

**Școala doctorală în domeniul Științe medicale**

Cu titlu de manuscris  
CZU: 618.11-008.9:618.11-007.59-005.4-092.9(043.2)

**Lazăr Cornelia**

**Caracteristica metabolică a ischemiei/reperfuziei  
cauzate de torsiunea/detorsiunea ovariană**

**315.01. Biochimie medicală**

**Teză de doctor în științe medicale**

**Chișinău, 2021**

Teza a fost elaborată la Catedra de biochimie și biochimie clinică  
a Universității de Stat de Medicină și Farmacie ”Nicolae Testemițanu”

**Conducător științific:**

Tagadiuc Olga,  
dr. hab. șt. med., conf. univ. *semnătura*

**Conducător prin cotelă:**

Mișina Ana,  
dr. hab. șt. med., conf. cerc. *semnătura*

**Membrii comisiei de îndrumare:**

Gudumac Valentin,  
dr. hab. șt. med., prof. univ. *semnătura*

Protopop Svetlana,  
dr. șt. med., conf. univ. *semnătura*

Andronache Lilia,  
dr. șt. med., cerc. șt. *semnătura*

Susținerea va avea loc la 17.02.2021, ora 14:00, în regim online: [meet.google.com/mjj-voan-tuj](https://meet.google.com/mjj-voan-tuj)  
în ședința Comisiei de susținere publică a tezei de doctorat, aprobată prin decizia Consiliului  
Științific al Consorțiului din 14.12.2020 (*proces verbal nr.12*).

**Componența Comisiei de susținere publică a tezei de doctorat:**

**Președinte:**

Lîsîi Leonid,  
dr. hab. șt. med., prof. univ. *semnătura*

**Membrii:**

Tagadiuc Olga,  
dr. hab. șt. med., conf. univ. *semnătura*

Mișina Ana,  
dr. hab. șt. med., conf. cerc. *semnătura*

Stratulat Silvia,  
dr. șt. med., conf. univ. *semnătura*

**Referenți oficiali:**

Gudumac Valentin,  
dr. hab. șt. med., prof. univ. *semnătura*

Popovici Mihail,  
dr. hab. șt. med., prof. univ., acad. al AȘM *semnătura*

Moșin Veaceslav,  
dr. hab. șt. med., prof. univ. *semnătura*

Autor

Lazăr Cornelia *semnătura*

## CUPRINS

LISTA ABREVIERILOR .....	5
LISTA FIGURILOR .....	6
LISTA TABELELOR .....	7
INTRODUCERE .....	8
1. METABOLISMUL OXIDATIV ÎN TORSIUNEA/DETORSIUNEA OVARIANĂ.....	12
1.1. Stresul oxidativ și sistemul reproducător feminin .....	12
1.1.1. Stresul oxidativ și principalele mecanisme de producere a SRO.....	12
1.1.2. Mecanisme de protecție antioxidantă.....	15
1.1.3. Modificări patologice induse de SRO .....	18
1.1.4. Acțiunea fiziologică a SRO la nivelul sistemului reproducător feminin .....	21
1.2. Mecanisme biochimice ale dezvoltării leziunilor prin ischemie/reperfuzie .....	22
1.3. Fenomenul de postcondiționare ischemică .....	29
2. MATERIALE ȘI METODE DE STUDIU ÎN TORSIUNEA OVARIANĂ EXPERIMENTALĂ.....	32
2.1. Modelul experimental .....	32
2.1.1. Animale de laborator și loturi de cercetare .....	32
2.1.2. Procedura chirurgicală.....	34
2.2. Pregătirea materialului biologic și investigații biochimice.....	35
2.2.1. Pregătirea materialului biologic pentru studiu .....	35
2.2.2. Dozarea indicilor ischemiei.....	37
2.2.3. Determinarea indicilor stresului oxidativ .....	37
2.2.4. Aprecierea markerilor sistemului antioxidant .....	38
2.2.5. Evaluarea altor indici ai metabolismului.....	39
2.3. Tehnologii informaționale și procedee de analiză statistică a rezultatelor .....	40
3. MODIFICĂRI BIOCHIMICE ÎN ISCHEMIA/REPERFUZIA OVARIANĂ .....	42
3.1. Impactul intervenției chirurgicale asupra markerilor biochimici studiați în ischemia/reperfuzia produsă de torsiunea/detorsiunea ovarelor .....	42
3.2. Influența torsiunii/detorsiunii ovariene asupra indicilor ischemiei .....	43

3.3. Modificările indicilor stresului oxidativ în torsiunea/detorsiunea ovariană .....	55
3.4. Influența torsiunii/detorsiunii ovariene asupra markerilor sistemului antioxidant.....	76
3.5. Sinteza rezultatelor studiului .....	101
CONCLUZII GENERALE.....	111
RECOMANDĂRI PRACTICE .....	112
BIBLIOGRAFIE .....	113
INFORMAȚII PRIVIND VALORIFICAREA REZULTATELOR CERCETĂRII .....	135
ANEXE.....	139
<i>Anexa 1.</i> Analiza corelației dintre indicii ischemiei din serul sangvin și omogenatul ovarian în torsiunea/detorsiunea ovariană experimentală.....	140
<i>Anexa 2.</i> Examinarea corelației dintre markerii stresului oxidativ din serul sangvin și omogenatul ovarian în torsiunea/detorsiunea ovariană experimentală.....	141
<i>Anexa 3.</i> Studiul corelației dintre markerii sistemului antioxidant din serul sangvin și omogenatul ovarian în torsiunea/detorsiunea ovariană experimentală.....	142
Declarația privind asumarea răspunderii .....	143

## LISTA ABREVIERILOR

ADN – acid dezoxiribonucleic	NADPH – nicotinamid adenin dinucleotid fosfat redus
AGE – produși finali de glicare avansată (advanced glycation end products)	NO· – radicalul oxid nitric
AIM – albumina ischemic modificată	PcI – postcondiționare ischemică
ATP – adenozină trifosfat	PNL – leucocite polimorfonucleare
CAT – catalaza	PPOA – produși proteici de oxidare avansată
CP – ceruloplasmina	RAGE – receptor AGE (receptor for advanced glycation end products)
DAM – dialdehida malonică	RL – radicali liberi
DNO – derivații oxidului nitric	rot/min – rotații pe minut
g.prot. – gram de proteină	SAO – sistem antioxidant
G6PDH – glucozo-6-fosfat dehidrogenaza	SO – stresul oxidativ
GMPc – guanozină monofosfat ciclică	SOD – superoxid dismutaza
GPO – glutatation peroxidaza	SRN – specii reactive ale azotului
GR – glutatation reductaza	SRO – specii reactive ale oxigenului
GSH – glutatation redus	TNF- $\alpha$ – factorul de necroză tumorală $\alpha$ (tumor necrosis factor $\alpha$ )
GSSG – glutatation oxidat	TO – torsiune ovariană
GST – glutatation-S-transferaza	U – unități
GT – glutatation total	u.c. – unități convenționale
I – ischemie	vs. – versus
I/R – ischemie/reperfuzie	XO – xantin oxidaza
ICDH – izocitrat dehidrogenaza citoplasmatică NADP <sup>+</sup> -dependentă	
kDa – kilodaltoni	
LDH – lactat dehidrogenaza	
LDH-L – lactat dehidrogenaza-lactat (LDH <sub>1</sub> )	
LDH-P – lactat dehidrogenaza-piruvat (LDH <sub>5</sub> )	
MPO – mieloperoxidaza	
mPTP – porul de tranziție a permeabilității mitocondriale (mitochondrial permeability transition pore)	
NAD <sup>+</sup> – nicotinamid adenin dinucleotid	

## LISTA FIGURILOR

Figura 1. Structura și activitatea NADPH oxidazei, conform lui Gardiner G.J., et al. ....	14
Figura 2. Schema producerii diferitor specii reactive de oxigen și înlăturarea acestora de către enzime antioxidante, modificată de noi după Reiter R.J., et al. ....	16
Figura 3. S-glutationilarea proteinelor, după Chen W., et al. ....	17
Figura 4. Procesul de peroxidare al lipidelor, conform Ayala A., et al. ....	18
Figura 5. Etapele desfășurării procesului lezional în afecțiuni caracterizate prin ischemie și reperfuzie, adaptată de noi după Rodríguez-Lara S.Q., et al. ....	23
Figura 6. Mecanisme biochimice ale leziunii I/R, modificată de noi după Francischetti I., et al. ....	27
Figura 7. Repartizarea animalelor de laborator în loturi de cercetare. ....	33
Figura 8. Congestie vasculară și edem în ovar (hematoxină-eozină). ....	36
Figura 9. Congestie vasculară și hemoragie în ovar (hematoxină-eozină). ....	36
Figura 10. Modificările nivelului lactatului și activității LDH-P și LDH-L în omogenatul ovarian în torsiunea/detorsiunea ovariană experimentală ....	44
Figura 11. Modificările nivelului lactatului și activității LDH-P și LDH-L în serul sangvin în torsiunea/detorsiunea ovariană experimentală. ....	45
Figura 12. Derivații oxidului nitric din serul sangvin și omogenatul ovarian în torsiunea/detorsiunea ovariană experimentală. ....	56
Figura 13. Producții proteice de oxidare avansată din serul sangvin și omogenatul ovarian în torsiunea/detorsiunea ovariană experimentală. ....	63
Figura 14. Cantitatea dialdehidei malonice din serul sangvin și omogenatul ovarian în torsiunea/detorsiunea ovariană experimentală. ....	71
Figura 15. Efectul torsiunii/detorsiunii ovariene experimentale asupra activității superoxid dismutazei și catalazei din omogenatul ovarian ....	77
Figura 16. Activitatea glutatión-S-transferazei din serul sangvin și omogenatul ovarian în torsiunea/detorsiunea ovariană experimentală. ....	86
Figura 17. Nivelul glutatiónului oxidat din serul sangvin și omogenatul ovarian în torsiunea/detorsiunea ovariană experimentală. ....	92
Figura 18. Acțiunea torsiunii/detorsiunii ovariene experimentale asupra activității glucozo-6-fosfat dehidrogenazei din serul sangvin și omogenatul ovarian ....	94
Figura 19. Ceruloplasmina din serul sangvin în torsiunea ovariană experimentală. ....	99
Figura 20. Efectele ischemiei ovariene asupra nivelului de lactat, DNO, DAM, AGE și activității LDH-P din omogenat. ....	102
Figura 21. Activitatea unor enzime antioxidante din omogenat în ischemia ovariană. ....	103
Figura 22. Modificări metabolice tisulare postreperfuzie în torsiunea ovariană. ....	106

## LISTA TABELELOR

Tabelul 1. Rezultatele evaluării indicilor biochimici în loturile martor și control.....	42
Tabelul 2. Influența torsiunii/detorsiunii ovariene asupra albuminei ischemic modificate din serul sangvin și omogenatul ovarian .....	52
Tabelul 3. Efectul torsiunii/detorsiunii ovariene asupra cantității produșilor finali de glicare avansată din serul sangvin și omogenatul ovarian .....	68
Tabelul 4. Activitatea superoxid dismutazei și catalazei din serul sangvin în torsiunea/detorsiunea ovariană .....	78
Tabelul 5. Acțiunea torsiunii/detorsiunii ovariene asupra activității glutatation peroxidazei și glutatation reductazei din serul sangvin și omogenatul ovarian.....	82
Tabelul 6. Influența torsiunii/detorsiunii ovariene asupra nivelului de glutatation total și glutatation redus din serul sangvin și omogenatul ovarian.....	88
Tabelul 7. Activitatea izocitrat dehidrogenazei citoplasmatică NADP <sup>+</sup> -dependente din serul sangvin și omogenatul ovarian în torsiunea/detorsiunea ovariană .....	97

## INTRODUCERE

### Actualitatea și importanța problemei cercetate

Torsiunea ovariană reprezintă o afecțiune rară, dar severă, cu o prevalență de 2,7% [1-3]-3% [4, 5], până la 6% [6]. La moment, se află pe locul cinci în cadrul urgențelor ginecologice chirurgicale [1, 3] și poate fi întâlnită la orice vârstă, marea majoritate a cazurilor înregistrându-se la femeii de vârstă reproductivă [7]. Este o urgență medicală care afectează 4,9/100.000 din populația de sex feminin cu vârsta cuprinsă între 1-20 ani [8-10]. Aproximativ 80% dintre cazuri apar în perioada de vârstă reproductivă [5], iar 20% dintre cazuri apar în timpul sarcinii [1]. Incidența maladiei în timpul sarcinii în datele literaturii variază de la aproximativ 1-10 la 1000 [11] până la 1 la 5000 de sarcini [5, 12], și apare mai frecvent în primul trimestru, la pacientele care au urmat tratament pentru infertilitate pentru procedura de fertilizare *in vitro* (FIV) sau stimulare ovariană [12], aceasta fiind o cauză a creșterii incidenței maladiei [13, 14].

Torsiunea ovariană este definită ca rotația parțială sau totală în jurul axei sale vasculare a trompei uterine, a ovarului sau a ambelor [10, 15], cu obstrucție a fluxului venos, limfatic și arterial, având ca și consecință modificări ischemice, care pot determina necroză ovariană [10, 12, 16]. Chiar dacă principalul factor de risc în apariția maladiei sunt formațiunile de volum ovariene, s-a observat că și ovarele sănătoase pot fi implicate în procesul patologic [7, 17], iar aceasta, probabil, are loc din cauza laxității ligamentare excesive, a spasmului tubar sau a modificărilor presiunii intraabdominale la vârsta neonatală și prepubertară [18]. S-a constatat că la pacientele cu vârsta sub 15 ani în mai mult de 50% de cazuri ovarele torsionate sunt normale [7, 10], pe când la femeile adulte afecțiunea este frecvent determinată de prezența unor anomalii ovariene (teratom, endometriom, chisturi, sindrom de hiperstimulare ovariană, etc.) [4].

Diagnosticul corect este foarte important pentru femeile de vârstă reproductivă, mai ales că manifestările clinice ale bolii sunt nespecifice [17, 19, 20], iar intervenția medicului poate fi întârziată din această cauză [10].

Cea mai frecventă acuză în torsiunea ovariană este durerea. Localizarea acesteia este în cadranul abdominal inferior [4, 10, 17], putând fi constantă sau intermitentă [5, 10]. Alte simptome care pot fi observate, pe lângă creșterea temperaturii corpului, sunt greața și vomă [4, 10, 17], sângerarea vaginală [10, 21], sugerând medicului o gamă foarte variată de alte posibile diagnostice.

Tratamentul întârziat din cauza unui diagnostic greșit poate duce la complicații precum pierderea ovarelor [10, 19, 22], cu efecte negative asupra fertilității [10, 19, 23, 24]. Dacă nu se intervine chirurgical, pot apărea tromboflebite, hemoragii, infecție [16, 25], peritonită [16, 19, 25] și moarte [10, 19]. Managementul tradițional în torsiunea ovariană presupune ovariectomie, în timp ce managementul conservator include detorsionarea segmentului răsucit [26-28]. Dacă torsiunea ovariană este diagnosticată și tratată precoce prin manevra de detorsionare, perspectivele păstrării



fertilității sunt favorabile [28], restabilirea unei circulații sangvine adecvate fiind scopul intervenției chirurgicale care se efectuează [15, 24]. Astfel, TO, fiind o urgență chirurgicală, necesită diagnostic și tratament imediat pentru a evita diferite complicații grave [10, 21, 29-34] și pentru a diminua incidența infertilității [19, 24, 25, 35], care constituie o problemă importantă de sănătate publică, pentru care diagnosticul și tratamentul sunt invazive, costisitoare și stresante [36]. Cu toate acestea, înlăturarea ischemiei poate fi însoțită de daune celulare și tisulare suplimentare din cauza intensificării formării SRO în momentul restabilirii fluxului sangvin și amplificării stresului oxidativ. Este bine cunoscut faptul că reluarea circulației sangvine spre un organ, după o perioadă de timp în care aceasta a fost întreruptă, poate fi mai dăunătoare decât ischemia propriu-zisă. În țesutul ischemic reoxigenat se produc intens radicali liberi, rezultând leziuni de reperfuzie [21, 28, 30-34, 37-39].

Conform cercetărilor anterioare [21, 28, 32-33], în torsiunea ovariană speciilor reactive ale oxigenului le revine un rol major în afectarea tisulară cauzată de I/R.

Deci, în pofida avantajului de conservare a organului, detorsionarea anexelor torsionate poate avea consecințe negative cauzate de fenomenul reperfuziei. În diferite studii s-a arătat că în timpul procesului de detorsionare, o cantitate excesivă de oxigen molecular este furnizată țesuturilor și se produc cantități mari de SRO, care sunt implicate în deteriorarea țesuturilor [13, 24, 26, 29-34, 38, 40-51].

Conform datelor literaturii, leziunea de reperfuzie a fost bine documentată în alte organe decât în ovar. Totuși, există anumite publicații care indică faptul că expunerea ovarelor la I/R este însoțită de stres oxidativ și că administrarea anumitor substanțe, până la eliminarea blocajului ischemic sau imediat după, reduce gradul de vătămare și ajută la o recuperare mai rapidă [13, 24, 26, 29-34, 38, 40-50, 52].

Astfel, leziunile prin fenomenul I/R din TO necesită o bună cunoaștere, monitorizare și o strategie terapeutică care ar reduce efectele negative ale SO asupra ovarelor, asigurând buna lor funcționare după manevra de detorsionare și împiedicând apariția complicațiilor.

**Scopul** cercetării a fost studierea modificărilor metabolice cauzate de ischemie/reperfuzie în torsiunea/detorsiunea ovariană experimentală pentru evidențierea indicilor specifici de diagnostic ai leziunilor tisulare ovariene și argumentarea strategiilor de tratament care ar reduce leziunile de reperfuzie.

#### **Obiectivele cercetării:**

1. Determinarea particularităților metabolice ale leziunilor cauzate de ischemie/reperfuzie la nivelul ovarelor în torsiunea/detorsiunea ovariană experimentală.
2. Studiul expresiei biochimice sangvine a leziunilor prin ischemie/reperfuzie cauzate de torsiunea/detorsiunea ovariană.

3. Identificarea corelațiilor modificărilor biochimice sangvine cu cele tisulare în torsiunea/detorsiunea ovariană experimentală.

4. Evaluarea metodei de reperfuzie controlată asupra indicilor biochimici tisulari și sangvini în torsiunea/detorsiunea ovariană experimentală.

#### **Metodologia cercetării științifice**

S-a efectuat un studiu preclinic, experimental, respectând toate rigorile științifice și principiile etice de cercetare instituțională, naționale și internaționale. Cercetarea a fost efectuată pe șobolani albi de laborator (*Rattus albicans*), modelându-se torsiunea ovariană, cu detorsiune/reperfuzie ulterioară, inclusiv aplicându-se și tehnica de reperfuzie controlată (modelul *on-off*). Pentru realizarea obiectivelor tezei, au fost investigate omogenatele țesutului ovarian și serul sangvin pentru aprecierea indicilor metabolici ai ischemiei, stresului oxidativ și sistemului antioxidant.

A fost obținut **avizul pozitiv al Comitetului de Etică a Cercetării** pentru realizarea studiului: proces verbal nr. 27, la nr. 24, din data de 08.02.2016.

Locația desfășurării cercetării: Catedra de biochimie și biochimie clinică și Laboratorul de biochimie ale USMF „Nicolae Testemițanu”.

#### **Noutatea și originalitatea științifică a rezultatelor obținute**

Cercetarea a relevat date importante cuprinzând indicii metabolismului ce asigură funcționarea celulelor ovariene în condiții de ischemie provocată. Au fost apreciate modificările biochimice care au loc în torsiunea/detorsiunea ovariană experimentală, profunzimea dereglărilor și reflectarea lor sangvină. S-au dozat indicii afectării ischemice, ai stresului oxidativ și de protecție antioxidantă atât la nivel tisular, cât și sangvin, cu determinarea prezenței corelațiilor sangvino-tisulare ale parametrilor evaluați.

Au fost formulate ipoteze privitor la condițiile care favorizează rezistența ovarelor la ischemie, conexiunea dintre modificările metabolice tisulare și cele sangvine. A fost identificat un spectru de indici de laborator din serul sangvin cu valoare diagnostică în TO, dar și de monitorizare după detorsiune. Au fost propuse anumite intervenții terapeutice, pentru un rezultat cât mai eficient al tratamentului chirurgical al TO cu păstrarea ovarelor.

Studiul a aprofundat cunoștințele referitor la metabolismul ovarian în torsiunea ovariană după reperfuzia simplă și cea controlată.

#### **Aprobarea rezultatelor științifice**

Rezultatele cercetării au fost prezentate, analizate, discutate și aprobate la mai multe foruri științifice naționale și internaționale:

- *6th International Medical Congress for Students and Young Doctors MedEspera*, USMF “Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Moldova, 12-14 mai 2016;

- Conferința Științifică Anuală IMU a tinerilor specialiști „Performanțe și perspective în urgențe medico-chirurgicale”, Institutul de Medicină Urgentă, Chișinău, Moldova, 20 mai 2016;
- Zilele Universității și Conferința științifică anuală consacrată aniversării a 90-a de la nașterea ilustrului medic și savant Nicolae Testemițanu, USMF “Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Moldova, 18-20 octombrie 2017;
- Annual Young Medical Scientists' Conference 2017, Bogomolets National Medical University, Kiev, Ucraina, 27-29 octombrie 2017;
- IBC – SOFIA 2017, 2nd INTERNATIONAL BIOMEDICAL CONGRESS of SOFIA 2017, Medical University – Sofia, Bulgaria, 17-19 noiembrie 2017;
- Conferința „Biological markers in fundamental and applied biology. From theory to practice”, European Scientific Center "Biomarker", or. Brno, Republica Cehă, 10 ianuarie 2018;
- Conferința „Modern technologies of diagnostics and monitoring of therapy in experimental, clinical medicine and pharmacy”, European Scientific Center "Biomarker", or. Brno, Republica Cehă, 15 ianuarie 2018;
- Conferința științifico-practică „Theoretical and practical aspects of the use of biological markers in fundamental and applied medicine and biology”, European Scientific Center "Biomarker", or. Praga, Republica Cehă, 27-29 martie 2018;
- 7th International Medical Congress for Students and Young Doctors MedEspera, USMF “Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Moldova, 3-5 mai 2018;
- Zilele Universității și Conferința științifică anuală a cadrelor științifico-didactice, doctoranzilor, masteranzilor, rezidenților și studenților, USMF “Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Moldova, 18 octombrie 2018 și 17 octombrie 2019;
- VI Bukovinian International Medical Congress, BIMCO 2019, Bukovinian State Medical University, Cernăuți, Ucraina, 2-5 aprilie 2019;
- VII Bukovinian International Medical Congress, BIMCO 2020, Bukovinian State Medical University, Cernăuți, Ucraina, 7-10 aprilie 2020.

#### **Publicații la tema tezei**

Au fost publicate 19 lucrări științifice la subiectul tezei, inclusiv 7 articole, dintre care 2 în reviste din baze de date internaționale (SCOPUS, **IF<sub>CiteScore2019</sub>: 0,6** și Web of Science, **IF<sub>ISI</sub>: 0,8**), 3 articole în reviste din Registrul Național al revistelor de profil, categoria B, inclusiv 1 articol în *Moldovan Journal of Health Sciences (Revista de Științe ale Sănătății din Moldova)*, 2 articole în culegeri internaționale și 12 teze în lucrările conferințelor și congreselor științifice naționale și internaționale.

**Cuvinte cheie:** torsiune ovariană experimentală, leziuni prin ischemie/reperfuzie, reperfuzie controlată, stres oxidativ, specii reactive ale oxigenului, sistem antioxidant

## 1. METABOLISMUL OXIDATIV ÎN TORSIUNEA/DETORSIUNEA OVARIANĂ

### 1.1. Stresul oxidativ și sistemul reproducător feminin

#### 1.1.1. Stresul oxidativ și principalele mecanisme de producere a SRO

Stresul oxidativ (SO), care a fost introdus ca și concept în medicină în 1985 [53] este un fenomen cauzat de un dezechilibru între producerea și acumularea de SRO în celule și țesuturi, și capacitatea unui sistem biologic de a detoxifica aceste produse reactive [54]. Mai mult, SO poate fi definit ca dezechilibrul caracteristicilor redox ale unui anumit mediu celular, cu producere excesivă a speciilor reactive de oxigen și/sau a speciilor reactive de azot, sau poate fi datorat unui deficit de antioxidanți endogeni [55], un antioxidant fiind o moleculă care are capacitatea de a preveni sau a încetini oxidarea macromoleculilor [56], permițând radicalilor liberi să îndeplinească funcții biologice utile fără daune colaterale [57].

