

Učinak astaksantina na torzijsko-detorzijsku ozljedu testisa u štakora

Bašković, Marko

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:445123>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-12**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Marko Bašković

**Učinak astaksantina na torzijsko-detorzijsku
ozljedu testisa u štakora**

DISERTACIJA



Zagreb, 2021.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Marko Bašković

**Učinak astaksantina na torzijsko-detorzijsku
ozljedu testisa u štakora**

DISERTACIJA

Zagreb, 2021.

Disertacija je izrađena na Zavodu za biologiju te Zavodu za histologiju i embriologiju
Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Disertacija je izrađena uz potporu Znanstvenog centra izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu, Republika Hrvatska, i Europske unije kroz Europski fond za regionalni razvoj, pod ugovorom KK.01.1.1.01.0008., projekt „Reproduktivna i regenerativna medicina – istraživanje novih platformi i potencijala“

Voditelj rada: prof. dr. sc. Davor Ježek, dr. med.



Zahvaljujem svome mentoru **prof. dr. sc. Davoru Ježeku, dr. med.**
na strpljenju, pomoći i vodstvu pri pisanju ove disertacije.
Uvijek ste bili pri ruci kada bi mi trebao savjet uz sveprisutnu dozu optimizma.
Veliko Vam Hvala!

Zahvaljujem se **izv. prof. dr. sc. Ani Katušić Bojanac dipl. ing. mol. biol. te**
izv. prof. dr. sc. Ninu Sinčiću, dr. med. na dragocjenim savjetima prilikom izrade i pisanja
ove disertacije.

Zahvaljujem se **Marti Himmelreich Perić, dr. med.**
na pomoći oko histološkog i imunohistokemijskog dijela disertacije.

Zahvaljujem se **Dajani Krsnik, mag. biol. exp.**
na pomoći oko biokemijskog dijela disertacije.

Zahvaljujem se **prof. dr. sc. Zdenku Sonickom, dr. med.**
na dragocjenim savjetima vezanima uz statističke metode i odabir testova.

Zahvaljujem se **Milanu Kopaču, vet. teh.**
na brizi o štakorima te pomoći prilikom provođenja eksperimenta na istima.
Također zahvaljujem na brizi o svim uzorcima koji su skoro nastradali
prilikom stoljetnog potresa u Zagrebu.

Zahvaljujem se **Mariani Dragojević, ing. med. lab.**
na pripremi uzoraka za histološku i imunohistokemijsku analizu.

Zahvaljujem se i svim ostalim djelatnicima Zavoda za biologiju
te Zavoda za histologiju i embriologiju koji su me oduševili svojom ljudskošću.

Zahvaljujem svim profesorima
koji su mi za vrijeme poslijediplomskog doktorskog studija prenijeli svoja znanja, vještine i
iskustva.

Zahvaljujem svim kolegicama i kolegama
koji su mi vrijeme provedeno na poslijediplomskom doktorskome studiju uljepšali svojim
prisustvom.

Hvala **mami i pokojnom ocu!**

Sadržaj

Popis oznaka i kratica	i
1. Uvod	1
1.1. Anatomija unutarnjih muških spolnih organa	1
1.2. Histologija sjemenika.....	3
1.3. Spermatogeneza.....	5
1.4. Torzija testisa.....	6
1.5. Ishemijsko-reperfuzijska ozljeda	9
1.6. Antioksidansi	12
1.7. Karotenoidi	14
1.8. Astaksantin	17
2. Hipoteza.....	19
3. Ciljevi rada	20
3.1. Opći cilj	20
3.2. Specifični ciljevi.....	20
4. Materijali i metode	21
4.1. Odobrenje projekta	21
4.2. Pokusne životinje - opće informacije i dobrobit.....	22
4.3. Tijek pokusa	24
4.4. Pohrana uzoraka do analize	28
4.5. Histološka analiza	28
4.5.1. Prosječan promjer sjemenskih kanalića (MSTD)	32
4.5.2. Procjena očuvanosti spermatogeneze po Johnsen-u.....	35
4.6. Imunohistokemijska analiza	36
4.7. Biokemijska analiza	39
4.7.1. Koncentracija proteina	39
4.7.2. Vrijednosti malondialdehida (MDA).....	41
4.7.3. Vrijednosti enzimskog antioksidansa superoksid dismutaze (SOD)	43
4.7.4. Vrijednosti enzimskog antioksidansa glutacion peroksidaze (GPx).....	46
4.8. Statističke analize	47
5. Rezultati.....	48
5.1. Histološka analiza	48
5.1.1. Prosječan promjer sjemenskih kanalića (MSTD)	49

5.1.2.	Procjena očuvanosti spermatogeneze prema Johnsenu.....	60
5.2.	Imunohistokemijska analiza	67
5.2.1.	Broj stanica pozitivnih na kaspazu-3 na 100 kanalića (indeks apoptoze).....	68
5.3.	Biokemijska analiza	79
5.3.1.	Koncentracija proteina	79
5.3.2.	Vrijednosti malondialdehida (MDA).....	85
5.3.3.	Vrijednosti enzimskog antioksidansa superoksid dismutaze (SOD).....	91
5.3.4.	Vrijednosti enzimskog antioksidansa glutathion peroksidaze (GPx).....	99
6.	Rasprava	128
7.	Zaključak.....	145
8.	Sažetak.....	147
9.	Summary.....	148
10.	Literatura	149
11.	Kratki životopis	165

Popis oznaka i kratica

Kratica	Značenje
I	intersticij
a	arterija
v	vena
H.E.	hemalaun-eozin
Lp	lamina propria
Sc	Sertolijeve stanice
Sp	spermatogonije
Psp	primarne spermatocite
Ssp	sekundarne spermatocite
Rsp	nezrele spermatide
Esp	zrele spermatide
L	Leydigove stanice
ATP	adenozin trifosfat
ADP	adenozin difosfat
AMP	adenozin monofosfat
IMP	inozin monofosfat
Na	natrij
K	kalij
Ca	kalcij
OH	hidroksilni radikal
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
H ₂ O	voda
O ₂	kisik
O ²⁻	superoksid
ROS	slobodni kisikov radikal
TNF- α	tumor nekrotizirajući faktor-alfa
IL-1 β	interleukin-1 beta
MCP-1	monocitni kemoatraktant protein-1
sICAM-1	topiva međustanična adhezijska molekula-1
IRI	ishemijsko-reperfuzijska ozljeda
csp-3	kaspaza 3
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
FasL	Fas ligand
AP-1	aktivator protein-1
DR	receptor stanične smrti
SOD	superoksid dismutaza
GPx	glutation peroksidaza
CAT	katalaza
GR	glutation reduktaza
G6PHD	glukoza-6-fosfat dehidrogenaza
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
GSH	glutation
GSSG	glutation disulfid
PSY	fitoen sintaza
GGPP	geranil-geranil pirofosfat
PDS	fitoen desaturaza
ZDS	zeta-karoten desaturaza

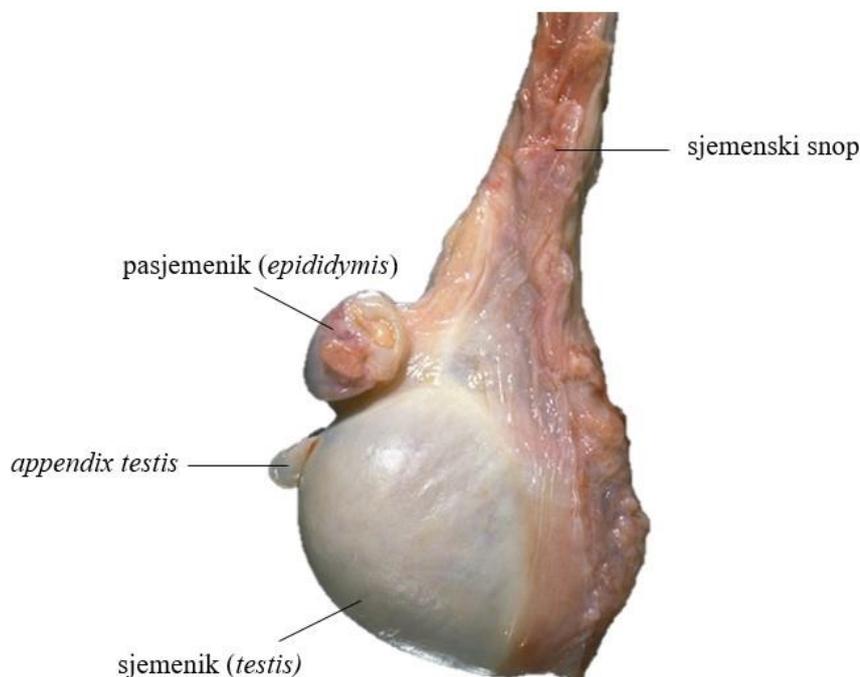
CRTISO	karoten cis-trans izomeraza
LCYB	likopen beta-ciklaza
CHYB	beta-karoten hidroksilaza
LCYE	likopen epsilon-ciklaza
ZEP	zeaksantin epoksidaza
BKT	beta-karoten ketolaza
VDE	violaksantin deepoksidaza
RNS	reaktivni dušikovi spojevi
VLDL	lipoprotein vrlo niske gustoće
LDL	lipoprotein niske gustoće
HDL	lipoprotein visoke gustoće
EPA	eikozapentaenska kiselina
DHA	dokosaheksaenoična kiselina
USD	američki dolar
BAD	Bcl-xL/Bcl-2 povezani medijator stanične smrti
MAPK	protein-kinaza aktivirana mitogenom
AST	astaksantin
PFA	paraformaldehid
MSTD	srednji promjer sjemenskih kanalića
STD	promjer sjemenskih kanalića
CPK	kreatin fosfokinaza
PEG-SOD	polietilen glikol-superoksid dismutaza
PAF	čimbenik aktivacije trombocita
NO	dušikov oksid
NOS	sintaza dušikovog oksida
Arg	arginin
L-NAME	N-nitro-L-arginin metil ester
CAPE	fenetil ester kofeinske kiseline
VIP	vazoaktivni intestinalni peptid
hCG	humani korionski gonadotropin
PARP	poli (adenozin difosfat riboza)
VEGF	vaskularni endotelni faktor rasta
XO	ksantin oksidaza
GSH	glutation
ZA	cink aspartat
NAC	N-acetilcistein
HSP	protein toplinskog šoka
NSAID	nesteroidni protuupalni lijek
TdT	terminalna deoksinukleotidil transferaza
NF	nuklearni faktor
EPO	eritropoetin
TNF	tumor nekrotizirajući faktor
IL	interleukin
GECT	debljina sjemenskog epitela
RIPA	radioimunoprecipitirajući esej
PI	proteinazni inhibitor
BCA	bikinkonična kiselina
TBA	tiobarbiturna kiselina
OD	optička gustoća

1. Uvod

1.1. Anatomija unutarnjih muških spolnih organa

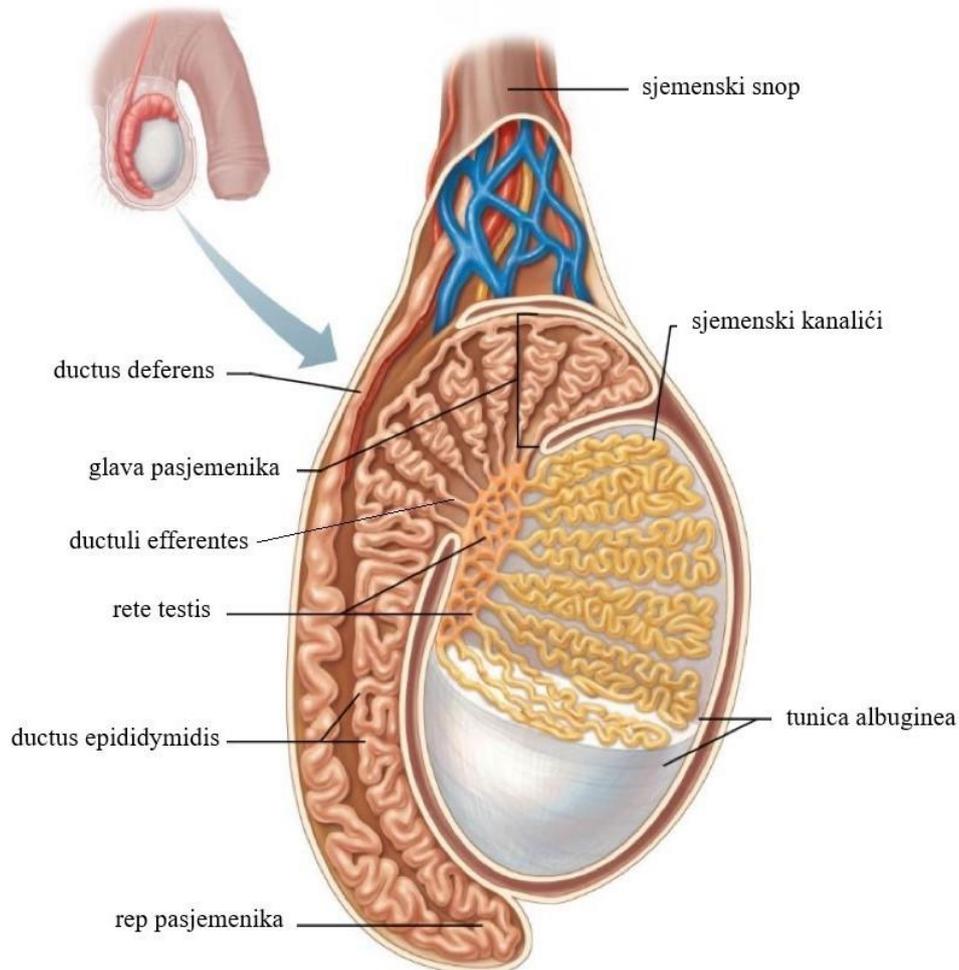
Sjemenik ili testis (parna muška spolna žlijezda) je organ u kojemu se umnožavaju i sazrijevaju muške spolne stanice (spermiji). Također je mjesto stvaranja i izlučivanja muških spolnih hormona. Veličine je 4-5 cm, jajolikog je oblika i elastične konzistencije (Slika 1). Smješten je izvan tjelesne šupljine u mošnji. Makroskopski se razlikuje gornji (*extremitas superior*) i donji pol (*extremitas inferior*). Gornji pol gleda prema naprijed i lateralno, a donji prema dolje i medijalno, s time da donji u odnosu na gornji pol nije slobodan već je svezom povezan za skrotum. Na gornjem polu pričvršćen je ostatak embrionalnih Müllerovih cijevi, *appendix testis*. Sjemenik je spljošten sa strane i ima dvije površine (*facies lateralis* i *facies medialis*) koje su omeđene prednjim (*margo anterior*) i stražnjim rubom (*margo posterior*). Sjemenik obavija *tunica vaginalis testis*, osim na mjestima gdje se nalazi pasjemenik i druge tvorbe iz sjemenskog snopa koje pristupaju na gornji kraj i stražnju površinu testisa. Sastoji se od dva lista; *lamina visceralis* i *parietalis*.

Pasjemenik ili epididimis je duguljastog oblika te je smješten na stražnjem rubu testisa. Makroskopski se razlikuju tri dijela: glava (*caput epididymidis*), tijelo (*corpus epididymidis*) i rep (*cauda epididymidis*). Glavu pasjemenika za testis pričvršćuju *ductuli efferentes*, koji iz testisa ulaze u njega. Tijelo se sastoji od zavijene cijevi, *ductus epididymidis*. Rep se nastavlja bez jasne granice u *ductus deferens* (Slika 2). Pasjemenik je obavijen vezivnom opnom koja je nastavak sjemenske ovojnice, ali je tanja od nje.



Slika 1 – Makroskopski izgled sjemenika, pasjemenika, testikularnog privjeska te sjemenskog snopa (slika je preuzeta i prilagođena s mrežne stranice: <https://webpath.med.utah.edu/MALEHTML/MALE130.html>, pristupljeno; 27. ožujka 2020.)

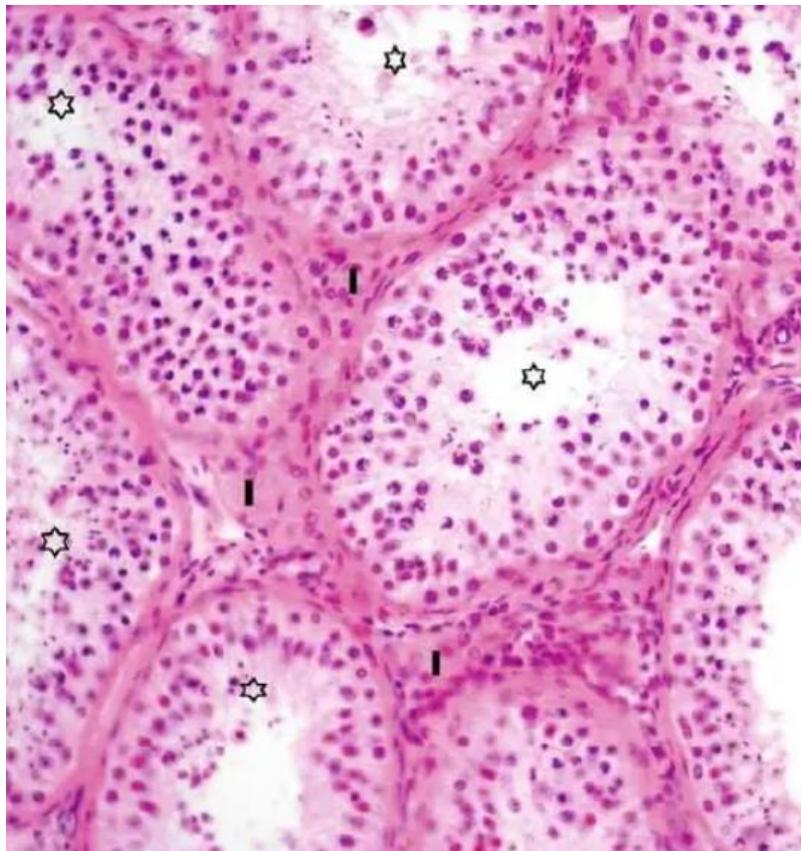
Sjemenski snop (*funiculus spermaticus*) je cilindrična tvorba na kojoj visi testis. Kroz snop prolazi *ductus deferens*, krvne žile i živci (*a. i v. testicularis*, *a. ductus deferentis*, *plexus pampiniformis* i vegetativni živci (*plexus hypogastricus inferior*)). *Ductus deferens* je 35-40 cm dugački transportni organ koji se nastavlja na pasjemenik. Debeo je 3-3,5 mm i ima mišićnu stijenku. Otvara se preko voda *ductus ejaculatorius* u pars prostatica mokraćne cijevi (1,2).



Slika 2 – Kanalići sjemenika i pasjemenika (slika je preuzeta i prilagođena s mrežne stranice: <https://quizlet.com/489214016/structure-of-the-testis-figure-422a-diagram/>, pristupljeno; 27. ožujka 2020.)

1.2. Histologija sjemenika

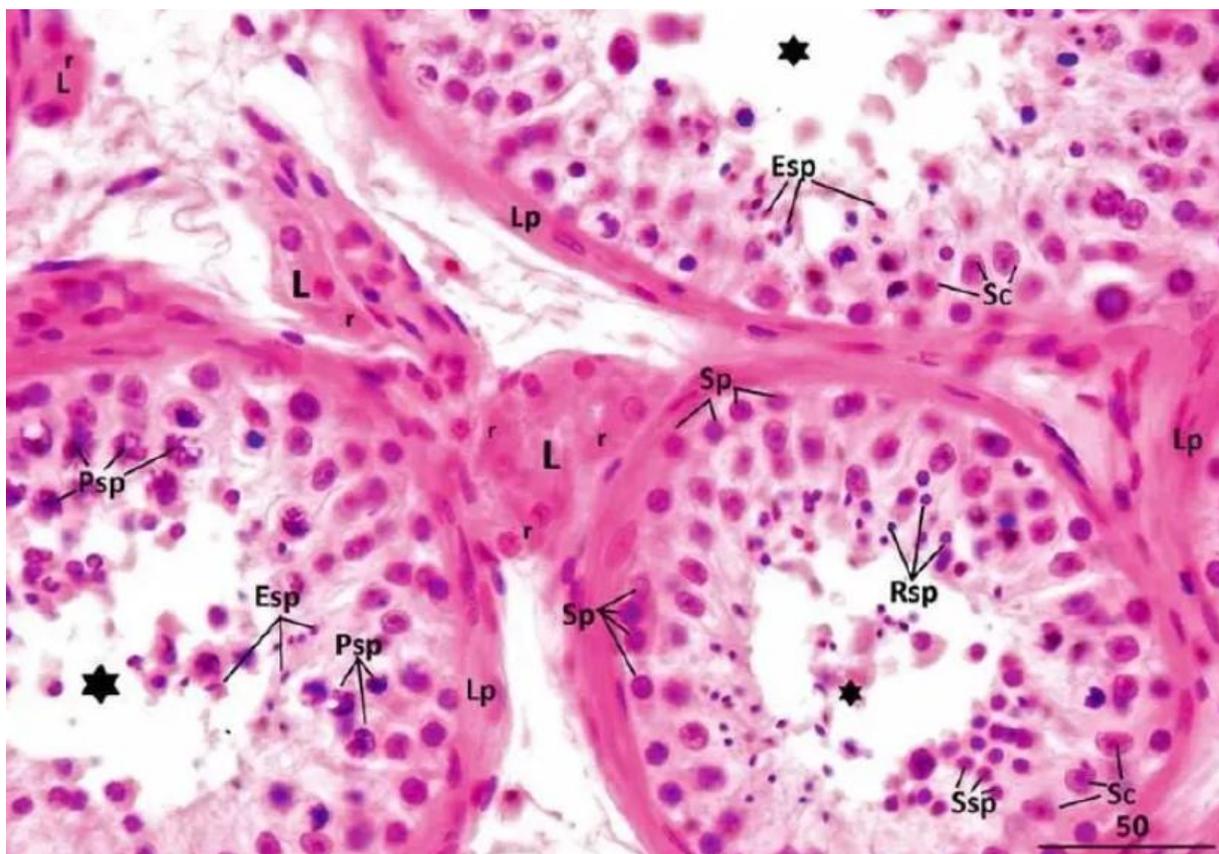
Sjemenik je građen od vezivnog tkiva i sustava kanalića. Od ovojnice (*tunica albuginea*) odvajaju se pregrade (*septula testis*) koje prodiru u unutrašnjost i dijele parenhim sjemenika na 200-300 čunjastih režnjića (*lobuli testis*). Svaki režnjić sadržava 1 – 4 vrlo zavijena sjemenska kanalića. Pregrade konvergiraju prema medijastinumu sjemenika (*mediastinum testis*). Unutar lobula, između sjemenskih kanalića, rahlo vezivo bogato krvnim žilama predstavlja intersticij (Slika 3). Ono sadržava skupine intersticijskih Leydigovih stanica. Leydigove stanice imaju eozinofilnu citoplazmu s ponekom vakuolom u kojoj se katkad vide Reinkeovi kristali. Sjemenski kanalići proizvode muške spolne stanice, a intersticijske stanice izlučuju androgene testisa.



Slika 3 – Parenhim sjemenika. Zvezdicama označeni sjemenski kanalići. I – intersticij. Bojenje H.E. x200. (slika je preuzeta i prilagođena prema; Ježek D. Atlas on the Human Testis: Normal Morphology and Pathology, London: Springer-Verlag; 2013. str. 80.)

Unutar sjemenika se nalaze zavijeni sjemenski kanalići, ravni sjemenski kanalići i mreža kanalića (*rete testis*). Najveći dio sjemenika izgrađuju zavijeni sjemenski kanalići (*tubuli seminiferi contorti*). Stijenka im čini vezivna *tunica (lamina) propria* koja okružuje sjemenski epitel. U nju su uložene mioidne stanice. Sjemenski epitel je višeslojan, a čine ga dvije vrste

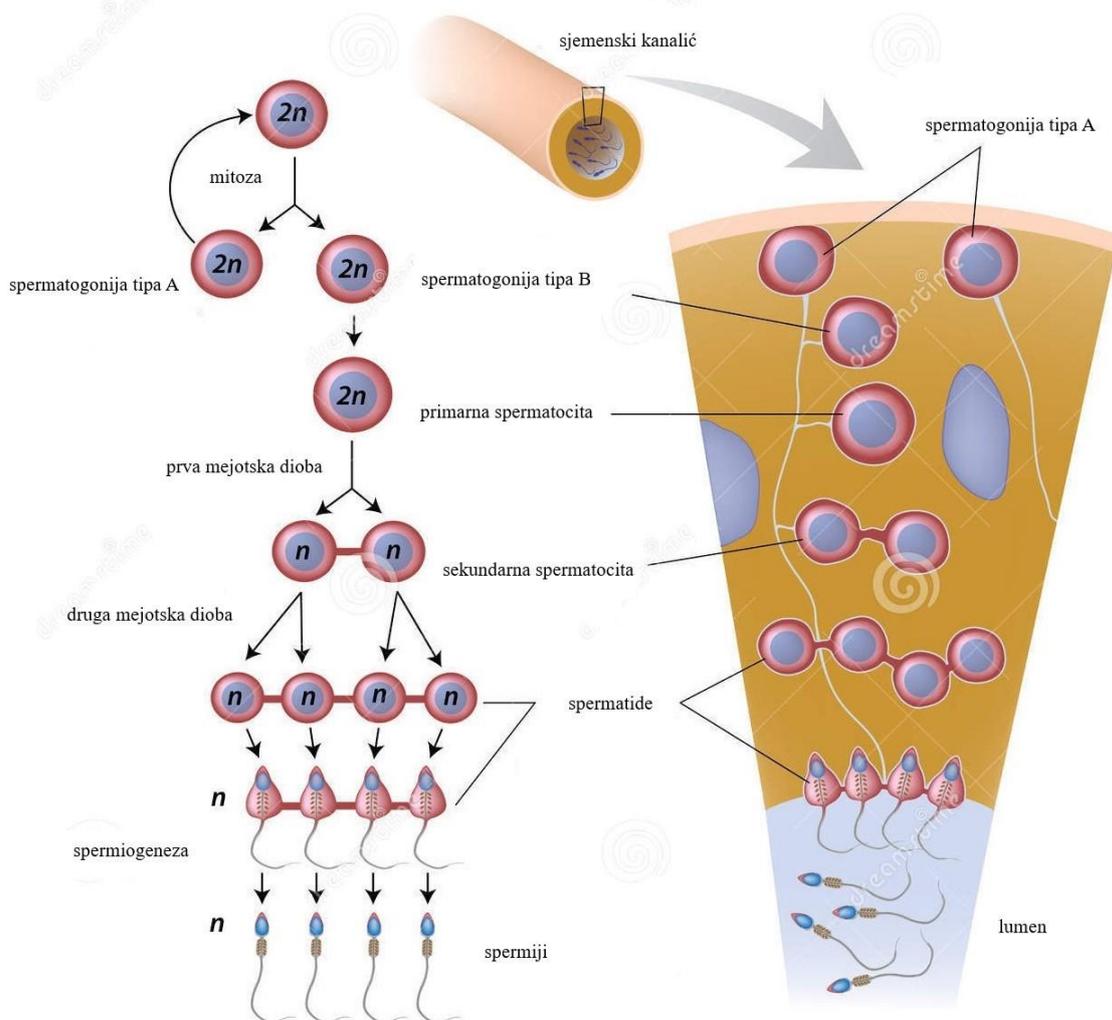
stanica; potporne (Sertolijeve) stanice i sjemenske stanice. Sertolijeve stanice imaju obilno razgranjenu citoplazmu i dobro vidljivu svijetlu, okruglu ili ovalnu jezgru s tamnim nukleolom. Sertolijeve stanice dijelom obavijaju stanice spermatogenetske loze. Bazom prijanjaju uz bazalnu laminu, a vrhovi im često strše u lumen sjemenskog kanalića. Susjedne Sertolijeve stanice u bazalnom su dijelu međusobno povezane čvrstim spojevima (*zonula occludens*), čineći barijeru krv-testis. Barijera krv-testis onemogućuje bilo kakvo međusobno djelovanje između imunskog sustava i spermija. Spermatogonije su smještene u bazalnom odjeljku koji je smješten ispod ove barijere. Sjemenske stanice se razlikuju prema položaju u sjemenskom epitelu i prema izgledu njihove jezgre. Neposredno uz bazalnu laminu se nalaze spermatogonije. Okrugle su, srednje velike, s okruglom tamnom jezgrom s mnogo kromatina. Primarne spermatocite najveće su među sjemenskim stanicama. Lako su uočljive po velikoj jezgri u kojoj je kromatin raspoređen rahlo u tračcima te predstavlja kromosome. Sekundarne spermatocite manje su od primarnih. Imaju malu okruglu jezgru sa znatnim kromatinom nalik na spermatogonije. Brzo se diferenciraju pa se u histološkom preparatu rijetko nađu. Kod spermatida okrugla se citoplazma izdužuje, a mala, okrugla, tamna jezgra pomakne se u jedan pol stanice. Leže uza sam lumen kanalića (Slika 4). Spermiji se nalaze neposredno uz lumen ili su slobodni u lumenu. Imaju malu, tamnu, duguljastu jezgru i tanak, dugačak rep usmjeren prema lumenu kanalića (3,4).



Slika 4 – Sjemenski kanalići s pripadajućim intersticijem. **Lp** – lamina propria unutar koje se nalaze mioidne stanice. **Sc** – Sertolijeve stanice. **Sp** – spermatogonije. **Psp** – primarne spermatocite. **Ssp** – sekundarne spermatocite. **Rsp** – nezrele spermatide. **Esp** – zrele spermatide. **L** – Leydigove stanice. Bojenje H.E., x400. (slika je preuzeta i prilagođena prema; Ježek D. Atlas on the Human Testis: Normal Morphology and Pathology. London: Springer-Verlag; 2013. str. 81.)

1.3. Spermatogeneza

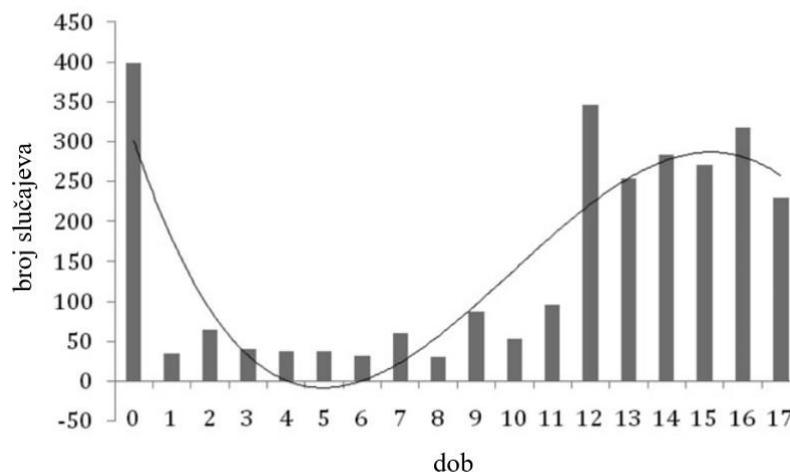
Za vrijeme stvaranja embrija primordijalne zametne stanice migriraju u sjemenike i postaju nezrele zametne stanice (pro-spermatogonije). Smještene su uz bazalnu laminu epitela. Spermatogonije se tijekom puberteta počinju mitotički dijeliti. Novonastale stanice mogu krenuti jednim od dvaju putova. Mogu ostati nediferenciranim matičnim stanicama (spermatogonije tipa A) ili se tijekom uzastopnih mitotskih ciklusa diferenciraju u spermatogonije tipa B. Spermatogeneza se zbiva u sjemenskim kanalčićima. Spermatogonije tipa B nakon prolaska između Sertolijevih stanica se mijenjaju i povećavaju stvarajući velike primarne spermatocite. Svaka od njih se zatim mejotički podijeli čime nastaju dvije sekundarne spermatocite. Nakon nekoliko dana one se također podijele stvarajući spermatide koje se konačno spermiogenezom pretvaraju u spermije. Za vrijeme prijelaza iz stadija spermatocita u stadij spermatide, 46 kromosoma se podijeli na 23 kromosoma po spermatidi. Razdoblje spermatogeneze kod čovjeka traje oko 74 dana (Slika 5)(4-7).



Slika 5 – Spermatogeneza (slika je preuzeta i prilagođena s mrežne stranice: <https://www.dreamstime.com/stock-photo-spermatogenesis-image27345480>, pristupljeno; 28. ožujka 2020.)

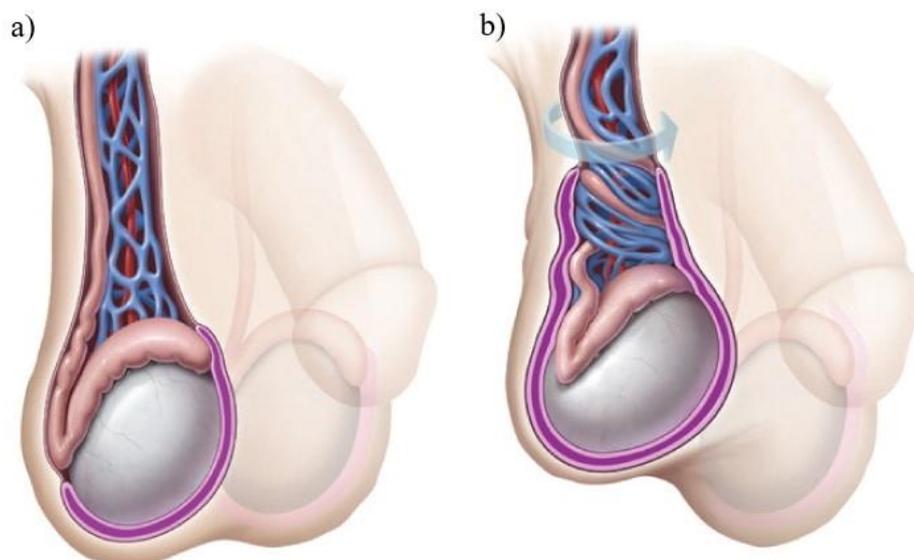
1.4. Torzija testisa

Torzija testisa je jedno od stanja akutnog skrotuma koje zahtijeva neodgodivu kiruršku intervenciju. Pod torzijom testisa podrazumijeva se rotacija testisa oko uzdužne osi za 180 ili više stupnjeva, nakon čega slijedi prekid cirkulacije u testisu. Ako nije prepoznata na vrijeme, može rezultirati ishemijskim ozljedama i gubitkom testisa (8). Incidencija torzije testisa je 1 na 4000 muškaraca u dobi od 1 do 25 godina. Prevalencija torzije testisa od ukupno svih stanja akutnog skrotuma čini 25-50% (9-12). Može se pojaviti u bilo kojoj dobi, ali obično se javlja u mladih muškaraca (13). Najčešće se viđa u novorođenčadi i dječaka u pubertetu (Slika 6)(14,15).



Slika 6 – Bimodalna distribucija torzije testisa (slika je preuzeta i prilagođena prema: Zhao LC, Lautz TB, Meeks JJ, Maizels M. Pediatric testicular torsion epidemiology using a national database: incidence, risk of orchiectomy and possible measures toward improving the quality of care. J Urol. 2011;186(5):2009–13.)

Ovo je izrazito bolno stanje i najčešći je uzrok gubitka testisa. Uobičajeno je uvjerenje da je torzija testisa koja traje duže od 6 sati izvan vremenskog okvira za preživljavanje parenhima sjemenika. Ako se tretira unutar 6 sati od nastanka boli, postoje dobri izgledi (90-100%) da će testis biti spašen. Ako se liječi u roku od 6-12 h, 20-50% testisa se može spasiti, a ako se tretira unutar 12-24 sati može se spasiti svega 0-10% (16). Torzija testisa rezultat je neodgovarajuće fiksacije donjeg pola testisa prema *tunici vaginalis*. Neodgovarajućom fiksacijom testis se može okrenuti oko vlastite osi, što izaziva ishemiju (smanjeni arterijski dotok i venski odljev). Torzija testisa obično se javlja nakon nekog poticajnog događaja (npr. trauma, jača fizička aktivnost) ili spontano (17). Klinička obilježja torzije testisa uključuju akutni početak umjerene do jake boli u testisu s mogućnošću prisustva crvenila i otoka uz negativan refleks kremastera prilikom fizičkog pregleda. Mučnina i povraćanje, kao i difuzna bol u donjem dijelu trbuha, mogu biti povezani s ovim stanjem. Klasični klinički nalaz je asimetrično (poprečno) visoko položen testis (Slika 7).

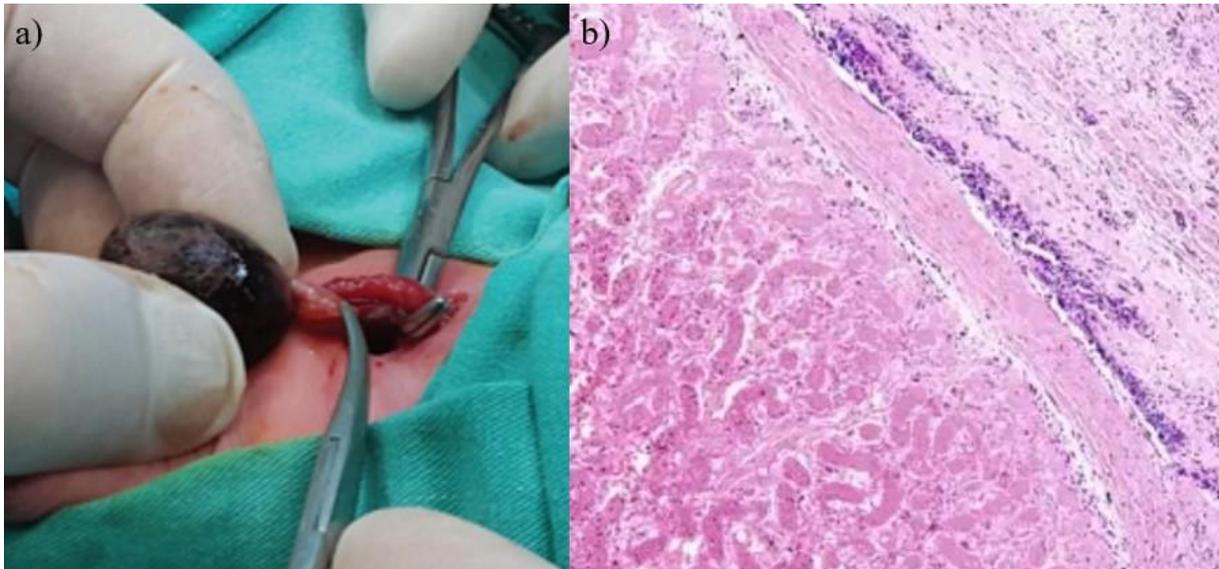


Slika 7 – a) normalni položaj testisa; b) viši položaj testisa u odnosu na kontralateralni po torziji (slika je preuzeta i prilagođena s mrežne stranice: <https://www.aafp.org/afp/2013/1215/p835.html> , pristupljeno; 28. ožujka 2020.)

Većina slučajeva torzije testisa ne zahtijevaju dodatnu dijagnostiku radi potvrđivanja dijagnoze ako su anamneza i fizikalni pregled patognomonični. Međutim, u dvosmislenim slučajevima hitno treba učiniti Doppler ultrazvuk. Ultrazvukom je važno detaljno procijeniti protok sjemenskog snopa do razine unutarnjeg ingvinalnog prstena, a ne samo ograničiti pregled na skrotum. Ukoliko pristup skrotalnoj ultrasonografiji nije dostupan ili ako ultrazvuk ne može isključiti torziju testisa, savjetuje se hitna kirurška eksploracija (18). Hitnom kirurškom eksploracijom učini se intraoperativna detorzija i fiksacija testisa. Kašnjenjem u detorziji za posljedicu ima višu stopu gubitka testisa. Ako se kirurška eksploracija ne može odmah učiniti treba pokušati s ručnom detorzijom. Ovdje treba napomenuti da treba biti oprezan s klasičnim načelima koja uče da torzija uvijek ide u istom pravcu te da se ručna detorzija radi u pravcu suprotnom od kazaljke na satu. Međutim, u retrospektivnoj analizi na 200 dječaka u dobi od 18 mjeseci do 20 godina koji su bili podvrgnuti kirurškoj eksploraciji, bočna rotacija bila je prisutna u čak trećine slučajeva. Čak i u slučaju uspješne ručne detorzije potrebno je učiniti orhidopeksiju (pričvršćivanje testisa za skrotalnu stijenku) radi sprječavanja recidiva (19). Produljeno razdoblje ishemije (> 6 sati) može uzrokovati infarkt testisa s nekrozom koja zahtijeva orhidektomiju. Daljnja ishemijska ozljeda testisa može se pojaviti i nakon detorzije zbog „sindroma kompartmenta“. To se događa kada reperfuzija i edem parenhima u prostoru koji je omeđen neelastičnom *tunicom albugineom* uzrokuju povećani tlak, što može smanjiti protok u samom parenhimu (20).

Neonatalna torzija testisa, definirana kao torzija koja se dogodila prenatalno ili unutar prvih 30 dana života, rijetka je pojava. Neonatalna torzija testisa dijeli se u dvije skupine ovisno o vremenu nastanka torzije. Ukoliko je torzija nastala prenatalno smatra se neakutnom. Često se pogrešno protumači kao nepalpabilni, nespušteni testis (ako se torzija pojavila dovoljno rano te je već nastupila atrofija testisa). Postnatalna torzija testisa nastaje nakon rođenja i smatra se

akutnom te je nužna kirurška intervencija (Slika 8a). Otkriva se prilikom kliničkog pregleda testisa za koji je tijekom poroda uočeno da je normalan (21). Neonatalna torzija testisa čini 10-12% svih slučajeva pedijatrijskih torzija testisa (22,23). Prema studiji iz Velike Britanije incidencija je bila 6,1 na 100 000 živorođenih (24). Točan mehanizam neonatalne torzije testisa nije poznat (25). Neonatalna torzija testisa najčešće je ekstravaginalni događaj. Smatra se da se torzija događa nakon što se testis spusti, ali prije same fiksacije (21,26).

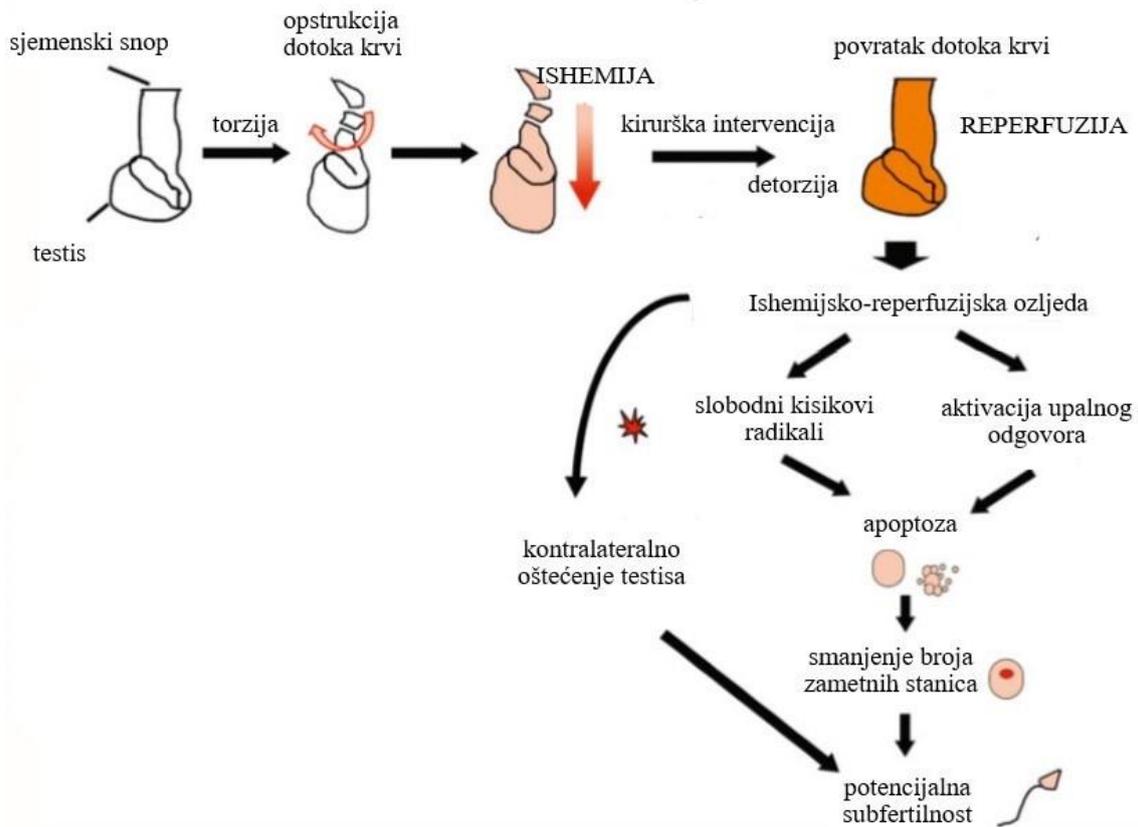


Slika 8 – a) kirurška eksploracija prilikom postnatalne torzije testisa (slika je preuzeta i prilagođena prema: Tuncer AA, Bayraktaroğlu A, Yümlü K, Baskın Embleton D, Çetinkurşun S. A Rare Cause of Scrotal Mass in a Newborn: Antenatal Intravaginal Testicular Torsion. J Urol Surg. 2018;5:44-6.), **b)** Stanje po dugotrajnoj torziji testisa - potpuna nekroza sjemenjskih kanalića i intersticija (slika je preuzeta i prilagođena prema: Ježek D. Atlas on the Human Testis: Normal Morphology and Pathology. London: Springer-Verlag; 2013. str. 244.)

Ako je lezija sjemenika posljedica torzije, smatra se da se radi o hemoragičnom infarktu testisa. Makroskopski je testis isprva crvenkast ili plavkast, a poslije crn (Slika 8a). Histološki lezije su dobro razvijene u većini neonatalnih torzija i kreću se od nekroze do fibroze s naslagama kalcija i hemosiderina (Slika 8b). U odraslih, histološke lezije svrstane su u tri kategorije: lezije I stupnja - lezije se nalaze uglavnom u intersticiju i sastoje se od edema, vaskularne kongestije i žarišnih krvarenja / lezije II stupnja - epitel kanalića pokazuje oštećenje svih vrsta sjemenjskih stanica / lezije III stupnja - hemoragični infarkt s nekrozom sjemenjskog epitela (27,28).

1.5. Ishemijsko-reperfuzijska ozljeda

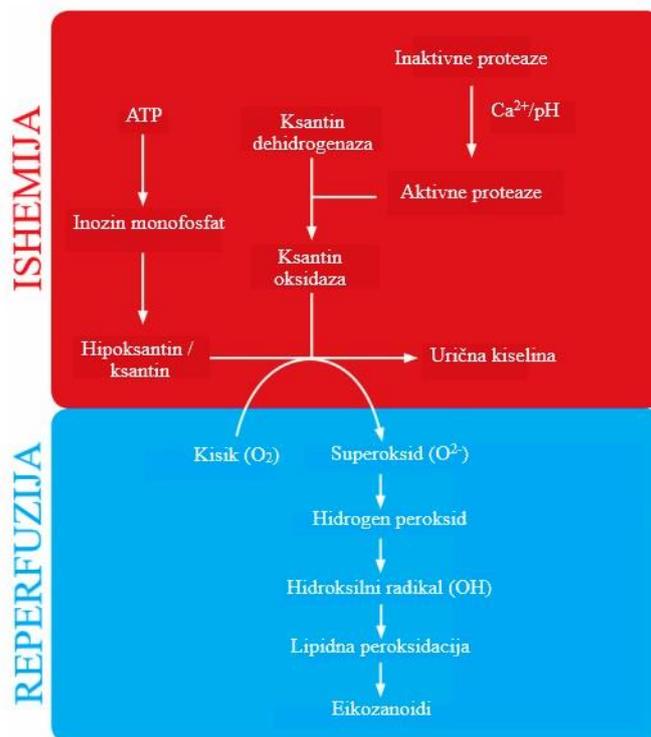
Ishemijsko-reperfuzijska ozljeda (IRI) definirana je kao paradoksalno pogoršanje stanične disfunkcije i smrti, nakon obnavljanja protoka krvi u ranije ishemijskim tkivima. Ponovno uspostavljanje protoka krvi bitno je za spašavanje ishemičnog tkiva. No, sama reperfuzija paradoksalno uzrokuje daljnja oštećenja, prijeteci funkciji i vitalnosti organa. Reperfuzijska ozljeda je multifaktorski proces koji rezultira uništavanjem tkiva (Slika 9).



Slika 9 – Mehanizam ishemijsko-reperfuzijske ozljede testisa (slika je preuzeta i prilagođena prema; Shimizu S, Tsounapi P, Dimitriadis F, Higashi Y, Shimizu T, Saito M. Testicular torsion-detorsion and potential therapeutic treatments: A possible role for ischemic postconditioning. *Int J Urol.* 2016;23(6):454–63.)

Ishemija se javlja kada je opskrba krvlju manja od potražnje za normalnom funkcijom, što rezultira nedostatkom kisika, glukoze i drugih tvari potrebnih za metabolizam. Osim nedostatne opskrbe javlja se i problem odstranjenja metabolita. U početku, raspadom glikogena mitohondrijskom anaerobnom glikolizom stvaraju se dvije molekule adenozin trifosfata (ATP), zajedno s mliječnom kiselinom, što rezultira smanjenjem pH tkiva, a zatim negativnom povratnom spregom djeluje na daljnju proizvodnju ATP-a. ATP se zatim postepeno razgrađuje na adenozin-difosfat (ADP), adenozin-monofosfat (AMP) i inozin-monofosfat (IMP) te potom na adenozin, inozin, hipoksantin i ksantin. Na staničnoj razini, nedostatak proizvodnje ATP-a

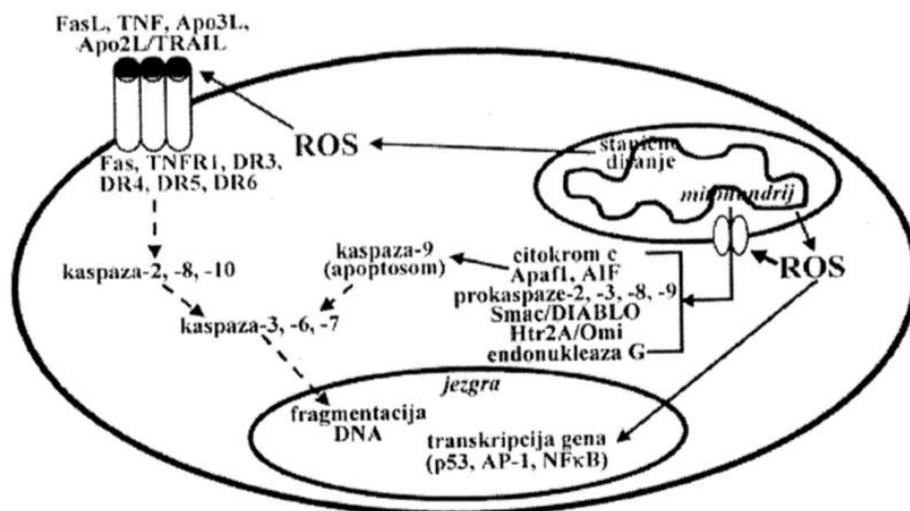
uzrokuje disfunkciju ionskih pumpi ovisnih o ATP-u, uključujući Na^+/K^+ i Ca^{2+} pumpe, čime se gube transmembranski ionski gradijenti. Slijedom toga, povećava se sadržaj natrija u citosolu, koji povlačeći za sobom vodu, pokušavajući održati osmotsku ravnotežu, dovodi do bubrenja stanice. Da bi održali ionsku ravnotežu, kalijevi ioni izlaze iz stanice u intersticij. Kalcij se oslobađa iz mitohondrija u citoplazmu i u izvanstanične prostore, čime se aktivira mitohondrijska, kalcij ovisna, citosolna proteaza, koja potom pretvara stanični enzim ksantin dehidrogenazu u ksantin oksidazu (Slika 10)(29-34).



Slika 10 – Dijagram procesa ishemijsko-reperfuzijske ozljede. Tijekom ishemije ATP se razgrađuje te se ksantin dehidrogenaza pretvara u ksantin oksidazu. U prisutnosti kisika, ksantin oksidaza katalizira pretvorbu hipoksantina u visoko reaktivne i toksične superoksidne anione. Superoksid tada reagira s H^+ kako bi pokrenuo proizvodnju vodikovog peroksida i hidroksilnog radikala, koji u konačnici posreduju lipidnom peroksidacijom i oštećenjem tkiva.

Tijekom same reperfuzije, priljev kisika katalizira ksantin oksidazu razgrađujući hipoksantin u mokraćnu kiselinu. Pritom se oslobađa visoko reaktivni anionski superoksid (O_2^-). Superoksid se potom pretvara u vodikov peroksid (H_2O_2) i hidroksilni radikal (OH^\cdot). Glavna posljedica proizvodnje hidroksilnih radikala je peroksidacija lipidnih struktura staničnih membrana što rezultira proizvodnjom i sistemskim oslobađanjem proupalnih eikozanoida, poremećajem propusnosti stanica i na kraju staničnom smrću (Slika 10)(29-34). Po reperfuziji slobodni kisikovi radikali izazivaju upalni odgovor u lokalnom tkivu, uz prateća oštećenja. Torzija testisa inducira ekspresiju adhezivnih molekula (sICAM-1, sP-selektin, sEselektin i tenascin) u endotelu vena i dovodi do adhezije leukocita na stijenke (35,36). Lysiak i sur. utvrdili su da su proupalni citokini, poput $\text{TNF-}\alpha$ i $\text{IL-1}\beta$, stimulirani po ishemijskoj reperfuzijskoj ozljedi (37). Wei i sur. potvrdili su povećanje broja proupalnih citokina $\text{TNF-}\alpha$ i $\text{IL-1}\beta$ (38).

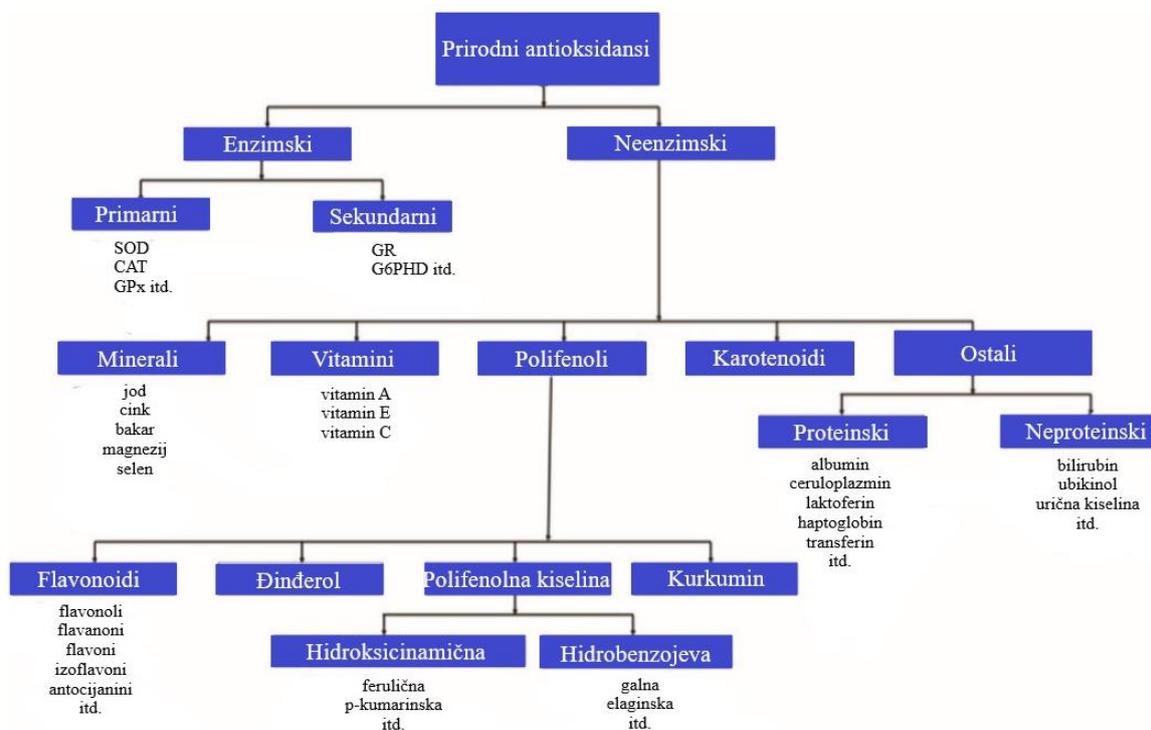
induciraju upalu i aktiviraju proupalne citokine, poput IL-6, u Sertolijevim i peritubularnim stanicama (39,40). Adhezijska molekula MCP-1 izrazito je izražena, a regulirana je TNF- α i IL-1 β (21). Temeljni molekularni mehanizmi indukcije apoptoze sjemenskih stanica mogu uključivati modulaciju ekspresije nekoliko molekula stanične smrti (41). Do povećanja koncentracije slobodnih kisikovih radikala najčešće dolazi ukoliko mehanizmi koji su zaduženi za uklanjanje istih u jednom trenutku postanu nedostadni. Time dolazi do narušavanja ravnoteže između prooksidansa i antioksidansa u korist prooksidansa (stanje oksidacijskog stresa). Stanično je oštećenje reverzibilno do jedne točke, ali kod intenzivnog i dugotrajnog stresa stanica podliježe ireverzibilnom oštećenju. Stanice najčešće umiru procesom nekroze i apoptoze. Do nekroze uglavnom dolazi zbog snažnih patoloških poticaja (teška mehanička, ishemijska ili toksična oštećenja). Apoptoza je organiziran, visoko reguliran način umiranja stanice kojim se omogućava stroga kontrola broja stanica. Naziva se i programiranom smrću stanice jer proces ovisi o kontroliranoj indukciji ekspresije određenih gena. Do apoptoze dolazi u fiziološkim uvjetima tijekom razvoja, ali može nastati i zbog patoloških poticaja (slabijeg intenziteta nego kod nekroze). Biološki odgovor stanice na slobodne kisikove radikale ovisi o; vrsti stanice, vrsti slobodnih kisikovih radikala, sposobnosti stanice da ukloni slobodne kisikove radikale, dužini vremena izlaganja slobodnim kisikovim radikalima te o koncentraciji slobodnih kisikovih radikala. Uglavnom se pokazalo da niske koncentracije slobodnih kisikovih radikala induciraju apoptozu, dok visoke za posljedicu imaju nekrozu. Većinu morfoloških promjena stanica uzrokuju cisteinske proteaze koje tvore veliku veliku obitelj enzima poznatu pod nazivom kaspaze. Kaspaze se funkcionalno dijele u dvije glavne obitelji; kaspaze koje sudjeluju u sazrijevanju citokina i kaspaze koja imaju važnu ulogu u apoptozi (42,43). U skupini koje imaju važnu ulogu u apoptozi razlikuju se inicijatorske kaspaze (kaspaza-8,-9,-10) te efektorske kaspaze (kaspaza-3,-6,-7) koje proteolitičkim cijepanjem supstrata doprinose apoptotičkom fenotipu. Kaspaze se sintetiziraju u stanicama kao inaktivni prekursori. Na svom aktivnom mjestu imaju cistein i kidaju supstrate iza asparaginske kiseline (Asp-X veza). Kaspaze su posebno osjetljive na promjenu redoks-statusa u stanici, pri čemu slobodni kisikovi radikali aktiviraju kaspaze (Slika 11)(44-46).



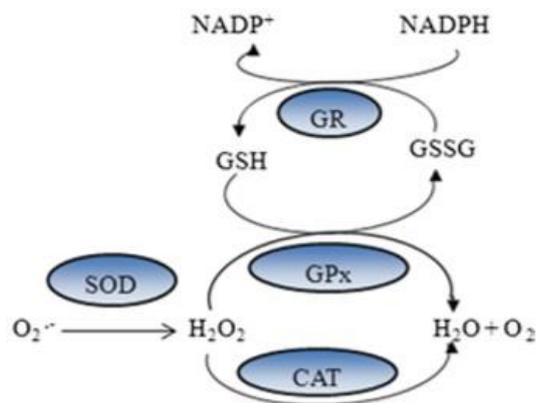
Slika 11 – Aktivacija kaskade kaspaza slobodnim kisikovim radikalima (slika je preuzeta i prilagođena prema; Rumora L, Petrik J, Žanić-Grubišić T. Oksidacijski stres i stanična smrt. Biochemia medica. 2003;13(3-4):75-82.)

1.6. Antioksidansi

Antioksidansi su molekule sposobne za inhibiciju oksidacije drugih molekula. Obrambeni su sustav tijela od potencijalnog oštećenja slobodnim kisikovim radikalima koji nastaju prilikom oksidativnog stresa (47). Mogu biti endogeni (prisutni u tijelu) te egzogeni. U posljednjih nekoliko desetljeća interes za prirodnim izvorima antioksidansa naglo se povećao. Među izvorima prirodnih antioksidansa najvažniji su oni koji potječu iz rutinske konzumacije voća i povrća, no ne treba zanemariti i antioksidanse iz drugih prirodnih izvora (Slika 12). Općenito, antioksidansi se mogu podijeliti u dvije glavne kategorije; sintetski i prirodni. Antioksidansi se također mogu klasificirati kao enzimski i neenzimski. Enzimski antioksidansi uključuju glutacion peroksidazu (GPx), katalazu (CAT) i superoksid dismutazu (SOD). Enzim superoksid dismutaza (SOD) uklanja superoksidni radikal ($O_2^{\cdot-}$) te time štiti tjelesne stanice. SOD katalizira redukciju superoksidnih aniona u vodikov peroksid ($2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$). SOD se također zna natjecati s dušikovim oksidom (NO) za superoksidni anion, koji inaktivira NO da tvori peroksinitrit. Katalaza (CAT) razgrađuje H_2O_2 u vodu i kisik ($2H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$). Katalaza se s glutacion peroksidazom koristi i komercijalno kao konzervans. Glutacion peroksidaza (GPx) skupina je enzima ovisnih o selenu. GPx katalizira reakciju H_2O_2 s reduciranim glutationom (GSH) te kao rezultat, nastaje oksidirani glutation (GSSG) ($2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$). Isti se ponovno reciklira u smanjenom obliku glutation-reduktazom (GR) s reduciranim nikotinamid adenin dinukleotid fosfatom (NADPH) (Slika 13) (48). Neenzimski antioksidansi dijele se u nekoliko potkategorija; vitamini A, E, C, D, koenzim Q10, peptidi, minerali (cink, selen itd.). Glavni sastojci iz prirodnih izvora su polifenolni spojevi, za koje se navodi da imaju značajan antioksidacijski potencijal (49).



Slika 12 – Klasifikacija prirodnih antioksidansa (slika je preuzeta i prilagođena prema; Anwar H, Hussain G, Mustafa I. Antioxidants from Natural Sources. IntechOpen; 2018.)



Slika 13 – Mehanizam enzimskih antioksidansa u uklanjanju slododnih kisikovih radikala (slika je preuzeta i prilagođena prema; Mamta, Misra K, Dhillon GS, Brar SK, Verma M. Antioxidants. In: Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals. New York: Springer; 2014. Str. 120.)

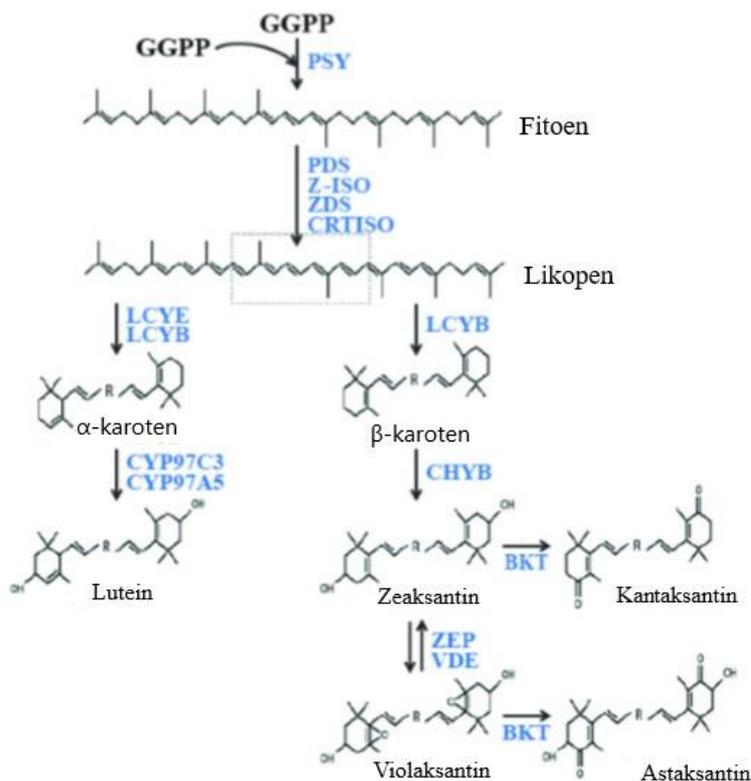
Iako se u posljednje vrijeme kemijska industrija okreće i istraživanju sintetskih antioksidansa, toksikološke studije vezane za upotrebu tih antioksidansa pokazale su njihove neželjene ili štetne učinke. Time se težište u novije vrijeme ipak daje istraživanju prirodnih antioksidansa (50). Prirodne antioksidanse svrstavamo u dvije glavne skupine; a) antioksidansi iz uobičajene svakodnevne prehrane (npr. povrće, voće, žitarice itd.), b) antioksidansi s visokim antioksidacijskim potencijalom koji nisu dio svakodnevne prehrane (npr. ljekovite biljke). Polifenoli, prisutni u voću i povrću, skupina je nekoliko spojeva niske i visoke molekularne mase koji imaju antioksidacijska svojstva. Većina njih su konjugati mono i polisaharida povezanih s jednom ili više skupina fenolnih prstenova, a mogu biti prisutni i kao funkcionalni derivati poput estera i metilnih estera. Ova glavna klasa prirodnih antioksidansa može se dobiti iz čajeva, posebno zelenih i crvenih, kao i iz voća poput grožđa (51-53). Gljive se smatraju zdravstvenom korisnom hranom, a ujedno su i izvor vrijednih tvari. Mnogobrojne konzumne gljive izvor su važnih hranjivih sastojaka uključujući β -glukane, B-vitamine (niacin, flavin, piridoksin), fenole (tokoferol), organske kiseline (askorbinska, fumarna), elemente u tragovima (selen), itd. Navedeni sastojci odgovorni su za imunomodulacijske, antimikrobne, antitumorske, antihipertenzivne i hepatoprotektivne aktivnosti (54-57). Morski ekosustav izvor je biološke raznolikosti i kemijskih supstanci. U posljednje vrijeme organizmi koji žive u morskom okolišu zadobili su veliku pažnju farmaceutske industrije zbog posjedovanja različitih zanimljivih i korisnih kemijskih spojeva (58). Morske alge i spužve smatraju se najbogatijim izvorom bioaktivnih spojeva koji imaju antimikrobno i antioksidativno djelovanje (59). Proučavan je veliki broj različitih vrsti algi za upotrebu njihovih bioaktivnih spojeva kao funkcionalnih komponenti hrane. Alge rastu u ekstremnim uvjetima okoliša što rezultira proizvodnjom velikog broja slobodnih kisikovih radikala. Da bi se mogle nositi s tim, alge stvaraju različite sekundarne metabolite s antioksidacijskim aktivnostima kao što su fikobilini, polifenoli, karotenoidi i vitamini (60). Karotenoidni pigment poznat kao astaksantin, koji se nalazi u mikroalgi *Haematococcus pluvialis*, ima protuupalno, imunomodulacijsko i antioksidativno djelovanje (61). Bez sumnje je da antioksidansi imaju vitalnu ulogu u

metaboličkim putovima čime štite stanicu, ali određeni dokazi prisilili su akademsku zajednicu da pomnije razmotri uloge antioksidansa i prooksidansa. Slobodni radikali smatraju se prooksidansima, ali iznenađujuće je da antioksidansi mogu imati i prooksidativno ponašanje. Vitamin C smatra se snažnim antioksidansom i važan je u mnogim fiziološkim reakcijama, ali može postati i prooksidans (62). Alfa-tokoferol također je poznat kao koristan i moćan antioksidans, ali u visokim koncentracijama može postati prooksidans. Kada reagira sa slobodnim radikalom, postaje sam radikal, a ako nema dovoljno askorbinske kiseline za njezinu regeneraciju, ostat će u ovom vrlo reaktivnom stanju i pospješiti autooksidaciju linoleinske kiseline (63). Iako nije pronađeno mnogo dokaza, smatra se da karotenoidi također mogu imati prooksidacijske učinke, posebno autooksidacijom u prisutnosti visokih koncentracija hidroksilnih radikala. Čak i flavonoidi mogu djelovati kao prooksidansi, mada svaki različito reagira u svojoj okolini (64,65).

