuju (170).

Proces postdenervacijske atrofije karakteriziran je značajnim strukturalnim remodeliranjem mišićnih vlakana i progresivnim gubitkom mišićno-specifičnih struktura. Naime, jedna od prvih promjena u denerviranom mišiću je razmještaj miofibrila što je vidljivo u izgledu Z-pruga koje su tipične za odrasli mišić. Ta promjena

je prisutna i sporim i u brzim mišićnim vlaknima iako je slabije izražena u sporim mišićnim vlaknima.

Poremećaj u pravilnom smještaju miofibrila je posljedica gubitka filamenata aktina i miozina što dovodi do resorpcije sarkomera, stvaranja prostora u mišićnom vlaknu bez miofibrila, kao i progresivnog gubitka mitohondrija (168,173). Gubitak mišićno-specifičnih struktura ne mora nužno biti vezan uz stupanj atrofije. Naime, u atrofičnom mišiću moguće je vidjeti velika mišićna vlakna sa dezorganiziranim kontraktilnim aparatom i vrlo malena vlakna sa stabilnom ultrastrukturom (170).

Denervacija podrazumijeva prekid u prijenosu živčanih impulsa i odsustvo akcijskog potencijala kao i eliminaciju trofičkih faktora koji se otpuštaju na neuromuskularnoj vezi (28). Međutim, presijecanje živca ne znači i odsustvo mehaničkog opterećenja na taj mišić. Npr. denervirani mišić može se napinjati djelovanjem sile gravitacije ili pod utjecajem inerviranih antagonista. Isto tako i fibrilacija mišića može kroz kratko vrijeme ukloniti primarni efekt denervacije. To je dokazano u EDL-u štakora gdje je došlo do kratkotrajnog porasta sinteze proteina 7-10 dana nakon denervacije (174).

Denervacijom mišića dolazi također i do promjena u kontraktilnim svojstvima i brzih i sporih mišića. U štakora i zeca brzi EDL postaje sporiji, a spori soleus postaje brži (175). Može se reći da dolazi do smanjenja ekspresije postojećih miofibrilarnih proteina, sa posljedičnim povećanjem ekspresije drugih izoformi (28).

Iz našeg istraživanja vidljivo je da sedam tjedana nakon denervacije vlakna pokazuju nejednaku veličinu i oblik. U atrofičnom mišiću prisutna su vlakna normalne veličine tj. ne-atrofična vlakna kao i vlakna vrlo malog promjera u kojima se opaža centralno smještena jezgra što je karakteristika nezrelih mišićnih vlakana.

Brojna istraživanja potvrđuju da se u EDL-u i soleusu javljaju mišićna vlakna u stadiju miotube već nekoliko tjedana nakon denervacije i perzistiraju kroz nekoliko mjeseci u postdenervacijskom periodu (173,176). Schmalbruch i sur. (177) su pretpostavili da je formiranje miotuba u denerviranim skeletnim mišićima znak kompenzatorne miogeneze koja slijedi nakon gubitka mišićnih vlakana (178,179). Iz ovoga možemo zaključiti da su dugotrajno denervirani mišići morfološki promijenjeni te posjeduju veliki broj nezrelih novoformiranih mišićnih vlakana.

Kao što je spomenuto tijekom denervacije mišića dolazi do smanjenja nNOS-a u svim tipovima vlakana. Imunohistokemijskom metodom dokazivanja nNOS-a nakon 7 tjedana denervacije dobili smo mišićna vlakna koja su slabije pozitivna, odnosno sarkolema pokazuje neujednačenu obojenost.

Naši rezultati ukazuju na značajno smanjenje ispoljavanja nNOS-a u denerviranim kako sporim tako i u brzim mišićima. Sedam tjedana nakon što je izvršena denervacija nije moguće detektirati nNOS protein. Novost u odnosu na već publicirane rezultate je proučavanje ekspresije nNOS-a u početnim fazama denervacije. Naime, nestanak nNOS-a sa sarkoleme mišićnog vlakna događa se postepeno. Nakon svega 24 sata od presijecanja živca ispoljavanje nNOS-a nije značajno promijenjeno. Tri dana od denervacije započinje pad u ekspresiji nNOS-a a sedmog dana je količina nNOS proteina vrlo mala, jednako kao i u denerviranom mišiću 7 tjedana nakon denervacije.

Kao što je već spomenuto nNOS je prisutan na sarkolemi mišićne stanice i udružen je s drugim proteinima membrane koji sačinjavaju njen citoskelet. Interesantno je primjetiti da se nNOS, koji je u vezi sa distrofinom, u distrofinopatijama, bolestima kojima nedostaje distrofin, premješta sa sarkoleme u sarkoplazmu tj. citoplazmu mišićne stanice.



Ekspresija nNOSa je u *mdx* miševa (animalnom modelu Duchenn-ove mišićne distrofije) smanjena, a u pacijenata s Duchenn-ovom mišićnom distrofijom je odsutna. Međutim, u trajno denerviranim mišićima, u kojima je ekspresija distrofina nepromijenjena, ispoljavanje nNOS-a je u potpunosti inhibirano. To ukazuje na vrlo važnu činjenicu koja govori da odsutstvo nNOS-a sa sarkoleme u denerviranim mišićnim vlaknima ne nastaje zbog promjena u glikoproteinskom kompleksu distrofina, već je regulirano drugim mehanizmima (112,146).

Dušikov monoksid u malim količinama ima protektivnu ulogu za mišićna vlakna jer inaktivira anione superoksida (152). Smanjenjem sinteze NO-a dolazi do nakupljanja slobodnih radikala koji dovode do oksidativnog stresa stanice.

Oksidativni stres je ujedno i patofiziološki proces koji igra važnu ulogu u neuromišićnim poremećajima (65). Posljedica je apoptoza mišićnog vlakna (153). To je potvrdio i Tews i sur (129) na denerviranom mišiću lica štakora.

Naime, apoptoza je strogo definirana i značajno se razlikuje od nekroze (180). Apoptoza je programirano samouništenje stanice, a njezine osobitosti su segregacija kromatina, zgušnjavanje (kondenzacija) stanice i stvaranje apoptotičnih tijela koja sadrže intaktne stanične organele dok upalne promjene nisu prisutne (181). Za razliku od apoptoze, u koju mišićno vlakno ulazi kada je niska koncentracija NO-a, smrt stanice nekrozom nastupa kada su koncentracije NO-a vrlo visoke (150,154).

Mišićna vlakna odraslog organizma, koja posjeduju nNOS na sarkolemi, stvaraju NO koji aktivira satelitske stanice. Time dolazi do stvaranja nezrelih mišićnih vlakana tzv. miotuba. Na njihovim membranama nema nNOS-a. S vremenom, sve zrele mišićne stanice propadnu, a nezrele, bez utjecaja živca, ne eksprimiraju nNOS. Dolazi do začaranog kruga gdje nakon degeneracije slijedi regeneracija, ali nepotpuna, jer ne

dolazi ni do uspostavljanja normalne strukture mišića, kao ni do normalne aktivnosti nNOS-a (182).

Ukoliko je mišiću omogućena reinervacija, početno smanjenje ekspresije nNOS-a je stimulus za regeneraciju aksona i njegovo privlačenje do novih motornih ploča. Kada se uspostavi neuromišićna veza, dolazi do povećanja ekspresije nNOS-a što je i potvrda uspješnosti reinervacije (129). Povećanje ekspresije je važno zbog toga jer nastali NO onemogućava polineuralnu inervaciju mišićnih vlakana, odnosno prekida stvaranje sinapsi izvan neuromišićne spojnice (183).

Reiser i suradnici su pokazali da kronična električna stimulacija skeletnih mišića štakora uzrokuje značajni porast u nNOS ekspresiji što ukazuje na važnost inervacije tj. živca u kontroli nNOS ispoljavanja (113). Međutim njihova studija ostavlja i neka otvorena pitanja. Naime, da li električna stimulacija mišića pomoću "brzog obrasca" (60 impulsa, 100 Hz, tijekom 60 sekundi) koji imitira brzi živac ima na ispoljavanje nNOS-a isti efekt kao i stimulacija pomoću "sporog obrasca" (200 impulsa, 20 Hz, tijekom 30 sekundi) koji imitira spori živac.