În general, prooxidanții pot fi divizați în două grupe: radicali și non-radicali [58, 59], durata de viață a acestora fiind diferită, și reactivitatea lor nu întotdeauna corelând cu toxicitatea. Nocivitatea prooxidanților depinde de pH-ul mediului, de prezența altor specii reactive, dar și de locul unde s-au format [58].

Electronii atomilor și moleculelor ocupă regiuni de spațiu cunoscute sub numele de orbitali. Fiecare orbital poate avea maximum doi electroni. Dacă un orbital conține un singur electron, se spune că respectivul electron este nepereche [60]. Radicali sunt acei prooxidanți care conțin cel puțin 1 electron nepereche în scheletul din jurul nucleului atomic, fiind capabili de existență independentă [58, 59], și care sunt extrem de activi în reacții chimice cu alte molecule [61]. Astfel, molecula care este atacată de radicali își pierde electronul și devine un radical liber în sine, începând o cascadă de reacții în lanț care dăunează în final celulei vii [59, 62]. Un dezechilibru între producerea intensă de radicalii liberi și cantitatea de antioxidanți care i-ar putea neutraliza, va avea ca rezultat leziuni oxidative ale proteinelor, lipidelor, acizilor nucleici [56, 63] și carbohidraților [56].

Speciile reactive de oxigen și alți radicali sunt implicați într-o mare varietate de fenomene biologice și maladii, influențând diferite reacții biochimice și manifestări clinice. Este cunoscut faptul că SRO sunt generate în cadrul proceselor importante din celule cu consum de  $O_2$  [64]. Astfel, celulele care trăiesc în condiții aerobe se confruntă întotdeauna cu paradoxul oxigenului, care constă în faptul că celulele utilizează oxigenul ca să-și mențină viața, însă, cu toate acestea, SRO, cu potențial efect lezional, sunt produse din oxigen [65].

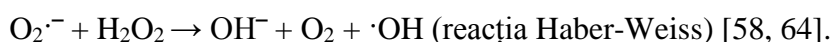
Orice compus, inclusiv și oxigenul, care poate accepta electroni este un oxidant. În contrast, o substanță care donează electroni este un reducător. Astfel de reacții, numite reacții redox, sunt

baza a numeroase procese care au loc în celule. Echivalentele termenilor oxidant și reducător din chimie, pentru sistemele biologice respectiv sunt prooxidant și antioxidant [58].

Mulți radicali sunt instabili și foarte reactivi. Aceștia pot dona un electron sau pot accepta un electron de la alte molecule, comportându-se, deci, ca oxidanți sau reducători [66].

Deoarece în celule lanțul respirator mitocondrial este principalul sistem care consumă oxigen, în condiții fiziologice majoritatea SRO sunt produse de către acesta [67]. Deci, sursa majoră a SRO este localizată în mitocondrii, unde pierderea de electroni în lanțul respirator determină generarea anionului superoxid ( $O_2^{\cdot-}$ ) [68, 69].  $O_2^{\cdot-}$  este o SRO relativ stabilă și are o rată scăzută de interacțiune cu componentele biologice [58], fiind transformat de enzima superoxid dismutaza în peroxid de hidrogen ( $H_2O_2$ ) [66].

Unul dintre mecanismele care intensifică SO este explicat prin reacțiile Fenton și Haber-Weiss care generează radicalul hidroxil, care este foarte reactiv, comparativ cu alte SRO:



Astfel, pentru a participa în reacția Fenton, fierul trebuie să fie în forma sa redusă. Însă, la un pH fiziologic acesta este, în mare parte, oxidat. Conversia de la forma oxidată la cea redusă poate avea loc cu participarea antioxidantilor, cum ar fi acidul ascorbic. Ascorbatul, atunci când este prezent în adiacența metalelor de tranziție, le reduce și le face susceptibile de a intra în reacția Fenton. Deci, în astfel de condiții, ascorbatul poate acționa și ca un agent prooxidant, și poate determina producerea de radicali care ar putea spori leziunile oxidative [58].

De asemenea, în mitocondrii anionul superoxid poate interacționa cu oxidul nitric pentru a forma peroxinitritul, un radical foarte instabil, care are o reactivitate mult mai mare [62], modificând diferite molecule organice:  $O_2^{\cdot-} + NO\cdot \rightarrow ONOO^-$  [62, 70, 71]. Se cunoaște faptul că peroxinitritul protonat ( $ONOOH$ ) are o reactivitate similară cu cea a radicalului hidroxil [70].

Se consideră că un factor favorizant pentru producerea de  $ONOO^-$  îl reprezintă faptul că reacția dintre  $O_2^{\cdot-}$  și  $NO\cdot$  are loc de 3-4 ori mai rapid, comparativ cu transformarea  $O_2^{\cdot-}$  de către Cu/Zn-SOD, una dintre principalele enzime antioxidante [53].

Astfel, un alt radical liber care poate intensifica leziunile oxidative este  $NO\cdot$ , iar acesta, interacționând cu anionul superoxid, determină producerea de peroxinitrit, care, la rândul său, modifică chimic diferite molecule, inclusiv aminoacizi, acizi nucleici și proteine [53]. Având un electron fără pereche,  $NO\cdot$ , care este un radical liber extrem de reactiv, poate deteriora celulele și țesuturile [72]. Totuși, datele literaturii de specialitate referitor la efectele  $NO\cdot$  sunt controversate, așa cum unii cercetători consideră că oxidul nitric este o moleculă importantă de semnalizare celulară care participă inclusiv la modularea protecției împotriva deteriorării oxidative [15, 70]. Rolul  $NO\cdot$  în patologia vasculară a fost investigată și elucidată inclusiv de cercetători autohtoni

[73, 74], care au reliefat efectele de vasodilatare, regenerare endotelială, inhibarea chemotaxiei leucocitare și a aderenței plachetare [73].

Pe lângă efectele citotoxice ale  $\text{NO}\cdot$ , sunt menționate și efecte benefice ale acestuia, precizându-se că această moleculă poate acționa ca un antioxidant, fiind capabil să inhibe reacțiile de peroxidare în lanț a lipidelor [70].

Oxidul nitric, care este considerat o specie reactivă de azot datorită conținutului acestui element, este sintetizat în timpul conversiei enzimatică a L-argininei în L-citrulină de către nitric oxid sintaza (NOS) [72, 75]. Este bine studiată activitatea nitric oxid sintazelor la nivelul ovarelor și este evidențiat și rolul benefic al  $\text{NO}\cdot$  în diferite procese fiziologice [76]. Se cunosc trei forme ale acestei enzime: neuronală, endotelială și inductibilă. Dintre cele trei izoenzime ale NOS, NOS endotelială și NOS inductibilă sunt exprimate în ovar [67]. Se cunoaște faptul că aceste enzime au nevoie de NADPH pentru sinteza  $\text{NO}\cdot$ . Cercetătorii au arătat că activitatea șuntului pentozo-fosfat, generator de NADPH, și activitatea enzimei G6PDH corelează cu producerea de  $\text{NO}\cdot$  [77].

O altă cale de producere a  $\text{NO}\cdot$  este prin reducerea nitritului cu implicarea enzimei XO [78-81], enzimă care apare în perioada de ischemie și își manifestă activitatea la reperfuție [82]. Reducerea nitritului de către XO este intensificată de condiții specifice, cum ar fi condiții de hipoxie [78, 79], anoxie și acidoză [79].

Sursă de SRO pot fi și celulele inflamatorii, cum ar fi macrofagele și neutrofilele [67]. Celulele fagocitare pot genera și ele specii reactive de oxigen, cu implicarea activă a enzimei NADPH oxidaza, utilizând NADPH și oxigen molecular, după cum este arătat în figura 1. Enzima este formată din nucleul catalitic, responsabil de producerea anionului superoxid, fiind reprezentat de flavocitocromul b558, care este format de subunitățile transmembranare gp91phox și p22phox. Celelalte subunități: p40phox, p47phox, p67phox și GTP-aza RAC, în celulele inactive sunt localizate în citoplasmă, iar în celulele stimulate de mediatori ai inflamației sunt translocate la miezul catalitic și au rol reglator [83].

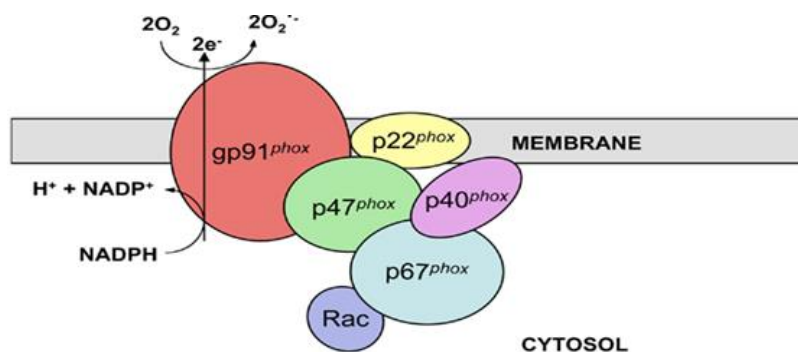


Figura 1. Structura și activitatea NADPH oxidazei, conform lui Gardiner G.J., et al. [83]

Recent s-a arătat că NADPH oxidaza este sintetizată în multe țesuturi și celule, fiind cunoscute 5 subtipuri. S-a dovedit că NADPH oxidaza 1 este prezentă în ovarele și ovocitele animalelor experimentale, iar NADPH oxidaza 2 este cea care aparține celulelor fagocitare [44].

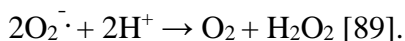
O altă enzimă produsă de neutrofile și macrofage, care generează SRO, este mieloperoxidaza [45, 51]. Atunci când neutrofilele sunt activate și degranulate, enzima este eliberată în spațiul extracelular, având o capacitate înaltă de a deteriora țesutul gazdă [84]. MPO catalizează reacția dintre peroxidul de hidrogen și clor [45, 51], și are ca rezultat formarea acidului hipocloros [45, 51, 71], care este un compus toxic. Se cunoaște faptul că acidul hipocloros poate fi implicat în formarea radicalului hidroxil, cu consecințe negative [45, 51]. MPO își manifestă activitatea în condiții fiziologice în țesuturile sănătoase, iar o activitate excesivă a enzimei le poate deteriora [46]. Astfel, MPO este considerată un oxidant și reprezintă un indicator al infiltrării țesutului cu neutrofile [85], fiind o enzimă despre care se cunoaște că intensifică stresul oxidativ în numeroase patologii [84]. Aceasta a fost studiată, inclusiv, în contextul ischemiei/reperfuziei din torsiunea ovariană [45, 51]. În prezent, se consideră că determinarea activității MPO este un marker util pentru aprecierea infiltrării țesuturilor cu neutrofile [86].

### **1.1.2. Mecanisme de protecție antioxidantă**

Expunerea continuă la numeroase surse care induc SO a dus la dezvoltarea la nivel celular a unui șir de mecanisme de protecție împotriva metaboliților reactivi [87].

Nivelul SRO poate fi controlat de către sistemul antioxidant care include o serie de enzime antioxidante (superoxid dismutaza, catalaza, glutatation peroxidaza, etc.) și compuși nonenzimatici (glutationul, vitamina C, vitamina E, etc.) [88].

Așa cum anionul superoxid este inițial produs de o mare varietate de surse, neutralizarea acestuia are o importanță deosebită pentru fiecare celulă. În acest proces sunt implicate superoxid dismutazele: Mn-SOD și Cu/Zn-SOD [88]. La om sunt prezente trei forme ale superoxid dismutazei. SOD1 este localizată în citoplasmă, SOD2 – în mitocondrie, iar SOD3 se află extracelular. SOD1 și SOD3 conțin cupru și zinc, în timp ce SOD2 are mangan în centrul activ [66]. Acestea dismutază anionul superoxid, așa cum este arătat în reacția următoare:



Ulterior, peroxizii de hidrogen sunt descompuși de către catalază în molecule de apă și oxigen [66]. Aceste enzime fac parte din prima linie de apărare în lupta cu SRO, iar biosinteza lor pare să fie dependentă de nivelul de  $\text{O}_2^-$  [88]. Există cercetări care indică faptul că izoenzimele SOD pot atenua leziunea cauzată de ischemie/reperfuzie, în timp ce alte rapoarte au pus la îndoială eficiența lor în asigurarea unei protecții antioxidante eficiente [90].

În neutralizarea  $H_2O_2$  mai este implicată și enzima glutatión peroxidaza, care utilizează pentru aceasta glutatión redus [91]. Aceasta este o enzimă seleniu-dependentă, fiind considerată una dintre cele mai importante enzime antioxidate cu rol în prevenirea peroxidării lipidelor membranare [92]. La mamifere, GPO, împreună cu superoxid dismutazele și catalazele, face parte din sistemul antioxidant enzimatic care limitează toxicitatea SRO, participând la reciclarea lor [91]. Acțiunea principalelor enzime antioxidante este ilustrată în figura 2 [93].

GSH este oxidat în timpul dezintoxicării peroxidului de hidrogen. Pentru a menține eficacitatea antioxidantă a GSH, glutatiónul oxidat (GSSG) trebuie din nou convertit în glutatión redus (GSH) [24]. Acest proces este realizat de glutatión reductaza (GR), o enzimă NADPH-dependentă [24, 71, 94], NADPH-ul fiind furnizat celulelor în primul rând în urma acțiunii enzimei glucozo-6-fosfat dehidrogenaza [95, 96]. G6PDH este o enzimă care susține activitatea sistemului antioxidant, participând la regenerarea antioxidantilor oxidați, asigurând celulele cu echivalenți reducători, și anume cu NADPH [58]. Concomitent, cercetările au relevat că izoenzimele izocitat dehidrogenazei  $NADP^+$ -dependente au un rol deosebit în prevenirea intensificării stresului oxidativ, prin asigurarea cu NADPH atât la nivel mitocondrial [97], cât și citoplasmatic [98]. Așa cum G6PDH este absentă în mitocondrii, se consideră că izocitrat dehidrogenaza  $NADP^+$ -dependentă este crucială pentru asigurarea echilibrului redox mitocondrial [97].

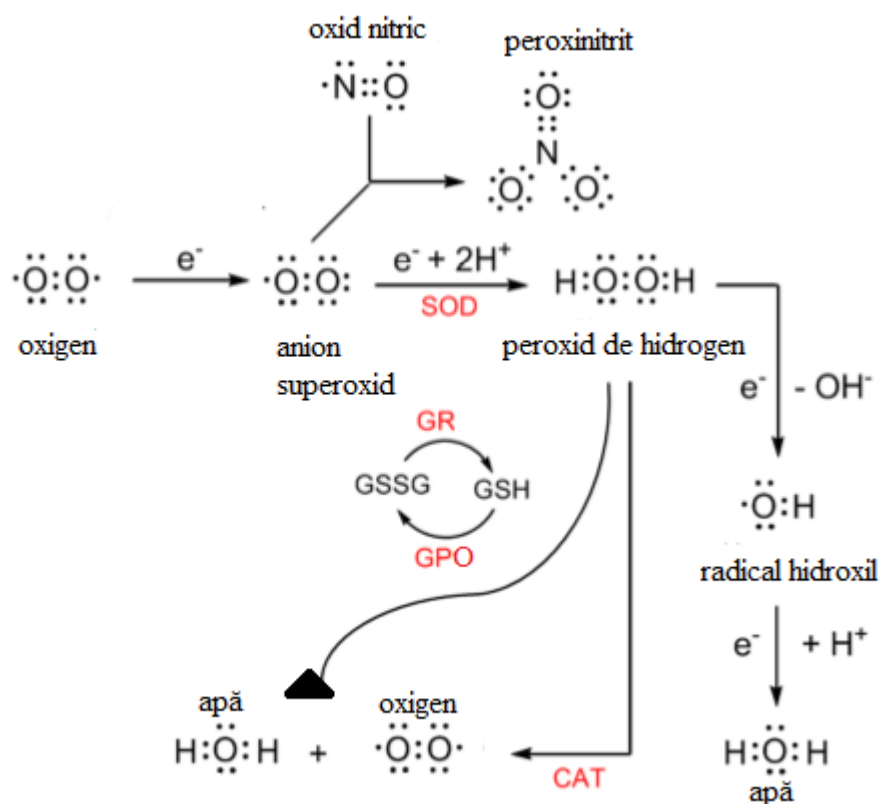


Figura 2. Schema producerii diferitor specii reactive de oxigen și înlăturarea acestora de către enzime antioxidante, modificată de noi după Reiter R.J., et al. [93]



Molecula de glutation este foarte importantă în procesul de protecție împotriva radicalilor liberi, fiind un antioxidant puternic ce preîntâmpină oxidarea biomoleculelor [94], protejând grupele -SH ale proteinelor [58, 99] și prevenind includerea ionilor de cupru în reacția Haber-Weiss [58]. De asemenea, GSH poate interacționa cu NO<sup>•</sup>, complexul format urmând a fi degradat de sistemul tioredoxinei. Acest tiol se găsește în cantități mari intracelular, 85-90% aflându-se în citoplasmă, iar în spațiul extracelular – în concentrații mici [94].

O altă enzimă care utilizează glutation pentru a-și desfășura efectele metabolice este glutation-S-transferaza [100]. GST leagă substanțele străine de gruparea -SH a cisteinei din glutation, neutralizând, astfel, regiunile electrofile și protejând celulele de efectele nocive ale substanțelor dăunătoare [24]. Concomitent, GST este responsabilă de procesul de S-glutationilare, ca răspuns la stresul oxidativ. Aceasta este o modificare posttranslațională caracterizată prin conjugarea glutationului cu proteine țintă. Acest fenomen este reversibil, oferindu-i celulei un șir dinamic de evenimente reglatoare. Prin acest proces se adaugă un lanț lateral cu trei aminoacizi [100], glutationul fiind structura formată din acid glutamic, cisteină și glicină [94], iar în acest fel proteinei i se introduce o sarcină negativă (datorită acidului glutamic). Ca urmare, are loc protecția împotriva deteriorării oxidative suplimentare și/sau alterarea conformației proteice care afectează funcția și/sau localizarea celulară a acestora. Proteinele identificate până acum, ca fiind susceptibile de S-glutationilare, pot fi divizate în șase grupuri: citoscheletice, glicolitice/ale metabolismului energetic, kinaze și căi de semnalizare, ale homeostaziei calciului, enzime antioxidante și proteine ce asigură foldingul [100]. Reacția de S-glutationilare este prezentată în figura 3 [101].

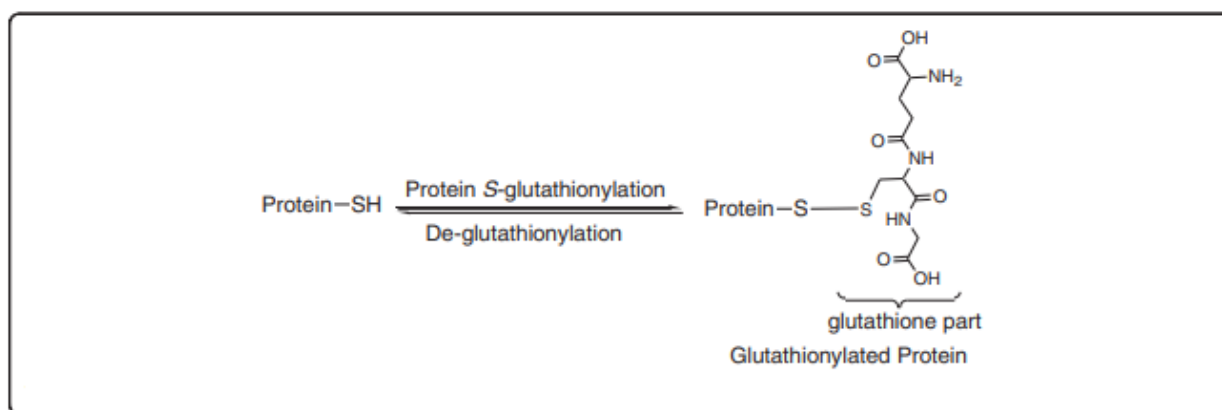


Figura 3. **S-glutationilarea proteinelor**, după Chen W., et al. [101]

Ceruloplasmina, o proteină plasmatică de fază acută [84, 102], este o oxidază care conține 90% din cuprul din plasmă. Activitatea sa de feroxidază este foarte importantă, deoarece oxidează Fe<sup>2+</sup> la Fe<sup>3+</sup>, care este preluat de transferină și, astfel, se împiedică participarea Fe<sup>2+</sup> la generarea radicalilor hidroxil [84]. De asemenea, ceruloplasmina este considerată a fi un inhibitor fiziologic

al mieloperoxidazei, fiind demonstrată interacțiunea dintre acestea în plasmă. Acest proces de inhibare este posibil din cauza interacțiunii electrostatice între cele două proteine, aceasta fiind datorată naturii cationice a MPO și anionice a ceruloplasminei [84, 102].

### 1.1.3. Modificări patologice induse de SRO

SRO determină leziuni directe ale celulelor [20]. Efectele negative ale SRO se realizează prin următoarele mecanisme: peroxidare lipidică, modificări ale proteinelor, oxidarea ADN-ului, în special a celui mitocondrial, și deschiderea canalelor ionice [64].

SRO interacționează cu macromoleculele, capturându-le electronii și interferând cu activitatea biologică a acestora [21].

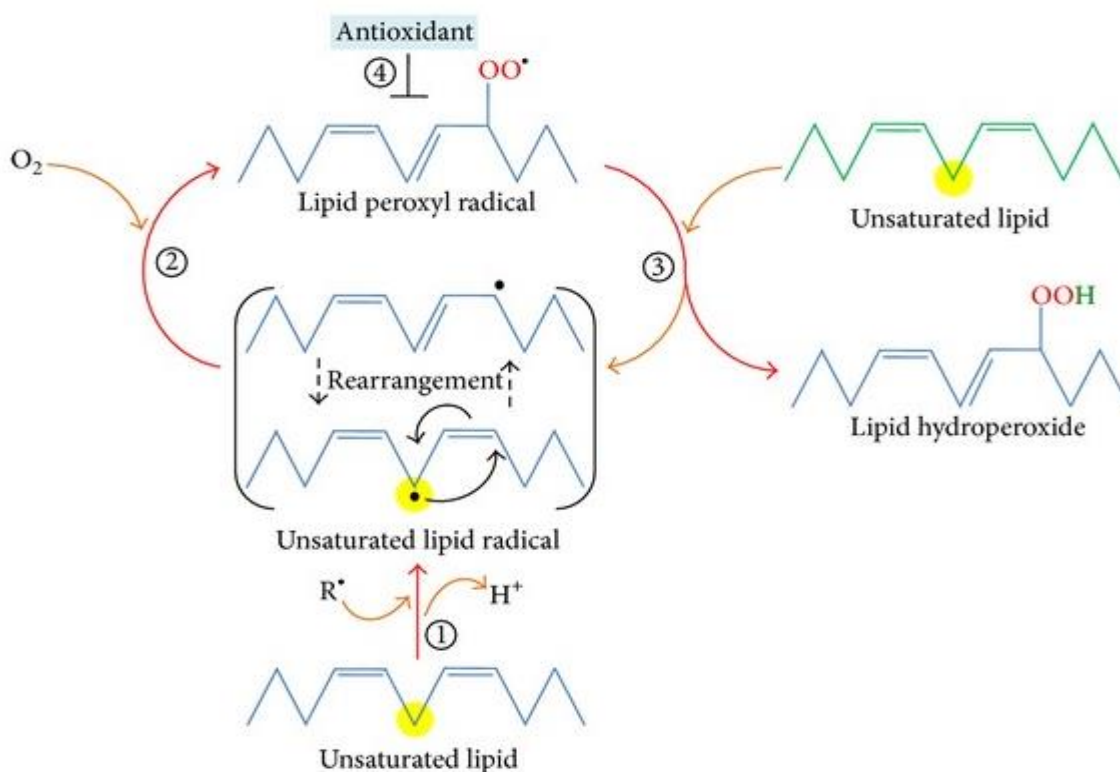


Figura 4. **Procesul de peroxidare al lipidelor**, conform Ayala A., et al. [103]

Acizii grași polinesaturați din membranele celulare fac aceste structuri vulnerabile la stres oxidativ. Peroxidarea lipidelor este un proces ce are loc în etape, așa cum este arătat în figura 4 [103]. Se cunoaște faptul că propagarea în lanț duce la degradarea membranelor. În prima etapă (1) este sustras un atom de hidrogen, deoarece prezența legăturii duble în adiacență face ca legătura dintre carbon și hidrogen să fie slabă, iar hidrogenul să poată fi ușor îndepărtat de la moleculă. Ulterior, radicalul rămas, datorită rearanjamentului structurii moleculare, formează o dienă conjugată, care poate fi inclusă în transformări, când  $O_2$  este în concentrații suficiente (2), care să propage procesul de peroxidare, formându-se un radical care va sustrage un alt atom de hidrogen

de la acidul gras vecin (3). Astfel, se favorizează o reacție în lanț, implicând lipidele membranare nesaturate. La finalul procesului, toate lipidele nesaturate din membrane pot fi peroxidate, iar hidroperoxizii lipidici pot fi descompuși în aldehide sau formează endoperoxizi ciclici și alți compuși [58]. Antioxidanții pot întrerupe acest proces (4), donând un hidrogen radicalului lipidic, care va fi transformat într-un non-radical, și, astfel, putând fi blocată reacția de propagare [103].

