

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

Jakov Meštrović

**AKUTNI UČINCI NIFEDIPINA NA TORZIJSKO
DETORZIJSKU OZLJEDU TESTISA ŠTAKORA**

Doktorska disertacija

Split, 2015.

Rad je izrađen u Zavodu za dječju kirurgiju KBC Split, Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu, Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC Split i Zavodu za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku KBC Split.

Mentor: Doc. dr. sc. Zenon Pogorelić

Posebno zahvaljujem:

- mentoru doc. dr. sc. Zenonu Pogoreliću na stručnoj potpori i savjetima kojima su mi omogućili da provedem istraživanja i napišem rad.

Zahvaljujem:

- svojim kolegama a posebice dr. sc. Davoru Todoriću sa Zavoda za dječju kirurgiju KBC Split na podršci i nesebičnoj pomoći.

- prof. dr. sc. Ireni Drmić Hofman i prof. dr. sc. Katarini Vilović, kolegicama i kolegama u Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC Split na nesebičnoj pomoći, bez kojih ovaj rad ne bi bilo moguće napraviti.

- Danijeli Šupe dipl.ing.med. biokemije.

- prof. dr. sc. Mladenu Boban i kolegicama na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu, koji su mi nesebično ustupili svoj laboratorij za izvođenje istraživanja.

- dipl. ing. Vesni Čapkun koja mi je svojim nesebičnim savjetima i velikom strpljenju pomogla u statističkoj obradi podataka.

Zahvaljujem mojoj obitelji, Zdenki, Ani, Sari i Zori što su mi omogućili radnu atmosferu u vlastitom domu kao i na poticaju u izradi ovog rada.

Hvala svima koji su mi pomogli savjetom i podrškom.

SADRŽAJ

1	UVOD	8
1.1	TORZIJA TESTISA	8
1.2	ISHEMIJSKO REPERFUZIJSKA OZLJEDA	10
1.2.1	ISHEMIJSKO REPERFUZIJSKA OZLJEDA TESTISA	11
1.3	UTJECAJ TORZIJE TESTISA NA SUPROTNi TESTIS.....	11
1.4	ULOGA SLOBODNIH RADIKALA KISIKA U ISHEMIJSKO REPERFUZIJSKOJ OZLJEDI.....	13
1.5	ULOGA KALCIJA U ISHEMIJSKO REPERFUZIJSKOJ OZLJEDI.....	14
1.6	REAKTIVNI OBLICI KISIKA I OKSIDACIJSKI STRES	16
1.6.1	SLOBODNI KISIKOVI RADIKALI.....	16
1.6.2	OKSIDACIJSKI STRES	19
1.6.3	LIPIDNA PEROKSIDACIJA	20
1.6.4	ZAŠTITA OD OKSIDACIJSKOG STRESA	21
1.7	APOPTOZA	24
1.7.1	APOPTOZA I SPERMATOGENEZA	27
1.8	NIFEDIPIN-BLOKATOR KALCIJEVIH KANALA	29
2	POSTAVKE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	32
3	MATERIJAL I METODE.....	33
3.1	POKUSNE ŽIVOTINJE.....	33
3.2	HISTOLOŠKA ANALIZA	35
3.3	BIOKEMIJSKA ANALIZA.....	36
3.3.1	Postupak pripreme i homogenizacija uzorka tkiva testisa.....	36
3.3.2	Određivanje malondialdehida pomoću reakcije s tiobarbiturnom kiselinom....	37
3.3.3	Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze.....	37
3.3.4	Određivanje aktivnosti glutation peroksidaze	37

3.4	STATISTIČKA ANALIZA.....	38
4	REZULTATI.....	39
5	RASPRAVA.....	48
6	ZAKLJUČAK	52
7	SAŽETAK.....	53
8	SUMMARY	54
9	LITERATURA.....	55
10	ŽIVOTOPIS	68

POPIS OZNAKA I KRATICA

ABP - androgen nosivi protein (engl: *androgen-binding protein*)

Ad - odrasle tamne (engl: *adult dark*) spermatogonije

ADP - adenzin difosfat

AIF – čimbenik izazivanja apoptoze (engl. *apoptosis-inducing factor*)

AOS - Sustav zaštite od oksidacijskog oštećenja (eng. *antioxidant defence system*)

AP-1 - aktivator protein-1

AP1 - apoptotski index 1

AP2 - apoptotski index 2

ATP - adenzin trifosfat

Bcl-2 – 2 skupina proteina B-staničnih limfoma (engl: *B-cell lymphoma*)

Ca⁺⁺ - ioni kalcija

CAD - kapsazom aktivirana endonukleaza (engl. *caspase activated DNase*)

CAT - katalaza

Cu⁺ - ioni jednovalentnog bakra

DAG - diacil glicerol

DNK - deoksiribonukleinska kiselina

ER - endoplazmatski retikulum

Fe²⁺ - ioni dvovalentnog željeza

Fe³⁺ - ioni trovalentnog željeza

FSH - folikulo-stimulirajući hormon

GPx - glutation peroksidaza

GR - glutation reduktaza

GSH - reducirani glutation

GSSG - oksidirani glutation

GST - glutation-S-transferaza

H₂O - voda

H₂O₂ - vodikov peroksid

HE – hematoksilin eozin

HNE - 4-hidroksi-2-noneal

HO₂⁻ - perhidroksilni anion

HOCl - hipoklorna kiselina
I/R - ishemijsko reperfuzijska
IL-1 - Interleukin-1
IP₃ - inositol 1,4,5-trisfosfat
K⁺ - ioni kalija
L· - lipidni radikal
LH - luteotropni hormon
LIF - leukemija inhibirajući faktor
LO· - lipidni alkoksil radikal
LOO· - lipidni peroksil radikal
LOOH - lipidni hidroperoksid
MDA - malondialdehid
Na⁺ - ioni natrija
NAD - nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH - nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat
NF-κB - nuklearni čimbenik kappa B
NO - dušikov oksid
O₂ - molekularni kisik
O₂⁻ - superoksidni anion
OH· - hidroksilni radikal
OS - oksidacijski stres
P - p vrijednost značajnosti
PIP2 - fosfolipid fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat
PLC – fosfolipaza C
PUFA - višestruko nezasićene masne kiseline (engl. polyunsaturated fatty acid)
RNK – ribonukleinska kiselina
RNS - reaktivni dušikovi spojevi
ROH - alkoholi
ROOH - organskih hidroperoksida
ROS - reaktivni oblici kisika
SCF - poticatelj rasta matičnih prastanica (engl. stem cell factor)
SD - standardna devijacija
SOD - superoksid dizmutaza
SRK - slobodni radikali kisika

T/D - torzijsko detorzijska

TBA - tiobarbiturna kiselina

TNF - čimbenik tumorske nekroze

TRAIL - TNF-u slični liganidi pokretači apoptoze (engl. TNF-related apoptosis inducing ligand)

UV-VIS - ultraljubičato vidljivi spektrofotometar

XO - ksantin dehidrogenaza

XO - ksantin oksigenaza

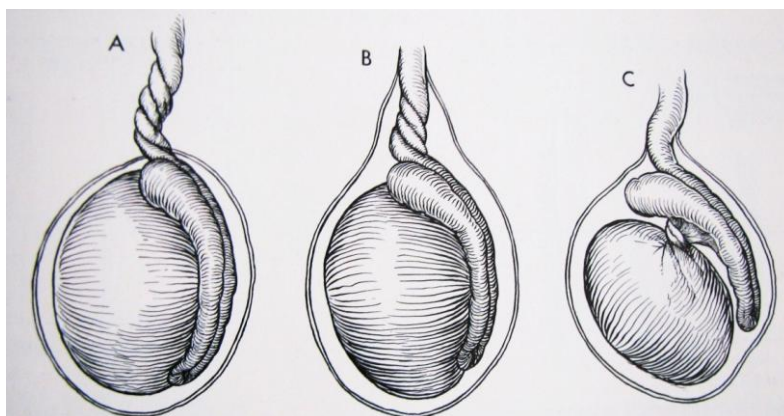
1 UVOD

1.1 TORZIJA TESTISA

Torzija testisa je rotacija testisa oko uzdužne osovine za 180 ili više stupnjeva nakon čega uslijedi prekid cirkulacije u testisu, infarkt i konačno atrofija organa.

Nastaje zbog mehaničkog zbivanja na peteljci (funikulusu) na kojoj testis visi. Izraz torzija testisa nije prikladan jer se testis ne uvrće, već se uvrće skup elemenata koji cirkulacijski opskrbljuju testis, sjemenovod i živčana vlakna koja mu pristupaju prateći krvne i limfne žile. Nakon torzije onemogućen je krvni protok kroz izuzetno osjetljivo tkivo testisa, što u konačnici rezultira njegovim propadanjem.

Torzija testisa predstavlja hitno stanje koje mora biti prepoznato, diferencirano od sličnih uzroka boli u testisu i adekvatno liječeno. Zakašnjela dijagnostika ovog stanja neminovno dovodi do gubitka testisa (1-4). U literaturi se navodi da je vitalnost testisa očuvana u preko 85% slučajeva, ukoliko se učini detorzija u prvih šest sati od početka torzije (4). Nakon 12 sati je svega 20-40% vitalnih testisa, a nakon 24 sata od početka torzije manje od 10% testisa može biti spašeno (4, 5).



Slika 1. A, ekstravaginalna torzija testisa iznad hvatišta tunike vaginalis. B, intravaginalna, torzija testisa ispod hvatišta tunike vaginalis. C, intravaginalna torzija testisa između epididimisa i testisa

Preuzeto iz „*Pediatric surgery*“, M Rawich, J Welch et al, 3-rd edition

Prvenstveno se javlja u neonatalnoj i adolescentnoj dobi i glavni je uzrok gubitka testisa u tom uzrastu. Torzija testisa može biti intravaginalna ili ekstravaginalna (Slika 1). Kod prve se testis s epididimisom torkvira unutar svojih ovojnica, a može se torkvirati i sam testis bez epididimisa. Kod druge, zajedno se rotiraju oko vertikalne osi u području funikulusa testis i epididimisa. Intravaginalna torzija se češće javlja u pubertetu i nakon puberteta dok je ekstravaginalna torzija češća u neonatalnoj dobi (4-8).



Slika 2. Torkviran i gangrenozno promijenjen testis

Preživljavanje testisa u slučaju torzije je izravno povezano sa stupnjem torzije (180 do 1080 stupnjeva) kao i vremenom od kada je nastala.

U slučaju dokazane torzije (Slika 2) terapija je kirurška. Potrebno je učiniti detorziju testisa, procijeniti njegovu vitalnost i fiksirati ga za ovojnice testisa ukoliko je vitalan. Ako je došlo do gangrene testisa, učini se orhidektomija te fiksacija drugog testisa (1, 4, 5, 9).

1.2 ISHEMIJSKO REPERFUZIJSKA OZLJEDA

Torzijsko-detorzijska (T/D) ozljeda testisa je u osnovi ishemijsko reperfuzijska (I/R) ozljeda. I/R ozljeda označava pogoršanje tkivnog oštećenja tijekom reperfuzije organa ili tkiva koje je prethodno bilo izloženo određenom razdoblju ishemije (prestanku krvnog optjecaja) (10).

Uspostavom protoka i oksigenacije u stanicama, istodobno s ispravkom energijskih i strukturnih poremećaja, pokreću se štetni procesi. Pritom dolazi do dodatnog oštećenja stanica koje su u razdoblju ishemije bile samo reverzibilno oštećene (11-13).

Manjak kisika u tkivima (hipoksija) koči tijekom oksidativne fosforilacije u mitohondrijima (nastaje manjak akceptora elektrona), a time se razvija manjak adenozin trifosfata (ATP), ključnog izvora energije za sve stanične funkcije. Zbog smanjenja oksidativne fosforilacije smanjuje se omjer koncentracije ATP/ADP, što potiče glukolizu. Manjak proizvodnje energije koči i procese transkripcije u jezgri (koči sintezu RNK). Usporava se i sinteza bjelančevina za koju je također potrebna energija (14).

Stanica može preživjeti razdoblje ishemije, popraviti se ili može umrijeti nekoliko sati ili dana kasnije. Ishemija pokreće kompleksnu metaboličku kaskadu oštećujući mnoge fiziološke stanične funkcije. I/R ozljeda pokreće niz događaja, među kojima je prekomjerno stvaranje slobodnih radikala kisika (SRK), povećanje koncentracije leukocita u oštećenom području, pomanjkanje ATP-a, povećanje koncentracije intracelularnog kalcija, aktivacije komplementa, povećane koncentracije dušičnog oksida (NO) i citokina (15).

Produljena ishemija dovest će u pravilu do krajnje hipoenergoze i smrti stanica procesom nekroze, dok u slučaju I/R ozljede smrt stanice može nastati i procesom apoptoze. Nekroza je pasivan i nepovratan događaj povezan s rupturom stanične membrane, što vodi do otpuštanja staničnog sadržaja i pokretanja upalne reakcije (16).

Za razliku od nekrotične smrti programirana stanična smrt je ovisna o sintezi proteina koji započinju program staničnog »samoubojstva« kao odgovor na različite podražaje. Apoptotski procesi troše ATP, stoga će raspoloživost energije utjecati na sudbinu stanice i vrstu njezina eventualnog propadanja (17).

Padom stanične energije, kalcijaska crpka ovisna o ATP-u ne može ispumpati sav kalcij iz stanice. Rezultat je znatan porast intracelularne koncentracije kalcija koji sam ili u kombinaciji s vezujućim proteinima aktivira razne proteaze, lipaze i endonukleaze koje doprinose oštećenju stanice. Proteaze započinju razgradnju citoskeleta, a endonukleaze

cijepanje DNK. Intracelularno nakupljanje kalcija, posebice povećana koncentracija u mitohondrijima doprinosi apoptozi odnosno smrti stanice (18-20).

1.2.1 ISHEMIJSKO REPERFUZIJSKA OZLJEDA TESTISA

Trajanje testikularne torzije kao i stupanj torzije dva su glavna čimbenika koji određuju oštećenje testisa. Produljena ishemija odnosno torzija testisa dovodi do stvaranja oksidacijskog stresa i u konačnici do apoptoze ili nekroze zametnih stanica. Patofiziologija I/R ozljede testisa je složena i karakterizirana nizom promjena koje uključuju aktivaciju citokina i komplementa, agregaciju leukocita, povećanu akumulaciju SRK, akumulaciju kalcija u stanicama i povećanu propusnost mikrocirkulacije.

Događa se niz uzročno posljedičnih morfološko-biokemijskih promjena koji u konačnici dovode do većeg ili manjeg oštećenja testisa zavisno o trajanju.

Promjene histološke građe testisa je zavise o dužini trajanja i stupnju torzije u rasponu od intersticijalnog edema i manje ekstravazacije eritrocita uz očuvanost stanica sjemenog epitela pa sve do masovne hemoragije i nekroze i konačno do atrofije testisa (21). Uz oštećenje ipsilateralnog testisa I/R ozljeda dovodi i do oštećenja suprotnog testisa. Nekoliko teorija poput imunološkog mehanizma, refleksne vasokonstrikcije te smanjenog protoka kroz suprotni testis pokušavaju objasniti utjecaj na suprotni testis (22, 23).

1.3 UTJECAJ TORZIJE TESTISA NA SUPROTNI TESTIS

Većina istraživanja koja su se bavila promjenama uzrokovanim torzijom jednog testisa potvrdila su postojanje oštećenja suprotnog testisa (24-27), premda postoje i istraživanja koja to nisu potvrdila (28, 29). U prilog utjecaja torzije na suprotni testis govori podatak da je nakon torzije jednog testisa spermatogram abnormalan u 70% bolesnika (30).

Unatoč kontroverzama, postoji nekoliko teorija o mehanizmu oštećenja suprotnog, zdravog testisa, a to su: imunološki mehanizam, refleksna vazokonstrikcija i smanjeni protok krvi kroz suprotni testis, prethodne atake kratkotrajnih i asimptomatskih torzija testisa i kongenitalna displazija testisa (23).

Imunološka teorija kaže da oštećenje suprotnog testisa nastaje djelovanjem imunološkog mehanizma što je potkrijepljeno opažanjima da oštećenje testisa nastaje u životinja podvrgnutih torziji testisa (25, 31). Ovo se stajalište temelji na spoznaji da imunoregulacija testisa počiva na održavanju ravnoteže između imunološke privilegiranosti i upale, a regulirana je dvojnog ulogom stanica imunološkog sustava i citokina koji mogu djelovati imunosupresijski ili proupalno. U fiziološkim uvjetima, antigen specifični autoimuni odgovor se sprečava sistemskim i lokalnim mehanizmima tolerancije što omogućuje preživljavanje zametnih stanica koje za vrijeme spermatogeneze ističu autoantigene. U uvjetima upale, traume ili torzije jednog testisa, zrele dendritične stanice i makrofagi luče velike količine proupalnih citokina koji otpušteni u cirkulaciju narušavaju nepropusnost krvno-testikularne barijere i uzrokuju apoptozu zametnih stanica (22, 30). Antigeni spermija koji se za vrijeme apoptoze otpuštaju sa zametnih stanica pojačavaju autoimuni odgovor, a pojava protutijela govori u prilog pojačanog imunog odgovora (22). Ove promjene uzrokuju propadanje zametnih stanica i neplodnost. U suprotnosti s podacima o apoptozi stanica, endokrini mehanizam testisa je puno otporniji na ishemiju (32).

U eksperimentalnim uvjetima dokazano je da davanje imunosupresivnih lijekova (ciklosporin, azatioprin, hidrokortizon) te antilimfocitnog globulina ublažuju oštećenje suprotnog testisa. (33, 34).

Mehanizam refleksne vazokonstrikcije i smanjenog protoka krvi kroz suprotni testis temelji se na činjenici da su testisi sisavaca vrlo osjetljivi na oštećenje slobodnim radikalima kisika (35). Ključni čimbenici za razvoj štetnih posljedica na torkviranom testisu su vrijeme trajanja ishemije i reperfuzije (36, 37). Ishemija testisa potiče smrt zametnih stanica uglavnom smanjenjem opskrbe kisikom ispod metaboličkih potreba tkiva testisa, smanjenjem stanične energije i nakupljanjem toksičnih metabolita, a broj oštećenih zametnih stanica pokazuje povezanost s trajanjem ishemije (38). Reperfuzija dodatno povećava ishemijom potaknuto oštećenje zametnih stanica nastankom slobodnih radikala kisika i spojeva dušika (35). Oštećenje suprotnog testisa nakon jednostrane torzije testisa, objašnjava se refleksnom vazokonstrikcijom i smanjenjem protoka krvi u suprotnom testisu (35). Pojedini autori su dokazali pojačan protok krvi kroz suprotni testis tijekom torzije ipsilateralnog testisa čime opovrgavaju ovu teoriju (39, 40).