Poznato je da spori mišić može promijeniti svoj fenotip u brzi (tj. započne ispoljavati brze izoforme kontraktilnih proteina na osnovu kojih i vršimo tipizaciju mišićnih vlakana) ukoliko ga električki stimuliramo brzim obrascem stimulacije koji imitira brzi živac (28).

Iz ove činjenice proizlazi vrlo logično pitanje na koje do sada objavljena literatura ne daje odgovor: ako je točno da nNOS ispoljavaju samo brza mišićna vlakana, hoćemo li stimulacijom sporih mišićnih vlakana, obrascem koji imitira brzi živac, izazvati pojačano ispoljavanje nNOS-a?

Mišićna vlakna se mogu prilagoditi promjenama u inervaciji transformirajući se iz jednog tipa vlakna u drugi. Do transformacije vlakana može doći uslijed cross-

inervacije (35,184), za vrijeme električne stimulacije perifernih živaca ili mišića (5,185) i u manjem stupnju za vrijeme vježbanja (186) i tijekom postnatalnog razvoja (187).

Još uvijek je nejasno kada je transformacija potpuna, odnosno kada brza vlakna tipa IIB u odraslom EDL-u mogu poprimiti sva svojstva sporih vlakana tipa I u odraslom soleusu i obratno. Poznato je da su brza i spora mišićna vlakna veoma različita. Postoje podaci da transformacija može biti kompletna samo za neka svojstva, ali ne i za sva. Tako npr. soleus može postati brz kao i EDL po pitanju izometričke kontrakcije, ali ne i izotoničke.

Spora mišićna vlakna tipa I u normalnom EDL-u i soleusu imaju različita vremena izometričke kontrakcije. U EDL-u su ona između sporih u soleusu i brzih u EDL-u (188). Isto tako u EDL-u koji je cross-inerviran sa živcem soleusa sva vlakna koja ekspimiraju sporu izoformu teških lanaca miozina pokazuju izometričku kontrakciju koja je po svojim svojstvima između brzih i sporih vlakana (189). Tako cross-inervacija sa soleusom može inducirati kompletnu transformaciju od brzih ka sporim vlaknima, ali ona neće nikada biti kao u soleusu.

Postavlja se pitanje koliko treba vremena da dođe do kompletne transformacije i po pitanju mišićne kontrakcije. Istraživanja su proveli Close i sur. (184) reinervacijom EDL-a živcem koji inače inervira soleus tijekom godine i pol dana. Gutman i Carlson (190) su transplantirali EDL na mjesto soleusa i također ga inervirali živcem soleusa. Nakon tri mjeseca trajanja unakrsne inervacije autori su zaključili da je vrlo teško inducirati karakteristike "tuđeg" mišića. Do sličnog zaključka došli su i drugi autori koji su pokušali inducirati ispoljavanje IIB MHC izoforme u soleusu živcem koji inače inervira EDL (191).

Windisch i sur. (192) su proučavali utjecaj električne stimulacije na EDL- u i soleus-u štakora. Upotrijebili su struju od 20 Hz. U vlaknima nije bilo znakova

degeneracije i regeneracije tijekom cijelog perioda transformacije, osim na mjestima gdje su bile aplicirane elektrode. Ovi rezultati nameću zaključak da se transformacija događa isključivo u postojećim, a nikako u novostvorenim vlaknima.

Transformacija od vlakana tipa IIB i IIX do vlakana tipa I se odvija na dva stupnja. Nakon dva tjedna stimulacije prvo se ispoljavaju vlakna tipa IIA, a tek onda nakon dva mjeseca vlakna tipa I. Činjenica da se vlakna tipa IIB i IIX zamjenjuju vlaknima tipa IIA nakon dva tjedna govori u prilog spoznaji da je promijenjena stimulacija blokirala njihovu ekspresiju (17). Vlakna tipa I su porasla od 3% na 15% nakon tri tjedna, a 100% nakon dva mjeseca. Pretpostavlja se da su u prva tri tjedna to bila vlakna tipa IIA, a kasnije transformirana vlakna IIB i IIX.

Jedini rad iz objavljene literature koji govori o utjecaju električne stimulacije na ispoljavanje nNOS-a (113) donosi rezultate koji nisu u potpunosti u skladu s našim rezultatima. Naime, ovi autori su proučavali ispoljavanje nNOS-a u m.tibialis anterior-u i EDL-u zeca nakon električne stimulacije od 10 Hz tj. obrascem koji imitira spori živac. Nakon tri tjedna stimulacije došlo je do transformacije vlakana tipa II u tip I. Autori su očekivali da će konverzija brzih mišića u spore mišiće dovesti do značajnog smanjenja ekspresije nNOS-a. Međutim, suprotno očekivanjima, došlo je do porasta u njegovoj ekspresiji. Time su zaključili da je ekspresija nNOS-a regulirana mišićnom aktivnošću i da regulacija nNOS ispoljavanja ne slijedi nužno brzi ili spori obrazac tijekom dinamične faze promjene fenotipa.

Rezultati našeg istraživanja ukazuju na činjenicu da inervacija predstavlja važan faktor kako u ispoljavanju miozinskih izoformi tako i u nNOS ekspresiji. Električna stimulacija sporog mišića soleusa, u kojem je prethodno izvršena denervacija, pomoću obrasca koji imitira brzi živac (100 Hz) dovodi do pojačane ekspresije nNOS-a. Nivo nNOS-a u stimuliranom m. soleus-u može se usporediti s vrijednostima dobivenim u

normalnom brzom mišiću kao što je TA i EDL. Suprotno tome, električna stimulacija brzog mišića EDL-a obrascem koji imitira spori živac dovodi do pada u ekspresiji nNOS-a. Iz ovoga možemo zaključiti da je inervacija ključni i određujući faktor u ispoljavanju nNOS-a u skeletnom mišiću. Transformacijom sporog mišića u brzi i obrnuto možemo mijenjati nivo ispoljavanja nNOS-a.

Poznato je da se u početnim fazama Duchenn-ove mišićne distrofije i u *mdx* miševa kod kojih nedostaje distrofin kao kompenzatorni mehanizam javlja se proces regeneracije mišićnih vlakana (193).

Također je dokazano da dolazi do redistribucije nNOS-a sa sarkoleme u citosol što dovodi do oštećenja mišićnih stanica (143). Ovaj rezultat također se bazira na imunohistokemijskoj metodi koja pokazuje odsutstvo nNOS-a sa sarkoleme mišićnih vlakana *mdx* miševa.

Postoje brojni eksperimentalni modeli izazivanja degeneracije i posljedične regeneracije mišićnih vlakana. Nekoliko lokalnih anestetika, uključujući lidokain i bupivakain uzrokuju mišićnu nekrozu vjerojatno na način da omogućavaju ulazak izvanstanične tekućine u sarkoplazmu.

Novonastalo povišenje razine unutarstaničnog kalcija dovodi do hiperkontrakcije miofibrila što konačno vodi nekrozi mišićnih vlakana (194). Nakon 24 sata od injiciranja lokalnog anestetika dolazi do infiltracije makrofaga i polimorfonukleara što također pospješuje nastanak nekroze mišićnih vlakana (53,194). Obzirom da vaskularizacija mišića nakon injekcije lokalnog anestetika nije kompromitirana, vrlo brzo će ukoliko su očuvane satelitske stanice uslijediti proces regeneracije mišićnih vlakana. Stoga je ovo vrlo pogodan eksperimentalni model koji omogućava izazivanje degenerativno-regeneracijskih promjena u normalnim mišićnim vlaknima mehanizmom

sličnom onom koji se događa u mdx miševa (195) i tijekom miogeneze mišića u razvoju (196,197).

Iz literature je poznato da regeneraciju omogućuju aktivirane satelitske stanice. Također znamo da nakon izazvane nekroze u mišiću NO difundira u okolna mišićna vlakna i potiče satelitske stanice koje su smještene između sarkoleme i bazalne lamine (182). Pored toga, uspješnoj regeneraciji pridonose i krvna opskrba i vezivno tkivo koje nije oštećeno injiciranjem lokalnih anestetika (198).

Naši rezultati potvrđuju prijašnja istraživanja da ukoliko postoji živac dolazi do ponovnog eksprimiranja spore izoforme miozina i do ponovne uspostave metaboličko-histokemijskog uzorka sporog mišićnog vlakna (196,197,199).