1.7. Karotenoidi

Karotenoidi su organski pigmenti koje nalazimo u kromoplastima. Karotenoidi općenito apsorbiraju valne duljine u rasponu od 400 do 550 nanometara (ljubičasto do zeleno svjetlo). Zbog toga su spojevi obojeni žuto, narančasto ili crveno. Daju karakterističnu boju bundevi, mrkvi, kukuruzu, rajčici, kanarincima, flamingosima, lososu, jastogu, škampima itd. Poznato je oko 1100 vrsta karotenoida (66). Prema strukturi dijelimo ih u dvije glavne skupine: karoteni (ne sadrže kisik, čisti su ugljikovodici) i ksantofili ili oksikarotenoidi (sadrže kisik). Svi karotenoidi su tetraterpenoidi, što znači da se sastoje od 8 izoprenoidnih jedinica (C₅) (sadrže 40 ugljikovih atoma). Neki poznati karoteni su β-karoten i likopen. Lutein i zeaksantin primjer su ksantofila s -OH skupinama u svojim strukturama, dok kantaksantin i ehinenoni sadrže =O skupine. Astaksantin u svojoj strukturi ima i -OH i =O skupine. Nadalje, neki karotenoidi kao što su violaksantin i diadinoksantin sadrže epoksidne skupine, dok drugi poput dinoksantina i fukoksantina u svojim strukturama imaju acetilne skupine (67). Mikroalge su fotosintetski mikroorganizmi koji se mogu široko koristiti kao potencijalni izvor za proizvodnju nekoliko vrlo vrijednih bioprodukata. Karotenoidi u algama štite klorofil od djelovanja prekomjernog izlaganja svjetlu (uklanjanjem reaktivnih oblika kisika, poput singletnih molekula kisika i slobodnih radikala), a potrebni su i za fototropizam i fototaksiju (68,69). Naše trenutno razumijevanje metaboličkog puta karotenoida i njegove regulacije u mikroalgama nije u potpunosti jasno, a uglavnom se izvodi iz saznanja o procesu u višim biljkama. Prvi korak u biosintezi karotenoida je kondenzacija dviju molekula geranil-geranil pirofosfata (GGPP), kataliziranog enzimom fitoen-sintazom (PSY), čime se dobiva fitoen, bezbojni karotenoid. Nakon ovog koraka, fitoen prolazi niz sekvencijalnih desaturacija kataliziranih fitoen desaturazom (PDS) i zeta-karoten desaturazom (ZDS), koje rezultiraju stvaranjem pro-likopena. Pro-likopen se zatim izomerizira posebnom karoten cis-trans izomerazom (CRTISO) u sve-trans likopen. Nakon ovog koraka put se dijeli na dvije grane. U jednoj grani sintetskog puta likopen se na oba kraja ciklizira likopen β-ciklazom (LCYB), dajući β-karoten. Isti se može

dalje hidroksilirati β -karoten hidroksilazom (CHYB), dajući zeaksantin. U drugoj grani sintetskog puta, kombinirano djelovanje LCYB i likopen epsilon-ciklaze (LCYE) dovodi do stvaranja α -karotena. Količine karotenoida proizvedenih na svakoj grani puta određene su apsolutnim aktivnostima LCYE i LCYB. Hidroksilaciju α -karotena kataliziraju dvije citokrom P450 monooksigenaze koje sadrže hem (karoten β -hidroksilaza i karoten epsilon-hidroksilaza) što dovodi do stvaranja luteina. U drugoj grani zeaksantin se pretvara u violaksantin zeaksantin epoksidazom (ZEP), koji umeće dvije epoksidne skupine na položajima C-5,6 i C-50,60. U drugoj grani puta zeaksantin se pretvara u diketo karotenoid kantaksantin, a violaksantin se u astaksantin pretvara enzimom β -karoten ketolazom (BKT) (Slika 14) (70-74). Trenutno se većina karotenoida proizvedenih u industriji kemijski sintetizira, dok se mali dio karotenoida prirodno dobiva iz biljaka ili algi. Budući da alge predstavljaju alternativni izvor prirodnih karotenoida, ekstrakcija karotenoida iz kultiviranih algi svakako pomaže u prevladavanju problema s uravnoteženjem ponude i potražnje za tim proizvodima (75).



Slika 14 – Biosintetski put karotenoida (slika je preuzeta i prilagođena prema; Sathasivam R, Ki JS. A Review of the Biological Activities of Microalgal Carotenoids and Their Potential Use in Healthcare and Cosmetic Industries. Mar Drugs. 2018;16(1):26.)

Postoje čvrsti dokazi da karotenoidi igraju važnu ulogu u uklanjanju reaktivnih kisikovih spojeva, poput singletnog molekularnog kisika i peroksidnih radikala, ali malo je informacija o njihovoj ulozi u staničnoj obrani protiv reaktivnih dušikovih spojeva. Fukoksantinski ekstrakti

iz algi pokazuju veliki antioksidacijski potencijal. Imaju snažnu aktivnost uklanjanja radikala zbog prisutnosti dvostrukih alenskih veza na položaju C70 u svojoj strukturi (76). Fukoksantin također može značajno utjecati na ljudsko zdravlje mijenjajući ekspresiju gena proteina uključenih u stanični metabolizam (77). Drugi važan karotenoid koji pokazuje snažno antioksidacijsko djelovanje je astaksantin, koji pokazuje veće razine antioksidacijskog djelovanja od ostalih karotenoida poput beta-karotena, zeaksantina i kantaksantina (78). Trenutno su glavni karotenoidi od interesa tržišta β -karoten, astaksantin, lutein, zeaksantin, likopen i kantaksantin. Iako nije od velikog tržišnog interesa, fukoksantin je fokusiran na funkcionalnu hranu protiv pretilosti, antikancerogene i potencijalne protuupalne aktivnosti (79). Nije pokazao toksičnost i mutagenost u malim dozama (80). Astaksantin i β -karoten dva su najpoznatija karotenoida na globalnom tržištu i čine gotovo polovinu tržišta karotenoida (prema *Business Communications Company, 2015*). Kao najjači antioksidans od svih karotenoida, astaksantin pokazuje višestruko jače antioksidacijsko djelovanje od vitamina E i β -karotena. Kako su izvijestili neki autori, on pobuđuje proizvodnju antitijela, djeluje protiv starenja, zaštićuje od sunca, a pokazuje i protuupalne učinke (61,81). β -karoten, odgovoran za sprječavanje nakupljanja toksina u jetri, potencijalno poboljšava imunost sustav i može imati preventivnu ulogu kod očnih bolesti poput noćne sljepoće i katarakte (82). Međutim, neke nedavne studije povezuju dugoročni unos β -karotena s povećanim rizikom od karcinoma (83,84). Lutein i zeaksantin, također postaju sve važniji na tržištu prehrambenih lijekova jer se smatra da igraju značajnu ulogu u domeni oftalmologije (85). Za lutein je klinički dokazano da sprječava kataraktu i degeneraciju makule. Lutein i zeaksantin ne smatraju se toksičnima i relativno su sigurni za ljudsku upotrebu. Likopen se predlaže za liječenje kardiovaskularnih bolesti i raka prostate (86). Kantaksantin može zaštititi ljude od nekih krvotvornih bolesti, no zabilježeno je da može biti rizičan u svakodnevnoj upotrebi te potencijalno uzrokovati sljepoću ili aplastičnu anemiju ako se konzumira u velikim količinama (87). Oko 50 vrsta karotenoida detektirano je u ljudskoj prehrani. Od toga β -karoten, α -karoten, likopen, β -kriptoksantin, lutein i zeaksantin glavni su sastojci i čine više od 90% ukupnih karotenoida (88,89) Karotenoidi se nakupljaju u ljudskim eritrocitima (90). Oksidativni metaboliti likopena, luteina i zeaksantina se nalaze u ljudskoj plazmi. Karotenoidi koji se uzimaju prehranom apsorbiraju se u tankom crijevu. Ksantofilni esteri hidroliziraju se lipazom ili esterazom i potom apsorbiraju. Apsorbirani karotenoidi ugrađuju se u hilomikrone i nakon toga se transportiraju u jetru i razne druge organe putem krvi. Svo troje vrsta lipoproteina: lipoprotein vrlo niske gustoće (VLDL), lipoprotein niske gustoće (LDL) i lipoprotein visoke gustoće (HDL), uključeni su u transport karotenoida. Karotenoidi se mogu naći u nekoliko ljudskih organa, kao što su jetra, oko, mozak, nadbubrežna žlijezda, jajnici, koža, pluća, testis i prostata (91). Ukupno tržište karotenoida u 2019. godini iznosilo je 1,8 milijardi dolara, a β -karoten, lutein i astaksantin zauzimali su više od 60% tržišnog udjela. Najtraženiji karotenoidi koji se mogu dobiti iz mikroalgi su β -karoten, lutein, astaksantin i kantaksantin (92). Trošak sintetičkog astaksantina iznosi preko 1000 USD/kg, dok je prodajna cijena višestruko veća od toga (81). Osim karotenoida, mikroalge se mogu koristiti za proizvodnju vrijednih nusproizvoda, poput biodizela, EPA, DHA, vitamina, proteina i enzima.

Astaksantin ima daleko veću antioksidacijsku aktivnost u usporedbi s raznim karotenoidima poput luteina, likopena, α -karotena i β -karotena (96). Antioksidativna aktivnost astaksantina 10 puta je veća od zeaksantina, luteina, kantaksantina, β -karotena te 100 puta veća od α -tokoferola (97). Antioksidativni enzimi katalaza, superoksid dismutaza i glutation peroksidaza imaju visoke vrijednosti u plazmi i jetri štakora nakon hranjenja biomasom mikroalge *Haematococcus pluvialis* (98). Astaksantin ima jedinstvenu molekularnu strukturu koja mu omogućuje da ostane i unutar i izvan stanične membrane. Astaksantin i njegovi esteri pokazali su 80%-tnu protulipidnu peroksidacijsku aktivnost u štakora (99). Topiv je u lipidima, nagomilava se u životinjskim tkivima i nisu pronađeni toksični učinci (100). Prirodni astaksantin se u Europskoj uniji prodaje u niz proizvoda u dnevnim dozama do 12 mg, a oni su odobreni od strane nacionalnih nadležnih tijela širom svijeta u dnevnim dozama do 24 mg. Studije u kojima je bilo uključeno više od 2000 sudionika, nisu utvrdile nikakvu značajnu toksičnost u bilo kojoj dozi za prirodni astaksantin (101,102). Strukturne značajke poput veličine, oblika i polariteta ključne su odrednice sposobnosti astaksantina da se pravilno uklopi u svoje molekularno okruženje kako bi maksimalno djelovao (103). Prekomjerna apoptoza povezana je s neurodegenerativnim bolestima, ishemijskim moždanim udarom, srčanim bolestima, sepsom i sindromom multiple organske disfunkcije. Astaksantin pokazuje antiapoptotičke učinke. Mnogi ključni apoptotički proteini uključeni su u dva glavna apoptotička puta; unutarnji i vanjski (104). Astaksantin poboljšava fosforilaciju Bcl-xL/Bcl-2 povezanog medijatora stanične smrti (BAD), regulira aktivaciju citokroma c te kaspaze 3 i 9 kroz regulaciju proteina p38-MAPK. Također aktivira put preživljavanja PI3K/Akt, što zauzvrat dovodi do smanjene apoptoze (105).

Slijedom navedenih blagodati te da do početka i provedbe ovog istraživanja nije objavljen niti jedan znanstveni rad koji se sveobuhvatno bavio učincima ovog snažnog antioksidansa na ishemijsko-reperfuzijsku ozljedu testisa, odlučili smo istražiti učinak istoga. Ukoliko bi multimodalnim pristupom dokazali da astaksantin ima protektivni učinak svakako bi pridonijeli dosadašnjim spoznajama i budućim istraživanjima na ovom području, posebice zbog činjenice što do današnjeg dana, u kliničkoj praksi, ne postoji farmak koji se daje pacijentima s torzijsko-detorzijskom ozljedom testisa.

2. Hipoteza

Intraperitonealno davanje astaksantina, po torzijsko detorzijskoj ozljedi testisa štakora od 720°, ima protektivan učinak

3. Ciljevi rada

3.1. Opći cilj

Istražiti učinak astaksantina na torzijsko detorzijsku ozljedu testisa u štakora

3.2. Specifični ciljevi

1. Odrediti vrijednosti malondialdehida (MDA) iz homogenata testisa
2. Odrediti vrijednosti enzimskih antioksidansa; superoksid dismutaze (SOD) i glutacion peroksidaze (GPx) iz homogenata testisa
3. Izračunati srednji promjer sjemenskih kanalića (MSTD)
4. Izračunati srednju vrijednost Johnsen-ovog „skora“ (procjena statusa/očuvanosti spermatogeneze)
5. Odrediti broj apoptotičnih kaspaza-3 pozitivnih stanica na 100 sjemenskih kanalića (indeks apoptoze)

4. Materijali i metode

4.1. Odobrenje projekta

Prije započinjanja projekta završio sam tečaj za osposobljavanje voditelja pokusa po Programu osposobljavanja osoba koje rade s pokusnim životinjama i životinjama za proizvodnju bioloških pripravaka pri Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu (*Laboratory Animal Science Course, 80 hours, FELASA (Federation for Laboratory Animal Science Associations) equivalent*) (broj potvrde: 197.3-17, HR 191/02/P).

Projekt je odobren od strane;

Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu;

- Etičko povjerenstvo (ur. broj: 380-59-10106-19-111/162, klasa: 641-01/19-02/01)
- Povjerenstvo za dobrobit životinja (ur. broj: 380-59-10106-19-111/155, klasa: 641-01/19-04/01)

Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske;

- Etičko povjerenstvo za zaštitu životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (EP 217/2019)
- Rješenje Ministarstva poljoprivrede, Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane (klasa: UP/I-322-01/19-01/54, ur. broj: 525-10/0543-19-4)

4.2. Pokusne životinje - opće informacije i dobrobit

Istraživanje na životinjama provedeno je na Zavodu za biologiju pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, Šalata 3a, Zagreb (upisnik pravnih osoba registriranih za provođenje pokusa i pravnih/fizičkih osoba odobrenih za uzgoj životinja namijenjenih pokusima - HR-POK-010). O životinjama se brinuo Milan Kopač, veterinarski tehničar na Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Ispunjeni su svi zakonski uvjeti da se provede istraživanje sukladno članku 33. Zakona o zaštiti životinja. Istraživanje je bilo u potpunosti sukladno Zakonu o zaštiti životinja, NN 135/06, NN 37/13 te sukladno Pravilniku o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe, NN 55/13, NN 39/17. U odgovarajućim bazama (*Alttox*, *Cyprotex*, *Mattek*, *Altweb*, *Toxnet*) pregledane su sve mogućnosti za eventualnim korištenjem alternativa (članak 24. Zakona o zaštiti životinja, Direktiva 2010/63/EU). Za potrebe istraživanja koristila su se 32 laboratorijska štakora (*Rattus norvegicus*) muškog spola soja Fisher stara 35 dana. Životinje su bile iz vlastitog uzgoja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Koristili su se 3R principi; „*reduction*“, „*refinement*“ i „*replacement*“ (Tablica 1) (106) uz poštivanje načela pet sloboda (Tablica 2) (107) te se shodno tome vodila briga o dobrobiti životinja, kako u samom eksperimentu, tako i tokom čitavog njihovog života. Pristup vodi i hrani bio je *ad libitum* uz optimalan nutricionistički sastav certificirane hrane obzirom na vrstu, soj i dob životinje. Hrana je bila skladištena sukladno Pravilniku za smještaj i skladištenje hrane. Svakodnevno se provjeravao sustav za napajanje. Hranilice su bile odgovarajuće smještene kako bi se omogućio jednostavan pristup hrani te izbjegla kontaminacija izmetom i urinom. Životinjama se osigurao adekvatan obogaćen okoliš te se pazilo da kavezi ne budu prenapučeni. Svakodnevno se provjeravalo stanje životinja te su se poduzimale adekvatne radnje sukladno metričkim i parametričkim pokazateljima. Prostor u kojem su bile smještene životinje ispunjavao je sljedeće uvjete sukladno dobroj laboratorijskoj praksi: temperatura 20-24°C, relativna vlaga 55% +/- 10%, kontrolirano osvjetljenje, ciklus tama/svjetlo 12h/12h te nivo buke koji nije prelazio 60dB. Dnevno se vodila evidencija mikroklimatskih parametara. Sukladno dobroj laboratorijskoj praksi (GLP)(NN 73/12) podaci su se osigurali na način da se cijeli pokus može rekonstruirati/ponoviti na isti način kako je izveden (sljedivost). Po završetku laboratorijskih ispitivanja napravilo se izvješće o ispitivanju tako što su se svi rezultati analiza ispitivanih uzoraka prikazali tabelarno i/ili grafički. Ostali podaci koji su neophodni za izradu izvješća o ispitivanju (podaci o korisniku usluga, mjestu uzorkovanja, samom uzorku, postupku uzorkovanja, metodama ispitivanja, i dr.) unijeli su se u navedeno izvješće. Po završetku istraživanja usmrćivanje životinja obavilo se u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja NN 135/06, čl. 9. i Zakonom o izmjenama i dopunama zakona o zaštiti životinja NN 37/13 čl. 11. koje su potom biti odvezene u spalionicu i neškodljivo uklonjene.

Tablica 1 – 3R principi u našem istraživanju

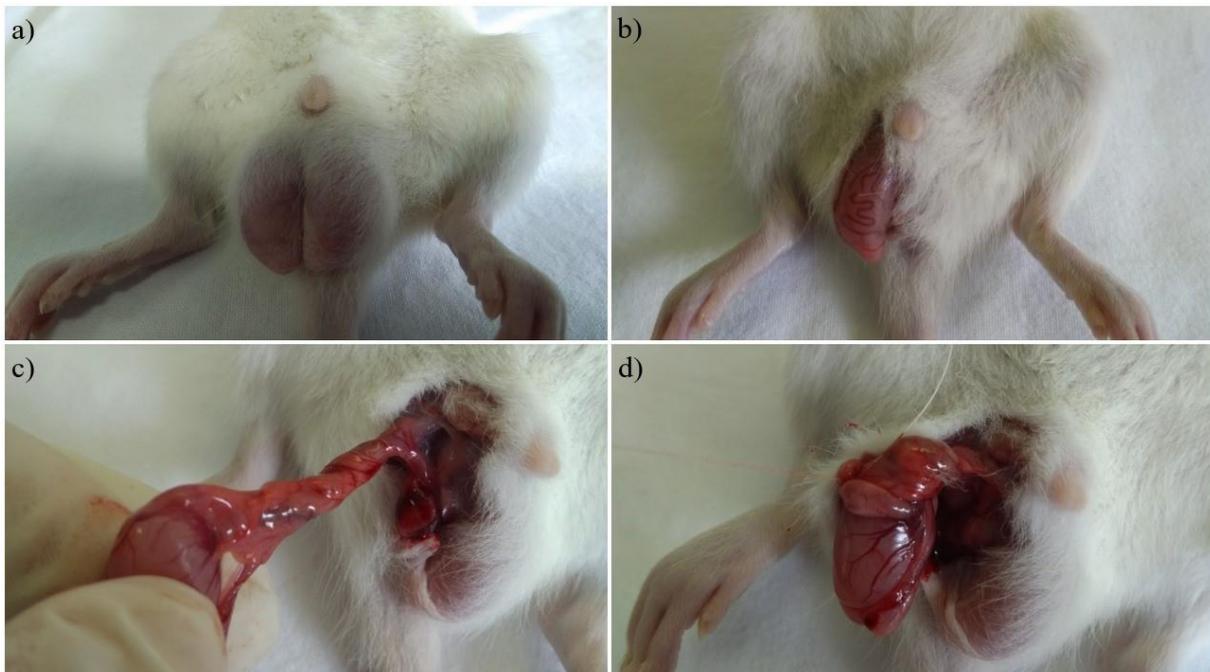
REPLACE	REDUCE	REFINE
<p>Trenutna saznanja dostupna u znanstvenoj literaturi ukazuju da niti jedan model (<i>in vitro</i>, računalni modeli, neživi model) nema alternative upotrebi životinja koje će se koristiti u ovom istraživanju. Živa životinja najbolje odražava djelovanje među stanicama, tkivima i organima koje posjeduje i ljudsko tijelo. Eksperiment je pomno osmišljen u skladu s najvišim standardima u smislu dobrobiti životinja.</p>	<p>Dizajn eksperimenta je detaljno analiziran. S 8 životinja po skupini dobit će se jednakovrijedni, visokokvalitetni podatci kao i da je eksperiment rađen s većim brojem jedinki (za $\alpha = 0.05$, snagu testa = 95% te efekt ≥ 0.9 potreban je uzorak od 32 životinje podijeljene u 4 skupine od 8 jedinki). Prethodne slične studije potvrđuju ovu tvrdnju.</p>	<p>Trenutno ne postoji jednako valjana <i>in vitro</i> alternativa. Uvjeti držanja životinja su u skladu s svim postojećim pravilnicima. Eksperimentalnih uvjeti, metode i protokoli odabrani su na način da izazivaju što je manje moguće boli, nelagode i stresa. Životinjama će se životni prostor obogatiti interaktivnim igračkama.</p>

Tablica 2 – Načelo pet sloboda prema kojima se vodilo istraživanje

Pravo na hranu i vodu	- slobodan pristup svježoj vodi i hrani što će omogućiti zdrav razvoj i život
Pravo na udoban smještaj	- život u prikladnoj okolini, osigurani zaklon i mjesto za odmor
Pravo na život bez boli, ozljeda i bolesti	- prevencija ili rano dijagnosticiranje i liječenje bolesti
Pravo na život bez straha i opasnosti	- život u uvjetima koji će spriječiti psihičku patnju i stres
Pravo na izražavanje prirodnog ponašanja	- život u prikladnom prostoru i uvjetima, kao i društvu životinja iste vrste

4.3. Tijek pokusa

Kirurški dio pokusa izveo se u aseptičnim uvjetima. Po brijanju dlaka u desnoj ingvinoskrotalnoj regiji, regija se oprala PLIVA®septom, zatim osušila te tretirala otopinom povidon joda nakon čega se u istoj regiji učinio rez. Ipsilateralni testis manualno se rotirao za 720° u smjeru suprotnom od kazaljke na satu te se takav pričvrstio za unutarnju stijenku skrotuma monofilamentnim poliglaktinskim šavom 6/0 tijekom 90 minuta (s obzirom da su prethodna istraživanja jasno ukazala da vrijeme torzije (ishemije) testisa od 720° kraće od 60 minuta na histološkoj razini ne uzrokuje promijene (108)) (Slika 17).



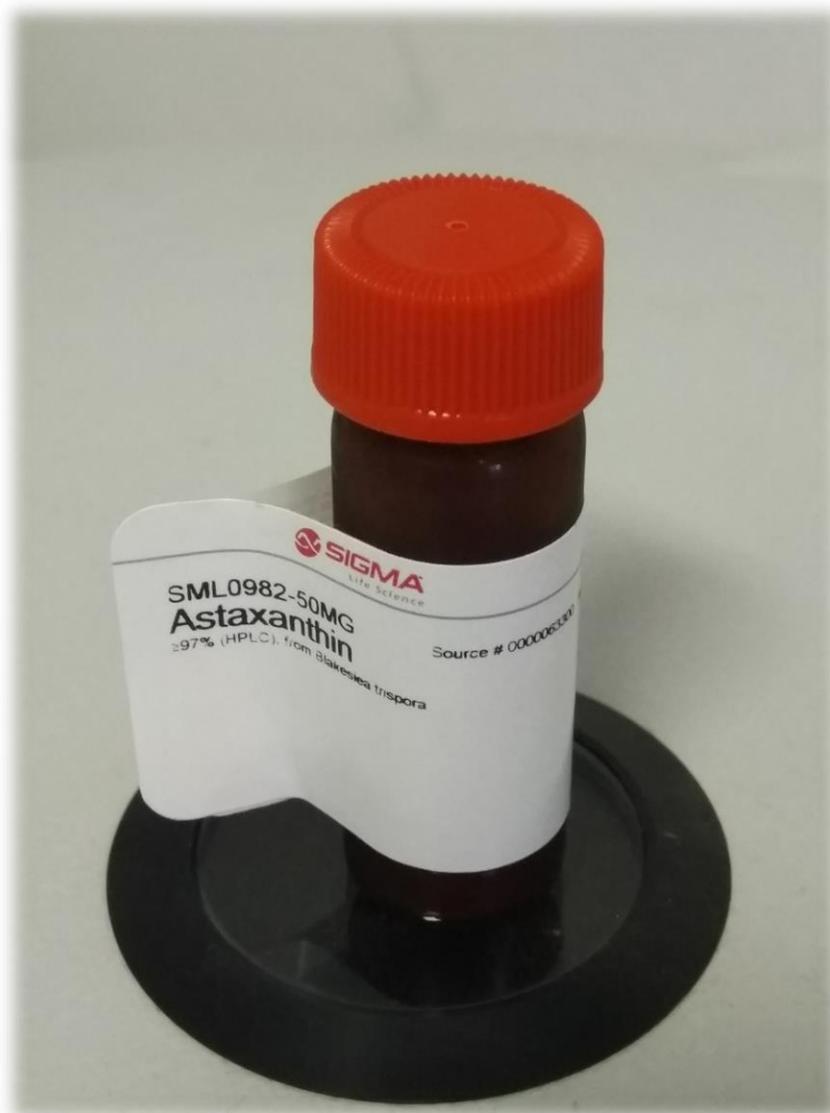
Slika 17 – a) izgled skrotuma laboratorijskog štakora soja Fisher starog 35 dana, b) rez u desnoj ingvinoskrotalnoj regiji, c) manualna torzija testisa za 720° u smjeru suprotnom od kazaljke na satu, d) pričvršćen testis za unutarnju stijenku skrotuma monofilamentnim poliglaktinskim šavom 6/0 (Izvorna slika)

Uklanjanjem šava, desni testis se manualno vratio (detorkvirao) u prirodni položaj. Sve kirurške intervencije provele su se pod općom anestezijom induciranoj intraperitonealnom injekcijom ketamina (90 mg / kg) i ksilazina (10 mg / kg) u aseptičnim uvjetima. Životinje su bile stalno nadgledane. U slučaju micanja, trzanja ili drugih znakova buđenja intraperitonealna anestezija se dopunila u manjoj dozi. Nije se koristio opioidni analgetik s obzirom da je pokus nepovratan, odnosno životinje su se iz održavane duboke anestezije eutanazirale. 32 štakora soja Fisher podijeljeno je u 4 skupine od po 8 jedinki (Tablica 3). Kod prve „lažno“ operirane (*sham*) skupine učinio se rez u desnoj ingvinoskrotalnoj regiji po kojem se izvadio ipsilateralni testis koji se odmah i vratio u prirodni položaj. U drugoj skupini učinila se torzija testisa po kojoj se

Tablica 3 - Tijek pokusa

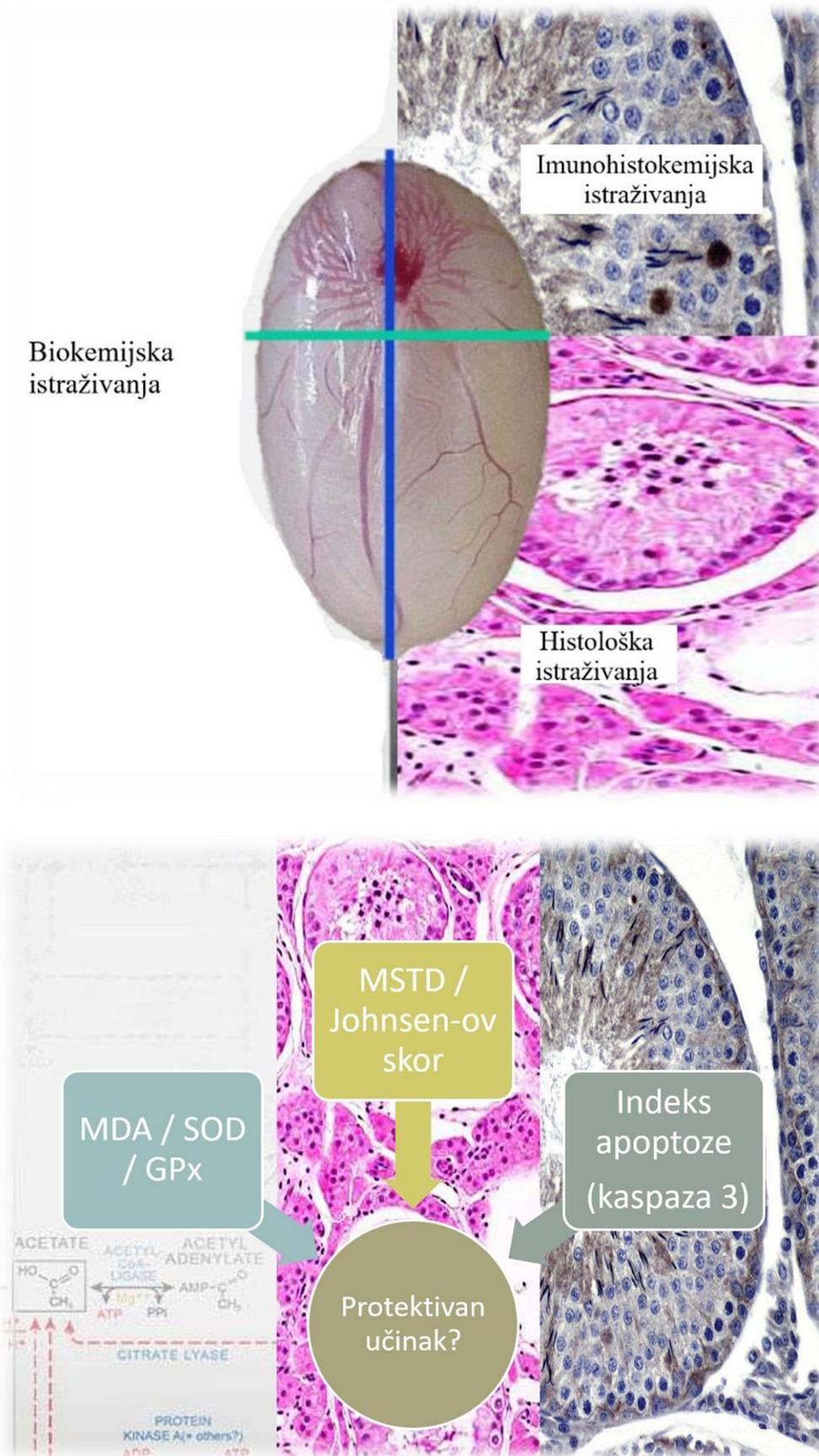
	0 min	90 min	135 min	180 min
Skupina 1 (8 jedinki) Lažno operirana (<i>sham</i>) skupina	Po intraperitonealnoj injekciji anestetika učinio se rez u desnoj ingvinalnoj regiji po kojem se izvadio ipsilateralni testis koji se odmah i vratio u prirodni položaj, šavi kože			Skidanje šavi kože, orhidektomija ipsilateralnog testisa za potrebna daljnja istraživanja (biokemijska, histološka, imunohistokemijska)
Skupina 2 (8 jedinki)	Po intraperitonealnoj injekciji anestetika učinio se rez u desnoj ingvinalnoj regiji po kojem se izvadio ipsilateralni testis na kojem se učinila torzija za 720°, te koji je u tom položaju fiksiran za skrotum, šavi kože	Skidanje šavi kože, detorzija ipsilateralnog testisa, šavi kože		Skidanje šavi kože, orhidektomija ipsilateralnog testisa za potrebna daljnja istraživanja (biokemijska, histološka, imunohistokemijska)
Skupina 3 (8 jedinki)	Po intraperitonealnoj injekciji anestetika učinio se rez u desnoj ingvinalnoj regiji po kojem se izvadio ipsilateralni testis na kojem se učinila torzija za 720°, te koji je u tom položaju fiksiran za skrotum, šavi kože	Skidanje šavi kože, detorzija ipsilateralnog testisa, šavi kože, intraperitonealno davanje astaksantina 75mg/kg		Skidanje šavi kože, orhidektomija ipsilateralnog testisa za potrebna daljnja istraživanja (biokemijska, histološka, imunohistokemijska)
Skupina 4 (8 jedinki)	Po intraperitonealnoj injekciji anestetika učinio se rez u desnoj ingvinalnoj regiji po kojem se izvadio ipsilateralni testis na kojem se učinila torzija za 720°, te koji je u tom položaju fiksiran za skrotum, šavi kože	Skidanje šavi kože, detorzija ipsilateralnog testisa, šavi kože	Intraperitonealno davanje astaksantina 75mg/kg	Skidanje šavi kože, orhidektomija ipsilateralnog testisa za potrebna daljnja istraživanja (biokemijska, histološka, imunohistokemijska)

nakon 90 minuta i uklanjanjem šava učinila detorzija. U trećoj skupini u trenutku detorzije intraperitonealno je jedinkama ordiniran astaksantin (Slika 18) u dozi od 75 mg/kg dok se četvrtoj skupini astaksantin intraperitonealno ordinirao 45 minuta od trenutka detorzije u jednakoj dozi.



Slika 18 – Astaksantin (Sigma-Aldrich®, ≥97% (HPLC), from *Blakeslea trispora*) (Izvorna slika)

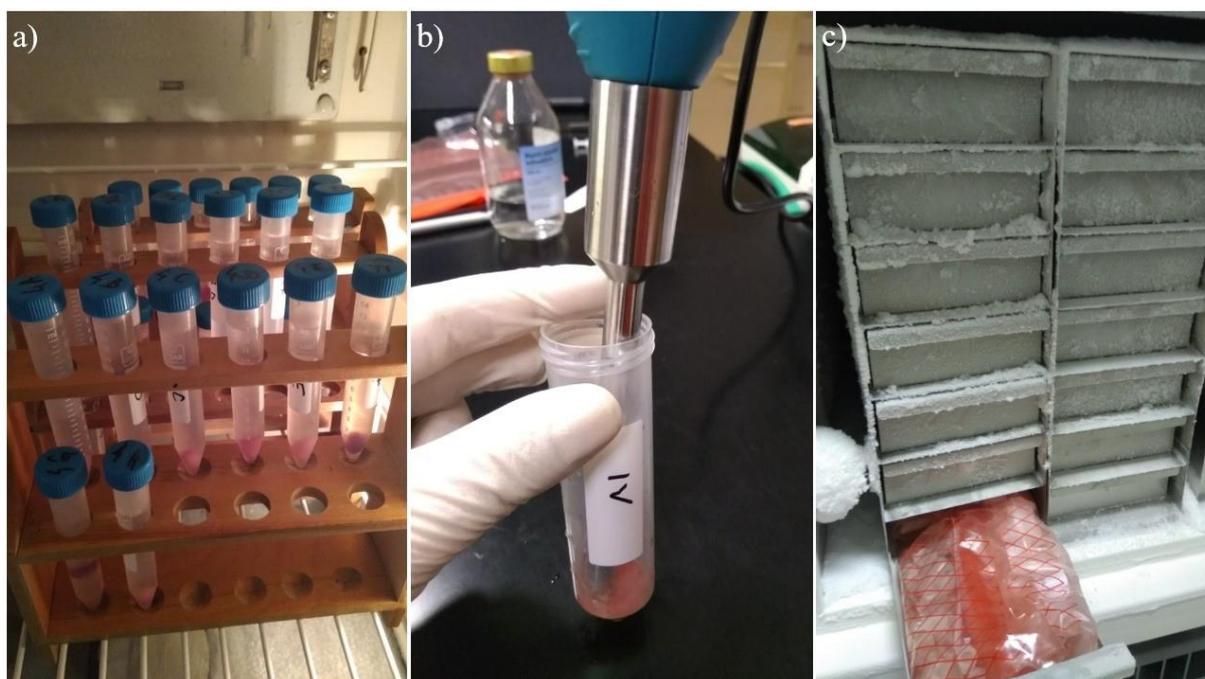
Nakon 90 minuta reperfuzije testis se uklonio te je podijeljen na dvije polovice. Na jednoj polovici testisa provela su se biokemijska istraživanja dok su se na drugoj polovici provela histološka i imunohistokemijska istraživanja (Slika 19). Po ostvarenju eksperimentalne krajnje točke (orhidektomiji) odnosno znanstvenom ostvarenju planiranog istraživanja eutanazija štakora obavila se primjenom T-61 (1ml/kg) i.v. Obzirom na opću anesteziju te da je riječ o nepovratnom pokusu životinje niti u jednom trenutku nisu trpjele bol.



Slika 19 – Shematski prikaz podjele testisa za biokemijska, histološka i imunohistokemijska istraživanja

4.4. Pohrana uzoraka do analize

Po eutanaziji i orhidektomiji prikupljeni su uzorci tkiva testisa za analizu. Polovica testisa svake životinje za potrebe biokemijskih istraživanja višekratno je isprano u fiziološkoj otopini 0,9% NaCl te držano na hladnome do obrade. Ohlađeno tkivo testisa se homogeniziralo. Homogenati testisa čuvali su se na -80°C do konačne biokemijske analize. Druga polovica testisa fiksirana je u puferiranom 4% paraformaldehidu (PFA) za histološku i imunohistokemijsku analizu (Slika 20).



Slika 20 – a) Fiksiranje tkiva testisa u 4% paraformaldehidu, b) homogeniziranje tkiva za biokemijska istraživanja, c) spremanje homogenata testisa za biokemijska istraživanja na -80°C (Izvorna slika)

4.5. Histološka analiza

U svrhu histoloških istraživanja tkivo testisa uklopilo se u parafin. Testisima je prethodno zarezana tunika albuginea, kako bi fiksativ mogao prodrijeti do samog parenhima. Fiksativ se sastojao od 4%-tnog paraformaldehida (PFA). Nakon 48 sati fiksiranja, testisi su isprani. Uranjanjem u otopine uzlaznog niza alkohola (96% i 100% etanol, svaki 2x20 minuta) uzorci su dehidrirani, pa uronjeni u tekući parafin na 56°C (postupak prožimanja parafinom ponovljen je 3 puta svakih sat vremena, uvijek sa svježim parafinom). Po hlađenju i stvrdnuću parafinskog bloka isti su se osušili i oblikovali. Blokovi su se do analize čuvali na 4°C (Slika 21).



Slika 21 – Parafinski blokovi (Izvorna slika)

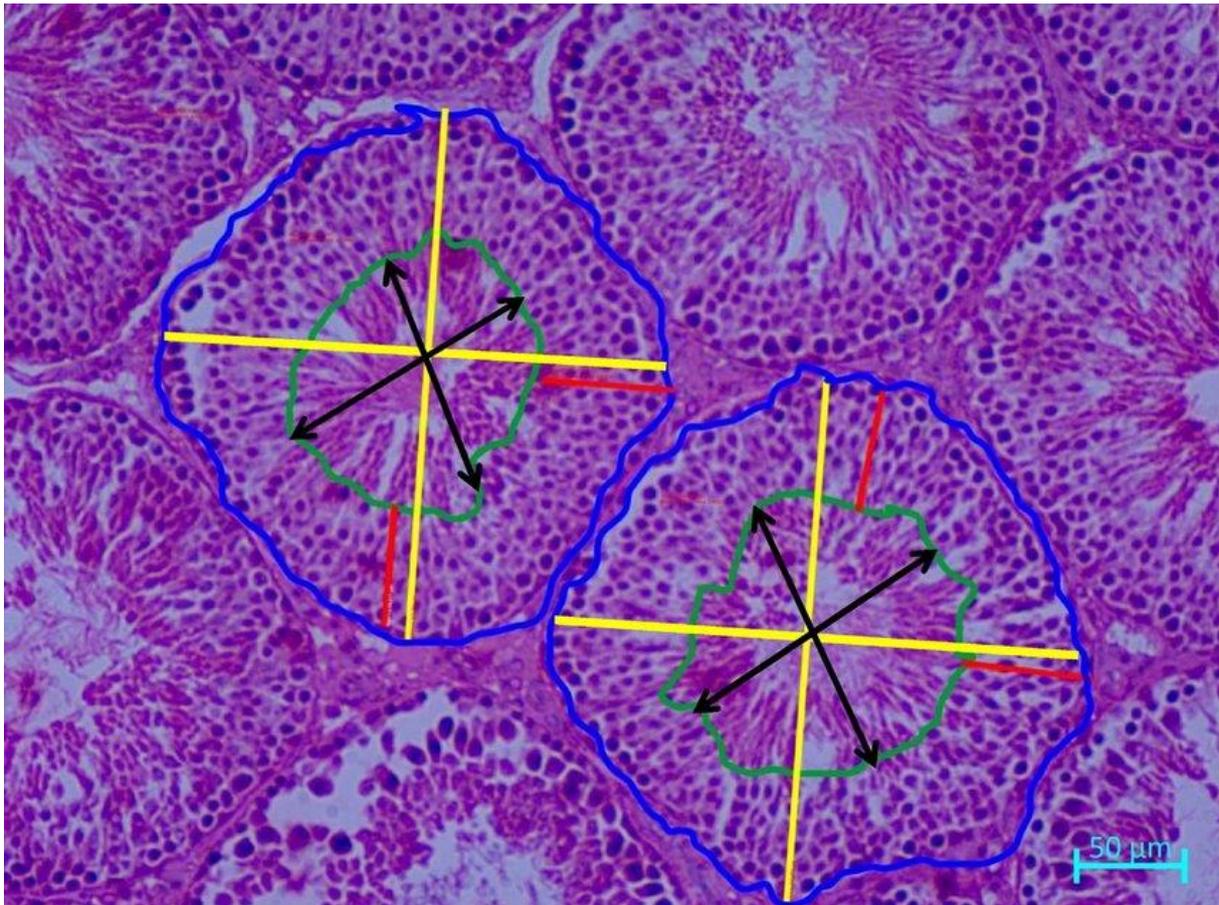
Blokovi su se serijski rezali rotacijskim mikrotomom *Leica* (debljina 4 μ m) te montirali na silanizirana stakalca (DAKO, Glostrup, Danska), osušili, stavili u termostat na 56°C i inkubirali 12h (Slika 22 a,b,c). Preparati su bojani hemalaun-eozinom (HE) (Slika 23). Preparati su pregledavani svjetlosnim mikroskopom Nikon ECLIPSE E200, a fotografirani digitalnim fotoaparatom Nikon E4500 (leća - 4x (7.85-32mm) Zoom Nikkor) (Slika 24).



Slika 24 – Mikroskop Nikon ECLIPSE E200 te digitalni fotoaparat Nikon E4500 (Izvorna slika)

4.5.1. Prosječan promjer sjemenskih kanalića (MSTD)

Mikroskopom se pri povećanju x200, uz pomoć softvera ImageJ[®], mjerio promjer sjemenskih kanalića iz čega se dobio srednji promjer kanalića - MSTD (*mean seminiferous tubular diameter*) (Slika 25). Za svaku skupinu nasumce se odabralo 20 najokruglijih presjeka. Promjer sjemenskog kanalića mjerio se na većoj i manjoj osi iz čega se dobio srednji promjer.



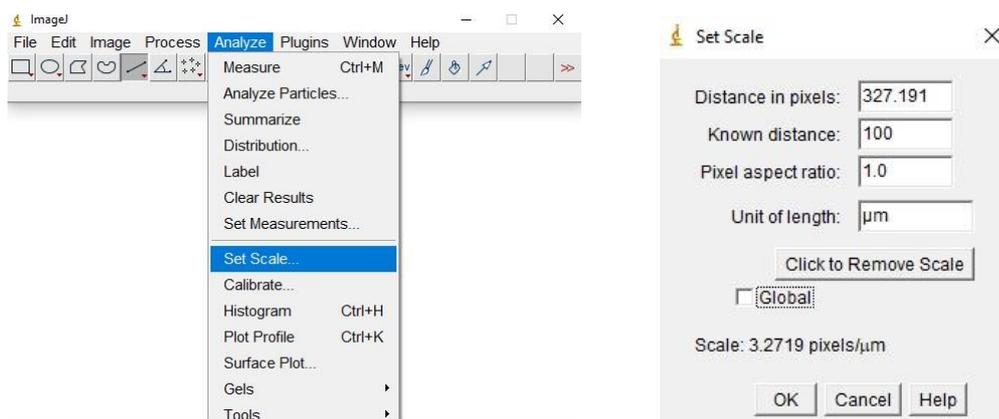
Slika 25 – Parametri sjemenskih kanalića. Promjer sjemenskih kanalića na većoj i manjoj osi (žute linije); površina sjemenskih kanalića (površina unutar plave linije); visina sjemenskog epitela (crvena linija); promjer lumena na većoj i manjoj osi (crna linija); površina luminalnog područja (površina unutar zelene linije) (slika je preuzeta i prilagođena prema: Omolaoye TS, Skosana BT, du Plessis SS. Diabetes mellitus- induction: Effect of different streptozotocin doses on male reproductive parameters. Acta Histochem. 2018;120(2):103-9.)

Način na koji se mjerio promjer kanalića je sljedeći;

- pomoću opcije *Ctrl + M* u nekoliko navrata mjerila se mjerna ljestvica (*scale bar*) pripadajuće slike, kako bi iz srednje vrijednosti (*mean*) mjerenja (*results > summarize*), piksele slike pretvorili u mikrometre (*analyze > set scale*) (Slika 26)

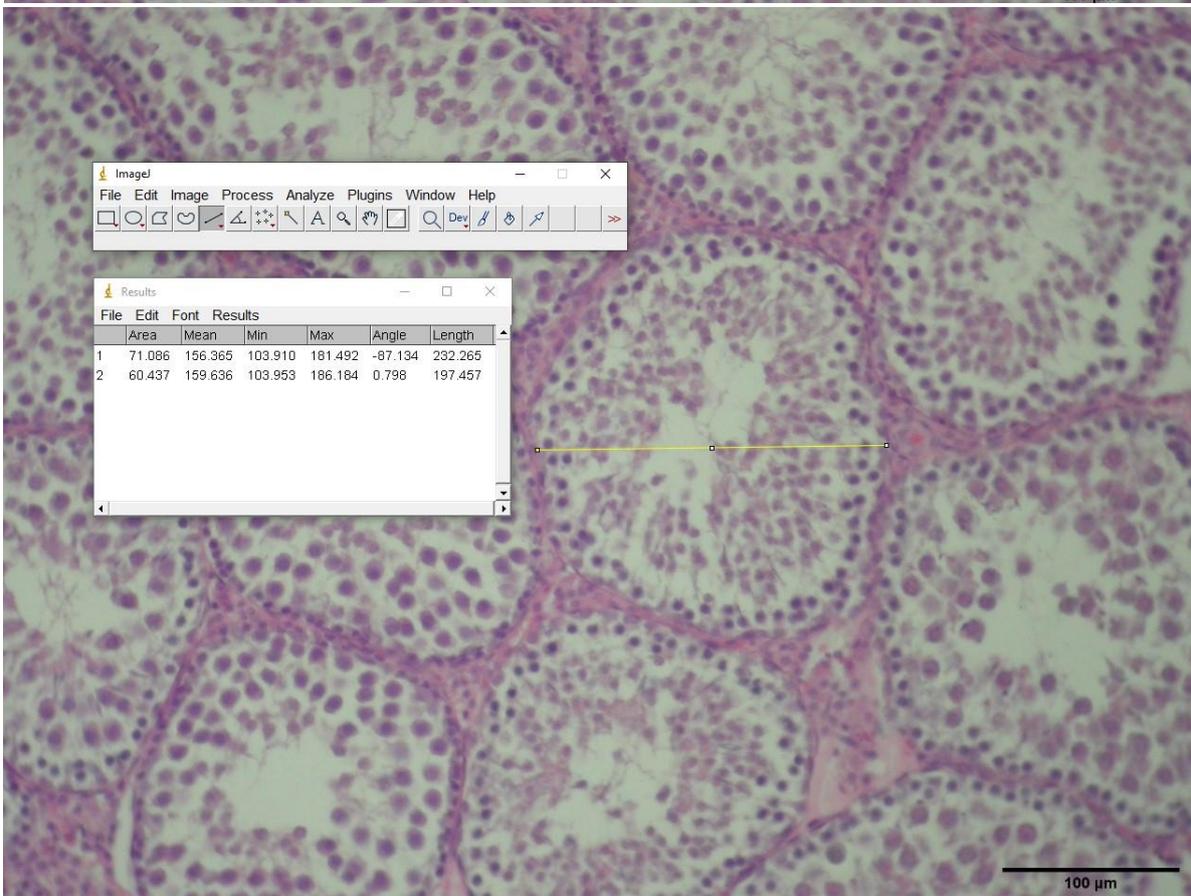
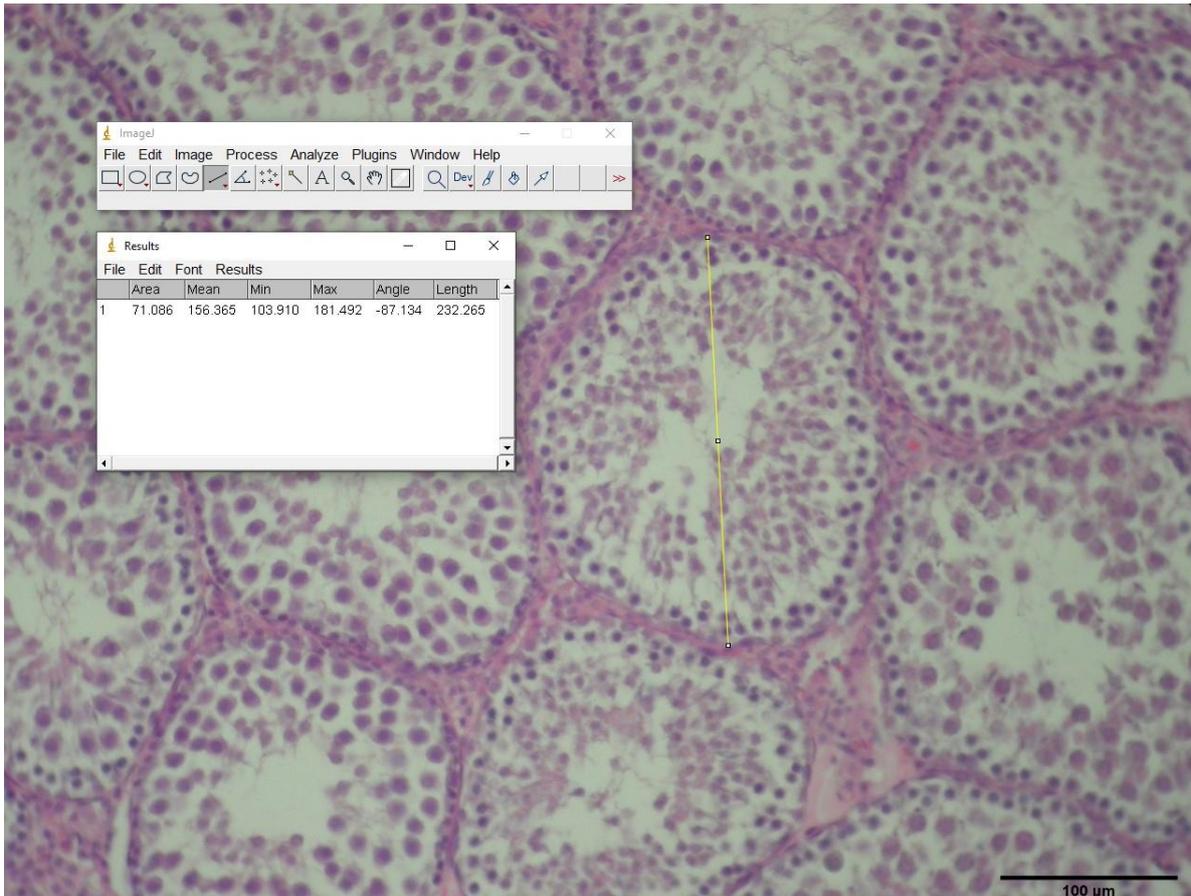


Results								Results							
File	Edit	Font	Results					File	Edit	Font	Results				
Label	Area		Area	Angle	Length		Label	Area	Mean	Min	Max	Angle	Length		
1	328.0		328.0	0.058	326.667		1	328.000	0.782	0.000	5.188	0.058	326.667		
2	328.0		328.0	-0.058	327.000		2	328.000	0.879	0.011	25.694	-0.058	327.000		
3	328.0		328.0	0.117	327.334		3	328.000	1.499	0.000	30.917	0.117	327.334		
4	328.0		328.0	-0.117	327.334		4	328.000	0.912	0.000	25.694	-0.117	327.334		
5	329.0		329.0	-0.117	327.667		5	329.000	65.477	24.177	118.267	-0.117	327.667		
6	328.0		328.0	-0.058	327.000		6	328.000	0.635	0.000	24.639	-0.058	327.000		
7	328.0		328.0	0.000	327.333		7	328.000	22.711	16.967	52.148	0.000	327.333		
8	Mean	328.0	328.143	-0.025	327.191		8	Mean	328.143	13.271	5.879	40.364	-0.025	327.191	
9	SD	0.378	24.410	10.251	36.996	0.088	9	SD	0.378	24.410	10.251	36.996	0.088	0.325	
10	Min	328.000	0.635	0.000	5.188	-0.117	10	Min	328.000	0.635	0.000	5.188	-0.117	326.667	
11	Max	329.000	65.477	24.177	118.267	0.117	11	Max	329.000	65.477	24.177	118.267	0.117	327.667	



Slika 26 – Screenshot - hodogram pretvaranja piksela u mikrometre u programu ImageJ® (Izvorna slika)

- rezultati mjerenja na većoj i manjoj osi (Slika 27) ručno su se unosili u prethodno pripremljene tablice (vidi pod „Rezultati“) iz čega se za svaki kanalić dobio srednji promjer ($a + b / 2$) te potom i srednji promjer za svaku skupinu



Slika 27 – Mjerenje promjera kanalića na većoj i manjoj osi pomoću programa ImageJ®, H&E, x200 (Izvorna slika)

4.5.2. Procjena očuvanosti spermatogeneze po Johnsen-u

Za svaku skupinu na slučajno odabranih 20 tubula odredila se i procjena očuvanosti spermatogeneze po Johnsen-u („Johnsen-ov skor“) ovisno o zrelosti sjemenskih stanica od bazalnog prema adluminalnom odjeljku čime se kvantificirala spermatogeneza od 1 do 10 (109) (Tablica 4).

Tablica 4 – Johnsen-ova scoring lista

1	bez sjemenskih stanica, bez potpornih (Sertolijevih) stanica, tubularna fibroza
2	bez sjemenskih stanica, prisutne samo Sertolijeve stanice
3	prisutne spermatogonije uz bazalnu laminu epitela
4	nekoliko spermatocita (<5)
5	više od 5 spermatocita, bez spermatida
6	prisutne spermatide (5-10), bez spermija
7	prisutno više od 10 spermatida, bez spermija
8	prisutni spermiji (<5-10)
9	mного spermija (>10), dezorganiziran sjemenski epitel, obliteriran lumen
10	potpuna spermatogeneza / spermiogeneza, mnogo spermija, organiziran sjemenski epitel, lumen prohodan

4.6. Imunohistokemijska analiza

S obzirom da je kaspaza-3 jedan od ključnih čimbenika apoptoze imunohistokemijskom metodom sukladno deklariranom protokolu detektirao se broj apoptotičnih kaspaza-3 pozitivnih stanica na 100 slučajno odabranih tubula po svakoj skupini (indeks apoptoze). U tu svrhu koristilo se zečje poliklonsko protutijelo (Cleaved Caspase-3; Asp 175, Cell Signaling Technology®) (Slika 28) koje detektira heterodimere (17/19kDa) aktivirane kaspaze-3 kao rezultat cijepanja na Asp175.



Certificate of Analysis

Product intended for Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

This document certifies that this product has met all of the quality control standards defined by Cell Signaling Technology, Inc.

Product Number: **9661**
Product Name: **Cleaved Caspase-3 (Asp175) Antibody**

Product Type: Polyclonal Antibody
Species of Origin: Rabbit
Lot Number: 45
Concentration: 51.9 µg/ml

Approved Applications:

- Flow Cytometry
- Immunofluorescence
- Immunohistochemistry
- Immunoprecipitation
- Western

Approvals:	
Production: Kristen Cullen	Date: 06-April-2015
Supervisor: Valerie Goss	Date: 06-April-2015

version 2017-9-21

3 Trask Lane, Danvers, MA 01923
www.cellsignal.com

phone: 978-867-2300
fax: 978-867-2400

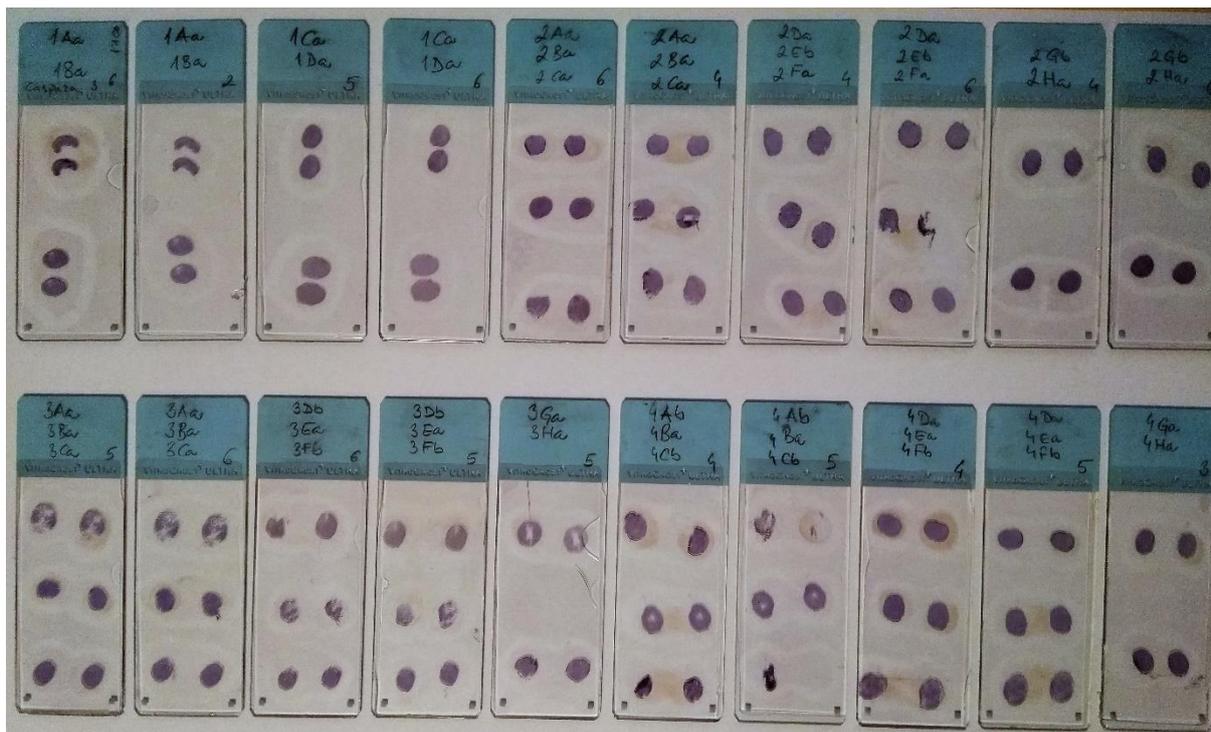
Slika 28 – Zečje poliklonsko protutijelo (Cleaved Caspase-3; Asp 175, Cell Signaling Technology®) uz certifikat proizvođača (Izvorna slika)

Imunohistokemijske metode u analizi ekspresije proteina su primijenjene, koristeći osnovni princip imunologije da se određeno protutijelo veže i prepoznaje samo ciljni antigen, na parafinskim rezovima, u svrhu analize apoptoze stanica. Za ovu analizu je dio serijskih rezova testisa debljine 4µm stavljen na silanizirana stakalca (DAKO, Glostrup, Danska). U imunohistokemijskoj metodi korišteno je prethodno navedeno protutijelo kao biljeg ciljnog proteina važnog za procese apoptoze. Korišteno je razrjeđenje 1:100.

Nakon deparafinizacije u ksilolu (2 x 10 minuta), rezovi su rehidrirani provlačenjem stakalaca kroz niz otopina: 100%-, 96%-, 70%-tni etanol (svaki 2 x 5 minuta). Potom je slijedilo ispiranje u destiliranoj vodi 5 minuta. Demaskiranje antigena izvedeno je metodom kuhanja stakalaca uronjenih u citratni pufer u parnoj kupelji tijekom 20 minuta od postizanja optimalne temperature. Na kraju je otopina sa stakalcima ostavljena da se ohladi 30 minuta na sobnoj temperaturi. Stakalca su potom premještena u TBS pufer (engl. *tris-buffered saline*) 5 minuta. Prije stavljanja kemikalija na njih, rezovi su zaokruženi masnom olovkom kako bi se napravili „bazečići“. Za blokiranje nespecifičnog vezanja sekundarnog protutijela na rezove je nakapan teleći serum (50% i serum razrijeđen s 1% BSA/TBS) te ostavljen 20 minuta. Višak seruma je potom otresen s rezova te je na njih stavljeno primarno protutijelo prethodno razrijeđeno u 1%BSA/TBS/0.05%Tween20. Rezovi su inkubirani s primarnim protutijelom u vlažnoj komori preko noći na +4°C. Na svakom staklu po jedan rez nakapan je samo puferom za razrjeđivanje protutijela (1%BSA/TBS/0.05%Tween20), što je definirano kao negativna kontrola. Drugi dan rezovi su dobro isprani u svježem TBS-u (5 x 5 minuta). Slijedilo je blokiranje endogenih peroksidaza otopinom priređenom neposredno prije upotrebe (3% H₂O₂) tijekom 20 minuta namakanja stakalaca u mraku. Nakon toga stakalca su isprana u TBS puferu 3 x 5 minuta.

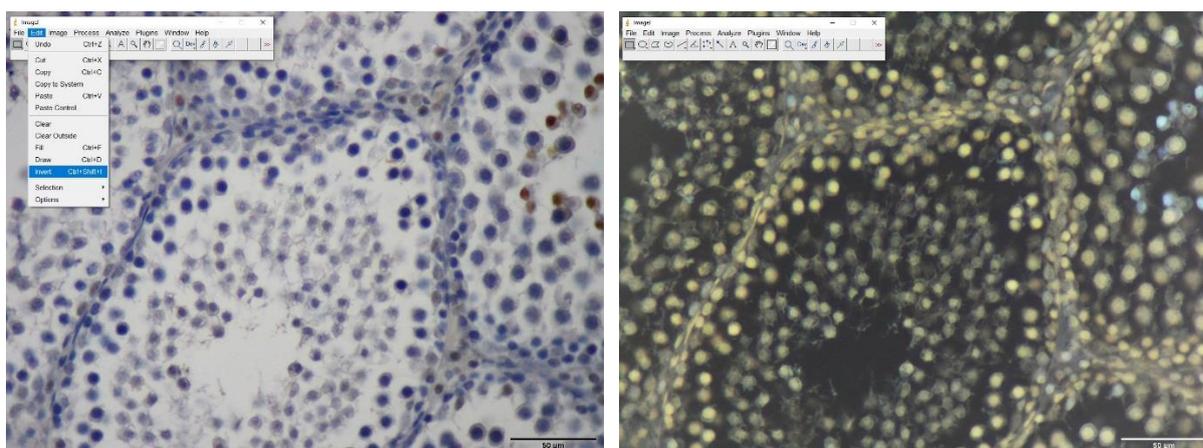
Slijedila je inkubacija s odgovarajućim sekundarnim protutijelom koje je konjugirano s peroksidazom iz hrena. Korišten je tvornički razrijeđeni HRP označeni polimer konjugiran sa sekundarnim protutijelima miša i zeca (HRP Labelled Polymer). Sekundarno protutijelo ostavljeno je 45 minuta, nakon čega su rezovi isprani 3 x 5 minuta u TBS puferu.

Signal, tj. prisutnost vezanog protutijela, vizualiziran je inkubacijom rezova s otopinom kromogena DAB+ Chromogen (3,3'-diaminobenzidin) i supstrata za peroksidazu tijekom 3 minute ili dok nije uočena promjena boje u smeđu. Reakcija je prekinuta uranjanjem stakalaca u destiliranu vodu 2 puta. Dalje su se rezovi kontrastirali hematoksilinom 30 sekundi, kratkim ispiranjem u destiliranoj vodi te puštanjem hladne vodovodne vode u posudicu sa stakalcima tijekom 7 minuta dok ne dobiju plavkastu boju. Nakon ispiranja u destiliranoj vodi, rezovi su dehidrirani uranjanjem u posudice s otopinama rastuće koncentracije etanola (od 70 do 100%, po 5 minuta) te izbistreni inkubacijom u otopini ksilola (3 x 5 minuta). Stakalca su potom pokrivena medijem za uklapanje i ostavljena da se osuše u digestoru 24 sata (Slika 29).



Slika 29 – Pripremljeni preparati za mikroskopiranje (Izorna slika)

Kako bi se što jasnije uočile kaspaza-3 pozitivne stanice u programu ImageJ® korištena je opcija *Invert* (*Ctrl+Shift+I*) čime su na preparatu smeđe obojane kaspaza-3 pozitivne stanice računalnim programom obojane u plavu boju dok su ostale stanice obojane žutom bojom (Slika 30). Stanice pozitivne na kaspazu-3 brojane su vizualnim zapažanjem od dva nezavisna istraživača. Ukoliko su se brojevi razlikovali zatraženo je mišljenje trećeg istraživača.



Slika 30 – Screenshot - korištenje opcije *Invert* u programu ImageJ® kako bi se što jasnije uočile kaspaza-3 pozitivne stanice (Izorna slika)

4.7. Biokemijska analiza

4.7.1. Koncentracija proteina

Nakon izolacije, testisi štakora su izvagani te su zapisane mase. Kako bi se u uzorcima izračunala koncentracija proteina bilo je potrebno izolirati proteine. Uzorci su prvo fizički razgrađeni pomoću sonikatora. Sonda je isprana te se postupak ponavljao sve dok je bilo tkiva. Tkivo je zatim dodatno fizički razgrađeno u Minilys homogenizatoru (kat. Br. P000673-MLYS0-A) dok se za kemijsku razgradnju i izolaciju proteina koristio RIPA pufer (Tablica 5) uz dodatak proteinaznog inhibitora (PI) u omjeru 1:25.