1.4 ULOGA SLOBODNIH RADIKALA KISIKA U ISHEMIJSKO REPERFUZIJSKOJ OZLJEDI

Aerobni organizmi koriste kisik kao krajnji akceptor elektrona. U fiziološkim uvjetima glavina kisika u mitohondrijima potpuno se reducira do vode. U manjoj mjeri (2–4% od sveukupno reduciranih molekula tijekom oksidativne fosforilacije) nastaje nepotpuna redukcija kisika do superoksidnog aniona ($O_2^{\cdot-}$). Iz superoksidnog aniona nastaju drugi SRK i reaktivni oblici kisika (ROS) (engl. reactive oxygen species). U aerobnim uvjetima SRK i ROS, koji se stvaraju u relativnom maloj količini, budu razgrađeni enzimima kao što su superoksid dizmutaza (SOD), glutation peroksidaza (GPx) i katalaza (CAT).

Njihovo neprekidno stvaranje i fiziološko uklanjanje unutar stanice omogućuje održavanje optimalnih oksidacijsko-redukcijskih uvjeta u organizmu. Kada antioksidacijski mehanizmi nisu dostatni za odstranjenje odnosno neutraliziranje ROS-a, odnosno kada se poremeti ravoteža između ROS-a i antioksidansa nastaje oksidacijski stres.

U uvjetima hipoksije (s posljedičnom permeabilitetnom tranzicijom mitohondrija) znatno se povećava nepotpuna redukcija kisika i nastajanje superoksidnog aniona ($O_2^{\cdot-}$) u mitohondrijima (41). Ne samo ishemija nego i reperfuzija doprinosi daljnjem oštećenju tkiva. Naime, tijekom reperfuzije dolazi do povećanje ponude kisika ishemičnom tkivu koji sada postaje dodatni izvor slobodnih radikala kisika. U složenom procesu tijekom I/R ozljede SRK aktivirajući fosfolipazu A_2 stimuliraju aktivaciju i kemotaksiju leukocita koji su također značajan izvor SRK-a (42).

Osim mnogih fizioloških uloga SRK-a koje imaju u organizmu (43), u stanjima oksidacijskog stresa dolazi do izražaja njihov štetni utjecaj. Ciljna mjesta SRK-a su stanična membrana, proteini i deoksiribonukleinska kiselina (DNK). Oksidirajući proteine i oštećujući staničnu membranu lipidnom peroksidacijom dovode do promjena u fluidnosti membrane, promjena u aktivnosti enzima, staničnih receptora i transportnih proteina. ROS također oštećuju DNK što ima za posljedicu poremećaje u replikaciji i transkripciji. Mijenjajući njihovu strukturu i funkciju, dovode do oštećenja i konačno smrti stanice (44).

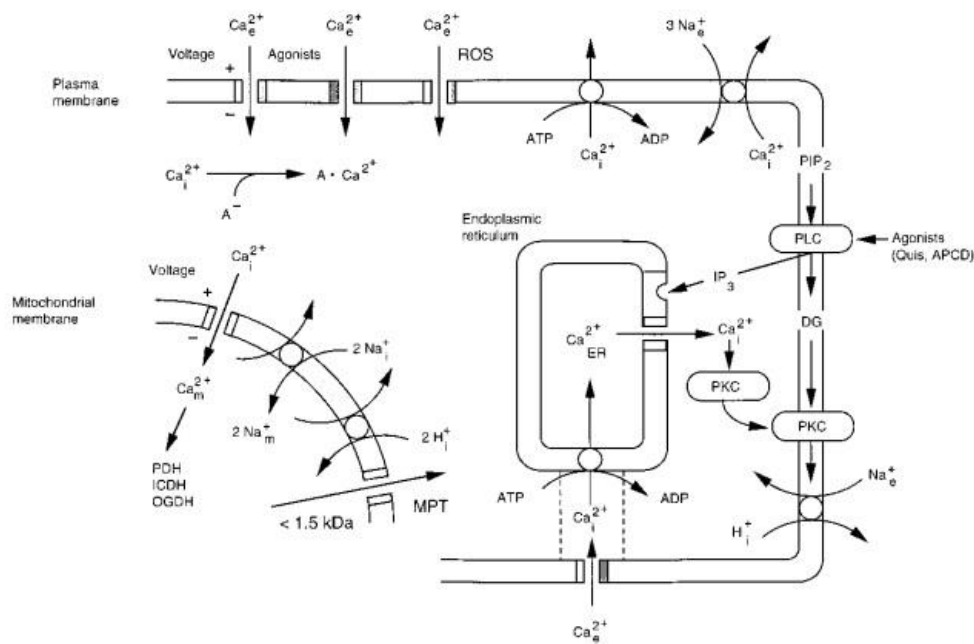
1.5 ULOGA KALCIJA U ISHEMIJSKO REPERFUZIJSKOJ OZLJEDI

Koncentracija iona kalcija (Ca^{++}) je 10 000 puta veća u izvanstaničnom prostoru nego u stanici. Kako je stanična membrana iznutra elektronegativna u odnosu na vanjsku površinu to su dva razloga zašto kalcij ima tendenciju ulaska u stanicu. Zahvaljujući $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ crpki koja pumpa Ca^{++} iz stanice u zamjenu za ione natrija (Na^+) i $\text{Ca}^{++}/\text{ATP}$ crpki održava se homeostaza kalcija u stanici.

Tijekom patoloških procesa u stanici dolazi i do poremećaja u regulaciji kalcija. Hoće li doći do reverzibilnih promjena, apoptoze ili nekroze stanica odnosno tkiva, zavisi kako o jačini tako i trajanju oštećenja odnosno ishemije. Bez obzira na konačni ishod, pokretači stanične smrti imaju zajedničke puteve.

Prekomjerno nakupljanje Ca^{++} u stanici jedan je od prvih pokazatelja I/R ozljede (45, 46) Nakupljanje kalcija nastaje zbog poremećaja u propusnosti stanične mabrane kao i zbog poremećaja u radu $\text{Ca}^{++}/\text{ATP}$ crpke koja izbacuje kalcij u zamjenu za natrij iz stanice. Zbog manjka energije (hipoenergoze) stradaju stanični transportni procesi, ponajprije oni koji održavaju razliku u koncentraciji tvari izvan i unutar stanice. Zbog slabljenja pogona Na^+/K^+ crpke zadržava se Na^+ u stanici. Posljedično se zadržavaju i Ca^{++} i voda, što pridonosi unutarstaničnom edemu. Rezultat je znatan porast intracelularne koncentracije kalcija koji vezujući se za Ca^{++} ovisne proteine, kao kalmodulin i kalpain, aktivira barem četiri vrste enzima: fosfolipaze (razlažu lipidnu celularnu membranu, oslobađaju arahidonsku kiselinu koja stvara prostaglandine i slobodne radikale); protein-kinazu koja aktivira enzime nasumičnim slijedom uključujući sintezu dušičnog oksida (NO), ksantin oksidazu koja također proizvodi slobodne radikale.

Fosfolipaza C (PLC) razgrađuje fosfolipid fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat (PIP₂) u diacil glicerol (DAG) i inositol 1,4,5-trisfosfat (IP₃). DAG ostaje vezan za staničnu membranu a IP₃ se otpušta u citosol. Difundirajući kroz citosol veže se za IP₃ receptore, zapravo kalcijeve kanale u endoplazmatskom retikulumu (ER). To dovodi do povećanog nakupljanja kalcija u citosolu što pokreće kaskadu unutarstaničnih promjena i aktivnosti. Kalcij zajedno s DAG-om aktiviraju protein kinaze koje foforiliraju druge molekule dovodeći do daljnjih promjena u funkciji stanice (Slika 3). Proteaze započinju razgradnju citoskeleta, a endonukleaze cijepanje DNK (18-20, 47).



Slika 3. Regulacija kalcija u stanici

Preuzeto iz Kristian T, Siesjo BK. Calcium in ischemic cell death. Stroke. 1998;29(3):705-18.

Porast unutarstanične koncentracije kalcija i manjak energije u stanici ključni su čimbenici mitohondrijske permeabilitetne tranzicije – poremećaja funkcije mitohondrija zbog stvaranja pora na mitohondrijskoj membrani (48, 49). Zbog povećane propusnosti mitohondrijske membrane iz mitohondrija izlaze Ca⁺⁺ i bjelančevine (od kojih citokrom c djeluje proapoptogeno), a u mitohondrij ulazi voda. Izlazak Ca⁺⁺ iz mitohondrija dodatno povećava citosolsku koncentraciju Ca⁺⁺. Produženo postojanje pora dovodi do nepovratnog oštećenja mitohondrija i stanice. Prevencija prekomjernog nakupljanja Ca⁺⁺ u mitohondrijima ima zaštitnu ulogu u nastajanju I/R ozljede (12, 13).

Kalcij sam ili u kombinaciji sa kalmodulinom aktivira enzim ksantin dehidrogenazu (XD) i prevodi ga i xantin oksigenazu (XO). U purinskome metaboličkom putu ksantin oksidaza katalizira oksidaciju hipoksantina i ksantina do mokraćne kiseline. U fiziološkim uvjetima u stanici prevladava oblik XD (90%) koji tijekom oksidacije ksantina prenosi elektrone na vodik i na nikotinamid adenin dinukleotid (NAD). No, u hipoksičnim uvjetima nastaje ksantin oksidaza, koja za razliku od dehidrogenaze prenosi elektrone na molekularni kisik. Tijekom

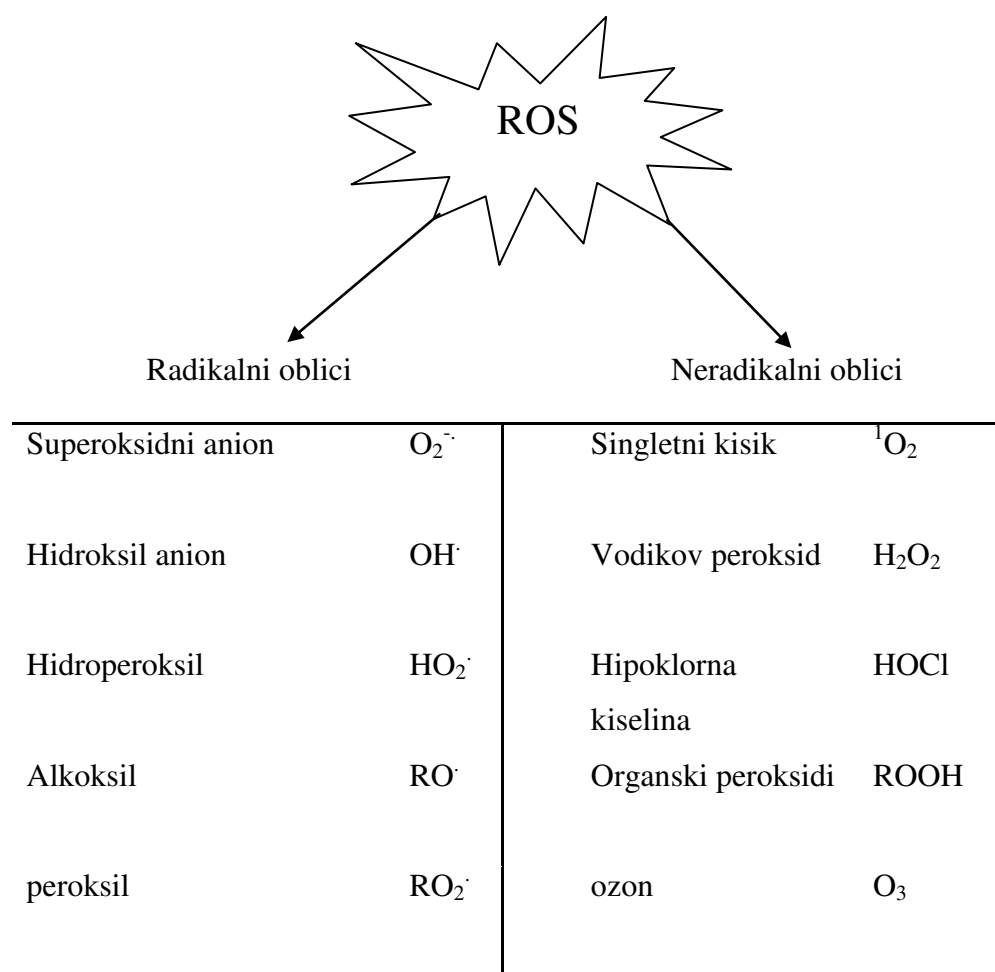
reperfuzije kisik postaje dostupan tkivu u kojem su se izmijenili metabolički uvjeti. Nastala XO prenosi elektrone na molekularni kisik (O_2) pri čemu nastaje slobodni radikal kisika superoksidni anion (O_2^-). Superoksidni anion u prisutnosti slobodnog željeza prelazi u vodikov peroksid (H_2O_2) iz kojeg nadalje nastaje slobodni hidroksilni radikal ($OH\cdot$) – jedan od najreaktivnijih i najtoksičnijih produkata molekularnog kisika (11, 48, 50).

Kalpain, protein koji svoju funkciju zahvaljuje vezanjem za Ca^{++} , igra značajnu ulogu u TNF induciranoj apoptozi (vanjski put). Davanjem estera koji inhibira kalpain u znatnoj mjeri smanjuje apoptozu i nekrozu nakon u I/R ozljedei jetre (51). Poznato je da kaspaze inaktiviraju inhibitore kalapina te tako doprinose njegovoj aktivaciji (52). Budući da je kalpain nađen u jezgri stanica koje podliježu apoptozi, kod ishemije mozga smatra se odgovornim za oštećenje DNK (53).

1.6 REAKTIVNI OBLICI KISIKA I OKSIDACIJSKI STRES

1.6.1 SLOBODNI KSIKOVİ RADIKALI

Slobodni radikali su molekule ili atomi koji u vanjskoj ljusci imaju jedan ili više nesparenih elektrona. Njihovi nespareni elektroni uzrokuju njihovo davanje ili uzimanje elektrona drugim molekulama te ih to čini izrazito nestabilnim i visoko reaktivnim, pri čemu reagiraju s organskim ili neorganskim spojevima (50). Tom prilikom nastaju ROS u koje se ubrajaju slobodni kisikovi radikali i neradikalni oblici koji funkcioniraju kao oksidirajući agensi i/ili se lako pretvaraju u slobodne radikale (Slika 4). Nespareni elektroni u vanjskoj orbitali odgovorni su za reaktivnost svih radikalnih oblika kisika (54). Svi aerobni organizmi koriste kisik kao krajni akceptor elektrona tijekom procesa koji se odvijaju u respiratornom lancu mitohondrija, pri čemu nastaje adenzin trifosfat (ATP), spoj bogat energijom koja je neophodna za odvijanje svih životnih funkcija (55).



Slika 4. Primjeri ROS (Halliwell i Gutteridge,1999)

Tijekom procesa respiracije O_2 se kompletno reducira do vode dodavanjem četiri elektrona što se odvija postupno uz formiranje djelomično reduciranih međuspojeva. Više od 95% O_2 unijetog u stanicu prolazi kroz kompletnu redukciju do vode, dok se zbog parcijalne redukcije oko 1-5% O_2 transformira u ROS (56).

Jednoelektronskom redukcijom O_2 nastaje superoksidni anion radikal ($O_2^{\cdot-}$), dvoelektronskom vodikov peroksid (H_2O_2), a troelektronskom hidroksilni radikal (OH^{\cdot}) (55, 56). Topljivost ($O_2^{\cdot-}$) u mastima je ograničena te ne može prodrijeti duboko u stanicu. Djelovanje mu je ograničeno na mjestu njegovog stvaranja. U kiseljoj sredini on veže proton i nastaje još reaktivniji perhidroksilni radikal (HO_2^{\cdot}). Superoksidni anion se spontano, ali i uz pomoć superoksid dismutaze (SOD) te vodikovih iona, prevodi u vodikov peroksid. Iako vodikov peroksid nije radikal jer nema nesparenih elektrona, on je oksidans koji uz prisustvo

prijelaznih metala, dvovalentnog iona željeza (Fe^{2+}) i jednovalentnog iona bakra (Cu^+), može prihvatiti jedan elektron stvarajući vrlo toksičan hidroksilni radikal (OH^\cdot). Hidroksilni radikal je izrazito reaktivan radikal koji reagira sa svim vrstama biomolekula (54, 57).

Vodikov peroksid je topljiv u mastima pa može djelovati na udaljenim mjestima od njegova stvaranja. Pod utjecajem henskog enzima, mijeloperoksidaze, može stvoriti druge radikale poput hipoklorne kiseline (HOCl) koja je 100-1000 puta toksičnija od O_2^\cdot i H_2O_2 (58). Hipoklorna kiselina nastaje u neutrofilima, snažan je oksidans i antimikrobni agens (59).

ROS konstantno nastaju tijekom aerobnog metabolizma stanice kao dio normalnih metaboličkih procesa. Slobodni radikali nastaju uslijed apsorpcije energije zračenja, u redukcijsko-oksidacijskim reakcijama tijekom patoloških i normalnih fizioloških procesa poput oksidativne fosforilacije u mitohondrijima (60), prijenosu elektrona u sustavu citokroma P-450 u endoplazmatskom retikulumu (61), oksidacije masnih kiselina u peroksisomima (62), metabolizma arahidonske kiseline u staničnim membranama (63) i fagocitoze (64). ROS mogu nastati i pod djelovanjem različitih egzogenih čimbenika, kao što su virusi, bakterije, hormoni, zračenje, teški metali i temperaturni šok (50).

Pri niskim i umjerenim koncentracijama, ROS imaju mnogobrojne uloge u stanici, kao što su obrana od infektivnih agenasa i uloga u funkcioniranju regulacijskih mehanizama i intrastaničnih signalnih puteva. ROS imaju bitnu ulogu u sazrijevanju spermatozoida i aktivaciji njihove pokretljivosti. Tijekom fertilizacije ROS utječu na interakciju spermatozoida i jajne stanice, što omogućava fuziju gameta. Tijekom razvoja embrija i fetusa ROS utječu na ključne transkripcijske faktore koji mijenjaju gensku ekspresiju tijekom embriogeneze (65).

Formiranje ROS u inflamatornim procesima dovodi do uništavanja invazivnih patogena. Povećana produkcija ROS u fagocitima predstavlja obranu od mikroorganizama. Reaktivni spojevi kisika, koji nastaju kao produkti aerobnog metabolizma u ljudskim stanicama, mogu aktivirati apoptozu djelujući na promjenu permeabiliteta membrane mitohondrija i otpuštanje citokroma c (60).