Što se tiče vremenskog pojavljivanja pojedinih izoformi miozina tijekom regeneracijskog procesa možemo ustvrditi da se naši rezultati slažu s podacima iz literature. Naime, Vitadello i suradnici (160) su pokazali da se već treći dan od izazivanja regeneracijskog procesa u soleusu javljaju mioblasti i miotube koje se boje monoklonskim protutijelima protiv embrionalnih izoformi teških lanaca miozina. Nakon sedmog dana, kada još uvijek perzistira embrionalna izoforma miozina, javlja se i odrasla spora i brza izoforma teškog lanca miozina, MHC tip I i MHC tip IIA.

Postoje brojni podaci u literaturi koji pokazuju da je ispoljavanje proteinskih izoformi u skeletnom mišiću tijekom regeneracijskog procesa ovisno o inervaciji. Midrio i sur. (200) su proučavali soleus u regeneraciji sa i bez živca. U mišiću su se nakon 14 dana od injiciranja bupivakaina gotovo sva vlakna diferencirala u tip I, a svega nekoliko u tip IIA. Vlakna tipa IIX i IIB uopće nisu bila prisutna. Međutim, nakon pokusa s TTX-om, kojim se postiže prekid prijenosa živčanih impulsa uz intaktan živac, sva vlakna su ispoljavala IIX izoformu i manjim dijelom izoformu tipa IIB. Naprotiv, vlakna tipa I tj. spora vlakna nisu prisutna u mišićima tijekom regeneracije

prethodno denerviranim kao ni u onima u kojima je izvršen prekid u provođenju impulsa kroz živac pomoću TTX-a. Autori su ovim radom došli do dva zaključka. Prvo, mišić koji je bez živca, odlazi u tzv. "default" program koji podrazumijeva ekspresiju svih brzih MHC izoformi (5). Drugo, neuromotorna aktivnost, pored stimuliranja ekspresije MHC izoforme tipa I, također inhibira ekspresiju najbržih izoformi MHC-a, IIX i IIB (200).

Poznato je da postotak vlakana tipa I i II u mišiću ovise o stupnju mišićne aktivnosti bilo da je fiziološka ili nametnuta. Ukoliko je aktivnost povećana, povećava se udio vlakana tipa I, a ukoliko je ona smanjena biti će više vlakana tipa II (136). Također je poznato da je količina impulsa motoneurona predana vlaknima tipa I najveća, dok je minimalna za najbrža vlakna, tipa IIB.

Minatel i sur. (195) su proučavali distribuciju tj. ekspresiju nNOS-a na neuromuskularnoj ploči mišićnih vlakana u regeneraciji. Naime, u m. sternocleidomastoideus štakora izazvali su proces regeneracije injiciranjem lokalnog anestetika lidokaina. Štakore su žrtvovali tri tjedna nakon izazvane regeneracije i uočili da je ispoljenost nNOS-a jaednaka kao i u kontrolnom mišiću. Međutim, budući znamo da već 15 dana nakon izazvanog procesa regeneracije mišić poprima svoj normalni fenotip ne možemo iz ovog rada zaključiti da do promjena u nNOS ispoljavanju uopće nije došlo.

Nadalje, Lincoln i Harb (138) su istraživali aktivnost NOS-a u postnatalnom razvoju EDL-a i SOL-a štakora. Koristili su metodu kojom nije bilo moguće odijeliti nNOS od eNOS aktivnosti. Pokazali su da NOS aktivnost nije značajno različita u brzom i sporom mišiću tijekom prva dva tjedna života. Razlika postaje očita kada štakori navrše četiri tjedna, jer tada NOS aktivnost značajno poraste u EDL-u, dok u

soleusu NOS aktivnost ostaje na jednako niskom stupnju kao što je bilo tijekom postnatalnog razvoja.

Poznato je da je u skeletnom mišiću nNOS lokaliziran na sarkolemi te da ostvaruje vezu s kompleksom distrofina (97). Također znamo da je u odsutnosti distrofina NOS aktivnost značajno niža (97,112).

Međutim, prisutnost distrofina nije jedini faktor koji određuje stupanj NOS aktivnosti u mišiću. Naime, Chang i sur. (112) su pokazali da je NOS aktivnost niska u skeletnim mišićima miševa divljeg tipa starih svega dva tjedna, kao i u *mdx* miševa, usprkos činjenici da je distrofin prisutan u miševa divljeg tipa. Taj rezultat ukazuje na to da postoji okidač koji povećava aktivnost i ekspresiju NOS-a u završnim fazama diferencijacije brzih, ali ne i sporih mišićnih vlakana. Vjerojatno je to motoneuron, odnosno uspostavljena aktivnost na neuromišićnoj spojnici (135,136). Motorne jedinice u EDL-u poprimaju obrazac odraslih jedinica tek nakon 2 tjedna (137). Time možemo zaključiti da je povećanje ekspresije NOS-a direktna posljedica uspostave neuromišićne veze.

Mi smo proučavali regeneraciju izazvanu injiciranjem bupivakaina na mišićnom tkivu EDL-a i SOL-a kroz deset dana. Prvog dana smo dobili amorfnu masu koja je pokazivala snažno obojenje na poliklonalno protutijelo specifično za nNOS izoformu. To objašnjavamo činjenicom da ulaskom kalcija u stanicu, što se svakako događa nakon injekcije bupivakaina, poraste aktivnost i ekspresija nNOS-a. Naime, u fiziološkim uvjetima, kalcij kada uđe u sarkoplazmu, ne samo da inducira mišićnu kontrakciju, već i aktivira kalcij-ovisnu izoformu, nNOS (201).

Već trećeg dana smo opazili da je ekspresija u mišićima veoma slaba, a mišićna vlakna se još ne prikazuju. Iako sedmog dana opažamo mnogobrojna malena mišićna vlakna još uvijek nema jače ekspresije nNOS-a.



Međutim, desetog dana, u oba mišića je prisutna podjednaka ekspresija nNOS-a i to uglavnom u sarkoplazmi. Naime, Blottner i Luck (132) su u svom istraživanju zaključili da tijekom razvoja mišića, od prenatalnog ka postnatalnom, dolazi do regulirane translokacije nNOS-a iz sarkoplazme na sarkolemu.

Činjenica da povećana mišićna i živčana aktivnost regulira ekspresiju nNOS-a u skeletnom mišiću potvrđuje pretpostavku da je nNOS inducibilni enzim. Naime, ekspresija nNOS-a u skeletnom mišiću je pod hormonalnom i metaboličkom kontrolom, a njegova aktivnost se može mijenjati u različitim fiziološkim i patološkim uvjetima.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Imunohistokemijskom metodom dokazali smo da je ispoljavanje nNOS-a u skeletnim mišićima štakora vezano za tip mišićnog vlakna.
2. nNOS je najjače ispoljen u brzim vlaknima tipa IIA i IIX, puno slabije u vlaknima tipa I dok vlakna tipa IIB uopće ne ispoljavaju nNOS na sarkolemi.
3. Inervacija skeletnog mišića predstavlja vrlo važan regulatorni faktor za pravilno ispoljavanje nNOS-a.
4. Denervacija skeletnog mišića dovodi do značajnog smanjenja ekspresije nNOS-a i konačno vodi potpunom nestanku nNOS-a sa sarkoleme. Nestanak nNOS-a sa sarkoleme mišićnog vlakna događa se postepeno i vidljivo je tek trećeg dana od denervacije.
5. Električna stimulacija skeletnih mišića obrascem koji imitira brzi ili spori živac moguće je mijenjati ekspresiju nNOS-a. Tako električna stimulacija sporog mišića soleusa, u kojem je prethodno izvršena denervacija, pomoću obrasca koji imitira brzi živac (100 Hz) dovodi do pojačane ekspresije nNOS-a. Dakle, transformacijom sporog mišića u brzi i obrnuto možemo mijenjati nivo ispoljavanja nNOS-a.
6. Izazvani proces mišićne regeneracije uzrokuje prolaznu inhibiciju nNOS ekspresije no već desetog dana od injekcije bupivakaina vrijednosti nNOS-a vraćaju se na normalne vrijednosti.