Peroxizii lipidici își exercită efectele toxice prin două mecanisme generale. Deoarece lipidele sunt responsabile pentru menținerea integrității membranelor celulare, peroxidarea intensă a lipidelor modifică compoziția, structura, dinamica și ansamblarea membranelor. Ca și compuși extrem de reactivi, peroxizii lipidici rezultați sunt, de asemenea, capabili să stimuleze producerea suplimentară de SRO sau să se degradeze în compuși reactivi capabili să modifice ADN-ul și proteinele [104]. Unul dintre acești compuși ce apare ca rezultat al peroxidării membranelor biologice este DAM. Ea este utilizată ca indicator pentru estimarea leziunilor provocate de speciile reactive de oxigen [105], atât *in vivo*, cât și *in vitro* [106]. DAM este considerabil crescută în afecțiunile prin I/R și se crede că aceasta ar provoca deteriorarea integrității și permeabilității membranei celulare [106]. La fel, se consideră că DAM și dienele conjugate sunt substanțe citotoxice și mutagene [54].

Proteinele, de asemenea, sunt molecule susceptibile de a fi modificate în condiții de stres oxidativ [107]. Acestea pot fi modificate reversibil și ireversibil. Modificările reversibile ale proteinelor, cum ar fi S-glutationilarea, S-nitrozarea și sulfoxidarea metioninei, pot avea un rol dublu, și anume de protecție împotriva oxidării ireversibile și de modulare a funcției proteice (reglare redox). Printre modificările ireversibile, cu pierderea activității biologice, se menționează carbonilarea proteinelor, detectarea compușilor proteici carbonilici fiind recunoscută ca un indice al stresului oxidativ în celulele afectate [108]. Aceștia se formează prin clivarea oxidativă a lanțului proteic, dar și prin alte căi, cum ar fi dezaminarea oxidativă a lizinei și a acidului glutamic [109].

Superoxid anionul este considerat o SRO relativ stabilă și are o rată scăzută de interacțiune cu componentele biologice, care, totuși, poate cauza oxidarea proteinelor și a altor macromolecule [58]. Modificările oxidative ale proteinelor, pe lângă faptul că dereglează funcționarea adecvată a celulei, mai pot determina dobândirea unei funcții toxice, cu acțiune negativă și asupra altor macromolecule [110]. Toate acestea, împreună cu peroxidarea lipidelor și distrugerile enzimaticе, pot participa la apariția altor radicali mult mai reactivi, care amplifică stresul oxidativ [58].

Printre indicii de laborator care sunt studiați în contextul modificărilor oxidative ale proteinelor sunt produșii proteici de oxidare avansată (PPOA) și albumina ischemic modificată (AIM).

O cantitate crescută de SRO induce modificări în structura proteinelor, transformându-le în particule patologice numite PPOA, care sunt derivați modificați oxidativ ai fibrinogenului,

albuminei și lipoproteinelor. PPOA pot fi detectați în condiții fiziologice, în concentrații scăzute, în sângele persoanelor sănătoase [111]. Intensificarea modificării oxidative a proteinelor și creșterea concentrației PPOA sunt confirmate de multe investigații experimentale în diferite stări patologice, în special, în acele în care este implicat stresul oxidativ [112].

S-a stabilit că principala enzimă responsabilă de formarea PPOA este mieloperoxidaza din neutrofile, iar acidul hipocloros (HClO) și cloramina (NH<sub>2</sub>Cl) transformă direct proteinele în PPOA [111].

Astfel, PPOA se formează ca rezultat al reacției dintre oxidanții clorinați și proteinele plasmatică. Acest grup de molecule modificate includ ditirozină, pentozidină și produse proteice care conțin grupa carbonil [113, 114]. Ele sunt recunoscute ca markeri ai leziunilor oxidative ale proteinelor, intensificării stresului oxidativ și inflamației [111, 115], așa cum cercetările au relevat faptul că aceste molecule de proteine modificate au efect proinflamator și prooxidativ [116]. Există cercetări care au demonstrat că PPOA-urile sunt, de asemenea, capabile să amplifice producerea de SRO. Aceasta se realizează printr-un mecanism care implică NAD(P)H oxidază, care este activată de către PPOA prin calea dependentă de proteinkinaza C, astfel, ducând la o generare excesivă de superoxid intracelular [115]. Unii cercetători consideră PPOA-urile o clasă de mediatori inflamatori, deoarece au capacitate de inducere a citokinelor proinflamatorii și a moleculelor de adeziune [117].

Albumina este o proteină care este modificată în urma interacțiunii cu SRO, în situații ce presupun stări de ischemie/reperfuzie și acidoză, cauzându-i schimbări structurale care îi descresc capacitatea de a fixa unele metale, cum ar fi cupru, nichel și cobalt. Această nouă structură formată poartă denumirea de albumină ischemic modificată [118, 119] și este un marker aprobat al ischemiei în patologia cardiacă [118, 120]. Cercetători emeriți autohtoni au dezvoltat un protocol de dozare a acesteia care nu este costisitor și ar putea fi folosit în oricare laborator din țară [121]. Există studii care arată că stresul oxidativ în TO intensifică producerea AIM [29, 119, 122-126].

Un alt biomarker ce poate fi identificat în condiții de stres oxidativ este cunoscut sub denumirea de AGE. AGE-urile sunt un grup de molecule heterogene care apar ca rezultat al reacției neenzimatice dintre carbohidrații reducători și grupările amino ale lipidelor, ADN-ului și, în special, a proteinelor [109, 127] cu timp de înjumătățire mare. Acest proces are loc în timpul metabolismului normal, dar este și mai pronunțat în condiții de hiperglicemie, hiperlipidemie și stres oxidativ. Reacția de glicare poate fi însoțită de o oxidare care duce la formarea de produse de glicoxidare. Carboximetil valina și pentozidina sunt printre cei mai cunoscuți AGE rezultați în urma glicoxidării [109].

Principalul rol în lezarea ADN-ului îl are radicalul hidroxil. În concentrații fiziologice anionul superoxid și peroxidul de hidrogen nu modifică acizii nucleici. Principalele leziuni care

apar în urma acțiunii SRO sunt: rupturi ale lanțurilor, modificarea bazelor azotate, deteriorarea dezoxiribozei, pierderea purinelor, precum și deteriorarea sistemului de reparare al ADN-ului [58]. În condițiile unui lanț transportator de electroni mitocondrial disfuncțional este afectat, în special, ADN-ul mitocondrial, datorită localizării sale în apropiere [128].

Un exces de SRO poate provoca, de asemenea, eliberarea de  $\text{Ca}^{2+}$ , care are ca rezultat modificarea permeabilității mitocondriale, cu o instabilitate a membranei miocondriale și încetarea producerii de ATP [21]. Concomitent, destabilizarea membranelor mitocondriale cauzate de peroxidarea lipidelor permite influxul de molecule nespecifice mici, ceea ce duce la tumefierea și apoptoza matricei mitocondriale [128].

#### **1.1.4. Acțiunea fiziologică a SRO la nivelul sistemului reproducător feminin**

Literatura de specialitate oferă unele dovezi referitor la faptul că stresul oxidativ influențează întreaga perioadă reproductivă a unei femei și menopauza [72].

La nivelul sistemului reproducător feminin, SRO pot avea implicații atât fiziologice, cât și patologice. Înțelegerea mecanismelor prin care acestea se produc și cunoașterea efectelor acestora ar putea ajuta la preîntâmpinarea patologiilor ginecologice soldate cu infertilitate [129].

Ovarul este un organ în care se produc SRO în cantități mari în diferite procese metabolice, mai ales în stadiile finale ale foliculogenezei, cât și la ovulație [130]. Ovulația este legată de nivelul de hormon luteinizat (LH), iar studiile au demonstrat că expunerea la LH crește nivelul SRO în foliculii ovarieni. Studiile *in vitro* au atestat că suprimarea SRO prin acțiunea SOD împiedică ovulația [131].

S-a constatat că în sistemul reproducător feminin, SRO și antioxidanții îndeplinesc roluri fiziologice pe parcursul foliculogenezei, maturării ovocitelor, regresiei luteale și fertilizării [132], iar producerea crescută de SRO este datorată metabolismului activ și steroidogenezei, menționându-se faptul că țesutul se află într-o stare de stres oxidativ continuu [67]. S-a stabilit că o anumită cantitate de SRO, în limite fiziologice, este necesară pentru dezvoltarea adecvată a ovocitelor și se sugerează că ar putea fi utilizată ca marker pentru ovocitele sănătoase aflate în curs de dezvoltare [130]. Maturarea ovocitelor, în etapa finală a foliculogenezei, este însoțită de creșterea SRO [67]. În aceste condiții, pentru menținerea stării redox, ovarul dispune de enzime antioxidante, precum SOD, CAT, GPO, etc. [130].

Un alt efect al SRO asupra sistemului reproducător feminin, evidențiat de către cercetători, este acțiunea acestora asupra steroidogenezei. S-a stabilit că steroidogeneza din ovare este inhibată de către oxidul nitric, acesta reducând nivelul de progesteron [133]. Activitatea  $\text{NO}\cdot$  este legată de stimularea guanilat ciclazei și de creșterea concentrației de GMPC. De asemenea,  $\text{NO}\cdot$  își exercită efectele prin atașarea la gruparea prostetică hem a enzimelor. Astfel,  $\text{NO}\cdot$  se poate lega direct de

aromataza P<sub>450</sub>, o enzimă cheie în steroidogeneză [76], inhibând activitatea citocromului P<sub>450</sub> [134].

S-a constatat că producerea de progesteron și estradiol este redusă atunci când se adaugă peroxid de hidrogen la o cultură de celule luteale, care au fost stimulate cu gonadotropină corionică umană. Cercetătorii au concluzionat că peroxidul de hidrogen scade steroidogeneza atât dependentă de AMPc, cât și non-AMPc dependentă [72]. De asemenea, radicalii superoxizi, care sunt generați în citoplasmă și în mitocondrii ca urmare a metabolismului normal și steroidogenezei din timpul dezvoltării foliculare, au un efect inhibitor asupra steroidogenezei [65].

În contextul metabolismului ovarian, există dovezi clare că NAD(P)H oxidaza, mieloperoxidaza și NOS, și produsele acestora, care includ superoxid anionul, acidul hipocloros, și, respectiv monoxidul de azot, declanșează răspunsurile citotoxice ale sistemului imunitar [21].

SRO joacă un rol important în fosforilarea și activarea proteinkinazelor. Deci, SO activează proteinele fosforilate, acestea fiind implicate în reglarea ciclului celular. S-a stabilit că inhibarea acestor cascade de transducție de către antioxidanți, cum ar fi SOD, poate împiedica progresia ciclului celular [21].

Toate mecanismele menționate arată faptul că ovarele sunt organe în care au loc modificări fiziologice importante cu implicarea speciilor reactive de oxigen, iar un anumit nivel al stresului oxidativ este esențial pentru buna lor funcționare.

## **1.2. Mecanisme biochimice ale dezvoltării leziunilor prin ischemie/reperfuzie**

Conform datelor literaturii, procesul de torsiune/detorsiune ovariană presupune leziune prin I/R [13, 24, 26, 29-34, 38, 40-51]. Încă nu este pe deplin clar care ar fi durata ischemiei pe care ovarul o poate tolera [135], așa cum studiile precedente au stabilit că anume condiții hipoxice sunt create în timpul foliculogenezei și acestea susțin ovulația [136-138].

Cercetările anterioare, efectuate pe organe care pot fi supuse procesului de torsionare, au arătat că severitatea afectării histologice ischemice depinde de doi factori importanți, și anume, de durata și de gradul torsiunii [139].

În faza ischemică, leziunea anoxică începe să se producă odată cu reducerea producerii ATP-ului de către mitocondrii. Datorită deficienței energetice, au loc dezechilibre ale homeostaziei intracelulare a ionilor, activarea hidrolazelor și creșterea esențială a permeabilității membranelor celulelor. Concomitent, pH-ul citoplasmatic scade, iar viteza glicolizei și acumulării lactatului, și eliberării H<sup>+</sup> din lizozomii deteriorați crește [140]. LDH catalizează transformarea piruvatului în lactat, iar activitatea enzimei este considerată un punct de control cheie al glicolizei anaerobe. Hipoxia poate fi sesizată de celule, astfel încât acestea vor suferi adaptări metabolice pentru a

compensa aportul inadecvat de O<sub>2</sub>. O adaptare majoră intracelulară la hipoxia severă este trecerea de la fosforilarea oxidativă la glicoliză ca principal mijloc de generare a ATP-ului [141].

Prejudiciul total adus țesutului în condiții de I/R este constituit din două părți: daunele produse de ischemie și leziunile induse de reperfuzie. Se cunoaște faptul că ischemia unei anumite regiuni a corpului poate provoca deteriorări tisulare din cauza lipsei de oxigen și nutrienți [128]. Astfel, leziunea ischemică apare din cauza unui dezechilibru între cerințele energetice și capacitatea de producere a energiei necesare pentru susținerea diferitor activități metabolice [13], iar reperfuzia prin detorsiune protejează ovarul de injuria ischemică [27].

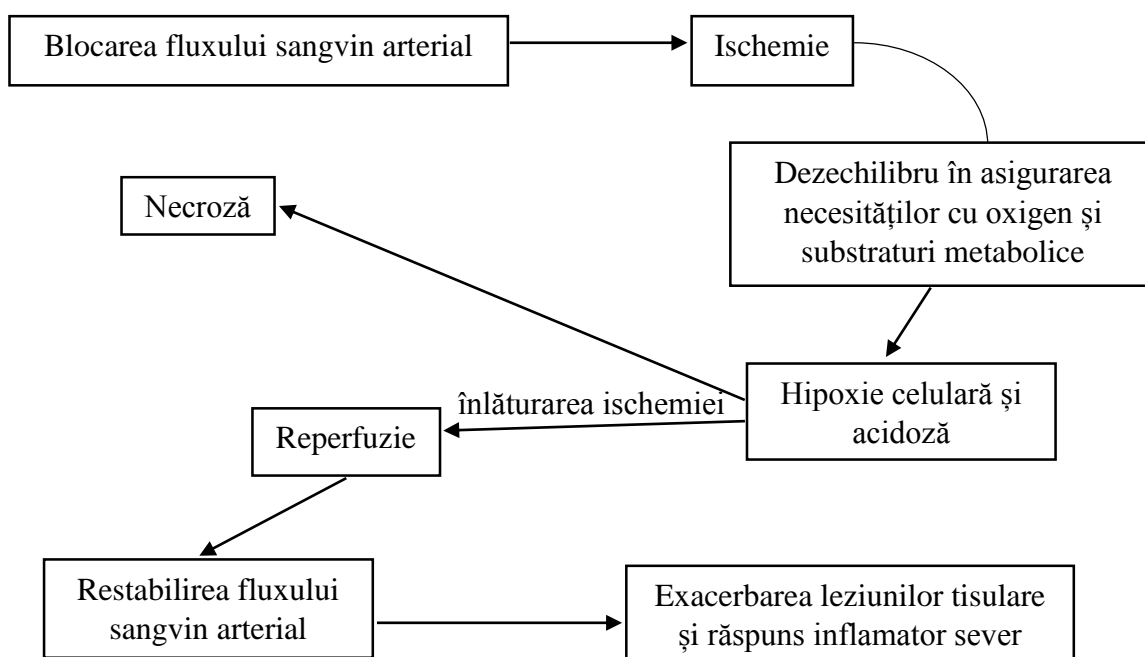


Figura 5. Etapele desfășurării procesului lezional în afecțiuni caracterizate prin ischemie și reperfuzie, adaptată de noi după Rodríguez-Lara S.Q., et al. [62]

Deși restabilirea fluxului sangvin este esențială pentru a preveni leziunile tisulare ireversibile [142], reperfuzia poate duce la un răspuns, care poate spori prejudiciul tisular [46, 85, 99, 142-144], agravând leziunile cauzate doar de ischemie [51, 142-145]. Afectarea țesutului ovarian în perioada de reperfuzie este condiționată de mai mulți factori, inclusiv de inflamație, infiltrarea cu leucocite, generarea radicalilor liberi ai oxigenului și creșterea cantităților dialdehidei malonice [85]. În timpul reperfuziei țesutului ischemic s-a observat o producere crescută de peroxinitrit, oxid nitric, peroxid de hidrogen, radical hidroxil și anion superoxid. Aceștia provoacă leziuni celulare, în mod deosebit, prin peroxidarea lipidelor din membranele mitocondriale și celulare [106]. Etapele desfășurării procesului lezional în afecțiuni caracterizate prin ischemie și reperfuzie sunt ilustrate în figura 5 [62].

Aceste date înregistrate în ultimii ani sunt în contradicție cu datele mai vechi ale literaturii. Astfel, într-o cercetare efectuată pe torsiunea ovariană în 1998, parametrii biochimici și histologici studiați nu au relevat efecte adverse ale reperfuziei [135].

Scopul principal al tratării ischemiei este nu doar de a restabili circulația sangvină, dar și de a îmbunătăți perfuzia tisulară. După perioada de ischemie, când fluxul sangvin este restaurat și menținut, se întâlnește un nou proces patologic numit leziune de reperfuzie, care provoacă mai multe grade de afectare tisulară. Deteriorarea totală pe care o suportă țesutul este suma leziunilor cauzate atât de ischemie, cât și de reperfuzie, iar prevenirea cumulării acestora crește succesul oricărui tratament [13, 29-34, 40, 41, 51].

Leziunea cauzată de I/R este o stare patologică, implicată într-un număr mare de maladii, care poate duce la moartea celulelor. Reperfuzia, după ischemie, este necesară pentru a asigura necesarul de substanțe nutritive, inclusiv de oxigen. Totuși, la reintroducerea oxigenului în țesutul ischemizat se produc SRO care înrăutățesc leziunile deja existente. Spre exemplu, s-a demonstrat deja că după 3 ore de ischemie urmate de o oră de reperfuzie în țesuturi schimbările histologice lezionale sunt mult mai grave decât cele observate după 4 ore de ischemie fără reperfuzie [142, 143]. S-a raportat că o situație de I/R provoacă inflamație acută odată cu creșterea citokinelor inflamatorii, în special TNF $\alpha$  (factorul de necroză tumorală alfa) [28, 38], IL-1 (interleukina-1) și IL-6 (interleukina-6) [143]. Astfel, se intensifică infiltrarea cu neutrofile, care vor produce mediatori inflamatori, inclusiv SRO [28, 38, 146].

Ocluzia fluxului de sânge cu înlăturarea ulterioară a acesteia este cunoscută prin faptul că sporește producerea de SRO, care depășește capacitatea de protecție a sistemului antioxidant endogen, având ca rezultat deteriorarea tisulară [128]. Acest fapt a fost demonstrat inclusiv în studii naționale pe rinichi [147] și ficat [148], cercetătorii măsurând radicalii liberi prin metoda rezonanței paramagnetice de spin, indicii peroxidării lipidice și enzimele antioxidante, și confirmând intensificarea SO [147, 148].

Afectarea I/R se caracterizează prin creșterea producerii de oxidanți, adeziune leucocitară endotelială, creșterea permeabilității microvasculare, agregare trombocitară, leucocitară, activarea complementului, scăderea relaxării dependente de endotelium [142] și inflamație [44].

În timpul ischemiei și reperfuziei, schimbările în structura și funcția multor enzime contribuie, de asemenea, la agravarea stresului oxidativ și a inflamației. Printre cele mai importante în literatură sunt menționate xantina oxidaza și NADPH oxidaza [44].

În mitocondrii, în condiții fiziologice, cea mai mare parte a oxigenului este redusă la H<sub>2</sub>O de către citocrom c oxidaza. Astfel, în mod normal, electronii sunt transferați prin lanțul transportator de electroni mitocondrial pentru reducerea oxigenului la apă, însă este posibil, în anumite condiții, să fie implicați în producerea de SRO [149]. Superoxid anionul este generat inclusiv și în procesul



de reperfuzie, doar că în cantități mai mari [150]. Se evidențiază faptul că producerea masivă de SRO în timpul reperfuziei este secundară scurgerii de electroni în special de la complexe I și III din lanțul transportator de electroni mitocondrial [149]. În același timp, interacțiunea dintre superoxid și oxidul nitric generează peroxinitrit, care, la rândul său, va fi implicat în reducerea respirației mitocondriale datorită nitrării complexelor I și IV, reducând astfel consumul respirator de oxigen. În această situație, hiperoxigenarea tisulară va determina producerea suplimentară de SRO [128]. Concomitent, un fenomen evidențiat în literatura de specialitate în condiții de hipoxie este scăderea activității mai multor enzime mitocondriale, incluzând citocrom oxidaza și superoxid dismutaza (Mn-SOD) [70].

În situații de hipoxie se reduc ratele fosforilării oxidative, iar nivelul de ATP scade, deoarece este utilizat [151]. Epuizarea ATP-ului induce activarea canalelor de  $K^+$  sensibile la ATP ( $K_{ATP}$ ) mitocondriale. Activarea  $K_{ATP}$  mitocondriale duce la influxul de  $K^+$  în matricea mitocondrială și la efluxul de  $H^+$ . Acest fenomen accelerează transportul de electroni în lanțul respirator cu o creștere a producerii speciilor reactive [62].

Există cercetări care au demonstrat prezența canalelor  $K_{ATP}$  la nivelul celulelor țesutului ovarian, totuși, fără vreo evidență clară a prezenței acestora la nivelul membranelor mitocondriale [152]. Sunt publicații care susțin faptul că în membrana celulară a ovocitelor  $K_{ATP}$  sunt menținute închise de cantități fiziologice sau ridicate de ATP intracelular. În situații de hipoxie, când are loc reducerea concentrației de ATP din celule, aceste canale scapă de inhibiție, provocând hiperpolarizarea membranei. Această hiperpolarizare inhibă canalele de  $Ca^{2+}$  voltaj-dependente și previne supraîncărcarea intracelulară cu  $Ca^{2+}$  [153], acest fapt putând fi văzut ca un mecanism protector în condițiile în care energia celulară este redusă semnificativ.

În același timp, epuizarea ATP-ului duce la acumularea de AMP, adenozei, inozinei, hipoxantinei și inhibarea activității  $Na^+/K^+$  ATP-azei, pompă ATP-dependentă, care menține gradientul fiziologic al acestor ioni la nivelul membranei celulare. Scăderea activității pompelor ionice ATP-dependente determină o creștere a cantității ionilor de calciu și sodiu în celule, cu efecte negative [37], inclusiv edemul celulei în perioada de ischemie [154]. Astfel, leziunea ischemică apare din cauza unui dezechilibru între cantitatea de energie care este produsă și necesitățile celulei [13].

În timpul ischemiei apar o serie de modificări în celulă, care includ activarea antiportului  $Na^+/Ca^{2+}$  și a canalelor de  $Ca^{2+}$  de tip L, care induc o creștere a cantității de  $Ca^{2+}$  citoplasmatic [62]. În literatura de specialitate se precizează că deteriorarea majoră a țesutului care apare în timpul leziunii I/R este secundară influxului de calciu în celulă, iar rezultatele încurajatoare care au fost obținute în țesuturi în urma administrării blocanților canalelor de calciu, cu scopul prevenirii leziunii I/R, sprijină această afirmație [48, 49, 155].

Intensificarea glicolizei anaerobe în timpul ischemiei duce la acumularea progresivă de protoni și acid lactic. Celulele încearcă să corecteze acidoza prin intensificarea antiportului  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ,  $\text{H}^+$  fiind scos extracelular, respectiv, ele încărcându-se cu  $\text{Na}^+$  [156]. Astfel, efluxul de  $\text{H}^+$  produce un influx de  $\text{Na}^+$ , crescând concentrația de sodiu în citoplasmă [62].