ROS imaju važnu ulogu u staničnoj signalizaciji. Signalna transdukcija je proces koji omogućava prijenos informacije iz staničnog okruženja do različitih funkcionalnih elemenata u stanici. Okidači signalne transdukcije su ekstracelularni signali (hormoni, citokini i neurotransmiteri), koji dovode do aktivacije različitih protein-kinaza i odgovarajućih transkripcijskih faktora ($\text{NF-}\kappa\text{B}$, AP-1) čija regulacija je redoks zavisna. Transkripcijski faktori induciraju ekspresiju određenih gena, koji imaju ulogu u aktivaciji imunološkog sustava, proliferaciji, diferencijaciji, reparaciji, apoptozi, kao i u antioksidacijskoj zaštiti.

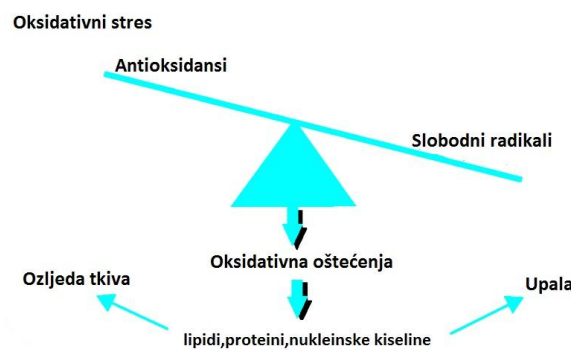
Signalni put u stanici često uključuje ROS kao signalne molekule intrastanične transdukcijske kaskade, tako da oni imaju važnu fiziološku ulogu kao sekundarni glasnici u stanici (57).

1.6.2 OKSIDACIJSKI STRES

Oksidacijski stres (OS) je stanje u kojem oksidacijski procesi prevladaju antioksidativne sposobnosti stanica tkiva ili organizama. U uvjetima ravnoteže slobodni radikali razgrađeni su staničnim antioksidansima, uz pomoć enzima kao što su SOD, CAT i GPx ili neenzimatski uz pomoć glutationa.

Do pomaka ravnoteže može doći ukoliko je smanjena antioksidativna sposobnost organizma ili je povećano stvaranje radikala (Slika 5). Ciljna mjesta djelovanja slobodnih radikala su stanični proteini, DNK i stanična membrana (19).

Polinezasićene masne kiseline fosfolipidnog dvosloja staničnih membrana predstavljaju glavne ciljne molekule za ROS.



Slika 5. Neravnoteža između slobodnih radikala i antioksidansa dovodi do oksidacijskog stresa

Najreaktivniji slobodni radikal kisika $\text{OH}\cdot$ započinje proces lipidne peroksidacije koji se zatim nastavlja nizom lančanih reakcija do formiranja lipidnih hidroperoksida i aldehida. Akumulacija hidroperoksida u plazma membrani i membranama organela dovodi do promjene fluidnosti membrane i tako utječe na aktivnost transmembranskih enzima, transportera, receptora i drugih membranskih proteina. Krajnji rezultat lipidne peroksidacije je

promjena propustljivosti membrane, što dovodi do narušavanja staničnog metabolizma i homeostaze, kao i smrti stanice (58).

Slično lipidnoj peroksidaciji, $\text{OH}\cdot$ predstavlja najreaktivniji ROS koji uzrokuje oksidacijska oštećenja proteina. Aminokiselinske rezidue proteina razlikuju se po stupnju osjetljivosti na ROS, a aminokiseline koje su najosjetljivije na oksidaciju su cistein i metionin (65). Proces oksidacije proteina najčešće dovodi do nastanka novih funkcionalnih grupa, kao što su hidroksilne i karbonilne grupe (58). Narušavanje strukture i funkcije različitih proteina (promjene u aktivnosti enzima, receptornih i transportnih proteina) mogu dovesti do smrti stanice (66).

ROS dovode do različitih oštećenja DNK kao što su jednolančani i dvolančani prekidi molekula DNK, modifikacije purinskih i pirimidinskih baza i dezoksiriboze, delecije, mutacije i translokacije DNK. Oštećenja DNK pod djelovanjem različitih ROS dovode do sprječavanja indukcije transkripcije, pogreški u replikaciji i genomske nestabilnosti, što predstavlja prvi korak uključen u mutagenezu, karcinogenezu i starenje (20, 65, 67).

1.6.3 LIPIDNA PEROKSIDACIJA

Lipidna peroksidacija je složena lančana reakcija razgradnje (oksidacije) višestruko nezasićenih masnih kiselina (engl. polyunsaturated fatty acid; PUFA) potaknuta ROS-om i reaktivnim dušikovim oblicima (RNS) (68, 69). U sastavu lipida svih bioloških membrana nalaze se višestruko nezasićene masne kiseline koje su jako osjetljive na oštećenja uzrokovana ROS-om. Zasićene masne kiseline i masne kiseline koje sadrže jednu dvostruku vezu, mnogo su otpornije prema djelovanju ROS-a negoli PUFA-e.

Lipidna peroksidacija započinje preuzimanjem vodikovog atoma nezasićene masne kiseline lipida (LH) od strane inicijatornog radikala ($\text{OH}\cdot$), što dovodi do nastanka lipidnog radikala ($\text{L}\cdot$). On u reakciji s O_2 prelazi u izrazito reaktivan lipidni peroksil radikal ($\text{LOO}\cdot$), koji zatim preuzima vodikov atom sa susjednog lipida i formira lipidni hidroperoksid (LOOH). Novonastali $\text{L}\cdot$ radikal reagira s drugim susjednim lipidom u lančanoj reakciji koja dovodi do akumulacije oštećenih lipida (70-73).

Produkt lipidne peroksidacije LOOH u reakciji s ionima željeza Fe^{2+} i Fe^{3+} dovodi do nastanka $LOO\cdot$ i lipidnog alkoksil radikala ($LO\cdot$). Novonastali lipidni radikali iniciraju dodatne lančane reakcije (71, 74, 75).

Pod djelovanjem iona željeza ili bakra, lipidni peroksidi stvaraju mnogobrojne razgradne produkte – od aldehida, ketona, ugljikovodika (etana, etena, pentana), epoksida, do aktivnih radikala.

Najpoznatiji toksični aldehidni produkti lipidne peroksidacije su 4-hidroksi-2-noneal (HNE) i malondialdehid (MDA). HNE je slabo mutagen, ali predstavlja glavni toksični produkt lipidne peroksidacije, dok MDA ima karcinogeno i mutageno djelovanje i koristi se kao biomarker lipidne peroksidacije. MDA koji postoji u različitim oblicima, u fiziološkim se uvjetima nalazi u obliku enolatnog iona koji interreagira s proteinima pokazujući izraziti afinitet prema lizinskom aminokiselinskome ostatku. Gvanin u DNA također je ciljno mjesto napada malondialdehida, što može stvarati mutagena oštećenja. U organizmu MDA se metabolizira do malonatne kiseline koja je kompeticijski inhibitor mitohondrijske sukcinat dehidrogenaze (65, 69).

Završni produkti lipidne peroksidacije su reaktivni aldehidi. Njihova je reaktivnost niža od reaktivnosti slobodnih radikala, ali dovoljno velika da mogu reagirati s molekulama u okolini te tako oštetiti stanice pa i uzrokovati staničnu smrt. Budući da su dugoživi, mogu se kretati od mjesta nastanka i napadati „ciljeve“ koji su daleko od mjesta početnog nastanka slobodnih radikala, bilo intracelularno ili ekstracelularno (68).

1.6.4 ZAŠTITA OD OKSIDACIJSKOG STRESA

Sustav zaštite od oksidacijskog oštećenja (eng. antioxidant defence system, AOS) sastoji se od enzimskih i neenzimskih komponenti (76).

1.6.4.1 ENZIMSKA ZAŠTITA OD OXIDACIJSKOG STRESA

U enzimске komponente antioksidacijske zaštite ubrajaju se enzimi SOD, CAT, GPx, glutation-reduktaza (GR), i enzim glutation-S-transferaza (GST) (77).

1.6.4.1.1 Superoksid-dizmutaza

Enzim SOD katalizira dizmutaciju superoksida u kisik i vodikov peroksid pa je važan antioksidativni čimbenik u obrani gotovo svih stanica izloženih aerobnom metabolizmu. SOD su bjelančevine koje kao kofaktor sadrže bakar, cink, mangan, željezo ili nikal. Poznato je pet različitih izoformi SOD enzima od kojih su tri strukturno karakterizirana. U sisavaca su prisutna tri oblika superoksid dismutaze. SOD1 je smješten u citoplazmi, SOD2 u mitohondrijima, a SOD3 u izvanstaničnom prostoru (21, 39, 40).

Fiziološku važnost SOD može se ilustrirati na primjeru pokusa s miševima. Miš kojem nedostaje enzim SOD2 ugiba nekoliko dana nakon okota zbog izuzetno jakog oksidativnog stresa. Miš kojem nedostaje SOD1 razvija niz patoloških stanja, uključujući tumor jetre, ubrzano starenje, gubitak mišićne mase. Miš kojem nedostaje SOD3 nema nikakvih zdravstvenih posljedica (78).

Uloga SOD je da zaštiti dušik oksid (NO) sintetiziran od strane endotelnih stanica. NO ima važnu protektivnu ulogu u nastanku ateroskleroze i drugih kardiovaskularnih bolesti (79).

1.6.4.1.2 Glutation-peroksidaza

GPx katalizira redukciju H_2O_2 u H_2O i organskih hidroperoksida (ROOH) u alkohole (ROH), pri čemu kao kofaktor koristi glutation.

Opisane su tri forme ovog enzima: selen-zavisna glutation-peroksidaza (Se-GPx), selen-nezavisna glutation-peroksidaza (non Se-GPx) i fosfolipid hidroperoksid glutation-peroksidaza (PH - GPx). Glutation također djeluje kao supstrat u drugim detoksificirajućim enzimima protiv oksidacijskog stresa kao što su glutation-transferaze. On sudjeluje u prijenosu aminokiselina kroz plazmatsku membranu i izravno čisti hidroksilni radikal i singletni kisik te time detoksicira vodikov peroksid i lipidne perokside katalitičkim

djelovanjem GPx. Glutation može obnoviti najvažnije vitamine, tj. vitamine C i E, natrag u njihove aktivne oblike (58, 80).

1.6.4.1.3 Katalaza

Osnovna uloga ovog antioksidacionog enzima je razlaganje neradikalnog H_2O_2 do H_2O . GPx je u fiziološkim uvjetima (mala koncentracija vodikovog peroksida), čak i aktivnija od katalaze, ali pri povećanim koncentracijama vodikovog peroksida aktivnost se katalaze naglo poveća.

Biološka uloga katalaze je zaštita organizma od štetnog djelovanja vodikovog peroksida, kad njegova koncentracija dosegne neuobičajeno visoku razinu. CAT ne može da bude saturirana svojim supstratom H_2O_2 bez obzira na njegovu koncentraciju, tako da enzimska aktivnost raste linearno s porastom koncentracije H_2O_2 (58, 81).

1.6.4.2 NEENZIMSKA ZAŠTITA OD OKSIDACIJSKOG STRESA

U neenzimske komponente sistema zaštite od oksidacijskih oštećenja ubrajaju se različite hidrosolubilne i liposolubilne tvari. Najviše proučavane hidrosolubilne neenzimske komponente sistema zaštite od oksidacijskih oštećenja su glutation, L-askorbinska kiselina (vitamin C), mokraćna kiselina, albumin, transferin, bilirubin, poliamini, a liposolubilne retinol (vitamin A), β -karoten (provitamin A), α -tokoferol (vitamin E) i ubikinon (koenzim Q) (19, 82)

1.6.4.2.1 Glutation

Glutation je tri-peptid sastavljen od glicina, cisteina i glutaminske kiseline. Nije esencijalan nutrient jer ga organizam može sam proizvesti. Dolazi u dva oblika, kao reducirani glutation (GSH) i oksidirani glutation (GSSG). U reduciranom obliku lako se dehidrogenizira donirajući elektron, najčešće drugim nestabilnim spojevima kao što su slobodni kisikovi

radikali. Nakon što se oksidira i sam postaje nestabilan i kao takav brzo reagira s drugim nestabilnim glutathionom tvoreći oksidirani glutathion. Enzim glutathion reduktaza (GR) može konvertirati ponovo GSSG u GSH koristeći pri tome nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat (NADPH). U fiziološkim uvjetima preko 90% glutathiona je u reduciranom obliku. Do povećanja koncentracije GSSG dolazi u stanju oksidacijskog stresa.

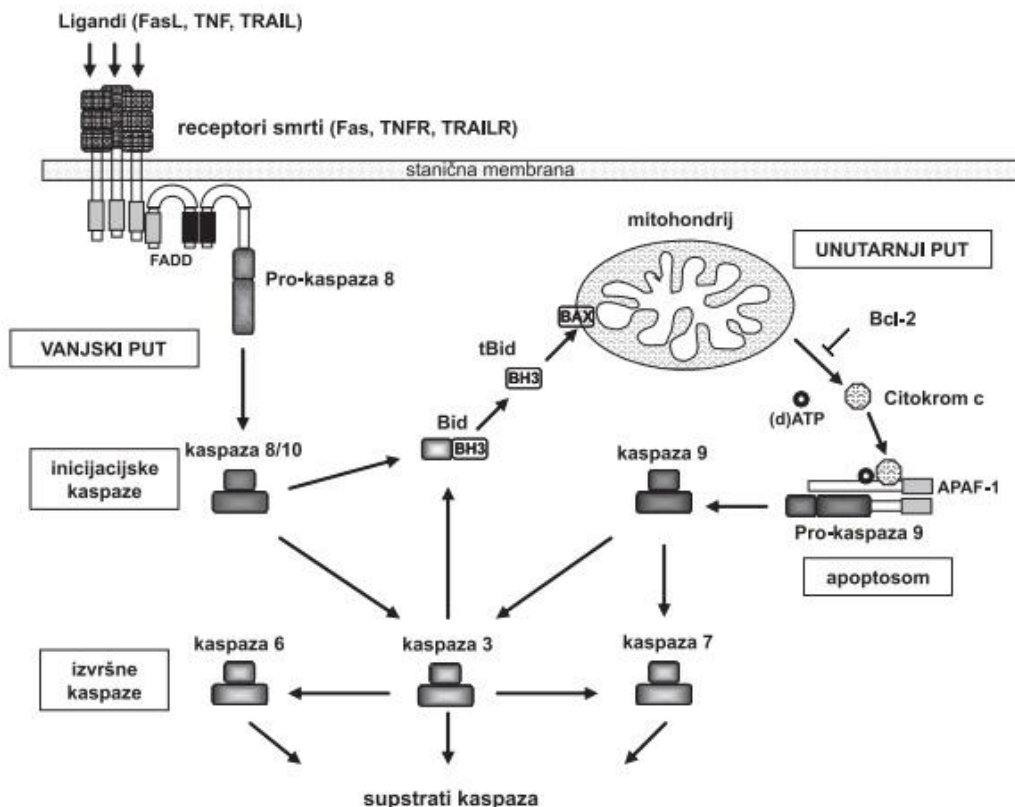
GSH ima nekoliko značajnih uloga u stanici sudjeluje u antioksidacijskoj obrani i detoksifikaciji različitih ksenobiotika, ima ulogu u održavanju proteinske strukture i funkcije, regulaciji sinteze i degradacije proteina, metabolizmu leukotriena i prostaglandina, redukciji ribonukleotida do dezoksiribonukleotida, regulaciji staničnog ciklusa i genskoj ekspresiji (78-80).

1.7 APOPTOZA

Pojam apoptoza (grč. a-po-toe-sis – otpadati) prvi su upotrijebili Kerr, Wyllie i Currie 1972. godine. Opisali su morfološki oblik stanične smrti koji se odvija kao energetski ovisan proces u kojem djelovanjem vlastitih proteina i enzima dolazi do usitnjavanja jezgre i zgušnjavanja citoplazme uz održanu cjelovitost stanične membrane (83, 84). Uočili su da u tkivu umiru pojedinačne stanice ne izazivajući upalu. Tri su glavna razloga zašto apoptoza nije praćena upalnim procesom: stanice ne otpuštaju svoj sadržaj u okolinu, ne otpuštaju medijatore upale i okolne stanice vrlo brzo fagocitiraju apoptotske stanice (85, 86). Stanice pokreću apoptozu u sklopu različitih fizioloških procesa ili zbog patoloških oštećenja stanica (uzrokovanih različitim vanjskim i unutrašnjim čimbenicima), zbog čega postaju opasne i/ili nekorisne za organizam. Mnogobrojni aktivatori programirane smrti stanice, preko različitih posrednika, dovode do pokretanja kaskade proteolitičkih enzima kaspaza (citoplazmatske cisteinil-aspartatno-specifične endoproteaze) koje uništavaju esencijalne strukturne komponente uključujući genski materijal stanice, i dovode do pojave specifičnih promjena kao što su skvrčenje stanice, kondenzacija kromatina, cijepanje DNK i formiranje apoptotskih tjelešaca, koja fagocitiraju susjedne stanice i makrofazi (87).

Nekroza stanice nastaje kao posljedica znatnijeg oštećenja stanice izazvanog različitim fizikalno kemijskim agensima. Katkad isti uzrok u nekom tkivu dovodi do istodobne pojave i nekroze i apoptoze. Naime, u slučajevima kada integritet stanice nije ozbiljnije

narušen i kada su oštećenja slabija, stanica može ući u program samouništenja, odnosno kada su ta oštećenja jaka i nepopravljiva, stanica umire nekrozom (88). Hoće li doći do apoptoze ili nekroze ovisi i o dugotrajnosti i jačini negativnog djelovanja. Tako su istraživanja vaskularnih bubrežnih oštećenja dokazala pojavu apoptoze nakon potpune kratkotrajne ishemije tijekom reperfuzije, dok su prolongirana ishemična stanja dovela do pojave nekroze stanica (89).



Slika 6. Prikaz unutrašnjeg i vanjskog puta aktivacije apoptoze ovisne o kaspazama

(Preuzeto iz: Žlender V. APOPTOSIS – PROGRAMMED CELL DEATH)

Oštećenja DNK pokreću apoptozu pa čimbenike koji uzrokuju oštećenje DNK, kao što je ionizacijsko zračenje, kemoterapeutici i lijekovi poput analoga nukleozida, ubrajamo u tzv. pokretače apoptoze (90).