## 7. LITERATURA

1. Schmalbruch H. Skeletal muscle fibres. U: Schmalbruch H (urednik): Skeletal muscle. Springer Verlag, Berlin, 1985; str.35-155.
2. Junqueira LC, Carneiro J, Kelly RO. Mišićno tkivo. U: Junqueira LC, Carneiro J, Kelly RO (urednici): Osnove histologije. Školska knjiga Zagreb, 1995; str. 198-208.
3. Guyton AC, Hall JE. Kontrakcija skeletnog mišića. U: Guyton AC, Hall JE. (urednici): Medicinska fiziologija. Medicinska naklada, Zagreb 1999; str. 67-77.
4. Pette D, Staron RS. Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. Rev Physiol Biochem Pharmacol 1990; 116:1-76.
5. Schiaffino S, Reggiani C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. Physiol Rev 1996; 76:371-423.
6. Baldwin KM. Effects of altered loading states on muscle plasticity: what have we learned from rodents? Med Sci Sports Exerc 1996; 28:S101-6.
7. Fitts RH, McDonald KS, Schluter JM. The determinants of skeletal muscle force and power: their adaptability with changes in activity pattern. J Biomech 1991; 1:111-112.
8. Fitts RH, Widrick JJ. Muscle mechanics: adaptations with exercise-training. Exerc Sport Sci Rev 1996; 24:427-73.
9. Rivero JL, Talmadge RJ, Edgerton VR. Interrelationships of myofibrillar ATPase activity and metabolic properties of myosin heavy chain-based fibre types in rat skeletal muscle. Histochem Cell Biol 1999; 111:277-87.

10. Talmadge RJ. Myosin heavy chain isoform expression following reduced neuromuscular activity: potential regulatory mechanisms. *Muscle Nerve* 2000; 23:661-679.
11. Demirel HA, Powers SK, Naito H, Hughes M, Coombes JS. Exercise-induced alterations in skeletal muscle myosin heavy chain phenotype: dose-response relationship. *J Appl Physiol* 1999; 86:1002-8.
12. Baldwin KM, Haddad F. Plasticity in skeletal, cardiac and smooth muscle. Invited review: Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. *J Appl Physiol* 2001;90:345-57.
13. d'Albis A, Couteaux R, Janmot C, Roulet A, Mira JC. Regeneration after cardiotoxin injury of innervated and denervated slow and fast muscles of mammals. Myosin isoform analysis. *Eur J Biochem* 1988; 174:103-10.
14. Lomo T, Westgaard RH, Dahl HA. Contractile properties of muscle: control by pattern of muscle activity in the rat. *Proc R Soc Lond Ser B Biol Sci* 1974; 187:99-103.
15. Di Maso NA, Caiozzo VJ, Baldwin KM. Single-fiber myosin heavy chain polymorphism during postnatal development: modulation by hypothyroidism. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2000; 278:R1099-106.
16. Staron RS, Pette D. The multiplicity of combinations of myosin light chains and heavy chains in histochemically typed single fibres. Rabbit soleus muscle. *Biochem J* 1987; 243:687-93.

17. Termin A, Staron RS, Pette D. Changes in myosin heavy chain isoforms during chronic low frequency stimulation of rat fast hindlimb muscles. A single-fiber study. *Eur J Biochem* 1989; 186:749-54.
18. Termin A, Staron RS, Pette D. Myosin heavy chain isoforms in histochemically defined fiber types of rat muscle. *Histochemistry* 1989; 92:453-57.
19. Tews DS, Goebel HH, Schneider I, Gunkel A, Stennert E, Neiss WF. Expression of different isoforms of nitric oxide synthase in experimentally denervated and reinnervated skeletal muscle. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997;56:1283-9.
20. Caiozzo VJ, Baker MJ, McCue SA, Baldwin KM. Single-fiber and whole muscle analyses of MHC isoform plasticity: interaction between T<sub>3</sub> and unloading. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 1997; 273:C944-52.
21. Caiozzo VJ, Haddad F, Baker M, McCue S, Baldwin KM. MHC polymorphism in rodent plantaris muscle: effects of mechanical overload and hypothyroidism. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 2000; 278:C709-17.
22. Butler-Browne GS, Eriksson PO, Laurent C, Thornell LE. Adult human masseter muscle fibers express myosin isoenzymes characteristic of development. *Muscle Nerve* 1988; 11:610-20.
23. Bredman JJ, Wessels A, Weijs WA, Kofrage JAM, Soffers CAS, Moorman AFM. Demonstration of 'cardiac-specific' myosin heavy chain in masticatory muscles of human and rabbit. *Histochem J* 1991; 23:160-70.

24. Stal P, Eriksson PO, Schiaffino S, Butler-Browne GS, Thornell LE. Differences in myosin composition between human oro-facial, masticatory and limb muscles: Enzyme-, immunohisto- and biochemical studies. *J Muscle Res Cell Motil* 1994; 15:517-34.
25. Maier A, Gambke B, Pette D. Immunohistochemical demonstration of embryonic myosin heavy chains in adult mammalian intrafusal fibers. *Histochemistry* 1988a; 88:267-71.
26. Pedrosa F, Butler-Browne G, Dhoot G, Fischman D, Thornell LE. Diversity in expression of myosin heavy chain isoforms and M-band proteins in rat muscle spindles. *Histochemistry* 1989; 92:185-94.
27. Kucera J, Walro JM, Gorza L. Expression of type-specific MHC isoforms in rat intrafusal muscle fibers. *J Histochem Cytochem* 1992; 40:293-307.
28. Pette D, Staron RS. Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int Rev Cyto* 1997; 25:143-178.
29. Adams GR, McCue SA, Zeng M, Baldwin KM. Time course of myosin heavy chain transitions in neonatal rats: importance of innervation and thyroid state. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 1999; 276: R964-71.
30. Condon K, Silberstein L, Blau HM, Thompson Wj. Development of muscle fiber types in the prenatal rat hindlimb. *Dev Biol* 1990; 138:256-74.
31. Mahdavi V, Izumo S, Nadal-Ginard B. Developmental and hormonal regulation of sarcomeric myosin heavy chain gene family. *Circ Res* 1987; 60:804-14.
32. Caiozzo VJ, Haddad F. Thyroid hormone: modulation of muscle structure, function, and adaptive responses to mechanical loading. *Exerc Sport Sci Rev* 1996; 24:321-61.

33. Butler-Browne GS, Whalen RG. Myosin isozyme transitions occurring during the postnatal development of the rat soleus muscle. *Dev Biol* 1984; 102:324-34.
34. d'Albis A, Couteaux R, Janmot C, Roulet A. Specific programs of myosin expression in the postnatal development of rat muscles. *Eur J Biochem* 1989; 183:538-90.
35. Buller AJ, Eccles JC, Eccles RM. Interactions between motoneurons and muscles in respect of the characteristic speeds of their responses. *J Physiol (Lond)* 1960; 150:417-39.
36. Ausoni L, Gorza L, Schiaffino S, Gunderson K, Lomo T. Expression of myosin heavy chain isoforms in stimulated fast and slow rat muscles. *J Neurosci* 1990; 10:153-60.
37. Gorza L, Gunderson K, Lomo T, Schiaffino S. Slow-to-fast transformation of denervated soleus muscles by chronic high frequency stimulation in the rat. *J Physiol (Lond)* 1988; 402:627-49.
38. Chizzonite RA, Everett AW, Clark WA, Jakovcic S, Rabinowitz M, Zak R. Isolation and characterization of two molecular variants of myosin heavy chain from rabbit ventricle. Change in their content during normal growth and after treatment with thyroid hormone. *J Biol Chem* 1982; 257:2056-65.
39. Larsson L, Muller U, Li X, Schiaffino S. Thyroid hormone regulation of myosin heavy chain isoform composition in young and old rats, with special reference to IIX myosin. *Acta Physiol Scand* 1995; 153:109-16.
40. Perry RLS, Rudnicki MA. Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. *Front Biosci* 2000;5:750-67.