Tablica 5 – Komponente RIPA pufera

Komponente	Korišteno
150mM NaCl	3 ml, 5M NaCl
25mM TrisHCl, pH 7,6	2,5 ml, 1M TrisHCl, pH 7,6
0,1% SDS	1 ml, 10% SDS
1% Na deoxycholate	otopili 1g u 20 ml vode i dodali sve u pufer
1% Triton x100	1 ml, Triton otopljeni
5mM EDTA	1 ml, 0,5M EDTA
H ₂ O	do 100

U epice je dodano 1 ml RIPA + PI pufera na 100 mg tkiva. Kapsule proteinaznog inhibitora (PI) prethodno su otopljene u 2 ml destilirane H₂O (miješano na radnoj temperaturi nekoliko minuta (Vortex)). Alikvoti otopljenog PI su do korištenja uskladišteni na -20°C. Nakon kratke inkubacije (3 min.) u RIPA/PI puferu, uzorci su centrifugirani 10 minuta na 12500rpm (+4°C). Potom se odijelio supernatant s proteinima u novu epicu prema tablici 6 (odvojili su se u nekoliko alikvota kako bi se izbjeglo odmrzavanje/zamrzavanje). Tijekom cijelog rada proteini su držani na +4°C.

Tablica 6 – Alikvoti

Alikvoti	Volumen
- za mjerenje koncentracije proteina (BCA)	- 100 µl
- za mjerenje MDA	- 800 µl
- za mjerenje GpX	- 100 µl
- za mjerenje SOD	- 100 µl

U svrhu mjerenja koncentracije proteina korišten je Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (kataloški broj BCA1 AND B9643; Sigma-Aldrich®). BCA test se temelji na stvaranju Cu^{2+} protein kompleksa kod kojih u lužnatim uvjetima dolazi do redukcije $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$ te je količina reduciranih iona proporcionalna količini proteina.

Kit se sastoji od reagensa A (otopina bicinkonične kiseline, Na karbonata, Na tartrata i Na bikarbonata u 0.1M NaOH, pH=11,25), reagens B (bakrov(II) sulfat pentahidrat 4%) te proteinskog standarda – BSA (1.0 mg/ml BSA u 0.15M NaCl sa 0.05% Na azid).

Standardi BSA zamiješani su uz RIPA+PI pufer tako da je koncentracijski raspon bio – 1000, 800, 600, 400, 200 i 0 $\mu\text{g/ml}$. BCA radna otopina (lagano zelene boje, stabilna 1 dan) napravljena je miješanjem reagensa A : reagens B = 50:1. Pomiješano je 19ml reagens A i 0,38ml reagens B što je bilo dostatno za 96 ploču. Potom je u 96 ploču dodano 200 μl BCA radne otopine te 25 μl uzorka (BCA radna otopina : uzorak = 8:1). U neke jažice 96 ploče umjesto uzorka pipetirana je negativna kontrola, a u neke BSA proteinski standard. Negativna kontrola je pufer bez proteina dok je BSA standard otopina poznate koncentracije albumina goveđeg seruma i služi kao pozitivna kontrola. Neposredno prije pipetiranja u ploču, uzorci nepoznate koncentracije proteina su razrijeđeni 20x \rightarrow 1,25 μl uzorka + 23,75 RIPA + PI pufera (za uzorke s nepoznatim koncentracijama proteina prethodno je trebalo napraviti serijska razrjeđenja kako bi se odredilo ono razrjeđenje koje je unutar linearnog koncentracijskog raspona od 200-1000 $\mu\text{g/ml}$). Uzorci su pipetirani u triplikatima. Pločice su zatvorene filmom te inkubirane 15 min na 60°C. Apsorbancija na 562 nm je očitana na spektrofotometru (Tecan, Spark 20M) (Slika 31) i koncentracija proteina je određena usporedbom sa standardnom krivuljom.



Slika 31 - Optička gustoća mjerena je pomoću spektrofotometra, mikročitača Tecan® (Austria GmbH, Salzburg, Austrija)

4.7.2. Vrijednosti malondialdehida (MDA)

U svrhu mjerenja koncentracije malondialdehida korišten je Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit (kataloški broj MAK085; Sigma-Aldrich®) (Slika 32).



Slika 32 - Kit za ispitivanje lipidne peroksidacije (Sigma-Aldrich®)

Peroksidacija lipida odnosi se na oksidativnu razgradnju lipida. U ovom procesu slobodni radikali uzimaju elektrone iz lipida (općenito u staničnim membranama), što rezultira oštećenjem stanica. Kvantifikacija lipidne peroksidacije ključna je za procjenu oksidacijskog stresa.

U protokolu ispitivanja peroksidacije lipida, MDA u uzorku reagira s tiobarbiturnom kiselinom (TBA) tvoreći MDA-TBA kompleks. MDA-TBA kompleks koji je proporcionalan prisutnom MDA. MDA-TBA kompleks može se lako kvantificirati kolorimetrijski (532 nm) na spektrofotometru.

TBA je otopljen u 7,5 mL octene kiseline (kat.br. A6283; Sigma-Aldrich®) i 17,5 mL ultračiste vode. U odvojene falkonice su pripravljene otopine potrebnih MDA standarda (0, 2, 4, 8, 12, 16 i 20 nmol). Uzorci su pripravljeni u optimalnim razrjeđenjima tako da su odgovarali standardima očitavanja krivulje. Dodano je 600 μ l otopine TBA u svaku epicu s 200 μ l standarda i svaku epicu s 200 μ l uzorka. Smjesa (TBA-standard / TBA-uzorak) je inkubirana na 95°C 60 minuta te potom ohlađena na sobnoj temperaturi u ledenoj kupelji 10 minuta. Potom je otpipetirano 200 μ l iz svake reakcijske smjese za TBA-standard i TBA-uzorak u mikroploču s 96 jažica. ApSORBANCija je odmah izmjerena na OD 532 nm za kolorimetrijski test (uzorci koji su proizvodili signale veće od onih najvišeg standarda trebalo je dalje razrijediti u odgovarajućem puferu i ponovno analizirati, a zatim pomnožiti dobivenu koncentraciju s

odgovarajućim faktorom razrjeđenja). Od srednje vrijednosti apsorbancije za svaki izmjereni standard i uzorak bilo je potrebno oduzeti negativnu kontrolu (blank) kako bi se dobila ispravljena apsorbancija. Iz dobivenih podataka konstruirana je standardna kalibracijska krivulja. Iz krivulje je određena količina MDA za svaki uzorak. Koncentracija MDA u ispitivanim uzorcima izračunata je prema formuli:

$$(S_a/S_v) \times D = C$$

S_a = količina MDA u nepoznatom uzorku (nmol) iz standardne krivulje

S_v = volumen uzorka (ml) dodanog u jažice (0,02 ml)

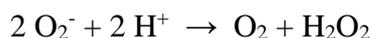
C = koncentracija MDA u uzorku

D = faktor razrjeđenja uzorka (ako je primjenjivo)

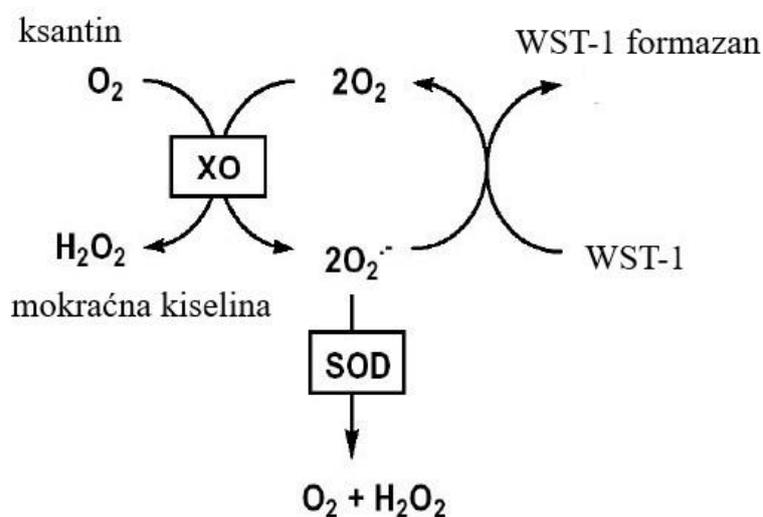
4.7.3. Vrijednosti enzimskog antioksidansa superoksid dismutaze (SOD)

U svrhu mjerenja superoksid dismutaze korišten je SOD Determination Kit (kataloški broj 19160; Sigma-Aldrich®).

Superoksid dismutaza katalizira sljedeću reakciju;



Kit za određivanje SOD omogućuje određivanje SOD-a korištenjem visoko vodotopljive soli tetrazolija (WST), koja nakon redukcije superoksidnim anionom stvara vodotopljivu formazan boju (Slika 33). Stopa redukcije s O_2 linearno je povezana s aktivnošću ksantin oksidaze (XO), a inhibira ih SOD. Stoga IC_{50} (50% aktivnost inhibicije SOD-a) može biti određena kolorimetrijskom metodom. Budući da je apsorpcija na 440 nm proporcionalna količini superoksidnog aniona, aktivnost SOD-a kao aktivnost inhibicije može se kvantificirati mjerenjem smanjenja razvoja boje na 440 nm.



Slika 33 – Redukcija WST-a superoksidnim anionom / aktivnost ksantin oksidaze

Kit se sastoji od; WST otopine (5 ml), enzimske otopine (100 µl), pufer otopine (100 ml) i pufera za razrjeđivanje (50 ml).

Otopine su pripremljene na sljedeći način: WST radna otopina je napravljena razrjeđivanjem 1 mL WST otopine s 19mL pufera dok je enzimska radna otopina je pripremljena razrjeđivanjem 15 µl enzimske otopine s 2,5 mL pufera za razrjeđivanje (DB). Za potrebu inhibicijske krivulje pripremljene su otopine SOD standarda razrjeđivanjem original SOD-a s puferom za razrjeđivanje (DB) prema tablici 7.

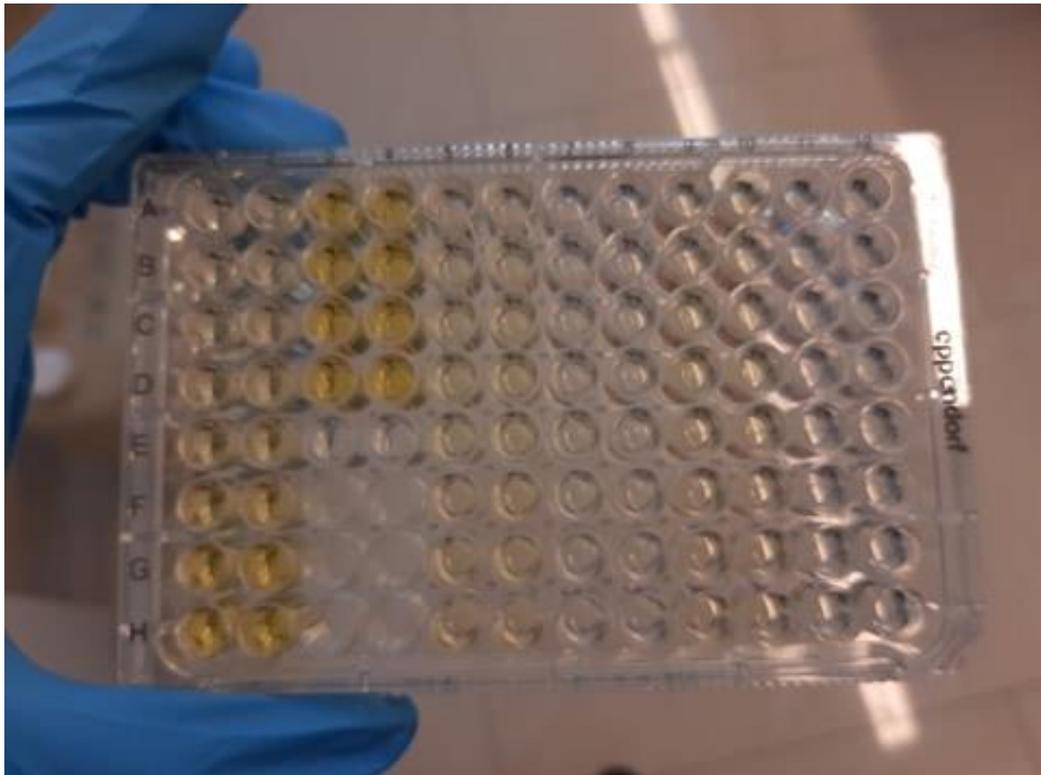
Prah SOD enzima (kat. br. S7571-15KU; Biovit) je otopljen u 1,5 mL ultračiste H₂O kako bi se dobila koncentracija od 10048 U/mg. Alikvoti otopljenog SOD-a su pohranjeni na -20°C. Neposredno prije korištenja original SOD je razrijeđen 50x kako bi se dobila željena koncentracija od 200U/ml (prema formuli $V_1C_1=V_2C_2$).

Tablica 7 – Priprema otopina SOD standarda razrjeđivanjem original SOD-a s puferom za razrjeđivanje

C ₁ (SOD) U/ml	V ₁ (SOD) µl	DB µl
200	10 (original)	490
100	250 (200U)	250
50	250 (100U)	250
20	200 (50U)	300
10	250 (20U)	250
5	250 (10U)	250
1	100 (5U)	400
0,1	50 (1U)	450
0,05	250 (0,1U)	250
0,01	100 (0,05U)	400
0,001	50 (0,01U)	450

Dodano je 20 µl uzorka u sve jažice 96 ploče označene za uzorke i Blank2, te 20 µl ultračiste H₂O u svaki Blank1 i Blank2. Potom je dodano 200 µl WST radne otopine u svaku jažicu te je miješano. 20 µl pufera za razrjeđivanje dodano je u svaki Blank2 i Blank3. Potom je dodano 20 µl enzimske radne otopine u svaku jažicu za uzorak i Blank1 te miksano (ovaj korak je rađen s multipipetom budući da se superoksid otpušta odmah po dodatku enzimske radne otopine). Ploča je potom inkubirana na 37°C 20min (Slika 34). Apsorbancija je očitana na 450nm (Tecan). Potom je putem sljedeće formule izračunata SOD aktivnost (stopa inhibicije u %);

$$\frac{(A_{\text{Blank 1}} - A_{\text{Blank 3}}) - (A_{\text{Sample}} - A_{\text{Blank 2}})}{(A_{\text{Blank 1}} - A_{\text{Blank 3}})} \times 100\%$$



Slika 34 – 96 ploča – pripremljeni uzorci za određivanje SOD aktivnosti

4.7.4. Vrijednosti enzimskog antioksidansa glutation peroksidaze (GPx)

U svrhu mjerenja aktivnosti glutation peroksidaze (GPx) korišten je GPx Assay Kit (kataloški broj 353919; Sigma-Aldrich®)

Biokemijska funkcija glutation peroksidaze je redukcija hidroperoksida u odgovarajuće alkohole i redukcija slobodnog vodikova peroksida u vodu.

Glavna reakcija koju katalizira glutation peroksidaza je: $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GS-SG} + 2\text{H}_2\text{O}$ gdje je GSH reducirani monomerni glutation, a GS-SG glutation disulfid. Mehanizam uključuje oksidaciju selenola u selenocisteinskom ostatku putem vodikovog peroksida.

Glutation reduktaza zatim reducira oksidirani glutation i kompletira ciklus: $\text{GS-SG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow 2\text{GSH} + \text{NADP}^+$. Oksidacija NADPH u NADP^+ popraćena je smanjenjem apsorpcije na 340 nm. U uvjetima u kojima je aktivnost glutation peroksidaze ograničena, stopa smanjenja A_{340} izravno je proporcionalna aktivnosti glutation peroksidaze u uzorku.

Kit se sastoji od; esej pufera (5 ml), pufer uzorka (3 ml), glutation peroksidaze (kontrola)(1 bočica), smjese ko-supstrata (2 bočice), kumen hidroperoksida (2.5 ml), NADPH (2 bočice), 96 ploče

Otopine su bile pripremljene na sljedeći način: 5ml esej pufera (koncentrat;10x) razrijeđeno je s 45ml ultračiste vode, 2ml pufer uzorka (koncentrat;10x) razrijeđeno je s 18 ml ultračiste vode dok je smjesa ko-supstrata (liofilizirani prah glutationa i glutation reduktaze) otopljena dodatkom 3ml razrijeđenog esej pufera (1x). Glutation peroksidaza (pozitivna kontrola-PK) je alikvotirana i pohranjena na -20°C , a neposredno prije pipetiranja je razrijeđena 50x s puferom za uzorke (stabilna na ledu 4h). NADPH je pripravljena dodatkom 3mL razrijeđenog esej pufera (1x) te je takva stabilna 2 dana na 4°C . Kumen hidroperoksid iz kita je spreman za upotrebu i do korištenja je uskladišten na -20°C .

U neenzimatske jažice (negativna kontrola - blank) dodano je 70 μl razrijeđenog esej pufera (1x) + 50 μl smjese ko-supstrata + 50 μl NADPH. U jažice s pozitivnom kontrolom dodano je 50 μl razrijeđenog esej pufera (1x) + 50 μl smjese ko-supstrata + 50 μl NADPH + 20 μl razrijeđene glutation peroksidaze (50x). U jažice s uzorcima dodano je 50 μl razrijeđenog esej pufera (1x) + 50 μl smjese ko-supstrata + 50 μl NADPH + 20 μl uzorka (*količina GPx dodana u jažice s uzorcima mora uzrokovati smanjenje u apsorpciji između 0,02 i 0,135/min pa su prema tome uzorci prethodno razrijeđeni 2x. Naposljetku je dodano 20 μL kumen hidroperoksida čime se pokrenula reakcija. Ploča se lagano protresla par sekundi. ApSORbancija je očitana na 340nm u 7 vremenskih točaka u razmaku od 1 minute (Tekan). Potom se odredila promjena u apSORbanciji ΔA_{340} te aktivnost glutation peroksidaze.

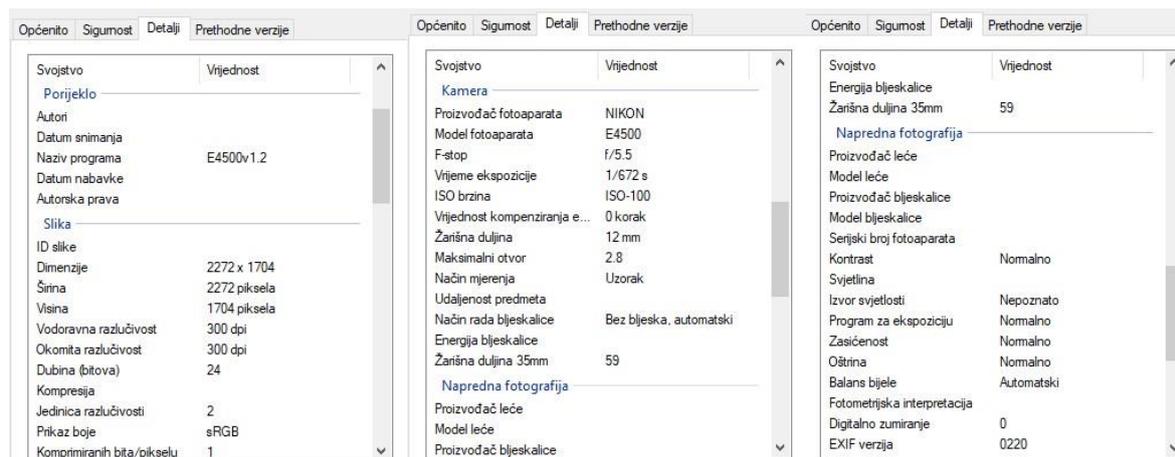
4.8. Statističke analize

Dizajn eksperimenta je pomno analiziran. S osam životinja po skupini dobili su se jednakovrijedni, visokokvalitetni podaci kao i da je eksperiment rađen s većim brojem jedinki (za $\alpha = 0.05$, snagu testa = 95% te efekt ≥ 0.9 bio je potreban uzorak od 32 životinje podijeljene u 4 skupine od 8 jedinki). Prethodne slične studije potvrdile su ovu tvrdnju. Dobiveni podaci analizirani su pomoću računalnog programa Microsoft Excel[®] za Windows (XLSTAT[®]), verzija 2020.5.1 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA). Prikupljeni rezultati mjerenja analizirani su na normalnu raspodjelu pomoću Shapiro-Wilk testa. S obzirom na nenormalnu distribuciju, podaci su predstavljeni kao medijan (interkvartilni raspon). Razlike između skupina kontinuiranih podataka uspoređivane su neparametrijskim Kruskal-Wallisovim testom. Podaci su predstavljeni na sljedeći način; hi-kvadrat (χ^2) = promatrana vrijednost (kritična vrijednost), stupnjevi slobode (DF), p-vrijednost. Za post-hoc usporedbu u paru korišten je Mann-Whitney U test s Bonferronijevom korekcijom. Razina značajnosti za Kruskal-Wallisov test postavljena je na 0,05, dok je za post-hoc ispitivanje u paru pomoću Mann-Whitneyevog testa uvedena Bonferronijeva korekcija s alfa razinom od 0,0083.

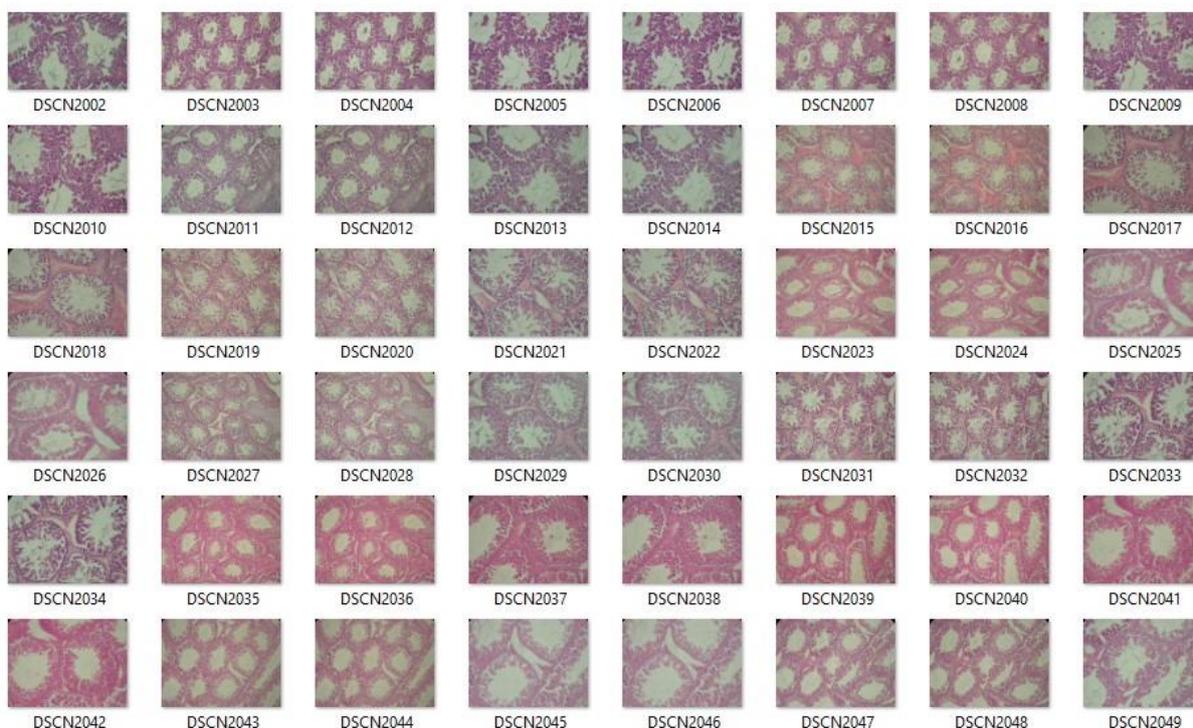
5. Rezultati

5.1. Histološka analiza

U svrhu histološke analize preparata pomoću mikroskopa Nikon ECLIPSE E200 te digitalnog fotoaparata Nikon E4500 za svaku skupinu učinjeno je slučajnim odabirom 50 slika (pod povećanjem x200: 25 slika; pod povećanjem x400: 25 slika), a ukupno 200 slika visoke kvalitete (Slika 35, Slika 36). Također je za svaku skupinu slučajnim odabirom izdvojeno 20 tubula koji su pomoću programa ImageJ® potom i analizirani.

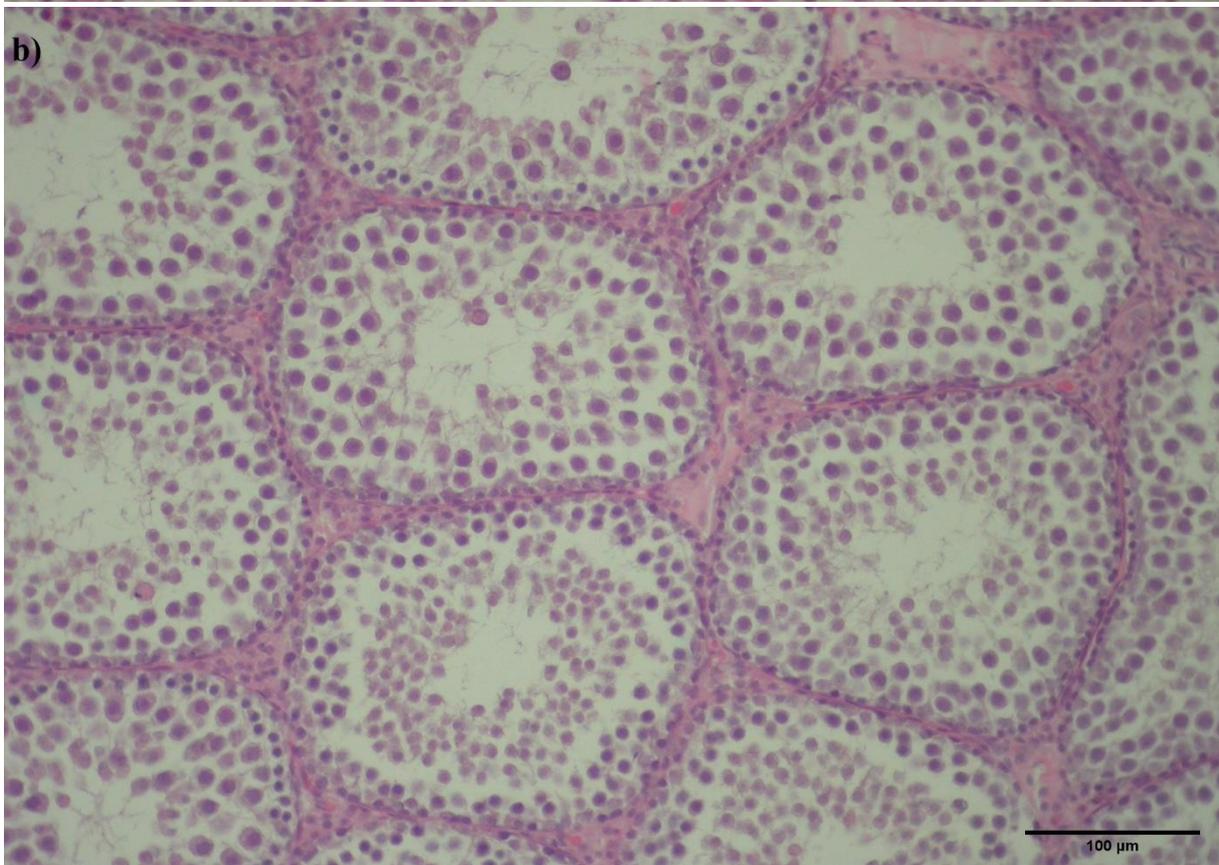
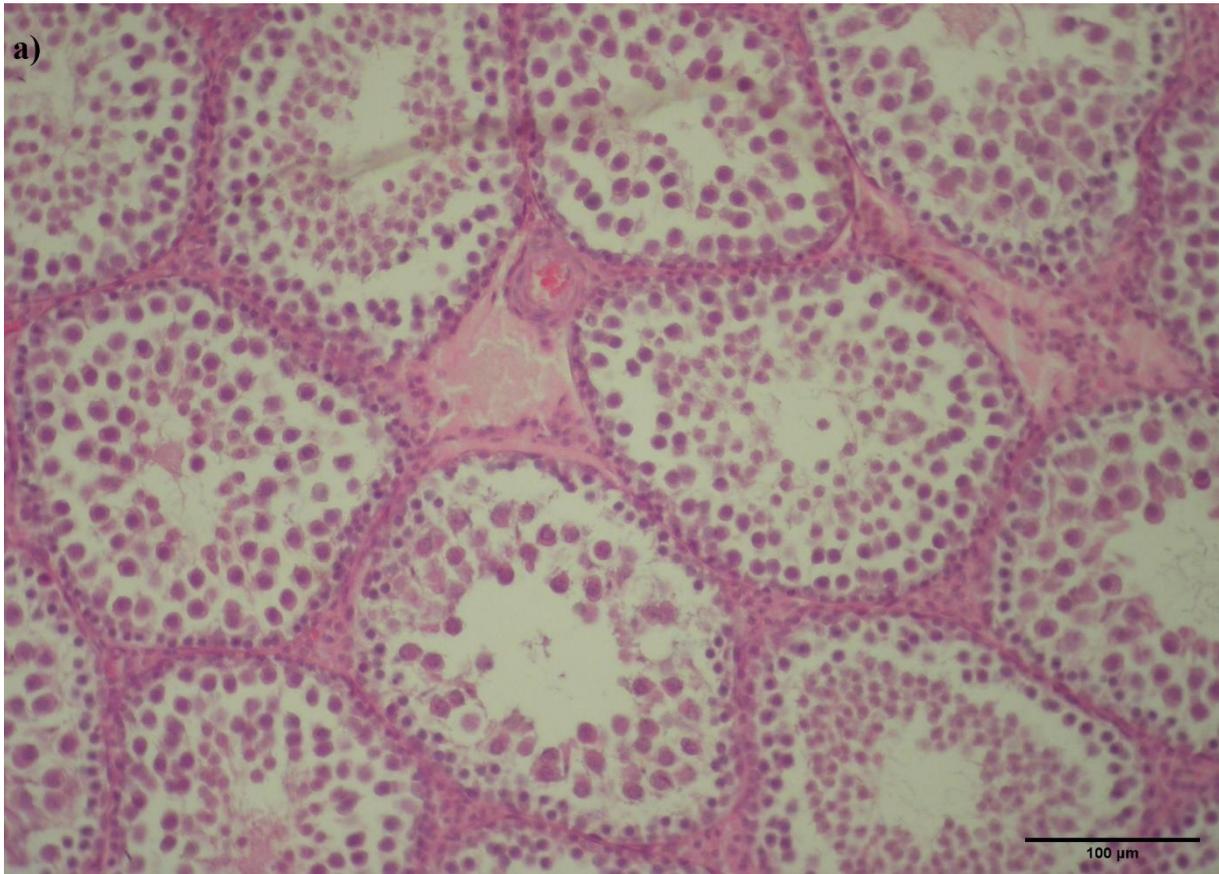


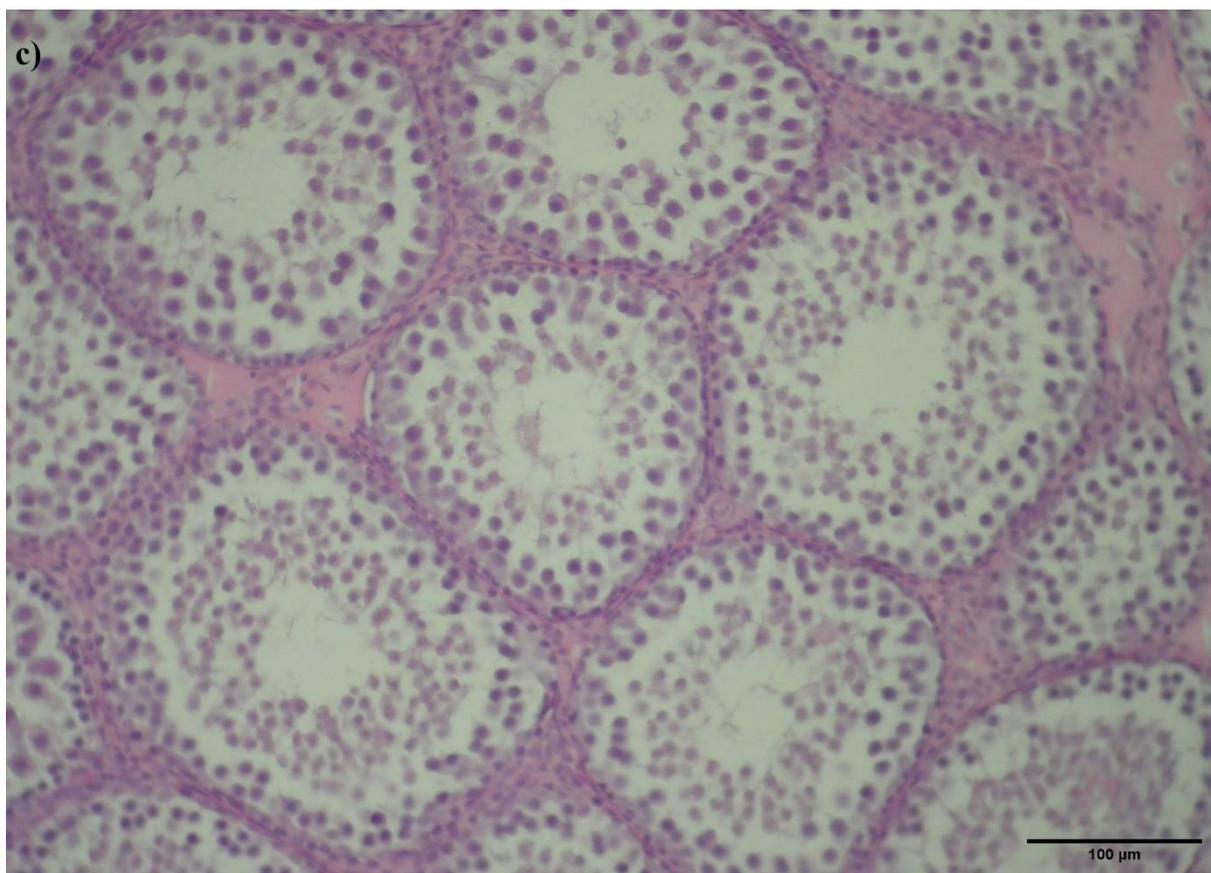
Slika 35 – Screenshot - obilježja učinjenih slika pomoću mikroskopa Nikon ECLIPSE E200 te digitalnog fotoaparata Nikon E4500



Slika 36 – Screenshot - dio slučajno odabranih slika učinjenih pomoću mikroskopa Nikon ECLIPSE E200 te digitalnog fotoaparata Nikon E4500 - preparati treće skupine

5.1.1. Prosječan promjer sjemenskih kanalića (MSTD)

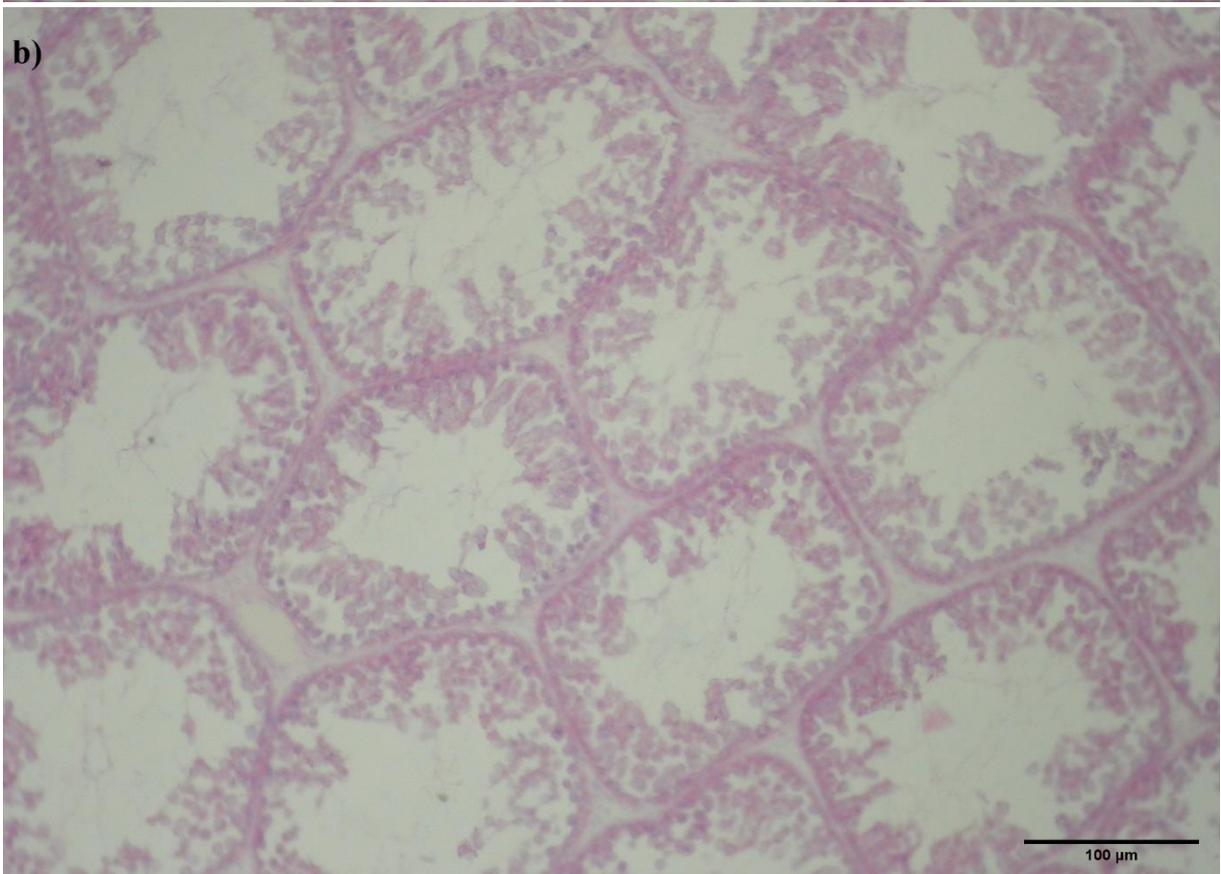
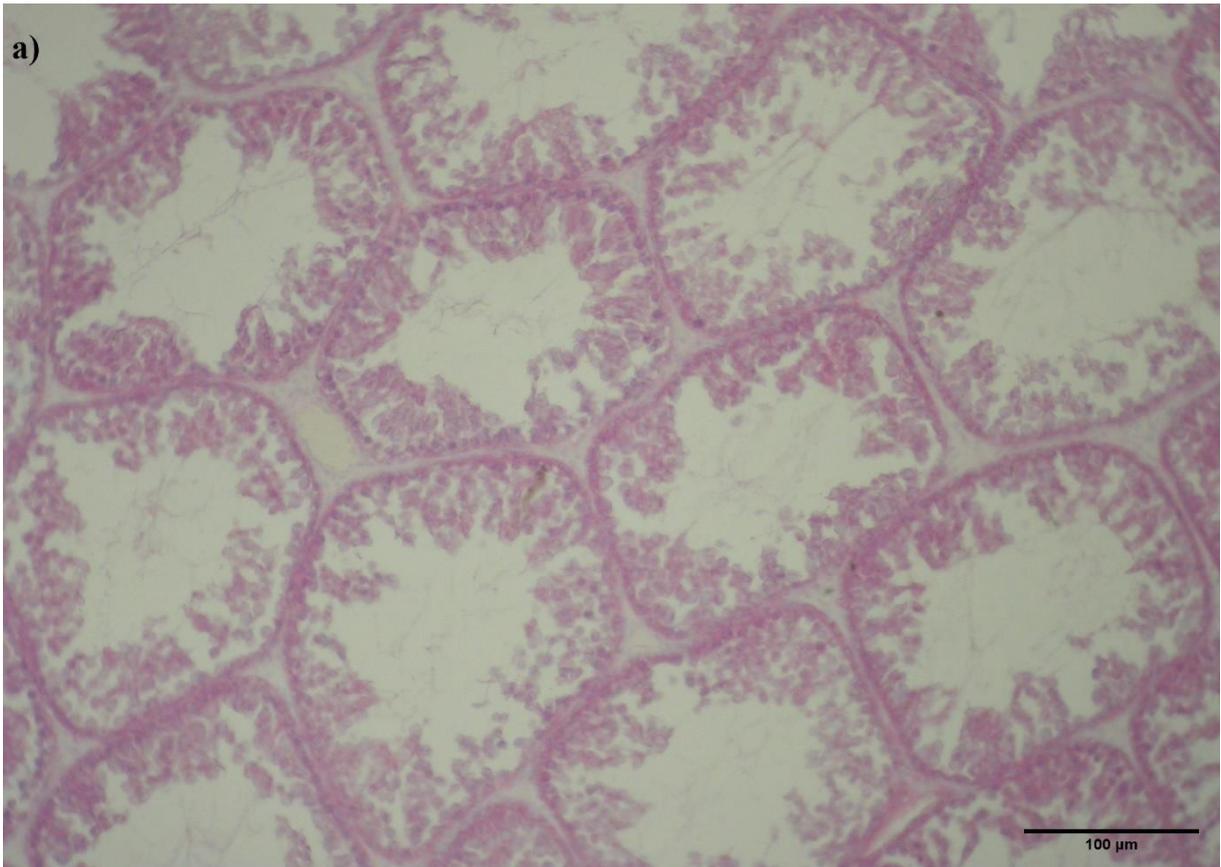


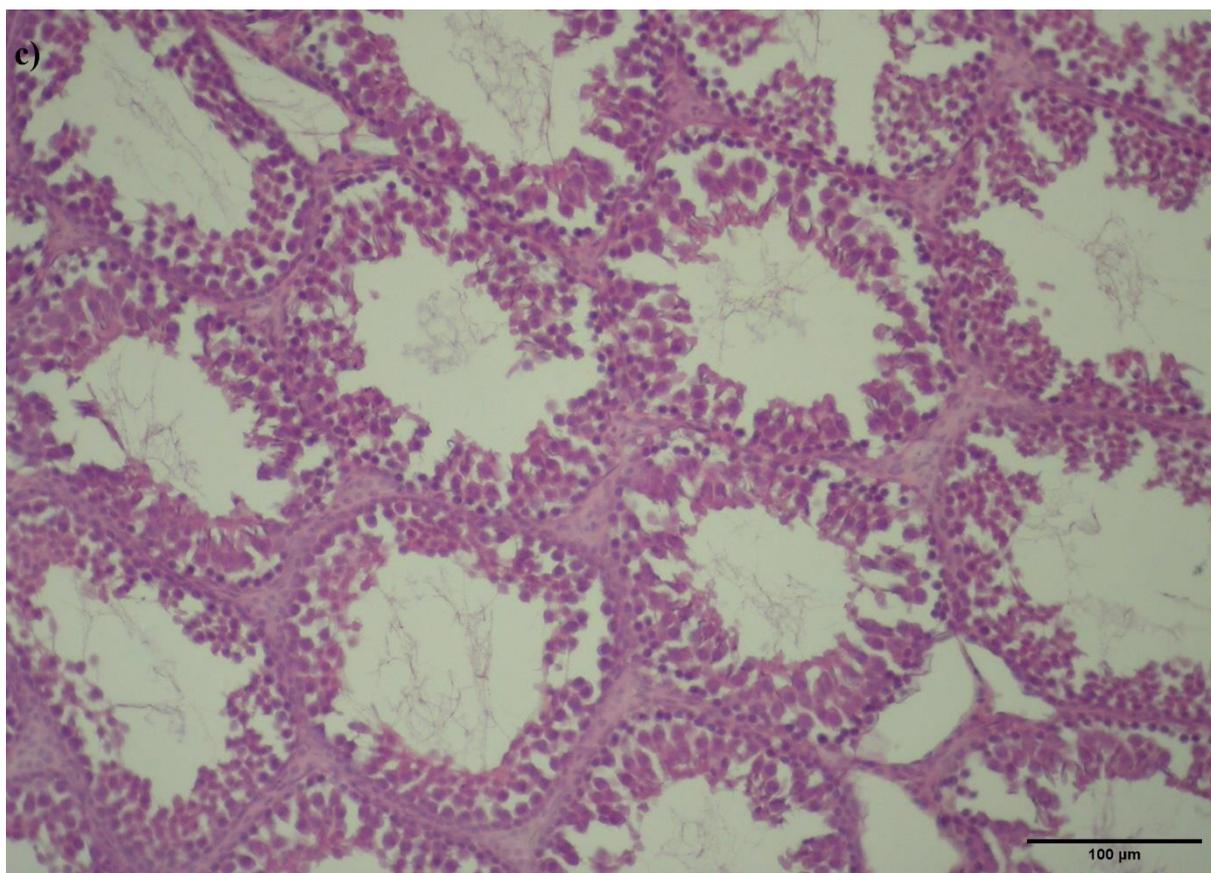


Slika 37 a,b,c – Neke od nasumično odabranih slika iz prve skupine na kojima se mjerio promjer kanalića na većoj i manjoj osi pomoću programa ImageJ®, H.E., x200 (Izvorna slika)

	Skupina 1		
	a (μm)	b (μm)	a+b/2
1	262,74	203,82	233,28
2	254,96	172,66	213,81
3	260,14	191,57	225,85
4	250,89	213,67	232,28
5	261,42	187,30	224,36
6	257,87	177,23	217,55
7	251,11	186,50	218,80
8	261,01	199,54	230,27
9	248,18	165,08	206,63
10	252,22	201,09	226,65
11	259,47	184,62	222,04
12	255,88	196,79	226,33
13	256,87	178,38	217,62
14	251,24	209,59	230,41
15	253,03	205,34	229,18
16	249,05	224,18	236,61
17	259,41	178,64	219,02
18	258,87	197,77	228,32
19	261,35	193,79	227,57
20	260,52	201,15	230,83
			224,87

Tablica 8 – Promjeri kanalića (μm) mjereni pomoću programa ImageJ® na većoj (a) i manjoj (b) osi nasumično 20 odabranih tubula. Prikazana srednja vrijednost (a+b)/2 za svaki nasumično odabran tubul te srednja vrijednost skupine 1.

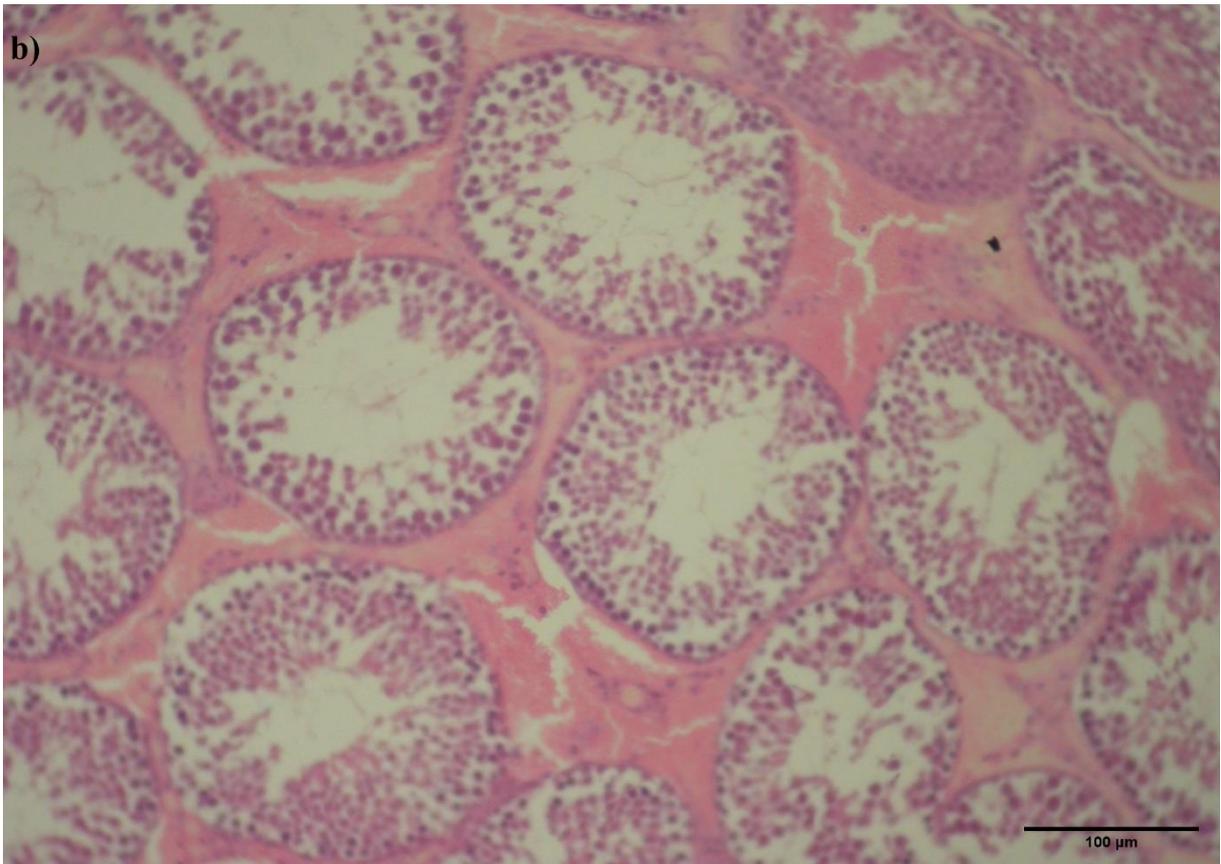
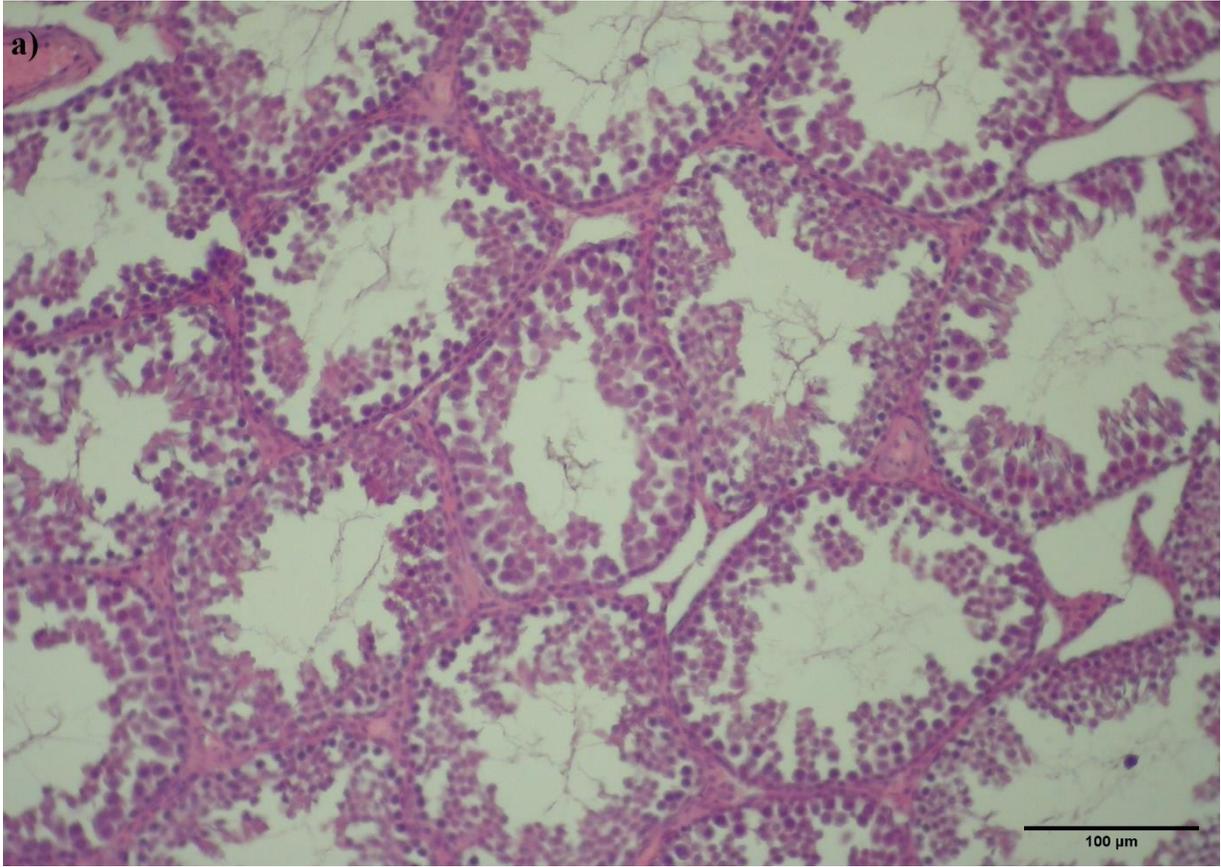


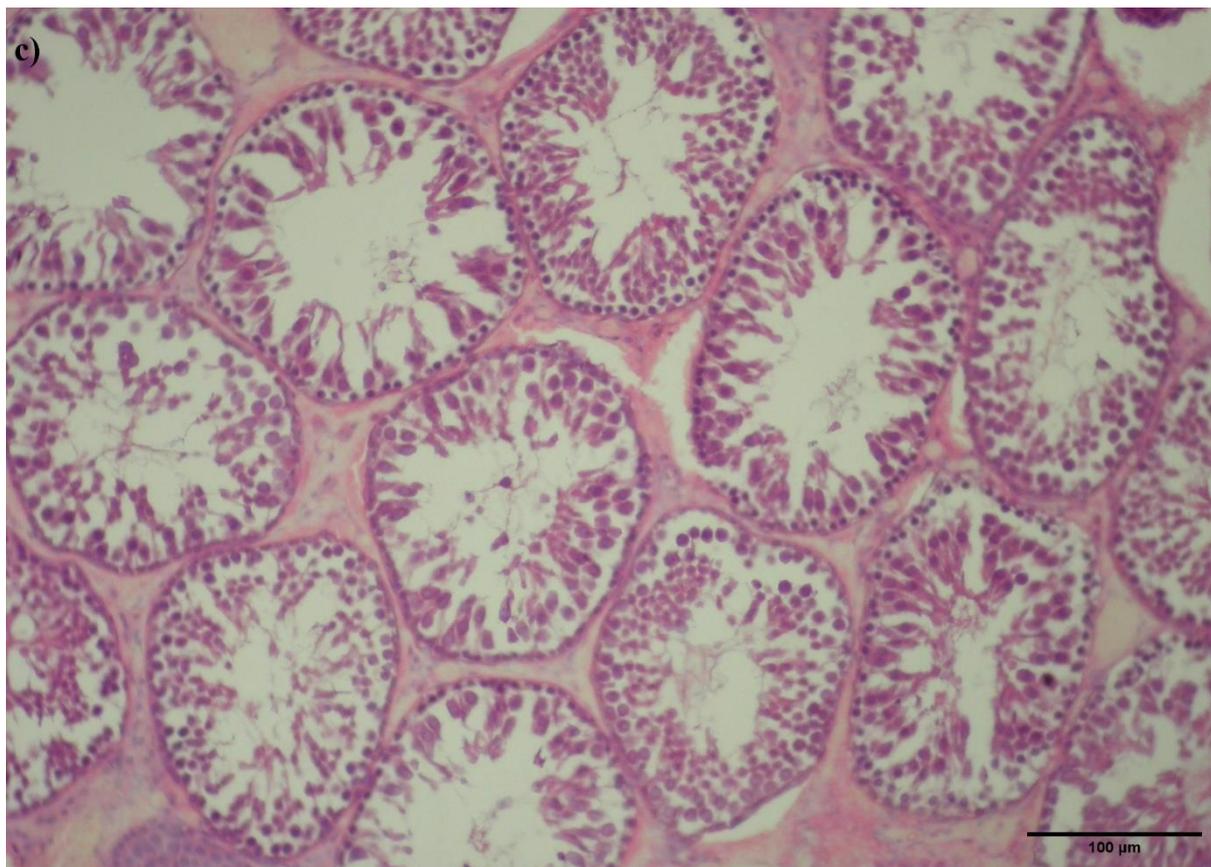


Slika 38 a,b,c – Neke od nasumično odabranih slika iz druge skupine na kojima se mjerio promjer kanalića na većoj i manjoj osi pomoću programa ImageJ®, H.E., x200 (Izvorna slika)

	Skupina 2		
	a (μm)	b (μm)	a+b/2
1	194,78	141,02	167,90
2	202,57	164,33	183,45
3	199,12	138,69	168,90
4	215,46	163,80	189,63
5	191,97	149,68	170,82
6	194,35	138,04	166,19
7	192,55	163,71	178,13
8	190,42	168,76	179,59
9	193,99	158,63	176,31
10	196,25	137,63	166,94
11	206,47	154,00	180,23
12	193,81	148,64	171,22
13	197,19	140,38	168,78
14	206,04	155,32	180,68
15	195,62	131,56	163,59
16	190,89	159,07	174,98
17	213,85	166,51	190,18
18	189,77	157,30	173,53
19	197,25	141,97	169,61
20	196,11	137,32	166,71
			174,37

Tablica 9 – Promjeri kanalića (μm) mjereni pomoću programa ImageJ® na većoj (a) i manjoj (b) osi nasumično 20 odabranih tubula. Prikazana srednja vrijednost (a+b)/2 za svaki nasumično odabran tubul te srednja vrijednost skupine 2.

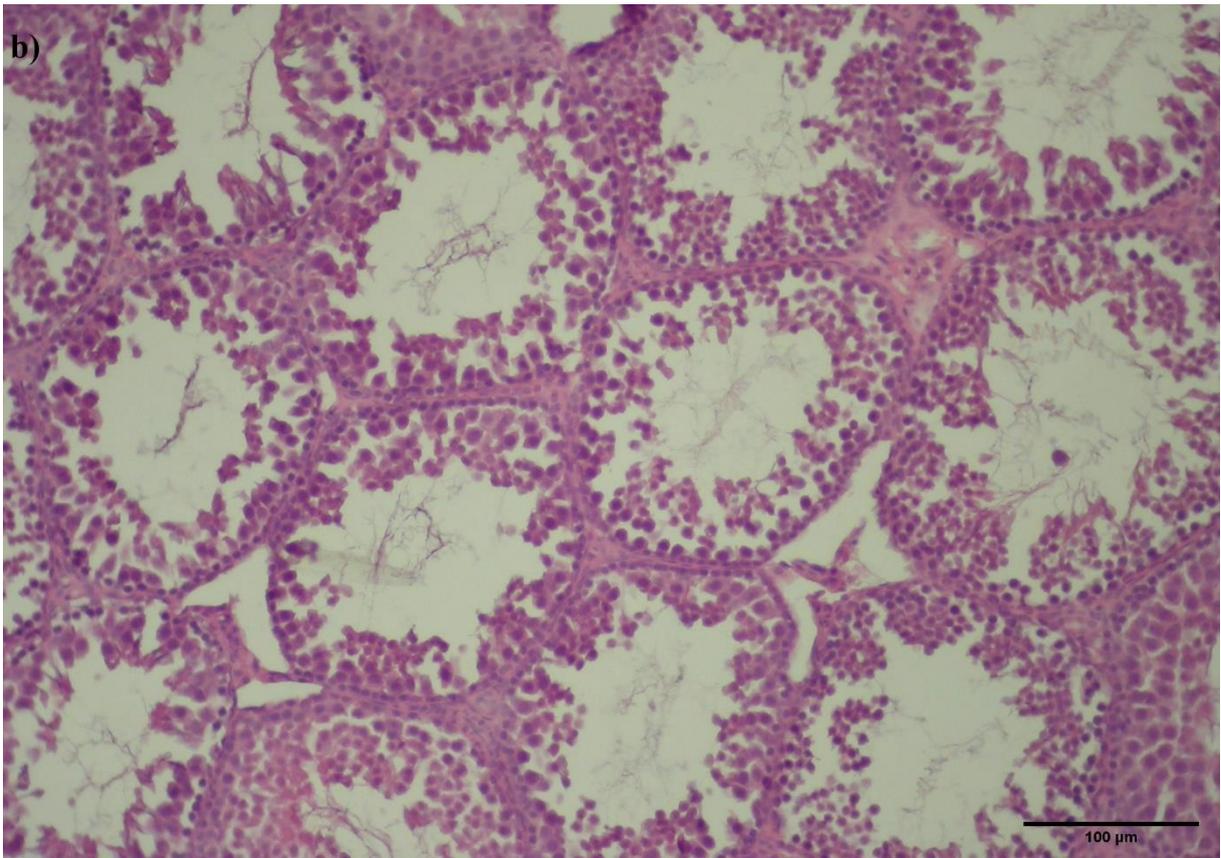
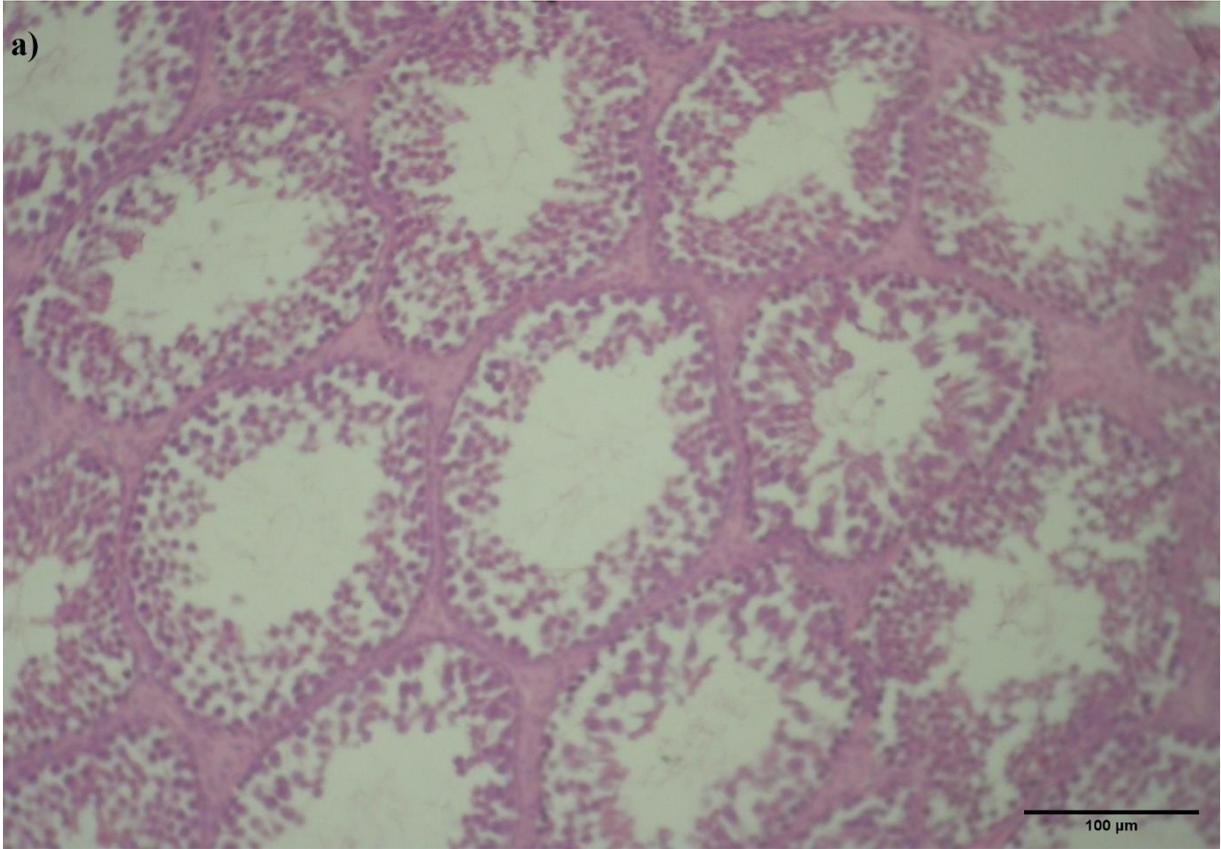


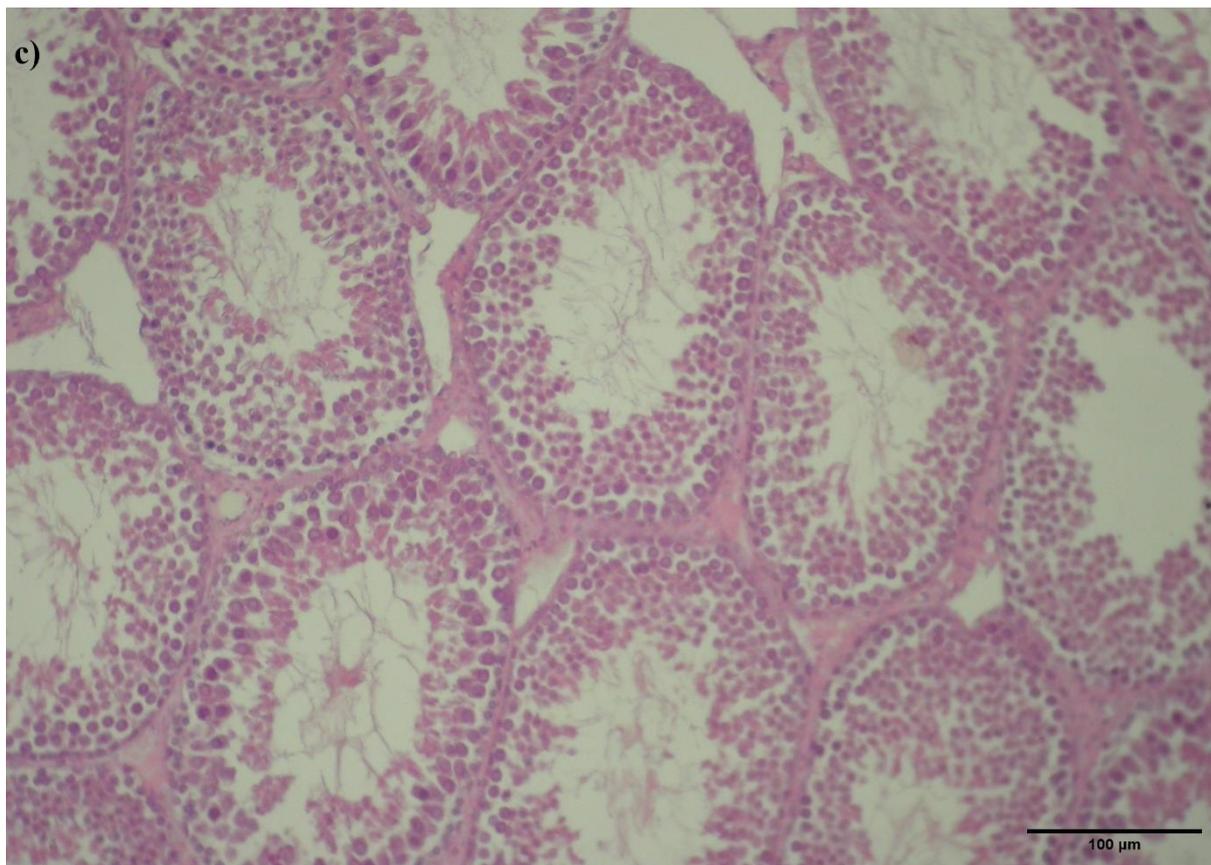


Slika 39 a,b,c – Neke od nasumično odabranih slika iz treće skupine na kojima se mjerio promjer kanalića na većoj i manjoj osi pomoću programa ImageJ®, H.E., x200 (Izvorna slika)

	Skupina 3		
	a (µm)	b (µm)	a+b/2
1	191,54	168,02	179,78
2	219,70	164,29	191,99
3	207,65	152,88	180,26
4	201,41	167,09	184,25
5	182,23	149,54	165,88
6	179,67	183,53	181,60
7	215,40	162,79	189,09
8	203,89	170,12	187,00
9	210,22	167,07	188,64
10	208,11	142,27	175,19
11	198,66	169,04	183,85
12	208,68	157,33	183,00
13	195,55	167,69	181,62
14	217,49	163,73	190,61
15	211,17	161,91	186,54
16	207,82	165,04	186,43
17	212,18	169,63	190,90
18	202,10	171,49	186,79
19	204,78	153,91	179,34
20	187,39	148,42	167,90
			183,03

Tablica 10 – Promjeri kanalića (µm) mjereni pomoću programa ImageJ® na većoj (a) i manjoj (b) osi nasumično 20 odabranih tubula. Prikazana srednja vrijednost (a+b)/2 za svaki nasumično odabran tubul te srednja vrijednost skupine 3.