Reaktivni spojevi kisika koji nastaju kao produkti aerobnog metabolizma u ljudskim stanicama mogu aktivirati apoptozu djelujući na propusnost membrane mitohondrija i

otpuštanje citokroma C (60). Posebno mjesto zauzimaju molekule koje se vežu na površinskim receptorima stanica, a nazivaju se "pokretači smrti". Neki od njih su: molekula Fas (FasL ili CD95 ligand), čimbenik tumorske nekroze α (TNF α), limfotoksin (TNF β) i TRAIL (engl. TNF-related apoptosis inducing ligand) (91). Najbolje istraženi putevi aktivacije apoptoze su mitohondrijski (unutrašnji) i receptorski (vanjski) put (Slika 6).

U mitohondrijskom putu signali pokreću staničnu smrt aktivacijom proapoptotskih članova obitelji proteina bcl-2. U receptorskom putu do apoptoze dolazi nakon vezanja molekula, kao što je Fas, na receptore stanične membrane (92). Oba puta aktiviraju enzime nazvane kaspaze (engl. caspase, cysteine aspartyl proteases). Kaspaze su proteolitički enzimi (citoplazmatske cisteinil-aspartatno specifične endoproteaze) koji potiču apoptozu (93).

U citoplazmi stanice nalaze se u obliku proenzima, a mogu biti aktivirane autokatalitički ili s drugom kaspazom. Svoju potpunu proteolitičku aktivnost postižu kao tetrameri koji nastaju nakon dvostrukog cijepanja. Postupna razgradnja u kojoj jedna kaspaza može aktivirati druge kaspaze, ali i samu sebe, pojačava apoptotski signalni put i dovodi do vrlo brze smrti stanice (94). Inhibitori kaspaza zaustavljaju apoptozu (93).

Danas je poznato 14 članova obitelji kaspaza koje se označavaju rednim brojem 1-14, pri čemu prokaspaze 2, 8, 9 i 10 ubrajamo u pokretačke, a prokaspaze 3, 6 i 7 u izvršne kaspaze. U receptorskom putu prva se aktivira kaspaza 8, a u mitohondrijskom kaspaza 9. Navedene kaspaze aktiviraju kaspazu 3 koja aktivira endonukleazu CAD (engl. caspase activated DNase) (11). Tijekom apoptoze kaspaza 3 je odgovorna, ili dijelom ili u cijelosti, za stupnjevitu razgradnju velikog broja proteina u stanici, fragmentaciju DNK i zgušnjavanje kromatina (95).

U slučajevima kada je oštećenje DNK uzrok pokretanja smrti stanice ključni protein je p53, koji je u normalnim stanicama prisutan u inaktivnom obliku. Gen za njegovu sintezu lociran je na sedamnaestom kromosomu, a sudjeluje u procesima replikacije DNA i transkripcije. Sposobnost p53 da zaustavi rast stanice njegova je važna tumor-supresijska funkcija, a mnogi tumori odnosno tumorske stanice imaju mutiran gen za sintezu p53 proteina. Oštećenja DNK potiču transkripcijsku aktivnost p53 i njegovo nakupljanje u stanici, a posljedično dolazi do zaustavljanja staničnog ciklusa u G1-fazi i popravljivanja oštećene DNK ili do pokretanja apoptoze stanice ako su ta oštećenja nepopravljiva. Protein p53 može pokrenuti apoptozu tako da poremeti odnos proapoptotskih i antiapoptotskih mitohondrialnih proteina Bcl-2 porodice, ili da inducira gene koji

povećavaju produkciju reaktivnih spojeva kisika, koji su snažni aktivatori oštećenja mitohondrija i apoptoze (96, 97).

1.7.1 APOPTOZA I SPERMATOGENEZA

Sjemenske stanice testisa nastaju iz primordijalnih sjemenskih stanica koji potiču iz embrionalnog ektoderma. Dolaskom u urogenitalni nabor primordijalne sjemske stanice posjeduju dvojni potencijal razvoja u muške ili ženske spolne stanice, a ključnu ulogu u njihovoj diferencijaciji prema muškim spolnim stanicama ima spolno određujući gen na Y kromosomu (98).

Razvoj testisa rođenjem nije završen i on se nastavlja nakon rođenja djeteta (99, 100). Prvi korak se zbiva u dobi 2-3 mjeseca života kada dolazi do privremenog naglog porasta gonadotropina FSH i LH, inhibina B i testosterona što se naziva mini-pubertet, koji u konačnici dovodi do pretvorbe gonocita u Ad spermatogonije (100, 101). Drugi korak u sazrijevanju sjemenskih stanica je pretvorba Ad spermatogonija u B spermatogonije i primarne spermatocite mitotičkom diobom, koji se zbiva u dobi 3-4 godine (99, 102). Tek nakon ovog koraka testis ulazi u stanje mirovanja do konačnog koraka spermatogeneze koji se odvija u pubertetu. Proces spermatogeneze se odvija u sjemenskim kanalićima iz stanica sjemenskog epitela. Prvi stadij u razvoju spermija je mitotička dioba spermatogonia. Nastala stanica se naredna 24 dana mijenja i povećava te tako nastaje veliki primarni spermatocit. Iz primarnog spermatocita, koji sadrži diploidni broj kromosoma, prvom mejotičkom diobom nastaju dva sekundarna spermatocita s haploidnim brojem kromosoma, a iz njih drugom mejotičkom diobom nastaju četiri spermatide, svaka s kompletom od 23 kromosoma. Spermatociti i spermatide svake generacije međusobno su povezani međustaničnim mostovima (103).

Novonastale stanice posjeduju antigena svojstva koja su strana već potpuno oblikovanom obrambenom sustavu domaćina, a zaštitu protiv njega daju mu čvrste veze Sertolijevih stanica uz bazalnu membranu koju nazivamo zonula occludens (104).

Spermatogeneza je karakterizirana kontinuiranim sazrijevanjem spolnih stanica od periferije prema centru sjemenskih kanalića. To je dinamičan proces koji je reguliran ravnotežom između proliferacije germinativnih stanica te programiranom smrti istih, odnosno apoptozom (105, 106). Smatra se da do 75 % stanica tijekom spermatogeneze podliježe fiziološkoj

apoptozi (81, 107). Proces i razumijevanje apoptoze tijekom spermatogeneze nije do kraja razjašnjen. Spolni hormoni imaju značajan utjecaj na regulaciju apoptoze u spolnim stanicama. Čitav proces spermatogeneze reguliran je endokrinim te testikularnim parakrinim i autokrinim djelovanjem (108).

Hormonska regulacija spermatogeneze počinje u pubertetu međudjelovanjem hipotalamusa i prednjeg režnja hipofize koja na poticaj gonadotropnih oslobađajućih hormona luči folikulo-stimulirajući (FSH) i luteotropni (LH) hormon. Točan mehanizam djelovanja ova dva hormona nije do kraja poznat, ali s obzirom da muške spolne stanice nemaju receptora za FSH i androgene očito je da oni djeluju preko Sertolijevih stanica (109). Poznato je da FSH preko receptora na Sertolijevim stanicama i testosteron imaju pozitivan učinak na preživljavanje stanica tijekom spermatogeneze, dok je djelovanje estrogena suprotno navedenom učinku, odnosno pro apoptotsko. Danas se smatra da androgen nosivi protein (APB), koji je proizvod Sertolijevih stanica, a koji se secenira u lumen sjemenskih kanalića i potom se sjemenskom tekućinom transportira do epididimisa, ima važnu ulogu u regulaciji spermatogeneze. Naime APB vezuje testosteron, dihidrotestosteron i estradiol te tako održava koncentraciju androgena u testisu i epididimisu što je preduvjet za normalnu spermatogenezu (110). Manjak FSH i testosterona potiče kako unutarjni tako i vanjski put apoptoze. Pokusima na životinjama dokazano je da davanje estrogena potiče apoptozu u zametnim stanicama i oštećuje spermatogenezu i spermioogenezu (111). Sertolijeve potporne stanice ograničavaju ekspanziju zametnih stanica. Smatra se da svaka Sertolijeva stanica podržava određen broj spermatogonija pa tako i zametnih stanica. Tijekom čitave spermatogeneze zametne stanice i Sertolijeve stanice su međusobnoj interakciji, kako endokrinim tako i parakrinim i autokrinim djelovanjem.

Citokini i faktori rasta te ekspresija njihovih receptora (interleukin-1 (IL-1), Leukemia inhibitory factor (LIF): Stem cell factor (SCF)) imaju značajnu ulogu u održavanju spermatogeneze odnosno regulaciji apoptoze (108). Proapoptotski učinak na spermatogenezu imaju različiti kemoterapeutici, ionizacijsko zračenje, kisikovi radikali i toksini kao nitrobenzen, etanol, bisfenol, lindan, brompropan itd. Apoptoza uglavnom zahvaća spermatocite, u nešto manjoj mjeri spermatogonije, a rijetko spermatide (112). Izloženost testisa povišenoj temperaturi pri retiniranom testisu rezultira pojačanom apoptozom (113). Također je uočeno da se apoptoza u zametnim stanicama pojačava starenjem. To se može objasniti smanjenom koncentracijom androgena (114) i povećanom količinom oksidacijskog stresa (115). Tijekom spermatogeneze apoptoza je fiziološki proces kojim se odstranjuje velik broj spolnih stanica tijekom njihovog sazrijevanja da bi na kraju proliferacije i

diferencijacije opstale one koje su sposobne oploditi jajnu stanicu. U tom procesu značajna je uloga Sertolijevih stanica (99).

1.8 NIFEDIPIN-BLOKATOR KALCIJEVIH KANALA

Nifedipin pripada grupi dihidropiridinskih blokatora kalcijevih kanala. Blokiranjem sporih kalcijevih kanala (L tip) sprječava ulazak kalcijevih iona u unutarstanični prostor. Proces se odvija na membrani stanice miokarda i glatkih mišića krvnih žila. Ova reverzibilna inhibicija ulaska iona kalcija u stanice dovodi do relaksacije krvnih žila kako koronarnih tako i perifernih, smanjenja potrebe miokarda za kisikom i smanjenja perifernog otpora, iz čega proizilazi antihipertenzivno i antianginozno djelovanje nifedipina.

Kalcijski su kanali velike transmembranske molekule široko rasprostranjene po mnogim stanicama, koje omogućavaju selektivni ulaz kalcijskih iona u stanicu nakon njezine aktivacije.

Kalcijski kanal građen je od četiri podjedinice visoke molekularne mase: α_1 , α_2 , β i γ (Slika 7). Podjedinica α_1 sadržava pore za kalcijske ione i vezna mjesta za blokatore kalcijskih kanala (BKK), a ima četiri glavne domene, svaku sa šest transmembranskih jedinica. Četiri α_1 podjedinice cirkularno postavljene pridonose normalnoj funkciji pora za ulaz kalcija.

Vežanjem za određena mjesta na α_1 podjedinici BKK inhibiraju ulaz kalcijskih iona u stanicu, smanjuju njezinu funkciju i tako ostvaruju svoje farmakološko djelovanje (116-118).

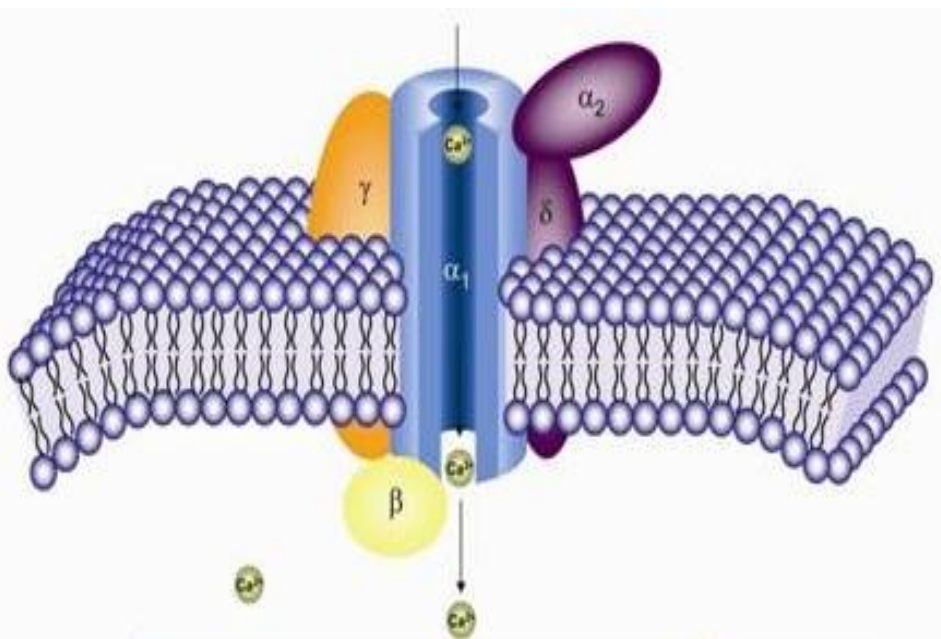
Postoji šest vrsta kalcijskih kanala (L, N, P, Q, R, T) koji se međusobno razlikuju po brzini kondukcije, pragu i duljini aktivacije, staničnoj distribuciji i funkciji. BKK se dijele u četiri osnovne skupine: dihidropiridine, benzotijazepine, fenilalkilamine i tetraline. Prve tri skupine djeluju na L-kanale, a tetralini na T-kanale (117, 119). Različito djelovanje na krvne žile i srce moguće je zbog djelomice različitog intracelularnog mehanizma kontrakcije glatkih mišićnih stanica krvnih žila i kardiomiocita.

S obzirom na vaskularnu selektivnost BKK dijelimo u dihidropiridine i nedihidropiridine. Nedihidropiridini (verapamil, diltiazem) nisu vaskuloselektivni (omjer djelovanja na krvne

žile i miokard 1:1), a dihidropiridini su vaskuloselektivni. Tako je u nifedipina i amlodipina navedeni omjer 10:1 (119, 120).

Osim antihipertenzivnog i kardioprotektivnog djelovanja, koje je najvažnije u svakodnevnoj kliničkoj praksi, u više radova je opisan antioksidativni učinak BKK-a. Kod nefrotoksičnosti uzrokovane cisplatinom u štakora nifedipin smanjuje koncentraciju malondialdehida uz povoljan učinak i na histologiju bubrega u odnosu na skupinu koja nije dobivala nifedipin (121).

Nadalje, u bolesnika sa sistemskom sklerozom nifedipin smanjuje koncentraciju superoksidnog aniona u monocitima (122). Također je dokazan antiapoptotski i antioksidativni učinak BKK kod oštećenja živčanih stanica (123).



Slika 7. Kalcijevi kanali

Preuzeto s http://medicine.nus.edu.sg/phys/lab/_Lab/Lab%20Interest/calcium%20channel.html

Znajući da kalcij sam ili vezan za stanične proteine, ima mnogobrojne uloge u metabolizmu stanice, sigurno je da blokirajući utok kalcija reverzibilno utječemo na mnoge od njih.

Nifedipin se oralno apsorbira preko 90%. Putem jetre se metabolizira preko citokroma P450. Putem bubrega 60-80% lijeka se izlučuje u obliku inaktivnih metaboilita. Ostatak se izlučuje

putem žuči i fecesa. Nepromijenjen lijek se nalazi samo u tragovima u urinu. Poluživot nakon intravenske primjene iznosi 5-6 minuta a nakon pareneteralne primjene oko 1,7 sati. U krvi je 90% lijeka vezano za proteine (124).

2 POSTAVKE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Postoji više studija koje su dokazale zaštitni učinak antioksidansa na torzijsko-detorzijsku ozljedu testisa u štakora (36, 125-127). Poznato je da je povećana koncentracija kalcija u stanici značajan čimbenik njenog oštećenja pri ishemijsko reperfuzijskoj ozljedi (48, 49).

Vodeći se činjenicom da slobodni kisikovi radikali doprinose oštećenju testisa kod ishemijsko reperfuzijske ozljede, odlučili smo ispitati akutni učinak nifedipina, blokatora kalcijevih kanala na oksidacijski stres kod torzijsko/detorzijske ozljede testisa u štakora.

Glavni cilj istraživanja je utvrditi učinak nifedipina na tkivo testisa štakora nakon torzijsko/detorzijske ozljede, tako da bi usporedili histološke i biokemijske promjene (oksidativni stres) na ipsilateralanom testisu nakon torzijsko/detorzijske ozljede u skupini koja je dobila nifedipin i skupini koja nije dobila nifedipin.

Sporadni ciljevi istraživanja su utvrditi djelovanje torzijsko/detorzijske ozljede ipsilateralnog testisa na suprotni testis analizirajući histološke i biokemijske promjene (oksidativni stres).

Utvrđiti učinak nifedipina na histološke i biokemijske promjene na suprotnom testisu štakora nakon torzijsko/detorzijske ozljede.

Iz literature je poznato da jednostrana I/R ozljeda testisa dovodi i do oštećenja suprotnog testisa (24-27), mada ima radova koji to opovrgavaju (28, 29).

Prema našim saznanjima ne postoji studija koja je ispitivala akutni učinak blokatora kalcijevih kanala na ishemijsku-reperfuzijsku ozljedu testisa. Varijable koje su korištene u istraživanju su aktivnosti enzima glutation peroksidaze i superoksid dismutaze te koncentracija malondialdehida (produkt lipidne peroksidacije) u tkivu testisa, kao pokazatelji oksidativnog stresa. Analizirali smo također histologiju testisa (Johnsen score) i apoptotski indeks. Sporadni ciljevi istraživanja su utvrditi akutno djelovanje jednostrane T/D ozljede na suprotni testis i mogući protektivni utjecaj nifedipina na suprotni testis.

Istraživanje je prema pristupu eksperimentalno, prema razini i namjeni temeljno, prema načinu dobivanja podataka intervencijsko, prema vremenskoj odrednici prospektivno, a prema specifičnom ustroju pokus na životinjama.

3 MATERIJAL I METODE

3.1 POKUSNE ŽIVOTINJE

Istraživanje smo proveli na 24 mužjaka štakora vrste Sprague-Dawley (starosti 9 tjedana), iz Nastambe za eksperimentalne životinje Sveučilišta u Splitu (Slika 8). Životinje su bile smještene po dvije u kavezu, uz izmjenu ciklusa dan – noć (10 h svjetlo/14 h tama), temperaturu ($20\pm 5^{\circ}\text{C}$), vlažnost ($55\pm 5\%$) te hranu i vodu po volji. U dobi od devet tjedana životinje su slučajnim odabirom bile podijeljene u tri skupine (kontrolna, torzijsko/detorzijska (T/D), nifedipinska) od kojih je svaka imala po osam štakora.

Sve životinje su anestetizirane intraperitonealnom primjenom 20% otopine uretana (1ml/100g tjelesne mase).