41. Kuschel R, Yablonka-Reuveni Z, Bornemann A. Satellite cells on isolated myofibers from normal and denervated adult rat muscle. *J Histo Cyto* 1999; 47: 1375-84.
42. Gunning P, Hardeman E. Multiple mechanisms regulate muscle fiber diversity. *FASEB J* 1991; 5:3064-70.
43. Hoh JFY. Myogenic regulation of mammalian skeletal muscle fibres. *News Physiol Sci* 1991; 6:1-6.
44. Hughes SM, Cho M, Karssch-Mizrachi I i sur. Three slow myosin heavy chains sequentially expressed in developing mammalian skeletal muscle. *Dev Biol* 1993; 158:183-99.
45. Janmot C, d'Albis A. Electrophoretic separation of developmental and adult rabbit skeletal muscle myosin heavy chain isoforms: example of application to muscle denervation study. *FEBS Lett*, 1994;353:13-5.
46. Russell SD, Cambon NA, Nadal-Ginard B, Whalen RG. Two types of neonatal-to-adult fast myosin heavy chain transitions in rat hindlimb muscle fibers. *Dev Biol* 1993; 157:359-370.
47. DeNardi C, Ausoni S, Moretti P i sur. Type 2X-myosin heavy chain is coded by a muscle fiber type-specific and developmentally regulated gene. *J Cell Biol* 1993; 123:823-35.
48. Ullman M, Ullman A, Sommerland H, Skottner A, Oldfors A. Effects of growth hormone on muscle regeneration and IGF-I concentration in old rats. *Acta Physiol Scand* 1990;140:521-5.



49. Carlson BM, Faulkner JA. The regeneration of noninnervated muscle grafts and Marcaine-treated muscles in young and old rats. *J Gerontol Biol Sci Med Sci* 1996; 51: B43-9.
50. Sachs M. Effects of aging on skeletal muscle regeneration. *J Neurol Sci* 1988; 87: 67-74.
51. Carlson BM, Faulkner JA. Muscle transplantation between young and old rats: age of host determined functional recovery. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 1989; 256: C1265-6.
52. Vandenburg HH, Sheff MF, Zacks SI. Soluble age-related factors from skeletal muscle which influence muscle development. *Exp Cell Res* 1984; 153: 389-401.
53. Hall-Craggs ECB. Rapid degeneration and regeneration of a whole skeletal muscle following treatment with bupivacaine (Marcain). *Exp Neurol* 1974; 43: 349-58.
54. Hamilton MT, Marsh DR, Criswell DS, Lou W, Booth FW. No effect of aging on skeletal muscle insulin-like growth factor mRNAs. *Am J Physiol* 1995; 269: R1183-8.
55. Marsh DR, Criswell DS, Carson JA, Booth FW. Myogenic regulatory factors during regeneration of skeletal muscle in young, adult and old rats. *J Appl Physiol* 1997; 83: 1270-5.
56. Rosenblatt JD. A time course study of the isometric contractile properties of rat extensor digitorum longus muscle injected with bupivacaine. *Comp Biochem Physiol* 1992; 101A:361-7.
57. Rosenblatt JD, Woods RI. Hypertrophy of rat extensor digitorum longus muscle injected with bupivacaine. A sequential histochemical, immunohistochemical, histological and morphometric study. *J Anat* 1992; 181: 11-27.

58. Buonanno A, Apone L, Morasso MI, Beers R, Brenner HR, Eftimie R. The MyoD family of myogenic factors is regulated by electrical activity: isolation and characterization of a mouse Myf-5 cDNA. *Nuc Acids Res* 1992;20:539-44.
59. Eftimie R, Brenner HR, Buonanno A. Myogenin and MyoD join a family of skeletal muscle genes regulated by electrical activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1349-53.
60. Füchtbauer EM, Westphal H. MyoD and myogenin are coexpressed in regenerating skeletal muscle of the mouse. *Dev Dyn* 1992;193:34-9.
61. Grounds MD, Garrett KL, Lai MC, Wright WE, Beilharz MW. Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of MyoD and myogenin probes. *Cell Tissue Res* 1992; 267: 99-104.
62. Rantanen J, Hurme T, Lukka R, Heino J, Kalimo H. Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells. *Lab Invest* 1995; 72: 341-7.
63. Judaš M, Kostović I. Sinaptička plastičnost i stanični mehanizmi učenja i pamćenja. U: Judaš M, Kostović I (urednici): *Temelji neuroznanosti*. MD Zagreb, 1997; str. 664-74.
64. Wood J, Garthwaite J. Models of the diffusional spread of nitric oxide: implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties. *Neuropharmacology* 1994;33:1235-44.
65. Brown RH. Free radicals, programmed cell death and muscular dystrophies. *Curr Opin Neurol* 1995;8:373-8.
66. Crow JP, Beckman JS. The role of peroxynitrite in nitric oxide-mediated toxicity. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995; 196:57-73.

67. Moncada S, Higgs EA. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J* 1995;9:1319-30.
68. Schuman EM, Madison DV. Nitric oxide and synaptic function. *Annu Rev Neurosci* 1994; 17:153-83.
69. Bachneff SA. Regional cerebral blood flow in schizophrenia and the local circuit neurons hypothesis. *Schizophr Bull* 1996; 22:163-82.
70. Bhargava HN. Attenuation of tolerance to, and physical dependence on, morphine in the rat by inhibition of nitric oxide synthase. *Gen Pharmacol* 1995;26:1049-53.
71. Vaupel DB, Kimes AS, London ED. Comparison of 7-nitroindazole with other nitric oxide synthase inhibitors as attenuators of opioid withdrawal. *Psychopharmacology (Berl)* 1995; 118:361-8.
72. Lancaster FE. Alcohol and the brain: What's NO got to do with it; *Metab Brain Dis* 1995; 10:125-33.
73. Dawson VL. Nitric oxide: role in neurotoxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995;22:305-8.
74. Moncada S. Nitric oxide. *J Hypertens Suppl* 1994;12:S35-9.
75. Olesen J, Thomsen LL, Lassen LH, Olesen IJ. The nitric oxide hypothesis of migraine and other vascular headaches. *Cephalalgia* 1995;15:94-100.
76. Moncada S, Higgs A, Furchgott R. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol Rev* 1997;49:137-42.
77. Guo FH, De Raeve HR, Rice TW, Stuehr DJ, Thunnissen FB, Erzurum SC. Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:7809-13.

78. Silvagno F, Xia H, Bredt DS. Neuronal nitric-oxide synthase- $\mu$ , an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. *J Biol Chem* 1996;271:11204-8.
79. Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae: specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem* 1996;271:22810-4.
80. Christopherson KS, Bredt DS. Nitric oxide in excitable tissues: Physiological roles and disease. *J Clin Invest* 1997;100:2424-9.
81. Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 1990;347:768-70.
82. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994;78:915-8
83. Rubinstein I, Abassi Z, Coleman R, Milman F, Winaver J, Better OS. Involvement of nitric oxide system in experimental muscle crush injury. *J Clin Invest* 1998; 101:1325-33.
84. Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 1991;351:714-8.
85. Nakane M, Mitchell J, Forstermann U, Murad F. Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 180:1396-402.
86. Brune B, Lapetina EG. Phosphorylation of nitric oxide by protein kinase A. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181:921-6.

87. Michel T, Li GK, Busconi L. Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:6252-6.
88. Stamler JS. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 1994;78:931-6.
89. Peunova N, Enikolopov G. Amplification of calcium-induced gene transcription by nitric oxide in neuronal cells. *Nature(Lond)* 1993;364:450-3.
90. Buchwalow IB, Schulze W, Kostic MM, Wallukat G, Morwinski R. Intracellular localization of inducible nitric oxide synthase in neonatal rat cardiomyocytes in culture. *Acta Histochem* 1997;99:231-40.
91. Tamir S, deRojas-Walker T, Wishnok JS, Tannenbaum SR. DNA damage and genotoxicity by nitric oxide. *Methods Enzymol* 1996;269:230-43.
92. Xia H, Bredt DS. Cloned and expressed nitric oxide synthase proteins. *Methods Enzymol* 1996;268:427-36.
93. Shen W, Hintze TH, Wolin MS. Nitric oxide. An important signaling mechanism between vascular endothelium and parenchymal cells in the regulation of oxygen consumption. *Circulation* 1995;92:3505-12.
94. Bates TE, Loesch A, Burnstock G, Clark JB. Mitochondrial nitric oxide synthase: a ubiquitous regulator of oxidative phosphorylation? *Biochem Biophys Res Commun* 1996;218:40-4.
95. Michel T, Feron O. Nitric oxide synthase: Where, where, how and why? *J Clin Invest* 1997;100:2146-52.
96. Parton RG, Joggerst B, Simons K. Regulated internalization of caveolae. *J Biol Chem* 1994;269:1199-215.