Slika 40 a,b,c – Neke od nasumično odabranih slika iz četvrte skupine na kojima se mjerio promjer kanalića na većoj i manjoj osi pomoću programa ImageJ[®], H.E., x200 (Izvorna slika)

	Skupina 4		
	a (μm)	b (μm)	a+b/2
1	229,69	170,60	200,14
2	218,55	171,35	194,95
3	198,63	159,67	179,15
4	227,45	177,37	202,41
5	201,88	196,30	199,09
6	178,69	169,06	173,87
7	179,97	160,75	170,36
8	219,22	191,16	205,19
9	224,84	167,73	196,28
10	206,31	176,59	191,45
11	228,60	173,09	200,84
12	186,42	173,29	179,85
13	232,62	192,93	212,77
14	204,16	169,88	187,02
15	195,00	164,63	179,81
16	234,68	165,01	199,84
17	222,71	179,60	201,15
18	181,24	176,49	178,86
19	248,17	158,47	203,32
20	183,38	170,93	177,15
			191,67

Tablica 11 – Promjeri kanalića (μm) mjereni pomoću programa ImageJ[®] na većoj (a) i manjoj (b) osi nasumično 20 odabranih tubula. Prikazana srednja vrijednost (a+b)/2 za svaki nasumično odabran tubul te srednja vrijednost skupine 4.

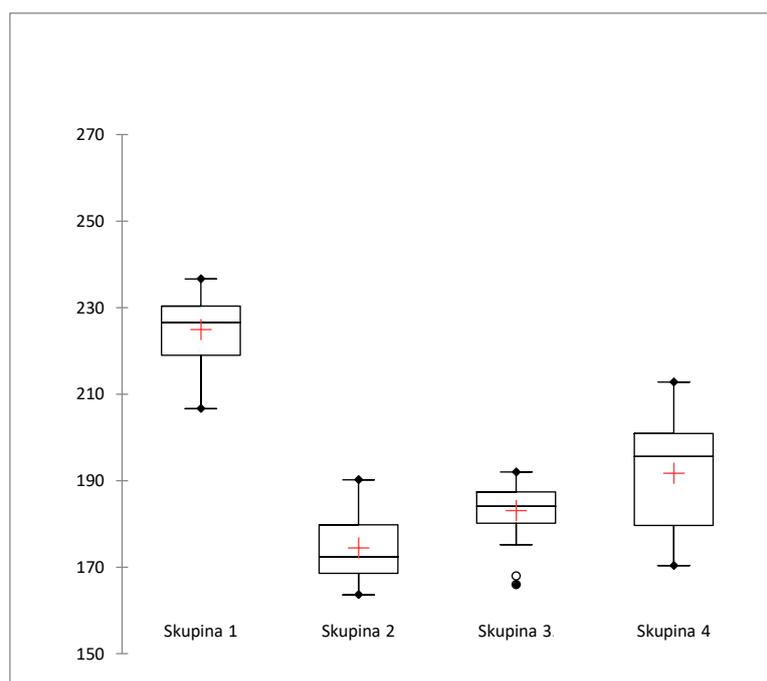
Vrijednosti medijana i interkvartilnih raspona po skupinama prikazane su u tablici 12.

Tablica 12 – Vrijednosti medijana, Q1, Q3 i interkvartilnih raspona po skupinama za srednji promjer sjemenskih kanalića

	MSTD (μm)			
	Mdn	Q1	Q3	IQR
Skupina 1	226.495	218.970	230.310	11.340
Skupina 2	172.380	168.564	179.751	11.187
Skupina 3	184.050	180.144	187.415	7.271
Skupina 4	195.618	179.649	200.923	21.274

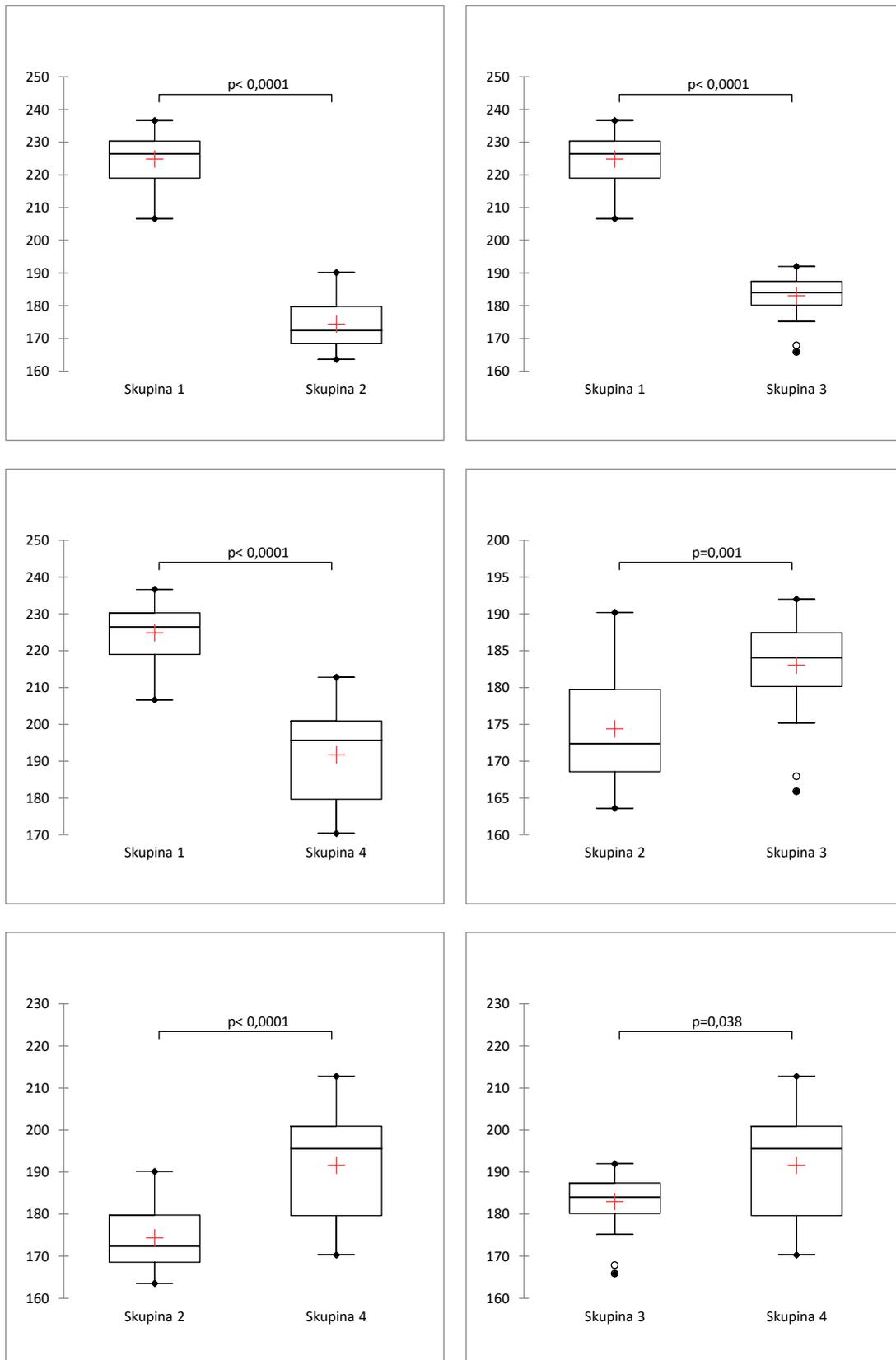
Kruskal-Wallisov test pokazuje da postoji statistički značajna razlika u promatranom parametru između različitih skupina (na razini značajnosti od 5%);

MSTD [$\chi^2 = 55,733 (7,815), DF = 3, p < 0,0001$]



Slika 41 – „Box plot“ za srednji promjer sjemenskih kanalića

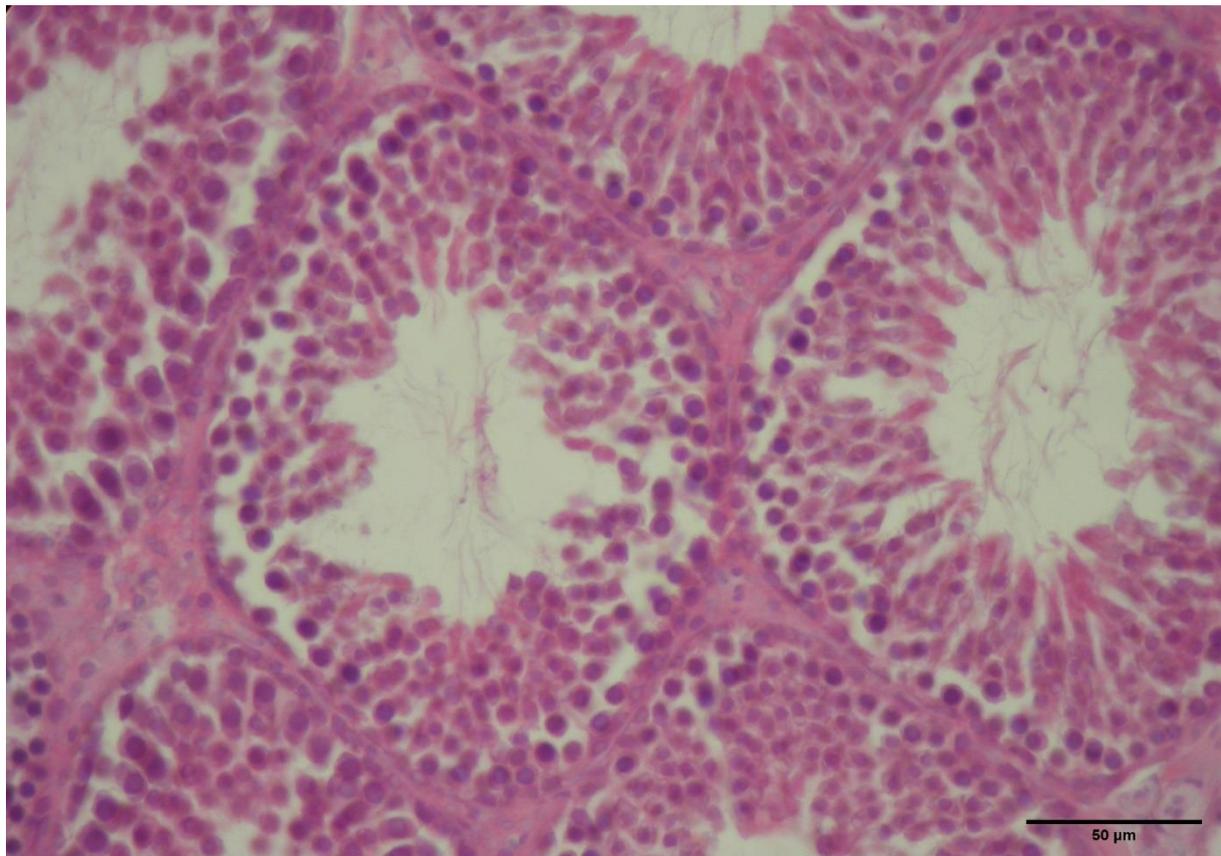
Rezultati post-hoc usporedbi u parovima pomoću Mann-Whitney testa prikazani su na slici 42.



Slika 42 – „Box plotovi“ post-hoc usporedbi u parovima za srednji promjer sjemenjskih kanalića

Slijedom navedenih grafikona srednji promjer sjemenskih tubula (MSTD) statistički se značajno povećava u skupinama kod kojih je primijenjen astaksantin u odnosu na netretiranu torzijsko detorzijsku skupinu [$p(\text{skupina2/3}) = 0,001$, $p(\text{skupina2/4}) < 0,0001$]. MSTD je statistički značajno viši u skupini 4 u kojoj je astaksantin primijenjen 45 minuta od trenutka detorzije (Mdn = 195,62), u odnosu na skupinu 3 u kojoj je astaksantin primijenjen u trenutku detorzije (Mdn = 184,05, $p = 0,038$) (tablica 12, slika 42).

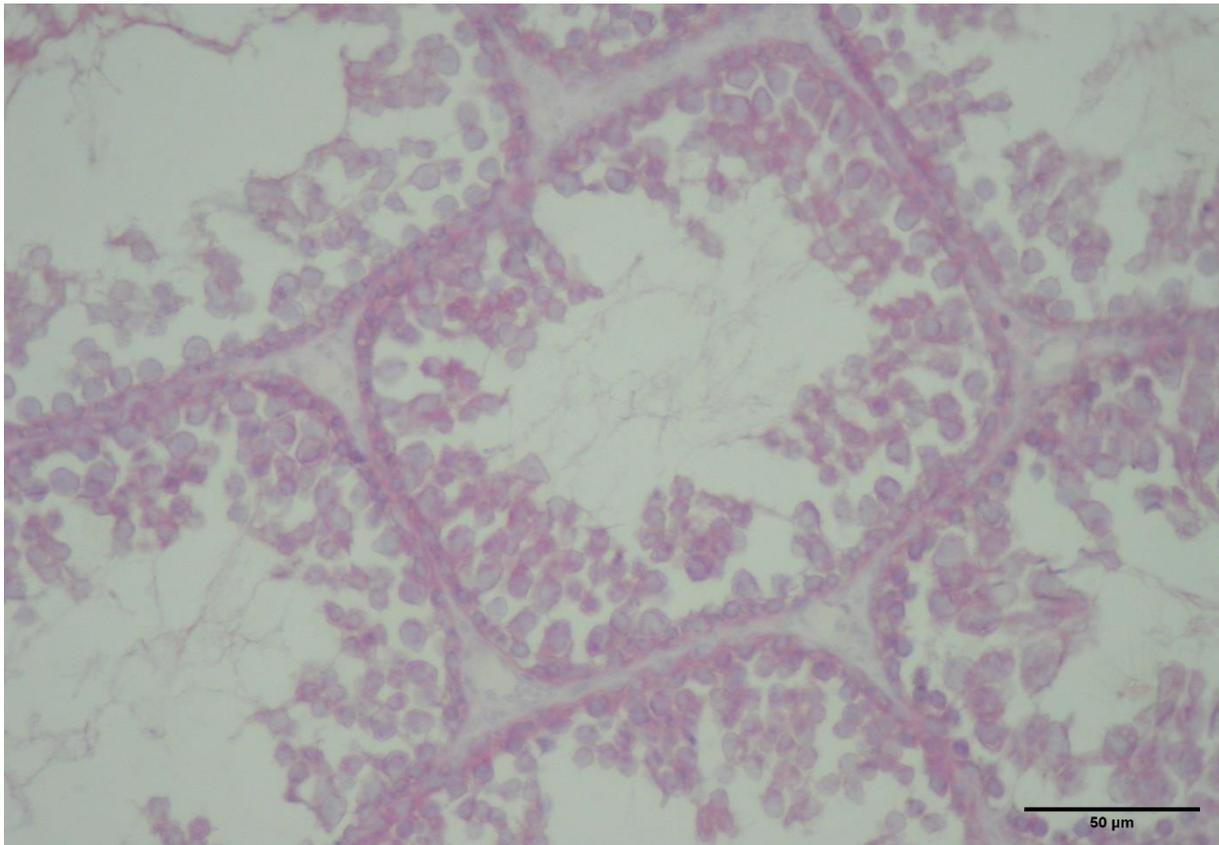
5.1.2. Procjena očuvanosti spermatogeneze prema Johnsenu



Slika 43 – Jedan od nasumično odabranih tubula iz prve skupine na kojemu se mjerila Johnsenova vrijednost, H.E., x400 (Izvorna slika)

Skupina 1	
1	8
2	8
3	8
4	8
5	8
6	8
7	7
8	8
9	8
10	8
11	8
12	8
13	8
14	8
15	8
16	8
17	8
18	7
19	8
20	8
7.90	

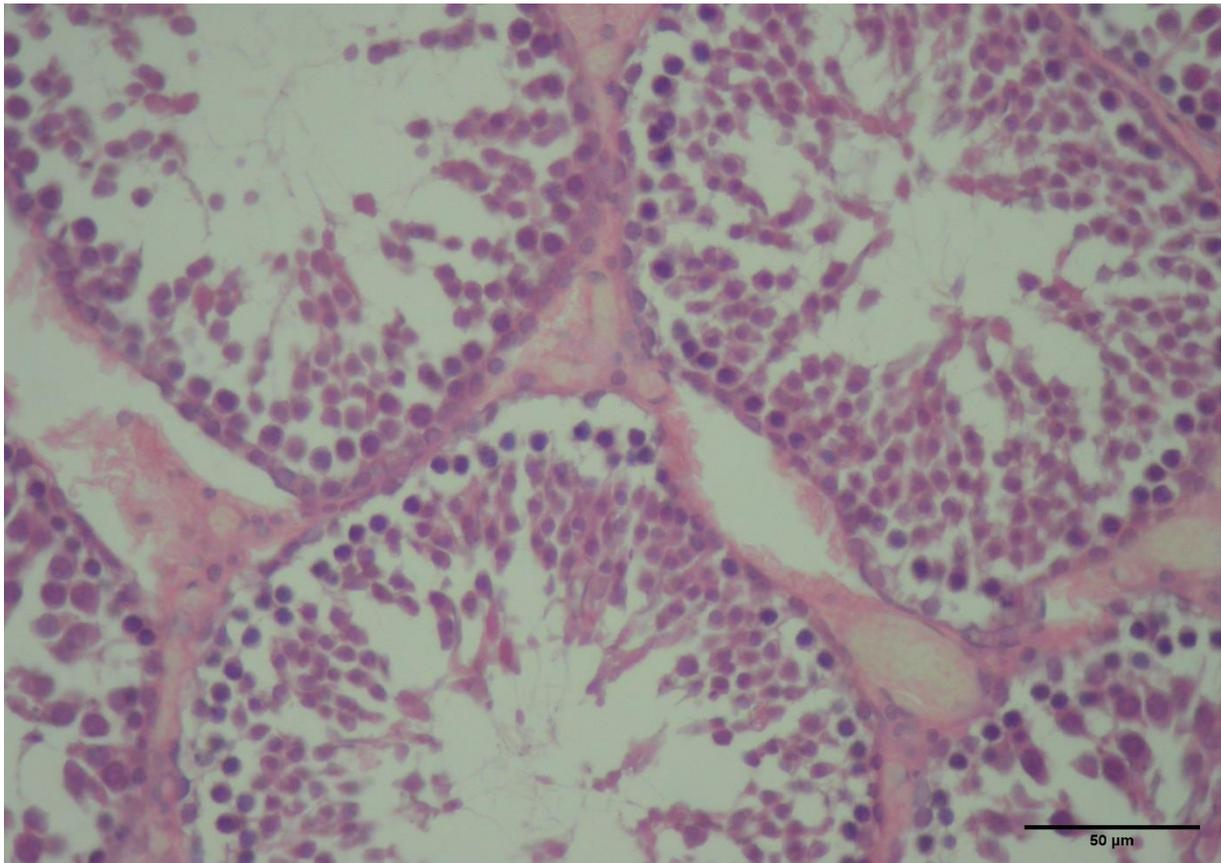
Tablica 13 – Johnsenove vrijednosti 20 nasumično odabranih tubula u prvoj skupini. Prikazana srednja vrijednost skupine 1.



Slika 44 – Jedan od nasumično odabranih tubula iz druge skupine na kojemu se mjerila Johnsenova vrijednost, H.E., x400 (Izvorna slika)

Skupina 2	
1	5
2	5
3	5
4	5
5	5
6	5
7	5
8	5
9	5
10	5
11	5
12	5
13	5
14	5
15	5
16	5
17	5
18	5
19	5
20	5
5,00	

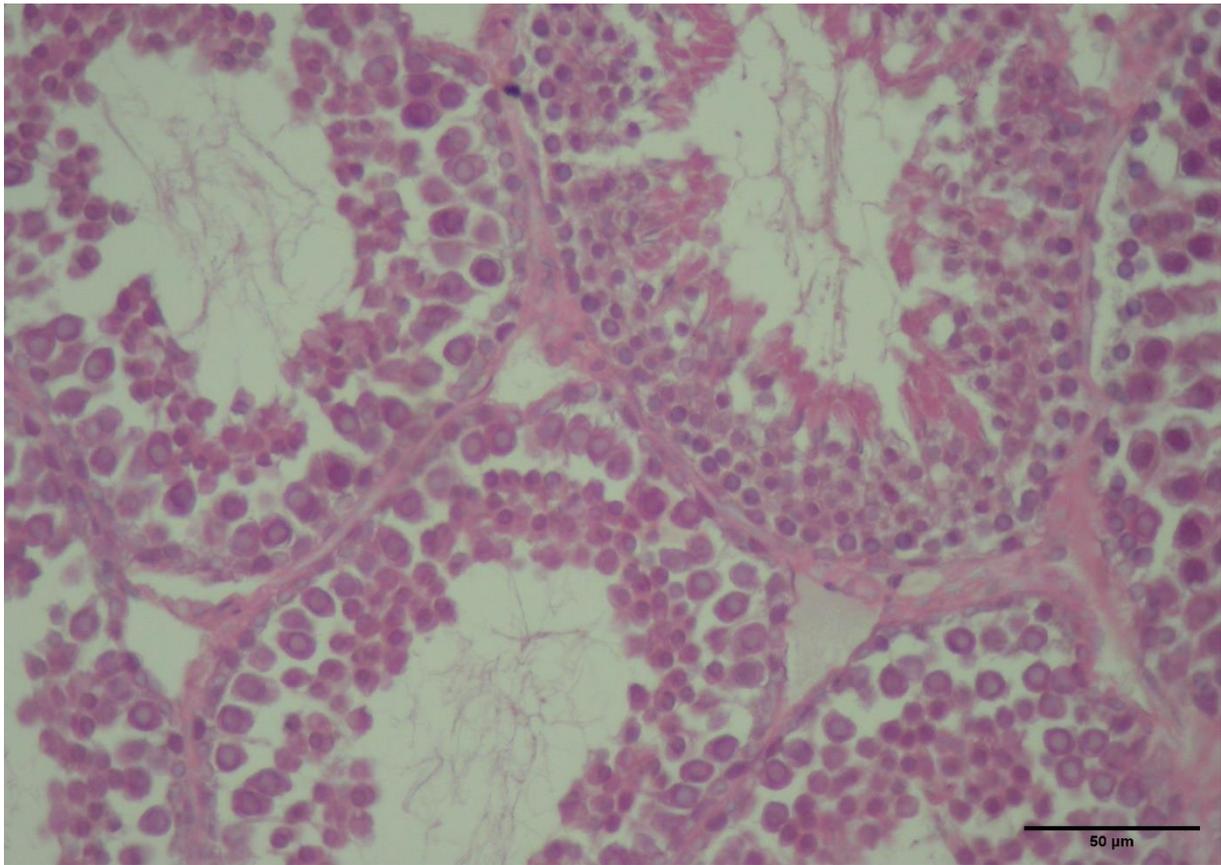
Tablica 14 – Johnsenove vrijednosti 20 nasumično odabranih tubula u drugoj skupini. Prikazana srednja vrijednost skupine 2.



Slika 45 – Jedan od nasumično odabranih tubula iz treće skupine na kojemu se mjerila Johnsenova vrijednost, H.E., x400 (Izvorna slika)

Skupina 3	
1	7
2	6
3	6
4	6
5	7
6	6
7	7
8	7
9	7
10	7
11	6
12	7
13	6
14	6
15	7
16	7
17	6
18	6
19	6
20	6
6,45	

Tablica 15 – Johnsenove vrijednosti 20 nasumično odabranih tubula u trećoj skupini. Prikazana srednja vrijednost skupine 3.



Slika 46 – Jedan od nasumično odabranih tubula iz četvrte skupine na kojemu se mjerila Johnsenova vrijednost, H.E., x400 (Izvorna slika)

Skupina 4	
1	7
2	7
3	6
4	7
5	7
6	7
7	7
8	7
9	7
10	7
11	7
12	6
13	7
14	7
15	7
16	7
17	7
18	7
19	7
20	7
6,90	

Tablica 16 – Johnsenove vrijednosti 20 nasumično odabranih tubula u četvrtoj skupini. Prikazana srednja vrijednost skupine 4.

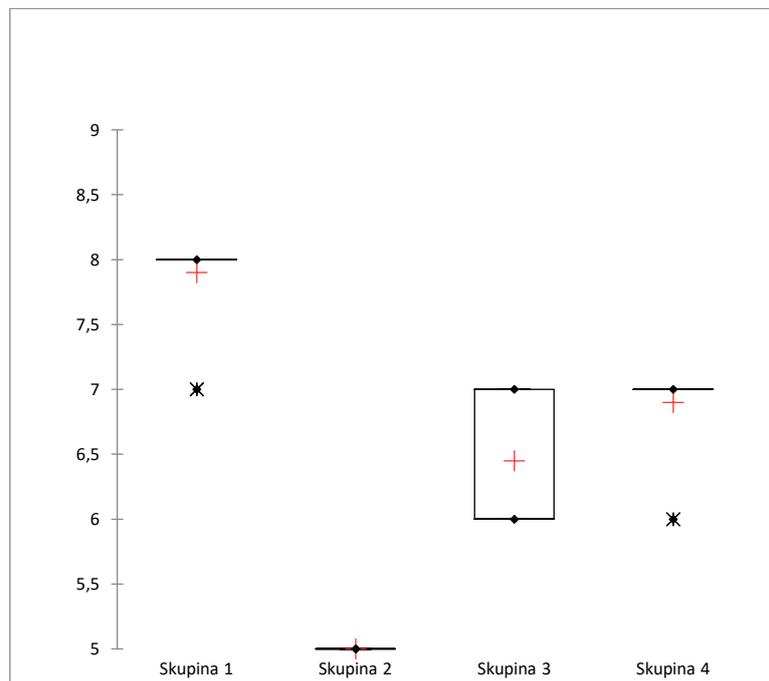
Vrijednosti medijana i interkvartilnih raspona po skupinama prikazane su u tablici 17.

Tablica 17 – Vrijednosti medijana, Q1, Q3 i interkvartilnih raspona po skupinama za Johnsenovu vrijednost

	Johnsen score			
	Mdn	Q1	Q3	IQR
Skupina 1	8.000	8.000	8.000	0.000
Skupina 2	5.000	5.000	5.000	0.000
Skupina 3	6.000	6.000	7.000	1.000
Skupina 4	7.000	7.000	7.000	0.000

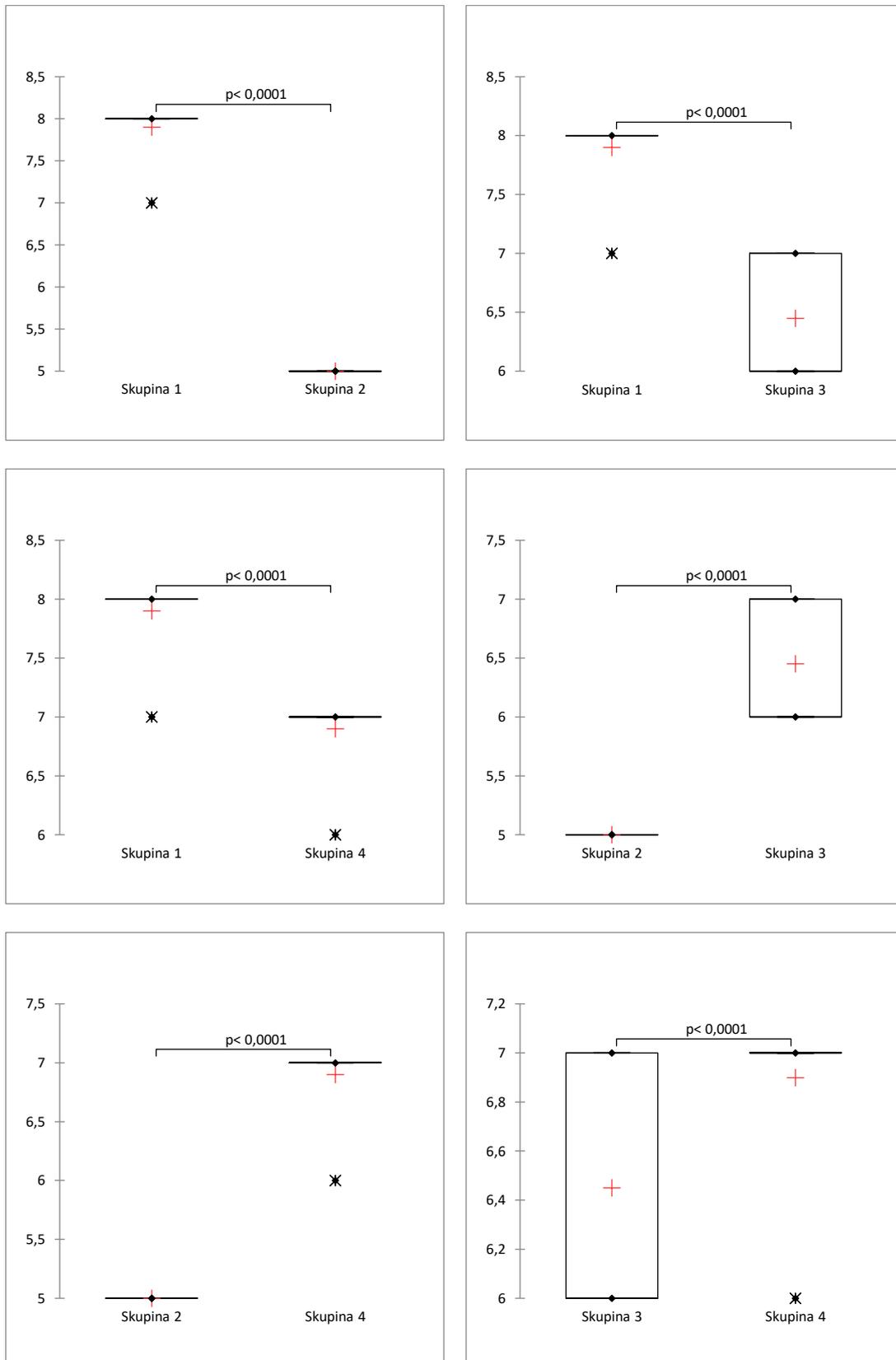
Kruskal-Wallisov test pokazuje da postoji statistički značajna razlika u promatranom parametru između različitih skupina (na razini značajnosti od 5%);

Johnsen score [$\chi^2 = 71.018$ (7.815), DF = 3, $p < 0.0001$]



Slika 47 – „Box plot“ za Johnsenovu vrijednost

Rezultati post-hoc usporedbi u parovima pomoću Mann-Whitney testa prikazani su na slici 48.

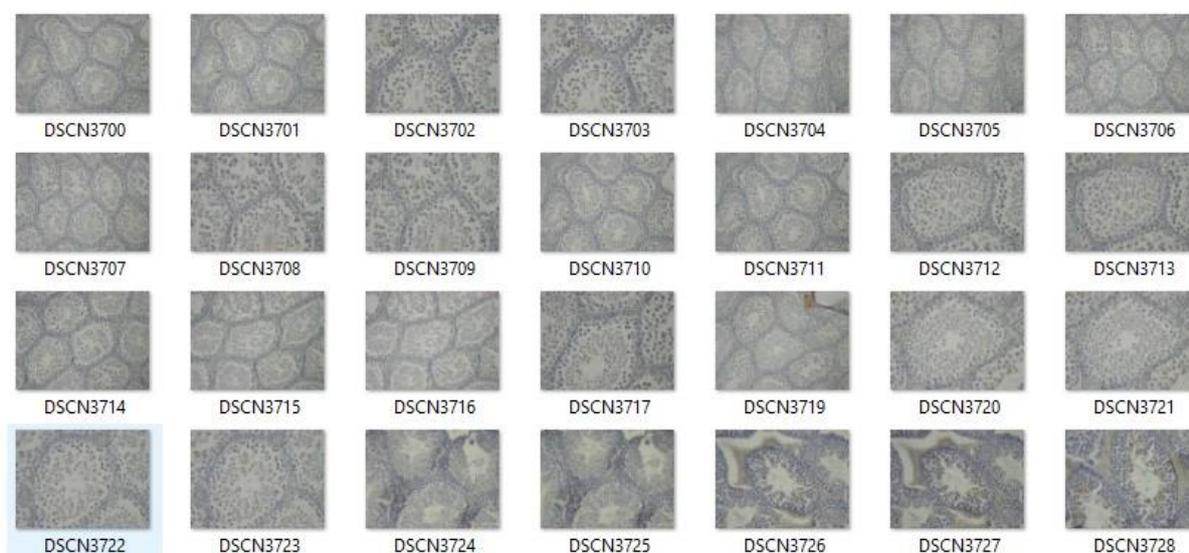


Slika 48 – „Box plotovi“ post-hoc usporedbi u parovima za Johnsenovu vrijednost

Johnsenova vrijednost statistički se značajno povećava u skupinama kod kojih je primijenjen astaksantin u odnosu na netretiranu torzijsko detorzijsku skupinu [$p(\text{skupina2/3}) < 0,0001$, $p(\text{skupina2/4}) < 0,0001$]. Johnsen-ova vrijednost statistički je značajno viša u skupini 4 u kojoj je astaksantin primijenjen 45 minuta od trenutka detorzije (Mdn = 7), u odnosu na skupinu 3 u kojoj je astaksantin primijenjen u trenutku detorzije (Mdn = 6, $p < 0,0001$) (tablica 17, slika 48).

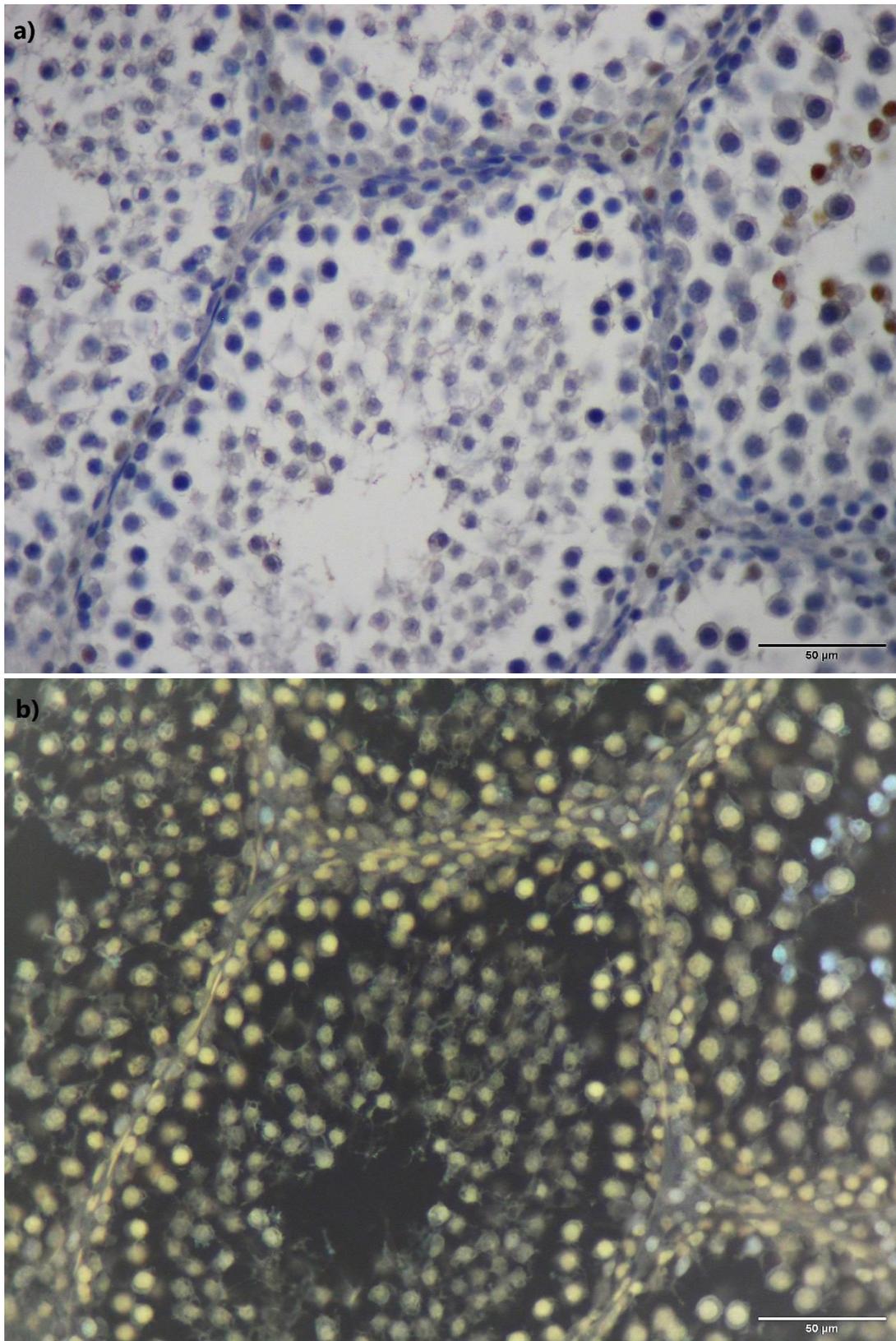
5.2. Imunohistokemijska analiza

U svrhu imunohistokemijske analize preparata, pomoću mikroskopa Nikon ECLIPSE E200 te digitalnog fotoaparata Nikon E4500, za svaku skupinu učinjeno je 100 slika (pod povećanjem x400) visoke kvalitete (Slika 49). Pažljivim korištenjem mehanizma za pokretanje stolića pomno se pazilo da slike nastaju na način da svaka detektira nove tubule. Stanice pozitivne na kaspazu-3 brojane su vizualnim zapažanjem dva neovisna istraživača.



Slika 49 – *Screenshot* - dio slučajno odabranih slika učinjenih pomoću mikroskopa Nikon ECLIPSE E200 te digitalnog fotoaparata Nikon E4500 - preparati prve skupine

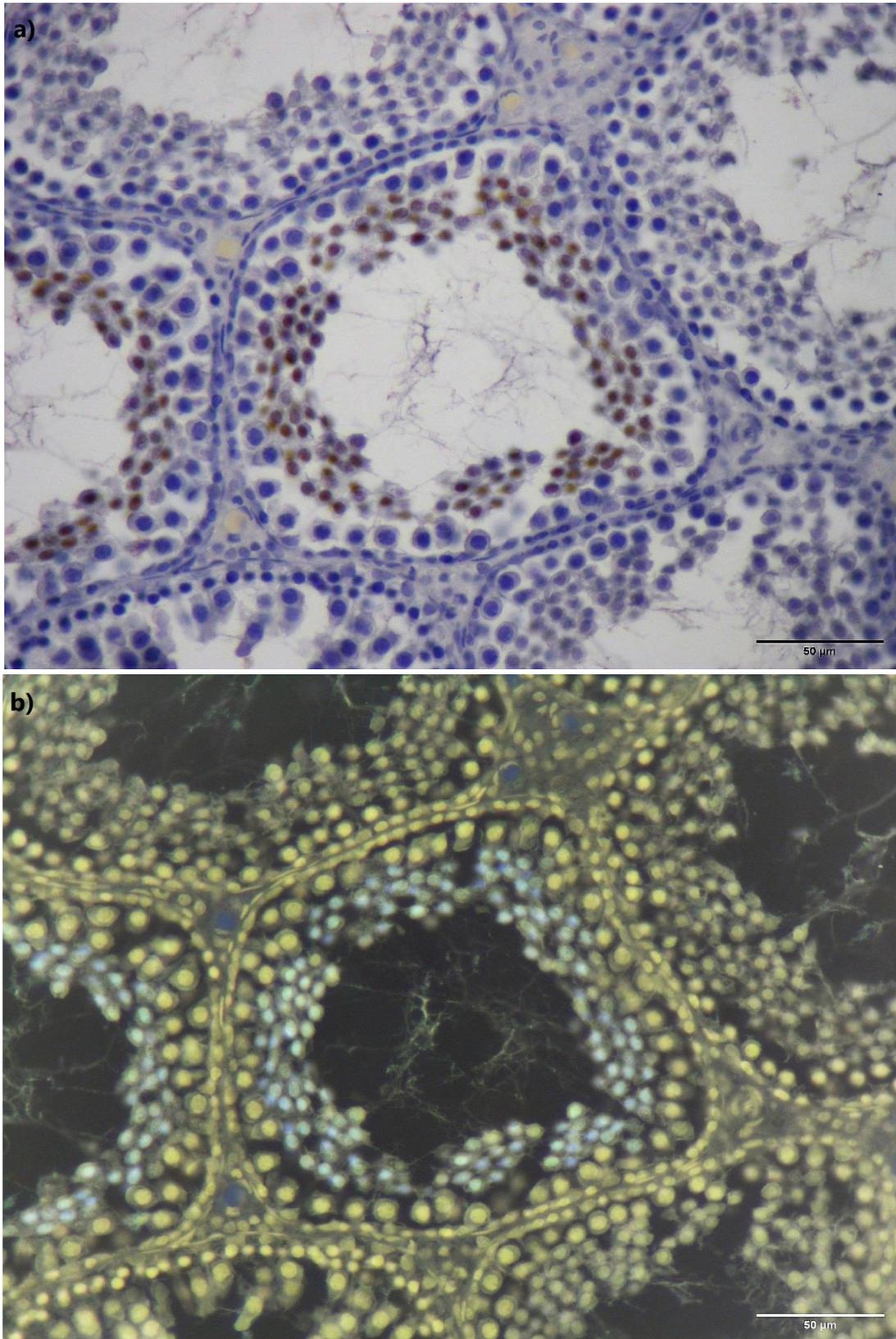
5.2.1. Broj stanica pozitivnih na kaspazu-3 na 100 kanalića (indeks apoptoze)



Slika 50 a,b – Jedan od nasumično odabranih tubula iz prve skupine na kojemu se mjerio broj apoptotičnih stanica pozitivnih na kaspazu-3, Cleaved Caspase-3; Asp 175, Cell Signaling Technology®, x400 (Izvorna slika)

Skupina 1			
1	2	51	0
2	0	52	0
3	1	53	0
4	11	54	3
5	0	55	0
6	0	56	0
7	0	57	0
8	1	58	0
9	4	59	0
10	0	60	1
11	0	61	1
12	0	62	7
13	0	63	0
14	0	64	1
15	2	65	0
16	0	66	0
17	0	67	0
18	0	68	3
19	0	69	2
20	1	70	0
21	8	71	0
22	0	72	5
23	0	73	1
24	0	74	0
25	0	75	0
26	7	76	0
27	18	77	0
28	0	78	4
29	0	79	0
30	6	80	0
31	0	81	0
32	1	82	0
33	0	83	0
34	0	84	1
35	0	85	1
36	0	86	0
37	0	87	0
38	0	88	0
39	0	89	4
40	3	90	0
41	1	91	0
42	1	92	0
43	0	93	1
44	1	94	0
45	0	95	0
46	0	96	2
47	0	97	0
48	0	98	0
49	8	99	0
50	0	100	0
			1,130 (113)

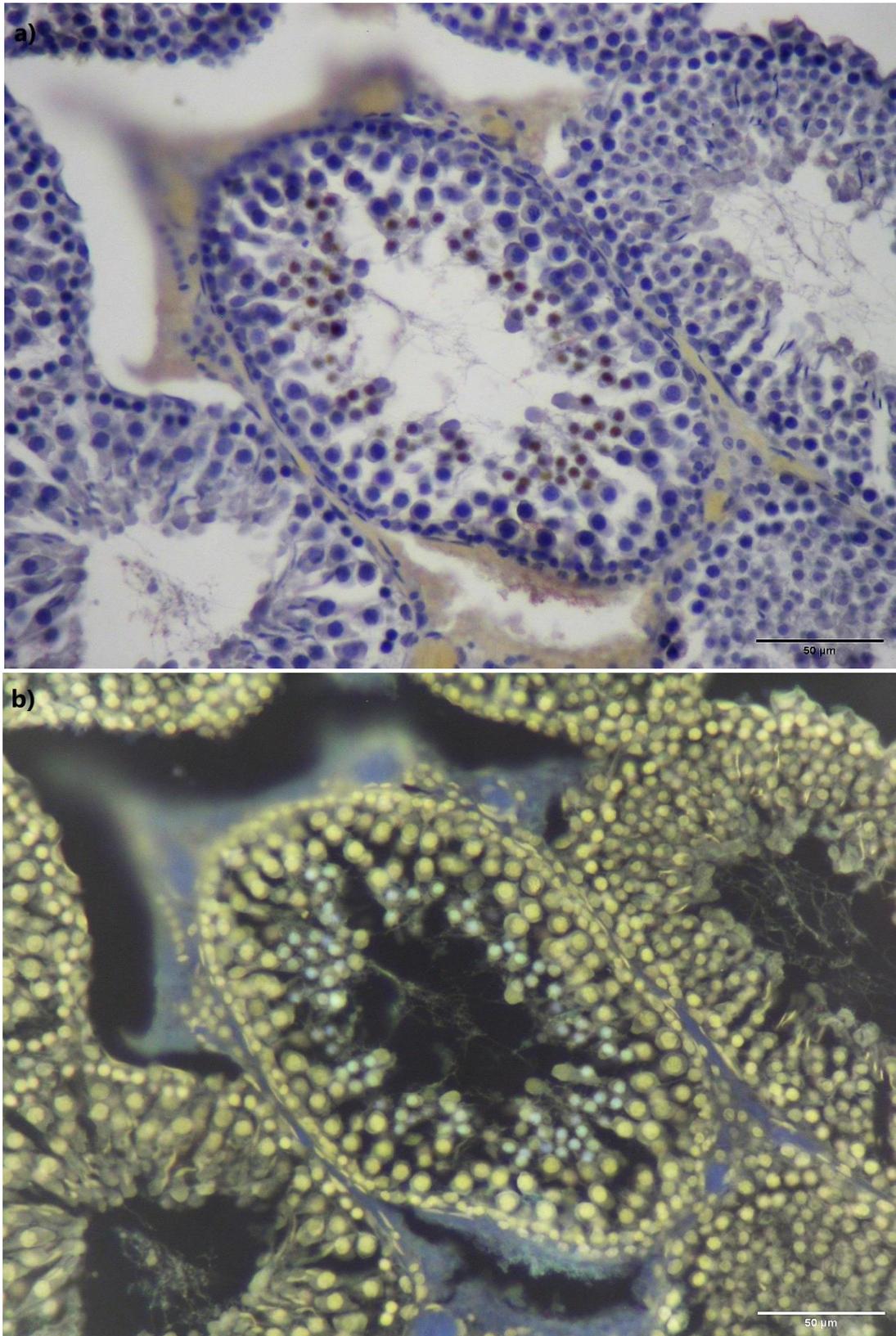
Tablica 18 – Broj apoptotičnih stanica pozitivnih na kaspazu-3 na 100 tubula - prva skupina. Prikazana srednja vrijednost skupine 1 (indeks apoptoze).



Slika 51 a,b – Jedan od nasumično odabranih tubula iz druge skupine na kojemu se mjerio broj apoptotičnih stanica pozitivnih na kaspazu-3, Cleaved Caspase-3; Asp 175, Cell Signaling Technology®, x400 (Izvorna slika)

Skupina 2			
1	11	51	57
2	0	52	78
3	108	53	0
4	72	54	1
5	0	55	0
6	0	56	0
7	95	57	43
8	35	58	0
9	0	59	0
10	0	60	0
11	2	61	0
12	112	62	0
13	0	63	0
14	0	64	97
15	24	65	73
16	13	66	55
17	0	67	0
18	54	68	2
19	51	69	0
20	49	70	0
21	0	71	0
22	0	72	76
23	0	73	69
24	0	74	2
25	0	75	0
26	84	76	0
27	35	77	133
28	0	78	57
29	56	79	0
30	0	80	0
31	0	81	35
32	0	82	44
33	104	83	0
34	0	84	0
35	0	85	0
36	0	86	92
37	0	87	32
38	0	88	0
39	46	89	0
40	0	90	2
41	134	91	0
42	36	92	0
43	0	93	0
44	51	94	0
45	0	95	49
46	0	96	54
47	33	97	0
48	0	98	14
49	0	99	0
50	0	100	0
			22,700 (2270)

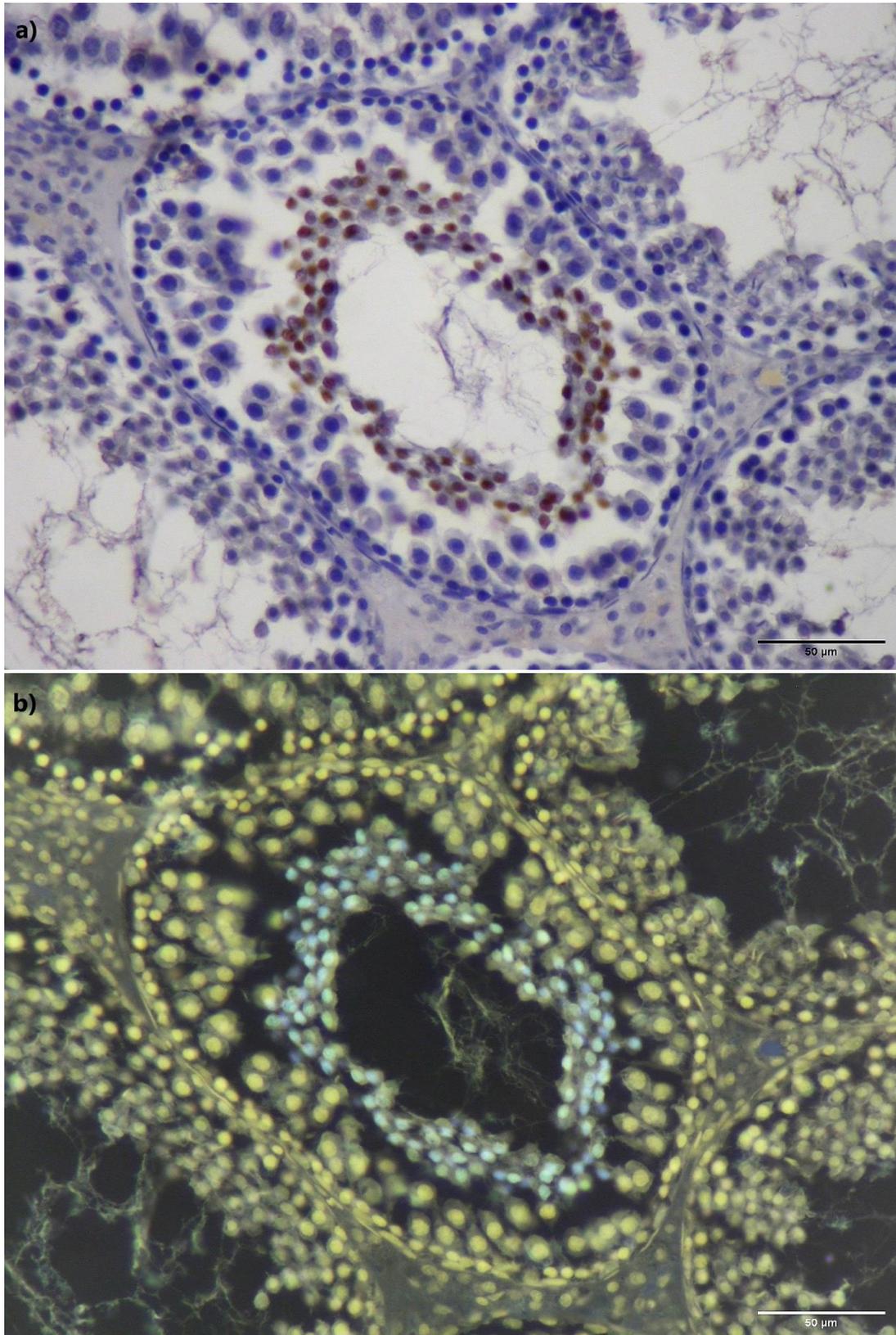
Tablica 19 – Broj apoptotičnih stanica pozitivnih na kaspazu-3 na 100 tubula - druga skupina. Prikazana srednja vrijednost skupine 2 (indeks apoptoze).



Slika 52 a,b – Jedan od nasumično odabranih tubula iz treće skupine na kojemu se mjerio broj apoptotičnih stanica pozitivnih na kaspazu-3, Cleaved Caspase-3; Asp 175, Cell Signaling Technology®, x400 (Izvorna slika)

Skupina 3			
1	0	51	33
2	0	52	0
3	52	53	0
4	4	54	0
5	0	55	59
6	0	56	0
7	66	57	0
8	0	58	0
9	0	59	6
10	0	60	0
11	71	61	45
12	23	62	0
13	0	63	38
14	0	64	0
15	0	65	0
16	0	66	0
17	83	67	0
18	0	68	0
19	6	69	0
20	0	70	10
21	0	71	41
22	74	72	0
23	0	73	1
24	0	74	0
25	58	75	0
26	0	76	0
27	0	77	62
28	0	78	0
29	0	79	0
30	38	80	3
31	0	81	1
32	0	82	0
33	0	83	26
34	0	84	0
35	0	85	0
36	0	86	0
37	59	87	0
38	0	88	55
39	0	89	0
40	0	90	0
41	0	91	4
42	0	92	0
43	57	93	0
44	0	94	81
45	73	95	64
46	0	96	0
47	0	97	1
48	0	98	0
49	0	99	0
50	50	100	6
			12,500 (1250)

Tablica 20 – Broj apoptotičnih stanica pozitivnih na kaspazu-3 na 100 tubula - treća skupina. Prikazana srednja vrijednost skupine 3 (indeks apoptoze).



Slika 53 a,b – Jedan od nasumično odabranih tubula iz četvrte skupine na kojemu se mjerio broj apoptotičnih stanica pozitivnih na kaspazu-3, Cleaved Caspase-3; Asp 175, Cell Signaling Technology®, x400 (Izvorna slika)

Skupina 4			
1	2	51	0
2	0	52	0
3	78	53	0
4	34	54	0
5	0	55	4
6	0	56	75
7	0	57	0
8	0	58	0
9	24	59	0
10	0	60	93
11	0	61	2
12	0	62	0
13	0	63	0
14	102	64	0
15	0	65	0
16	0	66	0
17	0	67	24
18	0	68	0
19	0	69	63
20	0	70	0
21	0	71	0
22	47	72	0
23	0	73	0
24	0	74	2
25	0	75	0
26	0	76	0
27	0	77	66
28	65	78	9
29	0	79	0
30	0	80	0
31	0	81	0
32	0	82	71
33	0	83	19
34	0	84	15
35	0	85	0
36	24	86	0
37	0	87	0
38	0	88	0
39	55	89	0
40	0	90	42
41	0	91	0
42	0	92	46
43	0	93	0
44	77	94	0
45	0	95	0
46	92	96	0
47	0	97	7
48	0	98	0
49	46	99	0
50	0	100	0
			11,840 (1184)

Tablica 21 – Broj apoptotičnih stanica pozitivnih na kaspazu-3 na 100 tubula - četvrta skupina. Prikazana srednja vrijednost skupine 4 (indeks apoptoze).

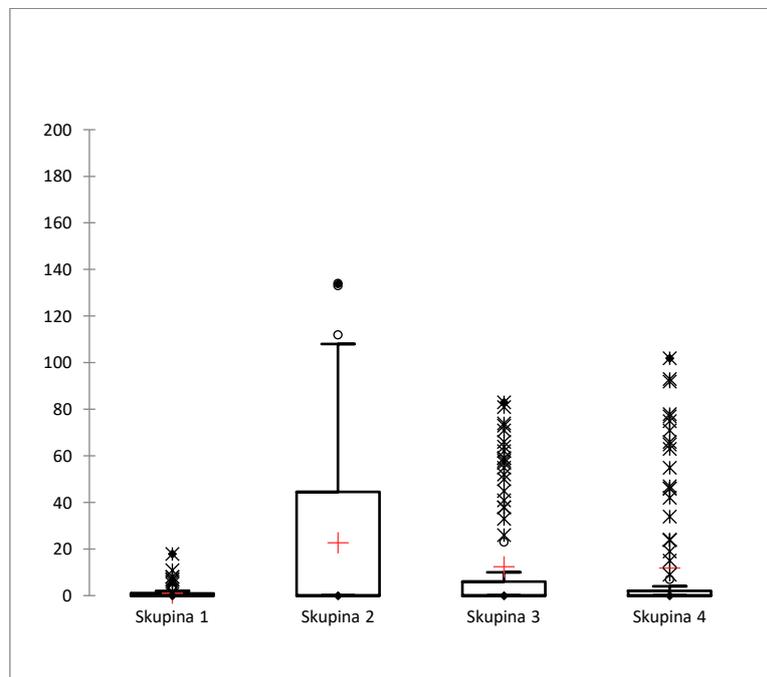
Vrijednosti srednjih vrijednosti, standardnih devijacija, medijana i interkvartilnih raspona po skupinama prikazane su u tablici 22.

Tablica 22 – Vrijednosti srednjih vrijednosti, standardnih devijacija, medijana, Q1, Q3 i interkvartilnih raspona po skupinama za stanice pozitivne na kaspazu-3

	Kaspaza-3					
	Mean	SD	Mdn	Q1	Q3	IQR
Skupina 1	1,130	2,677	0,000	0,000	1,000	1,000
Skupina 2	22,700	35,218	0,000	0,000	44,500	44,500
Skupina 3	12,500	23,976	0,000	0,000	6,000	6,000
Skupina 4	11,840	25,343	0,000	0,000	2,000	2,000

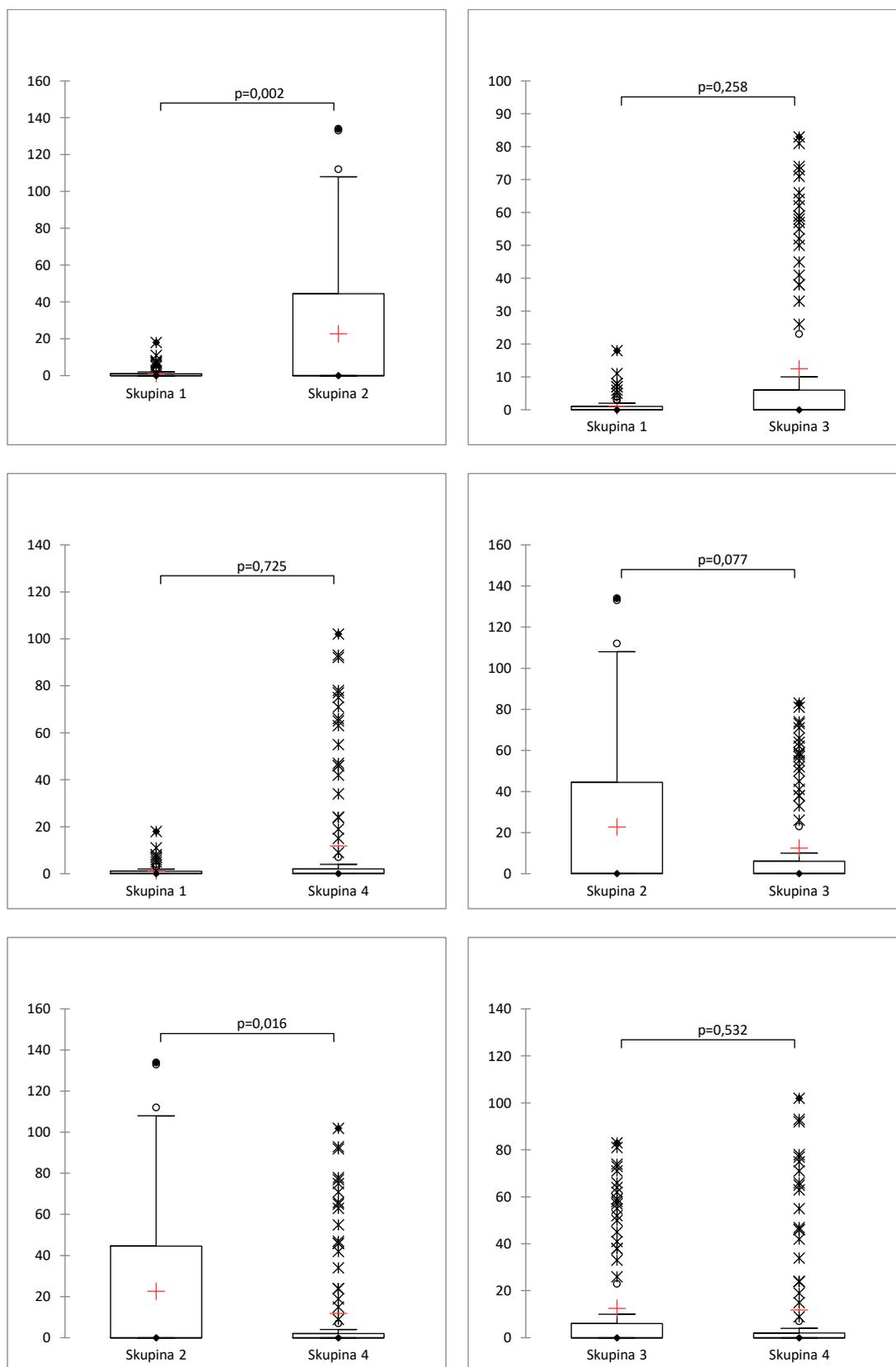
Kruskal-Wallisov test pokazuje da postoji statistički značajna razlika u promatranom parametru između različitih skupina (na razini značajnosti od 5%);

Kaspaza-3 [$\chi^2 = 10.441$ (7.815), DF = 3, p=0.015]



Slika 54 – „Box plot“ za stanice pozitivne na kaspazu-3

Rezultati post-hoc usporedbi u parovima pomoću Mann-Whitney testa prikazani su na slici 55.



Slika 55 – „Box plotovi“ post-hoc usporedbi u parovima za stanice pozitivne na kaspazu-3

Broj stanica pozitivnih na kaspazu-3 statistički je značajno manji ($p = 0,016$) u skupini 4 u kojoj je astaksantin primijenjen 45 minuta od trenutka detorzije (Mdn = 11,84) u odnosu na netretiranu torzijsko detorzijsku skupinu 2 (Mdn = 22,700). U odnosu na skupinu 2, skupina 3 u kojoj je astaksantin primijenjen u trenutku detorzije također bilježi daleko manji medijan (Mdn = 12,50) no ne postoji statistički značajna razlika na razini značajnosti od 5% ($p = 0,077$) (tablica 22, slika 55).