Așa cum excesul de  $\text{Na}^+$  nu poate fi înlăturat din celulă prin intermediul  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP-azei, din cauza deficitului important de ATP, surplusul de  $\text{Na}^+$  va fi scos în afara celulei prin antiportul  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , având, în schimb, ca rezultat, majorarea concentrației citoplasmatică de  $\text{Ca}^{2+}$  [62, 156].  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmatic duce la contracția citoscheletului, la activarea fosfolipazei  $\text{A}_2$  [143] și la eliberarea acidului arahidonic și creșterea nivelului metaboliților săi, cum ar fi prostaglandine, leucotriene și tromboxani, care vor determina adeziune și infiltrare cu neutrofile a țesuturilor, și agregare plachetară. Odată ajunse în țesuturi, neutrofilele produc cantități mari de SRO, care conduc la stres oxidativ [71, 143].

În același timp, concentrația crescută de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmatic și hipoxia vor crește permeabilitatea membranei mitocondriale, cu umflarea mitocondriilor și eliberarea citocromului c, care activează o cale de semnalizare care implică caspazele 1 și 9, ce induce apoptoza celulară. Pe de altă parte, creșterea  $\text{Na}^+$  va produce edem celular, care va deteriora membrana plasmatică, având ca rezultat moartea celulelor prin necroză [140].

Concentrația crescută de calciu citoplasmatic determină transformarea enzimei xantin dehidrogenaza în xantin oxidază, prin mecanism proteolitic [82]. Forma xantin dehidrogenaza este predominantă în țesuturi în condiții fiziologice și catalizează oxidarea hipoxantinei cu formare de xantină, și oxidarea xantinei cu formare de acid uric [157].

Diferența între xantin dehidrogenază și xantin oxidază se referă la acceptorul de electroni: xantin dehidrogenaza are ca și cofactor  $\text{NAD}^+$  și oxidarea substratului regenerează NADH, în timp ce XO utilizează xantină și hipoxantină, și  $\text{O}_2$ , ceea ce duce la formarea de acid uric [158], superoxid [158-160] și peroxid de hidrogen [159, 160]. Astfel, hipoxantina acumulată în perioada de ischemie, sub acțiunea XO, este transformată în xantină, concomitent crescând esențial și producerea de anioni superoxid de îndată ce oxigenul este reperfuzat. Se consideră că acest mecanism stă la baza inițierii generării leziunilor oxidative în perioada reperfuziei, după cum este arătat în figura 6 [161].

Hipoxantina și xantina sunt substraturi pentru enzima XO. Acestea sunt rezultatul degradării ATP-ului. Pentru metabolizarea acestora la acid uric este necesar oxigenul molecular, care este furnizat în momentul restabilirii fluxului sangvin. Această transformare are loc concomitent cu generarea superoxidului ca un produs secundar. Deci, această reacție nu apare decât după furnizarea necesarului de oxigen în timpul reperfuziei [161, 162].

De asemenea, concentrația citoplasmatică de calciu ridicată activează canalele de  $K^+$  mitocondriale sensibile la calciu (mtKca), crescând influxul de  $K^+$  în matrice. Concomitent,  $Ca^{2+}$  în exces activează nitric oxid sintaza mitocondrială (mtNOS), ceea ce duce la creșterea nivelului de  $NO\cdot$  [62]. Astfel, se presupune că în situații de hipoxie, în mitocondrii, mecanismul producerii SRO implică și oxidul nitric care ar inhiba citocrom c oxidaza [62, 159]. Blocarea complexului IV al lanțului respirator va determina micșorarea ATP-ului [62], concomitent, cu reducerea în amonte de oxidaza terminală (citocrom c oxidaza) a oxigenului rămas la anionul superoxid [159]. Epuizarea ATP-ului induce activarea canalelor mitocondriale de  $K^+$  sensibile la ATP ( $K_{ATP}$  mitocondriale), ceea ce va spori influxul de  $K^+$  în matricea mitocondrială și efluxul de  $H^+$ . Această schimbare va accelera transportul de electroni în lanțul respirator, care, la rândul său, va produce mai multe SRO și SRN [62].

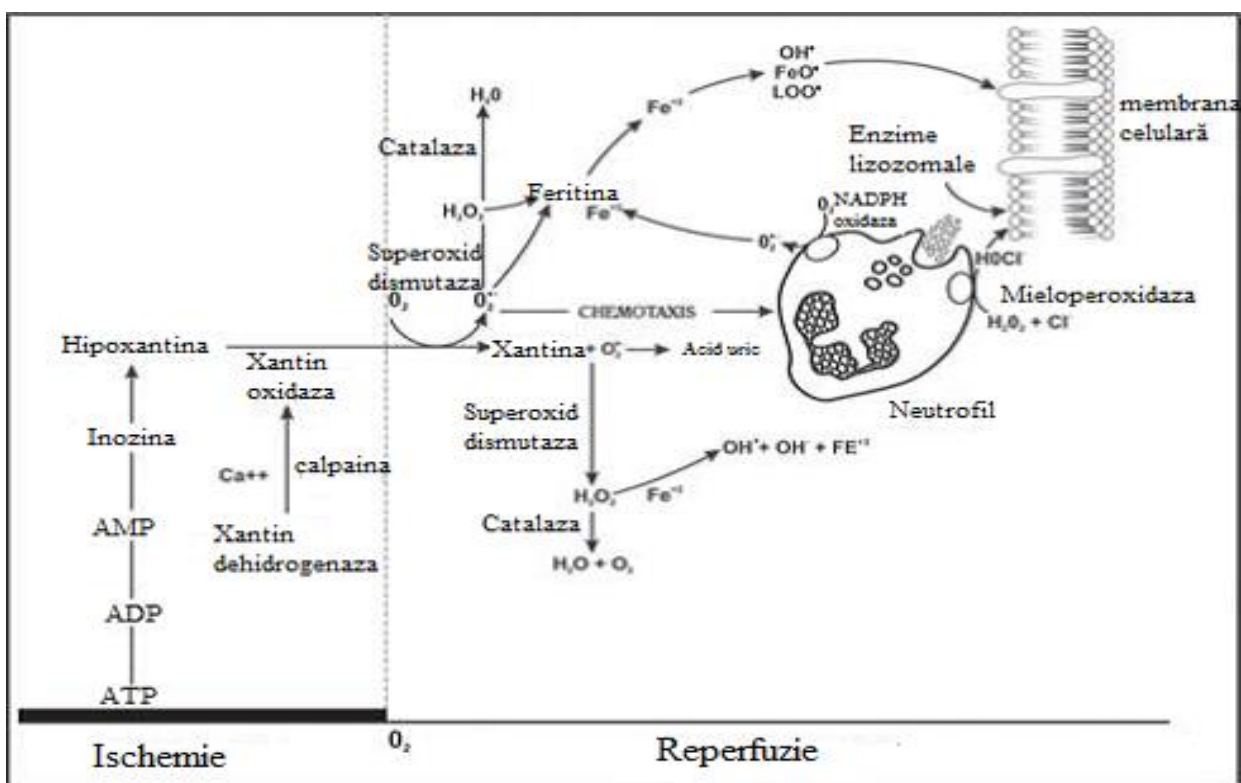


Figura 6. **Mecanisme biochimice ale leziunii I/R**, modificată de noi după Francischetti I., et al. [161]

Superoxidul poate ataca centrele Fe-S din lanțul transportator de electroni mitocondrial și, astfel, provoacă reducerea  $Fe^{3+}$  și eliberarea  $Fe^{2+}$ , transportatorii de electroni devenind disfuncționali. Se cunoaște faptul că ioni  $Fe^{2+}$  pot participa în reacția chimică Fenton, prin care peroxidul de hidrogen poate fi transformat în radical hidroxil, care este mai nociv pentru proteinele celulare și lipidele membranare [149].

Mai mult decât atât, superoxidul reacționează rapid cu oxidul nitric pentru a genera, în special, peroxinitrit [62, 157]. O complicație a acestei reacții poate fi afectare procesului de

vasodilatație indus de NO<sup>•</sup>, în special în condiții de ischemie, când activitatea NOS este scăzută [157].

Un alt mecanism prin care se reliefează faptul că mitocondriile au un rol central în dezvoltarea leziunilor de reperfuzie este că odată cu restabilirea pH-ului, intensificarea stresului oxidativ și supraîncărcarea cu calciu, se induce deschiderea bruscă a porilor de tranziție a permeabilității mitocondriale (mPTP), megacanal de înaltă conductanță care sunt localizate în site-urile de contact între membranele mitocondriale internă și externă. Când sunt deschise, mPTP permit comunicarea între citoplasmă și matricea mitocondrială. Deși pH-ul scăzut în timpul ischemiei împiedică deschiderea mPTP, formarea excesivă de SRO la debutul reperfuziei este esențială pentru deschiderea lor și agravarea leziunilor existente, datorită modificării profunde și ireversibile a homeostaziei energetice celulare. Formarea de pori duce la creșterea permeabilității mitocondriale la ioni și molecule cu greutatea moleculară până la 1,5 kDa și la colapsul potențialului membranei mitocondriale. Aceasta este urmată rapid de epuizarea ATP-ului și a NAD<sup>+</sup>-ului, de eliberarea calciului mitocondrial acumulat, de umflarea matricei și ruperea membranei mitocondriale externe, care, la rândul său, are ca rezultat eliberarea factorilor proapoptotici și inhibarea fluxului de electroni prin lanțul transportator de electroni cu moarte celulară [163].

Un alt mecanism patogenetic al leziunii tisulare în timpul reperfuziei este considerat a fi acumularea neutrofilelor activate care produc specii reactive de oxigen [45, 50, 51, 164-166], concomitent cu o scădere a activității enzimelor antioxidante [99, 167].

Se cunoaște că activitatea crescută a leucocitelor polimorfonucleare care ajung în regiunea ischemică în cantități mari joacă un rol important în leziunile de reperfuzie. Acestea eliberează substanțe proinflamatorii în țesuturile supuse I/R, în literatura de specialitate precizându-se că simptomele inflamației în țesutul ovarian ischemic devin mai severe odată cu restabilirea fluxului sangvin [46].

S-a demonstrat că activitatea mieloperoxidazei, enzimă produsă de neutrofile și macrofage, este crescută în țesutul ovarian supus ischemiei/reperfuziei [45, 51]. MPO crește formarea unui oxidant toxic care poate afecta țesuturile, și anume a acidului hipocloros (HOCl), prin oxidarea ionilor de clorură cu peroxid de hidrogen. Aceste informații din literatură indică faptul că leziunea I/R va scădea odată cu inhibarea producerii de MPO din polimorfonucleare [46].

Deci, activarea celulelor fagocitare în timpul I/R determină o producere suplimentară de SRO. Acest proces implică neutrofilele circulante care migrează spre zonele de țesut lezate [46], ele dispunând de NADPH oxidază 2. Spre deosebire de NADPH oxidaza 2, NADPH oxidaza 1, care este localizată în ovare, stimulează direct expresia TNF- $\alpha$ . Acest lucru sugerează că NADPH

oxidaza 1 poate avea, de asemenea, efecte importante asupra răspunsului inflamator acut, inducând, de asemenea, apoptoza celulelor în timpul I/R [44].

Totodată, în condiții de stres oxidativ se reduce activitatea enzimelor antioxidante [168]. S-a constatat că o cantitate crescută de SRO are efecte negative asupra diferitor molecule antioxidante, cum ar fi GSH [41], SOD [41, 168] și catalaza [168] din diferite țesuturi [147, 148, 168], inclusiv și din ovare [41].

În perioada post-I/R, SRO sunt produse în cantități mari, iar mecanismele de apărare antioxidante ale organismului sunt compromise [106]. Deoarece țesutul ischemic primește un aport excesiv de oxigen molecular în timpul reperfuziei, afecțiunea ischemică acută este agravată de produsele stresului oxidativ, inclusiv de radicalii liberi și speciile reactive de oxigen, care, peroxidând lipidele, vor afecta permeabilitatea membranelor celulare și vor perturba integritatea celulelor [15, 106].

Astfel, dacă acțiunea dăunătoare a SRO ar putea fi limitată, leziunea prin I/R ar putea fi evitată sau redusă [169].

### **1.3. Fenomenul de postcondiționare ischemică**

În literatură este menționat fenomenul de postcondiționare ischemică ca unul benefic [71, 143, 170-176], care ar putea diminua producerea SRO și, în acest fel, s-ar reduce leziunile de reperfuzie [170, 172, 174]. PcI a fost definită ca „scurte perioade de ischemie care alternează cu scurte perioade de reflux, aplicate la debutul reperfuziei, după o ischemie prelungită” [128]. În prezent, în funcție de intervalul de timp după care este aplicată, PcI poate fi clasificată în rapidă și întârziată. PcI rapidă se efectuează în câteva secunde până la câteva minute, în timp ce PcI întârziată se consideră de la câteva ore până la 2 zile după reperfuzie [177].

Principalii mediatori și efectori implicați în mecanismele PcI sunt: mPTP, NO<sup>-</sup>, adenzina, canalele K<sub>ATP</sub> (canalele de K<sup>+</sup> dependente de ATP) și kinaza de pro-supraviețuire [178]. De asemenea, în literatura de specialitate se menționează că efectul protector al PcI poate fi datorat unei scăderi în generarea de SRO, protecției integrității mitocondriale, diminuării răspunsului inflamator, cu reducerea acumulării de neutrofile în regiunea afectată și scăderea adeziunii lor la endoteliul vascular ischemic, inclusiv cu atenuarea disfuncției endoteliale a vasului implicat în procesul patologic, evenimente care apar, în mod obișnuit, în I/R [174].

Se sugerează că producerea abundantă de SRO în faza inițială a reperfuziei este un factor important în patogeneza leziunii tisulare, iar PcI acționează în acest stadiu, reducând, probabil, cantitatea de SRO sintetizată prin introducerea treptată a oxigenului în țesut [179].

Condiția esențială pentru un rezultat favorabil ar fi intervenția în primele minute din momentul restabilirii circulației. Studiile au arătat că se poate de redus mărimea infarctului datorat

fenomenului I/R, dacă până la restabilirea completă a fluxului sangvin, se aplică scurte perioade de ischemie, urmate de scurte perioade de perfuzie tisulară, permițându-se restabilirea graduală a circulației sangvine [171, 172]. S-a constatat că după o ischemie prelungită, în diferite experimente efectuate pe mai multe specii de animale, episoadele scurte de întrerupere a fluxului sangvin, la debutul reperfuziei, au redus esențial dimensiunea leziunii [156].

În reperfuzia precoce, o întrerupere temporară a respirației mitocondriale poate preveni generarea exagerată de anion superoxid și peroxinitrit, poate reduce oxidarea tiolilor și inactivarea permanentă a enzimelor, sau este implicată în inhibarea deschiderii mPTP [180].

Deci, unul dintre factorii care determină moartea celulelor după I/R este legat de deschiderea mPTP [180]. Producerea excesivă de SRO în primele minute ale revascularizării [170] și supraîncărcarea cu  $Ca^{2+}$  vor declanșa deschiderea mPTP [170, 181]. Aceasta va determina colapsul potențialului membranei, decuplarea lanțului respirator și efluxul citocromului c și a altor factori proapoptotici, care pot duce la apoptoză sau necroză. Se sugerează că reducerea producerii de SRO prin fenomenul de postcondiționare ar fi responsabilă de întârzierea deschiderii mPTP [170] și, astfel, reducerea dimensiunilor leziunilor. Concomitent, s-a constatat că  $NO\cdot$  poate influența diferit activitatea mitocondriilor, în dependență de concentrația sa. O concentrație ridicată de  $NO\cdot$  deschide mPTP, în timp ce nivelurile fiziologice favorizează închiderea mPTP [180]. Totuși, datele referitoare la implicarea mPTP în procesul patologic sunt contradictorii. Atunci când deschiderea mPTP a fost blocată farmacologic cu ciclosporină A nu s-a reușit reducerea dimensiunii infarctului la unele specii de animale, pe când la altele a avut un efect favorabil. Studii recente sugerează că deschiderea mPTP și rolul său în moartea celulelor indusă de reperfuzie este dependentă de durata ischemiei [176].

Se consideră că activarea canalelor  $K_{ATP}$  prin intermediul receptorilor adenzinici este responsabilă de un alt mecanism protector al reperfuziei controlate [99]. PCI are ca efect majorarea nivelului de adenzină endogenă în primele momente ale reperfuziei. Deoarece se întârzie epurarea adenzinei, cresc, în mod evident, concentrațiile intravasculare ale acesteia. Se presupune că reținerea adenzinei intravasculare are proprietăți antineutrofilice, interacțiunea cu receptorii adenzinici reducând aderența endotelială și infiltrarea țesutului cu leucocite polimorfonucleare, astfel, diminuându-se și cantitatea de SRO. Se sugerează că adenzina poate influența activitatea kinazelor de supraviețuire, eliberarea de citokine, producerea oxidului nitric și activarea canalelor  $K_{ATP}$  [182]. A fost deja stabilit că aceste canale  $K_{ATP}$  sunt prezente în membranele celulare ale diferitor organe [173], existând studii care confirmă prezența lor și în membranele celulelor ovariene [136, 152, 153]. În momentul în care aceste canale se deschid, fluxul de  $Ca^{2+}$  descrește [99], concentrația crescută a acestui ion fiind responsabilă de o serie de procese fiziopatologice în afecțiuni caracterizate prin I/R, menționate mai sus, care pot agrava leziunile celulelor.

În literatura de specialitate se sugerează că rezultatele PcI depind de durata aplicării și de specia animalelor expuse tratamentului [178]. Astfel, PcI nu a fost în măsură să minimizeze sau să prevină lezarea țesutului intestinal la șobolanii supuși ischemiei și procesului de reperfuzie, atunci când s-au utilizat cinci cicluri, cu o durată de 30 de secunde fiecare [179]. PcI s-a arătat că este capabilă să reducă producerea de DAM, biomarker al lezării lipidelor, și să intensifice activitatea enzimelor antioxidante, precum SOD, CAT și GPO, comparativ cu reperfuzia tisulară obișnuită [183].

În ultimii ani, în literatura de specialitate, au apărut câteva publicații cu date referitor la cercetările experimentale în torsiunea ovariană cu aplicarea PcI, care au identificat un efect favorabil în cazul utilizării diferitor modele de reperfuzie controlată [85, 99, 184-186]. Aceste studii au evaluat un număr redus de parametri biochimici, fără a fi în totalitate clarificate mecanismele ce ar asigura efectul protector al PcI la nivel ovarian.

Astfel, putem conchide că un rol important în maladiile caracterizate prin I/R îl are stresul oxidativ. Restabilirea fluxului sangvin, chiar dacă este esențială pentru asigurarea supraviețuirii organului afectat, poate determina o agravare a leziunilor inițiale prin intensificarea producerii de specii reactive de oxigen.

Modificările metabolice cauzate de ischemie/reperfuzie în torsiunea/detorsiunea ovariană, la moment, sunt incomplet elucidate, iar o creștere a incidenței maladiei în ultimii ani [13, 14] impune aprofundarea cercetărilor fundamentale pentru optimizarea diagnosticului, dar și a tratamentului chirurgical, atunci când se dorește păstrarea ovarelor.

Așa cum ovarul este un organ în care au loc dinamice procese fiziologice însoțite de stres oxidativ, nu este clar stabilit care este intensitatea SO care poate induce o afectare ireversibilă.

Postcondiționarea ischemică este un mecanism propus de cercetători pentru prevenirea afectării prin I/R, inclusiv în tratamentul TO, însă fără o deslușire completă a mecanismelor ce ar sta la baza asigurării protecției la nivel ovarian.

În acest context, deosebit de importantă este studierea modificărilor metabolice cauzate de ischemie/reperfuzie în torsiunea/detorsiunea ovariană experimentală pentru evidențierea indicilor specifici de diagnostic ai leziunilor tisulare ovariene și argumentarea strategiilor de tratament care ar reduce consecințele nefaste ale reperfuziei.

## 2. MATERIALE ȘI METODE DE STUDIU ÎN TORSIUNEA OVARIANĂ EXPERIMENTALĂ

### 2.1. Modelul experimental

Cercetarea este una preclinică, experimentală, efectuată pe animale de laborator, respectând toate rigorile științifice și principiile etice de cercetare instituțională, naționale și internaționale. Protocolul experimental a fost aprobat prin avizul favorabil al Comitetului de Etică a Cercetării al USMF „Nicolae Testemițanu” din data de 08.02.2016.

#### 2.1.1. Animale de laborator și loturi de cercetare

Studiul a inclus 70 de șobolani albi de laborator (*Rattus albicans*) de la vivariul USMF „Nicolae Testemițanu”, femele, cu masa corporală 180-265 grame, de vârstă reproductivă (6-12 luni), care au fost divizate aleator în 7 loturi: 1 lot martor, 1 lot de control și 5 loturi cu torsiune ovariană, în corespundere cu protocolul cercetării, după cum este prezentat în figura 7. Numărul de șobolani necesar a fost stabilit în conformitate cu normele internaționale de utilizare a animalelor în studii experimentale [187]. Astfel, fiecare lot de cercetare, conform principiului celor 3 R [188, 189], a fost constituit din 10 șobolani pentru ca rezultatele studiului să fie științific veridice [187, 190].

Animalele au fost ținute în condiții standard de vivariu, cu acces liber la hrană și apă.

#### Descrierea loturilor de studiu (Lt)

**Lt<sub>1</sub>** – lot martor – șobolani supuși doar laparotomiei pentru prelevarea ovarelor și a sângelui din aorta abdominală.

**Lt<sub>2</sub>** – lot de control – animale expuse laparotomiei pentru menținerea cavității abdominale deschise pentru o perioadă de 15 min., cu închiderea ei ulterior și cu laparotomie repetată peste 3 ore pentru recoltarea ovarelor și colectarea sângelui din aorta abdominală, fără provocarea ischemiei în ovare. Lotul de control a fost inclus în cercetare cu scopul de a identifica dacă intervenția chirurgicală induce modificări serice sangvine sau tisulare ovariene ale indicilor metabolici ai ischemiei, stresului oxidativ și sistemului antioxidant incluși în lista de evaluare.

**Lt<sub>3</sub>** – lot doar cu torsiune ovariană (ischemie ovariană) – laparotomie, răsucirea anexelor în direcția acelor de ceasornic de 3 ori, închiderea cavității abdominale, iar peste 3 ore, laparotomie repetată pentru prelevarea materialului biologic pentru studiu.

**Lt<sub>4</sub>** – lot cu torsiune/1 oră detorsiune ovariană (ischemie/1 oră reperfuzie simplă) – laparotomie, răsucirea anexelor în direcția acelor de ceasornic de 3 ori, închiderea cavității abdominale, apoi, peste 3 ore, laparotomie repetată, detorsionarea anexelor, închiderea cavității



abdominale, după care, peste 1 oră, laparotomie și colectarea materialului biologic pentru cercetare.

**Lt5** – lot cu torsiune/1 oră detorsiune ovariană controlată (ischemie/1 oră reperfuzie controlată sau *on-off*) – laparotomie, răsucirea anexelor în direcția acelor de ceasornic de 3 ori, închiderea cavității abdominale, iar peste 3 ore, laparotomie repetată cu detorsionarea anexelor și reperfuzie controlată prin tehnica *on-off*, după care, peste 1 oră laparotomie pentru prelevarea ovarelor și a sângelui din aorta abdominală.

**Lt6** – lot cu torsiune/24 ore detorsiune ovariană (ischemie/24 ore reperfuzie simplă) – laparotomie, răsucirea anexelor în direcția acelor de ceasornic de 3 ori, închiderea cavității abdominale, apoi, peste 3 ore, laparotomie repetată, detorsionarea anexelor, închiderea cavității abdominale, ulterior, peste 24 ore, laparotomie cu recoltarea ovarelor și colectarea sângelui din aorta abdominală.

**Lt7** – lot cu torsiune/24 ore detorsiune ovariană controlată (ischemie/24 ore reperfuzie controlată sau *on-off*) – laparotomie, răsucirea anexelor în direcția acelor de ceasornic de 3 ori, închiderea cavității abdominale, apoi, peste 3 ore, laparotomie repetată cu detorsionarea anexelor și reperfuzie controlată prin metoda *on-off*, după care, peste 24 ore laparotomie pentru prelevarea materialului biologic pentru studiu.