97. Brenman JE, Chao DS, Xia H, Aldape K, Brecht DS. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin are absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 1995; 82:743-52.
98. Brenman JE, Chao DS, Gee SH i sur. Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 1996;84:757-67.
99. Vodovotz Y, Russell D, Xie QW, Bogdan C, Nathan C. Vesicle membrane association of nitric oxide synthase in primary mouse macrophages. *J Immunol* 1995;154:2914-25.
100. Feron O, Dessy C, Opel DJ, Arstall MA, Kelly RA, Michel T. Modulation of the endothelial nitric-oxide synthase-caveolin interaction in cardiac myocytes. Implications for the autonomic regulation of heart rate. *J Biol Chem* 1998;273:30249-54.
101. Anderson RGW. Caveole: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10909-13.
102. Couet JS, Li S, Okamoto PE, Scherer PE, Lisanti MO. Molecular and cellular biology of caveolae. *Trends Cardiovasc Med* 1997;4:103-10.
103. Feron O, Smith TW, Michel T, Kelly RA. Dynamic targeting of the agonist-stimulated m2 muscarinic acetylcholine receptor to caveolae in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1997;272:17744-8.
104. Adams V, Jiang H, Yu Y i sur. Apoptosis in skeletal myocytes of patients with chronic heart failure is associated with exercise intolerance. *J Am Coll Cardiol* 1999;33:959-65.

105. Tews DS, Goebel HH. Cell death and oxidative damage in inflammatory myopathies. *Clin Immunol Immunopathol* 1998;87:240-7.
106. Thompson M, Becker L, Bryant D i sur. Expression of the inducible nitric oxide synthase gene in diaphragm and skeletal muscle. *J Appl Physiol* 1996;81:2415-20.
107. el-Dwairi Q, Comtois A, Guo Y, Hussain SN. Endotoxin-induced skeletal muscle contractile dysfunction: contribution of nitric oxide synthases. *Am J Physiol* 1998;274:C770-9.
108. Barreiro E, Comtois AS, Gea J, Laubach VE, Hussain SN. Protein tyrosine nitration in the ventilatory muscles: role of nitric oxide synthases. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 26:438-46.
109. Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Association of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) with  $\alpha$ 1-syntrophin at the sarcolemma. *Microsc Res Tech* 2001;55:164-70.
110. Grozdanovic Z, Nakos G, Dahrmann G, Mayer B, Gossrau R. Species-independent expression of nitric oxide synthase in the sarcolemal region of visceral and somatic striated muscle fibers. *Cell Tissue Res* 1995; 281:493-9.
111. Nakane M, Schmidt HHHW, Pollock JS, Forstermann, Murad F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett* 1993; 316:175-80.
112. Chang WJ, Iannaccone ST, Lau KS i sur. Neuronal nitric oxide synthase and dystrophin-deficient muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:9142-7.
113. Reiser PJ, Kline WO, Vaghy PL. Induction of neuronal type nitric oxide synthase in skeletal muscle by chronic electrical stimulation in vivo. *J Appl Physiol* 1997;82:1250-5.

114. Frandsen U, Lopez-Figueroa M, Hallsten Y. Localization of nitric oxide synthase in human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Comm* 1996;227:88-93.
115. Capanni C, Squarzone S, Petrini S i sur. Increase on neuronal nitric oxide synthase in rat skeletal muscle during ageing. *Biochem Biophys Res Comm* 1998;245:216-9.
116. Ogilvie P, Schilling K, Billingsley ML, Schmidt HH. Induction and variants of neuronal nitric oxide synthase type I during synaptogenesis. *FASEB J* 1995;9:799-806.
117. Weiner CP, Lizasoain I, Bayalis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:5212-6.
118. Balon TW, Nadler JL. Evidence that nitric oxide increases glucose transport in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 1997;82:359-63.
119. Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, Stamler JS. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* 1994; 372:546-8.
120. Reid MB. Role of nitric oxide in skeletal muscle: synthesis, distribution and functional importance. *Acta Physiol Scand* 1998;162:401-9.
121. Murphy ME, Brayden JE. Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels. *J Physiol* 1995;486:47-58.
122. Abramson JJ, Salama G. Sulfhydryl oxidation and  $Ca^{2+}$  release from sarcoplasmic reticulum. *Mol Cell Biochem* 1988; 82: 81-4.
123. Bailey K, Perry SV. The role of sulfhydryl groups in the interaction of myosin and actin. *Biochim Biophys Acta* 1989; 1000:177-8.



124. Higaki Y, Hirshman MF, Fujii N, Goodyear LJ. Nitric oxide increases glucose uptake through a mechanism that is distinct from the insulin and contraction pathways in rat skeletal muscle. *Diabetes* 2001;50:241-7.
125. Alnaqueeb MA, Goldspink G. Changes in fibre type, number and diameter in developing and ageing skeletal muscle *J Anat* 1987; 153:31-45.
126. Brown M. Change in fibre size, not number, in ageing skeletal muscle. *Age Ageing* 1987; 16:244-8.
127. Chao DS, Silvagno F, Xia H, Cornwell TL, Lincoln TM, Bredt DS. Nitric oxide synthase and cyclic GMP-dependent protein kinase concentrated at the neuromuscular endplate. *Neuroscience* 1997;76:665-72.
128. Grozdanovic Z, Christova T, Gosztonyi G, Mellerowicz H, Blottner D, Gossrau R. Absence of nitric oxide synthase I despite the presence of the dystrophin complex in human striated muscle. *Histochem J* 1997;29:97-104.
129. Tews DS, Goebel HH, Schneider I, Gunkel A, Stennert E, Neiss WF. Expression of different isoforms of nitric oxide synthase in experimentally denervated and reinnervated skeletal muscle. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997;56:1283-9.
130. Lee MA, Cai L, Huebner N, Lee YA, Linpainter K. Tissue- and development-specific expression of multiple alternatively spliced transcripts of rat neuronal nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 1997;100:1507-12.
131. Xie J, Roddy P, Rife TK, Murad F, Young AP. Two closely linked but separable promoters for human neuronal nitric oxide synthase gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:11242-6.

132. Blottner D, Lück G. Nitric oxide synthase (NOS) in mouse skeletal muscle development and differentiated myoblasts. *Cell Tissue Res* 1998; 292:293-302.
133. Lee KH, Baek MY, Moon KY i sur. Nitric oxide as a messenger molecule for myoblast fusion. *J Biol Chem* 1994; 269:14371-4.
134. Balon TW, Nadler JL. Nitric oxide release is present from incubated skeletal muscle preparations. *J Appl Physiol* 1994; 77:2519-21.
135. Navarette R, Vrbová G. Activity-dependent interactions between motoneurons and muscles: their role in the development of the motor unit. *Proc Neurobiol* 1993; 41:93-124.
136. Pette D, Vrbová G. Invited Review: Neural control of phenotypic expression in mammalian muscle fibers. *Muscle Nerve* 1985;8:676-89.
137. Navarette R, Vrbová G. Changes in activity patterns in slow and fast muscles during postnatal development. *Dev Brain Res* 1983;8:11-9.
138. Lincoln J, Harb R. Postnatal development of nitric oxide synthase activity in fast and slow muscles of the rat. *Muscle Nerve* 1998; 21:1344-6.
139. Grozdanovic Z, Gosztanyi G, Gossrau R. Nitric oxide synthase I (NOS-I) is deficient in the sarcolemma of striated muscle fibers in patients with Duchenne muscular dystrophy, suggesting an association with dystrophin. *Acta Histochem* 1996;98:61-9.
140. Thomas GD, Victor RG. Nitric oxide mediates contraction-induced attenuation of sympathetic vasoconstriction in rat skeletal muscle. *J Physiol* 1998;506:817-26.
141. Rando TA, Disatnik MH, Yu Y, Franco A. Muscle cells from mdx mice have an increased susceptibility to oxidative stress. *Neuromuscul Disord* 1998;8:14-21.