5.3. Biokemijska analiza

5.3.1. Koncentracija proteina

Izmjerene apsorbancije pomoću spektrofotometra, mikročitača Tecan®;

Tablica 23 – Vrijednosti apsorbancija

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	B	B	1A	1A	1A	2A	2A	2A	3A	3A	3A
B	200	200	200	1B	1B	1B	2B	2B	2B	3B	3B	3B
C	400	400	400	1C	1C	1C	2C	2C	2C	3C	3C	3C
D	600	600	600	1D	1D	1D	2D	2D	2D	3D	3D	3D
E	800	800	800	1E	1E	1E	2E	2E	2E	3E	3E	3E
F	1000	1000	1000	1F	1F	1F	2F	2F	2F	3F	3F	3F
G				1G	1G	1G	2G	2G	2G	3G	3G	3G
H				1H	1H	1H	2H	2H	2H	3H	3H	3H

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	B	B	4A	4A	4A						
B	100	100	100	4B	4B	4B						
C	200	200	200	4C	4C	4C						
D	400	400	400	4D	4D	4D						
E	600	600	600	4E	4E	4E						
F	800	800	800	4F	4F	4F						
G	1000	1000	1000	4G	4G	4G						
H				4H	4H	4H						

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,12688	0,12275	0,12234	0,55351	0,58783	0,5701	0,40894	0,41968	0,38555	0,35936	0,36157	0,36406
B	0,39442	0,38237	0,38536	0,73299	0,75852	0,69359	0,47572	0,49288	0,48818	0,34851	0,34557	0,34898
C	0,6314	0,59725	0,58069	0,5394	0,52266	0,52906	0,34878	0,34116	0,35117	0,35219	0,35256	0,36739
D	0,84828	0,81759	0,82559	0,57491	0,58861	0,58789	0,41623	0,42304	0,41436	0,42165	0,45639	0,39619
E	1,094	1,0265	1,0683	0,62292	0,57904	0,56671	0,44729	0,41593	0,42152	0,45214	0,46604	0,3405
F	1,3137	1,3243	1,2595	0,67854	0,65795	0,6425	0,40642	0,39932	0,36645	0,35274	0,37195	0,35428
G				0,66601	0,66211	0,63269	0,47575	0,47344	0,47386	0,39551	0,38897	0,36881
H				0,67999	0,64384	0,63115	0,45465	0,44425	0,46446	0,39763	0,4003	0,3489

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,14918	0,14091	0,1358	0,40564	0,42207	0,45146						
B	0,28947	0,26735	0,26335	0,38568	0,40089	0,42594						
C	0,41226	0,3798	0,35343	0,45981	0,46358	0,47305						
D	0,69059	0,63363	0,60407	0,44133	0,4495	0,48721						
E	1,1773	1,098	1,051	0,70207	0,67568	0,45118						
F	1,3022	1,1128	1,1587	0,40284	0,36317	0,41587						
G	1,3365	1,3521	1,2771	0,41503	0,39218	0,40263						
H				0,48075	0,47099	0,47735						

o	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL1 1/3 0.12688	BL1 2/3 0.12275	BL1 3/3 0.12234	SM1_91 1/1 0.55351	SM1_99 1/1 0.58783	SM1_107 1/1 0.5701	SM1_115 1/1 0.40894	SM1_123 1/1 0.41968	SM1_131 1/1 0.38556	SM1_139 1/1 0.35936	SM1_147 1/1 0.36157	SM1_155 1/1 0.36406
B	ST1_8 1/1 0.39442	ST1_13 1/1 0.38237	ST1_18 1/1 0.38536	SM1_92 1/1 0.73299	SM1_100 1/1 0.75852	SM1_108 1/1 0.69359	SM1_116 1/1 0.47572	SM1_124 1/1 0.49288	SM1_132 1/1 0.48818	SM1_140 1/1 0.34851	SM1_148 1/1 0.34557	SM1_156 1/1 0.34898
C	ST1_9 1/1 0.6314	ST1_14 1/1 0.59725	ST1_19 1/1 0.58069	SM1_93 1/1 0.5394	SM1_101 1/1 0.52266	SM1_109 1/1 0.52906	SM1_117 1/1 0.34878	SM1_125 1/1 0.34116	SM1_133 1/1 0.35117	SM1_141 1/1 0.35219	SM1_149 1/1 0.35256	SM1_157 1/1 0.36738
D	ST1_10 1/1 0.84828	ST1_15 1/1 0.81759	ST1_20 1/1 0.82559	SM1_94 1/1 0.57491	SM1_102 1/1 0.58861	SM1_110 1/1 0.58789	SM1_118 1/1 0.41623	SM1_126 1/1 0.42304	SM1_134 1/1 0.41436	SM1_142 1/1 0.42165	SM1_150 1/1 0.45639	SM1_158 1/1 0.39619
E	ST1_11 1/1 1.0939	ST1_16 1/1 1.0265	ST1_21 1/1 1.0683	SM1_95 1/1 0.62292	SM1_103 1/1 0.57904	SM1_111 1/1 0.56671	SM1_119 1/1 0.44729	SM1_127 1/1 0.41593	SM1_135 1/1 0.42152	SM1_143 1/1 0.45214	SM1_151 1/1 0.46604	SM1_159 1/1 0.3405
F	ST1_12 1/1 1.3137	ST1_17 1/1 1.3243	ST1_22 1/1 1.2595	SM1_96 1/1 0.67854	SM1_104 1/1 0.65795	SM1_112 1/1 0.6425	SM1_120 1/1 0.40643	SM1_128 1/1 0.39932	SM1_136 1/1 0.36645	SM1_144 1/1 0.35274	SM1_152 1/1 0.37195	SM1_160 1/1 0.35428
G				SM1_97 1/1 0.66601	SM1_105 1/1 0.66211	SM1_113 1/1 0.63269	SM1_121 1/1 0.47575	SM1_129 1/1 0.47344	SM1_137 1/1 0.47386	SM1_145 1/1 0.39551	SM1_153 1/1 0.38897	SM1_161 1/1 0.36881
H				SM1_98 1/1 0.67999	SM1_106 1/1 0.64384	SM1_114 1/1 0.63115	SM1_122 1/1 0.45465	SM1_130 1/1 0.44425	SM1_138 1/1 0.46446	SM1_146 1/1 0.39763	SM1_154 1/1 0.4003	SM1_162 1/1 0.3489

TECAN Austria

o	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL1 1/3 0.14918	BL1 2/3 0.14091	BL1 3/3 0.1358	SM1_148 1/1 0.40564	SM1_142 1/1 0.42207	SM1_145 1/1 0.45146						
B	ST1_41 1/1 0.28947	ST1_47 1/1 0.26735	ST1_53 1/1 0.26335	SM1_140 1/1 0.38568	SM1_143 1/1 0.40089	SM1_146 1/1 0.42594						
C	ST1_42 1/1 0.41226	ST1_48 1/1 0.3798	ST1_54 1/1 0.35343	SM1_141 1/1 0.45981	SM1_144 1/1 0.46358	SM1_147 1/1 0.47305						
D	ST1_43 1/1 0.69059	ST1_49 1/1 0.63363	ST1_55 1/1 0.60407	SM1_94 1/1 0.44133	SM1_102 1/1 0.4495	SM1_110 1/1 0.48721						
E	ST1_44 1/1 1.1773	ST1_50 1/1 1.098	ST1_56 1/1 1.051	SM1_95 1/1 0.70207	SM1_103 1/1 0.67568	SM1_111 1/1 0.45118						
F	ST1_45 1/1 1.3022	ST1_51 1/1 1.1128	ST1_57 1/1 1.1587	SM1_96 1/1 0.40284	SM1_104 1/1 0.36317	SM1_112 1/1 0.41587						
G	ST1_46 1/1 1.3365	ST1_52 1/1 1.3521	ST1_58 1/1 1.2771	SM1_97 1/1 0.41503	SM1_105 1/1 0.39218	SM1_113 1/1 0.40263						
H				SM1_98 1/1 0.48075	SM1_106 1/1 0.47099	SM1_114 1/1 0.47735						

TECAN Austria

Slika 56 – Screenshot zaslona Tecan® softver-a - vrijednosti apsorbancija dobivenih putem mikročitača (Tecan® Austria)

Iz dobivenih vrijednosti apsorbancija u triplicatima izračunate su srednje vrijednosti apsorbancija te je od istih oduzeta slijepa proba (blank, B);

Tablica 24 – Srednje vrijednosti apsorbancija

B	0,12399	1A	0,57048	2A	0,40472	3A	0,36166
100	0,38738	1B	0,72836	2B	0,48559	3B	0,34768
200	0,60311	1C	0,53037	2C	0,34703	3C	0,35738
400	0,83048	1D	0,58380	2D	0,41787	3D	0,42474
600	1,06293	1E	0,58955	2E	0,42824	3E	0,41956
800	1,29916	1F	0,65966	2F	0,39073	3F	0,35965
1000	0,12399	1G	0,65360	2G	0,47435	3G	0,38443
		1H	0,65166	2H	0,45445	3H	0,38227

B	0,14196	4A	0,42639
100	0,27339	4B	0,40417
200	0,38183	4C	0,46548
400	0,64276	4D	0,45934
600	1,10876	4E	0,60964
800	1,19123	4F	0,39396
1000	1,3219	4G	0,40328
		4H	0,47636

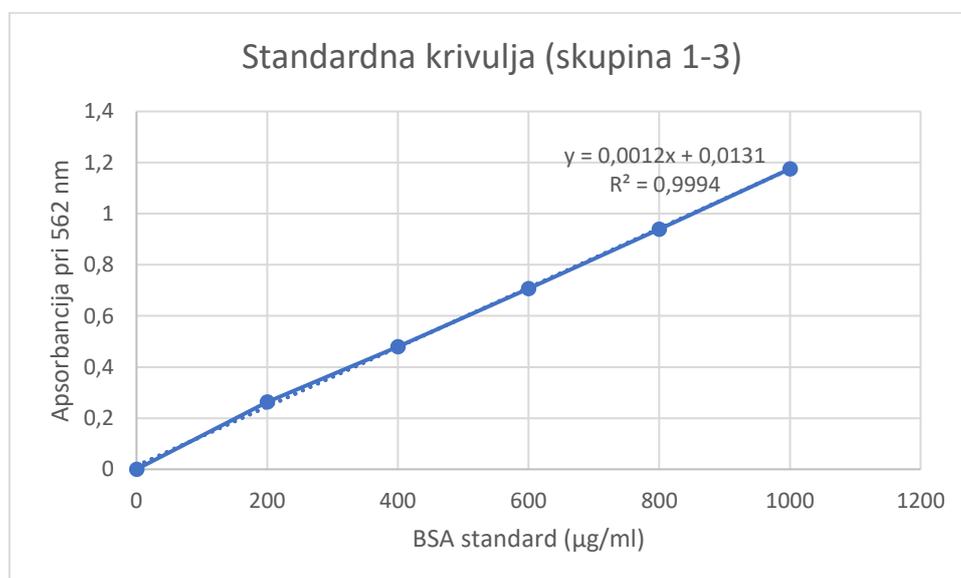
Tablica 25 – Vrijednosti razlika srednjih vrijednosti apsorbancija i slijepih proba

1A - B	0,44649	2A - B	0,28073	3A - B	0,23767	4A - B	0,28442
1B - B	0,60437	2B - B	0,36160	3B - B	0,22369	4B - B	0,26220
1C - B	0,40638	2C - B	0,22304	3C - B	0,23339	4C - B	0,32351
1D - B	0,45981	2D - B	0,29388	3D - B	0,30075	4D - B	0,31738
1E - B	0,46556	2E - B	0,30425	3E - B	0,29557	4E - B	0,46768
1F - B	0,53567	2F - B	0,26674	3F - B	0,23566	4F - B	0,25199
1G - B	0,52961	2G - B	0,35036	3G - B	0,26044	4G - B	0,26131
1H - B	0,52767	2H - B	0,33046	3H - B	0,25828	4H - B	0,3344

Iz srednjih vrijednosti apsorbancija standarda dobivene su standardne krivulje;

Tablica 26 – Vrijednosti apsorbancija standarda te vrijednosti razlika apsorbancija standarda i slijepih proba

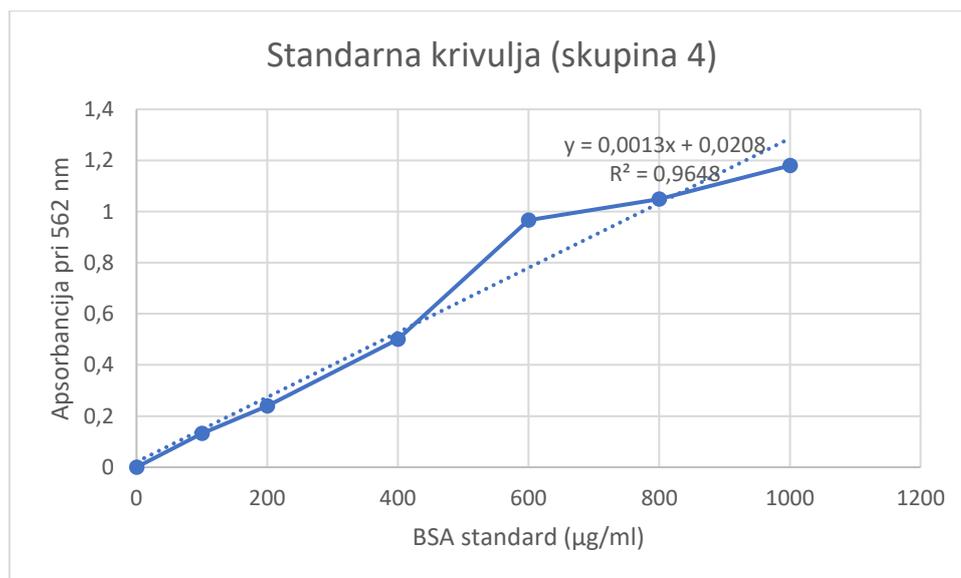
X os (BSA standard / $\mu\text{g/ml}$)	0	200	400	600	800	1000
Y os (apsorbancija pri 562 nm)	0,12399	0,38738	0,60311	0,83048	1,06293	1,29916
Izmjerena apsorbancija - B	0	0,26339	0,47912	0,70649	0,93894	1,17517



Slika 57 – Standardna krivulja za skupine 1-3

Tablica 27 – Vrijednosti apsorbancija standarda te vrijednosti razlika apsorbancija standarda i slijepih proba

X os (BSA standard / $\mu\text{g/ml}$)	0	100	200	400	600	800	1000
Y os (apsorbancija pri 562 nm)	0,14193	0,27339	0,38183	0,64276	1,10876	1,19123	1,3219
Izmjerena apsorbancija - B	0	0,13145	0,23989	0,50082	0,96683	1,04929	1,17996



Slika 58 – Standardna krivulja za skupinu 4

Količina proteina u uzorku ($\mu\text{g/ml}$) određena je iz krivulja prema dobivenim formulama;

- za skupine 1-3

$$y = 0,0012x + 0,0131$$

srednja vrijednost = $0,0012$ (količina proteina) + $0,0131$

- za skupinu 4

$$y = 0,0013x + 0,0208$$

srednja vrijednost = $0,0013$ (količina proteina) + $0,0208$

Tablica 28 – Vrijednosti količine proteina u uzorcima

1A	361,15833	2A	223,02777	3A	187,14444	4A	202,78974
1B	492,73055	2B	290,41944	3B	175,49722	4B	185,69743
1C	327,73611	2C	174,95555	3C	183,575	4C	232,85897
1D	372,26111	2D	233,98888	3D	239,71111	4D	228,14102
1E	377,05555	2E	242,63055	3E	235,39166	4E	343,75384
1F	435,47777	2F	211,36666	3F	185,47222	4F	177,84358
1G	430,42777	2G	281,05	3G	206,11666	4G	185,01282
1H	428,80833	2H	264,46944	3H	204,32222	4H	241,23076

Koncentracija proteina ($\mu\text{g/ml}$) u uzorku s obzirom na razrjeđenje dobivena je množenjem vrijednosti količine proteina s dilucijskim faktorom 20;

Tablica 29 – Vrijednosti koncentracija proteina u uzorcima

1A	7223,16	2A	4460,55	3A	3742,88	4A	4055,79
1B	9854,61	2B	5808,38	3B	3509,94	4B	3713,94
1C	6554,72	2C	3499,11	3C	3671,5	4C	4657,17
1D	7445,22	2D	4679,77	3D	4794,22	4D	4562,82
1E	7541,11	2E	4852,61	3E	4707,83	4E	6875,07
1F	8709,55	2F	4227,33	3F	3709,44	4F	3556,87
1G	8608,55	2G	5621	3G	4122,33	4G	3700,25
1H	8576,16	2H	5289,38	3H	4086,44	4H	4824,61

5.3.2. Vrijednosti malondialdehida (MDA)

Izmjerene apsorbancije pomoću spektrofotometra, mikročitača Tecan®;

Tablica 30 – Vrijednosti apsorbancija

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			1A	1A	1B	1B	1C	1C	1D	1D	B	B
B			1E	1E	1F	1F	1G	1G	1H	1H	4	4
C			2A	2A	2B	2B	2C	2C	2D	2D	8	8
D			2E	2E	2F	1F	2G	2G	2H	2H	12	12
E			3A	3A	3B	3B	3C	3C	3D	3D	16	16
F			3E	3E	3F	3F	3G	3G	3H	3H	20	20
G			4A	4A	4B	4B	4C	4C	4D	4D		
H			4E	4E	4F	4F	4G	4G	4H	4H		

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			1,5233	1,6269	1,3385	0,92994	0,87087	1,0038	0,68159	0,71746	0,047125	0,04776
B			0,59232	0,76426	0,68506	0,78815	1,0203	0,76311	0,54492	0,72909	0,21903	0,24323
C			0,9508	1,2267	0,97016	1,0117	0,82922	0,86763	1,3637	1,3852	0,50426	0,52114
D			1,5131	1,4436	1,2379	1,1715	1,0328	0,86372	1,1418	1,1842	0,65396	0,67605
E			1,6143	1,5058	0,55142	0,57267	0,95545	0,94239	1,1763	1,097	0,85989	0,86838
F			1,0365	1,0187	1,1071	1,0962	0,96074	0,81529	1,4013	1,2992	1,0787	1,1149
G			0,93928	0,783	1,0938	1,0129	0,94503	0,75414	0,82186	1,0013		
H			1,1472	1,0471	1,2591	1,3044	1,0594	0,96976	0,85587	0,92045		

Iz dobivenih vrijednosti apsorbancija u duplikatima izračunate su srednje vrijednosti apsorbancija te je od istih oduzet blank (B);

Tablica 31 – Srednje vrijednosti apsorbancija

1A	1,5751	1B	1,1342	1C	0,93731	1D	0,69952	B	0,04744
1E	0,67829	1F	0,73661	1G	0,89173	1H	0,637	4	0,23113
2A	1,0888	2B	0,99093	2C	0,84842	2D	1,3744	8	0,5127
2E	1,4783	1F	1,2047	2G	0,94824	2H	1,163	12	0,665
3A	1,56	3B	0,56205	3C	0,94892	3D	1,1366	16	0,86414
3E	1,0276	3F	1,1017	3G	0,88801	3H	1,3503	20	1,0968
4A	0,86114	4B	1,0534	4C	0,84959	4D	0,91158		
4E	1,0971	4F	1,2817	4G	1,0146	4H	0,88816		

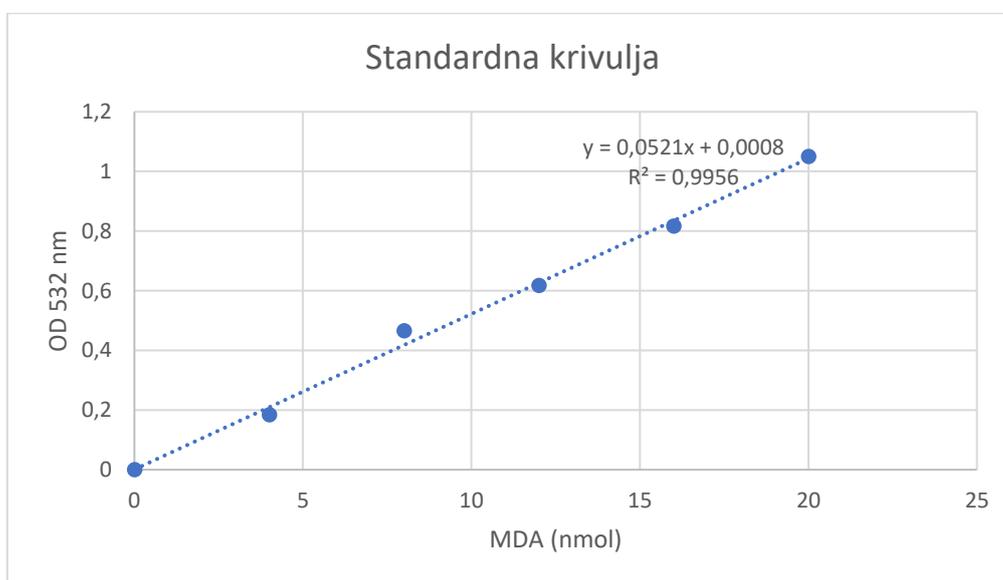
Tablica 32 – Vrijednosti razlika srednjih vrijednosti apsorbancija i slijepih proba

1A-B	1,52765	1B-B	1,08675	1C-B	0,88986	1D-B	0,65207
1E-B	0,63084	1F-B	0,68916	1G-B	0,84428	1H-B	0,58955
2A-B	1,04135	2B-B	0,94348	2C-B	0,80097	2D-B	1,32695
2E-B	1,43085	1F-B	1,15725	2G-B	0,90079	2H-B	1,11555
3A-B	1,51255	3B-B	0,51460	3C-B	0,90147	3D-B	1,08915
3E-B	0,98015	3F-B	1,05425	3G-B	0,84056	3H-B	1,30285
4A-B	0,81369	4B-B	1,00595	4C-B	0,80214	4D-B	0,86413
4E-B	1,04965	4F-B	1,23425	4G-B	0,96715	4H-B	0,84071

Iz srednjih vrijednosti apsorbancija standarda dobivena je standardna kalibracijska krivulja;

Tablica 33 – Vrijednosti apsorbancija standarda te vrijednosti razlika apsorbancija standarda i slijepih proba

X os (MDA standard / nmol)	0	4	8	12	16	20
Y os (apsorbancija pri 532 nm)	0,047442	0,23113	0,5127	0,665	0,86414	1,0968
Izmjerena apsorbancija - B	0	0,183688	0,465258	0,617558	0,816698	1,049358



Slika 59 – Standardna krivulja

Količina MDA u uzorku (nmol) određena je iz krivulje prema dobivenoj formuli;

$$y = 0,0521x + 0,0008$$

srednja vrijednost = 0,0521 (količina MDA) + 0,0008

Tablica 34 – Vrijednosti količine MDA u uzorcima

1A	29,306295	1B	20,843723	1C	17,064644	1D	12,500537
1E	12,093051	1F	13,212437	1G	16,189788	1H	11,300537
2A	19,972322	2B	18,093819	2C	15,358502	2D	25,454088
2E	27,448330	2F	22,196890	2G	17,274433	2H	21,396506
3A	29,016468	3B	9,8619577	3C	17,287485	3D	20,889788
3E	18,797658	3F	20,219923	3G	16,118387	3H	24,991516
4A	15,602648	4B	19,292859	4C	15,380959	4D	16,570786
4E	20,131631	4F	23,674817	4G	18,548138	4H	16,121266

Koncentracija MDA (nmol/ml) u uzorku dobivena je dijeljenjem količine MDA (nmol) i volumena uzorka (ml) dodanog u jažice (0,02 ml);

Tablica 35 – Vrijednosti koncentracija MDA u uzorcima

1A	1465,31477	2A	998,61612	3A	1450,8234	4A	780,13243
1B	1042,18618	2B	904,69097	3B	493,09788	4B	964,64299
1C	853,23224	2C	767,92514	3C	864,37428	4C	769,04798
1D	625,02687	2D	1272,70441	3D	1044,48944	4D	828,53934
1E	604,65259	2E	1372,4165	3E	939,88291	4E	1006,58157
1F	660,62188	2F	1109,84453	3F	1010,99616	4F	1183,74088
1G	809,48944	2G	863,72168	3G	805,91938	4G	927,40690
1H	565,02687	2H	1069,82533	3H	1249,57581	4H	806,06333

Količina malondialdehida po μg proteina (nmol/ μg) dobivena je dijeljenjem koncentracije MDA (nmol/ml) i koncentracije proteina ($\mu\text{g}/\text{ml}$);

Tablica 36 – Vrijednosti količine MDA po μg proteina (nmol/ μg)

1A	0,202863	2A	0,223877	3A	0,387622	4A	0,192350
1B	0,105756	2B	0,155756	3B	0,140486	4B	0,259735
1C	0,130170	2C	0,219462	3C	0,235428	4C	0,165132
1D	0,083950	2D	0,271958	3D	0,217864	4D	0,181584
1E	0,080180	2E	0,282820	3E	0,199642	4E	0,146410
1F	0,075850	2F	0,262540	3F	0,272546	4F	0,332804
1G	0,094033	2G	0,153659	3G	0,195500	4G	0,250633
1H	0,065883	2H	0,202259	3H	0,305785	4H	0,167073

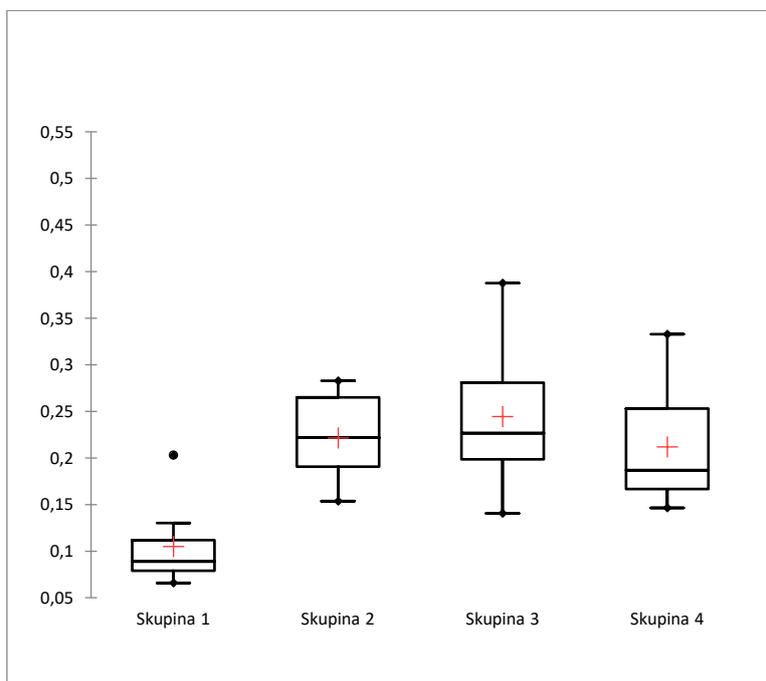
Vrijednosti medijana i interkvartilnih raspona po skupinama prikazane su u tablici 37.

Tablica 37 – Vrijednosti medijana, Q1, Q3 i interkvartilnih raspona po skupinama za malondialdehid

	MDA			
	Mdn	Q1	Q3	IQR
Skupina 1	0,089	0,079	0,112	0,033
Skupina 2	0,222	0,191	0,265	0,074
Skupina 3	0,227	0,199	0,281	0,082
Skupina 4	0,187	0,167	0,253	0,086

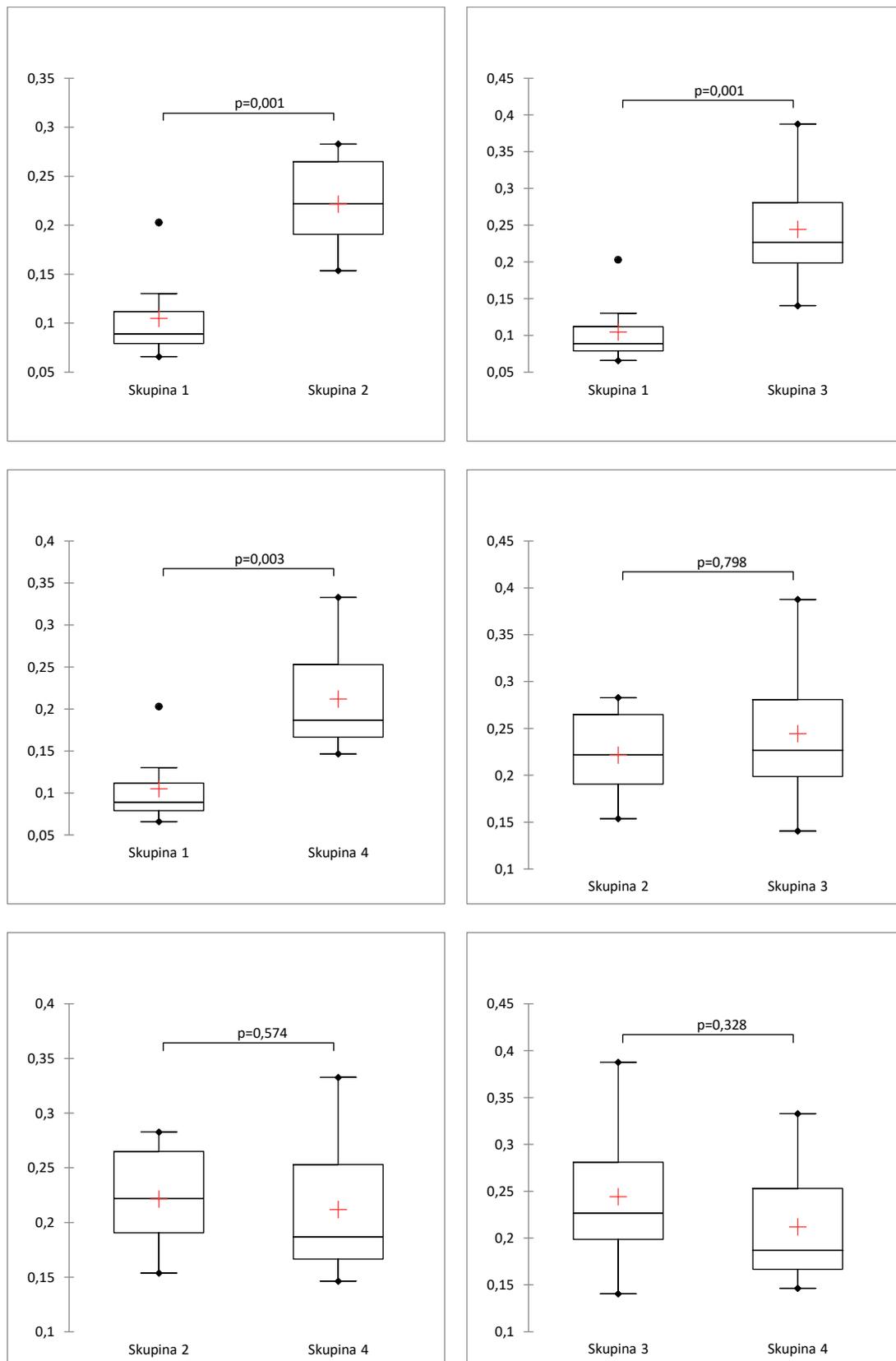
Kruskal-Wallisov test pokazuje da postoji statistički značajna razlika u promatranom parametru između različitih skupina (na razini značajnosti od 5%);

Malondialdehid [$\chi^2 = 14.395$ (7.815), DF = 3, p=0.002]



Slika 60 – „Box plot“ za MDA

Rezultati post-hoc usporedbi u parovima pomoću Mann-Whitney testa prikazani su na slici 61.



Slika 61 – „Box plotovi“ post-hoc usporedbi u parovima za MDA

Slijedom navedenih grafikona primjetan je pad vrijednosti malondialdehida u skupini u kojoj je astaksantin primijenjen 45 minuta od trenutka detorzije (Mdn = 0,187) u odnosu na netretiranu torzijsko detorzijsku skupinu (Mdn = 0,222), no ne postoji statistički značajna razlika na razini značajnosti od 5% ($p = 0,574$). Vrijednosti medijana između skupine 2 (Mdn = 0,222) i skupine 3 (Mdn = 0,227) su gotovo identične ($p = 0,798$). Nesporna je činjenica da vrijednosti MDA u skupini 2 u odnosu na lažno operiranu skupinu statistički značajno rastu ($p = 0,001$) (tablica 37, slika 61).

5.3.3. Vrijednosti enzimskog antioksidansa superoksid dismutaze (SOD)

Izmjerene apsorbancije pomoću spektrofotometra, mikročitača Tecan®;

Tablica 38 – Vrijednosti apsorbancija za prvu i drugu skupinu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	200	200	200	0,05	0,05	0,05	1A	1A	B2	2A	2A	B2
B	100	100	100	0,01	0,01	0,01	1B	1B	B2	2B	2B	B2
C	50	50	50	0,001	0,001	0,001	1C	1C	B2	2C	2C	B2
D	20	20	20	B1	B1		1D	1D	B2	2D	2D	B2
E	10	10	10	B3	B3		1E	1E	B2	2E	2E	B2
F	5	5	5				1F	1F	B2	2F	2F	B2
G	1	1	1				1G	1G	B2	2G	2G	B2
H	0,1	0,1	0,1				1H	1H	B2	2H	2H	B2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,051009	0,052409	x	0,73988	0,73578	0,72907	0,17887	x	0,098554	0,1494	0,13712	0,061729
B	0,051585	0,052642	0,051671	0,77751	0,75394	0,74212	0,18472	0,18376	0,11473	0,14637	0,14191	0,071646
C	0,052368	0,054581	0,058858	0,757	0,75665	0,75816	0,18481	0,18533	0,11169	0,15966	0,13782	0,059316
D	0,062669	0,06572	0,061099	0,73763	0,73462		0,19281	0,19196	0,11856	0,15001	0,14923	0,073988
E	0,1112	0,10931	0,094226	0,0475	0,05106		0,17749	0,18284	0,111325	0,14857	0,14994	0,071324
F	0,1856	0,16479	0,16489				0,1761	0,1917	0,11594	0,13789	0,14323	0,055052
G	0,42289	0,4406	0,42994				0,17313	0,19059	0,120525	0,16995	0,15438	0,070869
H	0,73261	0,72796	0,66957				0,18062	0,17717	0,114385	0,14065	0,13776	0,06708

Tablica 39 – Vrijednosti apsorbancija za treću i četvrtu skupinu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	200	200	0,05	0,05	3A	3A	B2		4A	4A	B2	
B	100	100	0,01	0,01	3B	3B	B2		4B	4B	B2	
C	50	50	0,001	0,001	3C	3C	B2		4C	4C	B2	
D	20	20	B1	B1	3D	3D	B2		4D	4D	B2	
E	10	10	B3	B3	3E	3E	B2		4E	4E	B2	
F	5	5			3F	3F	B2		4F	4F	B2	
G	1	1			3G	3G	B2		4G	4G	B2	
H	0,1	0,1			3H	3H	B2		4H	4H	B2	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,049166	0,049287	0,67903	0,68146	0,16992	0,16927	0,070217		0,14247	0,14331	0,064656	
B	0,049978	0,049688	0,68826	0,71048	0,16431	0,17389	0,068021		0,13561	0,1328	0,06452	
C	0,051403	0,051722	0,70581	0,71274	0,17239	0,17895	0,067745		0,14834	0,14294	0,070353	
D	0,060181	0,061149	0,73601	0,73601	0,17947	0,18182	0,072173		0,16264	0,14133	0,069409	
E	0,076632	0,079854	0,05009	0,050099	0,17086	0,16754	0,073674		0,14891	0,14296	0,068661	
F	0,13983	0,13242			0,17365	0,19401	0,07103		0,14572	0,13942	0,066923	
G	0,33717	0,38536			0,18717	0,19017	0,066322		0,14086	0,14574	0,061728	
H	0,66533	0,67277			0,19127	0,17933	0,062638		0,14349	0,13713	0,069474	

Iz dobivenih vrijednosti apsorbancija izračunali smo srednje vrijednosti apsorbancija;

Tablica 40 – Srednje vrijednosti apsorbancija za prvu i drugu skupinu

0,051709	0,73491	1A	0,17887	B2	0,098554	2A	0,14326	B2	0,061729
0,051966	0,757857	1B	0,18424	B2	0,11473	2B	0,14414	B2	0,071646
0,055269	0,75727	1C	0,18507	B2	0,11169	2C	0,14874	B2	0,059316
0,063163	0,736125	1D	0,192385	B2	0,11856	2D	0,14962	B2	0,073988
0,104912	0,049283	1E	0,180165	B2	0,111325	2E	0,149255	B2	0,071324
0,17176		1F	0,1839	B2	0,11594	2F	0,14056	B2	0,055052
0,431143		1G	0,18186	B2	0,120525	2G	0,162165	B2	0,070869
0,710047		1H	0,178895	B2	0,114385	2H	0,139205	B2	0,06708

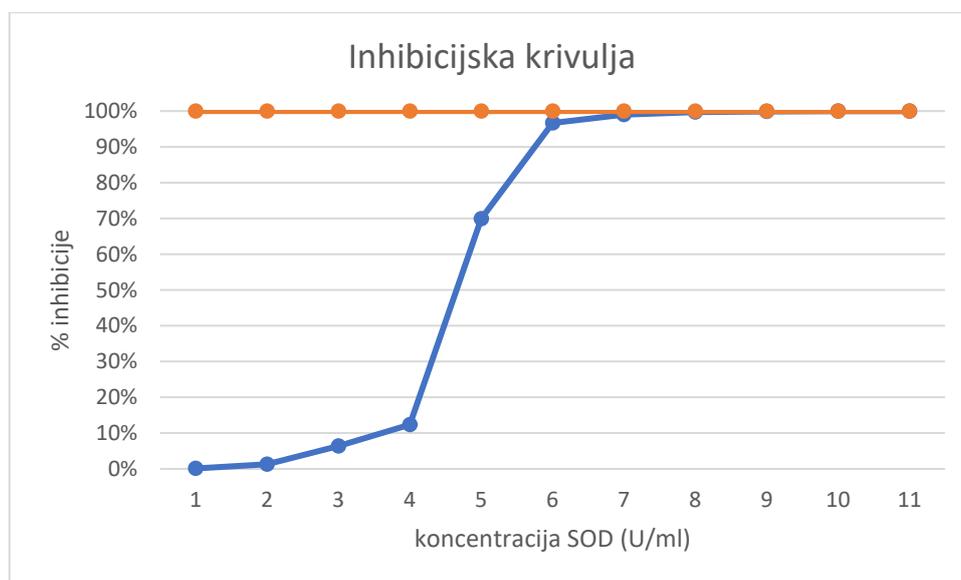
Tablica 41 – Srednje vrijednosti apsorbancija za treću i četvrtu skupinu

0,049227	0,680245	3A	0,169595	B2	0,070217	4A	0,14289	B2	0,064656
0,049833	0,69937	3B	0,1691	B2	0,068021	4B	0,134205	B2	0,06452
0,051563	0,709275	3C	0,17567	B2	0,067745	4C	0,14564	B2	0,070353
0,060665	0,73601	3D	0,180645	B2	0,072173	4D	0,151985	B2	0,069409
0,078243	0,050095	3E	0,1692	B2	0,073674	4E	0,145935	B2	0,068661
0,136125		3F	0,18383	B2	0,07103	4F	0,14257	B2	0,066923
0,361265		3G	0,18867	B2	0,066322	4G	0,1433	B2	0,061728
0,66905		3H	0,1853	B2	0,062638	4H	0,14031	B2	0,069474

Iz srednjih vrijednosti apsorbancija standarda dobivena je inhibicijska krivulja;

Tablica 42 – Vrijednosti apsorbancija standarda za prvu i drugu skupinu

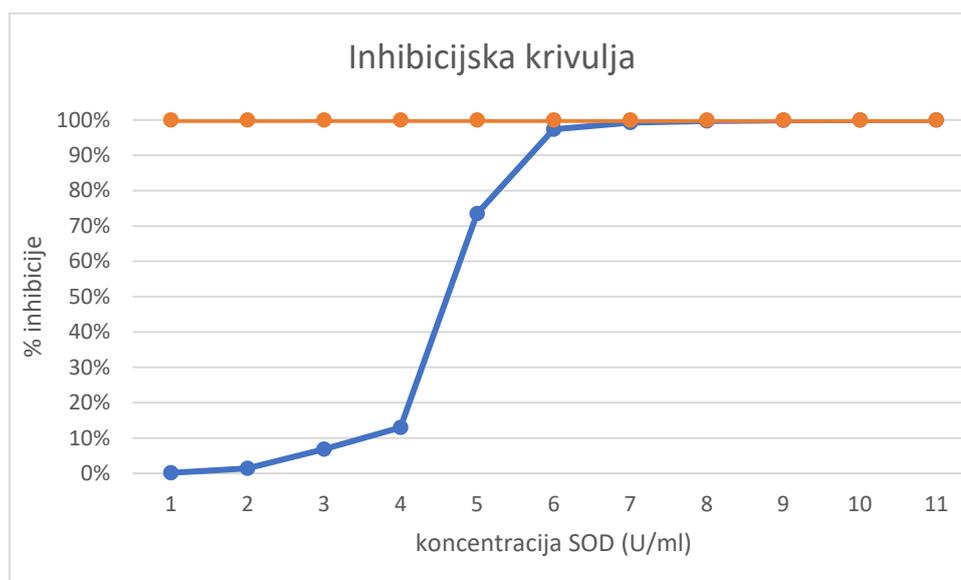
X os – koncentracija SOD	0,001	0,01	0,05	0,1	1	5	10	20	50	100	200
Y os (apsorbancija pri 450 nm)	0,7572	0,75785	0,7349	0,71004	0,43114	0,1717	0,10491	0,06316	0,05526	0,05196	0,05170



Slika 62 – Inhibicijska krivulja za prvu i drugu skupinu

Tablica 43 – Vrijednosti apsorbancija standarda za treću i četvrtu skupinu

X os – koncentracija SOD	0,001	0,01	0,05	0,1	1	5	10	20	50	100	200
Y os (apsorbancija pri 450 nm)	0,70927	0,6993	0,68024	0,6690	0,36126	0,13612	0,07824	0,06066	0,05156	0,04983	0,04922



Slika 63 – Inhibicijska krivulja za treću i četvrtu skupinu

SOD aktivnost dobivena je iz sljedeće formule;

$$\text{SOD aktivnost (\% inhibicije)} = \{[(S1 - S3) - (SS - S2)] / (S1 - S3)\} \times 100\%$$

- S1 – blank 1
- S2 – blank 2
- S3 – blank 3
- SS – uzorak

Tablica 44 – Vrijednosti SOD aktivnosti

1A	0,883065	2A	0,881295	3A	0,864977	4A	0,893705
1B	0,898798	2B	0,894453	3B	0,862666	4B	0,905321
1C	0,893163	2C	0,869804	3C	0,853365	4C	0,897709
1D	0,892515	2D	0,889884	3D	0,852621	4D	0,887806
1E	0,899773	2E	0,886537	3E	0,87021	4E	0,89501
1F	0,901054	2F	0,875505	3F	0,846741	4F	0,897219
1G	0,9107	2G	0,867079	3G	0,833769	4G	0,889169
1H	0,906077	2H	0,89499	3H	0,833341	4H	0,903756

Tablica 45 – Vrijednosti izražene kao % inhibicije

1A	88,30649	2A	88,12952	3A	86,49767	4A	89,37052
1B	89,87978	2B	89,44525	3B	86,26656	4B	90,53206
1C	89,31633	2C	86,98042	3C	85,33648	4C	89,77093
1D	89,25154	2D	88,98838	3D	85,26209	4D	88,78059
1E	89,97732	2E	88,65366	3E	87,02103	4E	89,50096
1F	90,10545	2F	87,55049	3F	84,67405	4F	89,72195
1G	91,07001	2G	86,70787	3G	83,37686	4G	88,91693
1H	90,60774	2H	89,49898	3H	83,33413	4H	90,37561

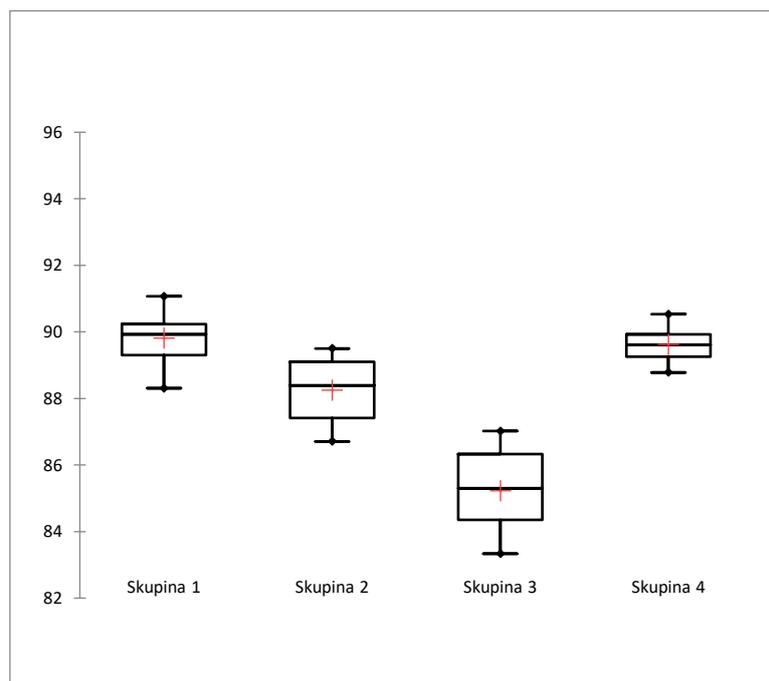
Vrijednosti medijana i interkvartilnih raspona po skupinama prikazane su u tablici 46.

Tablica 46 – Vrijednosti medijana, Q1, Q3 i interkvartilnih raspona po skupinama za SOD

	SOD			
	Mdn	Q1	Q3	IQR
Skupina 1	89,929	89,300	90,231	0,931
Skupina 2	88,392	87,408	89,103	1,695
Skupina 3	85,299	84,350	86,324	1,974
Skupina 4	89,611	89,257	89,922	0,665

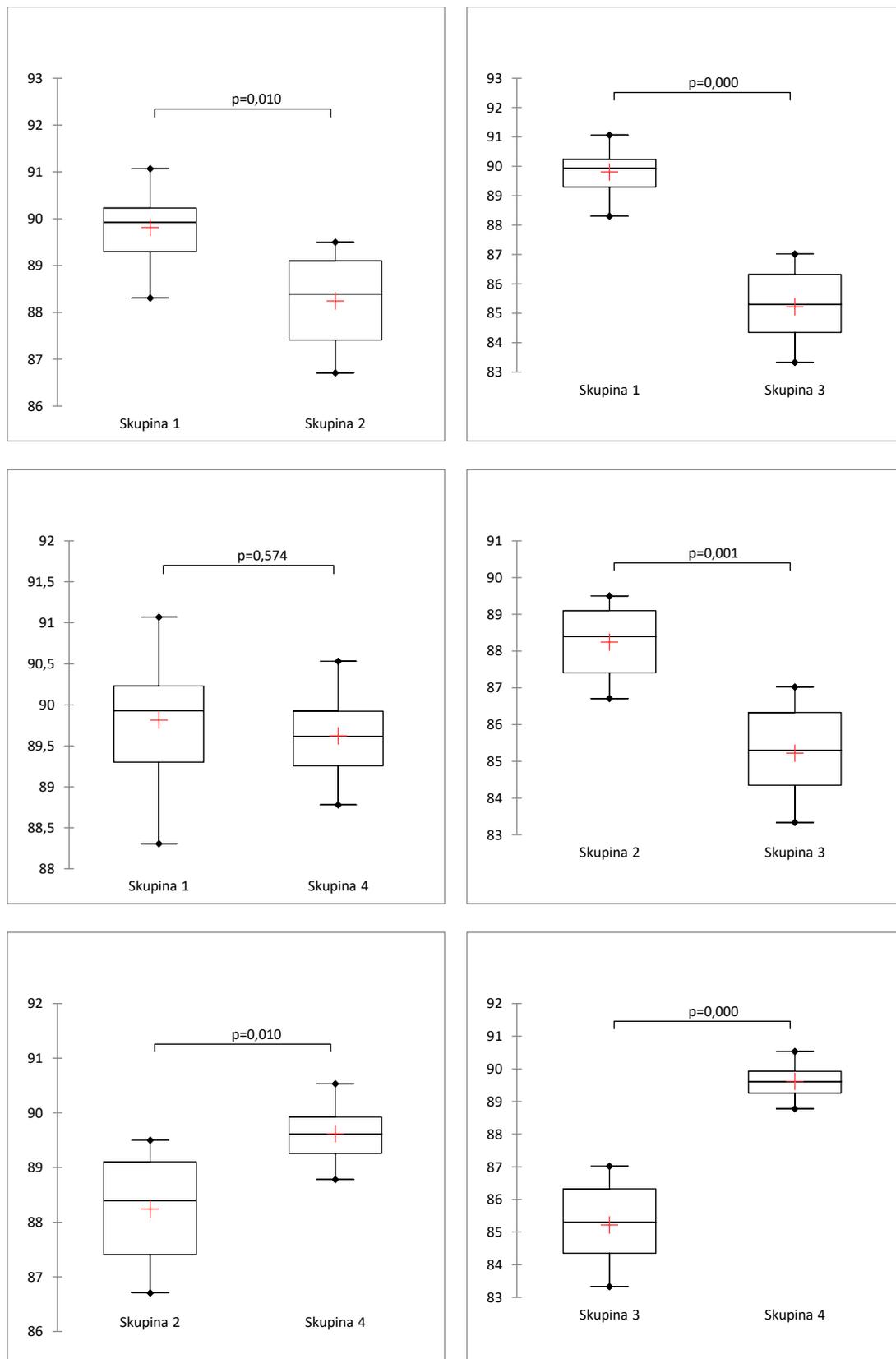
Kruskal-Wallisov test pokazuje da postoji statistički značajna razlika u promatranom parametru između različitih skupina (na razini značajnosti od 5%);

Superoksid dismutaza [$\chi^2 = 22.023$ (7.815), DF = 3, $p < 0.0001$]



Slika 64 – „Box plot“ za SOD

Rezultati post-hoc usporedbi u parovima pomoću Mann-Whitney testa prikazani su na slici 65.



Slika 65 – „Box plotovi“ post-hoc usporedbi u parovima za SOD

Slijedom navedenih grafikona primjetno je statistički značajno povećanje enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) u skupini 4 u kojoj je astaksantin primijenjen 45 minuta od trenutka detorzije (Mdn = 89,61) u odnosu na netretiranu torzijsku detorzijsku skupinu 2 (Mdn = 88,39) ($p = 0,01$) i skupinu 3 u kojoj je astaksantin primijenjen u trenutku detorzije (Mdn = 85,30) ($p = 0,000$). Interesantno je primijetiti i statistički značajni pad enzimske aktivnosti SOD u skupini 3 u odnosu na skupinu 2 ($p = 0,001$) (tablica 46, slika 65).

5.3.4. Vrijednosti enzimskog antioksidansa glutation peroksidaze (GPx)

Izmjerene apsorbancije u 0.,1.,2.,3.,4.,5. i 6. min pomoću spektrofotometra, mikročitača Tecan®;

Tablica 47 – Vrijednosti apsorbancija u 0.,1.,2.,3.,4.,5.,6. min

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	B	B	PK	PK	PK	1A	1A	1A	1B	1B	1B
B	1C	1C	1D	1D	1E	1E	1F	1F	1G	1G	1H	
C	2A	2A	2A	2B	2B	2B	2C	2C	2C	2D	2D	2D
D	2E	2E	2E	2F	2F	2F	2G	2G	2G	2H	2H	2H
E	3A	3A	3A	3B	3B	3B	3C	3C	3C	3D	3D	3D
F	3E	3E	3E	3F	3F	3F	3G	3G	3G	3H	3H	3H
G	4A	4A	4A	4B	4B	4B	4C	4C	4C	4D	4D	4D
H	4E	4E	4E	4F	4F	4F	4G	4G	4G	4H	4H	4H

- 0. min

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,5095	1,4966	1,4694	1,222	1,2489	1,2409	1,2709	1,2455	1,3415	1,2996	1,2986	1,3549
B	1,1484	1,2352	1,3011	1,3283	1,3156	1,2937	1,2791	1,298	1,294	1,334	0,89403	
C	1,215	1,2478	1,3312	1,353	1,2684	1,3453	1,326	1,3538	1,3766	1,3602	1,3919	1,3569
D	1,3499	1,4105	1,4428	1,3864	1,4501	1,4259	1,4013	1,3806	1,362	1,3553	1,3568	1,3776
E	1,3252	1,3821	1,3364	1,404	1,4141	1,3885	1,3592	1,3747	1,4016	1,4268	1,3051	1,3357
F	1,3249	1,3295	1,3935	1,3366	1,3455	1,3846	1,355	1,4005	1,3854	1,3789	1,3359	1,4477
G	1,322	1,3018	1,317	1,3058	1,3177	1,3309	1,3101	1,2969	1,3332	1,3274	1,3281	1,3241
H	1,2876	1,2959	1,3343	1,3266	1,3165	1,371	1,3138	1,3069	1,3349	1,3043	1,3928	1,3298

- 1. min

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,4723	1,449	1,4306	1,1706	1,2059	1,2021	1,2313	1,2015	1,2797	1,2348	1,2402	1,2728
B	1,105	1,1864	1,2432	1,2622	1,2628	1,2412	1,2328	1,2511	1,2431	1,2957	0,86569	
C	1,1866	1,2192	1,2995	1,3104	1,2309	1,3023	1,2856	1,3022	1,3291	1,3114	1,3488	1,3084
D	1,3008	1,3647	1,3929	1,3438	1,4038	1,3834	1,339	1,3274	1,3165	1,3147	1,3181	1,3193
E	1,2964	1,3453	1,3048	1,3676	1,373	1,344	1,3213	1,3282	1,3883	1,3668	1,3049	1,3222
F	1,2872	1,2958	1,3606	1,3026	1,3017	1,3394	1,3045	1,3639	1,3419	1,3338	1,3264	1,4078
G	1,2798	1,2586	1,2679	1,263	1,2726	1,2786	1,2358	1,2288	1,2708	1,2782	1,2771	1,2785
H	1,2262	1,2305	1,2726	1,2742	1,2692	1,3142	1,2539	1,2507	1,2665	1,2775	1,3303	1,2774

- 2. min

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,454	1,4313	1,4156	1,1197	1,1551	1,1516	1,1826	1,1538	1,2327	1,1785	1,1817	1,1755
B	1,0568	1,1356	1,1832	1,2093	1,2084	1,1803	1,1828	1,1999	1,2069	1,2545	0,8346	
C	1,149	1,1796	1,2599	1,2631	1,1813	1,2543	1,2245	1,2542	1,2874	1,2496	1,303	1,2547
D	1,2529	1,3206	1,3439	1,3021	1,3598	1,3334	1,2817	1,278	1,2733	1,2798	1,2788	1,2692
E	1,262	1,3091	1,2694	1,33	1,3233	1,2976	1,2868	1,2832	1,3468	1,3047	1,2877	1,2835
F	1,2525	1,2626	1,329	1,2697	1,2696	1,2928	1,2683	1,3307	1,2899	1,2927	1,3043	1,3623
G	1,2336	1,2136	1,2234	1,218	1,2262	1,2291	1,1659	1,1638	1,2106	1,2219	1,2281	1,2321
H	1,1668	1,1658	1,2142	1,224	1,2199	1,2616	1,2051	1,1986	1,2111	1,2308	1,2781	1,2281

- 3. min

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,4378	1,4146	1,402	1,0685	1,1044	1,1009	1,1332	1,1061	1,1839	1,1159	1,1221	1,1239
B	1,0064	1,0853	1,1235	1,1515	1,1525	1,1193	1,1306	1,1452	1,153	1,2004	0,80374	
C	1,1116	1,1432	1,2213	1,2163	1,1329	1,2056	1,1782	1,2162	1,2495	1,1958	1,2538	1,2086
D	1,1815	1,2755	1,2938	1,2574	1,3136	1,285	1,2313	1,2269	1,2315	1,2406	1,2421	1,2316
E	1,2277	1,2723	1,2351	1,2886	1,2755	1,2573	1,2552	1,2425	1,2895	1,2512	1,2578	1,2441
F	1,2149	1,2293	1,2964	1,2368	1,2368	1,2543	1,2358	1,2967	1,2527	1,2595	1,276	1,3239
G	1,1882	1,1702	1,179	1,1735	1,1805	1,1832	1,1058	1,1035	1,1544	1,1681	1,1803	1,1842
H	1,1042	1,1004	1,1589	1,172	1,1697	1,2084	1,1558	1,1477	1,1611	1,1845	1,2282	1,1825

- 4. min

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,4166	1,4009	1,3889	1,0157	1,05	1,0496	1,0829	1,0574	1,1341	1,0534	1,062	1,0769
B	0,95518	1,0341	1,0644	1,094	1,0982	1,0612	1,0764	1,0911	1,0967	1,1387	0,77213	
C	1,0758	1,1057	1,1827	1,1688	1,0842	1,1573	1,1413	1,1803	1,2147	1,1517	1,1997	1,1638
D	1,1316	1,2273	1,2436	1,2118	1,2674	1,2424	1,167	1,175	1,1907	1,2023	1,2046	1,1934
E	1,194	1,2362	1,2025	1,2529	1,2394	1,2255	1,2243	1,2093	1,2421	1,2131	1,2248	1,2093
F	1,1779	1,1961	1,2645	1,2024	1,2035	1,2177	1,2043	1,2634	1,222	1,2316	1,2477	1,2886
G	1,1434	1,1298	1,1351	1,1277	1,1329	1,1367	1,0478	1,0444	1,0981	1,1182	1,1328	1,1337
H	1,0421	1,0363	1,1033	1,1204	1,1211	1,155	1,1075	1,0983	1,1106	1,1366	1,1784	1,1349

- 5. min

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,4007	1,3939	1,3738	0,96013	0,9963	0,99678	1,0325	1,0073	1,0836	0,99147	1,0014	1,0262
B	0,90451	0,98354	1,0059	1,0373	1,0453	1,0053	1,0196	1,0403	1,0408	1,0793	0,74176	
C	1,0418	1,0667	1,143	1,1211	1,0336	1,1087	1,1056	1,1452	1,1801	1,1083	1,1435	1,1174
D	1,0815	1,1799	1,194	1,1664	1,2213	1,2006	1,1204	1,1219	1,1489	1,1623	1,1663	1,154
E	1,16	1,1965	1,1678	1,2187	1,2063	1,1937	1,1933	1,1792	1,2088	1,1806	1,1909	1,1767
F	1,1398	1,1623	1,2317	1,1691	1,1711	1,1821	1,1752	1,2289	1,1927	1,2031	1,2176	1,2575
G	1,095	1,0902	1,0911	1,0816	1,0865	1,0905	0,99101	0,98629	1,0422	1,0684	1,0844	1,0816
H	0,98125	0,97111	1,0463	1,0678	1,0706	1,0713	1,0573	1,048	1,0609	1,0897	1,1286	1,086

- 6. min

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,3799	1,37	1,3514	0,90486	0,94201	0,94244	0,98302	0,95849	1,0347	0,93051	0,94153	0,97309
B	0,85481	0,93425	0,94838	0,982	0,99294	0,95046	0,96383	0,98923	0,98624	1,0255	0,71038	
C	1,0074	1,0274	1,1036	1,0739	0,98449	1,0605	1,0701	1,1099	1,1458	1,0661	1,0937	1,0715
D	1,0313	1,1326	1,1438	1,1215	1,176	1,1594	1,0746	1,0714	1,1094	1,1261	1,1296	1,1158
E	1,123	1,1591	1,1333	1,1861	1,1713	1,1626	1,1628	1,1487	1,1775	1,148	1,1574	1,1424
F	1,1025	1,1286	1,1988	1,1345	1,1379	1,147	1,1462	1,1948	1,1632	1,1751	1,189	1,2281
G	1,0506	1,0476	1,0475	1,036	1,0419	1,0447	0,93451	0,92854	0,98774	1,0198	1,0362	1,0295
H	0,92115	0,90754	0,98952	1,0162	1,0223	1,021	1,008	0,9977	1,0105	1,0422	1,0789	1,039

Iz dobivenih vrijednosti apsorbancija u triplicatima izračunate su srednje vrijednosti apsorbancija;

Tablica 48 – Srednje vrijednosti apsorbancija u 0.,1.,2.,3.,4.,5. i 6. min

- 0. min

1,483	1A	1,286	2A	1,264	3A	1,347	4A	1,313
1,237	1B	1,317	2B	1,322	3B	1,402	4B	1,318
	1C	1,191	2C	1,352	3C	1,378	4C	1,313
	1D	1,314	2D	1,369	3D	1,355	4D	1,326
	1E	1,304	2E	1,401	3E	1,349	4E	1,305
	1F	1,288	2F	1,420	3F	1,355	4F	1,338
	1G	1,314	2G	1,381	3G	1,380	4G	1,318
	1H	0,894	2H	1,363	3H	1,387	4H	1,342

- 1. min

1,450	1A	1,237	2A	1,235	3A	1,315	4A	1,268
1,192	1B	1,249	2B	1,281	3B	1,361	4B	1,271
	1C	1,145	2C	1,305	3C	1,346	4C	1,245
	1D	1,252	2D	1,322	3D	1,331	4D	1,277
	1E	1,252	2E	1,352	3E	1,314	4E	1,243
	1F	1,242	2F	1,377	3F	1,314	4F	1,285
	1G	1,269	2G	1,327	3G	1,336	4G	1,257
	1H	0,865	2H	1,317	3H	1,356	4H	1,295

- 2. min

1,433	1A	1,189	2A	1,196	3A	1,280	4A	1,223
1,142	1B	1,178	2B	1,232	3B	1,317	4B	1,224
	1C	1,096	2C	1,255	3C	1,305	4C	1,180
	1D	1,196	2D	1,269	3D	1,292	4D	1,227
	1E	1,194	2E	1,305	3E	1,281	4E	1,182
	1F	1,191	2F	1,331	3F	1,277	4F	1,235
	1G	1,230	2G	1,277	3G	1,296	4G	1,204
	1H	0,834	2H	1,275	3H	1,319	4H	1,245

- 3. min

1,418	1A	1,141	2A	1,158	3A	1,245	4A	1,179
1,091	1B	1,178	2B	1,184	3B	1,273	4B	1,179
	1C	1,096	2C	1,214	3C	1,262	4C	1,121
	1D	1,196	2D	1,219	3D	1,251	4D	1,177
	1E	1,194	2E	1,250	3E	1,246	4E	1,121
	1F	1,191	2F	1,285	3F	1,242	4F	1,183
	1G	1,230	2G	1,229	3G	1,261	4G	1,154
	1H	0,834	2H	1,238	3H	1,286	4H	1,198

- 4. min

1,402	1A	1,091	2A	1,121	3A	1,210	4A	1,136
1,038	1B	1,120	2B	1,136	3B	1,239	4B	1,132
	1C	1,045	2C	1,178	3C	1,225	4C	1,063
	1D	1,137	2D	1,171	3D	1,215	4D	1,128
	1E	1,135	2E	1,200	3E	1,212	4E	1,060
	1F	1,137	2F	1,240	3F	1,207	4F	1,132
	1G	1,176	2G	1,177	3G	1,229	4G	1,105
	1H	0,803	2H	1,200	3H	1,256	4H	1,15

- 5. min

1,389	1A	1,041	2A	1,083	3A	1,174	4A	1,092
0,984	1B	1,064	2B	1,087	3B	1,206	4B	1,086
	1C	0,994	2C	1,143	3C	1,193	4C	1,006
	1D	1,079	2D	1,123	3D	1,182	4D	1,078
	1E	1,079	2E	1,151	3E	1,177	4E	0,999
	1F	1,083	2F	1,196	3F	1,174	4F	1,069
	1G	1,117	2G	1,130	3G	1,198	4G	1,055
	1H	0,772	2H	1,160	3H	1,226	4H	1,101

- 6. min

1,367	1A	0,992	2A	1,046	3A	1,138	4A	1,048
0,929	1B	0,948	2B	1,039	3B	1,173	4B	1,040
	1C	0,894	2C	1,108	3C	1,163	4C	0,950
	1D	0,965	2D	1,077	3D	1,149	4D	1,028
	1E	0,971	2E	1,102	3E	1,143	4E	0,939
	1F	0,976	2F	1,152	3F	1,139	4F	1,019
	1G	1,005	2G	1,085	3G	1,168	4G	1,005
	1H	0,710	2H	1,123	3H	1,197	4H	1,053

Potom su oduzete srednje vrijednosti apsorbancija kako bi se dobile razlike srednjih vrijednosti apsorbancija između 0. i 1. min, 1. i 2. min, 2. i 3. min, 3. i 4. min, 4. i 5. min, 5. i 6. min;

Tablica 49 – Razlike srednjih vrijednosti apsorbancija između 0. i 1. min, 1. i 2. min, 2. i 3. min, 3. i 4. min, 4. i 5. min, 5. i 6. min;

- $\Delta A_{340}/\text{min}$ (0-1)

0,0324	1A	0,0485	2A	0,0296	3A	0,0324	4A	0,0448
0,0444	1B	0,0684	2B	0,041	3B	0,0407	4B	0,0467
	1C	0,0461	2C	0,0465	3C	0,0325	4C	0,0683
	1D	0,062	2D	0,0468	3D	0,0246	4D	0,0486
	1E	0,0526	2E	0,0483	3E	0,0348	4E	0,0628
	1F	0,0466	2F	0,0438	3F	0,0411	4F	0,0521
	1G	0,0446	2G	0,0537	3G	0,0435	4G	0,0615
	1H	0,02834	2H	0,0458	3H	0,0315	4H	0,0472

- $\Delta A_{340}/\text{min}$ (1-2)

0,017	1A	0,0478	2A	0,0389	3A	0,0353	4A	0,0453
0,0507	1B	0,0707	2B	0,0483	3B	0,0445	4B	0,047
	1C	0,0495	2C	0,0502	3C	0,0404	4C	0,065
	1D	0,0565	2D	0,0538	3D	0,0393	4D	0,0506
	1E	0,0577	2E	0,047	3E	0,0332	4E	0,0609
	1F	0,0507	2F	0,0452	3F	0,0372	4F	0,0507
	1G	0,0387	2G	0,0499	3G	0,0405	4G	0,0521
	1H	0,0310	2H	0,0415	3H	0,0362	4H	0,0494

- $\Delta A_{340}/\text{min}$ (2-3)

0,0155	1A	0,0487	2A	0,0375	3A	0,0352	4A	0,0444
0,0509	1B	0,058	2B	0,048	3B	0,0432	4B	0,0454
	1C	0,0504	2C	0,0408	3C	0,0432	4C	0,0589
	1D	0,0587	2D	0,0497	3D	0,041	4D	0,0498
	1E	0,0584	2E	0,0555	3E	0,0344	4E	0,0611
	1F	0,0534	2F	0,0465	3F	0,0347	4F	0,0518
	1G	0,054	2G	0,0478	3G	0,0345	4G	0,05
	1H	0,0308	2H	0,0378	3H	0,0333	4H	0,0473

- $\Delta A_{340}/\text{min}$ (3-4)

0,016	1A	0,0495	2A	0,0373	3A	0,0341	4A	0,043
0,0529	1B	0,0565	2B	0,0481	3B	0,0345	4B	0,0466
	1C	0,05115	2C	0,0359	3C	0,0372	4C	0,0578
	1D	0,0583	2D	0,0477	3D	0,0319	4D	0,0493
	1E	0,0562	2E	0,0495	3E	0,0341	4E	0,0605
	1F	0,0541	2F	0,0448	3F	0,0347	4F	0,0512
	1G	0,059	2G	0,0523	3G	0,0319	4G	0,0495
	1H	0,03161	2H	0,038	3H	0,0305	4H	0,0484

- $\Delta A_{340}/\text{min}$ (4-5)

0,0126	1A	0,0504	2A	0,0376	3A	0,0361	4A	0,044
0,054	1B	0,0577	2B	0,049	3B	0,0331	4B	0,0462
	1C	0,05062	2C	0,0351	3C	0,0314	4C	0,0569
	1D	0,0576	2D	0,0486	3D	0,033	4D	0,0501
	1E	0,0544	2E	0,049	3E	0,0349	4E	0,0610
	1F	0,0539	2F	0,0444	3F	0,0338	4F	0,0623
	1G	0,0577	2G	0,0472	3G	0,031	4G	0,05
	1H	0,0303	2H	0,0392	3H	0,0299	4H	0,0486

- $\Delta A_{340}/\text{min}$ (5-6)

0,0224	1A	0,04902	2A	0,0377	3A	0,0363	4A	0,0435
0,0546	1B	0,05802	2B	0,0482	3B	0,0329	4B	0,0453
	1C	0,0495	2C	0,035	3C	0,0308	4C	0,05623
	1D	0,0564	2D	0,046	3D	0,0334	4D	0,0496
	1E	0,0536	2E	0,0492	3E	0,0346	4E	0,0601
	1F	0,0533	2F	0,0438	3F	0,0343	4F	0,050
	1G	0,0541	2G	0,0453	3G	0,0308	4G	0,05
	1H	0,03138	2H	0,0371	3H	0,0287	4H	0,048

Od razlika srednjih vrijednosti apsorbancija oduzet je blank;

Tablica 50 – Vrijednosti razlika srednjih vrijednosti apsorbancija i slijepih proba

- $\Delta A_{340}/\text{min}$ (0-1) - B

0	1A	0,0161	2A	0,0028	3A	0	4A	0,0124
0,012	1B	0,036	2B	0,0086	3B	0,0083	4B	0,0143
	1C	0,0137	2C	0,0141	3C	1E-04	4C	0,0359
	1D	0,0296	2D	0,0144	3D	0,0078	4D	0,0162
	1E	0,0202	2E	0,0159	3E	0,0024	4E	0,0304
	1F	0,0142	2F	0,0114	3F	0,0087	4F	0,0197
	1G	0,0122	2G	0,0213	3G	0,0111	4G	0,0291
	1H	0,0040	2H	0,0134	3H	0,0009	4H	0,0148

- $\Delta A_{340}/\text{min}$ (1-2) - B

0	1A	0,0308	2A	0,0219	3A	0,0183	4A	0,0283
0,0337	1B	0,0537	2B	0,0313	3B	0,0275	4B	0,03
	1C	0,0325	2C	0,0332	3C	0,0234	4C	0,048
	1D	0,0395	2D	0,0368	3D	0,0223	4D	0,0336
	1E	0,0407	2E	0,03	3E	0,0162	4E	0,0439
	1F	0,0337	2F	0,0282	3F	0,0202	4F	0,0337
	1G	0,0217	2G	0,0329	3G	0,0235	4G	0,0351
	1H	0,0140	2H	0,0245	3H	0,0192	4H	0,0324

- $\Delta A_{340}/\text{min}$ (2-3) - B

0	1A	0,0332	2A	0,022	3A	0,0197	4A	0,0289
0,0354	1B	0,0425	2B	0,0325	3B	0,0277	4B	0,0299
	1C	0,0349	2C	0,0253	3C	0,0277	4C	0,0434
	1D	0,0432	2D	0,0342	3D	0,0255	4D	0,0343
	1E	0,0429	2E	0,04	3E	0,0189	4E	0,0456
	1F	0,0379	2F	0,031	3F	0,0192	4F	0,0363
	1G	0,0385	2G	0,0323	3G	0,019	4G	0,0345
	1H	0,01536	2H	0,0223	3H	0,0178	4H	0,0318

- $\Delta A_{340}/\text{min}$ (3-4) - B

0	1A	0,0335	2A	0,0213	3A	0,0181	4A	0,027
0,0369	1B	0,0405	2B	0,0321	3B	0,0185	4B	0,0306
	1C	0,03515	2C	0,0199	3C	0,0212	4C	0,0418
	1D	0,0423	2D	0,0317	3D	0,0193	4D	0,0333
	1E	0,0402	2E	0,0335	3E	0,0181	4E	0,0445
	1F	0,0381	2F	0,0288	3F	0,0187	4F	0,0352
	1G	0,043	2G	0,0363	3G	0,0159	4G	0,0335
	1H	0,0156	2H	0,022	3H	0,0145	4H	0,0324

- $\Delta A_{340}/\text{min}$ (4-5) - B

0	1A	0,0378	2A	0,025	3A	0,0235	4A	0,0314
0,0414	1B	0,0451	2B	0,0364	3B	0,0205	4B	0,0336
	1C	0,03802	2C	0,0225	3C	0,0188	4C	0,0443
	1D	0,045	2D	0,036	3D	0,0204	4D	0,0375
	1E	0,0418	2E	0,0364	3E	0,0223	4E	0,04845
	1F	0,0413	2F	0,0318	3F	0,0212	4F	0,0497
	1G	0,0451	2G	0,0346	3G	0,0184	4G	0,0374
	1H	0,01777	2H	0,0266	3H	0,0173	4H	0,036

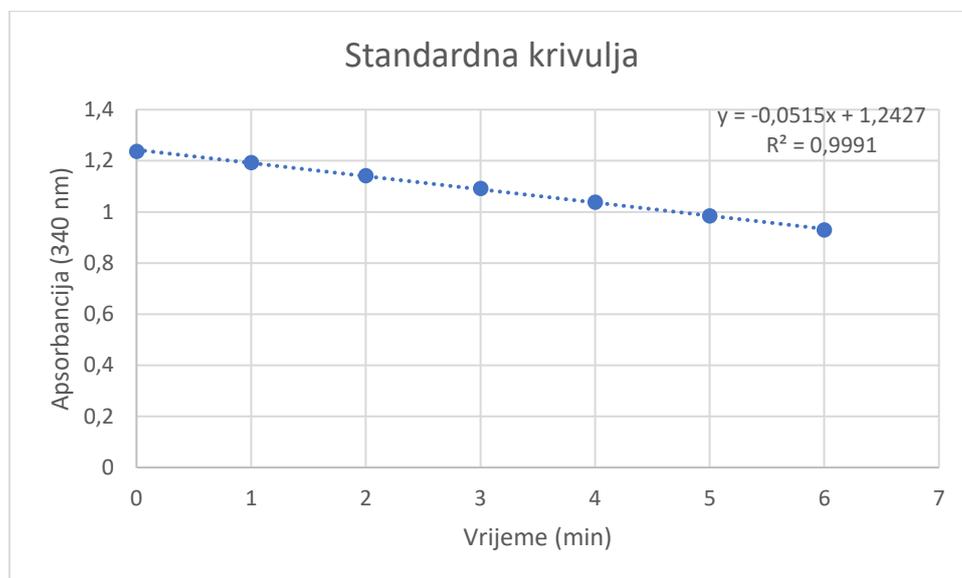
- $\Delta A_{340}/\text{min}$ (5-6) - B

0	1A	0,02662	2A	0,0153	3A	0,0139	4A	0,0211
0,03223	1B	0,03562	2B	0,0258	3B	0,0105	4B	0,0229
	1C	0,0271	2C	0,0126	3C	0,0084	4C	0,03383
	1D	0,03401	2D	0,0236	3D	0,011	4D	0,0272
	1E	0,0312	2E	0,0268	3E	0,0122	4E	0,03774
	1F	0,03097	2F	0,0214	3F	0,0119	4F	0,0277
	1G	0,0317	2G	0,0229	3G	0,0084	4G	0,0276
	1H	0,00898	2H	0,0147	3H	0,0063	4H	0,0256

Iz srednjih vrijednosti apsorbancija PK dobivena je standardna krivulja;

Tablica 51 – Vrijednosti apsorbancija pozitivnih kontrola (0.-6. min)

X os – vrijeme (min)	0	1	2	3	4	5	6
Y os (apsorbancija pri 340 nm)	1,2373	1,1929	1,1422	1,0913	1,0384	0,9844	0,92977



Slika 66 – Standardna krivulja

GPx aktivnost u uzorku (nmol/min/ml) određena je iz formule;

$$\text{GPx Activity} = \frac{\Delta A_{340} / \text{min.}}{0.00373 \mu\text{M}^{-1}} \times \frac{0.19 \text{ ml}}{0.02 \text{ ml}} \times \text{Sample dilution} = \text{nmol/min/ml}$$

- razrjeđenje uzorka: 2

Tablica 52 – Vrijednosti GPx aktivnosti u 1.,2.,3.,4.,5. i 6. min

- GPx aktivnost u 1. min

1A	82,01072	2A	14,2627	3A	0	4A	63,16354
1B	183,37	2B	43,8069	3B	42,27882	4B	72,84182
1C	69,78552	2C	71,82306	3C	0,509383	4C	182,8686
1D	150,7775	2D	73,35121	3D	39,7319	4D	82,52011
1E	102,8954	2E	80,99196	3E	12,2252	4E	154,8525
1F	72,33244	2F	58,06971	3F	44,31635	4F	100,3485
1G	62,14477	2G	108,4987	3G	56,54155	4G	148,2306
1H	20,681	2H	68,25737	3H	4,58445	4H	75,38874

- GPx aktivnost u 2. min

1A	156,8901	2A	111,555	3A	93,21716	4A	144,1555
1B	273,5389	2B	159,437	3B	140,0804	4B	152,815
1C	165,5496	2C	169,1153	3C	119,1957	4C	244,504
1D	201,2064	2D	187,4531	3D	113,5925	4D	171,1528
1E	207,319	2E	152,815	3E	82,52011	4E	223,6193
1F	171,6622	2F	143,6461	3F	102,8954	4F	171,6622
1G	110,5362	2G	167,5871	3G	119,7051	4G	178,7936
1H	71,77212	2H	124,7989	3H	97,80161	4H	165,0402

- GPx aktivnost u 3. min

1A	169,1153	2A	112,0643	3A	100,3485	4A	147,2118
1B	216,4879	2B	165,5496	3B	141,0992	4B	152,3056
1C	177,7748	2C	128,874	3C	141,0992	4C	221,0724
1D	220,0536	2D	174,2091	3D	129,8928	4D	174,7185
1E	218,5255	2E	203,7534	3E	96,27346	4E	232,2788
1F	193,0563	2F	157,9088	3F	97,80161	4F	184,9062
1G	196,1126	2G	164,5308	3G	96,78284	4G	175,7373
1H	78,24129	2H	113,5925	3H	90,67024	4H	161,9839

- GPx aktivnost u 4. min

1A	170,6434	2A	108,4987	3A	92,19839	4A	137,5335
1B	206,3003	2B	163,5121	3B	94,23592	4B	155,8713
1C	179,0483	2C	101,3673	3C	107,9893	4C	212,9223
1D	215,4692	2D	161,4745	3D	98,31099	4D	169,6247
1E	204,7721	2E	170,6434	3E	92,19839	4E	226,6756
1F	194,0751	2F	146,7024	3F	95,25469	4F	179,3029
1G	219,0349	2G	184,9062	3G	80,99196	4G	170,6434
1H	79,51475	2H	112,0643	3H	73,86059	4H	165,0402

- GPx aktivnost u 5. min

1A	192,5469	2A	127,3458	3A	119,7051	4A	159,9464
1B	229,7319	2B	185,4155	3B	104,4236	4B	171,1528
1C	193,6676	2C	114,6113	3C	95,76408	4C	225,6568
1D	229,2225	2D	183,378	3D	103,9142	4D	191,0188
1E	212,9223	2E	185,4155	3E	113,5925	4E	246,7962
1F	210,3753	2F	161,9839	3F	107,9893	4F	253,1635
1G	229,7319	2G	176,2466	3G	93,72654	4G	190,5094
1H	90,51743	2H	135,496	3H	88,12332	4H	183,378

- GPx aktivnost u 6. min

1A	135,5979	2A	77,93566	3A	70,80429	4A	107,4799
1B	181,4424	2B	131,4209	3B	53,48525	4B	116,6488
1C	138,0429	2C	64,18231	3C	42,7882	4C	172,3244
1D	173,2413	2D	120,2145	3D	56,03217	4D	138,5523
1E	158,9276	2E	136,5147	3E	62,14477	4E	192,2413
1F	157,756	2F	109,008	3F	60,61662	4F	141,0992
1G	161,4745	2G	116,6488	3G	42,7882	4G	140,5898
1H	45,74263	2H	74,87936	3H	32,09115	4H	130,4021

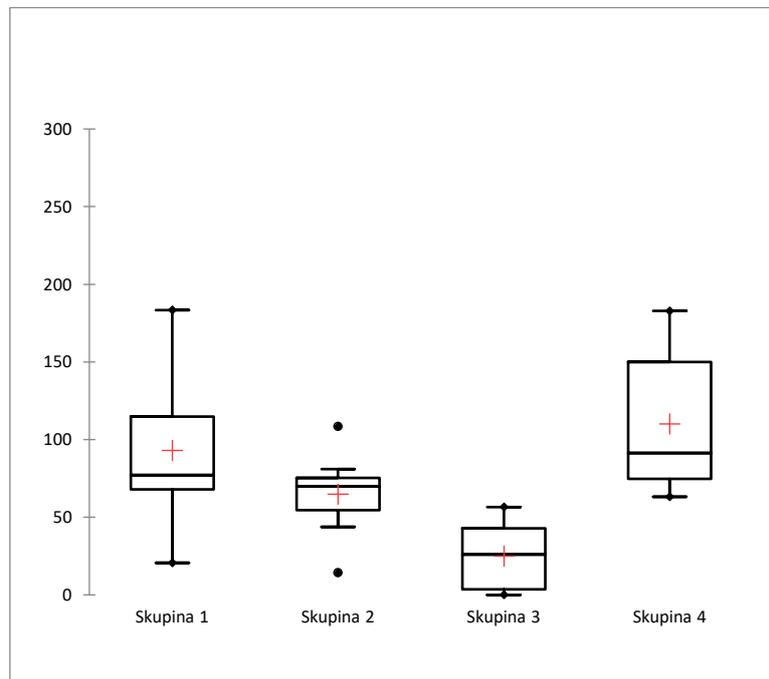
Vrijednosti medijana i interkvartilnih raspona po skupinama za GPx aktivnost u 1. minuti prikazane su u tablici 53.