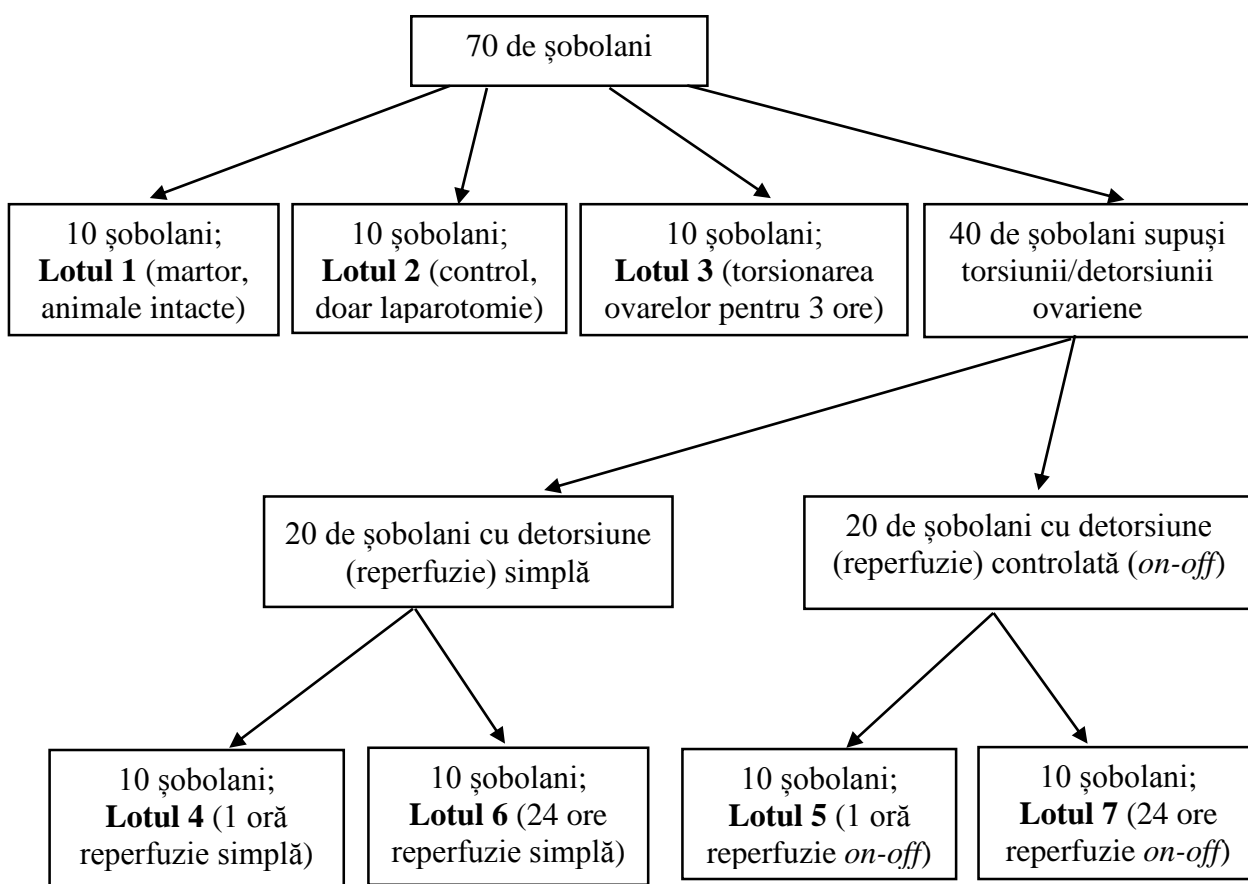


Figura 7. Repartizarea animalelor de laborator în loturi de cercetare

### 2.1.2. Procedura chirurgicală

Intervențiile chirurgicale au fost efectuate în condiții sterile și cu anestezie generală. Animalele au fost anesteziate prin administrare intraperitoneală a sol. ketamină hidroclohid 10% (Calypsol<sup>®</sup>, Gedeon Richter, Ungaria), 50 mg/kg. Pe parcursul procedurii chirurgicale animalele au respirat spontan. Timpul oportun pentru efectuarea intervenției chirurgicale a fost considerat momentul când șobolanii rămâneau nemișcați în poziție supină. Pielea abdominală a fost dezinfectată cu sol. Iod povidonă 100 mg/mL (Betadine<sup>®</sup>, Egis Pharmaceuticals PLC, Ungaria) și bărbierită. Animalele au fost poziționate în decubit dorsal. Procedura chirurgicală a durat aproximativ 15 minute. Tuturor șobolanilor le-a fost efectuată laparotomie 2-2,5 cm – incizie verticală în porțiunea inferioară a abdomenului, care să permită accesul la ovare. Șobolanilor din loturile martor (Lt<sub>1</sub>) și control (Lt<sub>2</sub>) nu le-a fost provocată ischemia ovarelor. Celor din lotul martor li s-a colectat sânge din aorta abdominală și li s-au prelevat ovarele. Celor din lotul de control li s-a lăsat cavitatea abdominală deschisă pentru o perioadă de 15 min., după care aceasta a fost închisă, urmată peste 3 ore de reanestezierea subiecților, laparotomie repetată pentru colectarea ovarelor și a sângelui din aorta abdominală.

În celelalte loturi de cercetare (Lt<sub>3</sub> – Lt<sub>7</sub>) animalelor li s-a modelat torsiunea ovariană pentru o perioadă de 3 ore. Ischemia ovariană a fost provocată prin răsucirea anexei de 3 ori în direcția acelor de ceasornic. Pentru menținerea acesteia și pentru a preîntâmpina detorsionarea, după răsucire, anexa a fost fixată de peretele abdominal prin aplicarea suturii cu fir de mătase 3/0. Manevra de torsionare a fost urmată de închiderea peretelui abdominal prin aplicarea de suturi cu fir de mătase 3/0. Ulterior, după 3 ore, animalele au fost reanesteziate și supuse următoarelor manevre, în dependență de lotul din care făceau parte, după cum urmează: lotul 3 – laparotomie cu recoltarea ovarelor și colectarea sângelui din aorta abdominală; lotul 4 – laparotomie cu înlăturarea torsiunii ovariene și închiderea peretelui abdominal prin aplicarea de suturi cu fir de mătase 3/0, iar peste 1 oră reanestezierea animalelor, efectuarea laparotomiei cu prelevarea ovarelor și colectarea sângelui din aorta abdominală; lotul 5 – laparotomie pentru înlăturarea torsiunii cu reluarea perfuziei prin metoda controlată, apoi, închiderea peretelui abdominal prin aplicarea de suturi cu fir de mătase 3/0, după care, peste 1 oră, animalele au fost reanesteziate, efectuată laparotomie, colectate ovarele și sânge din aorta abdominală; lotul 6 – laparotomie cu detorsionarea ovarelor și închiderea peretelui abdominal prin aplicarea de suturi cu fir de mătase 3/0, iar peste 24 ore reanestezierea șobolanilor, efectuarea laparotomiei pentru recoltarea ovarelor și colectarea sângelui din aorta abdominală; lotul 7 – laparotomie pentru înlăturarea torsiunii cu restabilirea circulației sangvine prin aplicarea metodei *on-off*, apoi, închiderea peretelui abdominal prin aplicarea de suturi cu fir de mătase 3/0, după care, peste 24 ore, animalele au fost reanesteziate, efectuată laparotomie cu prelevarea ovarelor și a sângelui din aorta abdominală.

Metoda de reperfuzie controlată (*on-off*) a presupus ca pe vasele anexe ovariene să se aplice o pensă atraumatică, după care ovarul a fost detorsionat. Ulterior, în primele 2 minute, până la restabilirea deplină a fluxului sangvin, s-a deschis și s-a închis (*on-off*) această pensă, cu un interval de 10 secunde pentru fiecare manevră, pentru a permite restabilirea graduală a circulației sangvine. După această etapă pensa a fost înlăturată, permițând reluarea completă a fluxului sangvin.

Administrarea de analgezice oral sau parenteral în perioada postoperatorie inițială nu a fost făcută pentru că acestea ar fi putut induce modificarea parametrilor biochimici cu obținerea de rezultate neveridice. S-a aplicat anestezic local, lidocaină gel, pe linia de sutură.

Toate animalele au fost eutanasiate sub anestezie, imediat după prelevarea materialului biologic pentru cercetare.

## **2.2. Pregătirea materialului biologic și investigații biochimice**

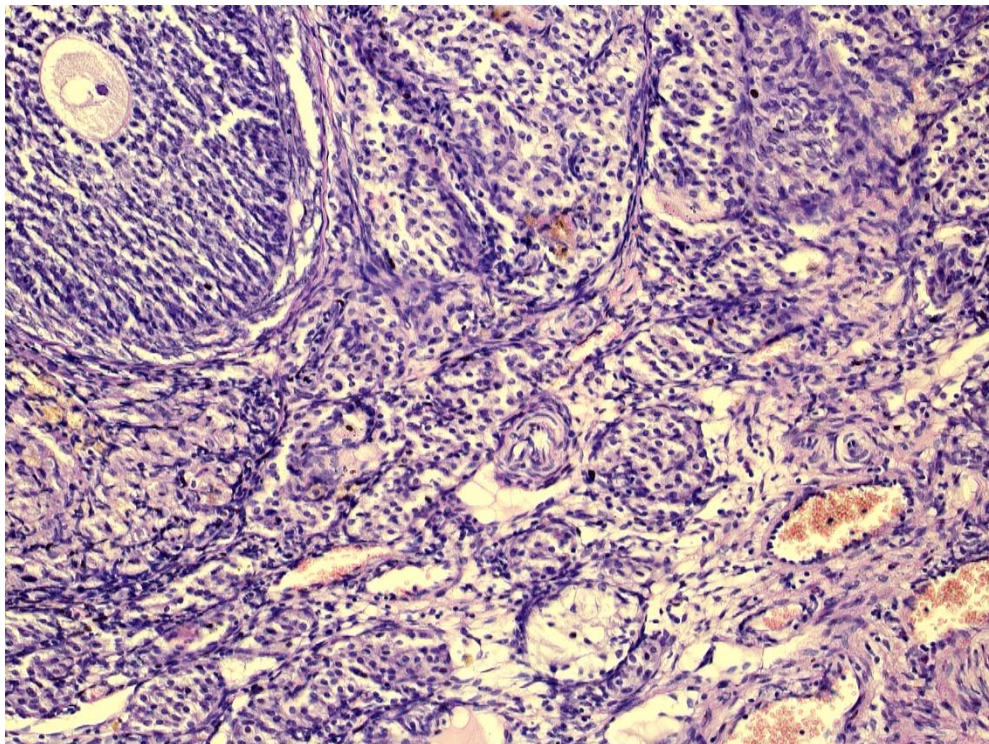
### **2.2.1. Pregătirea materialului biologic pentru studiu**

Pentru confirmarea modelului de torsiune ovariană ales, aleator din fiecare lot a fost selectat pentru evaluare histopatologică câte un ovar, care a fost plasat în sol. formalină 10% și expediat pentru investigare în cadrul Catedrei de morfopatologie a USMF “Nicolae Testemițanu”. Toate probele au fost codate, morfopatologul necunoscând protocolul experimental. S-a examinat prezența edemului interstițial, congestiei vasculare, hemoragiei și infiltrației leucocitare [191], așa cum ischemia ovariană se caracterizează printr-o creștere a dimensiunii organului, hemoragie și congestie venoasă, iar odată cu procedeele de detorsionare se constată și infiltrarea cu neutrofile [47]. Astfel, chiar de la debutul torsiunii, cercetătorii au observat reducerea fluxului venos, mărirea ovarului, edemul și hemoragia interstițială [192]. Rezultatele noastre au arătat modificări la nivelul ovarelor, care au confirmat modelarea corectă a torsiunii ovariene (figura 8 și figura 9).

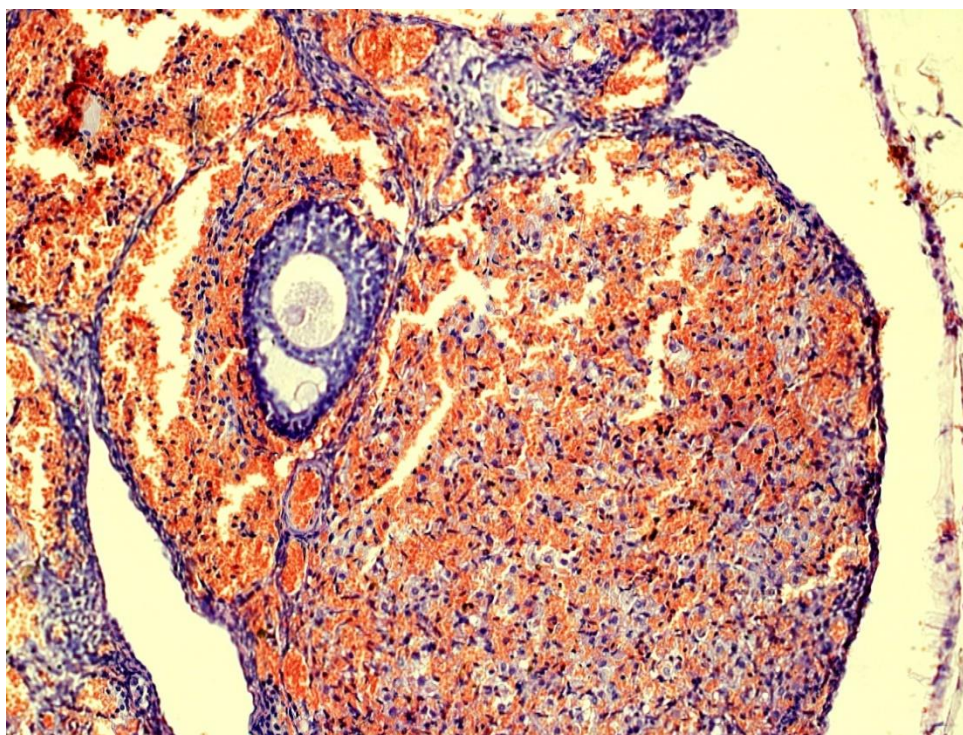
Sângele prelevat a fost plasat în eprubete pentru 30 minute, pentru a i se permite coagularea, ulterior centrifugat la 1500 rot/min timp de 10 minute, iar serul a fost păstrat în tuburi Eppendorf în congelator, la -40°C, până la examinarea biochimică. Țesutul ovarian a fost omogenizat în soluție tampon fosfat 0,1 M (pH=7,4), astfel încât diluția finală a omogenatului să fie 1:10, apoi centrifugat timp de 15 minute, la 4°C, 3000 rot/min. Supernatantul a fost plasat în tuburi Eppendorf și păstrat în congelator la temperatura de -40°C până la investigație. Pentru dozarea glutatationului, țesutul ovarian a fost omogenizat în sol. 5% acid sulfosalicilic în raport de 1:5. Omogenatele ovariene au fost pregătite în condiții specifice (folosindu-se gheață) care să permită aprecierea ulterioară a activității enzimaticice.

Toate investigațiile biochimice au fost efectuate după metode adaptate pentru spectrofluorimetrul cu microplăci Synergy H1 (Hybrid Reader) (BioTek Instruments, SUA) și

spectrofotometrul Power Wave HT (BioTek Instruments, SUA) ale Laboratorului de biochimie al USMF “Nicolae Testemițanu”.



**Figura 8. Congestie vasculară și edem în ovar (hematoxină-eozină)**



**Figura 9. Congestie vasculară și hemoragie în ovar (hematoxină-eozină)**

### 2.2.2. Dozarea indicilor ischemiei

Dozarea *lactatului* a fost efectuată cu setul standard ELITechGroup (Franța), după metoda enzimatică-colorimetrică. Principiul determinării lactatului se bazează pe reacțiile de oxidare ale acestuia cu implicarea enzimelor lactat oxidaza și peroxidaza cu obținerea unui compus (chinonimina) ce poate fi identificat utilizându-se lungimea de undă de 550 nm. Calculul cantității de lactat a fost exprimat în mmol/L pentru ser și mmol/g.prot. pentru omogenat.

Determinarea activității *lactat dehidrogenazei* (EC 1.1.1.27) s-a realizat cu seturile standard ELITechGroup (Franța) pentru LDH-L și DAC-SpectroMed (R. Moldova) pentru LDH-P. LDH-L are capacitatea de a utiliza L-lactatul pentru a-l transforma în piruvat, conform reacției:  $L\text{-lactat} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{Piruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+$ . Reacția are loc în prezența  $\text{NAD}^+$  care se reduce la  $\text{NADH} + \text{H}^+$ , concomitent cu creșterea absorbției, care se estimează spectrofotometric (340 nm), ceea ce corelează cu activitatea enzimei. LDH-P se estimează după principiul diminuării absorbției  $\text{NADH}$ , detectată la 340 nm, conform reacției:  $\text{Piruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Lactat} + \text{NAD}^+$ , ceea ce este proporțional activității enzimei. Activitatea LDH-L și LDH-P a fost exprimată în U/L pentru ser și U/g.prot. pentru omogenat.

Cantitatea *albuminei ischemic modificate* a fost identificată conform metodei descrise de Gudumac V. și Tagadiuc O. [121]. Determinarea are la bază proprietatea albuminei de a lega ionii de cobalt ( $\text{Co}^{2+}$ ), care scade în condiții de ischemie și care poate fi evaluată prin măsurarea absorbției spectrofotometric la 492 nm. Calculele nivelului de AIM au fost făcute după curba de calibrare a soluției standard de  $\text{CoCl}_2$ , construită în baza diluțiilor succesive și exprimate în  $\mu\text{mol/L}$  pentru ser, și  $\mu\text{mol/g.prot.}$  pentru omogenat.

### 2.2.3. Determinarea indicilor stresului oxidativ

Dozarea *dialdehidei malonice* s-a efectuat conform procedurii descris de Галактионова Л.П. și coaut. [193], modificat de Gudumac V. și coaut. [194]. Principiul metodei are la bază identificarea spectrofotometrică a complexului trimetinic rezultat în urma interacțiunii acidului tiobarbituric cu dialdehida malonică [194]. Cantitatea de DAM a fost exprimată în  $\mu\text{mol/L}$  pentru ser și  $\mu\text{mol/g.prot.}$  pentru omogenat.

Identificarea *derivaților oxidului nitric* a fost realizată conform procedurii descris de Метельская В.А. și Гуманова Н.Г. [195], și modificat de Gudumac V. și coaut. [196]. Principiul metodei se bazează pe deproteinizarea materialului biologic colectat, reducerea nitraților în nitriți, prelucrarea cu reactivul Griss a supernatantului și măsurarea densității optice a produsului. Calculul cantității DNO s-a bazat pe curba de calibrare, construită în baza diluțiilor succesive ale soluției standard de nitrit de sodiu [196] și a fost exprimată în  $\mu\text{mol/L}$  pentru ser și  $\mu\text{mol/g.prot.}$  pentru omogenat.

Dozarea *produșilor proteici de oxidare avansată* s-a efectuat conform procedurii lui Capeillere-Blandin C., și coaut. [197], modificat de Gudumac V. și coaut. [198]. PPOA pot fi identificate spectrofotometric datorită absorbției specifice la 340 nm. Calculele cantității de PPOA s-au făcut după curba de calibrare a sol. standard de cloramină-T (0-100  $\mu\text{mol/L}$ ), construită în baza diluțiilor succesive și au fost exprimate în  $\mu\text{mol/L}$  pentru ser și  $\mu\text{mol/g.prot.}$  pentru omogenat, echivalente de cloramină-T.

*Produsele finale de glicare avansată (AGE)* pentozidine-like s-au apreciat în conformitate cu procedeul descris de Séro L. și coaut. [199], care se bazează pe măsurarea intensității fluorescenței la 330/emisia 390 nm. Rezultatul calculelor a fost exprimat în  $\mu\text{g/L}$  pentru ser și  $\mu\text{g/g.prot.}$  pentru omogenat.

#### **2.2.4. Aprecierea markerilor sistemului antioxidant**

Activitatea *superoxid dismutazei (EC 1.15.1.1)* a fost determinată conform procedurilor descrise de Матюшин Б.Н. și coaut. [200] și Дубинина Е.Е. și coaut. [201], modificate de Tagadiuc O. și coaut. [202]. Activitatea SOD s-a evaluat indirect, în baza aprecierii gradului de inhibare a transformării sării de tetrazoliu nitroblue (NBT) în nitroformazan, cantitatea căruia a fost dozată spectrofotometric (540 nm). Inhibiția acestui proces depinde de activitatea SOD [202]. Activitatea SOD a fost exprimată în unități convenționale (u.c.) pentru ser, iar pentru omogenat rezultatul obținut a fost raportat la 1 gram de proteină (u.c./g.prot.).

Activitatea *catalazei (EC 1.11.1.6)* a fost determinată conform procedurii menționat de Корольюк М.А. și coaut. [203], modificat de Baciu E. și Nastas I. [204]. CAT are capacitatea de a scinda peroxidul de hidrogen cu formarea apei și  $\text{O}_2$ .  $\text{H}_2\text{O}_2$  interacționează cu molibdatul de amoniu și formează un compus de culoare galbenă. Micșorarea cantității de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ca rezultat al descompunerii acestuia de către enzimă, determină și un anumit grad de decolorare a soluției, care se determină spectrofotometric la 410 nm [204]. Activitatea CAT a fost exprimată în micromoli pe secundă la 1 litru de ser ( $\mu\text{mol/s/L}$ ), iar pentru omogenat rezultatul obținut a fost raportat la 1 gram de proteină ( $\mu\text{mol/s/g.prot.}$ ).

Activitatea *glutation peroxidazei (EC 1.11.1.9)* s-a determinat pe baza testului optic Warburg, conform procedurii descris de Wendel A. [205], modificat de Tagadiuc O. și coaut. [206], măsurându-se absorbția la 340 nm la intervale de timp prestabilite. Activitatea GPO se măsoară în ser în micromoli de glutatone redus pe secundă la un litru de ser sangvin ( $\mu\text{mol/s/L}$ ), iar în omogenat în nanomoli de glutatone redus pe secundă la un gram de proteină ( $\text{nmol/s/g.prot.}$ ).

Activitatea *glutation-S-transferazei (EC 2.5.1.18)* a fost dozată conform procedurii descris de Habig W.H. și coaut. [207], modificat de Tagadiuc O. și coaut. [208], având la bază capacitatea GST de a cataliza reacția de condensare a GSH cu 1-clor-2,4-dinitrobenzenul, cu formarea unui

compus ce se determină spectrototometric la 346 nm și a cărei cantitate este proporțională cu activitatea GST, care a fost exprimată în nanomoli pe secundă la un litru de ser sangvin (nmol/s/L) pentru ser, și nanomoli pe secundă la un gram de proteină (nmol/s/g.prot.) pentru omogenat.

Dozarea activității *glutation reductazei* (EC 1.6.4.2) s-a efectuat conform metodei descrise de Власова С.Н. și coaut. [209], modificată de Gudumac V. și coaut. [210], având la bază testul optic Warburg. Principiul metodei constă în măsurarea consumului de NADPH, utilizat de GR pentru a reduce GSSG, observat prin micșorarea absorbanței la 340 nm. Activitatea enzimei a fost exprimată în micromoli de GSSG ce a fost transformat în GSH într-o secundă la un litru de ser sangvin (μmol/s/L), iar în omogenat în nanomoli de GSSG ce a fost transformat în GSH într-o secundă la un gram de proteină (nmol/s/g.prot.).

Determinarea *glutationului total* s-a făcut conform procedurii descris de Akerboom T.P. și coaut. [211], modificat de Andronache L. și coaut. [212]. Metoda are la bază formarea compusului colorat dintre GSH și acidul ditiobisnitrobenzoic (DTNB) în mediul de reacție ce conține NADPH, identificat la 405 nm în dependență de timp. Calculele se fac conform curbei de calibrare construită în baza soluției standard stock de 10 mM GSH [212]. Rezultatele se exprimă în nanomoli la litru (nmol/L) pentru ser și picomoli la un gram de proteină (pmol/g.prot.) pentru omogenat.

Nivelul *glutationului redus* s-a identificat conform procedurii propus de Mortensen E. [213], modificat de Andronache L. și coaut. [214]. Principiul metodei este bazat pe interacțiunea în mediu alcalin a GSH cu ionii de cian și nitroprusiatul, ceea ce duce la formarea unui compus complex de culoare roșie-violetă, intensitatea colorației fiind direct proporțională concentrației de glutatone redus în materialul biologic studiat. Calculul se efectuează după curba de calibrare construită în bază diluțiilor soluției standard stock de glutatone redus [214]. Rezultatele se exprimă în nanomoli la litru (nmol/L) pentru ser și picomoli la un gram de proteină (pmol/g.prot.) pentru omogenat.

Cantitatea de *glutation oxidat* (GSSG) s-a determinat după formula:

$$\text{GSSG} = \text{glutationul total} - \text{glutationul redus.}$$

*Ceruloplasmīna* s-a determinat conform procedurii descris de Colb V.G. și Camishnicov V.S. [215], modificat de Gudumac V. și coaut. [196], care are la bază reacția de oxidare a p-fenilendiaminei la un compus colorat în albastru-violet, cantitatea căruia corelează cu cantitatea ceruloplasmīnei și a cărei densitate optică a fost măsurată la 530 nm. Calculele se efectuează în baza curbei de calibrare [196] și se exprimă în miligrame la un litru de ser (mg/L).