U T/D skupini, kroz ilioingvinalnu inciziju pristupilo se na lijevi testis te ga se torkviralo (rotiralo) za 720 stupnjeva u smjeru kazaljke na satu, a potom fiksiralo za tuniku Dartos resorptivnim šavovima polyglactin 5/0 (Vicryl, Ethicon, Johnson & Johnson Somerville, New Jersey, SAD) (Slika 9). Nakon tri sata detorkvirao se lijevi testis, a nakon dodatna tri sata reperfuzije učinila se obostrana orhidektomija. Testisima je određena masa, nakon čega su prerezani na polovice. Jedna polovica je fiksirana u 4% formaldehidu za histološku i imunohistokemijsku analizu (Johnsenov scor, apoptotski indeks). Druga polovica je bila zamrznuta u tekućem dušiku na temperaturi od -195°C za biokemijsku analizu (enzimi superoksid dismutaza i glutation peroksidaza, te malondialdehid produkt lipidne peroksidacije).

U nifedipinskoj skupini učinjeni su isti postupci kao u T/D skupini uz intraperitonealnu primjenu nifedipina (Adalat® 5mg-Infusionsflasche, 0,01% solution, Bayer, Njemačka) u dozi od $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 30 minuta prije detorzije lijevog testisa.

U kontrolnoj ili lažno operiranoj skupini ilioingvinalnim rezom pristupili smo lijevom testisu, izvadili ga iz skrotalne vreće ne oštetiivši cirkulaciju te ga ponovo vratili u skrotum bez torkviranja. Daljnji postupak je bio isti kao u T/D skupini.



Slika 8. Mužjaci štakora vrste Sprague-Dawley starosti 9 tjedana



Slika 9. Torzija lijevog testisa u štakora

3.2 HISTOLOŠKA ANALIZA

Komadići tkiva uklopljeni u parafin izrezani su na rezove debljine 5 μm prilipljeni na pozitivno nabijena predmetna stakalca (Superfrost Plus Adhesion Slides, Thermo Scientific). Imunohistokemijski postupak je proveden u uređaju BenchMark ULTRA (Automated IHC/ISH Slide Staining System, Ventana, Tucson, Arizona, USA) (Slika 10). Nakon deparafinizacije u ksilolu i rehidracije kroz alkohole silazne koncentracije, rezovi su obrađeni Tris puferom 52 min na 95C. Endogena peroksidaza je inaktivirana inkubacijom u 3%-tnom H_2O_2 4 minute na 36C. Nakon ispiranja u otopini fosfatnog pufera (PBS) inkubirani su primarnim protutijelom kunića na cijepanu kaspazu 3 štakora (Asp 175 Cleaved Caspase 3, Cell Signaling, USA) u vlažnoj atmosferi tijekom 32 minute. Nakon ispiranja u PBS-u, rezovi su inkubirani s odgovarajućim biotiniziranim sekundarnim protutijelom i vizualizirani DAB-om (Ultraview Universal DAB Detection Kit, Ventana, Tucson, Arizona, SAD). Apoptotske stanice su se obojale smeđe.

Obojeni uzorci analizirani su svjetlosnim mikroskopom Olympus BX41 (Olympus, Tokio, Japan). Rezultati su prikazani apoptotskim indeksom 1 (AP1), koji predstavlja broj pozitivno obojanih stanice na stotinu sjemenskih kanalića (broj pozitivnih stanica / 100 sjemenskih kanalića) i apoptotskim indeksom 2 (AP2), koji označava broj pozitivnih sjemenskih kanalića na stotinu sjemenskih kanalića (broj pozitivnih sjemenskih kanalića / 100 sjemenskih kanalića). Histološke promjene sjemenskog epitela analizirane su u skladu s Johnsenovim kriterijima (Tablica1) (38, 128).



Slika 10. Uređaj za imunohistokemijski postupak (BenchMark ULTRA)

Tablica 1. Histološka ocjena spermatogeneze po Johnsenovoj ljestvici.

OCJENA	OPIS
10	Puna spermatogeneza
9	Lagano poremećena spermatogeneza, puno kasnih spermatida, dizorganiziran epitel
8	Manje od pet spermatozoida po tubulu, nekoliko kasnih spermatida
7	Puno ranih spermatida, bez spermatozoida i kasnih spermatida
6	Bez ranih spermatida, bez spermatozoida i kasnih spermatida
5	Bez spermatozoida ili spermatida, puno spermatocita
4	Bez spermatozoida ili spermatida, nekoliko spermatocita
3	Samo spermatogonije
2	Bez zametnih stanica, samo Sertolijeve stanice
1	Bez seminiferne epitela

3.3 BIOKEMIJSKA ANALIZA

3.3.1 Postupak pripreme i homogenizacija uzorka tkiva testisa

1. Svi dobiveni uzorci tkiva testisa se isperu s 0.9% NaCl, te se izvažu na analitičkoj vagi.
2. Uzorci se stave se u kriotubice, označe i pohrane u zamrzivaču (-80°C) do nastavka analize.
3. Homogenizacija tkiva se učini u homogenizatoru od medicinskog čelika (ohlađen tekućim dušikom).
4. Uzorcima tkiva testisa se doda 1.15% KCl, uz konačnu koncentraciju 1:10 kako bi se dobio 10% homogenat.
5. Homogenat se potom sonificira u ultrazvučnoj kupelji (Thermofisher Scientific, SAD), i to 3 puta po 30 sekundi, s 10 sekundi stanke između.

6. Sonificirani homogenat se potom centrifugira na 16,000 rpm, 30 minuta, na +4°C, u centrifugi Eppendorf 5810R (Eppendorf, Hamburg, Njemačka). Dobiveni supernatant služi za trenutno određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima.

3.3.2 Određivanje malondialdehida pomoću reakcije sa tiobarbiturnom kiselinom

1. Otpipetira se 0,66 ml uzorka i doda 1,384 ml hladne 20%-tne trikloroctene kiseline.
2. Dobivena otopina se potom centrifugira na 14,000 rpm, 5 minuta, na +4°C.
3. Otpipetira se 1,5 ml supernatanta i doda se 0,67% tiobarbiturne kiseline (TBA) i izmiješa.
4. Uzorak se potom zagrijava na 100° C, 10 minuta. Potom se hladi 10 minuta, dok se ne postigne sobna temperatura.
5. Koncentracija TBA se odredi spektrofotometrijski, na UV-VIS spektrofotometru Lambda 25 (Perkin Elmer, SAD), mjerenjem absorbancija na 532 i 572 nm.
6. Koncentracija MDA izražena je u nmol/mg proteina.

3.3.3 Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze

Aktivnost superoksid dismutaze u tkivu testisa je odrađena korištenjem RANSOD kita, prema uputama proizvođača (Randox Labs, UK). Absorbancija se mjeri na 505 nm, na instrumentu Abott Architect ci16200 integrated system (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, SAD). Aktivnost SOD izražena je u jedinicama po mg proteina (units/mg).

3.3.4 Određivanje aktivnosti glutathion peroksidaze

Aktivnost glutathion peroksidaze (GPx) u tkivu testisa je odrađena korištenjem metode po autorima Paglia i Valentine (129), pomoću RANSEL kita (Randox Labs, UK). Absorbancija se mjeri na 340 nm, na instrumentu Abott Architect ci16200 integrated system (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, SAD), prema uputama proizvođača. Aktivnost GPx izražena je u jedinicama po mg proteina (units/mg).

3.4 STATISTIČKA ANALIZA

Rezultati istraživanja su prikazani tablično i grafički te analizirani prikladnim metodama opisne i inferencijske statistike. Opisna statistika podataka dobivenih pobrojavanjem obavila se uporabom apsolutnih brojeva i relativnih frekvencija, dok su se u opisnoj statistici podataka dobivenih mjerenjem koristile mjere aritmetičke sredine i standardne devijacije.

Za usporedbu razlika srednjih vrijednosti kvantitativnih (metričkih) podataka između tri ispitivane skupine koristili smo Kruskal-Wallis test, dok smo za usporedbu istih podataka između dviju skupina koristiti Mann-Whitney test. Navedeni neparametrijski testovi korišteni su i pri testiranju ordinalnih podataka (histološki podatci).

Za obradu podataka korišteni su računalni programi Microsoft Excel for Windows verzija 11.0 (Microsoft Corporation, USA) i Statistica for Windows Release 11,0 (Statsoft Inc. Tulsa, OK, USA).

4 REZULTATI

Statističkom obradom (Kruskal Wallis test) nismo našli statistički značajnu razliku u masi testisa štakora ($p=0,46$) kao ni u tjelesnoj masi štakora ($p=0,64$) po skupinama (Tablice 2 i 3).

Tablica 2. Prikaz mase lijevih testisa štakora po skupinama u gramima (g)

skupine	Masa testisa (g)		
	Srednja vrijednost	Median	Min-max vrijednosti
Kontrolna skupina	1,64±0,13	1,65	(1,39-1,87)
T/D skupina	1,68±0,12	1,73	(1,38-1,83)
Nifedipinska skupina	1,69±0,11	1,70	(1,49-1,85)

Tablica 3. Prikaz tjelesne mase štakora po skupinama u gramima (g)

skupine	Masa štakora (g)		
	Srednja vrijednost	Median	Min-Max vrijednosti
Kontrolna skupina	314,37±15,45	315,00	(290-340)
T/D skupina	318,75±17,26	322,50	(280-335)
Nifedipinska skupina	317,50±13,88	317,50	(290-335)

Aktivnosti enzima SOD u lijevom testisu značajno se razlikuju u tri skupine ($p < 0,001$) (Kruskal-Wallis test).

Uspoređujući aktivnost enzima između pojedinih skupina (Mann-Whitney test) dokazali smo da se vrijednosti SOD značajno razlikuju između kontrolne i T/D skupine ($p < 0,01$), kontrolne i nifedipinske ($p < 0,01$) te T/D i nifedipinske skupine ($p < 0,01$) (Tablica 4).

Tablica 4. Prikaz srednjih vrijednosti i standardne devijacije (SD) aktivnosti enzima SOD u lijevom testisu po skupinama

Skupine	SOD (jedinica/mg protein)
Kontrolna skupina	119,01 ± 1,98
T/D skupina	89,40 ± 7,13
Nifedipinska skupina	113,06 ± 3,42

Aktivnosti enzima GPx u lijevom testisu značajno se razlikuju u tri skupine ($p < 0,001$) (Kruskal-Wallis test) (Tablica 5).

Tablica 5. Prikaz srednjih vrijednosti ± SD aktivnosti enzima GPx u lijevom testisu po skupinama

Skupine	GPx (jedinica/mg protein)
Kontrolna skupina	179,91 ± 3,98
T/D skupina	139,01 ± 5,70
Nifedipinska skupina	171,36 ± 2,48

Uspoređujući aktivnost GPx između pojedinih skupina (Mann-Whitney test) dokazali smo da se vrijednosti GPx značajno razlikuju između kontrolne i T/D skupine ($p < 0,01$), kontrolne i nifedipinske ($p < 0,01$) te T/D i nifedipinske skupine ($p < 0,01$).

Dokazali smo statistički značajne razlike u vrijednostima malondialdehida između tri skupine ($p = 0,03$) u lijevom testisu (Tablica 6). Uspoređujući vrijednosti između pojedinih skupina (Mann-Whitney test) dokazali smo da se vrijednosti MDA značajno razlikuju između kontrolne i T/D skupine ($p < 0,01$). Vrijednost MDA je za 22% manja u nifedipinskoj skupini u odnosu na T/D skupinu ($p = 0,06$).

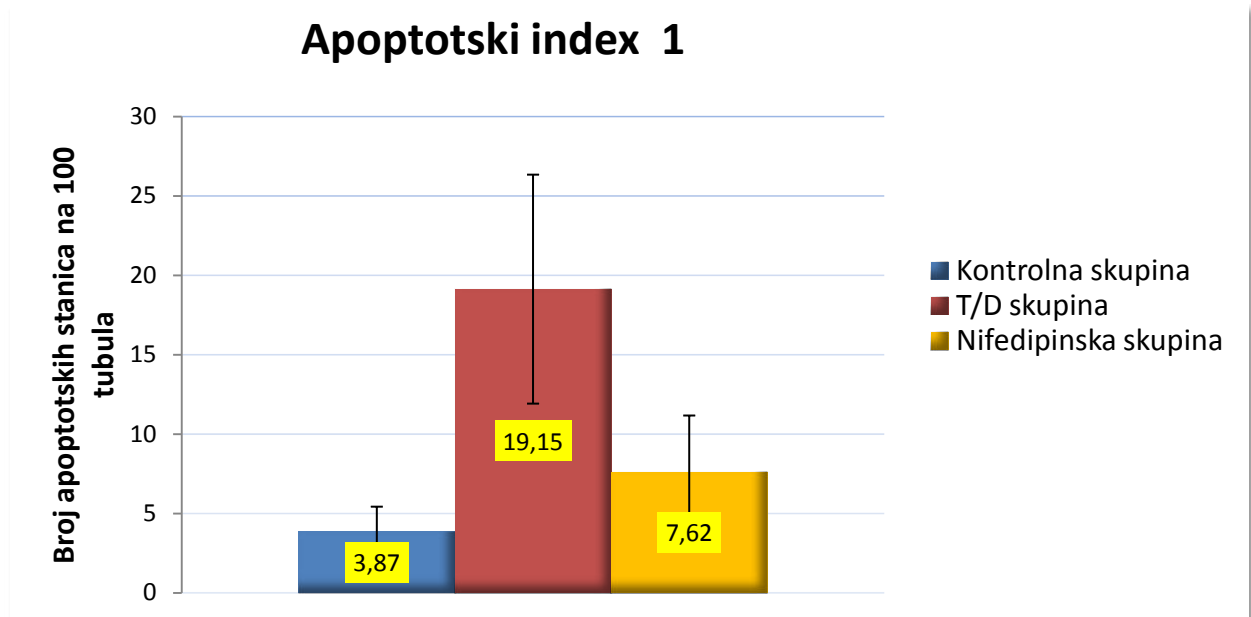
Tablica 6. Prikaz srednjih vrijednost MDA \pm SD u lijevom testisu po skupinama

Skupine	MDA (nmol/mg protein)
Kontrolna skupina	3,14 \pm 0,57
T/D skupina	5,06 \pm 0,51
Nifedipinska skupina	3,93 \pm 1,15

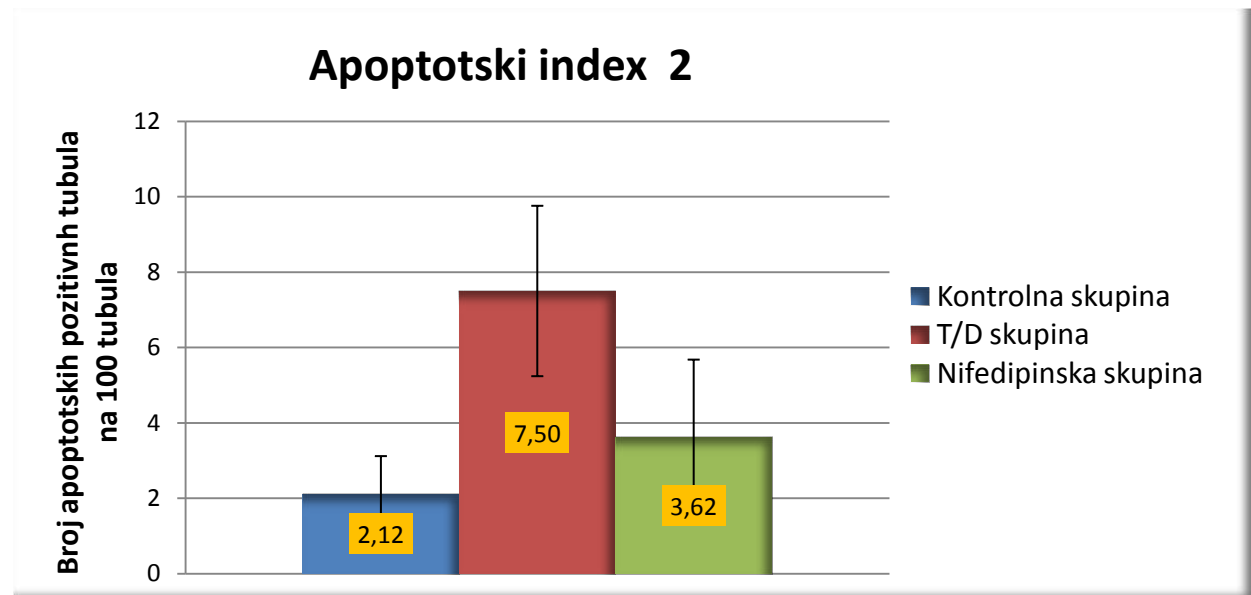
Uspoređujući rezultate apoptotskog indexa 1 (AP1) u lijevom testisu, odnosno broja apoptotskih stanica na 100 tubula (Slika 11), dokazali smo da postoji statistički značajna razlika između T/D skupine (19.12 \pm 7.21) i skupine koja je dobila nifedipin (7.62 \pm 3.54) ($p = 0,003$). U nifedipinskoj skupini AP1 je oko 2,5 puta manji u odnosu na T/D skupinu. Za primijetiti je da se AP1 značajno razlikuje ($p = 0,001$) u kontrolnoj skupini (3,87 \pm 1,55) i skupini T/D.

Broj apoptotskih pozitivnih tubula na 100 tubula (AP2) također pokazuje značajnu razliku ($p = 0,007$) između T/D skupine (7,50 \pm 2,26) i skupine koja je dobila nifedipin (3.62 \pm 2.06)

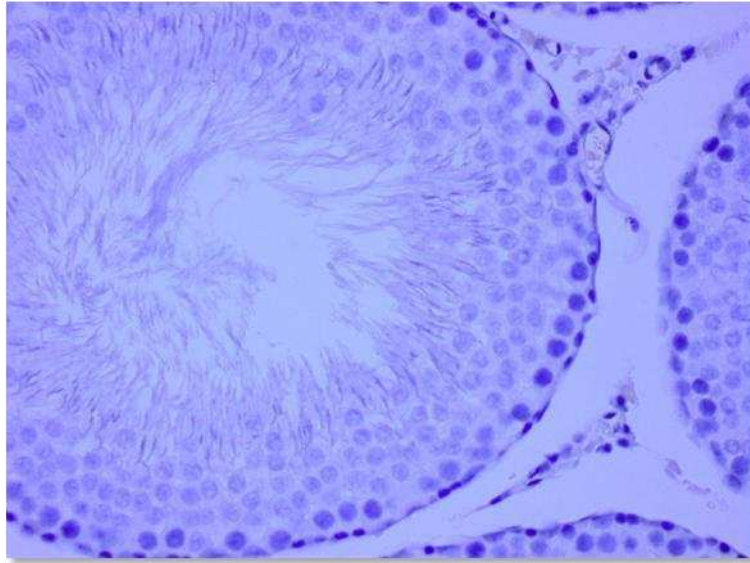
(Slika 12). AP2 je u kontrolnoj skupini iznosio ($2,12 \pm 0,99$) što je 3,5 puta manje u odnosu na T/D skupinu ($p=0,001$).