Tablica 53 – Vrijednosti medijana, Q1, Q3 i interkvartilnih raspona po skupinama za GPx aktivnost u 1. minuti

	GPx aktivnost u 1. min			
	Mdn	Q1	Q3	IQR
Skupina 1	77,172	67,875	114,866	46,991
Skupina 2	70,040	54,504	75,261	20,757
Skupina 3	25,979	3,566	42,788	39,222
Skupina 4	91,434	74,752	149,886	75,134

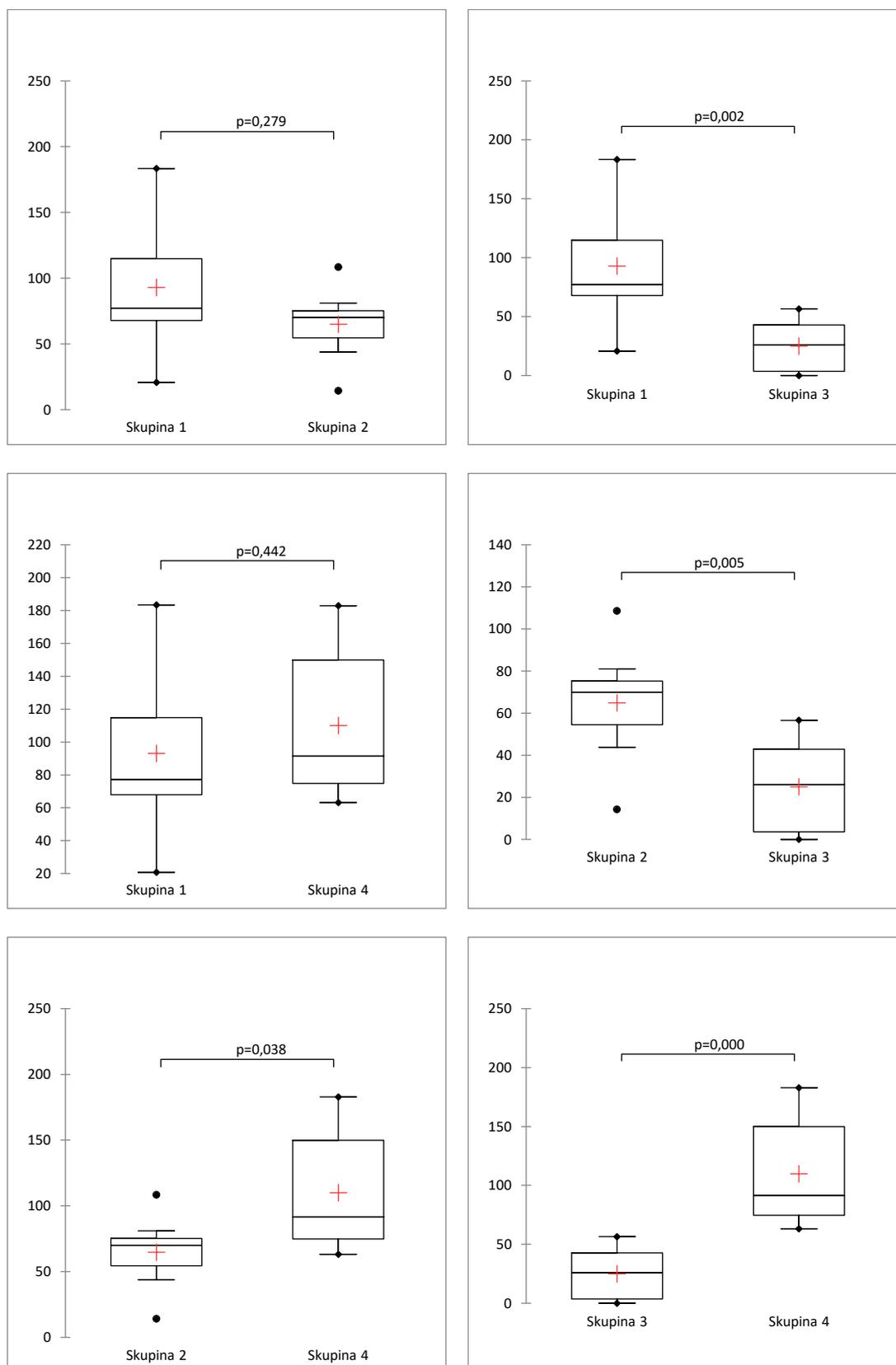
Kruskal-Wallisov test pokazuje da postoji statistički značajna razlika u promatranom parametru između različitih skupina (na razini značajnosti od 5%);

GPx (1. min) [$\chi^2 = 17.020$ (7.815), DF = 3, p=0.001]



Slika 67 – „Box plot“ za GPx aktivnost u 1. minuti

Rezultati post-hoc usporedbi u parovima pomoću Mann-Whitney testa za GPx aktivnost u 1. minuti prikazani su na slici 68.



Slika 68 – „Box plotovi“ post-hoc usporedbi u parovima za GPx aktivnost u 1. minuti

Slijedom navedenih grafikona primjetno je statistički značajno povećanje enzimske aktivnosti glutation peroksidaze (GPx) u prvoj minuti, u skupini u kojoj je astaksantin primijenjen 45 minuta od trenutka detorzije (Mdn = 91,43) u odnosu na netretiranu torzijsku detorzijsku skupinu (Mdn = 70,04) i skupinu u kojoj je astaksantin primijenjen u trenutku detorzije (Mdn = 25,98) [p (skupina 2/4) = 0,038, p (skupina 3/4) = 0,000]. Također je interesantno primijetiti statistički značajan pad enzimske aktivnosti GPx u skupini 3 u odnosu na skupinu 2 (p = 0,005) (tablica 53, slika 68).

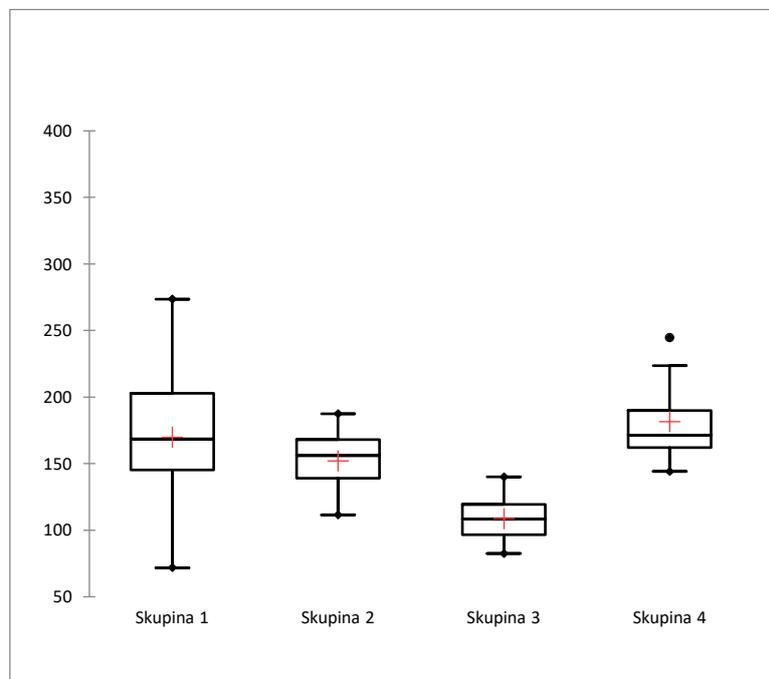
Vrijednosti medijana i interkvartilnih raspona po skupinama za GPx aktivnost u 2. minuti prikazane su u tablici 54.

Tablica 54 – Vrijednosti medijana, Q1, Q3 i interkvartilnih raspona po skupinama za GPx aktivnost u 2. minuti

	GPx aktivnost u 2. min			
	Mdn	Q1	Q3	IQR
Skupina 1	168,606	145,302	202,735	57,433
Skupina 2	156,126	138,934	167,969	29,035
Skupina 3	108,244	96,655	119,323	22,668
Skupina 4	171,408	161,984	190,000	28,016

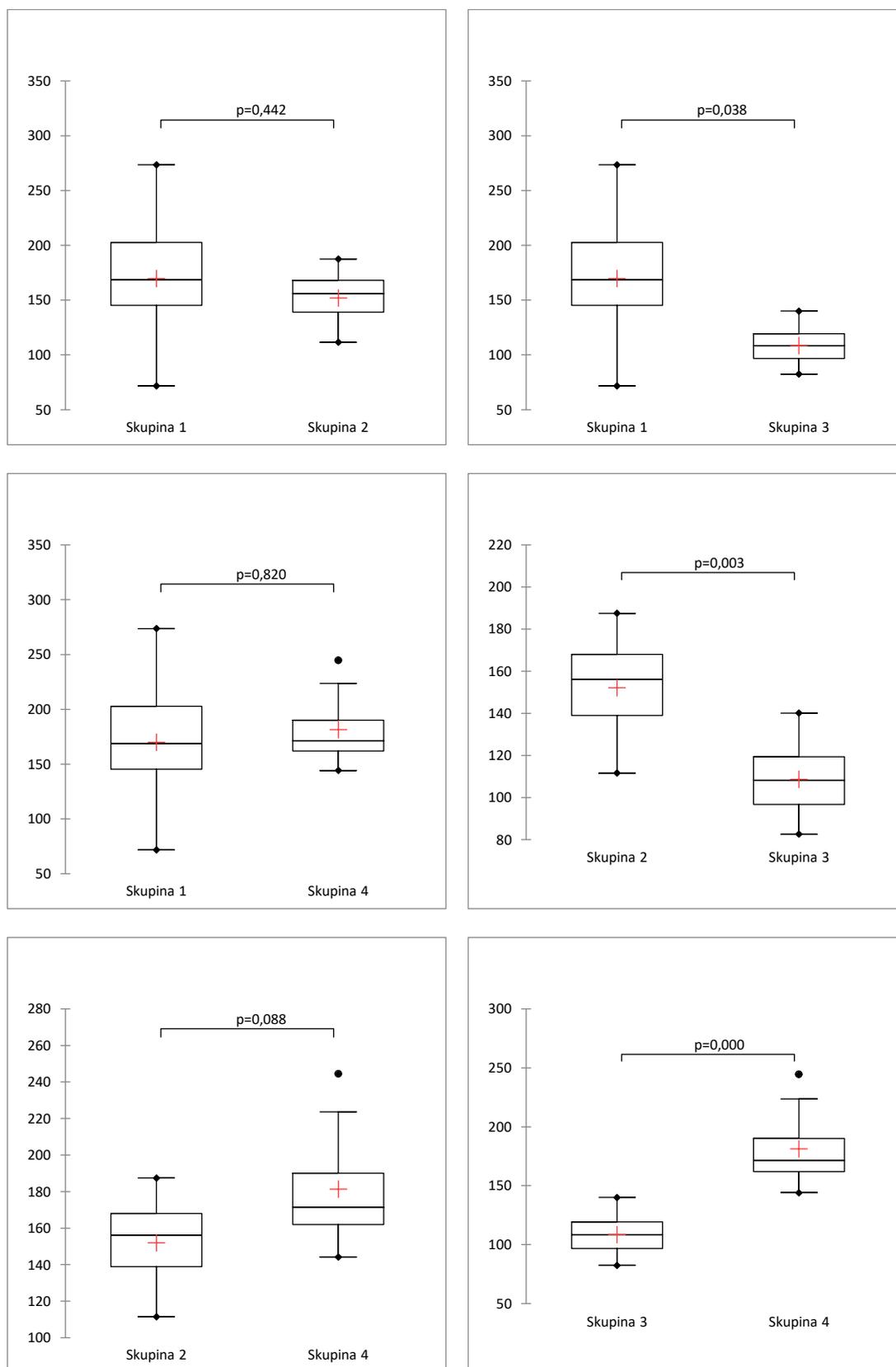
Kruskal-Wallisov test pokazuje da postoji statistički značajna razlika u promatranom parametru između različitih skupina (na razini značajnosti od 5%);

GPx (2. min) [$\chi^2 = 13.497$ (7.815), DF = 3, p=0.004]



Slika 69 – „Box plot“ za GPx aktivnost u 2. minuti

Rezultati post-hoc usporedbi u parovima pomoću Mann-Whitney testa za GPx aktivnost u 2. minuti prikazani su na slici 70.



Slika 70 – „Box plotovi“ post-hoc usporedbi u parovima za GPx aktivnost u 2. minuti

Slijedom navedenih grafikona primjetno je povećanje enzimske aktivnosti glutathion peroksidaze (GPx) u drugoj minuti, u skupini u kojoj je astaksantin primijenjen 45 minuta od trenutka detorzije (Mdn = 171,41) u odnosu na netretiranu torzijsku skupinu (Mdn = 156,13) i skupinu u kojoj je astaksantin primijenjen u trenutku detorzije (Mdn = 108,21) [p (skupina 2/4) = 0,088, p (skupina 3/4) = 0,000]. Također je interesantno primijetiti statistički značajan pad enzimske aktivnosti GPx u skupini 3 u odnosu na skupinu 2 (p = 0,003) (tablica 54, slika 70).

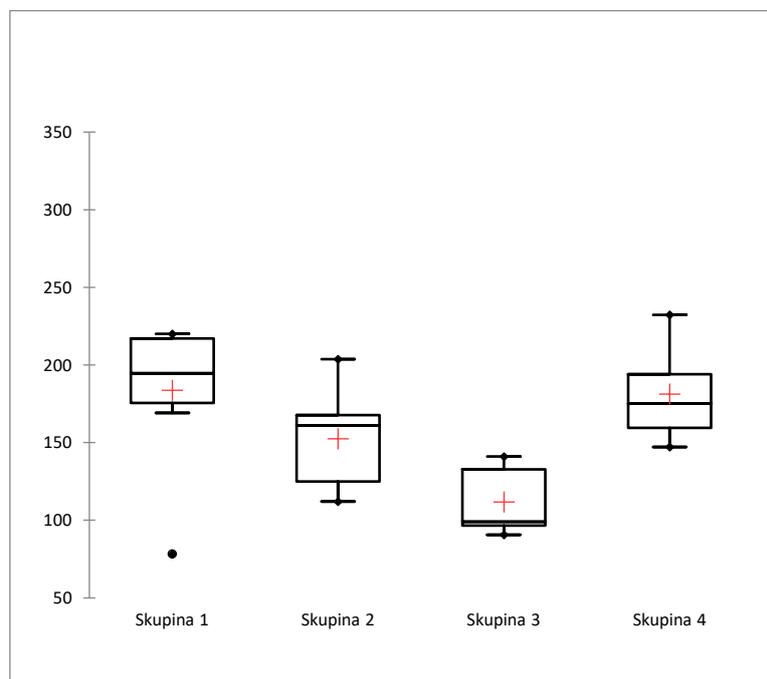
Vrijednosti medijana i interkvartilnih raspona po skupinama za GPx aktivnost u 3. minuti prikazane su u tablici 55.

Tablica 55 – Vrijednosti medijana, Q1, Q3 i interkvartilnih raspona po skupinama za GPx aktivnost u 3. minuti

	GPx aktivnost u 3. min			
	Mdn	Q1	Q3	IQR
Skupina 1	194,584	175,610	216,997	41,387
Skupina 2	161,220	125,054	167,714	42,66
Skupina 3	99,075	96,655	132,694	36,039
Skupina 4	175,228	159,564	193,948	34,384

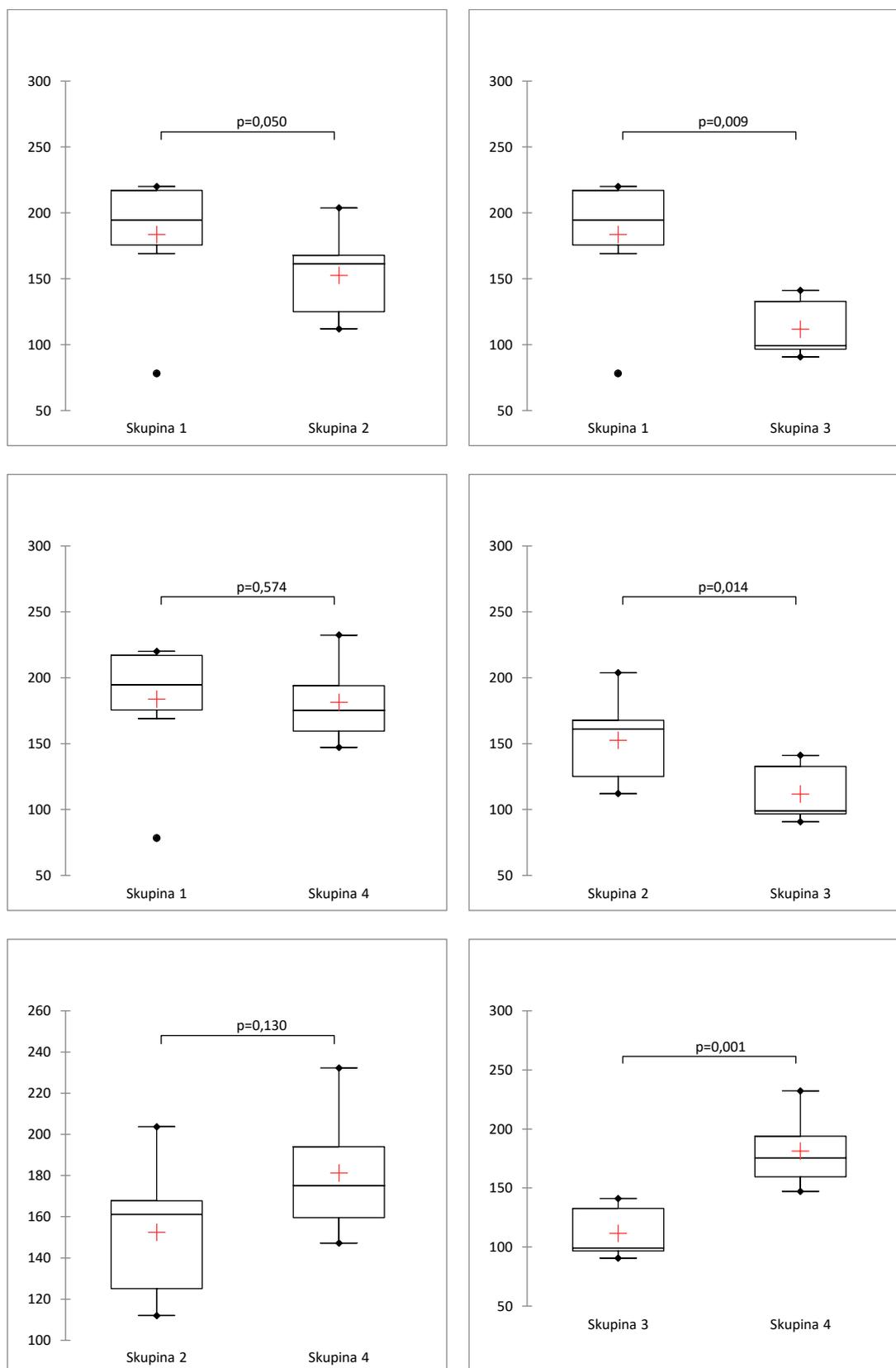
Kruskal-Wallisov test pokazuje da postoji statistički značajna razlika u promatranom parametru između različitih skupina (na razini značajnosti od 5%);

GPx (3. min) [$\chi^2 = 14.838$ (7.815), DF = 3, p=0.002]



Slika 71 – „Box plot“ za GPx aktivnost u 3. minuti

Rezultati post-hoc usporedbi u parovima pomoću Mann-Whitney testa za GPx aktivnost u 3. minuti prikazani su na slici 72.



Slika 72 – „Box plotovi“ post-hoc usporedbi u parovima za GPx aktivnost u 3. minuti

Slijedom navedenih grafikona primjetno je povećanje enzimske aktivnosti glutathion peroksidaze (GPx) u trećoj minuti, u skupini u kojoj je astaksantin primijenjen 45 minuta od trenutka detorzije (Mdn = 175,23) u odnosu na netretiranu torzijsko detorzijsku skupinu (Mdn = 161,22) i skupinu u kojoj je astaksantin primijenjen u trenutku detorzije (Mdn = 99,08) [p (skupina 2/4) = 0,130, p (skupina 3/4) = 0,001]. Također je interesantno primijetiti statistički značajan pad enzimske aktivnosti GPx u skupini 3 u odnosu na skupinu 2 (p = 0,014) (tablica 55, slika 72).

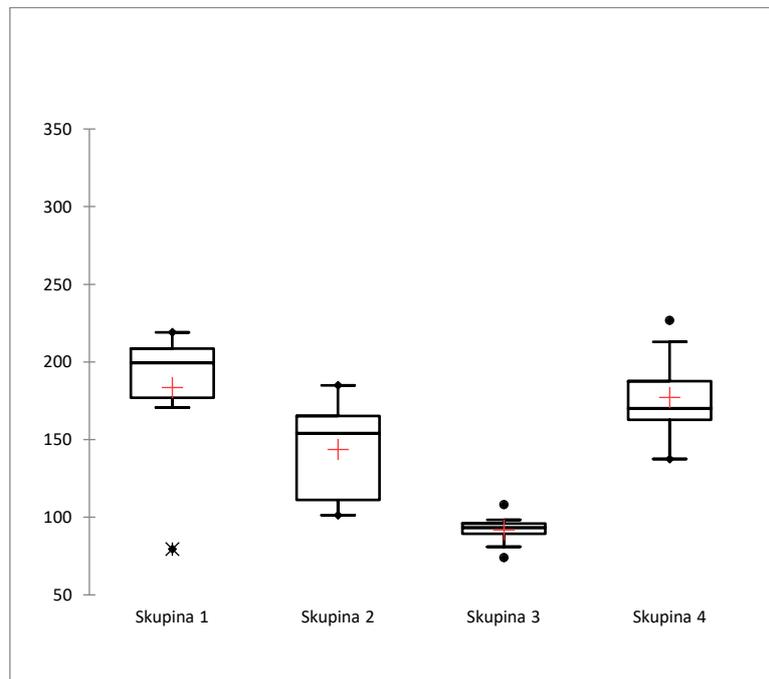
Vrijednosti medijana i interkvartilnih raspona po skupinama za GPx aktivnost u 4. minuti prikazane su u tablici 56.

Tablica 56 – Vrijednosti medijana, Q1, Q3 i interkvartilnih raspona po skupinama za GPx aktivnost u 4. minuti

	GPx aktivnost u 4. min			
	Mdn	Q1	Q3	IQR
Skupina 1	199,424	176,947	208,593	31,646
Skupina 2	154,088	111,173	165,295	54,122
Skupina 3	93,217	89,397	96,019	6,622
Skupina 4	170,134	162,748	187,708	24,96

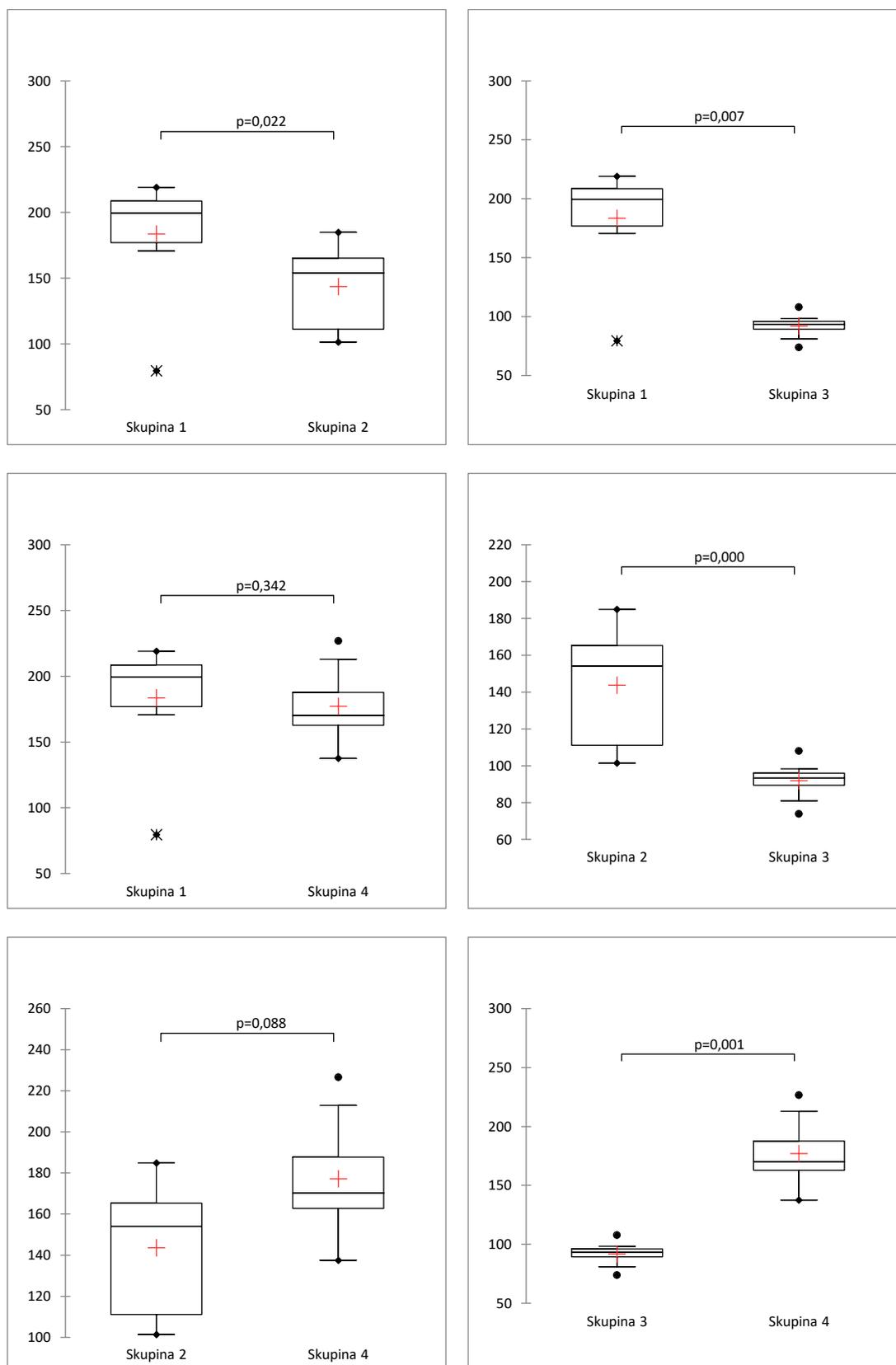
Kruskal-Wallisov test pokazuje da postoji statistički značajna razlika u promatranom parametru između različitih skupina (na razini značajnosti od 5%);

GPx (4. min) [$\chi^2 = 17.701$ (7.815), DF = 3, p=0.001]



Slika 73 – „Box plot“ za GPx aktivnost u 4. minuti

Rezultati post-hoc usporedbi u parovima pomoću Mann-Whitney testa za GPx aktivnost u 4. minuti prikazani su na slici 74.



Slika 74 – „Box plotovi“ post-hoc usporedbi u parovima za GPx aktivnost u 4. minuti

Slijedom navedenih grafikona primjetno je povećanje enzimске aktivnosti glutathion peroksidaze (GPx) u četvrtoj minuti, u skupini u kojoj je astaksantin primijenjen 45 minuta od trenutka detorzije (Mdn = 170,13) u odnosu na netretiranu torzijsku skupinu (Mdn = 154,09) i skupinu u kojoj je astaksantin primijenjen u trenutku detorzije (Mdn = 93,22) [p (skupina 2/4) = 0,088, p (skupina 3/4) = 0,001]. Također je interesantno primijetiti statistički značajan pad enzimске aktivnosti GPx u skupini 3 u odnosu na skupinu 2 (p = 0,000) (tablica 56, slika 74).

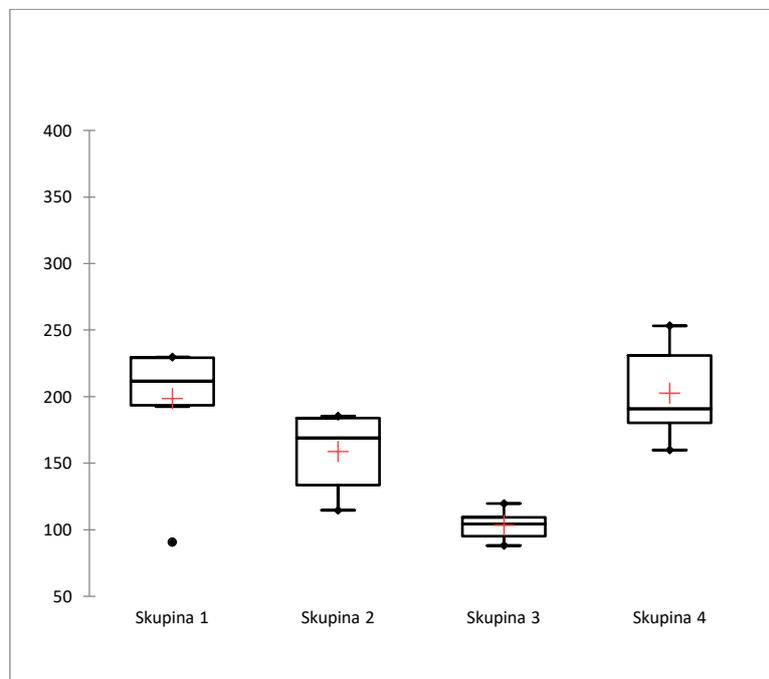
Vrijednosti medijana i interkvartilnih raspona po skupinama za GPx aktivnost u 5. minuti prikazane su u tablici 57.

Tablica 57 – Vrijednosti medijana, Q1, Q3 i interkvartilnih raspona po skupinama za GPx aktivnost u 5. minuti

	GPx aktivnost u 5. min			
	Mdn	Q1	Q3	IQR
Skupina 1	211,649	193,387	229,350	35,963
Skupina 2	169,115	133,458	183,887	50,429
Skupina 3	104,169	95,255	109,390	14,135
Skupina 4	190,764	180,322	230,942	50,62

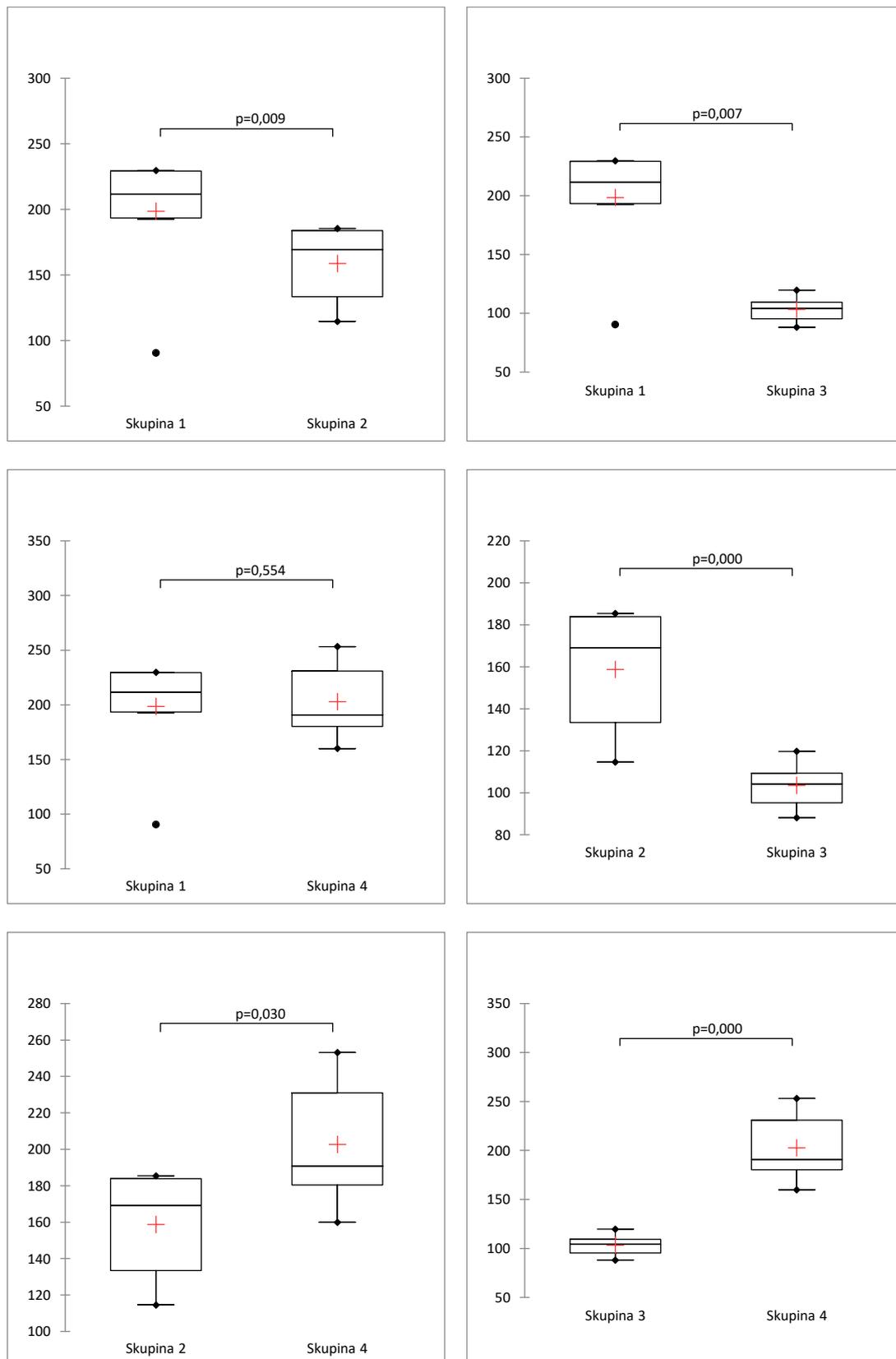
Kruskal-Wallisov test pokazuje da postoji statistički značajna razlika u promatranom parametru između različitih skupina (na razini značajnosti od 5%);

GPx (5. min) [$\chi^2 = 18.637$ (7.815), DF = 3, p=0.000]



Slika 75 – „Box plot“ za GPx aktivnost u 5. minuti

Rezultati post-hoc usporedbi u parovima pomoću Mann-Whitney testa za GPx aktivnost u 5. minuti prikazani su na slici 76.



Slika 76 – „Box plotovi“ post-hoc usporedbi u parovima za GPx aktivnost u 5. minuti

Slijedom navedenih grafikona primjetno je statistički značajno povećanje enzimske aktivnosti glutation peroksidaze (GPx) u petoj minuti, u skupini u kojoj je astaksantin primijenjen 45 minuta od trenutka detorzije (Mdn = 190,76) u odnosu na netretiranu torzijsku detorzijsku skupinu (Mdn = 169,12) i skupinu u kojoj je astaksantin primijenjen u trenutku detorzije (Mdn = 104,17) [p (skupina 2/4) = 0,03, p (skupina 3/4) = 0,000]. Također je interesantno primijetiti statistički značajan pad enzimske aktivnosti GPx u skupini 3 u odnosu na skupinu 2 (p = 0,000) (tablica 57, slika 76).

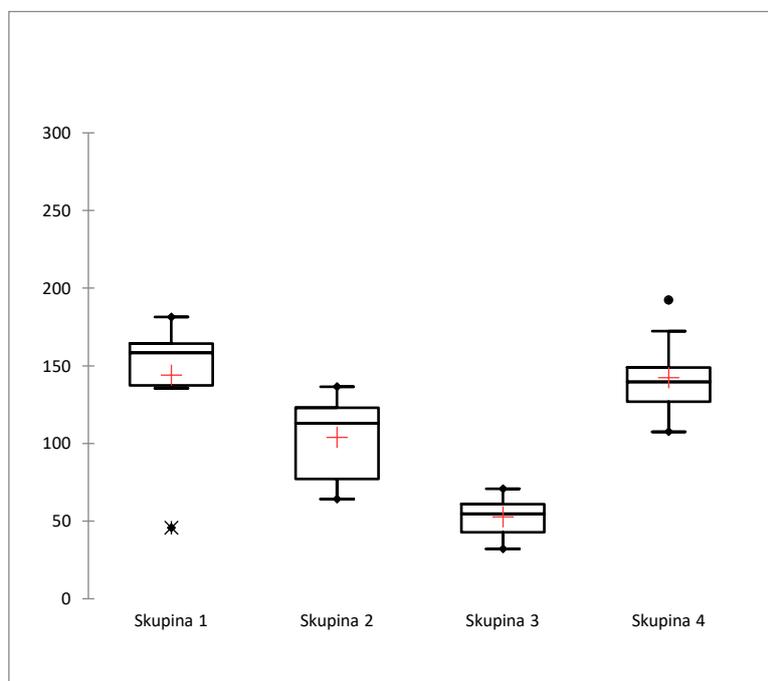
Vrijednosti medijana i interkvartilnih raspona po skupinama za GPx aktivnost u 6. minuti prikazane su u tablici 58.

Tablica 58 – Vrijednosti medijana, Q1, Q3 i interkvartilnih raspona po skupinama za GPx aktivnost u 6. minuti

	GPx aktivnost u 6. min			
	Mdn	Q1	Q3	IQR
Skupina 1	158,342	137,432	164,416	26,984
Skupina 2	112,828	77,172	123,016	45,844
Skupina 3	54,759	42,788	60,999	18,211
Skupina 4	139,571	126,964	148,906	21,942

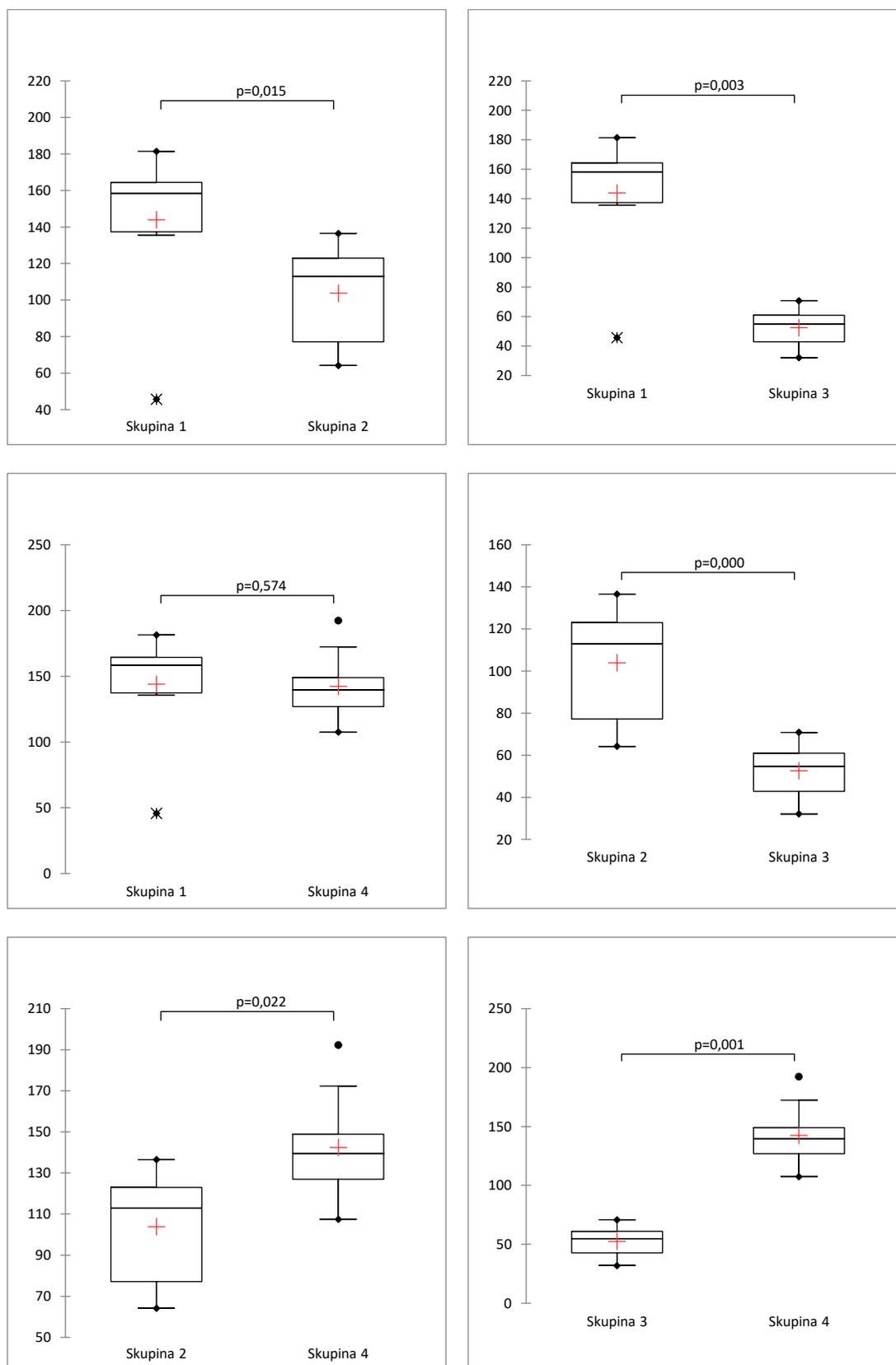
Kruskal-Wallisov test pokazuje da postoji statistički značajna razlika u promatranom parametru između različitih skupina (na razini značajnosti od 5%);

GPx (6. min) [$\chi^2 = 19.431$ (7.815), DF = 3, p=0.000]



Slika 77 – „Box plot“ za GPx aktivnost u 6. minuti

Rezultati post-hoc usporedbi u parovima pomoću Mann-Whitney testa za GPx aktivnost u 6. minuti prikazani su na slici 78.



Slika 78 – „Box plotovi“ post-hoc usporedbi u parovima za GPx aktivnost u 6. minuti

Slijedom navedenih grafikona primjetno je statistički značajno povećanje enzimske aktivnosti glutation peroksidaze (GPx) u šestoj minuti, u skupini u kojoj je astaksantin primijenjen 45 minuta od trenutka detorzije (Mdn = 139,57) u odnosu na netretiranu torzijsko detorzijsku skupinu (Mdn = 112,83) i skupinu u kojoj je astaksantin primijenjen u trenutku detorzije (Mdn = 54,76) [p (skupina 2/4) = 0,022, p (skupina 3/4) = 0,001]. Također je interesantno primijetiti statistički značajan pad enzimske aktivnosti GPx u skupini 3 u odnosu na skupinu 2 (p = 0,000) (tablica 58, slika 78).

6. Rasprava

Već su se krajem sedamdesetih i početkom osamdesetih godina prošloga stoljeća istraživači intenzivno počeli baviti problematikom plodnosti nakon torzije testisa na animalnim modelima te su počeli tragati za načinima liječenja. Tako je Ludwig 1980. godine sa suradnicima na uzorku od 100 štakora ispitivao stopu plodnosti po unilateralnoj i bilateralnoj torziji testisa za 720 stupnjeva. Neovisno o vremenu torzije stopa plodnosti (ispitivana mogućnošću naknadne trudnoće ženskih jedinki oplodjenima mužjacima iz pokusa) kod unilateralno torkviranih testisa bila je 60%, dok je kod bilateralno torkviranih testisa iznosila 40% nakon jednog sata po torziji odnosno 30% u skupini kod koje je vrijeme torzije iznosilo 2 sata. U skupinama kod kojih je bilateralna torzija testisa trajala dulje od 2 sata sve su životinje bile neplodne. Također je tvrdio da jednostrana torzija testisa nema utjecaja na kontralateralni zdravi testis (110). Već su iste godine Chakraborty i sur. na dva pacijenta s jednostranim torzijama testisa, biopsijom sjemenika otkrili različite poremećaje mikroskopske građe na kontralateralnim „zdravim“ testisima. Ovi poremećaji građe uključivali su abnormalnu nuklearnu kondenzaciju u spermatidama, nestanak unutarnje sastavnice bazalne lamine, degeneraciju sjemenskog epitela, miješanje sjemenskih epitelnih stanica s peritubularnim komponentama; nadalje, spomenuti istraživači su opisali spermatide s degenerirajućim glavama i repovima unutar citoplazme Sertolijevih stanica blizu bazalne lamine i peritubularno zadebljanje praćeno većim brojem Leydigovih stanica. Na modelu zamorca s eksperimentalno induciranom jednostranom torzijom kod kontralateralnog testisa uočen je abnormalni spermatidni razvoj dok su Sertolijeve stanice pokazivale visok stupanj fagocitne aktivnosti. Kontralateralno oštećenje testisa koreliralo je s dužinom trajanja i stupnjem torzije ipsilateralnog testisa (111). Na tragu ovoga istraživanja su Merimsky i sur. (112) na štakorima promatrali što se događa s pokretljivošću i koncentracijom spermija ovisno o duljini okluzije sjemenske vrpce te trenutku orhidektomije kako ipsilateralnog tako i kontralateralnog testisa. Uočena je korelacija između duljine okluzije sjemenske vrpce i trenutka orhidektomije s težinom ozljede kako ipsilateralnog tako i kontralateralnog „zdravog“ testisa. U skupini gdje je sjemenska vrpca ipsilateralnog testisa bila ligirana 3 sata nakon čega je učinjena orhidektomija istoga pokretljivost spermija ipsilateralnog testisa pala je na svega 30% sa značajnim padom koncentracije, dok je pokretljivost u kontralateralnom testisu i dalje bila na razini kontrolnih skupina. U skupini gdje je ligacija trajala 24 sata strukture ipsilateralnog testisa i epididimisa su postale nekrotične, čime su pokretljivost i koncentracija spermija iznosili nula. Pokretljivost spermija kontralateralnog testisa u ovoj skupini pala je na 81%. Također je uočen bolji fertilitet u skupini gdje je orhidektomija izvršena odmah po torziji, u odnosu na skupine u kojima orhidektomija nije učinjena odmah već s vremenskim odmakom od 3 mjeseca. Kod ovakve metodologije istraživanja uvijek treba imati na umu da je sjemenska vrpca ligirana, a ne torkvirana za određeni broj stupnjeva, s obzirom da u prirodnim uvjetima uvijek nastupa torzija. U sadašnjem istraživanju poštivala su se prirodna načela torzije zbog čega je sjemenska vrpca torkvirana a ne ligirana. Solov'ev je na uzorku od 123 nezrela testisa štakora te kliničkih ispitivanja na 22 djece došao do zaključka da, osim vremena i stupnja torzije testisa, na promjene u samom testisu utječu i poremećaji u hematotestikularoj barijeri te razvoj autoimunskog procesa u operiranom testisu (113). Imunosne osnove ove tvrdnje objasnili su iste godine Lewis-Jones i sur. (114). Povećanje količine prirodno cirkulirajućeg citotoksičnog protutijela na antigen u testisu te promjena u specifičnosti ovog protutijela zabilježeni su pomoću testova citotoksičnih protutijela. Imunocitokemijske tehnike pokazale su vezanje fluorescein obilježenih protutijela

na kontralateralni zdravi testis, nastalih izlaganjem ishemičnih stanica testisa imunom sustavu po disfunkciji hematotestikularne barijere. Zaključili su da, analogno ubrizganom homogenatu tkiva testisa bilo normalnog ili ishemičnog, tkivo ishemičnog testisa djeluje kao antigen i izaziva imunski odgovor kod domaćina. Stvorena protutijela u mogućnosti su ući u sjemenske kanaliće kontralateralnog testisa te oštetiti stanice spermatogenetske loze kao i somatske stanice intersticija. Iz navedenog su zaključili da, ako se ishemični testis ostavi *in situ* (omogućava stalni antigeni podražaj imunom sustavu) isti bi mogao oštetiti kontralateralni testis. Tako proizvedena antitijela nastavila bi napadati kontralateralni testis sve dok se antigeni stimulus ne smanji postepenim prirodnim fibroznim procesima torkviranog testisa. Dvije godine poslije Merimsky i sur. (115) također na štakorima istražuju protutijela na spermije u serumu. Iako stvarno mjesto indukcije imunskog odgovora ostaje nepoznato, pokazali su značajnu razliku između kontrolne skupine te skupina u kojoj je učinjena orhidektomija ili detorzija po torziji. Od važnosti je za primijetiti da su protutijela dominirala u skupini u kojoj je učinjena detorzija za razliku od skupine u kojoj je učinjena orhidektomija. Protutijela su imala tendenciju mnogo bržeg nestajanja u grupi orhidektomiranih (3 mjeseca) u odnosu na detorkviranu skupinu (6 mjeseci). Iz navedenog istraživanja autori su se zalagali za orhidektomiju nakon prolongirane torzije kako bi se smanjilo oštećenje kontralateralnog testisa te time povećala fertilitet. Na tragu Ludwigove studije (110) Cosentino i sur. (116) četiri godine kasnije proveli su studiju na 60 prepubertalna štakora starih 35 dana kojom su jasno ustanovili da unilateralna torzija testisa od 720° u mladih štakora značajno smanjuje njihovu naknadnu plodnost s obzirom na trajanje torzije (0, 1, 3, 5, 9, 12h) te da se štetni učinak po torziji testisa može svesti na minimum ukoliko se torkvirani testis nakon torzije ukloni umjesto da se detorkvira i vrati u skrotum. Životinje su bile podijeljene u 6 skupina ovisno o trajanju torzije. U svakoj skupini, po isteku planiranog vremena torzije, pet životinja je podvrgnuto detorziji dok je kod ostalih pet učinjena orhidektomija neposredno po torziji. Nakon prvog dijela pokusa štakori nisu eutanazirani nego su živjeli u vivariju do 65-tog dana starosti kada su pareni s ženkama u naredna tri tjedna. Po isteku tri tjedna životinje su eutanazirane te se ispitala gravidnost ženki. Na kontralateralnim testisima, na deset nasumično odabranih kanalića, mjereno je promjer. Postotak plodnosti mužjaka bio je obrnuto proporcionalan duljini trajanja torzije. Torzija u trajanju od 9 i 12 sati značajno je smanjila plodnost u usporedbi s ostalim skupinama. U životinja kod kojih je učinjena orhidektomija zadržana je plodnost bez obzira na trajanje torzije. Postotak trudnih štakorica bio je najniži u skupini parenih s mužjacima kod kojih je učinjena detorzija nakon torzije od 9 i 12 sati. Histološka istraživanja kontralateralnog testisa ukazala su na obrnuto proporcionalan odnos između promjera kanalića i duljine trajanja torzije, no nije bilo značajne razlike srednjih promjera kanalića između skupina kod kojih je učinjena orhidektomija u odnosu na skupine kod kojih je učinjena detorzija, osim kod skupine kod koje je torzija trajala 12 sati. Cosentino je upravo odabrao štakore stare 35 dana kako bi najbolje povukao paralelu s adolescentnim dječacima kada postoji najveća pojavnost torzije testisa. Ovo načelo primijenjeno je i u sadašnjem istraživanju. Prvu sveobuhvatniju morfološku studiju godinu dana je kasnije proveo Kurpisz sa sur. na 180 štakora (117). Morfološka opažanja otkrila su ozbiljna oštećenja sjemenskih kanalića u kontralateralnom testisu. Kod četiri štakora opažena je trajna neplodnost. Neplodnost je potvrđena potpunom atrofijom sjemenskog epitela unutar kanalića. Istovremeno se pojavljuju studije koje tvrde da prepubertalna ipsilateralna torzija nema utjecaj na kontralateralni zdravi

testis. Henderson i sur. (118) eksperimentirali su na modelu hrčka. 56 jedinki podijeljeno je u četiri skupine. Kod prve skupine učinjena je samo orhidektomija, drugoj je učinjena lažna operacija, trećoj je učinjena torzija tijekom 24h od 720° praćena orhidektomijom dok je četvrtoj po torziji od 720° učinjena detorzija. Nakon prvog dijela pokusa svakoj je životinji u točno određenim razdobljima (1 tjedan, 1 mjesec, 6 mjeseci) bioptiran kontralateralni testis. Prospektivnim praćenjem bioptata nije nađena razlika među skupinama. Spermatogeneza je u svim skupinama bila uredna. Već sljedećih godina Kogan i sur., Gülmez i sur., Madarikan te Sade i sur. (119-122) eksperimentiraju s kortikosteroidima čijim djelovanjem odnosno imunosupresijom smanjuju oštećenja na kontralateralnom testisu čime potvrđuju postojanje imunosne uloge u oštećenju kontralateralnog testisa. Kogan i sur. (119) su na modelu štakora istraživali mehanizme ozljede po jednostranoj torziji testisa, kao i učinke orhidektomije i imunosupresije kortikosteroidima. Torzija je bila povezana s nenormalnom kontralateralnom histologijom testisa te je imala utjecaj na povišeni broj antilimfocitnih protutijela i onih na spermije. I orhidektomija i primjena kortikosteroida smanjili su ove vrijednosti, sugerirajući da imunosni proces stoji u pozadini abnormalnosti uočenih u ovom modelu eksperimenta. Godinu dana kasnije analognu studiju s prednizolonom proveli su Gülmez i sur. (120). Pedeset švicarskih albino štakora podijelili su u 5 skupina. U prvoj su skupini, po torziji, uočili smanjenje srednjeg promjera sjemenskih kanalića te narušenu spermatogenezu kontralateralnih testisa uz prisutnu upalnu reakciju. U drugoj skupini, na tragu prethodnih istraživanja, je detorzija testisa povećala štetu. Orhidektomija u skupini tri nije spriječila već nastalu štetu. U skupini četiri prednizolon je poboljšao spermatogenezu te je imao utjecaj na proliferaciju intersticijskih Leydigovih stanica. U skupini pet gdje je prednizolon ubrizgan neposredno po torziji testisa nisu zabilježena oštećenja kontralateralnog testisa. Madarikan (121) iste godine eksperimentira na Wistar štakorima. Vremena torzije u navedenom istraživanju iznosila su 3, 6 i 24 sata. Po torziji od 1080° štakori su bili podijeljeni u 6 skupina. Kod prve je učinjena detorzija, kod druge detorzija i neposredna splenektomija, u trećoj detorzija uz primjenu hidrokortizona, u četvrtoj detorzija uz primjenu azatioprina, u petoj detorzija uz primjenu ciklosporina A, dok je u šestoj skupini učinjena neposredna orhidektomija. Ovisno o duljini trajanja same torzije u svim skupinama je, osim prvoj, primijećeno manje kontralateralno oštećenje testisa čime su rezultati potvrdili teoriju istraživača da adjuvantna imunoterapija sprječava kontralateralno oštećenje testisa. U skupini štakora kod kojih je primijenjen ciklosporin A jedna je životinja uginula, dok je azatioprin imao utjecaj na cijeljenje rana. Primjena hidrokortizona nije uzrokovala komplikacije te je time hidrokortizon postao imunoterapijsko sredstvo izbora, jer je njegova primjena bila povezana s najmanje komplikacija. Sade i sur. (122) također su proveli istraživanje na štakorima. Prva skupina bila je kontrola. U drugoj skupini lijevi testis torkviran je za 720°, dok je desni testis uklonjen 4 tjedana kasnije. U trećoj skupini štakori su bili podvrgnuti detorziji 24 sata po torziji, dok je u četvrtoj skupini dodan kortizon. Petu skupinu činili su štakori koji su bili podvrgnuti orhidektomiji 24 sata nakon torzije, a šestoj skupini je uz orhidektomiju također dodan kortizon. Liječenje kortizonom započelo je 24 sata po torziji testisa i nastavljeno je u naredna 4 tjedna. Rezultati su sugerirali da, bez obzira radilo se o kombinaciji kortizona uz detorziju ili orhidektomiju, isti svakako ima protektivni učinak na kontralateralni testis što se ogledalo u srednjem promjeru sjemenskih kanalića i postotku azospermije. Tih godina u znanosti izmjenjivale su se teorije koje su išle u prilog kontralateralnog oštećenja (123-125) te teorije

koje su isto opovrgavale (126-129). U prilog dugoročnog oštećenja kontralateralnog testisa govori istraživanje Chakrabortya i sur. (123). Također su se pitali da li su nastala oštećenja prolazna i reverzibilna ili trajna i nepovratna. Na osamnaest zamoraca podijeljenih u tri skupine od po 6 jedinki detaljno su se putem svjetlosne i elektronske mikroskopije evaluirala oštećenja kontralateralnog testisa. Prvoj skupini učinjena je samo torzija od 540° , dok je u drugoj učinjena detorzija nakon 8-12h. Treća skupina služila je za kontrolu. Životinje su žrtvovane nakon 16 mjeseci. U kontralateralnim testisima zabilježeno je niz degenerativnih promjena, koje su uključivale prekomjernu intraepitelnu vakuolizaciju, gubitak sjemenskih stanica te prisutnost kanalića koji sadrže samo Sertolijeve stanice i nekoliko spermatogonija. Već je tada primijećeno da na torzijsko-detorzijsku skupinu otpada najveći postotak oštećenja no znanstvenicima tada nije bio jasan mehanizam zašto je tome tako. Također su mjerili promjer sjemenskih kanalića no istima nisu davali preveliku važnost s obzirom da su verificirane promjene smatrali beznačajnima. Zaključili su da je dugoročni učinak jednostrane torzije sjemenske vrpce trajne i nepovratne prirode. Jhunhunwala i sur. (124) također su promatrali dugoročne učinke torzije testisa na kontralateralni testis. Zamorci su bili podijeljeni u šest skupina od po 12 jedinki. U prvoj skupini učinjena je torzija od 540° koja je bila prisutna do dana žrtvovanja. U drugoj skupini torzija je bila prisutna 8-12h nakon čega je učinjena detorzija. U trećoj skupini je po torziji učinjena orhidektomija. Ostale tri skupine služile su kao kontrola (skupina 4 – unilateralna orhidektomija, skupina 5 – jednostrana lažna operacija, skupina 6 – samo pentobarbitalna injekcija koja je služila kao anestetik). Polovica životinja iz svake skupine žrtvovana je nakon 4 mjeseca, a druga polovica nakon 8 mjeseci. Kvantitativnim mjerenjem sjemenskih stanica kontralateralnih testisa uočen je značajan gubitak istih u prve tri skupine nakon 4 mjeseci te u skupini jedan i dva nakon 8 mjeseci po torziji. U usporedbi s kontrolnim skupinama promjer sjemenskih kanalića prve tri skupine nije se značajno razlikovao neovisno o mjesecu žrtvovanja. Za razliku od navedenog istraživanja Cosentino i sur. (116) ukazali su na značajnije promijene promjera sjemenskih kanalića. Jhunhunwala i sur. su se zapitali da li je možda podloga gore opisanih nalaza u drugačije odabranom modelu. Već tih godina znanstvenici si opravdano postavljaju pitanja za koja će se ispostaviti da su itekako značajna kada se problematika promatra s današnjeg stajališta (kada su nam horizonti gledanja na problem daleko širi). Mazurkiewicz (125) je eksperimentirao na 100 odraslih i 80 prepubertalnih Wistar štakora. Histološka istraživanja otkrila su u čak trećine teške morfološke promjene u kontralateralnim testisima. Torzija testisa iznosila je 720° , a životinje su žrtvovane 10-tog, 20-tog, 30-tog i 42-og dana. Za razliku od Chakrabortya i sur. (123) koji su zaključili da je dugoročni učinak jednostrane torzije spermatične vrpce na kontralateralni testis trajne i nepovratne prirode, istraživanje Choi-a i Lee-a (126) donosi drugačiji zaključak. Inducirali su jednostranu torziju kod Sprague-Dawley štakora u trajanju 3 odnosno 24 sata, da bi potom iste detorkvirali ili učinili orhidektomiju. Nakon 2 odnosno 4 tjedna promatrali su promjene na kontralateralnim testisima te su pokušali odgovoriti na sljedeća pitanja: utječe li trajanje torzije testisa na stupanj histološke promjene u kontralateralnom testisu te da li detorzija odnosno orhidektomija utječu na kontralateralni testis? Rezultati su pokazali da je u skupini u kojoj je torzija trajala 24 sata došlo do izrazitog smanjenja spermatogeneze, ali i da je došlo do potpunog oporavka 4 tjedna kasnije. Zaključili su da je torkvirani testis odgovoran za histološke promijene kontralateralnog testisa, ali da je ovaj fenomen prolazan. Na tragu ovoga istraživanja Madgar i sur. (127) šezdeset dana stare štakore podijelili su u 7 skupina od 8 do 10 jedinki.