### **2.2.5. Evaluarea altor indici ai metabolismului**

Determinarea activității *glucozo-6-fosfat dehidrogenazei* (EC 1.1.1.49) s-a efectuat conform procedurii descris de Кочетов Г.А. [216] cu unele modificări introduse de Gudumac V. și coaut.

[196]. Procedul se bazează pe capacitatea G6PDH de a transforma glucozo-6-fosfatul în 6-fosfogluconolactonă, în prezența  $\text{NADP}^+$ , care se reduce la  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ . Creșterea absorbției la 340 nm a fost determinată spectrofotometric și corelează cu activitatea enzimei [196], care a fost exprimată în nmol de  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  format timp de 1 secundă la 1 litru de ser (nmol/s/L) pentru ser și la 1 gram de proteină (nmol/s/g.prot.) pentru omogenat.

Evaluarea activității *izocitrat dehidrogenazei*  $\text{NADP}^+$ -dependente (EC 1.1.1.42) s-a realizat conform recomandărilor lui Gudumac V. și coaut. [196]. Principiul metodei are la bază creșterea densității optice a soluției în urma intensificării producerii de  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ , ca rezultat al decarboxilării oxidative a izocitratului, conform reacției:  $\text{izocitrat} + \text{NADP}^+ \rightarrow \alpha\text{-cetoglutarat} + \text{CO}_2 + \text{NADPH} + \text{H}^+$ . Creșterea densității optice s-a estimat spectrofotometric la 340 nm și este proporțională cu activitatea enzimei [196], care a fost exprimată în nmol de  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  format timp de 1 secundă la 1 litru de ser (nmol/s/L) pentru ser și la 1 gram de proteină (nmol/s/g.prot.) pentru omogenat.

Conținutul de *proteină totală* a fost identificată conform instrucțiunilor tehnice ale setului standard al companiei ELITechGroup (Franța), conform metodei biuretice, utilizând lungimea de undă de 546 nm. Cantitatea proteinei totale a fost exprimată în grame de proteină la 1 litru de ser sangvin (g/L) și miligrame de proteină la 1 gram de țesut (mg/g).

### **2.3. Tehnologii informaționale și procedee de analiză statistică a rezultatelor**

Studierea situației la moment la subiectul tezei de doctorat în literatura științifică internațională a fost făcută accesându-se următoarele baze: Google scholar, inclusiv baze de date cu profil medical: HINARI, ARDI, OARE, Global Library of Women's Medicine, utilizându-se cuvintele cheie: ovarian torsion, adnexal torsion, torsion, ovary, ischemia/reperfusion injury, ischemia, reperfusion, oxidative stress, reactive oxygen species, nitric oxide, ischemic postconditioning, controlled reperfusion, lactate, lactate dehydrogenase, ischemia modified albumin, advanced oxidation protein products, advanced glycation end products, glutathione, glucose-6-phosphate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase, ceruloplasmin.

Teza a fost redactată folosindu-se programul Microsoft Word 2013.

Graficele incluse în teză au fost realizate cu ajutorul programului Microsoft Excel 2013.

Prelucrarea statistică a rezultatelor investigațiilor biochimice s-a efectuat utilizând pachetul software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), versiunea 23.0. Pentru crearea tabelor cu rezultatele cercetării, cu scopul procesării statistice ulterioare, s-a utilizat programul Microsoft Excel 2013.

Analiza a presupus, în prima etapă, alegerea testelor potrivite pentru identificarea diferențelor statistic semnificative între loturile de studiu [190]. Astfel, datele inițial au fost testate



cu scopul de a aprecia dacă acestea au distribuție gaussiană sau nu. Teste de normalitate aplicate au fost Kolmogorov-Smirnov și Shapiro-Wilk, iar datele evaluate pentru care  $p > 0,05$  au fost apreciate ca având distribuție normală, iar cele la care  $p < 0,05$  au fost considerate că nu sunt distribuite gaussian. Cu țelul de a facilita interpretarea distribuției, pentru fiecare grup de variabile au fost construite histogramele corespunzătoare, iar ulterior au fost create boxplot-uri, identificând prezența sau absența valorilor extreme.

Așa cum unele teste statistice de evaluare a diferențelor dintre mai multe loturi de cercetare presupun ca abaterea standard calculată în diferite loturi, pentru anumite variabile, să nu fie foarte diferită, s-a aplicat testul lui Levene, iar rezultatele acestuia au fost interpretate astfel: un  $p > 0,05$  a confirmat faptul că loturile nu au abateri standard diferite, iar un  $p < 0,05$  a indicat faptul că acestea diferă.

În urma analizei rezultatelor obținute la testele de mai sus, s-a decis ca diferențele între loturi, pentru diferite variabile cercetate, să fie studiate utilizând One-Way Anova (atunci când  $p > 0,05$  după aplicarea testelor de verificare a normalității și abaterii standard) și Welch's Anova (în situația când  $p < 0,05$  după utilizarea testului lui Levene).

Cu scopul etalării diferențelor între loturi, s-au aplicat testele *post-hoc* pentru comparații multiple: Tukey după One-Way Anova și Games-Howell după Welch's Anova. Pragul de semnificație stabilit a fost  $p < 0,05$ .

S-a decis prezentarea datelor ca medie aritmetică  $\pm$  eroarea mediei ( $M \pm m$ ).

Pentru a se stabili dacă este vreo legătură de dependență între fenomenele cercetate din serul sangvin și omogenatul ovarian, s-a utilizat coeficientul de corelație al rangurilor (Spearman). Valoarea lui  $p < 0,05$  a fost considerată statistic semnificativă.

### 3. MODIFICĂRI BIOCHIMICE ÎN ISCHEMIA/REPERFUZIA OVARIANĂ

#### 3.1. Impactul intervenției chirurgicale asupra markerilor biochimici studiați în ischemia/reperfuzia produsă de torsiunea/detorsiunea ovarelor

Evaluarea impactului intervenției chirurgicale asupra parametrilor biochimici nu a relevat diferențe statistic semnificative între valorile măsurate în serul sangvin și în omogenatul ovarian între loturile martor (animale intacte) și control (animale supuse doar intervenției chirurgicale). Excepție au constituit nivelurile de AIM și CP din serul sangvin. S-a identificat majorarea AIM cu aproximativ 4% ( $p=0,003$ ) și CP cu aproape 9% ( $p=0,028$ ) (tabelul 1).

Tabelul 1. Rezultatele evaluării indicilor biochimici în loturile martor și control

Variabila		Lotul		p
		martor	control	
<b>Lactat</b>	ser, mmol/L	3,014±0,095	3,071±0,122	>0,05
	omogenat, mmol/g.prot.	2,893±0,089	2,918±0,076	>0,05
<b>LDH-P</b>	ser, U/L	136,383±2,430	134,862±5,142	>0,05
	omogenat, U/g.prot.	25,677±0,885	25,054±1,714	>0,05
<b>LDH-L</b>	ser, U/L	283,417±18,005	285,325±9,660	>0,05
	omogenat, U/g.prot.	54,181±0,853	53,367±1,249	>0,05
<b>AIM</b>	ser, μmol/L	402,370±2,732	418,472±1,854	<b>0,003</b>
	omogenat, μmol/g.prot.	14,233±0,458	14,251±0,733	>0,05
<b>DNO</b>	ser, μmol/L	77,991±1,307	76,934±1,177	>0,05
	omogenat, μmol/g.prot.	15,941±0,306	16,164±0,480	>0,05
<b>PPOA</b>	ser, μmol/L	26,415±1,028	26,474±120	>0,05
	omogenat, μmol/g.prot.	5,695±0,246	5,804±0,373	>0,05
<b>AGE</b>	ser, μg/L	224,913±6,490	225,262±4,143	>0,05
	omogenat, μg/g.prot.	37,930±0,882	38,580±0,596	>0,05
<b>DAM</b>	ser, μmol/L	11,763±0,161	12,180±0,093	>0,05
	omogenat, μmol/g.prot.	2,317±0,072	2,375±0,036	>0,05
<b>SOD</b>	ser, u.c.	1294,017±26,853	1251,282±19,035	>0,05
	omogenat, u.c./g.prot.	317,339±13,243	315,585±1,627	>0,05
<b>CAT</b>	ser, μmol/s/L	11,351±0,599	11,531±0,106	>0,05
	omogenat, μmol/s/g.prot.	32,423±2,151	31,899±0,728	>0,05
<b>GPO</b>	ser, μmol/s/L	1,624±0,106	1,768±0,128	>0,05
	omogenat, nmol/s/g.prot.	344,498±7,316	344,364±14,163	>0,05

<b>GR</b>	ser, $\mu\text{mol/s/L}$	2,303 $\pm$ 0,150	2,359 $\pm$ 0,036	>0,05
	omogenat, nmol/s/g.prot.	220,639 $\pm$ 6,822	216,383 $\pm$ 8,833	>0,05
<b>GST</b>	ser, nmol/s/L	84,147 $\pm$ 1,019	82,010 $\pm$ 1,378	>0,05
	omogenat, nmol/s/g.prot.	76,018 $\pm$ 1,222	76,412 $\pm$ 2,94	>0,05
<b>GT</b>	ser, nmol/L	200,916 $\pm$ 4,549	209,124 $\pm$ 10,151	>0,05
	omogenat, pmol/g.prot.	51,913 $\pm$ 1,034	51,214 $\pm$ 3,021	>0,05
<b>GSH</b>	ser, nmol/L	146,484 $\pm$ 5,311	145,357 $\pm$ 12,048	>0,05
	omogenat, pmol/g.prot.	32,171 $\pm$ 0,397	32,198 $\pm$ 0,873	>0,05
<b>GSSG</b>	ser, nmol/L	54,432 $\pm$ 7,649	63,767 $\pm$ 5,515	>0,05
	omogenat, pmol/g.prot.	19,742 $\pm$ 1,210	19,015 $\pm$ 2,753	>0,05
<b>G6PDH</b>	ser, nmol/s/L	24,852 $\pm$ 2,426	23,445 $\pm$ 2,421	>0,05
	omogenat, nmol/s/g.prot.	7,316 $\pm$ 0,765	6,746 $\pm$ 0,335	>0,05
<b>ICDH</b>	ser, nmol/s/L	77,371 $\pm$ 4,955	76,433 $\pm$ 2,525	>0,05
	omogenat, nmol/s/g.prot.	8,572 $\pm$ 0,141	8,48 $\pm$ 0,393	>0,05
<b>CP</b>	ser, mg/L	396,718 $\pm$ 2,109	432,762 $\pm$ 8,760	<b>0,028</b>

Notă: LDH-P – lactat dehidrogenaza-piruvat; LDH-L – lactat dehidrogenaza-lactat; AIM – albumina ischemic modificată; DNO – derivații oxidului nitric; PPOA – produși proteici de oxidare avansată; AGE – produși finali de glicare avansată; DAM – dialdehida malonică; SOD – superoxid dismutaza; CAT – catalaza; GPO – glutation peroxidaza; GR – glutation reductaza; GST – glutation-S-transferaza; GT – glutation total; GSH – glutation redus; GSSG – glutation oxidat; G6PDH – glucozo-6-fosfat dehidrogenaza; ICDH – izocitrat dehidrogenaza citoplasmatică NADP<sup>+</sup>-dependentă; CP – ceruloplasmina; p – pragul de semnificație.

Rezultatele înregistrate atestă că intervenția chirurgicală, efectuată conform protocolului aprobat (capitolul 2, pag. 34), are o influență minimă asupra indicilor de laborator evaluați în cercetarea noastră. Astfel, rezultatele studiului modificărilor markerilor biochimici pot fi analizate fără a lua în considerare impactul intervenției chirurgicale, cu excepția analizei schimbărilor valorilor AIM și CP în serul sangvin.

### 3.2. Influența torsiunii/detorsiunii ovariene asupra indicilor ischemiei

Torsiunea ovariană experimentală a indus modificarea anaerobă a metabolismului cu o creștere a cantității de **lactat**.

În omogenatul ovarian rezultatele notate nu au prezentat diferențe statistic semnificative ale cantității de lactat în lotul de control comparativ cu lotul martor,  $p > 0,05$ . Valorile acestuia înregistrate în serul sangvin în lotul martor și lotul de control nu au fost semnificativ statistic diferite,  $p > 0,05$  (tabelul 1).

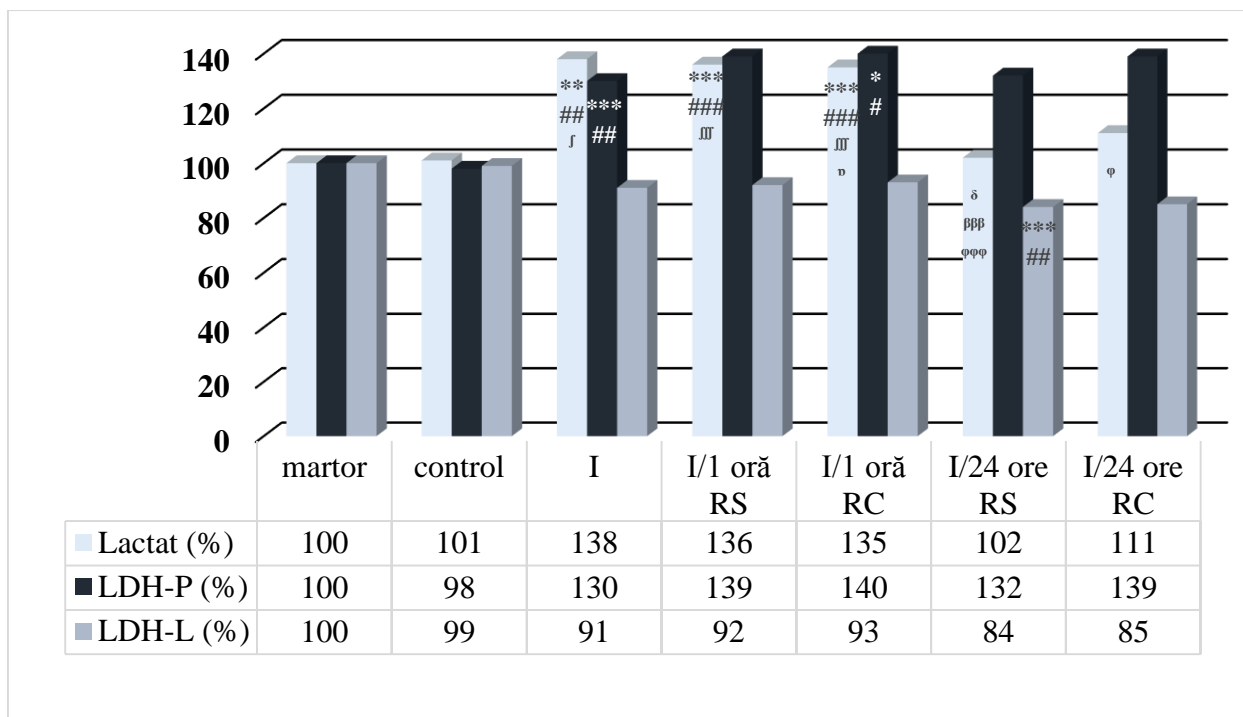


Figura 10. Modificările nivelului lactatului și activității LDH-P și LDH-L în omogenatul ovarian în torsiunea/detorsiunea ovariană experimentală

Notă: I – ischemie; RS – reperfuzie simplă; RC – reperfuzie controlată (*on-off*); LDH-P – lactat dehidrogenaza-piruvat; LDH-L – lactat dehidrogenaza-lactat.

Diferență statistic semnificativă comparativ cu:

- lotul martor: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ ;
- lotul control: # –  $p < 0,05$ ; ## –  $p < 0,01$ ; ### –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie:  $\delta$  –  $p < 0,05$ ;  $\delta\delta$  –  $p < 0,01$ ;  $\delta\delta\delta$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/1 oră reperfuzie simplă:  $\beta$  –  $p < 0,05$ ;  $\beta\beta$  –  $p < 0,01$ ;  $\beta\beta\beta$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/1 oră reperfuzie controlată:  $\varphi$  –  $p < 0,05$ ;  $\varphi\varphi$  –  $p < 0,01$ ;  $\varphi\varphi\varphi$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/24 ore reperfuzie simplă:  $\jmath$  –  $p < 0,05$ ;  $\jmath\jmath$  –  $p < 0,01$ ;  $\jmath\jmath\jmath$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/24 ore reperfuzie controlată:  $\nu$  –  $p < 0,05$ ;  $\nu\nu$  –  $p < 0,01$ ;  $\nu\nu\nu$  –  $p < 0,001$ .

Odată cu torsionarea ovarelor cantitatea de lactat s-a majorat atât în omogenat (figura 10), cu aproximativ 38% (de la  $2,893 \pm 0,089$  mmol/g.prot. până la  $4,002 \pm 0,214$  mmol/g.prot.,  $p = 0,006$ ), cât și în ser (figura 11), cu aproape 66% (de la  $3,014 \pm 0,095$  mmol/L până la  $5,029 \pm 0,139$  mmol/L,  $p < 0,001$ ) comparativ cu nivelul consemnat în lotul martor. Totuși, o corelație a creșterii cantității de lactat în ser și țesut în lotul cu ischemie nu a fost identificată ( $r_s = 0,333$ ,  $p = 0,347$ ) (tabelul A1.1).

Înlăturarea ischemiei și restabilirea fluxului sangvin, cu un aport semnificativ de oxigen și substanțe nutritive, nu a mai determinat creșterea lactatului în țesutul ovarian, acesta modificându-se neesențial la reperfuzia simplă de 1 oră ( $3,933 \pm 0,124$  mmol/g.prot.) și reperfuzia controlată de 1 oră ( $3,907 \pm 0,046$  mmol/g.prot.) față de cantitatea înregistrată după perioada de ischemie ( $4,002 \pm 0,214$  mmol/g.prot.),  $p > 0,05$ . Totuși, după 24 ore de reperfuzie simplă s-a constatat o descreștere a valorilor acestui indice (până la  $2,957 \pm 0,041$  mmol/g.prot.,  $p < 0,001$ ) comparativ cu loturile care au fost expuse reperfuziei de 1 oră. După 24 ore de reperfuzie controlată cantitatea de

lactat din omogenat s-a diminuat statistic semnificativ (până la  $3,222 \pm 0,181$  mmol/g.prot.,  $p=0,047$ ) comparativ cu lotul care a fost expus doar reperfuziei *on-off* de 1 oră (figura 10).

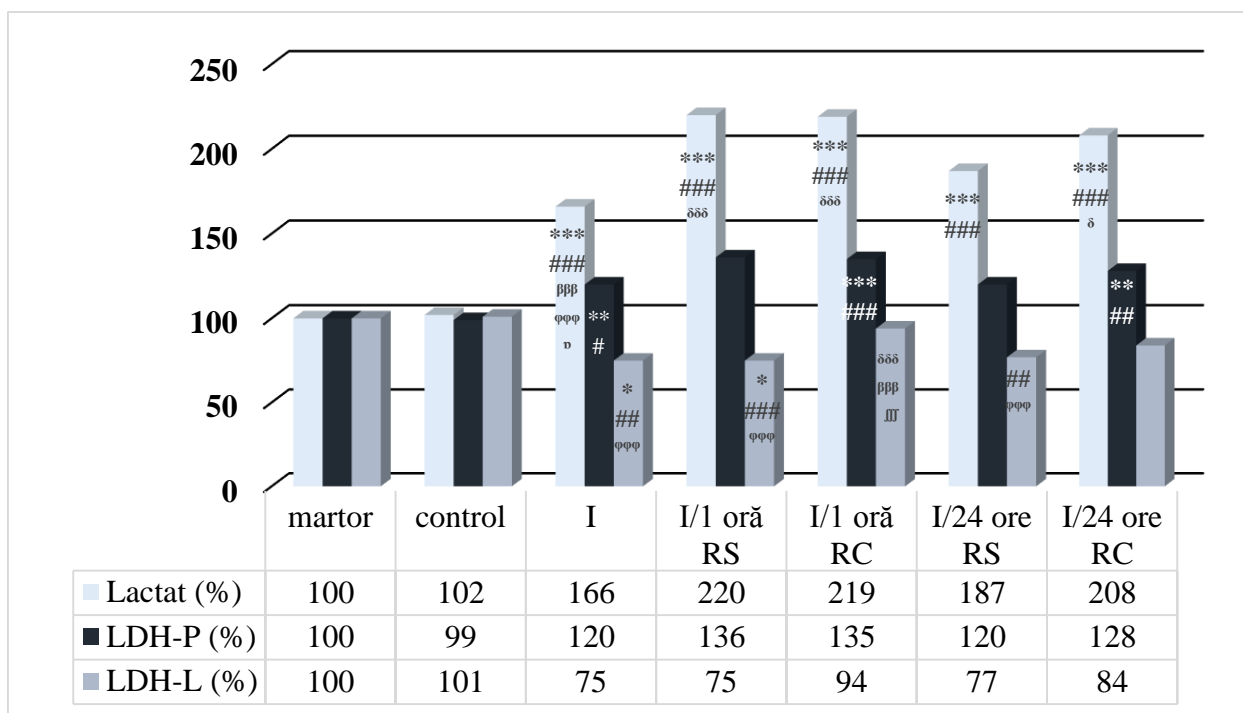


Figura 11. Modificările nivelului lactatului și activității LDH-P și LDH-L în serul sângvin în torsiunea/detorsiunea ovariană experimentală

Notă: I – ischemie; RS – reperfuzie simplă; RC – reperfuzie controlată (*on-off*); LDH-P – lactat dehidrogenaza-piruvat; LDH-L – lactat dehidrogenaza-lactat.

Diferență statistic semnificativă comparativ cu:

- lotul martor: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ ;
- lotul control: # –  $p < 0,05$ ; ## –  $p < 0,01$ ; ### –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie:  $\delta$  –  $p < 0,05$ ;  $\delta\delta$  –  $p < 0,01$ ;  $\delta\delta\delta$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/1 oră reperfuzie simplă:  $\beta$  –  $p < 0,05$ ;  $\beta\beta$  –  $p < 0,01$ ;  $\beta\beta\beta$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/1 oră reperfuzie controlată:  $\varphi$  –  $p < 0,05$ ;  $\varphi\varphi$  –  $p < 0,01$ ;  $\varphi\varphi\varphi$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/24 ore reperfuzie simplă:  $\jmath$  –  $p < 0,05$ ;  $\jmath\jmath$  –  $p < 0,01$ ;  $\jmath\jmath\jmath$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/24 ore reperfuzie controlată:  $\upsilon$  –  $p < 0,05$ ;  $\upsilon\upsilon$  –  $p < 0,01$ ;  $\upsilon\upsilon\upsilon$  –  $p < 0,001$ .

Nivelul lactatului în ser după 1 oră de reperfuzie atât simplă, cât și controlată a crescut cu aproximativ 120% comparativ cu lotul martor (de la  $3,014 \pm 0,095$  mmol/L până la  $6,632 \pm 0,089$  mmol/L, respectiv  $6,590 \pm 0,106$  mmol/L,  $p < 0,001$ ), iar comparativ cu lotul de șobolani supuși doar torsiunii ovariene creșterea a fost de circa 31% (de la  $5,029 \pm 0,139$  mmol/L până la  $6,632 \pm 0,089$  mmol/L în lotul cu 1 oră reperfuzie simplă, respectiv până la  $6,590 \pm 0,106$  mmol/L în lotul cu 1 oră reperfuzie controlată,  $p < 0,001$ ). La distanță, după 24 ore de la restaurarea circulației sanguine s-a observat o tendință de micșorare a cantităților înregistrate inițial, după 1 oră de reperfuzie, acest fapt fiind mai evident la reperfuzia simplă (până la  $5,633 \pm 0,364$  mmol/L,  $p > 0,05$ ) decât la reperfuzia *on-off* (până la  $6,254 \pm 0,301$  mmol/L,  $p > 0,05$ ), această descreștere a valorilor lactatului

în loturile cu reperfuzie de 24 ore nefiind statistic semnificativă comparativ cu loturile cu reperfuzie de 1 oră (figura 11).

Doar în lotul de control s-a determinat o corelație moderat pozitivă ( $r_s=0,673$ ,  $p=0,033$ ) între nivelul lactatului din serul sangvin și omogenatul ovarian, pe când în celelalte loturi experimentale lipsește semnificația statistică (tabelul A1.1).