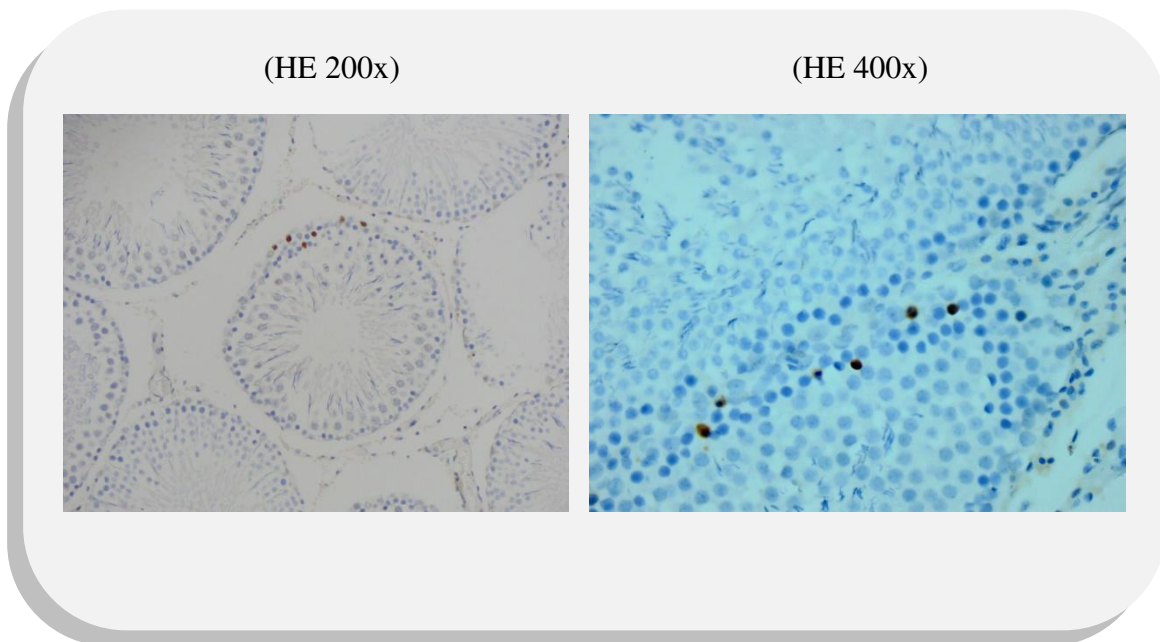
Slika 11. Grafički prikaz srednjih vrijednosti i standardne devijacije apoptotskog indexa 1 (AP1) u lijevom testisu po skupinama



Slika 12. Grafički prikaz srednjih vrijednosti i standardne devijacije apoptotskog indexa 2 (AP2) u lijevom testisu po skupinama



Slika 13. Prikaz sjemenskih kanalića lijevog testisa štakora nakon tri sata T/D. Sjemenski epitel je u potpunosti očuvan (HE 400x)



Slika 14. Apoptoza u sjemenskim kanalićima. Prikazano kao smeđe obojane stanice (Cleaved Caspase 3)

Aktivnosti enzima SOD u desnom testisu značajno se ne razlikuju između tri skupine ($p=0,49$) (Kruskal-Wallis test) (Tablica 7).

Tablica 7. Prikaz srednjih vrijednosti i standardne devijacije aktivnosti enzima superoksid dizmutaze u desnom testisu po skupinama

skupine	SOD (jedinica/mg protein)
Kontrolna skupina	122,87 ± 6,43
T/D skupina	110,99 ± 7,52
Nifedipinska skupina	114,03 ± 6,25

Aktivnost enzima GPx u suprotnom desnom testisu se statistički značajno ne razlikuju između tri skupine ($p=0,07$) (Kruskal-Wallis test) (Tablica 8).

Tablica 8. Prikaz srednjih vrijednosti i standardne devijacije aktivnosti enzima glutation peroksidaze u desnom testisu po skupinama

skupine	GPx (jedinica/mg protein)
Kontrolna skupina	178,92 ± 5,39
T/D skupina	172,53 ± 4,95
Nifedipinska skupina	174,85 ± 4,81

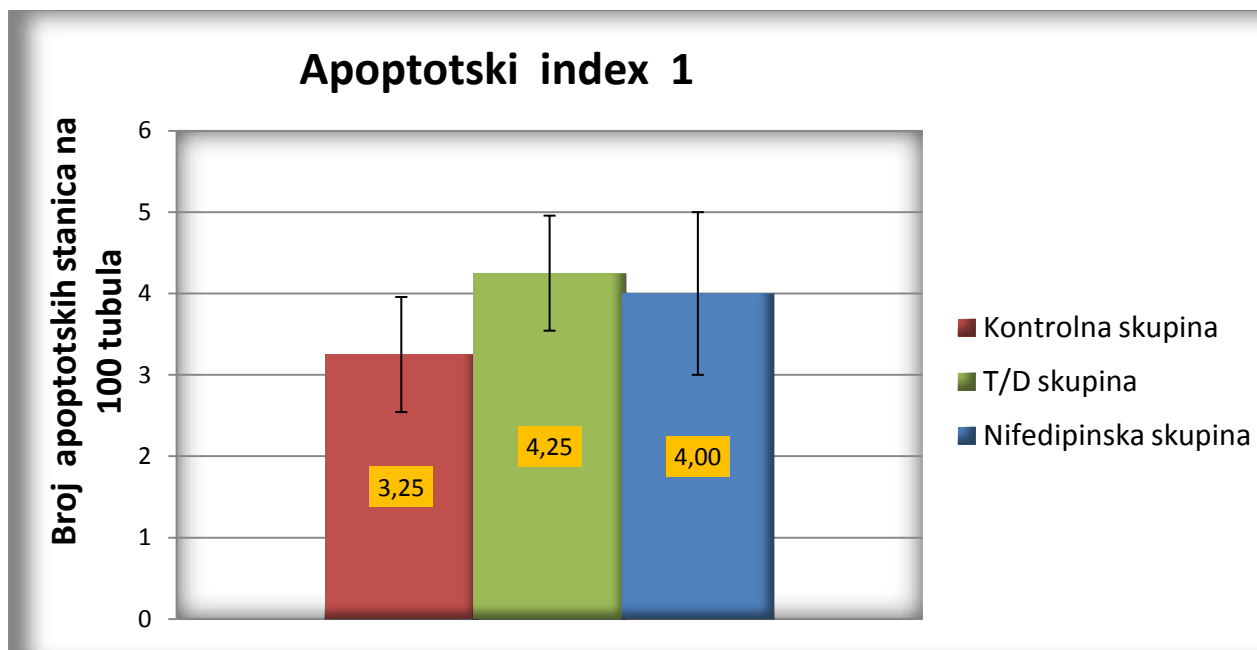
Vrijednosti MDA u suprotnom testisu se statistički značajno razlikuju između kontrolne i T/D skupine ($p=0,02$) (Tablica 9). Vrijednosti MDA u T/D skupini ($3,44 \pm 0,27$) se značajno ne razlikuju od onih u nifedipinskoj skupini ($3,38 \pm 0,33$) ($p=0,08$).

Tablica 9. Prikaz srednjih vrijednosti i standardne devijacije malondialdehida u desnom testisu po skupinama

skupine	MDA (nmol/mg protein)
Kontrolna skupina	$3,06 \pm 0,31$
T/D skupina	$3,44 \pm 0,27$
Nifedipinska skupina	$3,38 \pm 0,33$

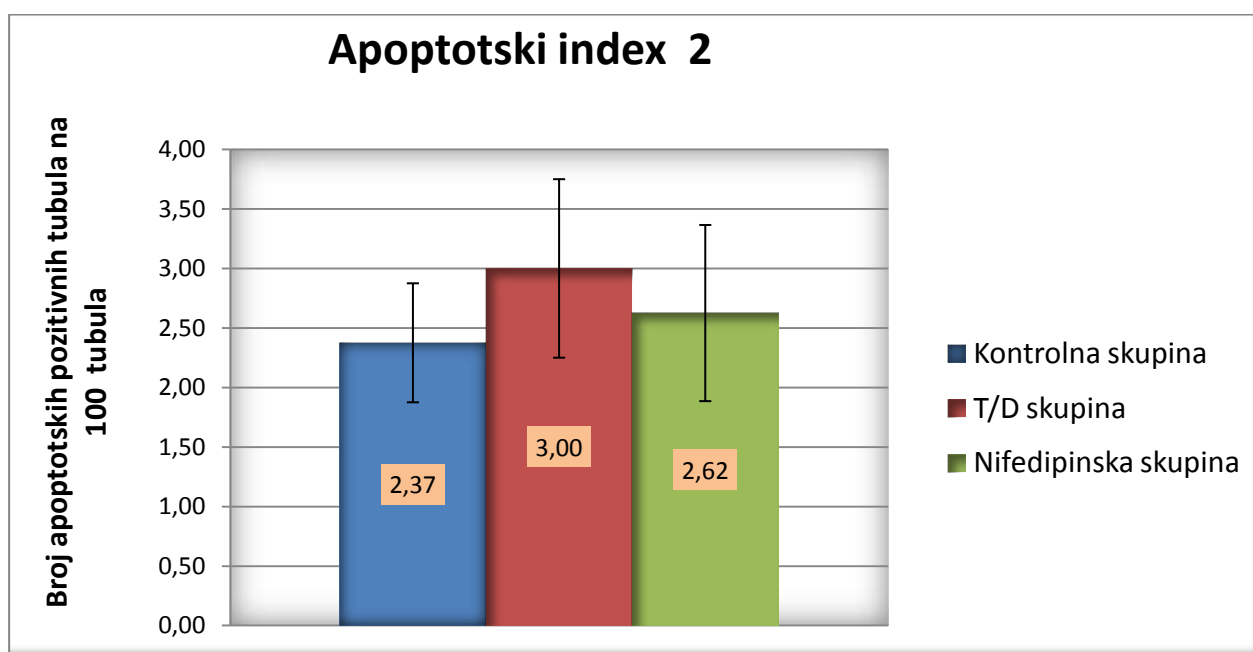
Uspoređujući rezultate apoptotskog indexa 1 (AP1) u desnom testisu, odnosno broja apoptotskih stanica na 100 tubula (Slika 15), dokazali smo da ne postoji statistički značajna razlika između T/D skupine ($4,25 \pm 0,70$), skupine koja je dobila nifedipin ($4,00 \pm 1,06$) i kontrolne skupine ($3,25 \pm 0,70$) ($p=0,065$) (Kruskal-Wallis test).

Uspoređujući razliku između dviju skupina, utvrdili smo značajnu razliku između kontrolne i T/D skupine ($p=0,019$) (Mann-Whitney test). Za primijetiti je da je srednja vrijednost AP1 u T/D skupini 30% veća u odnosu na kontrolnu skupinu bez obzira na ($p=0,065$).



Slika 15. Grafički prikaz srednjih vrijednosti i standardne devijacije AP1 u desnom testisu po skupinama

Broj apoptotskih pozitivnih tubula na 100 tubula (AP2) ne pokazuje značajnu razliku ($p=0,21$) između T/D skupine ($3,00 \pm 0,75$), skupine koja je dobila nifedipin ($2,62 \pm 0,74$) i kontrolne skupine ($2,37 \pm 0,51$) (Slika 16).



Slika 16. Grafički prikaz srednjih vrijednosti i standardne devijacije AP2 u desnom testisu po skupinama

Statističkom analizom dokazali smo da ne postoji statistički značajna razlika u Johnsen kriterijima između tri skupine kako u lijevom tako i desnom testisu ($P > 0,05$) (Kruskal-Wallis test) (Tablica 10). Sjemenski epitel je gotovo u potpunosti očuvan.

Tablica 10. Prikaz srednjih vrijednosti \pm SD Johnsen kriterija u oba testisa po skupinama

skupine	Johnsen kriteriji	
	Lijevi testis	Desni testis
Kontrolna skupina	10,00 \pm 0,00	10,00 \pm 0,00
T/D skupina	9,37 \pm 0,74	9,87 \pm 0,35
Nifedipinska skupina	10,00 \pm 0,00	10,00 \pm 0,00

5 RASPRAVA

Torzija testisa je stanje koje zahtijeva žurnu dijagnozu i liječenje, a koji su ključni u očuvanju vitalnosti testisa i eventualnog fertiliteta. Konačni ishod nakon torzije testisa može biti od minimalnih strukturnih i funkcionalnih poremećaja do nekroze organa (21).

Dužina trajanja kao i stupanj torzije su u izravnoj vezi s oštećenjem testisa. Patofiziološki mehanizam torzije testisa je složen, a u osnovi predstavlja I/R ozljedu.

Ozljeda ne nastaje samo tijekom perioda ishemije kada je smanjen ili prekinut dotok kisika i hranjivih tvari, nego reperfuzija dodatno pridonosi akutnom oštećenju tkiva prije svega pojačanim stvaranjem ROS.

Tijekom zadnjih tridesetak godina napisani su brojni radovi o torziji testisa, njezinim posljedicama te načinima na koji se mogu ublažiti oštećenja. Većina autora se slaže i dokazala je da su ROS jedan od glavnih krivaca za oštećenje testisa kod torzijsko detorzijske ozljede (130-132).

Kisik je nepohodan za funkcioniranje svih aerobnih organizama. ROS koji se stvaraju u malim količinama tijekom metabolizma u fiziološkim uvjetima, imaju mnogobrojne pozitivne učinke u organizmu, a njihova koncentracija regulirana je sustavom antioksidativne zaštite u koju su uključeni enzimi i neenzimske komponente.

Manjak kisika tijekom ishemije dovodi do hipoenergetičke stanice. I/R ozljeda je karakterizirana pojačanim stvaranjem ROS-a odnosno gubitkom ravnoteže između stvaranja ROS-a i antioksidansa, što dovodi konačno do oksidacijskog stresa. Dovodeći do promjena u strukturi i fluidnosti stanične membrane, promjenama strukture i aktivnosti staničnih proteina i oštećenja DNK-a, oštećuju stanicu. Zavisno o jačini i dužini djelovanja u konačnici mogu dovesti i do smrti stanice.

Da reperfuzija odnosno detorzija testisa dodatno pojačava stvaranje ROS-a pokazali su u svom radu Akondi i suradnici prateći razinu MDA, superoksid dizmutaze i katalaze kod T/D ozljede testisa u štakora (130). Smatra se da su glavni izvor ROS-a tijekom I/R ozljede leukociti koji se pojačano nakupljaju u intersticiju te aktivacija ksantin oksidaze tijekom metabolizma purina (23, 133, 134).

Brojni autori su dokazali zaštitnu ulogu antioksidansa kod T/D ozljede testisa štakora (126, 135-138). Jedna od posljedica djelovanja ROS-a na stanicu je pojačana apoptoza odnosno energetska uvjetovana programirana stanična smrt. Smatra se da ROS djeluju na apoptozu na način da oštećuju mitohondrijsku membranu doprinoseći izlasku mnogobrojnih

proapoptotskih čimbenika, prije svega citokroma c koji je jedan od glavnih pokretača apoptoze. Djelovanje ROS na mitohondrije očituje se i u otpuštanju apoptotski inducirajućeg faktora (AIF) koji dovodi do fragmentacije DNK (139).

Apoptoza je sastavni dio spermatogeneze. Poznato je da preko polovine stanica sjemenskog epitela podliježe fiziološkoj apoptozi kako bi na kraju ostale zrele stanice koje su sposobne oploditi jajnu stanicu. Apoptozom se također regulira i odnos Sertolijevih stanica i stanica sjemenskog epitela (107, 140, 141).

Pojačana apoptoza se javlja u situacijama toplinskog oštećenja testisa (142), kemo i radioterapije (143), kod autoimunog orhitisa (144), tijekom izlaganja različitim različitim toksičnim čimbenicima (145, 146). Biopsijom testisa Calvacanti i suradnici su pokazali da je pojačana apoptoza prisutna u infertilnih muškaraca (147). Wang i suradnici su dokazali pozitivnu korelaciju između ROS-a, i citkroma c u infertilnih muškaraca (148). Također je poznato da je pojačana aktivnost kaspaza u infertilnih muškaraca (149, 150).

Nizom pokusa na štakorima dokazano je da su poremećaji u ekspresiji pojedinih proteina iz Bcl skupine odgovorni za poremećaj spermatogeneze i fertiliteta (151-153). Iz ovih navoda da se zaključiti da je pojačana apoptoza u stanicama sjemenskog epitela pokazatelj oštećenja spermatogeneze, a ROS su jedan od uzroka apoptoze odnosno programirane smrti stanice.

I/R ozljeda je karakterizirana nakupljanjem slobodnih kisikovih radikala, aktivacijom komplementa, povećanim utokom kalcija u stanicu, pojačanom kemotaksijom i adhezijom leukocita, otpuštanjem citokina i povećenom propusnošću kapilara. Obzirom na složenost ovog procesa, razvili su se različite strategije u liječenju I/R ozljede, odnosno smanjivanju njenih štetnih posljedica.

Yazawa i sur. dokazali su povoljan učinak glukokortikoida na ishemijsku ozljedu testisa. U skupni štakora koji su jednokratno tretirani dexametazonom broj apoptoza u sjemenskom epitelu kao i nakupljanje leukocita u testisu je bilo značajno manje u odnosu na skupinu koja nije tretirana (154). Također je dokazan protektivni učinak ibuprofena, protupualnog lijeka na T/D ozljedu testisa. U skupni štakora tretiranoj ibuprofenom razina MDA je značajno manja u odnosu na netretiranu skupinu (155). Nadalje, supstance kao Lipoxin A4 koje inhibiraju ekspresiju nekih citokina (IL-2, TNF- α) također djeluju povoljno na T/D ozljedu testisa smanjujući oksidacijski stres i aktivnost kaspaza (156).

Zheng i suradnici su pokazali da inhibicija podjedinice C5a komplementa djeluje protektivno na I/R ozljedu bubrega (157).

Jedan od načina kojim se povoljno djeluje na I/R ozljedu je ishemijsko postkondicioniranje, odnosno postupna reperfuzija nakon trajanja ishemije odnosno torzije.

Ozkisacik je dokazao da postishemijsko postkondicioniranje nakon torzije testisa u štakora doprinosi ublažavanju torzijske ozljede testisa. Tijekom reperfuzije najbolji učinak je postigao s 10 sekundi ishemije i 5 sekundi reperfuzije u 10 ponavljanja (158, 159). Mehanizam ovog učinka nije do kraja jasan, ali nedvojbeno povoljno djeluje na integritet mitohondrija smanjujući njihovu osjetljivost na povećanu koncentraciju Ca^{++} (160).