Skupini jedan učinjena je lažna operacija te je služila kao kontrola. Skupina dva podvrgnuta je torziji i ligaciji spermatičnih krvnih žila da bi se nakon 24 sata učinila orhidektomija. Skupini tri učinjeno je isto no s vremenskim odmakom od 48 sati. Kod skupine 4 odnosno skupine 5 postupak je bio analogan skupini 2 odnosno 3 no umjesto orhidektomije učinjena je detorzija. Skupini 6 učinjena je torzija i ligacija no testis nije diran narednih 8 tjedana. Skupina 7 također je služila kao kontrola. U navedenoj skupini učinjena je samo ipsilateralna orhidektomija. Nakon 8 tjedana životinje su parene te su nakon 2 tjedna žrtvovane. Proučavale su histološke promijene na kontralateralnim testisima te plodnost jedinki u odnosu na kontrolne skupine. Rezultati ove studije pokazali su da je u zrelih štakora, koji su podvrgnuti torziji ipsilateralnog testisa, normalna spermatogeneza bila prisutna u 100% kontralateralnih testisa (nije bila značajno smanjena plodnost između skupina). Također nije bilo uočljive razlike u promjeru sjemenskih kanalića u bilo kojoj eksperimentalnoj skupini u usporedbi s kontrolnom skupinom. Na pragu ovih istraživanja i Turner (128) u svojem istraživanju opovrgava teoriju da ipsilateralna torzija utječe na kontralateralni testis (123-125). Neovisno o tome da li su ipsilateralni testisi bili torkvirani 24 sata ili 10 dana, nakon 30 ili 60 dana kada su se isti promatrali nisu zabilježena oštećenja kontralateralnog testisa. Osim morfometrijskih istraživanja kontralateralnih testisa Janetschek i sur. (129) su u svoje istraživanje uključili i ispitivanje egzokrine i endokrine funkcije mjesec dana prije i dva mjeseca poslije torzije ipsilateralnog testisa od 540°. Također su koristili štakorski model s 6-satnom, 12-satnom ili trajnom ekstravaginalnom torzijom testisa. Lažno operirana skupina životinja služila je kao kontrola. Razine LH, FSH i testosterona u serumu određene su radioimunskim ispitivanjima. Osam tjedana nakon torzije broj spermija smanjen je za polovinu u eksperimentalnim skupinama, a razina LH značajno se povećala, dok su ostale razine hormona, kao i kod kontrolne skupine, ostale nepromijenjene. Morfometrijska istraživanja kontralateralnih testisa nisu pokazala značajne promjene osim značajnog povećanja Leydigovih stanica u nekim podskupinama. Sve uočene promjene u korelaciji su s funkcionalnim gubitkom jednog testisa ali definitivni dokazi za kontralateralno oštećenje nisu primijećeni. I ovim istraživanjem, iako rezultati nisu dio ove disertacije (na pragu grupacije autora (126-129) koja u svojim istraživanjima zaključuju da ne nalaze značajnija oštećenja kontralateralnih testisa), nisu nađena oštećenja na kontralateralnim testisima (sukladno postavljenoj metodologiji, s morfometrijskog i imunohistokemijskog aspekta, nisu nađena oštećenja na kontralateralnim testisima promatranih skupina). Iako su do 1990. godine ishemični učinci na ipsilateralni i kontralateralni testis relativno dobro opisani i dokumentirani, preventibilni i zaštitni učinci po torziji testisa gotovo da nisu istraživani, osim u istraživanjima s primjenom kortikosteroida. Pakyz i sur. (130), kao nastavak na studije s kortikosteroidima i imunosupresivima (119-122), eksperimentiraju s ciklosporinom i prednizonom te dobivaju obećavajuće rezultate. Eksperimentirali su na 35 dana starim štakorima. Ipsilateralni testis torkvirali su za 720° u trajanju od 9 sati. U trenutku detorzije jednoj skupini inicirali su ciklosporin, drugoj prednizon, a trećoj kombinaciju ciklosporina i prednizona. Kontrolne skupine činile su životinje kod kojih je po torziji učinjena orhidektomija te životinje kod kojih je učinjena lažna operacija. Iako su i pojedinačne primjene ciklosporina i prednizona utjecale na kontralateralni testis, kombinacija ciklosporina i prednizona značajno je utjecala na kontralateralni testis u vidu smanjenja oštećenja. Istovremeno su se znanstvenici počeli interesirati i za dob u kojoj su učinci po torziji testisa najnepovoljniji za životinju čemu se u dosadašnjim istraživanjima nije davao preveliki

značaj. Da bi se utvrdilo u kojoj su dobi štakori najosjetljiviji na reproduktivna oštećenja Heindel i sur. (131) eksperimentirali su s životinjama starosti 30 do 70 dana. Životinje su podijeljene u skupine ovisno o starosti (30 dana, 35 dana, 40 dana, 50 dana, 70 dana). Unutar svake skupine životinje su razdvojene u eksperimentalnu i kontrolnu podskupinu. Eksperimentalne podskupine podvrgnute su unilateralnoj torziji od 1080° u trajanju od 9 sati, nakon čega je učinjena detorzija. Mlađe životinje za test fertilitnosti morale su po eksperimentu doseći dob od 65 dana kada su iste parene s ženkaama tijekom naredna 3 tjedna. Nakon razdoblja parenja iz svake jedinke uzet je i serum iz čega se određivala koncentracija testosterona. Osim seruma u istom razdoblju rađena su i histološka istraživanja na kontralateralnim testisima na kojima se mjerio srednji promjer sjemenskih kanalića na 10 slučajno odabranih najokruglijih presjeka. Što se tiče rezultata, kada se razmatrala fertilitnost mužjaka u dobi od 35, 40 i 50 dana, oni su pokazivali značajno niže vrijednosti. Zanimljivo je primijetiti da životinje kod kojih je torzija učinjena u 30-tom ili 70-tom danu nisu pokazale značajno smanjenu fertilitnost. U skladu s time i kod ispitivanja trudnoća ženskih jedinki jasno je vidljivo da su upravo ženke koje su parene s mužjacima iz navedenih dobnih skupina imale najmanju stopu trudnoća. Što se tiče razine testosterona eksperimentalna krivulja je pratila krivulju kontrolnih skupina (osim skupine u dobi od 70 dana) što je i bilo za očekivati s obzirom na kompenzatorne mehanizme kontralateralnog testisa (hipertrofija Leydigovih stanica). Srednji promjer sjemenskih kanalića kontralateralnih testisa značajno se razlikovao u odnosu na kontrolne skupine u dobi od 50 dana. Ovo istraživanje ukazalo je da ipsilateralna torzija testisa u dobi od 35-50 dana ima najveći utjecaj na kontralateralni testis. Iz navedenog razloga istraživači upozoravaju da prethodne studije koje govore u prilog ili protiv oštećenja kontralateralnog testisa treba gledati i iz ugla dobi i vrsti korištenih životinja navedenih istraživanja. Također, osim dobi životinja, na utjecaj kontralateralnog oštećenja svakako ima i vrijeme i stupanj torzije te način na koji je torzija načinjena (manualna torzija i fiksacija ili ligacija spermatičnog snopa). Moram naglasiti da su ovo ključni zaključci svih studija do 1990. godine te iste treba cijelo vrijeme imati na umu kada se kritički promišlja o ovom obliku istraživanja. Osim preventabilnih i zaštitnih učinaka istražuju se i enzimi koji bi mogli poslužiti u dijagnostici ovog stanja. Erol i sur. (132), na tragu promišljanja da torzija sjemenske vrpce dovodi do ishemije mišića kremastera te time i do oslobađanja veće količine enzima kreatin fosfokinaze (CPK), koncipiraju svoje istraživanje. U svrhu potvrde svoje hipoteze koriste 36 zamoraca u dobi 6-8 mjeseci. U eksperimentalnoj skupini vrše torziju od 720° u trajanju od 40 sati. U vremenu od 4, 8, 20, 28 i 40 sati određivali su razinu CPK u serumu životinja. Za kontrolu im je služila skupina lažno operiranih životinja. Najznačajniji skok vrijednosti zabilježen je od trenutka torzije do osmoga sata trajanja iste, dok su najviše vrijednosti zabilježene u 20-tom satu. Istih godina javljaju se i prve studije koje razmatraju ulogu slobodnih kisikovih radikala u oštećenju tkiva testisa ishemijsko-reperfuzijskom ozljedom. Bergh i sur. (133) eksperimentiraju na 3-4 mjeseca starim Sprague-Dawley štakorima kod kojih su vršili ligaciju sjemenskog snopa. Nakon 60 ili 100 minuta ishemijske ligatura je uklonjena. Polovina štakora tretirana je intravenskim bolusima superoksid dismutaze i katalaze 3 minute prije okluzije te 3 minute prije reperfuzije. Nisu nađene morfološke promijene između eksperimentalnih i kontrolnih skupina. Razočarani rezultatom zaključili su da slobodni kisikovi radikali nemaju značajnu ulogu u ishemijsko-reperfuzijskoj ozljedi testisa. Greenstein i sur. (134) bavili su se pitanjem može li primjena polietilen glikol-superoksid dismutaze (PEG-SOD) ublažiti oštećenja po torziji testisa. U istraživanju su uključili

67 Sprague-Dawley štakora. U eksperimentalnoj skupini vršena je torzija od 720° u trajanju od 3 sata. PEG-SOD injiciran je jedan sat prije trenutka same detorzije. Nakon 14 dana provedena je histološka procjena na oba testisa. Nije pronađena statistički značajna razlika između liječene i kontrolne skupine. Akgür i sur. (135) ozbiljnije kreću u istraživanje reperfuzijske komponente torzijsko-detorzijske ozljede testisa u štakora. 70 odraslih albino štakora podijelili su u 7 skupina od po 10 jedinki. Prva skupina služila je za određivanje bazalnih vrijednosti biokemijskih parametara. Druga i treća skupina podvrgnute su torziji u trajanju od 1 odnosno 2 sata. Četvrtoj i petoj skupini neposredno po torziji učinjena je detorzija. Preostale dvije skupine lažno su operirane te su služile kao kontrola. Mjerili su razine mliječne kiseline, hipoksantina te produkte lipidne peroksidacije. Vrijednosti između prve te šeste i sedme skupine nisu se značajno razlikovale. Sva tri parametra značajno su povećana i u ipsilateralnom i u kontralateralnom testisu druge i treće skupine dok u skupinama gdje je rađena detorzija značajne promjene su zabilježene u ipsilateralnom, ali ne i u kontralateralnom testisu. Zaključeno je da je reperfuzijska ozljeda prisutna u ipsilateralnom, ali ne i u kontralateralnom testisu. Nametnulo im se pitanje bi li spojevi koji sudjeluju u uklanjanju slobodnih kisikovih radikala imali utjecaj na smanjenje štete uzrokovane istima. Sa Sveučilišta u Michiganu (136) istraživači su se zapitali da li će analogno reperfuzijskim oštećenjima drugih tkiva određenim spojevima uspjeti smanjiti reperfuzijska oštećenja tkiva testisa. Blank i sur. su prepubertalne Sprague-Dawley štakore podijelili u 9 skupina. Po šestosatnoj torziji te 24-satnoj reperfuziji pola sata prije same detorzije jedinkama su ordinirali deferoksamin i diltiazem s obzirom da su isti spojevi imali utjecaja na smanjenje reperfuzijske komponente štete u tkivima mozga, jetre, crijeva i srca (137-140). Nedvojbeno su dokazali da reperfuzijska komponenta svakako utječe na daljnja oštećenja tkiva testisa, no niti jedan od primijenjenih spojeva nije ublažio oštećenja. Iako nisu dobili obećavajuće rezultate autori su u zaključku naveli da svakako dalje treba tragati za spojevima koji će moći suzbiti reperfuzijsku komponentnu oštećenja čime su na neki način postali pioniri ovog tipa istraživanja. Prve uspješnije rezultate ostvarili su Akgür i sur. (141). U svrhu pokušaja smanjenja reperfuzijske komponente ozljede eksperimentirali su s alopurinolom, inhibitorom enzima ksantin oksidaze. Odrasle Wistar štakore podijelili su u 11 skupina od po 10 jedinki. Prva i zadnja skupina služile su kao kontrole. Kod tri skupine učinjena je torzija od 720° ipsilateralnog testisa (1h, 3h, 5h), kod tri detorzija po torziji, a kod preostale tri ordiniran je alopurinol neposredno pred detorziju. Mjerili su produkte lipidne peroksidacije. Zabilježen je statistički značajan pad produkata lipidne peroksidacije u skupini kojoj je ordiniran alopurinol. Zašto prethodni autori nisu dobili optimistične rezultate objašnjavaju činjenicom da se na modelu štakora mora izvršiti torzija a ne ligacija sjemenskog snopa s obzirom da torzija u samom početku začepkuje vene, ali ne i arterije te time uzrokuje djelomičnu ishemijsku u ranom periodu torzije. Dvije godine poslije Turan i sur. (142) tragajući za obećavajućim spojevima eksperimentiraju s antioksidansom, vitaminom E. 50 odraslih Sprague-Dawley štakora podijelili su u 5 skupina. Prvoj (kontrolnoj) skupini odmah je učinjena orhidektomija. Drugoj je učinjena nakon tri sata po torziji od 720° . Trećoj je učinjena lažna operacija. Četvrtoj i petoj skupini ordiniran je vitamin E dva sata prije, odnosno sat vremena po detorziji. Orhidektomija je učinjena nakon 6h. Mjerena je vrijednost malondialdehida (MDA) kao biljeg lipidne peroksidacije. Autori nisu našli statistički značajnu razliku između skupina te su, unatoč prethodnim studijama, hrabro zaključili da lipidna peroksidacija ne igra važnu ulogu u ozljedi testisa te da vitamin E nije koristan u sprječavanju reperfuzijske ozljede

po detorziji. Kada bi se devedesetih godina prošlog stoljeća trebao napisati pregledni rad zaključak bi na pragu svih dotadašnjih istraživanja definitivno ostao nedorečen. No, veselila je činjenica da istraživači diljem svijeta nisu odustajali. Prillaman i Turner (143) ne odustaju od hipoteze da antioksidansi i blokatori kalcijevih kanala mogu smanjiti reperfuzijsku ozljedu po detorziji testisa. Sedamdeset i dva Sprague-Dawley štakora podijelili su u 9 skupina. Vršena je eksperimentalna torzija od 720° tijekom jednog ili dva sata. Životinjama je ordinirana neka od kombinacija superoksid dismutaze, katalaze, alopurinola i verapamila (SOD + katalaza / SOD + katalaza + alopurinol / SOD + katalaza + verapamil). Spojevi su ordinirani kontinuirano tijekom posljednjih 15 minuta trajanja torzije te tijekom prvog sata detorzije. Funkcija testisa određivana je 60 dana nakon prve faze eksperimenta mjerenjem težine testisa, dnevne proizvodnje sperme i koncentracije testosterona. Kombinacija SOD + katalaza te SOD + katalaza + verapamil kod torzije od jednog sata značajno je smanjila štetu uzrokovanu reperfuzijskom ozljedom, dok kod trajanja torzije od 2 sata pozitivni učinci nisu zabilježeni. Iz istoga istraživačkog laboratorija dolaze zaključci da je brzina povratka krvi u trenutku detorzije obrnuto proporcionalna s duljinom trajanja same torzije. Iz navedenog podatka istraživači su došli do zaključka da je time i vaskularni kapacitet za dopremu antioksidansa u kritičnom trenutku daleko manji, a razne su studije pokazale da je prvih 60-90 minuta detorzije ključno u reperfuzijskom oštećenju (144-146). Temeljem navedenih zaključaka rađena je i metodologija ove disertacije. Na pragu Prillaman-a i Turner-a pozitivne učinke verapamila dokazuju Sarica i sur. (147). 35 odraslih Wistar štakora podijelili su u 3 skupine. U prvoj skupini učinjena je torzija od 720° u trajanju od 4 sata. U podskupini *a* prve skupine učinjena je detorzija, a u podskupini *b* orhidektomija. U skupini 2 učinjeni su isti postupci s time da su 2 tjedna prije same torzije životinje dobivale verapamil. Skupina 3 je bila lažno operirana. 24h i tjedan dana nakon zahvata histološki su evaluirani kontralateralni testisi mjerenjem srednjeg promjera sjemenskih kanalića. Skupina kojoj je ordiniran verapamil imala je statistički značajno manje smanjenje promjera kanalića u odnosu na skupinu koja nije primala verapamil. I ova studija nedvojbeno je dokazala da je orhidektomija, kada je u pitanju kontralateralno oštećenje testisa, u odnosu na detorziju bolji izbor. Osim zanimanja za reperfuzijsku komponentu oštećenje autori se okreću i ishemijskoj komponenti. Tako Palmer i sur. (148) eksperimentiraju s antagonistom čimbenika aktivacije trombocita (PAF), biokemijskim markerom i lipidnim posrednikom prilikom ishemijske ozljede. Antagonist čimbenika aktivacije trombocita (CV-6209) ordiniran je 4 sata prije torzije od 720°. U navedenoj skupini došlo je do značajnog smanjenja vaskularne kongestije i histoloških promjena u vidu povećanja promjera sjemenskih kanalića. Kolski i sur. (149) eksperimentiraju s hiperbaričnom oksigenacijom. 58 Wistar štakora podijelili su u 4 skupine. Prva je bila lažno operirana. Drugoj je učinjena bilateralna okluzija spermatičnog snopa u vremenu od 4 sata. Treća je podvrgnuta hiperbaričnoj oksigenaciji tijekom zadnjih 90 minuta ishemijske faze dok je četvrta podvrgnuta hiperbaričnoj oksigenaciji u trenutku detorzije. Skupine koje su bile podvrgnute hiperbaričnoj oksigenaciji imale su statistički značajno manja oštećenja (verificirano mjerenjem debljine zametnog epitela). Najbolji efekt postignut je u skupini koja je hiperbaričnoj oksigenaciji podvrgnuta u trenutku detorzije. Utjecaj testosterona na spermatogenezu nagnala je Da Ros-a i sur. (150) na promišljanje da bi primjena testosterona možda mogla spriječiti znatnija oštećenja po torzijskoj ozljedi. Eksperimentalna skupina Wistar štakora izložena je dvosatnoj torziji. Jednoj podskupini iste skupine ordiniran je testosteron intratestikularno 3 dana po torziji te narednih 7 dana svakodnevno. Životinje su

žrtvovane 30-tog i 60-tog dana. Životinjama koje su primale testosteron intratestikularno, testisi su imali manju težinu i volumen u odnosu na kontrolne skupine. Također su imali odsutnu spermatogenezu uz atrofiju. Autori su samo mogli konstatirati da primjena testosterona u dozi od 25mg nema djelotvoran učinak. Početkom 21. stoljeća istraživanja su se intenzivirala no cilj znanstvenika ostao je isti; otkrivati negativne kaskadne procese te naći odgovarajući odgovor na iste. Na prijelazu stoljeća Dokucu i sur. (151), na temelju istraživanja Walder-a i sur. (152) istražuju možebitni zaštitni učinak dušikovog oksida (NO). Dvadeset i osam prepubertalna Sprague-Dawley štakora podijelili su u 4 skupine. Skupina jedan je lažno operirana. Drugoj skupini testis je torkviran za 720° u trajanju od 6 sati te je potom detorkviran. Skupini 3 ordiniran je prekursor dušikovog oksida (L-arginin metil ester), dok je skupini 4 ordiniran inhibitor NO sintaze (L-NAME). Kontralateralni testisi orhidektomirani su 21. dan po torziji ipsilateralnog testisa te su histološki evaluirani. Evaluacijom je ustanovljeno da su mjereni parametri skupine 3 korelirali s parametrima kontrole te se zaključilo da dušikov oksid ima protektivan učinak na kontralateralni testis. Na pragu ovoga istraživanja Koltuksuz i sur. te Uz i sur. (153,154) eksperimentiraju s fenetil esterom kofeinske kiseline (CAPE), aktivnim sastojkom propolisa. Koltuksuz i sur. 35 odraslih štakora podijelili su u 4 skupine; prva je bila lažno operirana, drugoj je učinjena torzija od 720° u trajanju od 2 sata, trećoj je ordinirana fiziološka otopina dok je četvrtoj ordiniran fenetil ester kofeinske kiseline 30 minuta prije detorzije. Nakon četiri sata detorzije učinjena je orhidektomija kako bi se iz tkiva odredile vrijednosti NO. Rezultati su ukazali na činjenicu da se razina NO povećava s torzijom, a smanjuje s detorzijom. Primjena CAPE-a povećala je razinu NO u tkivu što je indirektan znak da bi CAPE mogao imati protektivan učinak. Analogno istraživanju Koltuksuz i sur., Uz i sur., da bi potvrdili hipotezu da CAPE ima protektivan učinak, skupinama iz homogenata tkiva testisa određuju vrijednosti superoksid dismutaze (SOD) i katalaze (CAT). Kako su eksperimentalnoj skupini, kojoj je ordiniran CAPE, zabilježene statistički značajno manje vrijednosti SOD i CAT, istraživači su indirektno zaključili da u navedenoj skupini dolazi do manjeg oslobađanja slobodnih kisikovih radikala, a time i do zaključka da CAPE ima protektivni učinak po ishemijsko-reperfuzijskoj ozljedi testisa. Prve studije koje se bave utjecajem kalpaina i kaspaza na staničnu smrt nekrozom odnosno apoptozom zametnih stanica po torzijsko-detorzijskoj ozljedi testisa dolaze iz Japana. Shiraishi i sur. (155) podvrgnuli su eksperimentalne životinje torziji od 1080° u trajanju od jednoga ili šest sati, nakon koje bi bila učinjena detorzija neposredno po torziji ili s vremenskim odmakom od 0.5, 1, 6 ili 24 sata. Kako je vrijeme detorzije bilo duže broj pozitivnih nekrotičnih/apoptičnih stanica je bio veći. Skupine kojima je ordiniran inhibitor kalpaina, odnosno inhibitor kaspaze-3 pokazale su statistički značajno manji broj stanica pozitivnih na kalpain/kaspazu-3 spermatogenetske loze u odnosu na kontrolne skupine bez inhibitora. Usporedivši međusobno skupine kojima je ordiniran inhibitor kalpaina u odnosu na inhibitor kaspaze došlo se do zaključka o učinkovitijem učinku inhibitora kalpaina. Time se ispostavilo da je nekroza dominantniji proces u odnosu na apoptozu kada se radi o torzijsko-detorzijskoj ozljedi stanica spermatogenetske loze. Umemoto i sur. (156) također su ispitivali učinak inhibitora kalpaina na staničnu smrt stanica spermatogenetske loze, s time da su testisi u odnosu na Shiraishi-ja i sur. bili torkvirani za 720°. Također su utvrdili da skupine kojima je ordiniran inhibitor imaju statistički značajno manji broj stanica pozitivnih na kalpain. Analogno tome i Johnsenov skor je u navedenim skupinama bio viši. Istovremeno se po prvi put u laboratoriju Lysiak-a i sur. istražuje molekularni put

apoptoze zametnih stanica (157). Kao model služili su odrasli Sprague-Dawley štakori. Torzija od 720° trajala je 60 minuta, nakon čega je uslijedila detorzija. Orhidektomije su vršene 1, 2, 4 i 24 sata od trenutka detorzije. Najveći skok broja apoptotičnih stanica dogodio se u razdoblju između 4 i 24 sata od trenutka detorzije. Najzastupljenije molekule apoptoze bile su Fas, Bcl-X_L, Bcl-X_S, kaspaze 1,2 i 3 te Bax. Također je putem Western blot tehnike 4 sata od detorzije primijećen značajan porast citokroma c. Zaključak studije bio je da do apoptoze, po ishemijsko-reperfuzijskoj ozljedi testisa, dolazi putem dva odvojena apoptotska puta. Jedan put uključuje Bax i njegovu sposobnost otpuštanja citokroma c koji potom aktivira kaspazu 9 te posljedično kaskadni kaspazni niz. Drugi put uključuje vezanje Fas i FasL te pokretanje kaspazne kaskade putem kaspaze 8 (Slika 1.5.3.). Do intenziviranja istraživanja s antioksidansima otkrivaju se poželjni učinci pentoksifilina, vazoaktivnog intestinalnog peptida (VIP), humanog korionskog gonadotropina (hCG), inhibitora poliadenozin difosfat riboze (PARP) te vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF). U svojoj prvoj studiji Savas i sur. (158) procjenjivali su učinak pentoksifilina na lipidnu peroksidaciju mjerenjem vrijednosti malondialdehida (MDA). Štakori su bili podijeljeni u 4 skupine; prvu su činile lažno operirane jedinice, drugu lažno operirane jedinice uz primjenu pentoksifilina, trećoj je učinjena torzija (720°) i detorzija u trajanju od 30 minuta, četvrtoj također torzija i detorzija uz primjenu pentoksifilina 15 minuta prije torzije. Vrijednosti malondialdehida određivane su iz homogenata tkiva testisa mjerenjem apsorbancije. Vrijednosti MDA su bile statistički značajno manje u skupini 4 u odnosu na skupinu 3 kako u ipsilateralnom tako i u kontralateralnom testisu. U svojoj drugoj studiji Savas i sur. (159) istraživali su učinak pentoksifilina na mikrovaskularni protok s obzirom da su određene prethodne studije tvrdile da je jedan od mehanizama kontralateralnog oštećenja testisa po ipsilateralnoj torziji smanjeni protok (160, 161). Štakori su bili podijeljeni u 6 skupina; lažno operirana skupina, lažno operirana skupina uz primjenu pentoksifilina, skupina s torzijom (720°, 30min), skupina s torzijom uz primjenu pentoksifilina 15 min prije torzije, skupina s detorzijom, skupina s detorzijom uz primjenu pentoksifilina 15 min prije torzije. Putem gama kamere mjeren je protok kako u ipsilateralnom tako i u kontralateralnom testisu. U skupini 5 i 6 u ipsilateralnom testisu došlo je do značajno većeg protoka u odnosu na skupine 3 i 4. Protok u kontralateralnim testisima nije bio statistički značajno promijenjen. Can i sur. (162) istražuju učinak vazoaktivnog intestinalnog peptida (VIP). S obzirom na saznanje da testisi sadrže receptore za VIP te da isti ima modulatorni učinak na mastocyte eksperimentalnim je skupinama intraperitonealno davan VIP. Mjerenjem produkata lipidne peroksidacije i enzima ustanovljeno je da je u eksperimentalnim skupinama došlo do statistički značajnog pada vrijednosti enzimске aktivnosti SOD. Nakon pentoksifilina Savas i sur. (163) eksperimentiraju s humanim korionskim gonadotropinom (hCG) budući da se isti koristi u hormonskoj terapiji nespuštenih testisa. hCG svojim djelovanjem potiče Leydigove stanice na izlučivanje testosterona. 40 odraslih Wistar štakora podijeljeno je u 4 skupine; lažno operirane, lažno operirane + hCG, torkvirane (720°), torkvirane + hCG (24h od torzije 2x tjedno kroz 3 tjedna). Na kontralateralnom testisu određivane su vrijednosti testosterona te histološka oštećenja (stupanj očuvanosti spermatogeneze po Johnsenovom testu te MSD). Za sva tri parametra postojala je statistički značajna razlika između skupina čime se zaključilo da hCG ima protektivni učinak na kontralateralni testis po ipsilateralnoj torziji. Već se tih godina dalo naslutiti da turski znanstvenici prednjače u istraživanju na ovom području. Bozlu i sur. (164) ispituju učinke inhibitora poliadenozin difosfat riboze (nikotinamida, 3-aminobenzamida, 1,5-

dihidroksikinolina, 4-amino-1,8-naftalimida), otopljenih u dimetil sulfoksidu (DMSO) mjerenjem NO, MDA i mijeloperoksidaze. Sve skupine kojima je davan jedan od inhibitora poliadenozin difosfat riboze pokazale su statistički značajno manje vrijednosti NO, MDA i mijeloperoksidaze u ipsilateralnom testisu u odnosu na skupine kojima nije davan inhibitor poliadenozin difosfat riboze. Za vrijednosti u kontralateralnim testisima nije nađena statistički značajna razlika između skupina. Ima li VEGF protektivan učinak na torzijsko detorzijsku ozljedu ispitali su Tunçkiran i sur. (165). 16 odraslih Wistar štakora podijelili su u 3 skupine; torzijsko-detorzijsku skupinu (720° kroz 2 sata), torzijsko-detorzijsku skupinu uz primjenu VEGF neposredno prije detorzije te lažno operiranu skupinu. Bilateralna orhidektomija vršena je 60-ti dan po torziji. Mjerali su MSTD te broj stanica pozitivnih na kaspazu-3. Uspoređujući vrijednosti za ipsilateralne testise našli su statistički značajne razlike dok su one za kontralateralne testise izostale. Intenzivna era istraživanja na antioksidansima i njihova primjena u sprječavanju ishemijsko-reperfuzijske ozljede testisa počela je 2004. godine, a traje i dan danas s obzirom da se svakodnevno otkrivaju sve jači i djelotvorniji antioksidansi. Unsal i sur. (166) eksperimentiraju s propofolom, široko poznatim intravenskim anestetikom. S obzirom da se u prethodnim studijama (167,168) pokazao kao dobar antioksidans željeli su istražiti učinak istoga po torzijsko-detorzijskoj ozljedi testisa. 35 odraslih štakora podijelili su u 5 skupina; kontrolnu skupinu kojoj nije rađena manipulacija, lažno operiranu, skupinu kojoj je učinjena torzija od 720° tijekom 2 sata, skupinu kojoj je učinjena torzija od 720° tijekom 2 sata te detorzija također u trajanju od 2 sata, skupinu kojoj je 30 min prije detorzije davan propofol. Iz homogenata tkiva testisa mjerili su vrijednosti MDA, XO, CAT i GPx. Razine MDA i CAT bile su statistički značajno niže u skupini 5 u odnosu na skupinu 4. Također, na temelju ohrabrujućih prethodnih studija (169-171), sa selenom kao sastojkom GPx, eksperimentiraju Avlan i sur. (172). 32 štakora bilo je podijeljeno u 4 skupine; lažno operiranu, lažno operiranu s intraperitonealno primijenjenim selenom, skupinu kojoj je učinjena torzija od 720° (4h) i detorzija (4h) te skupinu kojoj je također učinjena torzija i detorzija ali s intraperitonealno davanim selenom 20 min. prije detorzije. Kod svih skupina učinjene su bilateralne orhidektomije radi daljnjih biokemijskih istraživanja. Određivane su vrijednosti MDA i SOD. Smanjene vrijednosti MDA te povišene vrijednosti SOD u skupini 4 (ipsilateralno i kontralateralno) bile su statistički značajne u odnosu na skupinu 3. Učinak resveratrola ispitali su Uguralp i sur. (173). Četrdeset Wistar štakora podijelili su u 4 skupine. Skupinama je učinjena torzija od 720° u trajanju od 4 sata, osim kontrolnoj. Detorkviranim skupinama kod kojih je detorzija trajala 20 sati, 30 min. prije same detorzije intraperitonealno je primijenjena fiziološka otopina odnosno resveratrol. Po eksperimentalno ostvarenom cilju testisi su orhidektomirani te su iz homogenata istih određivane vrijednosti MDA i glutationa (GSH). Razina MDA u skupini liječenoj resveratrolom bila je statistički značajno manja, dok je razina GSH bila statistički značajno veća u usporedbi s skupinama gdje je učinjena samo torzija odnosno torzija/detorzija uz primjenu fiziološke otopine. Studija je pokazala da intraperitonealno davanje resveratrola može zaštititi testis po ishemijsko-reperfuzijskoj ozljedi. Iste godine Uguralp i sur. (174) objavljuju i svoj drugi znanstveni rad temeljem istog uzorka. Analizirali su broj apoptotičnih stanica pozitivnih na kaspazu-3. Broj ovih stanica bio je statistički značajno manji u skupini kojoj je ordiniran resveratrol te su i tim radom potvrdili prethodno postavljenu hipotezu. Kako su istraživanja pokazala da melatonin nije samo hormon koje nam pomaže kod spavanja već da je i odličan antikarcinogen i antiooksidans, Ozturk i sur.

(175) eksperimentiraju s melatoninom na način da ga ordiniraju profilaktički nadajući se da će djelovati na reperfuzijsku fazu torzijsko-detorzijske ozljede. Razine MDA mjerene su u tkivu i u serumu po prvi puta. I u serumu i u tkivu, skupina kojoj je ordiniran melatonin pokazala je statistički značajno manje vrijednosti MDA. Nakon dokazanih uspjeha s cink aspartatom (ZA) (176,177), Ozkan i sur. (178) podijelili su štakore u 4 skupine. Jednoj skupini po 4-satnoj torziji od 720° te 4-satnoj detorziji pola sata prije detorzije davan je cink aspartat. Mjerili su vrijednosti MDA, SOD i CAT. Vrijednosti MDA su bile statistički značajno niže, dok su vrijednosti SOD i CAT bile statistički značajno više u skupini na kojoj je primijenjen ZA. Analogno biokemijskim rezultatima i histološki verificirana oštećenja bila su statistički značajno manja. Antioksidans erdostein također je pokazao protektivno djelovanje. U istraživanju Koc-a i sur. (179) životinje su također bile podijeljene u 4 skupine: kontrolnu, onu na kojoj je izvršena torzija sjemenika (720°, 2h), potom torzija (2h)/detorzija (4h), torzija/detorzija te primjena erdosteina (2 dana prije operacije). Vrijednosti MDA i XO bile su statistički značajno niže u skupini kojoj je davan erdostein, dok su vrijednosti GSH i CAT bile statistički značajno više. Popratna histološka evaluacija također je govorila u prilog manjeg oštećenja u skupini u kojoj je primijenjen erdostein. Uspoređujući rezultate za kontralateralni testis, isti nisu pokazivali statistički značajne razlike između skupina. Salmasi i sur. (180) na temelju obećavajućih rezultata smanjenja ishemijsko reperfuzijske ozljede srca štakora i bubrega kunića (181,182) eksperimentiraju s morfinom. 36 odraslih Sprague-Dawley štakora podijelili su u 6 skupina. Skupini od interesa po torziji sjemenika od 720° u trajanju od jednog sata i detorziji u trajanju od 4 sata davan je morfin sulfat neposredno pred detorziju. Izmjerene vrijednosti MDA, CAT, SOD i GPx govore su u prilog zaključka da primjena morfina ima protektivan učinak na torzijsko-detorzijsku ozljedu testisa. N-acetilcistein (NAC), kao prekursor glutationa, u istraživanju Cay-a i sur. (183) pokazao je također protektivan efekt. Eksperimentalnoj skupini vršena je torzija od 720° u trajanju od 5 sati te detorzija u trajanju od 2 sata. NAC je primijenjen intravenski neposredno prije detorzije. Vrijednosti MDA su bile značajno niže, a vrijednosti GSH značajno više u odnosu na ostale skupine. Unsal i sur. (184) eksperimentiraju s ekstraktom češnjaka kojeg su štakorima davali putem gastične sonde 5 dana prije torzije testisa. Torzija (720°) i detorzija trajale su po 2 sata. Putem dobivenih vrijednosti MDA i XO zaključili su da ekstrakt češnjaka ima protektivno djelovanje. Može li gabeksat mesilat (inhibitor serinske proteaze) utjecati na smanjenje ishemijsko reperfuzijske ozljede testisa, na temelju prethodnih studija (185,186), zanimalo je Gezici-ja i sur. (187). Eksperimentalnoj skupini rađena je torzija od 720° tijekom 6 sati i detorzija u trajanju od jednog sata. Gabeksat mesilat je primijenjen u trenutku detorzije. Statistički značajno smanjene vrijednosti MDA i statistički značajno povišene vrijednosti SOD, CAT i GPx govore su u prilog protektivnog djelovanja ovoga spoja. Antiagregacijskim lijekom trapidilom bavili su se Somuncu i sur. (188). 40 prepubertalnih Wistar štakora podijelili su u 4 skupine: lažno operiranu, lažno operiranu kojoj je davan trapidil, torzijsko (720°, 2h) detorzijsku (4h), torzijsko-detorzijsku na koju je primijenjen trapidil (intraperiotenalno 1h prije detorzije). Izvršena su biokemijska i histološka istraživanja na ipsilateralnim i kontralateralnim testisima. Za ipsilateralne testise vrijednosti MDA i NO bile su statistički značajno niže u skupini kojoj je ordiniran trapidil u odnosu na skupinu bez trapidila, dok za kontralateralne testise nije bilo statistički značajne razlike između skupina. Također su za terapijsku skupinu zabilježena i statistički značajno manja histološka oštećenja. S obzirom na utjecaj L-karnitina na sportske performanse kod ljudi, nije ga zaobišao ni interes

od strane Dokmeci-ja i sur. (189). Osim što je dobar antioksidans pokazao je da ima učinke i na pokretljivost spermija (190-192). Istraživači su životinje podijelili u 4 skupine: lažno operiranu, torzijsku (720°, 5h), torzijsko (5h) detorzijsku (5h), torzijsko-detorzijsku uz primjenu L-karnitina (30 min prije detorzije). Za potrebe biokemijskih istraživanja određivana je vrijednost MDA, a za potrebe histoloških mjeren je MSTD. Vrijednosti MDA bile su statistički značajno manje i u ipsilateralnim i u kontralateralnim testisima ispitivane skupine. Interesantno je primijetiti da su rezultati mjerenja MSTD-a pokazali statistički značajno poboljšanje za kontralateralni testis, ali ne i za ipsilateralni. Provitaminom B5 bavili su se Etensel i sur. (193). Jedni su od prvih autora koji, osim što ispituju eventualni protektivni učinak spoja, eksperimentiraju i s dozama istoga. Mjerili su vrijednosti MDA u tkivu i serumu. Statistički značajan pad vrijednosti MDA u tkivu i serumu zabilježili su samo u skupini kojoj je davana duplo veća doza dekspanetnola, što je svakako otvorilo vidike da doza primijenjenog ispitivanog spoja može igrati odlučujuću ulogu. Interesantno istraživanje, kao nadopuna istraživanju Unsal-a i sur. (166), svijetu su prezentirali Yagmurur i sur. (194). Uspoređivali su vrijednosti MDA i NO kod torzijsko-detorzijske ozljede testisa štakora s time da su dvjema skupinama anesteziju inducirali i održavali tiopentalom a drugim dvjema propofolom. Životinje koje su anestezirane propofolom imale su statistički značajno manje vrijednosti MDA i NO te statistički značajno manja histološka oštećenja mjerena stupnjevima po Cosentinu (195). Alfa lipoična kiselina u studiji Guimarães-a i sur. (196) pokazala je protektivno djelovanje. Vrijednosti MDA, bez obzira na postishemijsko vrijeme uzorkovanja uzorka, bile su statistički značajno manje u skupini na kojoj je primijenjena alfa lipoična kiselina u odnosu na skupinu kojoj je davana fiziološka otopina. Trimetazidin, istaknuti inhibitor beta-oksidacije masnih kiselina, zaintrigirao je Unal-a i sur. (197). Primijenjen je trećeg dana nakon detorzije. Određivane su vrijednosti MDA, GSH, GPx te modificirana Johnsenova vrijednost („skor“). Dobivene vrijednosti govore su u prilog zaključka da trimetazidin ima protektivan učinak. Neesencijalnom kiselinom taurinom bavili su se znanstvenici iz Kine. Određivanjem vrijednosti mijeloperoksidaze i MDA te histološkom evaluacijom spermatogeneze zaključili su da ovaj antioksidans ima blagotvoran učinak po ishemijsko-reperfuzijskoj ozljedi tkiva testisa. Prva studija koja je prepoznala karotenoide kao potencijalne antioksidanse u domeni ishemijsko-reperfuzijske ozljede testisa pojavljuje se 2009. godine. Hekimoglu i sur. (199) istražuju učinke likopena. Tretman likopenom, koji je ordiniran tijekom 30 dana po detorziji, povećao je pokretljivost te smanjio broj abnormalnih spermija. Također je u eksperimentalnoj skupini kojoj je davan likopen došlo do povećanja aktivnosti CAT i GPx. Erol i sur. (200) eksperimentiraju s koenzimom Q10, koji je primijenjen intraperitonealno 30 min. prije detorzije te dobivaju zadovoljavajuće rezultate. Razina MDA bila je statistički značajno manja. Već se tih godina može vidjeti kako se stupanj torzije od 720° ujednačio u svim istraživanjima što je omogućilo usporedivost rezultata. Izuzetno jakim neuroprotektivnim lijekom ederavonom koji se koristi kod cerebralne ishemije bave se Tamamura i sur. (201). Pokazao se kao dobar protektivni spoj u ishemijsko-reperfuzijskoj ozljedi mozga, srca, jetre i crijeva (202-205). Ederavon su primijenili sat vremena prije torzijsko (30 min.) detorzijske (60 min.) ozljede. Osim vrijednosti MDA mjerene su i vrijednosti proteina toplinskog šoka (HSP). Vrijednosti i jednih i drugih bile su statistički značajno manje u odnosu na skupine kojoj nije davan ederavon. U ispitivanju timokinona znanstvenici su koristili model c57bl/6 miša (206). Također su radili torziju od 720° (vrijeme torzije – 2h, vrijeme detorzije – 4h). Timokinon je ordiniran

intraperitonealno 30 min prije detorzije. Vrijednosti MDA te razina histoloških oštećenja bile su statistički značajno manje u skupini kojoj je ordiniran timokinon. Paradigma da se znanstvenici dominantno okreću prirodnim spojevima, vidi se i na primjeru istraživanja bioflavonoida rutina (207). Intravenski primijenjen rutin, za vrijeme trajanja detorzije, statistički je značajno utjecao na smanjenje vrijednosti MDA i povećanje vrijednosti CAT i SOD. Učinkom ekstrakta sjemenki crvenoga grožđa bave se Bayatli i sur. (208). Ordiniran je svakodnevno tjedan dana prije torzijsko (2h) detorzijske (2h) ozljede od 720°. Određivane su vrijednosti MDA, SOD, MSTD i indeks apoptoze TUNEL tehnikom. Sve dobivene vrijednosti govore u prilog protektivnog učinka ekstrakta sjemenki crvenog grožđa. Osim antioksidansa također se ispituju i možebitni pozitivni učinci dobro znanih spojeva poput diklofenaka (209), sulfasalazina (210), ibuprofena (211), eritropoetina (215-217) i ginka (218-220). Nesteroidni protuupalni lijek diklofenak (inhibitor sinteze prostaglandina) koristi se u mnogim poremećajima testisa. Cilj istraživanja Mogilner-a i sur. (209) bio je ispitati možebitni protektivni učinak diklofenaka na torzijsko-detorzijsku ozljedu testisa. Diklofenak je ordiniran supkutano svakih 24 sata 3 dana po torziji. Mjerili su broj apoptotičnih sjemenskih stanica TUNEL tehnikom te su izračunavali Johansenovu vrijednost („skor“). Primijetili su da diklofenak u kontrolnim lažno operiranim skupinama povećava apoptozu sjemenskih stanica, dok u torzijsko-detorzijskim skupinama taj učinak inhibira čime ima protektivno djelovanje. Zhao i sur. (210) ispituju učinak intraperitonealno davanog sulfasalazina (inhibitor NF- κ B). Mjerenjem indeksa apoptoze zaključili su da sulfasalazin sprječavanjem aktivacije NF- κ B može spriječiti apoptozu sjemenskih stanica nakon torzijsko-detorzijske ozljede. Rani i kasni učinak ibuprofena (ovisno o neposrednom ili s odgodom od 7 dana učinjenom orhidektomijom) ispitali su Dokmeci i sur. (211). Mjerenjem MSTD i MDA zaključili su da neposredno dani ibuprofen 40 minuta prije detorzije ima protektivan učinak i na ipsilateralni i na kontralateralni testis, dok ibuprofen, davan jednom dnevno kroz 7 dana (do trenutka orhidektomije), ima učinak samo na kontralateralni testis. Nakon studija koje su donijele dokaze da eritropoetin (EPO) ima antiapoptotički, protuupalni i antioksidacijski učinak te da intravenski primijenjen EPO povisuje proizvodnju testosterona u bolesnika sa zatajenjem bubrega (212-214), autori su se pitali može li EPO imati blagotvoran učinak na torzijsko-detorzijsku ozljedu testisa. Yazihan i sur. (215) primijenili su ga pola sata prije, odnosno pola sata poslije trenutka detorzije i to na modelu Sprague-Dawley štakora kojima je rađena torzija od 720° u trajanju od jednoga sata i detorzija u trajanju 4 sata. Mjerili su vrijednosti citokina TNF α , IL-1 i IL-6, kaspaze-3 te nitrita. I kod ipsilateralnih i kod kontralateralnih testisa zabilježene su statistički značajno manje vrijednosti koje su govore u prilog protektivnog učinka eritropoetina. Ergur i sur. (216) također su ga istraživali na modelu Wistar štakora pri torziji od 720° u trajanju od 2 sata te detorziji istog trajanja. Apoptoza zametnih stanica mjerena je TUNEL tehnikom te kaspaza-3 imunohistokemijskom metodom. Histološki su mjereni MSTD i debljina sjemenskog epitela (GECT), dok su biokemijski određivane vrijednosti SOD i GPx. Svi rezultati (smanjen apoptotički indeks, veći promjer kanalića i debljina epitela, više vrijednosti SOD i GPx) govore u prilog blagotvornog učinka. I patohistološki rezultati Köseoğlu-a i sur. (217) govore u prilog protektivnog učinka eritropoetina po torzijsko-detorzijskoj ozljedi. Ginko biloba stoljećima je poznata kao ljekovita biljka. Većina ljudi pozna ju kao lijek za pamćenje. Akgül i sur. (218) istražili su učinke peroralnog uzimanja ginka mjesec dana prije torzijsko-detorzijske ozljede kod Wistar štakora. Mjerenjem MDA, nitrata i nitrita te histološkom

evaluacijom oštećenja dobili su statistički značajne razlike između skupina čime su zaključili da ginko ima protektivan učinak. Također su zaključili da bi bilo korisno ispitati i antiapoptotički učinak. Godinu dana kasnije, u istom časopisu temeljem istoga uzorka, iznijeli su rezultate iz kojih je vidljivo statistički značajno smanjenje broja apoptotičnih stanica u skupini kojoj je ordiniran ginko. Kanter je dvije godine kasnije, primjenjujući ginko 40 minuta prije detorzije, evaluirajući biokemijske, histološke i imunohistokemijske rezultate također došao do zaključka da ginko ima protektivni učinak na torzijsko-detorzijsku ozljedu testisa u štakora. Unazad četiri godine, od kada je osmišljen koncept ove disertacije te za vrijeme izrade iste, u znanstvenoj zajednici, na globalnoj razini, dogodila se eksplozija istraživanja u području torzijsko-detorzijske ozljede testisa. Dominantno se, poput sadašnjeg istraživanja, ispituju mogući protektivni učinci određenih novih spojeva koje svakodnevno otkrivaju kemičari diljem svijeta. Osim potentnih antioksidansa (221-233), ispituju se i antihipertenzivi, sedativi, antikoagulansi, antimikrobni lijekovi, antidepresivi, antidijabeteci, antilipemici (234-251) te hormoni (252,253). Većina ispitanih spojeva pokazala je protektivan učinak s većim ili manjim uspjehom. U posljednjih 20-tak godina astaksantin je privukao pažnju istraživača diljem svijeta te iz dana u dan svjedočimo sve brojnijim radovima koji istražuju učinke astaksantina. Temeljem niza studija Kishimoto i sur. (254) donose pregled koji govori o dokazanom potencijalu astaksantina da inhibira oksidaciju LDL-a te da povećava razinu HDL-a. Iz Japana dolazi studija koja govori o zaštitnom učinku astaksantina na djelovanje ultravioletnog zračenja (255). Otsuka i sur. (256) donose zaključak da astaksantin ima protektivno djelovanje po ishemijsko-reperfuzijskoj ozljedi mrežnice izazvanoj ligacijom arterije. Na modelu kroničnog autoimunog encefalomijelitisa C57BL/6 miševa Bidaran i sur. (257) zaključuju da astaksantin može biti moćan alat u liječenju multiple skleroze. Eren i sur. (258) topičkom primjenom astaksantina ispituju njegova antioksidativna djelovanja te smatraju da bi bio koristan u „*anti-aging*“ tretmanima koji u posljednje vrijeme uzimaju sve više maha. Comhaire i sur. (259) izvješćuju da bi astaksantin, s obzirom na poboljšane parametre sjemenja, mogao biti koristan u liječenju neplodnosti u muškaraca. O povećanoj razini serotonina u hipokampusu, prednjem korteksu i hipotalamusu kao rezultatu djelovanju trans-astaksantina izvijestili su Jiang i sur. (260). Podatci iz studije Mosaad-a i sur. (261) sugeriraju da astaksantin ima značajno profilaktičko djelovanje protiv nefrotoksičnosti izazvane gentamicinom. O protektivnom učinku derivata astaksantina na intracerebralno krvarenje izvješćuju Iwata i sur. (262). Hipotezu da će unos astaksantina smanjiti atrofiju mišića po imobilizaciji potvrdili su Shibaguchi i sur. (263). Na modelu kunića dokazan je blagotvoran učinak intraartikularne primjene astaksantina na razvoj degenerativnih promjena hrskavice pri osteoartritisu (264). O učinku astaksantina na stanice adenokarcinoma želudca govore Kim i sur. (265). O radioprotektivnom učinku svjedoči istraživanje ukrajinskih autora (266). Još jedno interesantno istraživanje dolazi iz Japana. Tamošnji istraživači ustvrdili su da astaksantin ima protektivan učinak na opterećenje i upalu glasnica u profesionalnih pjevača (267). Na *in vivo* i *in vitro* modelima Shen i sur. (268) došli su do spoznaje o protektivnom učinku astaksantina na fibrozu, a posljedično tome i cirozu jetre. O gastroprotektivnom učinku izvješćuju Kamath i sur. (269). Zaključci studije Naito-a i sur. (270) sugeriraju da antioksidativno djelovanje astaksantina može prevenirati dijabetičku nefropatiju. O protektivnom učinku trans-astaksantina na modelu osteosarkoma psa izvješćuju znanstvenici iz SAD-a (271). Iako nije pronađen kurativni učinak astaksantina kod bolesnika s funkcionalnom dispepsijom, smanjenje simptoma refluksa otkriveno je kod bolesnika liječenih

najvišom dozom (272). U eksperimentalnom modelu parodontitisa astaksantin je pokazao da utječe na povećanje osteoblastične i smanjenje osteoklastične aktivnosti (273). Istraživanje na staničnoj kulturi sugerira da astaksantin može prevenirati rak debelog crijeva (274). Zhao i sur. (275) govore o sjajnom uspjehu u liječenju sepse i multiorganske disfunkcije. Osim ishemijsko reperfuzijske ozljede mrežnice učinak astaksantina ispitan je i kod ishemijsko reperfuzijske ozljede jetre i mišića s jednako optimističnim rezultatima koji govore u prilog protektivnog učinka (276,277). O astaksantinu kao zaštitniku zametnih stanica, ciklofosfamidom tretiranih miševa, govore Tripathi i Jena (278). Pokazalo se da astaksantin kroz regulaciju ekspresije upalnih citokina ima blagotvoran učinak u atopijskom dermatitisu (279). Ishemijsko reperfuzijskom ozljedom miokarda bavila se skupina istraživača pod vodstvom Lauver-a. Zaključili su kako u smanjenju štete dinatrijev disukcinat astaksantin ima blagotvoran učinak (280). Xuan i sur. (281) rade istraživanja vezana uz preeklampsiju te dobivaju optimistične rezultate. Pozitivan učinak astaksantina na steroidogenezu i Leydigove stanice opisali su Wang i sur. (282). Ispitivanje učinka astaksantina na opeklinску ozljedu i cijeljenje iste proveli su Fang i sur. (283). Zaštitne učinke astaksantina na ishemijsko reperfuzijsku ozljedu bubrega na modelu miša istražili su Qiu i sur. (284). U ovom trenutku, u tijeku su zasigurno desetci, a možda i stotine istraživanja koja žele dokazati možebitni protektivni učinak ovog snažnog antioksidansa. U našem istraživanju istraživali smo učinak astaksantina po torzijsko-detorzijskoj ozljedi testisa u štakora. Do trenutka prijave teme disertacije, a i u trenutku pisanja iste, u međunarodno indeksiranim znanstvenim časopisima nije publiciran niti jedan rad na navedenu temu. Također je važno napomenuti da do današnjeg dana u kliničkoj praksi ne postoji farmak koji se daje pacijentima po torzijsko-detorzijskoj ozljedi testisa. Kada se raspravlja o navedenoj temi nekoliko je odlučujućih čimbenika koje treba uzeti u obzir da bi se rezultati mogli usko uspoređivati. To su dob životinja na kojima se vrši torzija odnosno detorzija testisa, trajanje torzije i detorzije, stupanj torzije, način prekida cirkulacije (ligacija sjemenskog snopa ili manualna torzija), trenutak orhidektomije, način primjene farmaka i doza danog farmaka. Rezultatima našeg istraživanja utvrdili smo da astaksantin (u dozi od 75mg/kg primijenjen intraperitonealno kod 35 dana starih štakora kod kojih je torzija od 720° vršena manualno u trajanju od 90 minuta te kod kojih je astaksantin primijenjen u trenutku detorzije, odnosno 45 minuta po detorziji) povoljno djeluje na ishemijsko-reperfuzijsku ozljedu tkiva testisa. Iako smo u specifičnim ciljevima, u domeni ove disertacije, naveli da ćemo, što se tiče histoloških istraživanja, određivati samo srednji promjer sjemenskih kanalića i Johnsenovu vrijednost bili smo ponukani da odredimo još neke dodatne parametre poput srednjeg promjera lumena kanalića, površinu tubularnog i luminalnog područja te visinu zametnog epitela. Rezultati dodatnih histoloških istraživanja dio su publiciranog rada objavljenog u *Journal of Pediatric Urology*. Rezultati srednjeg promjera sjemenskih kanalića i Johnsenovog skora bolji su u skupinama tretiranim astaksantinom (skupina 3 i 4) u odnosu na torzijsko/detorzijsku skupinu (skupina 2). Što se tiče imunohistokemijskog dijela istraživanja također smo utvrdili da postoji značajan pad broja pozitivnih stanica na kaspazu-3 u ASX skupinama u odnosu na skupinu 2. Biokemijskim istraživanjima utvrđen je primjetan pad vrijednosti malondialdehida te porast enzimske aktivnosti superoksid dismutaze i glutation peroksidaze u skupini 4. Očekivalo bi se da bi rezultati svih varijabli mogli biti bolji u skupini 3 u odnosu na skupinu 4 jer se u skupini 3 astaksantin primjenjivao u trenutku detorzije, ali se ispostavilo da su rezultati svih varijabli bolji u skupini 4. Odgovor na mogući uzrok dobivenih rezultata nalazi se u

činjenici da tromost povratnog krvotoka može ograničiti vaskularni kapacitet za isporuku odgovarajućih doza antioksidansa u testise tijekom neposrednog razdoblja nakon torzije. Raznolike studije pokazale su da je prvih 60-90 minuta nakon početne reperfuzije kritično vrijeme u kojem će doći do toksičnog izbijanja radikala kisika. Iako do sada nije publiciran niti jedan rad, u međunarodno indeksiranom znanstvenom časopisu, koji je proučavao učinak astaksantina na ishemijsko reperfuzijsku ozljedu testisa kod štakora, istraženi su učinci njegovog prekursora likopena. Hekimoglu i sur. (199) istraživali su histopatološke promjene nakon jednosatne ishemijske vaskularnom stezaljkom i dvadesetčetverosatne reperfuzije. Skupina koja je primila likopen pokazala je statistički značajno bolje rezultate Johnsenovog rezultata ($p < 0,05$), u usporedbi sa skupinom u kojoj je izvršena samo torzija-detorzija. Analogno našem istraživanju, Hekimoglu i sur. ustvrdili su da se vrijednosti GPx aktivnosti, u skupini kojoj je davan likopen, približavaju vrijednostima lažno operirane skupine što govori u prilog protektivnog djelovanja. Opet moramo ukazati na činjenicu da bi se, analogno našem istraživanju, u pretkliničkim istraživanjima ishemija trebala provoditi manualnom torzijom, a ne podvezivanjem žila vaskularnom stezaljkom jer torzija u početku začepљуje vene, ali ne i arterije te tako uzrokuje djelomičnu ishemiju u ranom razdoblju torzije. Güzel i sur. (285) istraživali su učinak intraperitonealnog davanja likopena. U njihovom modelu, torzija od 720° trajala je dva sata, nakon čega se davao likopen tri i deset dana u dozi od 20mg/kg/dan. Rezultati srednjeg promjera sjemenskih kanalića i Johnsenovog skora bili su viši u skupini koja je primala likopen tri dana intraperitonealno u usporedbi s grupom bez likopena. Također je u istoj skupini TUNEL tehnikom uočen manji broj apoptotičnih stanica dok su se vrijednosti MDA smanjivale u obje skupine koju su kroz tri i deset dana primale likopen. Kada se uspoređujemo s istraživanjima Hekimoglu-a i sur. te Güzel-a i sur. moramo napomenuti da smo u našem istraživanju istraživali učinak astaksantina na prepubertetskim štakorima zbog dobro poznate činjenice da se torzija testisa kod ljudi javlja prvenstveno u adolescenciji i preadolescenciji (prepubertalni testis štakora po svom je statusu sličan ranom adolescentnom humanom testisu koji obično doživljava učinke torzije)(286). Također je važno napomenuti da su Hekimoglu i sur., u odnosu na Güzel-a i sur., likopen davali gavažom. Način primjene potencijalnog farmaka od velikog je značaja s obzirom da su u pogledu astaksantina neke studije pokazale ograničenja nakon oralne primjene poput niske stabilnosti, biorasploživosti i bioefikasnosti, otkrivajući potrebu za primjenom novih biomaterijala koji djeluju kao nositelji *in vivo* (287). S obzirom na to da su znanstvenici u posljednje vrijeme sve više zainteresirani za antioksidanse dobivene iz mikroalgi, za očekivati je da će mnogi od njih pronaći primjenu u kliničkoj medicini. Do danas nema kliničkih studija o učinku astaksantina na ishemijsko-reperfuzijsku ozljedu testisa kod ljudi. U pogledu muškog reproduktivnog sustava, Comhaire i sur. (259) davali su astaksantin neplodnim muškarcima i uočili pozitivne učinke na parametre sperme i plodnost. Za optimalnu primjenu, farmakokinetika i farmakodinamika astaksantina moraju se detaljno istražiti. Istraživanja na ovu temu nisu dovršena (288,289). Također, ne smije se zanemariti činjenica postojanja krvno-testisne barijere, kao ni njezine promjene uslijed ishemijske (290). Vjerujemo da će jednog dana ti snažni antioksidanti biti primjenjivi u kliničkoj praksi.

7. Zaključak

Temeljem rezultata provedenog istraživanja zaključeno je sljedeće:

- općeniti zaključak je da intraperitonealno davanje astaksantina u dozi od 75 mg/kg ima povoljan učinak na torzijsko detorzijsku (ishemijsko reperfuzijsku) ozljedu testisa u štakora
- srednji promjer sjemenskih tubula (MSTD) statistički se značajno povećava u skupinama kod kojih je primijenjen astaksantin u odnosu na netretiranu torzijsko detorzijsku skupinu [$p(2/3)=0,001$, $p(2/4)<0,0001$]. MSTD je statistički značajno viši u skupini u kojoj je astaksantin primijenjen 45 minuta od trenutka detorzije (skupina 4), u odnosu na skupinu u kojoj je astaksantin primijenjen u trenutku detorzije (skupina 3) [$p(3/4)=0,038$]
- Johnsen-ova vrijednost statistički se značajno povećava u skupinama kod kojih je primijenjen astaksantin u odnosu na netretiranu torzijsko detorzijsku skupinu [$p(2/3, 2/4)<0,0001$]. Johnsen-ova vrijednost statistički je značajno viša u skupini u kojoj je astaksantin primijenjen 45 minuta od trenutka detorzije, u odnosu na skupinu u kojoj je astaksantin primijenjen u trenutku detorzije [$p(3/4)<0,0001$]
- broj stanica pozitivnih na kaspazu-3 statistički je značajno manji u skupini u kojoj je astaksantin primijenjen 45 minuta od trenutka detorzije u odnosu na netretiranu torzijsko detorzijsku skupinu [$p(2/4)=0,016$]
- primjetan je pad vrijednosti malondialdehida u skupini u kojoj je astaksantin primijenjen 45 minuta od trenutka detorzije u odnosu na netretiranu torzijsko detorzijsku skupinu
- primjetno je statistički značajno povećanje enzimске aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) u skupini u kojoj je astaksantin primijenjen 45 minuta od trenutka detorzije u odnosu na netretiranu torzijsko detorzijsku skupinu i skupinu u kojoj je astaksantin primijenjen u trenutku detorzije [$p(2/4)=0,010$, $p(3/4)=0,000$]
- primjetno je povećanje enzimске aktivnosti glutacion peroksidaze (GPx) u prvoj, drugoj, trećoj, četvrtoj, petoj i šestoj minuti, u skupini u kojoj je astaksantin primijenjen 45 minuta od trenutka detorzije u odnosu na netretiranu torzijsko detorzijsku skupinu i skupinu u kojoj je astaksantin primijenjen u trenutku detorzije
- odgovor na pitanje zašto su vrijednosti promatranih parametara povoljnije u skupini u kojoj je astaksantin primijenjen 45 minuta od trenutka detorzije u odnosu na skupinu u kojoj je astaksantin primijenjen u trenutku detorzije vjerojatno se nalazi u činjenici da tromost povratnog krvotoka može ograničiti vaskularni kapacitet za isporuku odgovarajućih doza antioksidansa u testise tijekom neposrednog razdoblja nakon detorzije

- kao i većina studija i ova ima nekoliko ograničenja;
 - važno je napomenuti da smo se u našem istraživanju usredotočili na akutni učinak i akutne promjene nakon ishemijsko-reperfuzijske ozljede. U kliničkom okruženju, prosječno vrijeme od torzije do kirurške intervencije (detorzije) često se proteže i preko 90 minuta (o tome ovisi niz čimbenika; udaljenost od bolnice, djetetova signalizacija od početka boli, dječakova sramežljivost itd.). Da bi oponašala postavke stvarnog života, studiji bi koristilo produženje vremena od torzije do detorzije
 - astaksantin je primijenjen intraperitonealno kako je najprikladnije za ovaj model. Svjesni smo da su oralni i intravenski načini primjene prikladniji za primjenu kod ljudi, ali kako su u tijeku detaljnija farmakokinetička i farmakodinamska ispitivanja, smatramo da je intraperitonealno davanje više nego zadovoljavajuće za ispitivanje astaksantina kao potencijalnog snažnog antioksidansa u prevenciji ishemijsko-reperfuzijske ozljede
 - primijenjena je doza od 75 mg/kg, ali smatramo da se u budućim studijama doza može smanjiti kako bi se doza zadržala u rasponu koji se trenutno preporučuje za ljudsku primjenu
 - da bi se odgovorilo na pitanje koje je optimalnije vrijeme za primjenu astaksantina, trebalo bi dodati još nekoliko skupina kojima bi se astaksantin davao u različito vrijeme od trenutka detorzije
 - s obzirom na dobro poznate činjenice učinka ishemijsko-reperfuzijske ozljede ipsilateralnog testisa na kontralateralni testis, njih bi svakako trebalo istražiti u budućim istraživanjima

8. Sažetak

Naslov: Učinak astaksantina na torzijsko-detorzijsku ozljedu testisa u štakora

Student: Marko Bašković, dr. med.

Godina: 2021.

Uvod: Torzija testisa jedno je od stanja akutnog skrotuma koje zahtijeva hitnu kiruršku intervenciju. Ako se ne prepozna na vrijeme može rezultirati ishemijskom ozljedom i gubitkom testisa. Obnova krvotoka ključna je za spašavanje ishemičnog tkiva, ali sama reperfuzija paradoksalno uzrokuje daljnju štetu. Morske alge i spužve smatraju se najbogatijim izvorom bioaktivnih spojeva koji imaju antioksidativno djelovanje. Antioksidativno djelovanje astaksantina 10 puta veće je od zeaksantina, luteina, kantaksantina, β -karotena i 100 puta veće od α -tokoferola. Budući da do danas ne postoji lijek koji se daje pacijentima s torzijsko-detorzijskom ozljedom testisa, istražen je učinak ovog snažnog antioksidansa.

Cilj: Cilj ovog istraživanja bio je istražiti učinak astaksantina (ASX) na torzijsko detorzijsku ozljedu testisa u štakora.

Materijali i metode: Trideset i dva prepubertalna muška štakora soja Fischer podijeljena su u 4 skupine od po 8 jedinki. Skupina 1 podvrgnuta je lažnoj operaciji kako bi se utvrdile bazalne vrijednosti za histološke, imunohistokemijske i biokemijske analize. U skupini 2 (torzijsko-detorzijska skupina (T/D)) desni je testis torkviran za 720° tijekom 90 minuta. Nakon 90 minuta reperfuzije testis je uklonjen. Astaksantin je primijenjen intraperitonealno u vrijeme detorzije (skupina 3) i 45 minuta nakon detorzije (skupina 4) u tretiranim skupinama. Za potrebe histološke i imunohistokemijske evaluacije koristili smo se ImageJ® softverom. U svrhu određivanja vrijednosti malondialdehida te enzimskih aktivnosti superoksid dismutaze i glutacion peroksidaze korišteni su standardni kitovi i protokoli.

Rezultati: Na razini značajnosti od 5% vrijednosti srednjeg promjera sjemenskih tubula statistički se značajno povećavaju u ASX skupinama u usporedbi s T/D skupinom. Johnsen-ov skor statistički je značajno veći u ASX skupinama u odnosu na T/D skupinu. Broj stanica pozitivnih na kaspazu-3 statistički je značajno manji u skupini 4 u odnosu na T/D skupinu. Primjetan je pad vrijednosti malondialdehida u skupini 4 u odnosu na T/D skupinu. Primjetno je povećanje enzimske aktivnosti superoksid dismutaze i glutacion peroksidaze u skupini 4 u odnosu na T/D skupinu i skupinu 3.