Lactatul este sintetizat de enzima lactat dehidrogenaza P (**LDH-P**). Studiul nostru nu a identificat diferențe între valorile activității LDH-P-ului din omogenatul ovarian între loturile martor și control,  $p>0,05$  (tabelul 1). Torsiunea ovariană a intensificat activitatea enzimei în țesut, înregistrându-se o majorare a LDH-P cu aproximativ 30% (de la  $25,677\pm 0,885$  U/g.prot. până la  $33,443\pm 0,636$  U/g.prot.,  $p<0,001$ ) comparativ cu lotul martor. Reperfuzia atât simplă, cât și controlată de 1 oră și 24 ore a modificat statistic nesemnificativ LDH-P-ul în omogenat comparativ cu lotul de animale expus doar ischemiei ovariene,  $p>0,05$ . Totuși, comparativ cu lotul martor valorile s-au menținut înalte în toate loturile cu reperfuzie, diferențele fiind statistic semnificative doar în lotul cu reperfuzie controlată de 1 oră, în care activitatea LDH-P a fost mai mare cu aproape 40% (de la  $25,677\pm 0,885$  U/g.prot. până la  $35,891\pm 2,338$  U/g.prot.,  $p=0,02$ ) (figura 10).

Activitatea LDH-P din serul sangvin din loturile martor și control nu a fost statistic semnificativ diferită,  $p>0,05$  (tabelul 1). Ischemia ovariană a indus o majorare a activității enzimei în ser cu aproximativ 20% (de la  $136,383\pm 2,430$  U/L până la  $163,254\pm 4,584$  U/L,  $p=0,002$ ). Reperfuzia postischemie de 1 oră a sporit LDH-P-ul în ser, în cea simplă cu aproape 36% (de la  $136,383\pm 2,430$  U/L până la  $185,562\pm 14,058$  U/L,  $p>0,05$ ), iar în cea controlată cu 35% (de la  $136,383\pm 2,430$  U/L până la  $184,379\pm 5,441$  U/L,  $p<0,001$ ) comparativ cu lotul martor. Astfel, s-a constatat că doar în cazul aplicării tehnicii *on-off* majorarea activității enzimei a fost veridică ( $p<0,001$ ) (figura 11).

Comparativ cu lotul expus doar ischemiei ovariene creșterea activității LDH-P serice a fost de aproximativ 13% în ambele loturi cu 1 oră reperfuzie (de la  $163,254\pm 4,584$  U/L până la  $185,562\pm 14,058$  U/L în cea simplă,  $p>0,05$ , respectiv până la  $184,379\pm 5,441$  U/L în cea *on-off*,  $p>0,05$ ). La 24 ore de reperfuzie activitatea enzimei a fost în descreștere față de valorile înregistrate după 1 oră de la restabilirea fluxului sangvin cu aproximativ 13% în lotul cu reperfuzie simplă (de la  $185,562\pm 14,058$  U/L până la  $163,085\pm 12,417$  U/L,  $p>0,05$ ), activitatea determinată fiind apropiată de cea observată în lotul expus doar ischemiei ovariene, și cu aproape 6% mai mică în lotul cu reperfuzie controlată (de la  $184,379\pm 5,441$  U/L până la  $174,239\pm 5,932$  U/L,  $p>0,05$ ).

Doar în lotul martor s-a determinat o corelație puternic negativă ( $r_s=-0,815$ ,  $p=0,004$ ) între nivelul activității LDH-P din serul sangvin și omogenatul ovarian, pe când în celelalte loturi studiate lipsește semnificația statistică (tabelul A1.1).

Lactatul poate fi transformat în piruvat, în condițiile în care enzima lactat dehidrogenaza L (**LDH-L**) își intensifică activitatea. Nu au fost constatate diferențe statistic semnificative între activitatea LDH-L măsurată în omogenatul ovarian între loturile martor și control,  $p > 0,05$  (tabelul 1). Ischemia ovariană a redus LDH-L-ul, consemnându-se o micșorare a activității enzimei în țesut cu aproape 9% comparativ cu lotul martor (de la  $54,181 \pm 0,853$  U/g.prot. până la  $49,184 \pm 1,920$  U/g.prot.,  $p > 0,05$ ). Reperfuzia atât simplă, cât și controlată de 1 oră a modificat ne semnificativ activitatea LDH-L din omogenat comparativ cu lotul cu ischemie,  $p > 0,05$  (figura 10).

La 24 ore de perfuzie atât simplă, cât și controlată LDH-L-ul a continuat să scadă în omogenat comparativ cu lotul cu ischemie,  $p > 0,05$ . Această reducere a activității enzimei a fost notată inclusiv comparativ cu loturile cu 1 oră perfuzie, dar diferența înregistrată a fost fără semnificație statistică,  $p > 0,05$ . În același timp, comparativ cu lotul martor, diminuarea activității a fost mai pronunțată în lotul cu 24 ore de perfuzie simplă cu aproximativ 16% (de la  $54,181 \pm 0,853$  U/g.prot. până la  $45,467 \pm 0,817$  U/g.prot.,  $p < 0,001$ ) decât în cel cu 24 ore de perfuzie controlată (de la  $54,181 \pm 0,853$  U/g.prot. până la  $46,048 \pm 2,522$  U/g.prot.,  $p > 0,05$ ) (figura 10).

Nu s-au înregistrat diferențe semnificative între activitatea LDH-L din serul sangvin în lotul de control comparativ cu lotul martor,  $p > 0,05$  (tabelul 1). La inducerea torsionii ovariene valorile enzimei au scăzut în ser comparativ cu lotul martor cu aproximativ 25% în lotul cu ischemie ovariană (de la  $283,417 \pm 18,005$  U/L până la  $212,619 \pm 7,373$  U/L,  $p = 0,04$ ) și lotul cu perfuzie simplă de 1 oră (de la  $283,417 \pm 18,005$  U/L până la  $212,956 \pm 6,282$  U/L,  $p = 0,039$ ), cu doar 6% în lotul cu perfuzie controlată de 1 oră (de la  $283,417 \pm 18,005$  U/L până la  $267,148 \pm 4,308$  U/L,  $p > 0,05$ ), cu aproape 23% în lotul cu perfuzie simplă de 24 ore (de la  $283,417 \pm 18,005$  U/L până la  $219,463 \pm 3,320$  U/L,  $p > 0,05$ ), și cu 16% în lotul cu perfuzie controlată de 24 ore (de la  $283,417 \pm 18,005$  U/L până la  $238,201 \pm 11,762$  U/L,  $p > 0,05$ ). Comparativ cu lotul cu ischemie ovariană, în ser s-a atestat o sporire a LDH-L-ului în loturile cu perfuzie controlată cu aproximativ 26% la 1 oră (de la  $212,619 \pm 7,373$  U/L până la  $267,148 \pm 4,308$  U/L,  $p < 0,001$ ), respectiv cu aproape 12% la 24 ore (de la  $212,619 \pm 7,373$  U/L până la  $238,201 \pm 11,762$  U/L,  $p > 0,05$ ), ceea ce nu s-a observat în loturile cu perfuzie simplă (figura 11).

Nu s-au identificat corelații semnificative statistic între activitatea LDH-L din serul sangvin și omogenatul ovarian în loturile de studiu (tabelul A1.1).

Torsiunea pediculului vascular ovarian determină scăderea fluxului sangvin arterial și obstrucția drenării venoase și limfatice, ducând la ischemie ovariană [12, 16]. În acest sens, este important de menționat faptul că ovarul are un dublu aport de sânge:

(1) din artera ovariană (care își are originea din aorta abdominală), aflată în ligamentul infundibulopelvic, care se extinde de la peretele lateral pelvin la ovar, și

(2) din ramura ovariană a arterei uterine (care își are originea din artera iliacă internă), conținută în ligamentul utero-ovarian, și care leagă ovarul cu uterul. Astfel, torsiunea ovariană apare atunci când ovarul se răsucește implicând suporturile sale ligamentare (atât ligamentul infundibulopelvic, cât și ligamentul utero-ovarian) [4].

Odată cu diagnosticarea torsiunii ovariene se propune detorsionarea anexei răsucite și evaluarea reperfuziei tisulare pentru a preveni infertilitatea, chiar și în cazul țesuturilor cianotice [45, 51]. Astfel, maladia include două faze:

(1) timpul scurs până la detorsiune, considerată ca perioadă de ischemie și

(2) producerea speciilor reactive de oxigen după detorsiune, considerată ca perioadă de reperfuzie [154].

Se cunoaște faptul că în TO dificultățile de diagnostic prelungesc timpul dintre debutul simptomelor și tratament. După confirmarea maladii este necesară o intervenție imediată, iar tratamentul conservator recomandat este prin detorsionarea ovarului [21], deoarece necroza celulară apare inevitabil în cazul unei perioade extinse de anoxie (absență de oxigen) sau hipoxie severă (când aportul de oxigen este scăzut în raport cu necesitatea metabolică) [70].

Totuși, la moment încă nu este clar care este perioada de ischemie pe care o poate tolera ovarul, așa cum există studii care au arătat viabilitatea acestuia și după 30 de ore de torsiune, sugerându-se că schimbările care ar determina leziuni importante sunt legate anume de restabilirea circulației sangvine [186]. Este demonstrat că toleranța hipoxică a diferitor tipuri de celule variază în funcție de rata metabolică, dar și de mecanismele de adaptare intrinsecă ale țesutului [70].

Concomitent, Celik Kavak E. și coaut. (2018) menționează că torsiunea provoacă modificări ischemice în ovar care pot fi demonstrate prin investigații biochimice [27]. Astfel, răsucirea anexei ovariene reduce fluxul sangvin cu majorarea cantității de acid lactic [47, 106] care poate fi detectat în sânge [47].

Substraturile metabolice, cum ar fi glucoza și oxigenul, sunt necesare pentru producerea de ATP la nivel mitocondrial. Când concentrația de oxigen este epuizată și glicoliza aerobă încetează, celulele trec la metabolismul anaerob, determinând o creștere a producerii de acid lactic care diminuează pH-ul citoplasmatic [62].

Se pare că modificarea pH-ului ar ajuta celulele să supraviețuiască în condiții de ischemie, conform unor date din literatura de specialitate [62]. Există studii care evidențiază faptul că L-lactatul ar reprezenta o moleculă reglatoare importantă a metabolismului celulelor ovariene și nu doar un produs final al unei căi metabolice, fiind sintetizat chiar și în timpul furnizării adecvate de oxigen. De asemenea, unele publicații descriu faptul că L-lactatul poate acționa ca o moleculă de semnalizare în diferite celule, incluzând și celulele țesutului ovarian [136].



În același timp, există cercetări în afecțiuni legate de fenomenul I/R care relatează despre faptul că menținerea unui pH scăzut în țesutul ischemizat în momentul restabilirii circulației sangvine ar avea un efect favorabil. Se consideră că reintroducerea lentă a oxigenului și persistența acidozei tisulare este unul dintre mecanismele prin care postcon condiționarea oferă beneficii [217], comparativ cu reperfuzia simplă. Zhang G. și coaut. (2015) au remarcat faptul că acidoza tisulară locală pentru o perioadă scurtă de timp și restabilirea graduală a nivelului local de oxigen pot fi mediatori importanți ai postcon condiționării prin diferite mecanisme, posibil, și prin reducerea cantității de SRO care este generată [217]. Deci, hiperlactemia observată în loturile experimentale din cercetarea noastră ar putea fi văzută ca un factor protector de diminuare a stresului oxidativ în torsionarea ovariană în momentul revascularizării, dar se pare că tipul de reperfuzie nu influențează procesul generării lactatului așa cum după 1 oră de la restabilirea fluxului sangvin au fost înregistrate cantități similare în ambele loturi,  $p > 0,05$ .

În perioada ischemică celula urmează căile metabolismului anaerob, deoarece în mitocondrie nu mai are loc fosforilarea oxidativă [71, 143]. Inhibarea fosforilării oxidative din cauza lipsei oxigenului, în condițiile unui flux sangvin întrerupt, nu permite degradarea piruvatului care a fost produs în procesul de glicoliză. În condiții aerobe piruvatul ar fi fost transportat în mitocondrii și transformat, sporind semnificativ randamentul glicolizei [218]. Astfel că majorarea nivelului de lactat în țesut este rezultatul oxidării preferențiale a glucozei pe cale anaerobă [141].

În condiții de ischemie, când practic este oprită alimentarea ovarului cu sânge, lipsa oxigenului face imposibilă desfășurarea adecvată a proceselor aerobe, până chiar la blocarea lor. Una dintre căile de producere a energiei în celule în condiții fiziologice este oxidarea aerobă a glucozei cu formare de piruvat. La blocarea fluxului sangvin spre ovare, practic, acesta sunt lipsite de substanțe nutritive și oxigen. Astfel, în condiții de ischemie, pentru menținerea vieții, procesele metabolice anaerobe devin intense, iar glucoza, ca substrat cu potențial energetic, este oxidată anaerob. Piruvatul obținut și care nu mai poate fi transformat în procesele mitocondriale este supus schimbărilor până la lactat, proces catalizat de enzima LDH-P, ceea ce a fost înregistrat în cercetarea noastră. Creșterea statistic semnificativă față de lotul martor a valorilor lactatului în situațiile de ischemie și ischemie/reperfuzie atât simplă, cât și controlată de 1 oră relevă faptul intensificării proceselor anaerobe de producere a energiei în condițiile privării ovarelor de oxigen.

Majorarea în ser de aproximativ două ori a cantității de lactat în loturile experimentale comparativ cu loturile martor și control sugerează o stare de hiperlactemie ca răspuns la procesul ischemic la care sunt expuse ovarele. O parte din acest lactat își poate avea originea din ovare, deoarece după reperfuzia de 1 oră, indiferent de metoda aplicată, s-au observat creșteri statistic semnificative ale concentrației lactatului comparativ cu lotul cu ischemie cu aproape 31%,  $p < 0,001$ , sugerându-se preluarea lactatului după revascularizarea ovarelor, respectiv cu majorarea

acestua în serul sangvin. Rezultate similare au înregistrat și Şahin Ç. și coaut. (2020) care au raportat creșteri serice ale nivelului de lactat după 3 ore de torsiune ovariană comparativ cu lotul de control, cu o continuă majorare a valorilor după 3 ore de la restabilirea fluxului sangvin [219].

Totuși, după 24 ore de reperfuzie a fost observată o tendință de descreștere serică a cantității de lactat comparativ cu perioada inițială (după 1 oră de la restabilirea circulației). Aceasta poate fi datorată faptului că unele organe îl pot capta din sânge și-l pot oxida [220, 221], printre acestea fiind și ficatul care are capacitatea de a prelua lactatul și de a-l supune transformărilor în ciclul Cori sau de a-l utiliza pentru sinteza de ATP [221, 222].

Datele obținute arată că ischemia provoacă acumularea produselor metabolismului anaerob manifestată prin creșterea lactatului, iar acest proces poate fi reversibil dacă se restabilește alimentarea cu sânge.

În același timp, modificări ale transportatorilor lactatului, aceștia fiind proteine membranare [221, 222], ar putea explica de ce lactatul s-a menținut crescut în omogenatul șobolanilor expuși torsiunii/detorsiunii ovariene, în special după 1 oră de la reoxigenare. O afectare a proteinelor membranare în condiții de SO ar putea justifica rezultatele obținute în țesutul ovarian. În momentul în care intervin aceste modificări este foarte probabil să se reducă capacitatea celulelor de a elibera lactatul în sânge, fapt care a și fost consemnat în studiul nostru prin niveluri mai mari de lactat în ambele loturi cu 1 oră reperfuzie comparativ cu lotul martor,  $p < 0,001$  [221]. Totuși, se pare că acest proces este reversibil, așa cum după 24 ore de la revascularizare în ambele loturi experimentale concentrația de lactat s-a apropiat de cea măsurată în lotul martor, diferențele fiind ne semnificative,  $p > 0,05$ .

LDH este cunoscută a fi o enzimă intracelulară ce catalizează reacția de transformare a piruvatului în lactat (LDH-P) sau a lactatului în piruvat (LDH-L). În dependență de situația metabolică a țesutului procesul poate fi îndreptat spre formarea unuia dintre cei doi metaboliți. Torsiunea ovariană, fiind o afecțiune însoțită de ischemie, amplifică activitatea LDH-P, reducând acțiunea LDH-L.

TO a sporit activitatea LDH-P, diminuând activitatea LDH-L, ceea ce indică despre adaptarea metabolismului în situația patologică condiționată de evenimentele care au loc în torsiunea ovariană. Aceasta ar putea fi un factor important care ar argumenta rezistența ovarelor la ischemie și refacerea mai rapidă după expunerea la I/R comparativ cu alte țesuturi și organe. Posibil că mitocondriile celulelor ovariene nu sunt capabile să asigure cantitatea de ATP necesară unei bune funcționări post-reperfuzie din cauza unor modificări la nivelul componentelor complexelor lanțului transportator de electroni care ar surveni în perioada de ischemie, descrise în capitolul 1. În aceste condiții, LDH-P are rolul de a oxida NADH cu formarea de  $\text{NAD}^+$ , care va fi reutilizat în glicoliză, menținând funcțional acest proces, astfel asigurându-se necesarul de

energie pentru supraviețuirea celulelor până la refacerea integrală a activității mitocondriale. Descreșterea activității enzimei LDH-L, generatoare de NADH, vine să susțină această ipoteză, care, însă, necesită studii suplimentare pentru confirmare. Se pare că după procedura I/R utilizarea lactatului pentru a fi transformat în piruvat de către LDH-L nu este metabolic avantajoasă, iar rolul LDH-P ar fi de a menține producerea de energie.

Concomitent, datele din literatură indică faptul că SRO produse în mitocondrii în condiții de hipoxie activează transcripția genelor pentru enzimele glicolitice, ceea ce sugerează că SRO mediază legătura dintre nucleu și mitocondrii [97]. Deci, ischemia însoțită de producere de radicali liberi ar putea explica rezultatele înregistrate referitor la activitatea LDH-P care a fost mai mare după 3 ore de ischemie ovariană cu aproape 30% în omogenat și cu aproximativ 20% în serul sangvin comparativ cu cea notată în lotul martor, continuând să crească și în perioada de reperfuzie. În același timp, o activitate majorată a enzimei în ser poate sugera și leziunea membranelor celulare, iar augmentarea la reperfuzie poate indica amplificarea procesului de deteriorare a membranelor.

Continuarea metabolismului anaerob după restabilirea fluxului sangvin în TO ar putea avea mai multe explicații: (1) lanțul respirator și/sau membranele mitocondriale au fost afectate în timpul ischemiei și este necesară o anumită perioadă de timp pentru restabilirea funcțională, probabil și structurală, (2) posibil manipulațiile chirurgicale să inducă spasm vascular, iar (3) reperfuzia să nu fie completă, astfel încât să nu fie asigurată oxigenarea tuturor celulelor la un nivel optim, având ca rezultat continuarea procesului de glicoliză anaerobă pentru obținerea necesarului de energie cu o majorare a lactatului.

Unii cercetători admit faptul că acidoza rezultată în urma ischemiei ar fi un factor favorizant important care ar determina modificări ale structurii proteinelor din circulația sangvină, inclusiv a albuminei, modificându-i capătul N-terminal, astfel încât să împiedice fixarea cobaltului [118].

Maladiile caracterizate prin ischemie acută sunt considerate urgențe medicale, iar tratamentul presupune, în primul rând, restabilirea circulației sangvine pentru a preveni necroza. Totuși, cercetările au sesizat faptul că ischemia și, inclusiv, reperfuzia amplifică formarea SRO, iar aceștia modifică, la rândul lor, diferite molecule, printre care și albumina plasmatică. Astfel, schimbările structurale ale acesteia ca și consecință a SO vor determina formarea AIM. Există studii care au constatat că AIM crește rapid după un proces ischemic [223-225].

În cercetarea noastră, în omogenatul ovarian nu s-au determinat diferențe statistic semnificative ale nivelului de AIM în loturile experimentale. Totuși, s-a observat tendința de majorare a producerii de AIM după aplicarea manevrei de torsionare a ovarelor, înregistrându-se creșteri de circa 7% în lotul cu ischemie ovariană (de la  $14,233 \pm 0,458$   $\mu\text{mol/g.prot.}$  până la  $15,274 \pm 0,284$   $\mu\text{mol/g.prot.}$ ,  $p > 0,05$ ), 22% în lotul cu 1 oră reperfuzie simplă (de la  $14,233 \pm 0,458$

$\mu\text{mol/g.prot.}$  până la  $17,384 \pm 1,018 \mu\text{mol/g.prot.}$ ,  $p > 0,05$ ), 15% în lotul cu 1 oră reperfuzie controlată (de la  $14,233 \pm 0,458 \mu\text{mol/g.prot.}$  până la  $16,423 \pm 1,618 \mu\text{mol/g.prot.}$ ,  $p > 0,05$ ), 18% în lotul cu 24 ore de reperfuzie simplă (de la  $14,233 \pm 0,458 \mu\text{mol/g.prot.}$  până la  $16,855 \pm 1,211 \mu\text{mol/g.prot.}$ ,  $p > 0,05$ ) și 13% în lotul cu 24 ore de reperfuzie controlată (de la  $14,233 \pm 0,458 \mu\text{mol/g.prot.}$  până la  $16,106 \pm 1,154 \mu\text{mol/g.prot.}$ ,  $p > 0,05$ ) comparativ cu lotul martor (tabelul 2).

În loturile cu reperfuzie s-a constatat o sporire a AIM în țesutul ovarian cu aproape 14% în lotul cu 1 oră reperfuzie simplă (de la  $15,274 \pm 0,284 \mu\text{mol/g.prot.}$  până la  $17,384 \pm 1,018 \mu\text{mol/g.prot.}$ ,  $p > 0,05$ ), 8% în lotul cu 1 oră reperfuzie controlată (de la  $15,274 \pm 0,284 \mu\text{mol/g.prot.}$  până la  $16,423 \pm 1,618 \mu\text{mol/g.prot.}$ ,  $p > 0,05$ ), 10% în lotul cu 24 ore de reperfuzie simplă (de la  $15,274 \pm 0,284 \mu\text{mol/g.prot.}$  până la  $16,855 \pm 1,211 \mu\text{mol/g.prot.}$ ,  $p > 0,05$ ) și aproximativ 5% în lotul cu 24 ore de reperfuzie controlată (de la  $15,274 \pm 0,284 \mu\text{mol/g.prot.}$  până la  $16,106 \pm 1,154 \mu\text{mol/g.prot.}$ ,  $p > 0,05$ ) comparativ cu lotul care a fost supus doar ischemiei ovariene. S-a remarcat faptul că în loturile cu reperfuzie simplă generarea de AIM la nivel tisular a fost mai intensă comparativ cu loturile cu reperfuzie controlată,  $p > 0,05$  (tabelul 2).

**Tabelul 2. Influența torsionii/detorsionii ovariene asupra albuminei ischemic modificate din serul sangvin și omogenatul ovarian**

Loturi de studiu	AIM	
	ser, $\mu\text{mol/L}$	omogenat, $\mu\text{mol/g.prot.}$
Martor	$402,370 \pm 2,732$ (100%)	$14,233 \pm 0,458$ (100%)
Control	$418,472 \pm 1,854$ (104%) **	$14,251 \pm 0,733$ (100%)
Ischemie	$478,359 \pm 5,218$ (119%) *** ### $\varphi\delta$	$15,274 \pm 0,284$ (107%)
Ischemie/1 oră reperfuzie simplă	$490,024 \pm 3,376$ (122%) *** ### $\varphi\varphi\varphi \nu\delta\delta$	$17,384 \pm 1,018$ (122%)
Ischemie/1 oră reperfuzie controlată (on-ff)	$452,564 \pm 3,096$ (112%) *** ### $\delta \beta\beta\beta \cdot\cdot\cdot$	$16,423 \pm 1,618$ (115%)
Ischemie/24 ore reperfuzie simplă	$483,370 \pm 1,550$ (120%) *** ### $\varphi\varphi\varphi \nu\delta\delta$	$16,855 \pm 1,211$ (118%)
Ischemie/24 ore reperfuzie controlată (on-ff)	$454,207 \pm 0,878$ (113%) *** ### $\delta \beta\beta\beta \cdot\cdot\cdot$	$16,106 \pm 1,154$ (113%)

Notă: AIM – albumina ischemic modificată.

Diferență statistic semnificativă comparativ cu:

- lotul martor: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ ;
- lotul control: # –  $p < 0,05$ ; ## –  $p < 0,01$ ; ### –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie:  $\delta$  –  $p < 0,05$ ;  $\delta\delta$  –  $p < 0,01$ ;  $\delta\delta\delta$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/1 oră reperfuzie simplă:  $\beta$  –  $p < 0,05$ ;  $\beta\beta$  –  $p < 0,01$ ;  $\beta\beta\beta$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/1 oră reperfuzie controlată:  $\varphi$  –  $p < 0,05$ ;  $\varphi\varphi$  –  $p < 0,01$ ;  $\varphi\varphi\varphi$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/24 ore reperfuzie simplă:  $\cdot$  –  $p < 0,05$ ;  $\cdot\cdot$  –  $p < 0,01$ ;  $\cdot\cdot\cdot$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/24 ore reperfuzie controlată:  $\nu$  –  $p < 0,05$ ;  $\nu\nu$  –  $p < 0,01$ ;  $\nu\nu\nu$  –  $p < 0,001$ .