142. Disatnik MH, Dhawan J, Yu Y i sur. Evidence of oxidative stress in mdx mouse muscle: studies of the pre-necrotic state. *J Neurol Sci* 1998;161:77-84.
143. Chao DS, Silvagno F, Bredt DS. Muscular dystrophy in *mdx* mice despite lack of neuronal nitric oxide synthase. *J Neurochem* 1998;71:784-9.
144. Crosbie RH, Yamada H, Venzke DP, Lisanti MP, Campbell KP. Caveolin-3 is not an integral component of the dystrophin glycoprotein complex. *FEBS Lett* 1998;427:279-82.
145. Kameya S, Miyagoe Y, Nonaka I i sur.  $\alpha$ 1-syntrophin gene disruption results in the absence of neuronal-type nitric-oxide synthase at the sarcolemma but does not induce muscle degeneration. *J Biol Chem* 1999;274:2193-200.
146. Zhuang W, Eby JC, Cheong M i sur. The susceptibility of muscle cells to oxidative stress is independent of nitric oxide synthase expression. *Muscle Nerve* 2001;24:502-11.
147. Wink DA, Vodovotz Y, Grisham MB i sur. Antioxidant effects of nitric oxide. *Methods Enzymol* 1999;302:413-24.
148. Sandri M, Minetti C, Pedemonte M, Carraro U. Apoptotic myonuclei in human Duchenne muscular dystrophy. *Lab Invest* 1998;78:1005-16.
149. Tidball JG, Albrecht DE, Lokensgard BE, Spencer MJ. Apoptosis precedes necrosis of dystrophin-deficient muscle. *J Cell Sci* 1995;108:2197-204.
150. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: Two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci* 1995;92:7162-6.

151. Tews DS, Goebel HH, Schneider I, Gunkel A, Stennert E, Neiss WF. Expression profile of stress proteins, intermediate filaments, and adhesion molecules in experimentally denervated and reinnervated rat facial muscle. *Exp Neurol* 1997;146:125-34.
152. Rubanyi GM, Ho EH, Cantor EH, Lumma WC, Bothelo LH. Cytoprotective function of nitric oxide: Inactivation of superoxide radicals produced by human leukocytes. *Biochem Biophys Res Comm* 1991;181:1392-7.
153. Stangel M, Zettl UK, Mix E i sur. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and nitric oxide-mediated oxidative stress induce apoptosis in rat skeletal muscle myoblasts. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996;55:36-43.
154. Nicotera P, Bonfoco E, Brüne B. Mechanisms for nitric oxide-induced cell death: Involvement of apoptosis. *Adv Neuroimmunol* 1995; 5:411-20.
155. Perreault M, Dombrowski L, Marette A. Mechanism of impaired nitric oxide synthase activity in skeletal muscle of streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia* 2000;43:27-37.
156. Fahim MA, el-Sabban F, Davidson N. Muscle contractility decrement and correlated morphology during the pathogenesis of streptozotocin-diabetic mice. *Anat Rec* 1998; 251: 240-4.
157. Stephenson GM, O'Callaghan A, Stephenson DG. Single-fiber study of contractile and biochemical properties of skeletal muscles in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 1994; 43: 622-8.
158. Paulus SF, Grossie J. Skeletal muscle in alloxan diabetes. A comparison of isometric contractions in fast and slow muscle. *Diabetes* 1983; 32: 1035-9.

159. Jerković R, Argentini C, Cerrano-Sanchez A, Cordonnier C, Schiaffino S. Early myosin switching induced by nerve activity in regenerating slow skeletal muscle. *Cell Struct Funct* 1997; 22:147-53.
160. Vitadello M, Schiaffino MT, Picard A, Scarpa M, Schiaffino S. Gene transfer in regenerating muscle. *Hum Gene Ther* 1994; 5:11-8.
161. Bobinac D, Malnar-Dragojević D, Bajek S, Šoić-Vranić T, Jerković R. Muscle fiber type composition and morphometric properties of denervated rat extensor digitorum longus muscle. *Croatian Medical Journal*. 2000; 41(3): 294-7.
162. Hussain SN, El-Dwairi Q, Abdul-Hussain MN, Sakkal D. Expression of nitric oxide synthase isoforms in normal ventilatory and limb muscles. *J Appl Physiol* 1997;83:348-53.
163. Kapur S, Bédard S, Marcotte B, Côté CH, Marette A. Expression of nitric oxide synthase in skeletal muscle. A novel role for nitric oxide as a modulator of insulin action. *Diabetes* 1997;46:1691-700.
164. Meszaros LG, Minarovic I, Zahradnikova A. Inhibition of the skeletal muscle ryanodine receptor calcium release channel by nitric oxide. *FEBS Lett* 1996;380:49-52.
165. Wolosker H, Panizzutti R, Engelender S. Inhibition of creatin kinase by S-nitrosoglutathione. *Febs Lett* 1996;392:274-6.
166. Tidball JG, Lavergne E, Lau KS, Spencer MJ, Stull JT, Wehling M. Mechanical loading regulates NOS expression and activity in developing and adult skeletal muscle. *Am J Physiol* 1998; 275:C260-66.
167. Schmalbruch H, Lewis DM. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and degenerated rat muscles. *Muscle Nerve* 2000;23:617-26.

168. Borisov AB, Huang SK, Carlson BM. Remodeling of vascular bed and progressive loss of capillaries in denervated skeletal muscle. *Anat Rec* 2000;258:292-304.
169. Gutmann E, Zelená J. Morphological changes in denervated muscle. U: Gutmann E (urednik). The denervated muscle. Prague: Publishing House of Czechoslovak Academy of Science, 1962; str. 341-371.
170. Borisov AB, Dedkov EI, Carlson BM. Interrelations of myogenic response, progressive atrophy of muscle fibers, and cell death in denervated skeletal muscle. *Anat Rec* 2001; 264:203-18.
171. Hoover F, Mathiesen J, Skålhegg BS, Lømo T, Taskén K. Differential expression and regulation of the PKA signalling pathway in fast and slow skeletal muscle. *Anat Embryol* 2001; 203:193-201.
172. Engel WK, Karpati G. Impaired skeletal muscle maturation following neonatal neurectomy. *Dev Biol* 1968; 17:713-723.
173. Lu DX, Huang SK, Carlson BM. Electron microscopic study of long-term denervated rat skeletal muscle. *Anat Rec* 1997;248:355-65.
174. Goldspink KF. The influence of passive stretch on the growth and protein turnover of the denervated extensor digitorum longus muscle. *Biochem J* 1978; 174:595-602.
175. Gutmann E, Melichna J, Syrový I. Contraction properties and ATPase activity in fast and slow muscle of the rat during denervation. *Exp Neurol* 1972; 36:488-497.
176. Mussini I, Favaro G, Carraro U. Maturation, dystrophic changes and the continuous production of fibers in skeletal muscle regenerating in the absence of nerve. *J Neuropathol Exp Neurol* 1987;46:315-31.

177. Schmalbruch H, Al-Amood WS, Lewis DM. Morphology of long-term denervated rat soleus muscle and the effect of chronic electrical stimulation. *J Physiol (Lond.)* 1991;233-41.
178. Dedkov EI, Kostrominova TY, Borisov AB, Carlson BM. Reparative myogenesis in long-term denervated skeletal muscles of adult rats results in a reduction of the satellite cell population. *Anat Rec* 2001;263:139-54.
179. Schmalbruch H, Lewis DM. A comparison of the morphology of denervated and aneurally regenerated soleus muscle of rat. *J Muscle Res Cell Motil* 1994;15:256-6.
180. Kerr JF. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol* 1971;105:13-20.
181. Sandri M, Carraro U. Apoptosis of skeletal muscles during development and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:1373-90.
182. Anderson JE. A role for nitric oxide in muscular repair: Nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cells. *Mol Biol Cell* 2000;11:1859-74.
183. Sealock R, Butler MH, Kramarcy NR i sur. Localization of dystrophin relative to acetylcholine receptor domains in electric tissue and adult and cultured skeletal muscle. *J Cell Biol* 1991;113:1133-44.
184. Close R. Properties of motor units in fast and slow skeletal muscles of the rat. *J Physiol* 1967;193:45-55.
185. Gundersen K. Determination of muscle contractile properties: the importance of the nerve. *Acta Physiol Scand* 1998;162:333-41.
186. Schantz P, Henriksson J. Increases in myofibrillar ATPase intermediate human skeletal muscle fibers in response to endurance training. *Muscle Nerve* 1983;6:553-6.