Poznato je da kalcijevi ioni imaju važnu ulogu u patofiziologiji I/R ozljede, odnosno da je povećan utok kalcija u stanicu i mitohondrije jedna od glavnih karakteristika I/R ozljede (10, 18).

U dostupnoj literaturi nalazimo na eksperimentalne radove o povoljnom utjecaju blokatora kalcijevih kanala na I/R ozljedu srca, jetre, mozga i bubrega (161-165). Chattopadhyay i suradnici su pokazali da preventivno djelovanje kalcijevog blokatora (Amlodipina) smanjuje utok kalcija u mitohondrije i djeluje na ekspresiju Bcl-2 proteina, smanjujući tako apoptozu kod I/R ozljede jetre (166). U drugom radu isti autor dokazuje da Amlodipin ublažava I/R ozljedu jetre čuvajući funkciju mitohondrija. Naime, blokadom utoka kalcija u mitohondrije stanica jetre povećava aktivnost glutathion-S transferaze, katalaze, superoksid dizmutaze te enzima u mitohondrijskom respiratornom lancu NADPH dehidrogenaze, malat dehidrogenaze i sukcinat dehidrogenaze što upućuje i na njegovu antioksidativnu aktivnost. Do poboljšanja dovodi i unutar same histološke strukture mitohondrija koje su analizirali elektronskim mikroskopom (161).

U našem istraživanju dokazali smo pozitivne učinke nifedipina na akutnu T/D ozljedu testisa u štakora. Pokazali i smo da nifedipin smanjuje oksidacijski stres i apoptozu kod T/D ozljede testisa.

Iako nismo proučavali mehanizam djelovanja kalcijevih blokatora, pozivajući se na navedenu literaturu za pretpostaviti je da svoj učinak postiže smanjenjem koncentracije kalcija u stanici i mitohondrijima. U uvjetima I/R ozljede koncentracija kalcija u stanici i mitohondrijima je povećana što ima za posljedicu induciranje apoptoze kao i pojačano stvaranje ROS-a, a to doprinosi oštećenju stanice odnosno tkiva i organa. Također smo dokazali da torzija testisa za 720 stupnjeva u 3 sata bitnije ne oštećuje sjemenski epitel. Johnsen skor je ostao praktički nepromijenjen.

Brojna eksperimentalna istraživanja su dokazala zaštitni učinak različitih tvari na akutnu T/D ozljedu testisa, međutim niti jedna nije zaživjela u praksi. Saznanje da kalcijevi blokatori djeluju protektivno na akutnu T/D ozljedu testisa u štakora daje nam nadu da će možda neki od lijekova iz te skupine zaživjeti u praksi.

Poznato je da oštećenje ipsilateralnog testisa dovodi do oštećenja suprotnog testisa. U mnogim radovima na životinjama je potvrđena ova tvrdnja (38, 106, 167-169), dok neki autori ne navode oštećenje suprotnog testisa (29, 170, 171). Naši rezultati nakon 3 sata ishemije i 3 sata reperfuzije ne pokazuju promjene u histološkoj građi u suprotnom testisu što se slaže s radom Turnera i suradnika. To možemo objasniti i relativno kratkim vremenom ishemije. Za razliku od histološke građe, u suprotnom testisu nalazimo promjene u markerima oksidacijskog stresa. To upućuje da jednostrana T/D ozljeda testisa ipak utječe na suprotni testis. Ostaje nejasno koliko snažno mora biti oštećenje ipsilateralnog testisa da bi došlo do značajnog oštećenja suprotnog testisa i koji su sve mehanizmi neposredno odgovorni za njegovo oštećenje.

6 ZAKLJUČAK

- Jednostrana T/D ozljeda (Tri sata torzije i tri sata detorzije) testisa štakora dovodi do oksidacijskog stresa i pojačane apoptoze u ipsilateralnom testisu
- Nifedipin - blokator kalcijevih kanala, smanjuje oksidacijski stres i apoptozu u ipsilateralnom testisu kod jednostrane T/D ozljede testisa štakora
- Tri sata torzije i tri sata detorzije testisa štakora značajno ne utječe na Johnsen kriterije sjemenskog epitela ipsilateralnog testisa
- Tri sata torzije i tri sata detorzije testisa štakora značajno utječe na oksidacijski stres suprotnog testisa
- Tri sata torzije i tri sata detorzije testisa štakora značajno ne utječe na apoptozu i Johnsen kriterije sjemenskog epitela suprotnog testisa

7 SAŽETAK

Pozadina/svrha: Torzija testisa je stanje koje zahtijeva žurnu dijagnostiku i liječenje kako bi se sačuvala vitalnost testisa i eventualna plodnost. Objavljene su mnoge studije o utjecaju različitih lijekova i supstanci koje imaju zaštitnu ulogu na testis prilikom jednostrane T/D ozljede, ali niti jedna nije zaživjela u svakodnevnoj praksi. Cilj ovog rada bio je ispitati akutni utjecaj nifedipina na jednostranu T/D ozljedu testisa u štakora.

Metode: Dvadeset četiri mužjaka štakora soja Sprague Dawley u dobi od 9 tjedana (odrasli štakori) je podijeljeno u tri skupine, svaka po 8 štakora. Prva skupina je bila kontrolna ili lažno operirana, druga skupina je bila skupina kojoj smo učinili jednostranu torziju testisa za 720 stupnjeva u trajanju od 3 sata, a treća skupina su bili štakori kojima smo također učinili jednostranu torziju testisa za 720 stupnjeva u trajanju od 3 sata, ali 30 minuta prije detorzije smo im dali intraperitonealno nifedipin. Nakon dodatnih 3 sata reperfuzije učinili smo obostranu orhidektomiju. Odstranjene testise smo analizirali na oksidacijski stres (aktivnost enzima glutation peroksidaze i superoksid dizmutaze i koncentraciju malondialdehida u tkivu testisa). Učinjena je histološka analiza po Johnsen kriterijima te je mjerena apoptoza.

Rezultati: U skupini štakora kod jednostrane T/D ozljede koja je primila nifedipin, ipsilateralni testis je pokazao manje oštećenje u odnosu na skupinu koja nije dobila nifedipin (Manji oksidacijski stres, manji apoptotski index). Nakon jednostrane T/D ozljede (3 sata torzije i 3 sata detorzije) nema značajnih akutnih promjena sjemenskog epitela po Johnsenovim kriterijima. Jednostrana T/D ozljeda testisa dovodi do povećanog oksidacijskog stresa u suprotnom testisu.

Zaključak: Nifedipin djeluje zaštitno na ipsilateralni testis kod jednostrane akutne T/D ozljede testisa u štakora.

8 SUMMARY

Background/aims: Testicular torsion is a condition that requires immediate diagnosis and treatment in order to preserve the vitality of the testicles and possible fertility. Many studies about the effect of various drugs and substances that have a protective effect on the testicle in T/D injury has been published but none become entrenched in everyday practice. The aim of this study was to investigate the effect of nifedipine on the unilateral testicular T/D injury in rats.

Methods: Twenty-four adult male Sprague-Dawley rats, aged 9 weeks (adult rats) were randomly divided into 3 groups, each containing 8 rats. Rats in the control group underwent a sham operation of the left testis. In the T/D group, the left testis was twisted at 720° for 3 hours. After 3 hours of reperfusion, at the end of the experiment, the testes were removed. Rats in the treatment group received the same surgical procedure as the T/D group, but nifedipine was administered intraperitoneally 30 minutes before the time of detorsion. After an additional 3 hours of reperfusion bilateral orchiectomy was performed. Removed testes were analyzed for oxidative stress (activity of the enzyme glutathione peroxidase, superoxide dismutase and malondialdehyde in testicular tissue). Histological analysis by Johnsen's criteria was performed and apoptosis was measured.

Results: In the group of rats with unilateral T/D injury, treated with nifedipine, ipsilateral testis showed less damage compared to the group that did not receive nifedipine (lower oxidative stress and apoptotic index). There were no significant differences in Johnsen's criteria after a unilateral I/R injury (3 hours torsion and 3 hours detorsion). Also no significant differences in contra lateral testis after unilateral I/R injury were recorded except in oxidative stress.

Conclusion: Nifedipine has protective effect on ipsilateral testicle after unilateral acute T/D injury of the rat's testicle.

9 LITERATURA

1. Drlik M, Kocvara R. Torsion of spermatic cord in children: a review. *J Pediatr Urol.* 2013;9(3):259-66.
2. Gunther P, Rubben I. The acute scrotum in childhood and adolescence. *Dtsch Arztebl Int.* 2012;109(25):449-57.
3. Saxena AK, Castellani C, Ruttensstock EM, Hollwarth ME. Testicular torsion: a 15-year single-centre clinical and histological analysis. *Acta Paediatr.* 2012;101(7):1651-2227.
4. Cattolica EV, Karol JB, Rankin KN, Klein RS. High testicular salvage rate in torsion of the spermatic cord. *J Urol.* 1982;128(1):66-8.
5. Holcomb GW, Murphy JP ed. *Aschraft's pediatric surgery*, Philadelphia: Saunders Elsevier. 2010; 687-92.
6. Cavusoglu YH, Karaman A, Karaman I, Erdogan D, Aslan MK, Varlikli O, et al. Acute scrotum -- etiology and management. *Indian J Pediatr.* 2005;72(3):201-3.
7. Jefferson RH, Perez LM, Joseph DB. Critical analysis of the clinical presentation of acute scrotum: a 9-year experience at a single institution. *J Urol.* 1997;158(3):1198-200.
8. Makela E, Lahdes-Vasama T, Rajakorpi H, Wikstrom S. A 19-year review of paediatric patients with acute scrotum. *Scand J Surg.* 2007;96(1):62-6.
9. Gearhar JP RR, Mouriqand PDE ed. *Pediatric urology*, Philadelphia, Saunders Elsevier; 2010;1-10.
10. Sirotkovic-Skerlev M, Plestina S, Bilic I, Kovac Z. [Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury]. *Lijec Vjesn.* 2006;128(3-4):87-95.
11. McCord JM, Roy RS, Schaffer SW. Free radicals and myocardial ischemia. The role of xanthine oxidase. *Adv Myocardiol.* 1985;5:183-9.
12. Argaud L, Gateau-Roesch O, Chalabreysse L, Gomez L, Loufouat J, Thivolet-Bejui F, et al. Preconditioning delays Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res.* 2004;61(1):115-22.
13. Duchen MR. Mitochondria and Ca²⁺ in cell physiology and pathophysiology. *Cell Calcium.* 2000;28(5-6):339-48.

14. Budde JM, Morris CD, Velez DA, Muraki S, Wang NP, Guyton RA, et al. Reduction of infarct size and preservation of endothelial function by multidose intravenous adenosine during extended reperfusion. *J Surg Res.* 2004;116(1):104-15.
15. Allen BS. The role of leukodepletion in limiting ischemia/reperfusion damage in the heart, lung and lower extremity. *Perfusion.* 2002;17:11-22.
16. Stephanou A. Role of STAT-1 and STAT-3 in ischaemia/reperfusion injury. *J Cell Mol Med.* 2004;8(4):519-25.
17. Meldrum DR.. Tumor necrosis factor in the heart. *Am J Physiol.* 1998;274(3):577-95.
18. Zhivotovsky B, Orrenius S. Calcium and cell death mechanisms: a perspective from the cell death community. *Cell Calcium.* 2011;50(3):211-21.
19. Pinton P, Ferrari D, Rapizzi E, Di Virgilio F, Pozzan T, Rizzuto R. A role for calcium in Bcl-2 action? *Biochimie.* 2002;84(2-3):195-201.
20. Mellgren RL. Calcium-dependent proteases: an enzyme system active at cellular membranes? *Faseb J.* 1987;1(2):110-5.
21. Mikuz G. Testicular torsion: simple grading for histological evaluation of tissue damage. *Appl Pathol.* 1985;3(3):134-9.
22. Perez CV, Theas MS, Jacobo PV, Jarazo-Dietrich S, Guazzone VA, Lustig L. Dual role of immune cells in the testis: Protective or pathogenic for germ cells? *Spermatogenesis.* 2013;3(1).
23. Visser AJ, Heyns CF. Testicular function after torsion of the spermatic cord. *BJU Int.* 2003;92(3):200-3.
24. Cerasaro TS, Nachtsheim DA, Otero F, Parsons CL. The effect of testicular torsion on contralateral testis and the production of antisperm antibodies in rabbits. *J Urol.* 1984;132(3):577-9.
25. Schanaider A, Aiex CA, Errico G. Immunological effects of acute testicular torsion on the contralateral testis in rats. *Eur J Pediatr Surg.* 2011;21(6):370-4.
26. Akgur FM, Kilinc K, Tanyel FC, Buyukpamukcu N, Hicsonmez A. Ipsilateral and contralateral testicular biochemical acute changes after unilateral testicular torsion and detorsion. *Urology.* 1994;44(3):413-8.
27. Yazihan N, Ataoglu H, Koku N, Erdemli E, Sargin AK. Protective role of erythropoietin during testicular torsion of the rats. *World J Urol.* 2007;25(5):531-6.

28. Stern JA, Lui RC, LaRegina MC, Herbold DR, Tolman KC, Johnson FE. Long-term outcome following testicular ischemia in the rat. *J Androl.* 1990;11(4):390-5.
29. Turner TT. Acute experimental testicular torsion. No effect on the contralateral testis. *J Androl.* 1985;6(1):65-72.
30. Hadziselimovic F, Geneto R, Emmons LR. Increased apoptosis in the contralateral testes of patients with testicular torsion as a factor for infertility. *J Urol.* 1998;160(3):1158-60.
31. Sade M, Amato S, Buyuksu C, Mertan S, Canda MS, Kaplanoglu N. The effect of testicular torsion on the contralateral testis and the value of various types of treatment. *Br J Urol.* 1988;62(1):69-71.
32. Romeo C, Impellizzeri P, Arrigo T, Antonuccio P, Valenzise M, Mirabelli S, et al. Late hormonal function after testicular torsion. *J Pediatr Surg.* 2010;45(2):411-3.
33. Nagler HM, White RD. The effect of testicular torsion on the contralateral testis. *J Urol.* 1982;128(6):1343-8.
34. Madarikan BA. Testicular salvage following spermatic cord torsion. *J Pediatr Surg.* 1987;22(3):231-4.
35. Filho DW, Torres MA, Bordin AL, Crezcynski-Pasa TB, Boveris A. Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusion injury. *Mol Aspects Med.* 2004;25(1-2):199-210.
36. Yildiz H, Durmus AS, Simsek H, Yaman M. Protective effect of sildenafil citrate on contralateral testis injury after unilateral testicular torsion/detorsion. *Clinics.* 2011;66(1):137-42.
37. Costabile RA, Choyke PL, Frank JA, Girton ME, Diggs R, Billups KL, et al. Variability of ischemia during spermatic cord torsion in the rat. *J Urol.* 1994;151(4):1070-2.
38. Sukhotnik I, Miselevich I, Lurie M, Nativ O, Coran AG, Mogilner JG. The time relationship between ipsilateral testicular ischemia and germ cell apoptosis in the contralateral testis in rat. *Pediatr Surg Int.* 2005;21(7):512-6.
39. Chen L, Zhan WW, Shen ZJ, Rui WB, Lv C, Chen M, et al. Blood perfusion of the contralateral testis evaluated with contrast-enhanced ultrasound in rabbits with unilateral testicular torsion. *Asian J Androl.* 2009;11(2):253-60.
40. Nguyen L, Lievano G, Ghosh L, Radhakrishnan J, Fornell L, John E. Effect of unilateral testicular torsion on blood flow and histology of contralateral testes. *J Pediatr Surg.* 1999;34(5):680-3.

41. Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Cargnoni A, Pasini E, De Giuli F, et al. Role of oxygen free radicals in ischemic and reperfused myocardium. *Am J Clin Nutr.* 1991;53(1):215-22.
42. Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;1:173-9.
43. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82(1):47-95.
44. Toyokuni S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int.* 1999;49(2):91-102.
45. Schanne FA, Kane AB, Young EE, Farber JL. Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science.* 1979;206(4419):700-2.
46. Lemasters JJ, DiGuseppi J, Nieminen AL, Herman B. Blebbing, free Ca^{2+} and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. *Nature.* 1987;325(6099):78-81.
47. Kristian T, Siesjo BK. Calcium in ischemic cell death. *Stroke.* 1998;29(3):705-18.
48. Krvavica S GS. Integralna reakcija stanice na ozljedu. In: Gamulin S MM, Kovač Z, ed. *Patofiziologija.* Zagreb: Medicinska naklada. 2002;15-23.
49. Hoffman JW, Jr., Gilbert TB, Poston RS, Silldorff EP. Myocardial reperfusion injury: etiology, mechanisms, and therapies. *J Extra Corpor Technol.* 2004;36(4):391-411.
50. Halliwell B GJ. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 3-rd, ed. New York: Oxford University Press; 2001.
51. Kohli V, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA. Calpain mediates ischemic injury of the liver through modulation of apoptosis and necrosis. *Gastroenterology.* 1999;116(1):168-78.
52. Wang KK, Posmantur R, Nadimpalli R, Nath R, Mohan P, Nixon RA, et al. Caspase-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis. *Arch Biochem Biophys.* 1998;356(2):187-96.
53. Lane RD, Allan DM, Mellgren RL. A comparison of the intracellular distribution of mu-calpain, m-calpain, and calpastatin in proliferating human A431 cells. *Exp Cell Res.* 1992;203(1):5-16.
54. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 1990;186:1-85.

55. Neviere FM.. Biological sources of reduced oxygen species. In: Favier A, Cadet J, ed. Analysis of free radicals in biological systems. Basel: Birkhauser Verlag.1995;11-9.
56. Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry*. 2005;70(2):200-14.
57. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84.
58. Kruidenier L, Verspaget HW. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease--radicals or ridiculous? *Aliment Pharmacol Ther*. 2002;16(12):1997-2015.
59. Gutteridge JM. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact*. 1994;91(2-3):133-40.
60. Lee HC, Wei YH. Mitochondrial role in life and death of the cell. *J Biomed Sci*. 2000;7(1):2-15.
61. Fulton D, McGiff JC, Wolin MS, Kaminski P, Quilley J. Evidence against a cytochrome P450-derived reactive oxygen species as the mediator of the nitric oxide-independent vasodilator effect of bradykinin in the perfused heart of the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;280(2):702-9.
62. Crane D, Masters C. On the role of catalase in the oxidation of tissue fatty acids. *Arch Biochem Biophys*. 1984;229(1):104-11.
63. Caccese D, Pratico D, Ghiselli A, Natoli S, Pignatelli P, Sanguigni V, et al. Superoxide anion and hydroxyl radical release by collagen-induced platelet aggregation--role of arachidonic acid metabolism. *Thromb Haemost*. 2000;83(3):485-90.
64. Knight JA. Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann Clin Lab Sci*. 2000;30(2):145-58.
65. Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2010;15(4):186-90.
66. Reinhold WC, Reimers MA, Maunakea AK, Kim S, Lababidi S, Scherf U, et al. Detailed DNA methylation profiles of the E-cadherin promoter in the NCI-60 cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2007;6(2):391-403.
67. Duguay D, Foty RA, Steinberg MS. Cadherin-mediated cell adhesion and tissue segregation: qualitative and quantitative determinants. *Dev Biol*. 2003;253(2):309-23.

68. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 1991;11(1):81-128.
69. Ayala A, Munoz MF, Arguelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal: *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:360438..
70. Catala A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(9):1482-95.
71. Fagali N, Catala A. Fe²⁺ and Fe³⁺ initiated peroxidation of sonicated and non-sonicated liposomes made of retinal lipids in different aqueous media. *Chem Phys Lipids.* 2009;159(2):88-94.
72. Blake D WP. Immunopharmacology of free radical species. Academic Press. 1995:23-37.
73. Porter NA. Chemistry of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1984;105:273-82.
74. Armstrong D. Free radicals in diagnostic medicine. A systems approach to laboratory technology cc, and antioxidant therapy. Plenum Press, New York, London 1994:43-58. . A systems approach to laboratory technology, clinical correlations, and antioxidant therapy. In: D. A, editor. Free radicals in diagnostic medicine. New York, London: Plenum Press; 1994.43-58.
75. Aikens J, Dix TA. Peroxyl radical (HOO.) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. *J Biol Chem.* 1991;266(23):15091-8.
76. Almeida A, Allen KL, Bates TE, Clark JB. Effect of reperfusion following cerebral ischaemia on the activity of the mitochondrial respiratory chain in the gerbil brain. *J Neurochem.* 1995;65(4):1698-703.
77. Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev.* 1999;79(4):1127-55.
78. Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol.* 2002;64(5-6):1019-26.
79. Pastore A, Piemonte F, Locatelli M, Lo Russo A, Gaeta LM, Tozzi G, et al. Determination of blood total, reduced, and oxidized glutathione in pediatric subjects. *Clin Chem.* 2001;47(8):1467-9.
80. Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol.* 2000;62(6):649-71.

81. Shukla KK, Mahdi AA, Rajender S. Apoptosis, spermatogenesis and male infertility. *Front Biosci.* 2012;4:746-54.
82. Fleiss PM, Hodges FM, Van Howe RS. Immunological functions of the human prepuce. *Sex Transm Infect.* 1998;74(5):364-7.
83. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26(4):239-57.
84. Wyllie AH. The genetic regulation of apoptosis. *Curr Opin Genet Dev.* 1995;5(1):97-104.
85. Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol.* 2003;171(9):4672-9.
86. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature.* 2000;407(6805):784-8.
87. Buttyan R, Gobe G. Apoptosis in the mammalian kidney: incidence, effectors, and molecular control in normal development and disease states. *Adv Pharmacol.* 1997;41:369-81.
88. Zhang Y, Herman B. Ageing and apoptosis. *Mech Ageing Dev.* 2002;123(4):245-60.
89. Schumer M, Colombel MC, Sawczuk IS, Gobe G, Connor J, O'Toole KM, et al. Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. *Am J Pathol.* 1992;140(4):831-8.
90. Davis MA, Ryan DH. Apoptosis in the kidney. *Toxicol Pathol.* 1998;26(6):810-25.
91. Reed JC. Mechanisms of apoptosis: *Am J Pathol.* 2000 Nov;157(5):1415-30.
92. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000;407(6805):770-6.
93. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science.* 1998;281(5381):1312-6.
94. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516.
95. Cor A, Pizem J, Gale N. Immunohistochemical analysis of pro- and active-caspase 3 in laryngeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch.* 2004;444(5):439-46.
96. Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, Morris RG, Bird CC, Hooper ML, et al. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature.* 1993;362(6423):849-52.

97. Komarova EA, Gudkov AV. Chemoprotection from p53-dependent apoptosis: potential clinical applications of the p53 inhibitors. *Biochem Pharmacol.* 2001;62(6):657-67.
98. de Rooij DG. Stem cells in the testis. *Int J Exp Pathol.* 1998;79(2):67-80.
99. Hadziselimovic F, Herzog B. The importance of both an early orchidopexy and germ cell maturation for fertility: *Lancet.* 2001 Oct 6;358(9288):1156-7.
100. Cortes D, Thorup J, Lindenberg S, Visfeldt J. Infertility despite surgery for cryptorchidism in childhood can be classified by patients with normal or elevated follicle-stimulating hormone and identified at orchidopexy. *BJU Int.* 2003;91(7):670-4.
101. Hadziselimovic F, Zivkovic D, Bica DT, Emmons LR. The importance of mini-puberty for fertility in cryptorchidism. *J Urol.* 2005;174(4):1536-9.
102. Ong C, Hasthorpe S, Hutson JM. Germ cell development in the descended and cryptorchid testis and the effects of hormonal manipulation. *Pediatr Surg Int.* 2005;21(4):240-54.
103. Amann RP. The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? *J Androl.* 2008;29(5):469-87.
104. Schlatt S, von Schonfeldt V, Nieschlag E. Germ cell transplantation in the male: animal studies with a human perspective. *Hum Fertil.* 1999;2(2):143-8.
105. Bartke A. Apoptosis of male germ cells, a generalized or a cell type-specific phenomenon?: *Endocrinology.* 1995 Jan;136(1):3-4.
106. Rodriguez MG, Rival C, Theas MS, Lustig L. Immunohistopathology of the contralateral testis of rats undergoing experimental torsion of the spermatic cord. *Asian J Androl.* 2006;8(5):576-83.
107. Print CG, Loveland KL. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *Bioessays.* 2000;22(5):423-30.
108. Huleihel M, Lunenfeld E. Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. *Asian J Androl.* 2004;6(3):259-68.
109. Simoni M, Weinbauer GF, Gromoll J, Nieschlag E. Role of FSH in male gonadal function. *Ann Endocrinol.* 1999;60(2):102-6.
110. Anthony CT, Danzo BJ, Orgebin-Crist MC. Investigations on the relationship between sperm fertilizing ability and androgen-binding protein in the hypophysectomized, pregnenoloneenolone-injected rat. *Endocrinology.* 1984;114(4):1419-25.

111. Pareek TK, Joshi AR, Sanyal A, Dighe RR. Insights into male germ cell apoptosis due to depletion of gonadotropins caused by GnRH antagonists. *Apoptosis*. 2007;12(6):1085-100.
112. Leandri RD, Dulious E, Benbrik E, Jouannet P, De Almeida M. Deficit in cytochrome c oxidase activity induced in rat sperm mitochondria by in vivo exposure to zidovudine. *Int J Androl*. 2003;26(5):305-9.
113. Fulda S, Gorman AM, Hori O, Samali A. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int J Cell Biol*. 2010;214074(10):21.
114. Xu Q, Lin HY, Yeh SD, Yu IC, Wang RS, Chen YT, et al. Infertility with defective spermatogenesis and steroidogenesis in male mice lacking androgen receptor in Leydig cells. *Endocrine*. 2007;32(1):96-106.
115. Samanta L, Sahoo A, Chainy GB. Age-related changes in rat testicular oxidative stress parameters by hexachlorocyclohexane. *Arch Toxicol*. 1999;73(2):96-107.
116. Collin T, Wang JJ, Nargeot J, Schwartz A. Molecular cloning of three isoforms of the L-type voltage-dependent calcium channel beta subunit from normal human heart. *Circ Res*. 1993;72(6):1337-44.
117. Spedding M, Paoletti R. Classification of calcium channels and calcium antagonists: progress report. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1992;6(1):35-9.
118. Zaputović L MŽ, Vitzeć D. Blokatori kalcijских kanala. *Medicus*. 2010;19(2):131-37.
119. Triggle DJ. Calcium channel antagonists: clinical uses--past, present and future. *Biochem Pharmacol*. 2007;74(1):1-9.
120. Triggle DJ. L-type calcium channels. *Curr Pharm Des*. 2006;12(4):443-57.
121. Erdinc M, Erdinc L, Nergiz Y, Kelle I. The Effects of Nifedipine on Renal Perfusion Pressure and Kidney During Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Rats. *Dicle Med J*. 2007;34(4):248-53.
122. Allanore Y, Borderie D, Perianin A, Lemarechal H, Ekindjian OG, Kahan A. Nifedipine protects against overproduction of superoxide anion by monocytes from patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(1):16.
123. Mason RP, Leeds PR, Jacob RF, Hough CJ, Zhang KG, Mason PE, et al. Inhibition of excessive neuronal apoptosis by the calcium antagonist amlodipine and antioxidants in cerebellar granule cells. *J Neurochem*. 1999;72(4):1448-56.

124. Waltereit R, Mannhardt S, Nescholta S, Maser-Gluth C, Bartsch D. Selective and protracted effect of nifedipine on fear memory extinction correlates with induced stress response. *Learn Mem.* 2008;15(5):348-56.
125. Aktas BK, Bulut S, Baykam MM, Ozden C, Senes M, Yucel D, et al. The effects of N-acetylcysteine on testicular damage in experimental testicular ischemia/reperfusion injury. *Pediatr Surg Int.* 2010;26(3):293-8.
126. Wei SM, Yan ZZ, Zhou J. Beneficial effect of taurine on testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *Urology.* 2007;70(6):1237-42.
127. Ranade AV, Tripathi Y, Rajalakshmi R, Vinodini NA, Soubhagya RN, Nayanatara AK, et al. Effect of vitamin E administration on histopathological changes in rat testes following torsion and detorsion. *Singapore Med J.* 2011;52(10):742-6.
128. Johnsen SG. Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones.* 1970;1(1):2-25.
129. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967;70(1):158-69.
130. Akondi BR, Challa SR, Akula A. Protective effects of rutin and naringin in testicular ischemia-reperfusion induced oxidative stress in rats. *J Reprod Infertil.* 2011;12(3):209-14.
131. Turner TT, Tung KS, Tomomasa H, Wilson LW. Acute testicular ischemia results in germ cell-specific apoptosis in the rat. *Biol Reprod.* 1997;57(6):1267-74.
132. Al-Maghrebi M, Kehinde EO, Anim JT. Long term testicular ischemia-reperfusion injury-induced apoptosis: involvement of survivin down-regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;395(3):342-7.
133. Granger DN, Korthuis RJ. Physiologic mechanisms of postischemic tissue injury. *Annu Rev Physiol.* 1995;57:311-32.
134. Lysiak JJ, Turner SD, Nguyen QA, Singbartl K, Ley K, Turner TT. Essential role of neutrophils in germ cell-specific apoptosis following ischemia/reperfusion injury of the mouse testis. *Biol Reprod.* 2001;65(3):718-25.
135. Wei SM, Yan ZZ, Zhou J. Protective effect of rutin on testicular ischemia-reperfusion injury. *J Pediatr Surg.* 2011;46(7):1419-24.
136. Abasiyanik A, Dagdonderen L. Beneficial effects of melatonin compared with allopurinol in experimental testicular torsion. *J Pediatr Surg.* 2004;39(8):1238-41.

137. Kehinde EO, Anim JT, Mojiminiyi OA, Al-Awadi F, Shihab-Eldeen A, Omu AE, et al. Allopurinol provides long-term protection for experimentally induced testicular torsion in a rabbit model. *BJU Int.* 2005;96(1):175-80.
138. Avlan D, Erdougan K, Cimen B, Dusmez Apa D, Cinel I, Aksoyek S. The protective effect of selenium on ipsilateral and contralateral testes in testicular reperfusion injury. *Pediatr Surg Int.* 2005;21(4):274-8.
139. Aitken RJ, Koppers AJ. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J Androl.* 2011;13(1):36-42.
140. Kim ED, Barqawi AZ, Seo JT, Meacham RB. Apoptosis: its importance in spermatogenic dysfunction. *Urol Clin North Am.* 2002;29(4):755-65.
141. Martincic DS, Virant Klun I, Zorn B, Vrtovec HM. Germ cell apoptosis in the human testis. *Pflugers Arch.* 2001;442(6 Suppl 1):R159-60.
142. Ferlin A, Speltra E, Patassini C, Pati MA, Garolla A, Caretta N, et al. Heat shock protein and heat shock factor expression in sperm: relation to oligozoospermia and varicocele. *J Urol.* 2010;183(3):1248-52.
143. Rendtorff R, Hohmann C, Reinmuth S, Muller A, Dittrich R, Beyer M, et al. Hormone and Sperm Analyses after Chemo- and Radiotherapy in Childhood and Adolescence. *Klin Padiatr.* 2010;222(3):145-9.
144. Theas S, Rival C, Lustig L. Germ cell apoptosis in autoimmune orchitis: involvement of the Fas-FasL system. *Am J Reprod Immunol.* 2003;50(2):166-76.
145. Richburg JH, Nanez A. Fas- or FasL-deficient mice display an increased sensitivity to nitrobenzene-induced testicular germ cell apoptosis. *Toxicol Lett.* 2003;139(1):1-10.
146. La Sala G, Farini D, De Felici M. Proapoptotic effects of lindane on mouse primordial germ cells. *Toxicol Sci.* 2009;108(2):445-51.
147. Cavalcanti MC, Steilmann C, Failing K, Bergmann M, Kliesch S, Weidner W, et al. Apoptotic gene expression in potentially fertile and subfertile men. *Mol Hum Reprod.* 2011;17(7):415-20.
148. Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas AJ, Jr., Falcone T, Agarwal A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril.* 2003;80(3):531-5.
149. Said TM, Paasch U, Glander HJ, Agarwal A. Role of caspases in male infertility. *Hum Reprod Update.* 2004;10(1):39-51.

150. Taylor SL, Weng SL, Fox P, Duran EH, Morshedi MS, Oehninger S, et al. Somatic cell apoptosis markers and pathways in human ejaculated sperm: potential utility as indicators of sperm quality. *Mol Hum Reprod.* 2004;10(11):825-34.
151. Knudson CM, Tung KS, Tourtellotte WG, Brown GA, Korsmeyer SJ. Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science.* 1995;270(5233):96-9.
152. Russell LD, Chiarini-Garcia H, Korsmeyer SJ, Knudson CM. Bax-dependent spermatogonia apoptosis is required for testicular development and spermatogenesis. *Biol Reprod.* 2002;66(4):950-8.
153. Ross AJ, Waymire KG, Moss JE, Parlow AF, Skinner MK, Russell LD, et al. Testicular degeneration in Bclw-deficient mice. *Nat Genet.* 1998;18(3):251-6.
154. Yazawa H, Sasagawa I, Suzuki Y, Nakada T. Glucocorticoid hormone can suppress apoptosis of rat testicular germ cells induced by testicular ischemia. *Fertil Steril.* 2001;75(5):980-5.
155. Dokmeci D, Kanter M, Inan M, Aydogdu N, Basaran UN, Yalcin O, et al. Protective effects of ibuprofen on testicular torsion/detorsion-induced ischemia/reperfusion injury in rats. *Arch Toxicol.* 2007;81(9):655-63.
156. Zhou X-L, Yang Q-S, Ni S-Z, Tu X-P, Zhao Y, Xu B, et al. Protective Effects of Lipoxin A4 in Testis Injury following Testicular Torsion and Detorsion in Rats. *Mediators of Inflammation.* 2014;2014:9.
157. Zheng X, Zhang X, Feng B, Sun H, Suzuki M, Ichim T, et al. Gene silencing of complement C5a receptor using siRNA for preventing ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol.* 2008;173(4):973-80.
158. Ozkisacik S, Yazici M, Gursoy H, Serter M, Culhaci N. The effects of short-interval postconditioning in preventing testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg.* 2011;46(3):546-50.
159. Ozkisacik S, Erdem AO, Durmaz O, Culhaci N, Gursoy H, Yazici M. The long-term protective effects of short-interval postconditioning in testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg.* 2012;47(4):743-6.
160. Mockford KA, Girn HR, Homer-Vanniasinkam S. Postconditioning: current controversies and clinical implications. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2009;37(4):437-42.

161. Pronobesh C, Dagagi AV, Pallab C, Kumar WA. Protective role of the calcium channel blocker amlodipine against mitochondrial injury in ischemia and reperfusion injury of rat liver. *Acta Pharm.* 2008;58(4):421-8.
162. Yui H, Imaizumi U, Beppu H, Ito M, Furuya M, Arisaka H, et al. Comparative Effects of Verapamil, Nicardipine, and Nitroglycerin on Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Anesthesiology Research and Practice.* 2011;2011:6.
163. Tucci S, Jr., Borelli-Bovo TJ, Cologna AJ, Tiraboschi RB, Martins AC, Roselino JE. Calcium channel blocker and renal mitochondrial function in warm renal ischemia. *Int Braz J Urol.* 2005;31(4):384-9.
164. Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(6):1503-20.
165. Horn J, Limburg M. Calcium antagonists for ischemic stroke: a systematic review. *Stroke.* 2001;32(2):570-6.
166. Chattopadhyay P, Verma N, Verma A, Shukla G, Wahi AK. Calcium antagonist prevents calcium flux induced necrosis and apoptosis in ischemic reperfusion of rat liver. *Indian J Clin Biochem.* 2008;23(4):356-60.
167. Cosentino MJ, Nishida M, Rabinowitz R, Cockett AT. Histological changes occurring in the contralateral testes of prepubertal rats subjected to various durations of unilateral spermatic cord torsion. *J Urol.* 1985;133(5):906-11.
168. Harrison RG, Lewis-Jones DI, Moreno de Marval MJ, Connolly RC. Mechanism of damage to the contralateral testis in rats with an ischaemic testis. *Lancet.* 1981;2(8249):723-5.
169. Aydin S, Ugras S, Odabas O, Yilmaz Y, Atilla MK, Yegin E. Experimental testicular torsion and its effects on the contralateral testicle. *Int Urol Nephrol.* 1997;29(6):661-5.
170. Lorenzini F, Tambara Filho R, Gomes RP, Martino-Andrade AJ, Erdmann TR, Matias JE. Long-term effects of the testicular torsion on the spermatogenesis of the contralateral testis and the preventive value of the twisted testis orchiepididymectomy. *Acta Cir Bras.* 2012;27(6):388-95.
171. Ozgur GK, Piskin B, Sivrikaya A, Gacar N, Erkul S. Effect of testicular torsion on the contralateral testis. *Int Urol Nephrol.* 1990;22(5):461-6.