Zaključak: Temeljem rezultata histoloških (prosječnog promjera sjemenskih kanalića, procjene očuvanosti spermatogeneze po Johnsen-u), imunohistokemijskih (broja stanica pozitivnih na kaspazu-3) i biokemijskih (vrijednosti malondialdehida, vrijednosti enzimskih antioksidansa superoksid dismutaze i glutacion peroksidaze) istraživanja može se zaključiti da astaksantin ima protektivan učinak na torzijsko detorzijsku ozljedu testisa u štakora.

Ključne riječi: astaksantin; testis; torzija-detorzija; ishemijsko-reperfuzijska ozljeda

9. Summary

Title: The effect of astaxanthin on testicular torsion-detorsion injury in rats

PhD student: Marko Bašković, MD

Year: 2021.

Introduction: Testicular torsion is one of the conditions of the acute scrotum that requires immediate surgical intervention. If not recognized at the time, it can result in ischemic injury and testicular loss. Restoration of blood flow is essential to save ischemic tissue, but reperfusion itself paradoxically causes further damage. Seaweed and sponges are considered to be the richest source of bioactive compounds that have antioxidant activity. The antioxidant activity of astaxanthin is ten times higher than zeaxanthin, lutein, canthaxanthin, β -carotene and 100 times higher than α -tocopherol. Since, to date, there is no drug given to patients with torsion-detorsion testicular injury, we have investigated the effect of this powerful antioxidant.

Objective: This study aimed to investigate the effect of astaxanthin (ASX) on testicular torsion-detorsion injury in rats.

Materials and Methods: Thirty-two prepubertal male Fischer prepubertal rats were divided into four groups of 8 individuals. Group 1 underwent sham surgery to determine basal values for histological, immunohistochemical and biochemical analyses. In group 2 (torsion-detorsion group (T/D)), the right testis was twisted at 720° for 90 min. After 90min of reperfusion, the testis was removed. Astaxanthin was administered intraperitoneally at the time of detorsion (group 3) and 45 minutes after detorsion (group 4) in the treatment groups. For histological and immunohistochemical evaluation, we used ImageJ® software. In order to determine the value of malondialdehyde and enzymatic activities of superoxide dismutase and glutathione peroxidase, we used prepared kits and protocols.

Results: At a significance level of 5% the MSTD values increase statistically significantly in the ASX groups compared to the T/D group. The Johnsen score is statistically significantly higher in the ASX groups compared to the T/D group. The number of apoptotic caspase-3 positive cells is statistically significantly lower in group 4 compared to the T/D group. There is a noticeable decrease in the value of malondialdehyde in group 4 compared to the T/D group. An increase in the enzymatic activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase is observed in group 4 compared to T/D group and group 3.

Conclusion: Based on the results of histological (mean seminiferous tubule diameter, Johnsen score), immunohistochemical (caspase-3-positive cell count) and biochemical research (value of malondialdehyde, values of the enzymatic antioxidants superoxide dismutase and glutathione peroxidase), it can be concluded that astaxanthin has a favourable effect on testicular torsion-detorsion injury in rats.

Keywords: astaxanthin; testis; torsion-detorsion; ischemia-reperfusion injury

10. Literatura

1. Krmpotić-Nemanić J, Marušić A. Anatomija čovjeka. Zagreb: Medicinska naklada; 2007. Str. 376-82.
2. Fritsch H, Kühnel W. Priručni anatomski atlas II. Zagreb: Medicinska naklada; 2006. Str. 250-9.
3. Durst Živković B. Praktikum histologije. Zagreb: Školska knjiga; 2007. Str. 158-62.
4. Junqueira LC, Carneiro J. Osnove histologije. Zagreb: Školska knjiga; 2005. Str. 431-47.
5. Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2006. Str. 996-8.
6. Chen H, Mruk D, Xiao X, Cheng CY. Human Spermatogenesis and Its Regulation. In: Winters S, Huhtaniemi I. (eds) Male Hypogonadism. Contemporary Endocrinology. Cham: Humana Press; 2017.
7. Griswold MD. Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiol Rev.* 2016;96(1):1–17.
8. Ta A, D'Arcy FT, Hoag N, D'Arcy JP, Lawrentschuk N. Testicular torsion and the acute scrotum: current emergency management. *Eur J Emerg Med.* 2016;23(3):160-5.
9. al Mufti RA, Ogedegbe AK, Lafferty K. The use of Doppler ultrasound in the clinical management of acute testicular pain. *Br J Urol.* 1995;76(5):625–7.
10. Watkin NA, Reiger NA, Moisey CU. Is the conservative management of the acute scrotum justified on clinical grounds?. *Br J Urol.* 1996;78(4):623–7.
11. Tajchner L, Larkin JO, Bourke MG, Waldron R, Barry K, Eustace PW. Management of the acute scrotum in a district general hospital: 10-year experience. *ScientificWorldJournal.* 2009;9:281–6.
12. Hegarty PK, Walsh E, Corcoran MO. Exploration of the acute scrotum: a retrospective analysis of 100 consecutive cases. *Ir J Med Sci.* 2001;170(3):181–2.
13. Kar A, Ozden E, Yakupoglu YK, Kefeli M, Sarikaya S, Yilmaz AF. Experimental unilateral spermatic cord torsion: the effect of polypolymerase enzyme inhibitor on histopathological and biochemical changes in the early and late periods in the ipsilateral and contralateral testicles. *Urology.* 2010;76(2):507.e1-5.
14. Molokwu CN, Somani BK, Goodman CM. Outcomes of scrotal exploration for acute scrotal pain suspicious of testicular torsion: a consecutive case series of 173 patients. *BJU Int.* 2011;107(6):990–3.
15. Zhao LC, Lautz TB, Meeks JJ, Maizels M. Pediatric testicular torsion epidemiology using a national database: incidence, risk of orchiectomy and possible measures toward improving the quality of care. *J Urol.* 2011;186(5):2009–13.
16. Pogorelić Z, Mrklić I, Jurić I. Do not forget to include testicular torsion in differential diagnosis of lower acute abdominal pain in young males. *J Pediatr Urol.* 2013;9:1161–5.
17. Ben-Chaim J, Leibovitch I, Ramon J, Winberg D, Goldwasser B. Etiology of acute scrotum at surgical exploration in children, adolescents and adults. *Eur Urol.* 1992;21(1):45–7.
18. Liguori G, Bucci S, Zordani A, Benvenuto S, Ollandini G, Mazzon G, i sur. Role of US in acute scrotal pain. *World J Urol.* 2011;29(5):639–43.
19. Sessions AE, Rabinowitz R, Hulbert WC, Goldstein MM, Mevorach RA. Testicular torsion: direction, degree, duration and disinformation. *J Urol.* 2003;169(2):663–5.
20. Kutikov A, Casale P, White MA, Meyer WA, Chang A, Gosalbez R, i sur. Testicular compartment syndrome: a new approach to conceptualizing and managing testicular torsion. *Urology.* 2008;72(4):786–9.
21. Das S, Singer A. Controversies of perinatal torsion of the spermatic cord: a review, survey and recommendations. *J Urol.* 1990;143(2):231–3.
22. Kaye JD, Levitt SB, Friedman SC, Franco I, Gitlin J, Palmer LS. Neonatal torsion: a 14-year experience and proposed algorithm for management. *J Urol.* 2008;179(6):2377–83.
23. Driver CP, Losty PD. Neonatal testicular torsion. *Br J Urol.* 1998;82(6):855–8.

24. John CM, Kooner G, Mathew DE, Ahmed S, Kenny SE. Neonatal testicular torsion - a lost cause?. *Acta Paediatr.* 2008;97(4):502–4.
25. Kyriazis ID, Dimopoulos J, Sakellaris G, Waldschmidt J, Charissis G. Extravaginal testicular torsion: a clinical entity with unspecified surgical anatomy. *Int Braz J Urol.* 2008;34(5):617–26.
26. Kaplan GW, Silber I. Neonatal torsion - to pex or not?. In: *Urologic Surgery in Neonates and Young Infants.* Philadelphia; WB Saunders: 1988. Str. 386.
27. Nistal M, Martinez C, Paniagua R. Primary testicular lesions in the twisted testis. *Fertil Steril.* 1992;57:381–6.
28. Ježek D. *Atlas on the Human Testis: Normal Morphology and Pathology.* London: Springer-Verlag; 2013. str. 244.
29. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol.* 2000;190(3):255–66.
30. Grace PA, Mathie RT. *Ischemia-reperfusion Injury.* London: Blackwell Science; 1999.
31. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2012;298:229–317.
32. Bellanti F. Ischemia-reperfusion injury: evidences for translational research. *Ann Transl Med.* 2016;4(Suppl 1):S55.
33. Slegtenhorst BR, Dor FJ, Rodriguez H, Voskuil FJ, Tullius SG. Ischemia/reperfusion Injury and its Consequences on Immunity and Inflammation. *Curr Transplant Rep.* 2014;1(3):147–54.
34. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Ischemia/Reperfusion. *Compr Physiol.* 2016;7(1):113–70.
35. 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;65:718–25.
36. Ozturk H, Buyukbayram H, Ozdemir E, Ketani A, Gurel A, Onen A, i sur. The effects of nitric oxide on the expression of cell adhesion molecules (ICAM-1, UEA-1, and tenascin) in rats with unilateral testicular torsion. *J. Pediatr. Surg.* 2003;38:1621–7.
37. Lysiak JJ, Nguyen QA, Kirby JL, Turner TT. Ischemia-reperfusion of the murine testis stimulates the expression of proinflammatory cytokines and activation of c-jun N-terminal kinase in a pathway to E-selectin expression. *Biol. Reprod.* 2003;69:202–10.
38. Wei SM, Yan ZZ, Zhou J. Taurine reduces testicular ischemia/reperfusion-induced neutrophil recruitment to testis probably by downregulation of proinflammatory cytokines and E-selectin. *Urology* 2008;72:464–5.
39. Al-Maghrebi M, Renno WM, Al-Ajmi N. Epigallocatechin-3-gallate inhibits apoptosis and protects testicular seminiferous tubules from ischemia/reperfusion-induced inflammation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012;420:434–9.
40. Sperling H, Krege S, Lummen G, Rubben H. Testicular perfusion injury. Cytokines and cell adhesion molecules in humans. *Urologe A.* 2007;46:1033–40.
41. Lysiak JJ, Nguyen QA, Turner TT. Fluctuations in rat testicular interstitial oxygen tensions are linked to testicular vasomotion: persistence after repair of torsion. *Biol. Reprod.* 2000;63:1383–9.
42. Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2000;29(3-4):323–33.
43. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000;407(6805):770–6.
44. Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature.* 2000;407(6805):810–6.

45. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:383–424.
46. Rumora L, Petrik J, Žanić-Grubišić T. Oksidacijski stres i stanična smrt. *Biochem Med.* 2003;13(3-4):75-82.
47. Miguel MG. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: A short review. *Molecules.* 2010;15(12):9252-87.
48. Chakraborty P, Kumar S, Dutta D, Gupta V. Role of antioxidants in common health diseases. *Res J Pharm Technol.* 2009;2(2):238–44.
49. Anwar H, Hussain G, Mustafa I. Antioxidants from Natural Sources. IntechOpen; 2018.
50. Ramalakshmi K, Kubra IR, Rao LJM. Antioxidant potential of low-grade coffee beans. *Food Res Int.* 2008;41(1):96-103.
51. Parr AJ, Bolwell GP. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *J Sci Food Agric.* 2000;80(7):985-1012.
52. Baxter H, Harborne JB, Moss GP. *Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants.* Philadelphia (PA), USA: CRC Press; 1998.
53. Carr AC, Zhu B-Z, Frei B. Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and α -tocopherol (vitamin E). *Circ Res.* 2000;87(5):349-54.
54. Ruthes AC, Smiderle FR, Iacomini M. Mushroom heteropolysaccharides: A review on their sources, structure and biological effects. *Carbohydr Polym.* 2016;136:358-75.
55. Khatua S, Paul S, Acharya K. Mushroom as the potential source of new generation of antioxidant: A review. *Research J Pharm and Tech.* 2013;6(5):496-505.
56. Taofiq O, Calhelha RC, Heleno S, Barros L, Martins A, Santos-Buelga C, i sur. The contribution of phenolic acids to the anti-inflammatory activity of mushrooms: Screening in phenolic extracts, individual parent molecules and synthesized glucuronated and methylated derivatives. *Food Res Int.* 2015;76(Pt 3):821–7.
57. Mamta, Misra K, Dhillon GS, Brar SK, Verma M. Antioxidants. In: *Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals.* New York: Springer; 2014.
58. Tramper J, Battershill C, Brandenburg W, Burgess G, Hill R, Luiten E, i sur. What to do in marine biotechnology?. *Biomol Eng.* 2003;20(4-6):467–71.
59. Ngo DH, Vo TS, Ngo DN, Wijesekara I, Kim SK. Biological activities and potential health benefits of bioactive peptides derived from marine organisms. *Int J Biol Macromol.* 2012;51(4):378–83.
60. Manivannan K, Karthikai Devi G, Anantharaman P, Balasubramanian T. Antimicrobial potential of selected brown seaweeds from Vedalai coastal waters, Gulf of Mannar. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2011;1(2):114–20.
61. Guerin M, Huntley ME, Olaizola M. Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol.* 2003;21(5):210–6.
62. Duarte TL, Lunec J. Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free Radic Res.* 2005;39(7):671–86.
63. Cillard J, Cillard P, Cormier M, Girre L. α -Tocopherol prooxidant effect in aqueous media: Increased autoxidation rate of linoleic acid. *J Am Oil Chem Soc.* 1980;57;252-5.
64. Young AJ, Lowe GM. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch Biochem Biophys.* 2001;385(1):20–7.
65. Galati G, O'Brien PJ. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic Biol Med.* 2004;37(3):287–303.

66. Yabuzaki J. Carotenoids Database: structures, chemical fingerprints and distribution among organisms. Database (Oxford). 2017;2017(1):bax004.
67. Dembitsky VM, Maoka T. Allenic and cumulenenic lipids. *Prog Lipid Res.* 2007;46:328–75.
68. Esteban R, Martinez B, Fernandez-Marin B, Becerril JS, Garcia-Plazaola I. Carotenoid composition in Rhodophyta: Insights into xanthophyll regulation in *Corallinaelongata*. *Eur J Phycol.* 2009;44:221–30.
69. Borowitzka MA. Vitamins and fine chemicals from micro-algae. In *Micro-Algal Biotechnology*; Borowitzka, MA, Borowitzka, LJ. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1988.
70. Farre G, Sanahuja G, Naqvi S, Bai C, Capell T, Zhu C, i sur. Travel advice on the road to carotenoids in plants. *Plant Sci.* 2010;179:28-48.
71. Varela JC, Pereira H, Vila M, León R. Production of carotenoids by microalgae: achievements and challenges. *Photosynth Res.* 2016;127(2):285-6.
72. Wani SH, Sah SK, Sági L, Solymosi K. Transplastomic plants for innovations in agriculture. A review. *Agron Sustain Dev.* 2015;35:1391–430.
73. Gateau H, Solymosi K, Marchand J, Schoefs B. Carotenoids of Microalgae Used in Food Industry and Medicine. *Mini Rev Med Chem.* 2017;17(13):1140–72.
74. Schwender J, Gemünden C, Lichtenthaler HK. Chlorophyta exclusively use the 1-deoxyxylulose 5-phosphate/2-C-methylerythritol 4-phosphate pathway for the biosynthesis of isoprenoids. *Planta.* 2001;212(3):416-23.
75. Sathasivam R, Pongpadung P, Praiboon J, Chirapart A, Trakulnaleamsai S, Roytrakul S, i sur. Optimizing NaCl and KNO₃ concentrations for high β -carotene production in photobioreactor by *Dunaliella salina* KU11 isolated from saline soil sample. *Chiang Mai J Sci.* 2018;45(1):106-15.
76. Sachindra NM, Sato E, Maeda H, Hosokawa M, Niwano Y, Kohno M, i sur. Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites. *J Agric Food Chem.* 2007;55(21):8516-22.
77. Miyashita K. Function of marine carotenoids. *Forum Nutr.* 2009;61:136-46.
78. Pashkow FJ, Watumull DG, Campbell CL. Astaxanthin: a novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 2008;101(10A):58D–68D.
79. Heo SJ, Yoon WJ, Kim KN, Ahn GN, Kang SM, Kang DH, i sur. Evaluation of anti-inflammatory effect of fucoxanthin isolated from brown algae in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(8-9):2045-51.
80. Nanba K, Toyooka S, Soh J, Tsukuda K, Yamamoto H, Sakai A, i sur. The allelic distribution of a single nucleotide polymorphism in the PDCD5 gene locus of Japanese non-small cell lung cancer patients. *Mol Med Rep.* 2008;1(5):667–71.
81. Li J, Zhu D, Niu J, Shen S, Wang G. An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol Adv.* 2011;29(6):568–74.
82. Dufosse L, Galaup P, Yaron A, Arad S, Blanc P, Murthy K, i sur. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends Food Sci Technol.* 2005;16(9):389-406.
83. Liu RH. Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet. *Adv Nutr.* 2013;4(3):384S–92S.
84. Virtamo J, Taylor PR, Kontto J, Männistö S, Utriainen M, Weinstein SJ, i sur. Effects of α -tocopherol and β -carotene supplementation on cancer incidence and mortality: 18-year postintervention follow-up of the Alpha-tocopherol, Beta-carotene Cancer Prevention Study. *Int J Cancer.* 2014;135(1):178-85.

85. Manayi A, Abdollahi M, Raman T, Nabavi SF, Habtemariam S, Daglia M, i sur. Lutein and cataract: from bench to bedside. *Crit Rev Biotechnol*. 2016;36(5):829–39.
86. Clinton SK. Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutr Rev*. 1998;56(2 Pt 1):35–51.
87. Zhang J, Sun Z, Sun P, Chen T, Chen F. Microalgal carotenoids: beneficial effects and potential in human health. *Food Funct*. 2014;5(3):413–425.
88. Khachik F, Beecher GR, Goli MB, Lusby WR, Smith JC Jr. Separation and identification of carotenoids and their oxidation products in the extracts of human plasma. *Anal Chem*. 1992;64(18):2111–22.
89. Khachik F, Pfander H, Traber B. Proposed mechanism for the formation of synthetic and naturally occurring metabolites of lycopene in tomato products and human serum. *J Agric Food Chem*. 1998;46:4885-90.
90. Nishino A, Ichihara T, Takaha T, Kuriki T, Nihei H, Kawamoto K, i sur. Accumulation of Paprika Carotenoids in Human Plasma and Erythrocytes. *J Oleo Sci*. 2015;64(10):1135-42.
91. Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander, H. Carotenoids volume 5: nutrition and health. Basel, Switzerland: Birkhäuser; 2009.
92. Zaghdoudi K, Pontvianne S, Framboisier X, Achard M, Kudaibergenova R, Ayadi-Trabelsi M, i sur. Accelerated solvent extraction of carotenoids from: Tunisian Kaki (*Diospyros kaki* L.), peach (*Prunus persica* L.) and apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Food Chem*. 2015;184:131–9.
93. Higuera-Ciapara I, Félix-Valenzuela L, Goycoolea FM. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2006;46(2):185-96.
94. Sarada R, Tripathi U, Ravishankar GA. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. *Process Biochem*. 2002;37: 623-7.
95. Kidd P. Astaxanthin, cell membrane nutrient with diverse clinical benefits and anti-aging potential. *Altern Med Rev*. 2011;16(4):355-64.
96. Naguib YMA. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *J. Agric Food Chem*. 2000;48:1150-4.
97. Miki W. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl Chem*. 1991;63:141-6.
98. Ranga Rao A, Raghunath Reddy RL, Baskaran V, Sarada R, Ravishankar GA. Characterization of microalgal carotenoids by mass spectrometry and their bioavailability and antioxidant properties elucidated in rat model. *J Agric Food Chem*. 2010;58(15):8553-9.
99. Kamath BS, Srikanta BM, Dharmesh SM, Sarada R, Ravishankar GA. Ulcer preventive and antioxidative properties of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Eur J Pharmacol*. 2008;590(1-3):387-95.
100. Ranga Rao A, Baskaran V, Sarada R, Ravishankar GA. In vivo bioavailability and antioxidant activity of carotenoids from micro algal biomass - A repeated dose study. *Food Res. Int*. 2013;54:711-7.
101. Brendler T, Williamson EM. Astaxanthin: How much is too much? A safety review. *Phytother Res*. 2019;33(12):3090-111.
102. Spiller GA, Dewell A. Safety of an astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis* algal extract: a randomized clinical trial. *J Med Food*. 2003;6(1):51-6.
103. Britton G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J*. 1995;9(15):1551-8.
104. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495–516.

105. Wu H, Niu H, Shao A, Wu C, Dixon BJ, Zhang J, i sur. Astaxanthin as a Potential Neuroprotective Agent for Neurological Diseases. *Mar Drugs*. 2015;13(9):5750-66.
106. Russell WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique. London: Methuen; 1959.
107. Webster AJ. Farm animal welfare: the five freedoms and the free market. *Vet J*. 2001;161(3):229-37.
108. Turner TT, Brown KJ. Spermatic cord torsion: loss of spermatogenesis despite return of blood flow. *Biol Reprod*. 1993;49(2):401-7.
109. 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.
110. Ludwig G, Haselberger J, Kagelmacher B. Fertilität nach ein- und beidseitiger experimenteller Samenstrangstorsion. *Urologe A*. 1980;19(5):303-5.
111. Chakraborty J, Jhunjhunwala J, Nelson L, Young M. Effects of unilateral torsion of the spermatic cord on the contralateral testis in human and guinea pig. *Arch Androl*. 1980;4(2):95-108.
112. Merimsky E, Rock M, Katz S. Assessment of fertility after testicular torsion: an experimental study. *Urol Res*. 1982;10(1):51-4.
113. Solov'ev AE. Pathogenesis of testicular atrophy in spermatic cord torsion in childhood. *Vestn Khir Im I I Grek*. 1982;128(6):99-102.
114. Lewis-Jones DI, Moreno de Marval M, Harrison RG. Impairment of rat spermatogenesis following unilateral experimental ischemia. *Fertil Steril*. 1982;38(4):482-90.
115. Merimsky E, Orni-Wasserlauf R, Yust I. Assessment of immunological mechanism in infertility of the rat after experimental testicular torsion. *Urol Res*. 1984;12(3):179-82.
116. Cosentino MJ, Rabinowitz R, Valvo JR, Cockett AT. The effect of prepubertal spermatic cord torsion on subsequent fertility in rats. *J Androl*. 1984;5(2):93-8.
117. Kurpisz M, Mazurkiewicz I, Fernandez N. Morphological and immunological observations in experimentally induced torsion of testis in rats. *Am J Reprod Immunol Microbiol*. 1985;9(4):129-35.
118. Henderson JA 4th, Smey P, Cohen MS, Davis CP, Payer AF, Parkening TA, i sur. The effect of unilateral testicular torsion on the contralateral testicle in prepubertal Chinese hamsters. *J Pediatr Surg*. 1985;20(6):592-7.
119. Kogan S, Owens G, Tarter T, Nehlsen-Cannarella S, Bennett B, Gill B, i sur. Mechanisms of injury in unilateral testis torsion. *Eur Urol*. 1986;12(3):184-6.
120. Gülmez I, Karacagil M, Sade M, Kandemir B. Effect of testicular torsion on the contralateral testis and prevention of this effect by prednisolone. *Eur Urol*. 1987;13(5):340-3.
121. Madarikan BA. Testicular salvage following spermatic cord torsion. *J Pediatr Surg*. 1987;22(3):231-4.
122. 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.
123. Chakraborty J, Sinha Hikim AP, Jhunjhunwala J. Torsion of the spermatic cord--a long term study of the contralateral testis. *Urol Res*. 1986;14(5):257-60.
124. Jhunjhunwala JS, Sinha Hikim AP, Budd CA, Chakraborty J. Germ cell degeneration in the contralateral testis of the guinea pig with unilateral torsion of the spermatic cord. Quantitative and ultrastructural studies. *J Androl*. 1986;7(1):16-22.
125. Mazurkiewicz I. Effect of testicular torsion on the contralateral testis following experimental testicular torsion in rats. *Z Kinderchir*. 1986;41(6):350-4.

126. Choi SK, Lee YT. The effect of testicular torsion on the contralateral testis in rats; histologic changes and its reversibility. *Yonsei Med J.* 1987;28(3):209-13.
127. Madgar I, Lunenfeld B, Mashiach S, Goldwasser B, Weissenberg R. Effect of testicular torsion on contralateral testis and fertility in mature rats. *Arch Androl.* 1987;19(3):237-41.
128. Turner TT. On unilateral testicular and epididymal torsion: no effect on the contralateral testis. *J Urol.* 1987;138(5):1285-90.
129. Janetschek G, SchreckenberG F, Mikuz G, Marberger M. Experimental testicular torsion: effect on endocrine and exocrine function and contralateral testicular histology. *Urol Res.* 1988;16(1):43-7.
130. Pakyz RE, Heindel RM, Kallish M, Cosentino MJ. Spermatic cord torsion: effects of cyclosporine and prednisone on fertility and the contralateral testis in the rat. *J Androl.* 1990;11(5):401-8.
131. Heindel RM, Pakyz RE, Cosentino MJ. Spermatic cord torsion. Contralateral testicular degeneration at various ages in the rat. *J Androl.* 1990;11(6):506-13.
132. Erol D, Germiyanoglu C, Bulut G, Ozkardeş H, Kurt U. Diagnostic value of creatine phosphokinase in testicular torsion. *Int Urol Nephrol.* 1992;24(2):201-4.
133. Bergh A, Damber JE, Marklund SL. Morphologic changes induced by short-term ischemia in the rat testis are not affected by treatment with superoxide dismutase and catalase. *J Androl.* 1988;9(1):15-20.
134. Greenstein A, Smith-Harrison LI, Wakely PE, Kololgi S, Salzberg AD, Koontz WW Jr. The effect of polyethylene glycol-superoxide dismutase administration on histological damage following spermatic cord torsion. *J Urol.* 1992;148(2 Pt 2):639-41.
135. Akgür FM, Kiliç K, Aktuğ T. Reperfusion injury after detorsion of unilateral testicular torsion. *Urol Res.* 1993;21(6):395-9.
136. Blank ML, O'Neill PJ, Steigman CK, Cobb LM, Wilde RA, Havenstein PJ, et al. Reperfusion injury following testicular torsion and detorsion in prepubertal rats. *Urol Res.* 1993;21(6):389-93.
137. van Jaarsveld H, Kuyt JM, Groenewald AJ, Potgieter GM. Effect of desferrioxamine on reperfusion damage of rat heart mitochondria. *S Afr Med J.* 1990;78(5):263-5.
138. Nauta RJ, Tsimoyiannis E, Uribe M, Walsh DB, Miller D, Butterfield A. The role of calcium ions and calcium channel entry blockers in experimental ischemia-reperfusion-induced liver injury. *Ann Surg.* 1991;213(2):137-42.
139. Patt A, Horesh IR, Berger EM, Harken AH, Repine JE. Iron depletion or chelation reduces ischemia/reperfusion-induced edema in gerbil brains. *J Pediatr Surg.* 1990;25(2):224-7.
140. Swies J, Omogbai EK, Smith GM. Occlusion and reperfusion-induced arrhythmias in rats: involvement of platelets and effects of calcium antagonists. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1990;15(5):816-25.
141. Akgür FM, Kiliç K, Aktuğ T, Olguner M. The effect of allopurinol pretreatment before detorting testicular torsion. *J Urol.* 1994;151(6):1715-7.
142. Turan C, Küçükaydin N, Bekerecioğlu A, Kazez A, Doğan P, Küçükaydin M. The effect of vitamin E on ipsilateral and contralateral testis following unilateral testicular torsion in rats. *Res Exp Med (Berl).* 1996;196(4):243-6.
143. Prillaman HM, Turner TT. Rescue of testicular function after acute experimental torsion. *J Urol.* 1997;157(1):340-5.
144. Werns SW, Lucchesi BR. Free radicals and ischemic tissue injury. *Trends Pharmacol Sci.* 1990;11(4):161-6.

145. Nathan CF. Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. *J Clin Invest.* 1987;80(6):1550-60.
146. Georgellis A, Tsirigotis M, Rydström J. Generation of superoxide anion and lipid peroxidation in different cell types and subcellular fractions from rat testis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1988;94(3):362-73.
147. Sarica K, Bakir K, Yagci F, Erbagci A, Topcu O, Uysal O. Unilateral testicular torsion: protective effect of verapamil on contralateral testicular histology. *Urol Int.* 1999;62(3):159-63.
148. Palmer JS, Cromie WJ, Plzak LF, Leff AR. A platelet activating factor antagonist attenuates the effects of testicular ischemia. *J Urol.* 1997;158(3 Pt 2):1186-90.
149. Kolski JM, Mazolewski PJ, Stephenson LL, Texter J, Grigoriev VE, Zamboni WA. Effect of hyperbaric oxygen therapy on testicular ischemia-reperfusion injury. *J Urol.* 1998;160(2):601-4.
150. Da Ros CT, Telöken C, Tannhauser M, Hartmann A. Does intratesticular testosterone administration modify the evolution of transitory testicular ischemia in pre-pubertal rats? *J Urol.* 1998;159(5):1752-4.
151. Dokucu AI, Öztürk H, Özdemir E, Ketani A, Büyükbayram H, Yücesan S. The protective effects of nitric oxide on the contralateral testis in prepubertal rats with unilateral testicular torsion. *BJU Int.* 2000;85(6):767-71.
152. Walder CE, Thiemermann C, Vane JR. The involvement of endothelium-derived relaxing factor in the regulation of renal cortical blood flow in the rat. *Br J Pharmacol.* 1991;102(4):967-73.
153. Koltuksuz U, Irmak MK, Karaman A, Uz E, Var A, Ozyurt H, i sur. Testicular nitric oxide levels after unilateral testicular torsion/detorsion in rats pretreated with caffeic acid phenethyl ester. *Urol Res.* 2000;28(6):360-3.
154. Uz E, Söğüt S, Sahin S, Var A, Ozyurt H, Güleç M, i sur. The protective role of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on testicular tissue after testicular torsion and detorsion. *World J Urol.* 2002;20(4):264-70.
155. Shiraishi K, Naito K, Yoshida K. Inhibition of calpain but not caspase protects the testis against injury after experimental testicular torsion of rat. *Biol Reprod.* 2000;63(5):1538-48.
156. Umemoto Y, Ozaki Y, Sasaki S, Tatsura H, Kubota H, Kubota Y, i sur. Involvement of calpain for apoptosis in dysfunction of the unaffected testis in rats with experimental testicular torsion. *Am J Reprod Immunol.* 2001;45(4):239-45.
157. Lysiak JJ, Turner SD, Turner TT. Molecular pathway of germ cell apoptosis following ischemia/reperfusion of the rat testis. *Biol Reprod.* 2000;63(5):1465-72.
158. Savas C, Dindar H, Bilgehan A, Ataoglu O, Yucesan S. Pentoxifylline attenuates reperfusion injury in testicular torsion. *Scand J Urol Nephrol.* 2002;36(1):65-70.
159. Savaş C, Dindar H, Aras T, Yücesan S. Pentoxifylline improves blood flow to both testes in testicular torsion. *Int Urol Nephrol.* 2002;33(1):81-5.
160. Tanyel FC, Büyükpamukçu N, Hiçsönmez A. Contralateral testicular blood flow during unilateral testicular torsion. *Br J Urol.* 1989;63(5):522-4.
161. Kizilcan F, Bernay I, Tanyel FC, Buyukpamukcu N, Bekdik C, Hicsonmez A. Ipsilateral and contralateral testicular blood flows during unilateral testicular torsion by ¹³³Xe clearance technique. *Int Urol Nephrol.* 1992;24:515-20.
162. Can C, Töre F, Tuñçel N, Uysal O, Gürer F, Ak D, i sur. Protective effect of vasoactive intestinal peptide on testicular torsion-detorsion injury: association with heparin-containing mast cells. *Urology.* 2004;63(1):195-200.

163. Savaş C, Özgüner M, Özgüner F, Delibaş N. The effects of human chorionic gonadotropin treatment on the contralateral side in unilateral testicular torsion. *Int Urol Nephrol*. 2003;35(2):237-45.
164. Bozlu M, Coşkun B, Cayan S, Acar D, Aktaş S, Ulusoy E, i sur. Inhibition of poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase decreases long-term histologic damage in testicular ischemia-reperfusion injury. *Urology*. 2004;63(4):791-5.
165. Tunçkiran A, Cayan S, Bozlu M, Yılmaz N, Acar D, Akbay E. Protective effect of vascular endothelial growth factor on histologic changes in testicular ischemia-reperfusion injury. *Fertil Steril*. 2005;84(2):468-73.
166. Unsal A, Devrim E, Guven C, Eroglu M, Durak I, Bozoklu A, i sur. Propofol attenuates reperfusion injury after testicular torsion and detorsion. *World J Urol*. 2004;22(6):461-5.
167. Kahraman S, Kiliç K, Dal D, Erdem K. Propofol attenuates formation of lipid peroxides in tourniquet-induced ischaemia-reperfusion injury. *Br J Anaesth*. 1997;78(3):279-81.
168. Runzer TD, Ansley DM, Godin DV, Chambers GK. Tissue antioxidant capacity during anesthesia: propofol enhances in vivo red cell and tissue antioxidant capacity in a rat model. *Anesth Analg*. 2002;94(1):89-93.
169. Erbas D, Soncul H, Turkozkan N, Arioiglu A, Muftugoglu S, Ersoz A. Effect of selenium on ischemic and reperfusion injury in isolated guinea pig lungs. *Gen Pharmacol*. 1995;26(8):1669-72.
170. Zapletal C, Heyne S, Golling M, Kraus T, Gebhard MM, Herfath C, i sur. Influence of selenium therapy on liver microcirculation after warm ischemia/reperfusion: an intravital microscopy study. *Transplant Proc*. 2001;33(1-2):974-5.
171. Nath KA, Paller MS. Dietary deficiency of antioxidants exacerbates ischemic injury in the rat kidney. *Kidney Int*. 1990;38(6):1109-17.
172. Avlan D, Erdouğan K, Cimen B, Düşmez Apa D, Cinel I, Aksöyek S. The protective effect of selenium on ipsilateral and contralateral testes in testicular reperfusion injury. *Pediatr Surg Int*. 2005;21(4):274-8.
173. Uguralp S, Mizrak B, Bay Karabulut A. Resveratrol reduces ischemia reperfusion injury after experimental testicular torsion. *Eur J Pediatr Surg*. 2005;15(2):114-9.
174. Uguralp S, Usta U, Mizrak B. Resveratrol may reduce apoptosis of rat testicular germ cells after experimental testicular torsion. *Eur J Pediatr Surg*. 2005;15(5):333-6.
175. Ozturk A, Baltacı AK, Mogulkoc R, Ozturk B. The effect of prophylactic melatonin administration on reperfusion damage in experimental testis ischemia-reperfusion. *Neuro Endocrinol Lett*. 2003;24(3-4):170-2.
176. Töns C, Klosterhalfen B, Klein HM, Rau HM, Anurov M, Oettinger A, i sur. Induction of heat shock protein 70 (HSP70) by zinc bis (DL-hydrogen aspartate) reduces ischemic small-bowel tissue damage in rats. *Langenbecks Arch Chir*. 1997;382(1):43-8.
177. Ophir A, Berenshtein E, Kitrossky N, Averbukh E. Protection of the transiently ischemic cat retina by zinc-desferrioxamine. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994;35(3):1212-22.
178. Ozkan KU, Boran C, Kiliç M, Garipardıç M, Kurutaş EB. The effect of zinc aspartate pretreatment on ischemia-reperfusion injury and early changes of blood and tissue antioxidant enzyme activities after unilateral testicular torsion-detorsion. *J Pediatr Surg*. 2004;39(1):91-5.
179. Koc A, Narci A, Duru M, Gergerlioglu HS, Akaydin Y, Sogut S. The protective role of erdosteine on testicular tissue after testicular torsion and detorsion. *Mol Cell Biochem*. 2005;280(1-2):193-9.
180. Salmasi AH, Beheshtian A, Payabvash S, Demehri S, Ebrahimkhani MR, Karimzadegan M, i sur. Effect of morphine on ischemia-reperfusion injury: experimental study in testicular torsion rat model. *Urology*. 2005;66(6):1338-42.

181. Schultz JE, Hsu AK, Gross GJ. Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart. *Circ Res.* 1996;78(6):1100-4.
182. Błaszczczyk J, Kedziora J, Luciak M, Sibińska E, Trznadel K, Pawlicki L. Effect of morphine and naloxone on oxidative metabolism during experimental renal ischemia and reperfusion. *Exp Nephrol.* 1994;2(6):364-70.
183. Cay A, Alver A, Küçük M, Işık O, Eminağaoğlu MS, Karahan SC, i sur. The effects of N-acetylcysteine on antioxidant enzyme activities in experimental testicular torsion. *J Surg Res.* 2006;131(2):199-203.
184. Unsal A, Eroglu M, Avci A, Cimentepe E, Guven C, Derya Balbay M, i sur. Protective role of natural antioxidant supplementation on testicular tissue after testicular torsion and detorsion. *Scand J Urol Nephrol.* 2006;40(1):17-22.
185. Murakami K, Okajima K, Uchiba M, Okabe H, Takatsuki K. Gabexate mesilate, a synthetic protease inhibitor, attenuates endotoxin-induced pulmonary vascular injury by inhibiting tumor necrosis factor production by monocytes. *Crit Care Med.* 1996;24(6):1047-53.
186. Jung SE, Yun IJ, Youn YK, Lee JE, Ha J, Noh DJ, i sur. Effect of protease inhibitor on ischemia-reperfusion injury to rat liver. *World J Surg.* 1999;23(10):1027-31.
187. Gezici A, Ozturk H, Buyukbayram H, Ozturk H, Okur H. Effects of gabexate mesilate on ischemia-reperfusion-induced testicular injury in rats. *Pediatr Surg Int.* 2006;22(5):435-41.
188. Somuncu S, Cakmak M, Erdogan S, Caglayan O, Akman H, Kaya M. Protective effects of trapidil in ischemia-reperfusion injury due to testicular torsion and detorsion: an experimental study. *Int J Urol.* 2006;13(5):601-5.
189. Dokmeci D, Inan M, Basaran UN, Yalcin O, Aydogdu N, Turan FN, i sur. Protective effect of L-carnitine on testicular ischaemia-reperfusion injury in rats. *Cell Biochem Funct.* 2007;25(6):611-8.
190. Agarwal A, Said TM. Carnitines and male infertility. *Reprod Biomed Online.* 2004;8(4):376-84.
191. Dokmeci D. Oxidative stress, male infertility and the role of carnitines. *Folia Med (Plovdiv).* 2005;47(1):26-30.
192. Vitali G, Parente R, Melotti C. Carnitine supplementation in human idiopathic asthenospermia: clinical results. *Drugs Exp Clin Res.* 1995;21(4):157-9.
193. Etensel B, Ozkisacik S, Ozkara E, Karul A, Oztan O, Yazici M, i sur. Dexpanthenol attenuates lipid peroxidation and testicular damage at experimental ischemia and reperfusion injury. *Pediatr Surg Int.* 2007;23(2):177-81.
194. Yagmurdu H, Ayyildiz A, Karaguzel E, Ogus E, Surer H, Caydere M, i sur. The preventive effects of thiopental and propofol on testicular ischemia-reperfusion injury. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2006;50(10):1238-43.
195. Cosentino MJ, Nishida M, Rabinowitz R, Cockett AT. Histopathology of prepubertal rat testes subjected to various durations of spermatic cord torsion. *J Androl.* 1986;7(1):23-31.
196. Guimarães SB, Santos JM, Aragão AA, de Sandes Kimura O, Barbosa PH, de Vasconcelos PR. Protective effect of alpha-lipoic acid in experimental spermatic cord torsion. *Nutrition.* 2007;23(1):76-80
197. Unal D, Karatas OF, Savas M, Yeni E, Keser BS, Verit A, i sur. Protective effects of trimetazidine on testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *Urol Int.* 2007;78(4):356-62.
198. Wei SM, Yan ZZ, Zhou J. Beneficial effect of taurine on testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *Urology.* 2007;70(6):1237-42.

199. Hekimoglu A, Kurcer Z, Aral F, Baba F, Sahna E, Atessahin A. Lycopene, an antioxidant carotenoid, attenuates testicular injury caused by ischemia/reperfusion in rats. *Tohoku J Exp Med.* 2009;218(2):141-7.
200. Erol B, Bozlu M, Hanci V, Tokgoz H, Bektas S, Mungan G. Coenzyme Q10 treatment reduces lipid peroxidation, inducible and endothelial nitric oxide synthases, and germ cell-specific apoptosis in a rat model of testicular ischemia/reperfusion injury. *Fertil Steril.* 2010;93(1):280-2.
201. Tamamura M, Saito M, Kinoshita Y, Shimizu S, Satoh I, Shomori K, i sur. Protective effect of edaravone, a free-radical scavenger, on ischaemia-reperfusion injury in the rat testis. *BJU Int.* 2010;105(6):870-6.
202. Nakashima M, Niwa M, Iwai T, Uematsu T. Involvement of free radicals in cerebral vascular reperfusion injury evaluated in a transient focal cerebral ischemia model of rat. *Free Radic Biol Med.* 1999;26(5-6):722-9.
203. Minhaz U, Tanaka M, Tsukamoto H, Watanabe K, Koide S, Shohtsu A, i sur. Effect of MCI-186 on postischemic reperfusion injury in isolated rat heart. *Free Radic Res.* 1996;24(5):361-7.
204. Higashi Y, Jitsuiki D, Chayama K, Yoshizumi M. Edaravone (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one), a novel free radical scavenger, for treatment of cardiovascular diseases. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov.* 2006;1(1):85-93.
205. Abe T, Unno M, Takeuchi H, Kakita T, Katayose Y, Rikiyama T, i sur. A new free radical scavenger, edaravone, ameliorates oxidative liver damage due to ischemia-reperfusion in vitro and in vivo. *J Gastrointest Surg.* 2004;8(5):604-15.
206. Gökçe A, Oktar S, Koc A, Gonenci R, Yalcinkaya F, Yonden Z, i sur. Protective effect of thymoquinone in experimental testicular torsion. *Urol Int.* 2010;85(4):461-5.
207. Wei SM, Yan ZZ, Zhou J. Protective effect of rutin on testicular ischemia-reperfusion injury. *J Pediatr Surg.* 2011;46(7):1419-24.
208. Bayatli F, Akkuş D, Kilic E, Saraymen R, Sönmez MF. The protective effects of grape seed extract on MDA, AOPP, apoptosis and eNOS expression in testicular torsion: an experimental study. *World J Urol.* 2013;31(3):615-22.
209. Mogilner JG, Lurie M, Coran AG, Nativ O, Shiloni E, Sukhotnik I. Effect of diclofenac on germ cell apoptosis following testicular ischemia-reperfusion injury in a rat. *Pediatr Surg Int.* 2006;22(1):99-105.
210. Zhao YG, Zheng XM, Zhou J, Liu XL, Hu XM, Chen DH, i sur. Sulfasalazine prevents apoptosis in spermatogenic cells after experimental testicular torsion/detorsion. *Acta Pharmacol Sin.* 2006;27(5):603-8.
211. Dokmeci D, Kanter M, Inan M, Aydogdu N, Basaran UN, Yalcin O, i sur. Protective effects of ibuprofen on testicular torsion/detorsion-induced ischemia/reperfusion injury in rats. *Arch Toxicol.* 2007;81(9):655-63.
212. Yamamoto Y, Sofikitis N, Miyagawa I. Effects of erythropoietin, bromocryptine and hydralazine on testicular function in rats with chronic renal failure. *Andrologia.* 1997;29(3):141-4.
213. Sepodes B, Maio R, Pinto R, Sharples E, Oliveira P, McDonald M, i sur. Recombinant human erythropoietin protects the liver from hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transpl Int.* 2006;19(11):919-26.
214. Liu X, Shen J, Jin Y, Duan M, Xu J. Recombinant human erythropoietin (rhEPO) preconditioning on nuclear factor-kappa B (NF -kB) activation & proinflammatory cytokines induced by myocardial ischaemia-reperfusion. *Indian J Med Res.* 2006;124(3):343-54.

215. 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.
216. Ergur BU, Kiray M, Pekcetin C, Bagriyanik HA, Erbil G. Protective effect of erythropoietin pretreatment in testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg.* 2008;43(4):722-8.
217. Köseoğlu B, Yılmaz E, Ceylan K, Uzun E, Bayram I, Hizli F. The protective effect of erythropoietin infusion on testicular torsion/detorsion: an experimental study. *Int Urol Nephrol.* 2009;41(1):85-91.
218. Akgül T, Ayyildiz A, Nuhoğlu B, Karagüzel E, Oğuş E, Yağmurdur H, i sur. Ginkgo biloba (EGb 761) usage attenuates testicular injury induced by testicular ischemia/reperfusion in rats. *Int Urol Nephrol.* 2008;40(3):685-90.
219. Akgül T, Karagüzel E, Sürer H, Yağmurdur H, Ayyildiz A, Ustün H, i sur. Ginkgo biloba (EGB 761) affects apoptosis and nitric-oxide synthases in testicular torsion: an experimental study. *Int Urol Nephrol.* 2009;41(3):531-6.
220. Kanter M. Protective effects of Ginkgo biloba (EGb 761) on testicular torsion/detorsion-induced ischemia-reperfusion injury in rats. *Exp Mol Pathol.* 2011;91(3):708-13.
221. Ayan M, Tas U, Sogut E, Cayli S, Kaya H, Erdemir F, i sur. Protective effect of thymoquinone against testicular torsion induced oxidative injury. *Andrologia.* 2016;48(2):143-51.
222. Dursun R, Zengin Y, Gündüz E, Iser M, Durgun HM, Dagguli M, i sur. The protective effect of goji berry extract in ischemic reperfusion in testis torsion. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(2):2727-33.
223. Ozbek O, Altintas R, Polat A, Vardi N, Parlakpınar H, Sagir M, i sur. The protective effect of apocynin on testicular ischemia-reperfusion injury. *J Urol.* 2015;193(4):1417-22.
224. Celik E, Oguzturk H, Sahin N, Turtay MG, Oguz F, Ciftci O. Protective effects of hesperidin in experimental testicular ischemia/reperfusion injury in rats. *Arch Med Sci.* 2016;12(5):928-34.
225. Skondras I, Lambropoulou M, Tsaroucha A, Gardikis S, Tripsianis G, Simopoulos C, i sur. The role of Apigenin in testicular damage in experimental ischemia-reperfusion injury in rats. *Hippokratia.* 2015;19(3):225-30.
226. Fouad AA, Qutub HO, Jresat I. Dose-dependent protective effect of baicalin against testicular torsion-detorsion in rats. *Andrologia.* 2017;49(1):10.1111/and.12580.
227. Doğan G, İpek H. The protective effect of Ganoderma lucidum on testicular torsion/detorsion-induced ischemia-reperfusion (I/R) injury. *Acta Cir Bras.* 2020;35(1):e202000103.
228. Javdan N, Ayatollahi SA, Choudhary MI, Al-Hasani S, Kobarfard F, Athar A, i sur. Capsaicin protects against testicular torsion injury through mTOR-dependent mechanism. *Theriogenology.* 2018;113:247-52.
229. Kheirollahi A, Abbaszadeh A, Anbari K, Rostami B, Ahangari A, Hasanvand A, i sur. Troxerutin protect sperm, seminiferous epithelium and pituitary-gonadal axis from torsion-detorsion injury: An experimental study. *Int J Reprod Biomed (Yazd).* 2018;16(5):315-22.
230. Qiao H, Ma H, Cao W, Chen H, Wei J, Li Z. Protective effects of polydatin on experimental testicular torsion and detorsion injury in rats. *Reprod Fertil Dev.* 2017;29(12):2367-75.
231. Sönmez MF, Ozdemir Ş, Guzel M, Kaymak E. The ameliorative effects of vinpocetine on apoptosis and HSP-70 expression in testicular torsion in rats. *Biotech Histochem.* 2017;92(2):92-99.
232. Kim HJ, Lee JW, Hwang BR, Lee YA, Kim J, Cho YJ, i sur. Protective effect of pterostilbene on testicular ischemia/reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg.* 2016;51(7):1192-6.
233. Ganjiani V, Ahmadi N, Raayat Jahromi A. Protective effects of Stevia rebaudiana aqueous extract on experimental unilateral testicular ischaemia/reperfusion injury in rats. *Andrologia.* 2020;52(2):e13469.

234. Kelsey R. Basic research: Aliskiren might have a protective effect in testicular torsion-detorsion injury. *Nat Rev Urol*. 2015;12(6):303.
235. Tuglu D, Yuvanc E, Ozan T, Bal F, Yilmaz E, Atasoy P, i sur. Protective effects of udenafil citrate, piracetam and dexmedetomidine treatment on testicular torsion/detorsion-induced ischaemia/reperfusion injury in rats. *Andrologia*. 2016;48(6):676-82.
236. Tuglu D, Yuvanc E, Yilmaz E, Gencay IY, Atasoy P, Kisa U, i sur. The antioxidant effect of dexmedetomidine on testicular ischemia-reperfusion injury. *Acta Cir Bras*. 2015;30(6):414-21.
237. Dogan C, Halici Z, Topcu A, Cadirci E, Karakus E, Bayir Y, i sur. Effects of amlodipine on ischaemia/reperfusion injury in the rat testis. *Andrologia*. 2016;48(4):441-52.
238. Mertoğlu C, Senel U, Cayli S, Tas U, Küskü Kiraz Z, Özyurt H. Protective role of methylprednisolone and heparin in ischaemic-reperfusion injury of the rat testicle. *Andrologia*. 2016;48(7):737-44.
239. Dejban P, Rahimi N, Takzare N, Jahansouz M, Haddadi NS, Dehpour AR. Beneficial effects of dapson on ischemia/reperfusion injury following torsion/detorsion in ipsilateral and contralateral testes in rat. *Theriogenology*. 2019;140:136-42.
240. Gozukara KH, Ozcan O, Ozgur T, Kaya YS, Tutuk O. Protective Effects of Colchicine on Testicular Torsion/Detorsion-Induced Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. *Urol J*. 2020;17(3):294-300.
241. Yapanoglu T, Ozkaya F, Yilmaz AH, Mammadov R, Cimen FK, Hirik E, i sur. Effect of etoricoxib on experimental oxidative testicular ischemia-reperfusion damage in rats induced with torsion-detorsion. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2017;21(5):457-64.
242. Ghasemnejad-Berenji M, Ghazi-Khansari M, Yazdani I, Nobakht M, Abdollahi A, Berenji HG, i sur. Effect of metformin on germ cell-specific apoptosis, oxidative stress and epididymal sperm quality after testicular torsion/detorsion in rats. *Andrologia*. 2018;50(2):10.1111/and.12846.
243. Karagoz MA, Doluoglu OG, Ünverdi H, Resorlu B, Sunay MM, Demirbas A, i sur. The protective effect of Papaverine and Alprostadil in rat testes after ischemia and reperfusion injury. *Int Braz J Urol*. 2018;44(3):617-22.
244. Abat D, Bayazit Y, Açıkalm A, Daglioglu K, Yenilmez ED, Altunkol A, i sur. Beneficial effects of rolipram, a phosphodiesterase 4 specific inhibitor, on testicular torsion-detorsion injury in rats. *J Pediatr Surg*. 2018;53(11):2261-5.
245. Oroszi M, Szabó A, Fehér ÁM, Deák G, Bajory Z. Microcirculatory effects of sildenafil in experimental testicular torsion in rats. *World J Urol*. 2018;36(12):2081-7.
246. Yildirim C, Yuksel OH, Urkmez A, Sahin A, Somay A, Verit A. Protective effects of Tadalafil and darbepoetin against ischemia - reperfusion injury in a rat testicular torsion model. *Int Braz J Urol*. 2018;44(5):1005-13.
247. Mahmoud NM, Kabil SL. Pioglitazone abrogates testicular damage induced by testicular torsion/detorsion in rats. *Iran J Basic Med Sci*. 2019;22(8):884-92.
248. Dejban P, Rahimi N, Takzare N, Jahansouz M, Dehpour AR. Protective effects of sumatriptan on ischaemia/reperfusion injury following torsion/detorsion in ipsilateral and contralateral testes of rat. *Andrologia*. 2019;51(9):e13358.
249. Wei SM, Huang YM, Zhou J. Probucol Reduces Testicular Torsion/Detorsion-Induced Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:5424097.
250. Keseroglu BB, Ozer E, Karakan T, Ozgur BC, Surer H, Ogus E, i sur. Protective effects of Ranolazine on testicular torsion and detorsion injury in rats [published online ahead of print, 2020 May 13]. *Andrologia*. 2020;e13616.

251. Polat EC, Bozkurt AS, Keskin Cimen F, Gulaboglu M, Altuner D. The investigation of the protective effects of nimesulide on experimental testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *Rev Int Androl.* 2020;18(2):55-62.
252. Taati M, Moghadasi M, Dezfoulian O, Asadian P, Zendehtdel M. Effects of Ghrelin on germ cell apoptosis and proinflammatory cytokines production in Ischemia-reperfusion of the rat testis. *Iran J Reprod Med.* 2015;13(2):85-92.
253. Fırat F, Erdemir F, Köllükçü E, Gevrek F, Benli İ, Ünsal V. Oxytocin for preventing injury due to testicular torsion/detorsion in rats. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2018;24(2):89-96.
254. Kishimoto Y, Yoshida H, Kondo K. Potential Anti-Atherosclerotic Properties of Astaxanthin. *Mar Drugs.* 2016;14(2):35.
255. Ito N, Seki S, Ueda F. The Protective Role of Astaxanthin for UV-Induced Skin Deterioration in Healthy People-A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Nutrients.* 2018;10(7):817.
256. Otsuka T, Shimazawa M, Inoue Y, Nakano Y, Ojino K, Izawa H, i sur. Astaxanthin Protects Against Retinal Damage: Evidence from In Vivo and In Vitro Retinal Ischemia and Reperfusion Models. *Curr Eye Res.* 2016;41(11):1465-72.
257. Bidaran S, Ahmadi AR, Yaghmaei P, Sanati MH, Ebrahim-Habibi A. Astaxanthin effectiveness in preventing multiple sclerosis in animal model. *Bratisl Lek Listy.* 2018;119(3):160-6.
258. Eren B, Tuncay Tanrıverdi S, Aydın Köse F, Özer Ö. Antioxidant properties evaluation of topical astaxanthin formulations as anti-aging products. *J Cosmet Dermatol.* 2019;18(1):242-50.
259. Comhaire FH, El Garem Y, Mahmoud A, Eertmans F, Schoonjans F. Combined conventional/antioxidant "Astaxanthin" treatment for male infertility: a double blind, randomized trial. *Asian J Androl.* 2005;7(3):257-62.
260. Jiang X, Zhu K, Xu Q, Wang G, Zhang J, Cao R, i sur. The antidepressant-like effect of trans-astaxanthin involves the serotonergic system. *Oncotarget.* 2017;8(15):25552-63.
261. Mosaad YO, Gobba NA, Hussein MA. Astaxanthin; a Promising Protector Against Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Rats. *Curr Pharm Biotechnol.* 2016;17(13):1189-97.
262. Iwata S, Imai T, Shimazawa M, Ishibashi T, Hayashi M, Hara H, i sur. Protective effects of the astaxanthin derivative, adonixanthin, on brain hemorrhagic injury. *Brain Res.* 2018;1698:130-8.
263. Shibaguchi T, Yamaguchi Y, Miyaji N, Yoshihara T, Naito H, Goto K, i sur. Astaxanthin intake attenuates muscle atrophy caused by immobilization in rats. *Physiol Rep.* 2016;4(15):e12885.
264. Huang LJ, Chen WP. Astaxanthin ameliorates cartilage damage in experimental osteoarthritis. *Mod Rheumatol.* 2015;25(5):768-71.
265. Kim JH, Park JJ, Lee BJ, Joo MK, Chun HJ, Lee SW, i sur. Astaxanthin Inhibits Proliferation of Human Gastric Cancer Cell Lines by Interrupting Cell Cycle Progression. *Gut Liver.* 2016;10(3):369-74.
266. Pilinska MA, Kurinnyi DA, Rushkovsky SR, Dybska OB. Genoprotective properties of astaxanthin revealed by ionizing radiation exposure in vitro on human peripheral blood lymphocytes. *Probl Radiac Med Radiobiol.* 2016;21:141-8.
267. Kaneko M, Kishimoto Y, Suzuki R, Kawai Y, Tateya I, Hirano S. Protective Effect of Astaxanthin on Vocal Fold Injury and Inflammation Due to Vocal Loading: A Clinical Trial. *J Voice.* 2017;31(3):352-8.

268. Shen M, Chen K, Lu J, Cheng P, Xu L, Dai W, i sur. Protective effect of astaxanthin on liver fibrosis through modulation of TGF- β 1 expression and autophagy. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:954502.
269. Kamath BS, Srikanta BM, Dharmesh SM, Sarada R, Ravishankar GA. Ulcer preventive and antioxidative properties of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Eur J Pharmacol.* 2008;590(1-3):387-95.
270. Naito Y, Uchiyama K, Aoi W, Hosegawa G, Nakamura N, Maoka T, i sur. Prevention of diabetic nephropathy by treatment with astaxanthin in diabetic db/db mice. *Biofactors.* 2004;20(1):49-59.
271. Wakshlag JJ, Balkman CA, Morgan SK, McEntee MC. Evaluation of the protective effects of all-trans-astaxanthin on canine osteosarcoma cell lines. *Am J Vet Res.* 2010;71(1):89-96.
272. Kupcinkas L, Lafolie P, Lignell A, Kiudelis G, Jonaitis L, Adamonis K, i sur. Efficacy of the natural antioxidant astaxanthin in the treatment of functional dyspepsia in patients with or without *Helicobacter pylori* infection: A prospective, randomized, double blind, and placebo-controlled study. *Phytomedicine.* 2008;15(6-7):391-9.
273. Balci Yuçe H, Lektetur Alpan A, Gevrek F, Toker H. Investigation of the effect of astaxanthin on alveolar bone loss in experimental periodontitis. *J Periodontal Res.* 2018;53(1):131-8.
274. Palozza P, Torelli C, Boninsegna A, Simeone R, Catalano A, Mele MC, i sur. Growth-inhibitory effects of the astaxanthin-rich alga *Haematococcus pluvialis* in human colon cancer cells. *Cancer Lett.* 2009;283(1):108-17.
275. Zhou L, Gao M, Xiao Z, Zhang J, Li X, Wang A. Protective effect of astaxanthin against multiple organ injury in a rat model of sepsis. *J Surg Res.* 2015;195(2):559-67.
276. Curek GD, Cort A, Yucel G, Demir N, Ozturk S, Elpek GO, i sur. Effect of astaxanthin on hepatocellular injury following ischemia/reperfusion. *Toxicology.* 2010;267(1-3):147-53.
277. Zuluaga Tamayo M, Choudat L, Aid-Launais R, Thibaudeau O, Louedec L, Letourneur D, i sur. Astaxanthin Complexes to Attenuate Muscle Damage after In Vivo Femoral Ischemia-Reperfusion. *Mar Drugs.* 2019;17(6):354.
278. Tripathi DN, Jena GB. Astaxanthin inhibits cytotoxic and genotoxic effects of cyclophosphamide in mice germ cells. *Toxicology.* 2008;248(2-3):96-103.
279. Yoshihisa Y, Andoh T, Matsunaga K, Rehman MU, Maoka T, Shimizu T. Efficacy of Astaxanthin for the Treatment of Atopic Dermatitis in a Murine Model. *PLoS One.* 2016;11(3):e0152288.
280. Lauver DA, Lockwood SF, Lucchesi BR. Disodium Disuccinate Astaxanthin (Cardax) attenuates complement activation and reduces myocardial injury following ischemia/reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;314(2):686-92.
281. Xuan R, Gao X, Wu W, Chen HM. Effect of Astaxanthin on Preeclampsia Rat Model. *Yao Xue Xue Bao.* 2014;49(10):1400-5.
282. Wang JY, Lee YJ, Chou MC, Chang R, Chiu CH, Liang YJ, i sur. Astaxanthin protects steroidogenesis from hydrogen peroxide-induced oxidative stress in mouse Leydig cells. *Mar Drugs.* 2015;13(3):1375-88.
283. Fang Q, Guo S, Zhou H, Han R, Wu P, Han C. Astaxanthin protects against early burn-wound progression in rats by attenuating oxidative stress-induced inflammation and mitochondria-related apoptosis. *Sci Rep.* 2017;7:41440.
284. Qiu X, Fu K, Zhao X, Zhang Y, Yuan Y, Zhang S, i sur. Protective effects of astaxanthin against ischemia/reperfusion induced renal injury in mice. *J Transl Med.* 2015;13:28.
285. Güzel M, Sönmez MF, Baştuğ O, Aras NF, Öztürk AB, Küçükaydın M, i sur. Effectiveness of lycopene on experimental testicular torsion. *J Pediatr Surg.* 2016;51(7):1187-91.

286. Becker EJ Jr, Turner TT. Endocrine and exocrine effects of testicular torsion in the prepubertal and adult rat. *J Androl.* 1995;16(4):342-51.
287. Zuluaga M, Gueguen V, Letourneur D, Pavon-Djavid G. Astaxanthin-antioxidant impact on excessive Reactive Oxygen Species generation induced by ischemia and reperfusion injury. *Chem Biol Interact.* 2018;279:145-58.
288. Reboul E. Mechanisms of Carotenoid Intestinal Absorption: Where Do We Stand?. *Nutrients.* 2019;11(4):838.
289. Parker RS. Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *FASEB J.* 1996;10(5):542-51.
290. Mel'man EP, Gritsulyak BV, Shutka BV. Changes in the ultrastructure of components of the blood-testis barrier in circulatory hypoxia. *Bull Exp Biol Med.* 1979;88:928-31.

11. Kratki životopis

Marko Bašković rođen je u Zagrebu gdje je završio osnovnu školu „Vrbani“ te IX. gimnaziju. Diplomirao je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2014. godine. Pripravnički staž odradio je u Klinici za dječje bolesti Zagreb. Od 2015. godine za potrebe Klinike za dječje bolesti Zagreb specijalistički se usavršavao iz područja dječje kirurgije. Specijalistički ispit položio je u kolovozu 2020. godine. Od 2017. godine polaznik je poslijediplomskog doktorskog studija Biomedicina i zdravstvo pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Autor je niza znanstvenih i stručnih radova.

Popis objavljenih radova;

1. **Bašković M**, Striber N, Gjurašin M. Posterior intraorbital bullet. *Slov Med J*. 2021;1-2:91-5.
2. **Bašković M**, Kljenak A, Čizmić A, Škrljak Šoša D, Vulin K, Đaković I. Successful antibiotic treatment of liver abscess in an eight-year-old boy after perforated appendix. *J Pediatr Neonat Individual Med*. 2021;10(1):e100120.
3. **Bašković M**, Milošević M. Adolescencija i doping. *Paediatr Croat*. 2020;64(3):187-93.
4. **Bašković M**, Škrljak Šoša D. Bioethics in the field of pediatric surgery. *Med Morale*. 2020;69(4):483-92.
5. **Bašković M**, Keretić D, Petračić I. Skin bridge secondary to onychocryptosis. *Eur J Pediatr Dermatol*. 2020;30(4):247-8.
6. **Bašković M**, Pajić A, Barčot Z. Massive dog bite injury of the scalp in one-year old boy. *Prague Med Rep*. 2020;121(4):277-82.
7. **Bašković M**, Pejić J, Sović Lj, Čizmić A, Žganjer M. VATS pleurectomy: A successful way to treat pneumothorax recurrence after blebs resection. *Balkan Med J*. 2020;37(5):301-2.
8. **Bašković M**, Kljenak A. Unusual presentation of congenital dermoid fistula of the anterior chest region. *J Cutan Aesthet Surg*. 2020;13(2):183-4.
9. Čizmić L, **Bašković M**, Župančić B. Varikokela – tihi ubojica muške plodnosti? *Med Flum*. 2020;56(1):16-25.
10. Kljenak A, **Bašković M**, Pešorda D, Pleškov A, Karaman Ilić M, Murat Sušić S. Inovativne prednosti Zagrebačkog kirurškog protokola rekonstrukcije šake u bolesnika s buloznom epidermolizom (ZSRP). *Paediatr Croat*. 2019;63(4):160-7.

11. **Bašković M**, Župančić B, Vukasović I, Štimac-Rojtinić I, Ježek D. Validation of a TWIST Score In Diagnosis of Testicular Torsion – Single-Center Experience. *Klin Pädiatr*. 2019;231(4):217-9.
12. Barčot Z, **Bašković M**, Car A, Jurić M. Aplasia cutis congenita of the scalp: The success of conservative approach in treatment of a large defect. *Indian J Paediatr Dermatol*. 2019;20(2):166-8.
13. **Bašković M**, Barčot Z. A five-year-old girl with a life-threatening rash. *Vis J Emerg Med*. 2019;14(1):19-21.
14. Vulin K, Đaković I, Grmoja T, Tripalo Batoš A, Rešić A, **Bašković M**, i sur. Cervicofacial subcutaneous emphysema after facial cosmetic procedure in an 11-year-old girl. *Australas J Dermatol*. 2019;60(1):64-5.
15. **Bašković M**, Župančić B, Dominković A, Čizmić A, Ježek D. Correlation of Leukocyte Count and Percentage of Segmented Neutrophils with Pathohistological Findings of Appendix in Children. *Int J Pediatr*. 2018;6(1): 6851-9.
16. Božić A, **Bašković M**, Tripalo Batoš A, Župančić B. Radiološke metode u dijagnostici tupe traume abdomena dječje dobi. *Acta Med Croatica*. 2018;72(3): 333-44.
17. **Bašković M**, Župančić B, Žganjer M, Nikolić I, Ježek D, Čizmić L. From ataxia to diagnosis of Askin tumor – a case report. *Acta Medica (Hradec Králové)* 2018;61(2): 60-4.
18. **Bašković M**, Župančić B, Car A, Višnjić S, Ježek D. Nekrotizirajući enterokolitis – prikaz slučaja i pregled literature. *Paediatr Croat*. 2018;62(2):89-95.
19. **Bašković M**, Đinkić M, Župančić B, Stepan J, Čizmić L. Torsion of a mesenchymal hamartoma of the liver in a 1-year-old boy – case report. *Acta Chir Belg*. 2017;117(2):128-30.
20. Župančić B, **Bašković M**, Sović Lj, Habek D. Bilateral Ovarian Torsion during Follow-up for Antenatally Detected Ovarian Cysts. *APSP J Case Rep*. 2017;8(3):21.
21. Župančić B, **Bašković M**, Višnjić S, Vukasović I. Minimalno invazivna urološka kirurgija dječje dobi - Što možemo učiniti danas? *Paediatr Croat*. 2016;60(3):91-6.

22. **Bašković M**, Župančić B, Lesjak N, Vukasović I. Hipertrofična stenoza pilorusa – retrospektivna petogodišnja analiza. Acta Med Croatica. 2016;70:103-6.
23. Župančić B, **Bašković M**, Gliha A, Sović Lj. Rascjep prsne kosti – prikaz troje bolesnika. Lijec Vjesn. 2016;138:204-7.
24. Župančić B, Lesjak N, Župančić V, Gliha A, Petračić I, Pašalić I, **Bašković M**. Što još možemo naučiti o akutnom skrotumu?! Paediatr Croat, 2015;59:119-27.