187. Kugelberg E. Adaptive transformation of rat soleus motor units during growth. *J Neurol Sci* 1976;27:269-89.
188. Westgaard RH, Lomo T. Control of contractile properties within adaptive ranges by patterns of impulse activity in the rat. *J Neurosci* 1988;8:4415-26.
189. Mira JC, Janmot C, Couteaux R, D'Albis A. Reinnervation of denervated extensor digitorum longus of the rat by the nerve of the soleus does not induce the type I myosin synthesis directly but through a sequential transition of type II myosin isoforms. *Neurosci Lett* 1992;141:223-6.
190. Gutmann E, Carlson BM. Contractile and histochemical properties of regenerating cross-transplanted fast and slow muscles in the rat. *Pflüg Arch* 1975;353:227-39.
191. Schiaffino S, Ausoni S, Gorza L, Saggin L, Gundersen K, Lomo T. Myosin heavy chain isoforms and velocity of shortening of type 2 skeletal muscle fibres. *Acta Physiol Scand* 1988;134:575-6.
192. Windisch A, Gundersen K, Szabolcs MJ, Gruber H, Lomo T. Fast to slow transformation of denervated and electrically stimulated rat muscle. *J Physiol (Lond)* 1998;510:623-32.
193. Tanabe Y, Esaki K, Nomura T. Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) mouse. *Acta Neuropathol* 1986;69:91-5.
194. Benoit PW, Belt WD. Destruction and regeneration of skeletal muscle after treatment with a local anesthetic, bupivacaine (Marcaine). *J Anat* 1970;107:547-56.
195. Minatel E, Santo Neto H, Marques MJ. Acetylcholine receptors and neuronal nitric oxide synthase distribution at the neuromuscular junction of regenerated muscle fibers. *Muscle Nerve* 2001;24:410-6.



196. Sesodia S, Choksi RM, Nemeth PM. Nerve-dependent recovery of metabolic pathways in regenerating soleus muscles. *J Muscle Res Cell Motil* 1994;15:573-81.
197. Whalen RG, Harris JB, Butler-Browne GS, Sesodia S. Expression of myosin isoforms during notexin-induced regeneration of rat soleus muscle. *Dev Biol* 1990;141:24-40.
198. Nonaka I, Takagi A, Ishiura S, Nakase H, Sugita H. Pathophysiology of muscle fiber necrosis induced by bupivacaine hydrochloride (Marcaine). *Acta Neuropathol* 1983;60:167-74.
199. Carraro U, Dalla Libera L, Catani L. Myosin light and heavy chain in muscle regenerating in absence of the nerve: transient appearance of the embryonic light chain. *Exp Neurol* 1983;79:106-17.
200. Midrio M, Danieli-Betto D, Esposito A i sur. Lack of type 1 and type 2A myosin heavy chain isoforms in rat slow muscle regenerating during chronic nerve block. *Muscle Nerve* 1998;21:226-32.
201. Roberts CK, Barnard RJ, Jasman A, Balon TW. Acute exercise increases nitric oxide synthase activity in skeletal muscle. *Am J Physiol* 1999; 277:E390-4.

## ŽIVOTOPIS

### DATUM I MJESTO ROĐENJA

10. srpnja 1967., Rijeka, Republika Hrvatska

### ADRESA

Ul. Janka Polić-Kamova 38, 51000 Rijeka

e-mail: tamaras@medri.hr

### ZAPOSLENJE

Zavod za anatomiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

### ŠKOLOVANJE

1982-1986. Centar za kadrove u obrazovanju i kulturi, Rijeka

1986-1992. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci (1994. položen stručni ispit)

1993-1995. Poslijediplomski studij iz »Kliničke patofiziologije« na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci

### AKADEMSKI STUPNJEVI

30. siječnja 1992. Doktor medicine, Medicinski fakultet u Rijeci

27. studenog 1996. Magistar biomedicinskih znanosti, Medicinski fakultet u Rijeci

### ZNANSTVENI STUPNJEVI

1993. znanstveni novak

1996. mlađi asistent

1998. asistent

### ČLANSTVO U STRUKOVNIM UDRUŽENJIMA

Hrvatski liječnički zbor

Hrvatsko društvo anatoma i histologa

## NASTAVNA DJELATNOST

1987-1991. Student-demonstrator, Zavod za histologiju i embriologiju, Medicinski fakultet u Rijeci

od 1992. vježbe i seminari, dodiplomski predmet »Anatomija«

od 1998. vježbe i seminari, dodiplomski predmet »Neuroanatomija«

## RADNO ISKUSTVO

1992. boravak na Odjelu za biomedicinska istraživanja, Biološkog instituta, Sveučilišta u Padovi

## PUBLIKACIJE

### 1. KVALIFIKACIJSKI RADOVI

1. Šoić-Vranić T. Utjecaj salbutamola na denervirane skeletne mišiće štakora. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, 1996. (Magistarski rad)

### 2. ZNANSTVENI RADOVI

#### a) izvorni znanstveni radovi

1. Bobinac D, Matešić D, Malnar-Dragojević D, Jerković R, Šoić T, Simonić A. Influence of repeated tonic-clonal convulsions on the deep dorsal muscle and diaphragm of the rat. *Periodicum Biologorum* 1994; 96:83-4.

2. Bobinac D, Malnar-Dragojević D, Bajek S, Šoić-Vranić T, Jerković R. Muscle fiber type composition and morphometric properties of denervated rat extensor digitorum longus muscle. *Croatian Medical Journal* 2000; 41(3): 294-7.

3. Bajek S, Bobinac D, Bajek G, Šoić-Vranić T, Lah B, Malnar-Dragojević D. Muscle fiber type distribution in multifidus muscle in cases of lumbar disc herniation. *Acta Medica Okayama* 2000; 54(6): 235-41.

4. Nikolić M, Malnar-Dragojević D, Bobinac D, Bajek S, Jerković R, Šoić-Vranić T. Age-related skeletal muscle atrophy in humans: An immunohistochemical and morphometric study. *Coll Antropol* 2001; 25(2): 545-53.

c) znanstvena kongresna saopćenja in extenso

1. Grubješić I, Malnar-Dragojević D, Šoić-Vranić T, Bobinac D. The effect of the electromagnetic field on the denervated soleus and tibialis anterior muscles of the rat. 8<sup>th</sup> International IMEKO Conference on Measurement in Clinical Medicine, Dubrovnik, Croatia, 1998.

d) ostala znanstvena kongresna saopćenja

1. Bobinac D, Matešić D, Malnar-Dragojević D, Jerković R, Šoić T, Simonić A. Influence of repeated tonic-clonal convulsions on the deep dorsal muscle and diaphragm of the rat. 16<sup>th</sup> Alps Adria Meeting of Anatomists, Zagreb, Croatia, 1993.

2. Malnar-Dragojević D, Bajek S, Šoić-Vranić T, Bobinac D, Jerković R. The muscle fiber type composition of rat denervated m. extensor digitorum longus. Second Croatian Neurosurgical Congress, Opatija, Croatia, 1999.

3. Šoić-Vranić T, Bobinac D, Malnar-Dragojević D, Bajek S, Jerković R, Nikolić M. Effect of salbutamol on denervated rat soleus muscle. 3<sup>rd</sup> Croatian Congress of Neurology, Rijeka, Croatia, 2001.

4. Nikolić M, Malnar-Dragojević D, Bobinac D, Bajek S, Jerković R, Šoić-Vranić T. Age-related muscle atrophy does not affect equally all human skeletal muscles: an immunohistochemical and morphometric study. 3<sup>rd</sup> Croatian Congress of Neurology, Rijeka, Croatia, 2001.

5. Malnar-Dragojević D, Šoić-Vranić T, Bobinac D, Bajek S, Jerković R, Nikolić M. Effect of electromagnetic field on skeletal muscle fiber of the rat. 3<sup>rd</sup> Croatian Congress of Neurology, Rijeka, Croatia, 2001.

6. Bobinac D, Malnar-Dragojević D, Bajek S, Šoić-Vranić T, Jerković R, Nikolić M. Muscle fiber type composition of denervated fast skeletal muscle of the rat. 3<sup>rd</sup> Croatian Congress of Neurology, Rijeka, Croatia, 2001.