În serul sangvin cantitatea de AIM a crescut semnificativ în lotul de control comparativ cu lotul martor (de la  $402,370 \pm 2,732$   $\mu\text{mol/L}$  până la  $418,472 \pm 1,854$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $p=0,003$ ). Torsiunea ovariană a sporit producerea de AIM cu aproximativ 19% comparativ cu lotul martor (de la  $402,370 \pm 2,732$   $\mu\text{mol/L}$  până la  $478,359 \pm 5,218$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $p<0,001$ ).

Comparativ cu lotul expus doar ischemiei ovariene nivelul seric al AIM consemnat a fost semnificativ mai mic atât în lotul cu 1 oră reperfuzie controlată,  $p=0,01$ , cât și în cel cu 24 ore de reperfuzie *on-off*,  $p=0,014$ . Reperfuzia simplă, însă, a menținut înalte valorile AIM din ser, observându-se atât după 1 oră de reperfuzie, cât și după 24 ore cantități apropiate celor măsurate în lotul doar cu ischemie ovariană,  $p>0,05$ .

În același timp, cantitatea de AIM în loturile cu reperfuzie controlată a fost statistic semnificativ mai mică comparativ cu loturile cu reperfuzie simplă,  $p<0,001$ , totuși, menținându-se statistic semnificativ înalte comparativ atât cu lotul martor,  $p<0,001$ , cât și cu lotul de control,  $p<0,001$  (tabelul 2).

Nu au fost identificate corelații între cantitatea de AIM din serul sangvin și cea din omogenatul ovarian (tabelul A1.1).

Rezultatul obținut, referitor la faptul că ischemia ovariană a determinat creșterea nivelului seric al AIM, este în concordanță cu datele literaturii din domeniu [29, 119, 122]. La fel ca și în studiul nostru, Aran T. și coaut. (2010) au identificat majorări serice ale AIM la animalele supuse TO comparativ cu lotul de animale fără torsiune [122, 223]. Aceleași raportări sunt făcute de Osmanağaoğlu M.A. și coaut. (2012) care au obținut valori statistic semnificativ mai mari ale AIM serice în lotul cu torsiune ovariană comparativ cu lotul de control [29]. Yildirim A. și coaut. (2016) au înregistrat valori înalte ale AIM în ser în lotul de șobolani expus fenomenului I/R prin modelarea TO comparativ cu lotul de control, arătând că există și o corelație pozitivă între schimbările histopatologice care apar în ovar și nivelul seric al AIM, sugerând astfel că severitatea leziunilor ar putea fi apreciată urmărind acest parametru [119, 223].

Există, însă, și cercetări în care rezultatele măsurării AIM sunt contrare celor obținute de noi. Astfel, Karatas Gurgun A. și coaut. (2017) nu au stabilit diferențe statistic semnificative între nivelurile de AIM evaluate în ser în loturile de animale cu TO pentru o perioadă de 4 ore, respectiv 24 de ore și lotul fără torsiune ovariană. Totuși, ei au consemnat faptul că valorile AIM erau mai mari în lotul cu 24 ore de torsiune ovariană decât în lotul de animale expuse TO pentru 4 ore și, respectiv, față de lotul de șobolani fără torsiune, concluzionând că durata întreruperii fluxului sangvin ar constitui un factor important în procesul de transformare a albuminei în AIM, iar o perioadă mai îndelungată a ischemiei ar putea avea ca rezultat majorarea AIM, astfel încât să treacă de pragul semnificației statistice [123, 223].

Valorile AIM înregistrate în studiul nostru în omogenatul ovarian nu au arătat diferențe statistice semnificative între loturile experimentale,  $p > 0,05$ . Totuși, a fost observată o tendință de creștere la aplicarea torsionii comparativ cu lotul martor. Această majorare a AIM cu aproape 7% după ischemia de 3 ore, urmată de o augmentare mai exprimată după reperfuzia simplă de 1 oră, confirmă faptul că întreruperea circulației sangvine induce modificări ale albuminei în așa fel încât să-i descrească capacitatea de a fixa  $\text{Co}^{2+}$ , iar reperfuzia, prin amplificarea SO, contribuie la intensificarea acestui proces, majorând nivelul de AIM detectată [223], SRO fiind cunoscute ca molecule implicate activ în generarea de AIM [226].

Astfel, constatările noastre corespund cu cele enunțate de alți cercetători care au raportat faptul că reperfuzia simplă în TO este capabilă să agraveze leziunile inițiale, produse doar de ischemie, fenomen marcat prin cantități mai mari de AIM [119, 124, 223]. Concomitent, putem constata că tipul de reperfuzie poate influența producerea de AIM, așa cum în loturile la care a fost aplicată manevra *on-off* cantitatea acesteia a fost mai mică decât în cele cu reperfuzie simplă.

Așa cum majorări ale AIM au fost observate și în alte afecțiuni ischemice decât TO [224, 225], iar studiul nostru nu a relevat prezența corelațiilor între cantitatea de AIM din serul sangvin și cea din omogenatul ovarian, o creștere sangvină a acestui parametru biochimic trebuie întotdeauna evaluată în context clinic [223]. Guven S. și coaut. (2015), care au măsurat AIM la pacientele cu durere pelvină, au venit cu recomandarea ca atunci când se determină niveluri înalte de AIM în ser și există suspiciunea clinică de torsione ovariană, medicii să facă o laparoscopie pentru a exclude această patologie [125, 223], iar tratamentul să fie efectuat prin înlăturarea torsionii, așa cum analiza pe termen lung a cazurilor tratate prin detorsione a relevat că metoda este sigură și poate salva ovarul [27].

Yeniocak S. și coaut. (2020) au publicat date care confirmă creșterea serică a AIM la pacientele cu torsione ovariană. Aceștia precizează că nivelurile serice de AIM la bolnavele cu patologie ovariană au fost semnificativ mai mari decât cele ale cazurilor clasificate drept dureri abdominale nespecifice. În urma analizei efectuate aceștia au concluzionat că o majorare serică a AIM la femeile care se prezintă la departamentul de urgență cu dureri abdominale poate indica cauza ischemică a acuzelor [126].

Cercetarea noastră reliefează faptul că torsione ovariană induce modificări metabolice caracterizate prin majorarea cantităților markerilor biochimici indicatori ai ischemiei tisulare atât în ser, cât și în țesutul ovarian. De asemenea, intensificarea activității LDH-P identificată de noi pare să fie unul dintre mecanismele care ar conferi rezistență ovarelor la I/R.

Chiar dacă studiul nostru nu a determinat prezența corelațiilor între indicii de laborator studiați în toate loturile experimentale, AIM, LDH-P și lactatul din serul sangvin ar putea avea utilitate în practica clinică pentru a fi evaluați atunci când se presupune ischemie ovariană,

investigațiile nefiind costisitoare și putând fi realizate în cadrul oricărui laborator din instituțiile medicale din țară.

Deci, o pacientă care ar acuza dureri abdominale inferioare și ar avea un nivel seric înalt de lactat, LDH-P și/sau AIM ar trebui obligatoriu evaluată pentru excluderea torsionii ovariene.

### **3.3. Modificările indicilor stresului oxidativ în torsionarea/detorsionarea ovariană**

Ischemia și reperfuzia pot duce la deteriorarea țesuturilor prin mai multe mecanisme, inclusiv prin creșterea nivelului de SRO și prin producerea, și secreția mediatorilor inflamatori [139]. Stresul oxidativ este capabil să provoace leziuni tisulare care se pot finaliza cu necroză sau apoptoză [44].

Se știe că efectele ischemiei în diferite țesuturi sunt determinate de durata acesteia, iar multe dintre leziunile rezultate apar în timpul stadiului de reoxigenare tisulară. Unul dintre procesele cu impact semnificativ asupra homeostaziei celulare este producerea de radicali liberi ca rezultat al stresului oxidativ, implicând două evenimente fiziopatologice majore: ischemia urmată de reperfuzie și procesul inflamator, care culminează cu modificări locale și/sau sistemice [145].

Așa cum  $\text{NO}\cdot$  este un radical liber foarte instabil [227], timpul de înjumătățire estimat al acestuia în sânge fiind de 1,8 milisecunde [228], determinarea directă a acestuia fiind foarte dificilă, s-a decis studierea derivaților oxidului nitric (cantitatea totală de nitrat și nitrit) conform protocolului Laboratorului de Biochimie al USMF „Nicolae Testemițanu” [196].

În cercetarea noastră nu au fost consemnate diferențe între cantitatea derivaților oxidului nitric (DNO) determinate în omogenatul ovarian și în serul sangvin între loturile martor și control,  $p > 0,05$  (figura 12).

În țesutul ovarian al animalelor care au fost expuse doar manevrei de torsionare s-a observat o descreștere a cantității DNO cu aproximativ 11% (de la  $15,941 \pm 0,306 \mu\text{mol/g.prot.}$  până la  $14,177 \pm 0,189 \mu\text{mol/g.prot.}$ ,  $p = 0,003$ ) comparativ cu lotul martor (figura 12).

Reperfuzia a determinat o intensificare a producerii DNO în țesut atât în loturile cu reperfuzie de 1 oră, cât și în cele cu 24 ore de reperfuzie comparativ cu lotul expus doar ischemiei. Astfel, au fost stabilite creșteri cu aproape 8% în lotul cu 1 oră reperfuzie (de la  $14,177 \pm 0,189 \mu\text{mol/g.prot.}$  până la  $15,254 \pm 0,518 \mu\text{mol/g.prot.}$ ,  $p > 0,05$ ), 14% în lotul cu 1 oră reperfuzie *on-off* (de la  $14,177 \pm 0,189 \mu\text{mol/g.prot.}$  până la  $16,178 \pm 0,312 \mu\text{mol/g.prot.}$ ,  $p = 0,001$ ), 28% în lotul cu 24 ore reperfuzie simplă (de la  $14,177 \pm 0,189 \mu\text{mol/g.prot.}$  până la  $18,108 \pm 0,420 \mu\text{mol/g.prot.}$ ,  $p < 0,001$ ) și cu aproximativ 24% în lotul cu 24 ore reperfuzie *on-off* (de la  $14,177 \pm 0,189 \mu\text{mol/g.prot.}$  până la  $17,503 \pm 0,641 \mu\text{mol/g.prot.}$ ,  $p = 0,006$ ).

Concomitent, la distanță (după 24 ore) în omogenatul ovarian s-au consemnat cantități mai mari ale DNO comparativ cu cele înregistrate în perioada inițială de reperfuzie (după 1 oră), cu

aproximativ 19% în lotul cu 24 ore reperfuzie simplă comparativ cu lotul cu 1 oră reperfuzie simplă (de la  $15,254 \pm 0,518 \mu\text{mol/g.prot.}$  până la  $18,108 \pm 0,420 \mu\text{mol/g.prot.}$ ,  $p=0,007$ ) și cu aproape 8% în lotul cu 24 ore reperfuzie controlată comparativ cu lotul cu 1 oră reperfuzie controlată (de la  $16,178 \pm 0,312 \mu\text{mol/g.prot.}$  până la  $17,503 \pm 0,641 \mu\text{mol/g.prot.}$ ,  $p>0,05$ ).

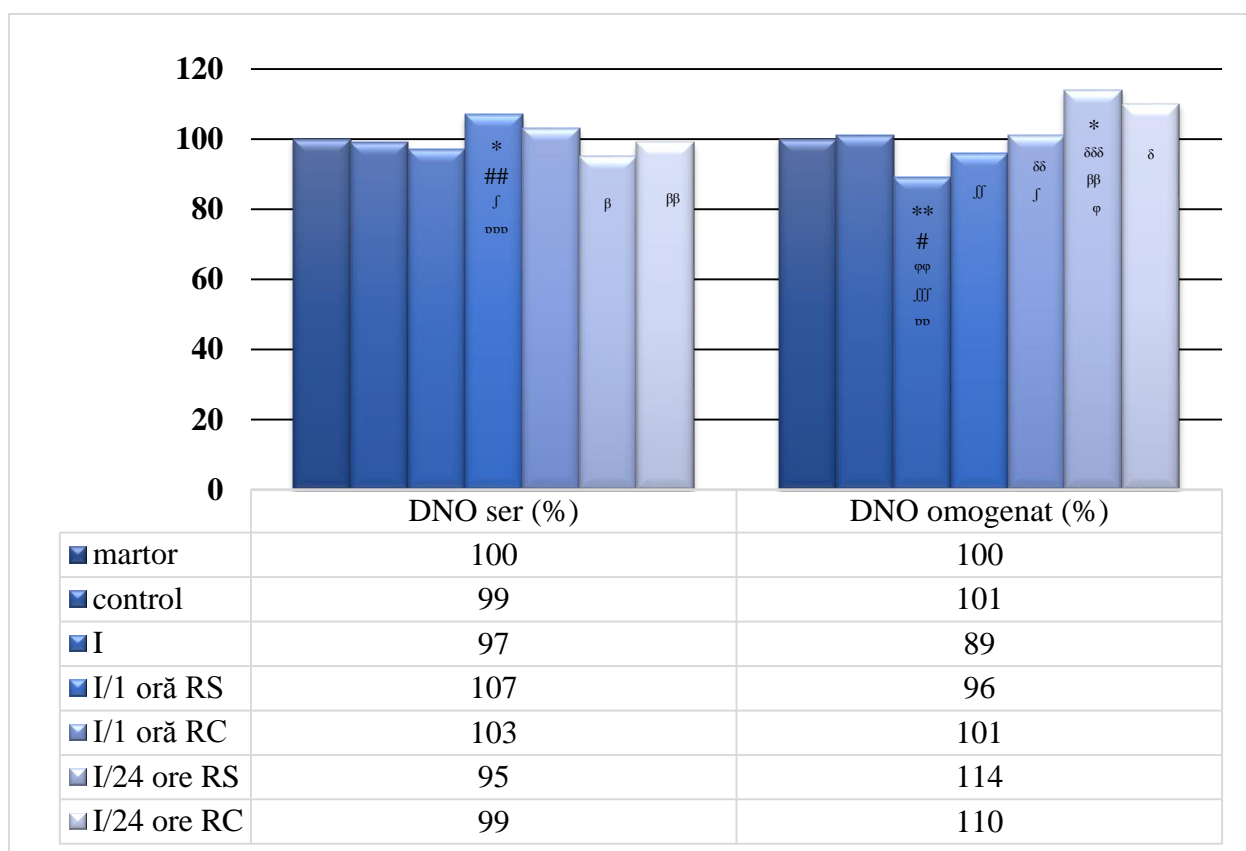


Figura 12. Derivații oxidului nitric din serul sangvin și omogenatul ovarian în torsiunea/detorsiunea ovariană experimentală

Notă: I – ischemie; RS – reperfuzie simplă; RC – reperfuzie controlată (*on-off*); DNO – derivații oxidului nitric. Diferență statistic semnificativă comparativ cu:

- lotul martor: \* –  $p<0,05$ ; \*\* –  $p<0,01$ ; \*\*\* –  $p<0,001$ ;
- lotul control: # –  $p<0,05$ ; ## –  $p<0,01$ ; ### –  $p<0,001$ ;
- lotul ischemie:  $\delta$  –  $p<0,05$ ;  $\delta\delta$  –  $p<0,01$ ;  $\delta\delta\delta$  –  $p<0,001$ ;
- lotul ischemie/1 oră reperfuzie simplă:  $\beta$  –  $p<0,05$ ;  $\beta\beta$  –  $p<0,01$ ;  $\beta\beta\beta$  –  $p<0,001$ ;
- lotul ischemie/1 oră reperfuzie controlată:  $\varphi$  –  $p<0,05$ ;  $\varphi\varphi$  –  $p<0,01$ ;  $\varphi\varphi\varphi$  –  $p<0,001$ ;
- lotul ischemie/24 ore reperfuzie simplă:  $\jmath$  –  $p<0,05$ ;  $\jmath\jmath$  –  $p<0,01$ ;  $\jmath\jmath\jmath$  –  $p<0,001$ ;
- lotul ischemie/24 ore reperfuzie controlată:  $\upsilon$  –  $p<0,05$ ;  $\upsilon\upsilon$  –  $p<0,01$ ;  $\upsilon\upsilon\upsilon$  –  $p<0,001$ .

Torsiunea ovarelor a redus cu aproape 3% nivelul DNO în serul sangvin (de la  $77,991 \pm 1,307 \mu\text{mol/L}$  până la  $75,575 \pm 2,263 \mu\text{mol/L}$ ,  $p>0,05$ ) comparativ cu lotul martor (figura 12).

Comparând rezultatele obținute în serul sangvin în loturile cu reperfuzie de 1 oră cu cele din lotul martor, s-a constatat creșterea statistic semnificativă a DNO în lotul cu reperfuzie simplă, unde s-a stabilit un nivel mai înalt al DNO cu aproximativ 7% (de la  $77,991 \pm 1,307 \mu\text{mol/L}$  până la  $83,201 \pm 0,654 \mu\text{mol/L}$ ,  $p=0,041$ ), iar în lotul cu reperfuzie *on-off* majorarea a fost de circa 3%,



însă fără vreo semnificație statistică (de la  $77,991 \pm 1,307 \mu\text{mol/L}$  până la  $80,256 \pm 1,551 \mu\text{mol/L}$ ,  $p > 0,05$ ) (figura 12).

Reperfuzia a sporit producerea DNO în ser în perioada inițială (după 1 oră de reperfuzie), când au fost înregistrate cantități mai mari. Astfel, comparativ cu lotul de șobolani expus doar ischemiei ovariene s-a constatat o mărire a DNO cu aproape 10% (de la  $75,575 \pm 2,263 \mu\text{mol/L}$  până la  $83,201 \pm 0,654 \mu\text{mol/L}$ ,  $p > 0,05$ ) în lotul cu 1 oră reperfuzie simplă și cu 6% (de la  $75,575 \pm 2,263 \mu\text{mol/L}$  până la  $80,256 \pm 1,551 \mu\text{mol/L}$ ,  $p > 0,05$ ) în lotul cu reperfuzie *on-off*.

Cantitatea DNO înregistrată la distanță (după 24 ore de reperfuzie) în ser a fost apropiată de cea măsurată în lotul martor. Astfel, nu există diferențe statistic semnificative între cantitatea DNO determinată în loturile cu 24 ore de reperfuzie și lotul martor,  $p > 0,05$ .

În lotul cu 24 ore reperfuzie simplă s-a observat o diminuare statistic semnificativă a DNO în ser cu aproximativ 11% (de la  $83,201 \pm 0,654 \mu\text{mol/L}$  până la  $74,367 \pm 2,121 \mu\text{mol/L}$ ,  $p = 0,027$ ) comparativ cu lotul cu 1 oră reperfuzie simplă.

S-a determinat o corelație puternic pozitivă ( $r_s = 0,722$ ,  $p = 0,018$ ) între nivelul DNO din ser și omogenatul ovarian doar în lotul cu ischemie/1 oră reperfuzie simplă (tabelul A2.1).

Rolul oxidului nitric în afecțiunile caracterizate prin ischemie/reperfuzie nu este clar stabilit ca fiind unul benefic sau unul dăunător. Unii autori au sugerat că  $\text{NO}\cdot$  exercită un efect favorabil în afecțiuni cu I/R ale diferitor organe, țesuturi și celule, iar alte studii nu raportează nici un efect sau chiar indică o acțiune dăunătoare a  $\text{NO}\cdot$  [227].

Radicalul  $\text{NO}\cdot$  este produs în condiții fiziologice în ovare, iar efectele sale sunt mediate de GMPc sau prin implicarea în stresul oxidativ [72].  $\text{NO}\cdot$  endogen este sintetizat din L-arginină într-o reacție de oxidare, catalizată de enzimele nitric oxid sintaze [229]. În literatură sunt date care confirmă faptul că niveluri crescute de  $\text{NO}\cdot$  și anion superoxid vor determina generarea de peroxinitrit cu afectarea severă a celulelor, care poate să ducă chiar la moartea acestora [72]. Deci, în condițiile unui stres oxidativ intens, în care anionul superoxid este sintetizat în cantități mari,  $\text{NO}\cdot$  disponibil se poate reduce semnificativ, fiind utilizat în procesul patologic al formării peroxinitritului.

Concomitent, *in vivo* nitritul este considerat un produs al catabolismului  $\text{NO}\cdot$  care ar putea proteja țesutul expus ischemiei. Așa cum a fost precizat anterior,  $\text{NO}\cdot$  poate fi inactivat datorită interacțiunii cu anionul superoxid, dar se poate și autoxida până la nitriți și apoi la nitrați. Alte căi de transformare a oxidului nitric pot fi mediate prin reacții de oxidare cu participarea metalelor din structura unor proteine. S-a constatat că proteina ceruloplasmina, care conține cupru, în condiții fiziologice oxidează rapid  $\text{NO}\cdot$  cu producerea de nitriți. Pe lângă reacția mediată de ceruloplasmină și hemoglobina deoxigenată poate transforma rapid  $\text{NO}\cdot$  în nitrați [229]. Deci, oxidul nitric poate

fi transformat și în nitrați, și nitriți, care pot fi măsurați, și pot oferi date indirecte despre producerea de NO<sup>•</sup> în organism.

Cantitatea de nitrați și nitriți este utilizată pe scară largă ca un indice al activității enzimei nitric oxid sintaza [230]. Totuși, trebuie de precizat faptul că aportul dietetic de nitrați și nitriți contribuie, de asemenea, cu aproximativ 30–50% din fondul circulant al acestor anioni. Nitrații se găsesc în multe alimente, în special în legumele cu frunze verzi. Nitratul ingerat este absorbit în stomac și intestine, ulterior secretat în concentrații mari de glandele salivare, formând așa-numita circulație enterosalivară a nitratului. Apoi, nitratul este redus la nitrit prin intermediul bacteriilor facultativ anaerobe din cavitatea bucală, după care nitritul este înghițit ca parte a salivei și reabsorbit la nivel intestinal. Creșterea preconizată a nitritului sistemic după ingerarea nitratului nu este observată dacă saliva nu este înghițită, dar expulzată [228].

În multe tipuri de celule nitric oxid sintaza inductibilă este indusă de condiții hipoxice [70]. Tuncer A.A. și coaut. (2016) au făcut o evaluare imunohistochimică a nitric oxid sintazei și au remarcat o majorare a cantității enzimei la nivelul ovarelor care au fost expuse torsionii, și detorsionii [15]. Totuși, în condiții de ischemie, când cantitatea de oxigen este redusă esențial, capacitatea nitric oxid sintazei de a genera NO<sup>•</sup> este compromisă din cauza lipsei oxigenului care este unul dintre substraturile absolut necesare pentru buna funcționare a enzimei [231]. În schimb, reducerea nitritului la NO<sup>•</sup> ar putea fi o reacție importantă care să explice modificările cantității DNO din cercetarea noastră, observându-se reducerea acestora cu aproximativ 3% ( $p > 0,05$ ) în ser și 11% ( $p = 0,003$ ) în omogenat după expunerea ovarelor torsionii pentru o durată de 3 ore. Deci, rezistența ovarelor la ischemie ar putea fi explicată prin capacitatea acestora de a utiliza DNO cu scopul producerii de oxid nitric, despre care se știe că este un reglator al funcției mitocondriale, în concentrații nanomolare inhibând reversibil citocrom c oxidaza, reglând formarea SRO și reducând eliberarea citocromului c, și, respectiv apoptoza [231].

Astfel, trebuie de precizat faptul că citokinele proinflamatorii, condițiile de hipoxie și acidoză pot induce în țesuturi, endoteliu și eritrocite expresia enzimei xantin oxido-reductaza care poate utiliza nitritul pentru a produce oxidul nitric [228]. Astfel, cercetătorii au demonstrat că nitritul este o moleculă de semnalizare intrinsecă care este redusă la NO<sup>•</sup> în timpul ischemiei și care la reperfuție limitează apoptoza și citotoxicitatea [231].

Lucrarea lui Waltz P. și coaut. (2015) prezintă date despre faptul că în timpul ischemiei nitritul mediază citoprotecția prin inhibarea activității complexului I al lanțului transportator de electroni prin S-nitrozare, scăzând astfel producerea de SRO și prevenind modificările permeabilității membranelor mitocondriale, și eliberarea citocromului c, inclusiv, reducând potențialele efecte dăunătoare ale reperfuziei [228].

În literatura de specialitate sunt date care confirmă faptul că producerea de oxid nitric și peroxinitrit este accelerată în caz de ischemie urmată de reperfuzie [15]. Cercetătorii au stabilit că în prezența oxidanților, cum ar fi radicalii superoxid și peroxidul de hidrogen, NO $\cdot$  poate fi oxidat la anionul peroxinitrit și dioxidul de azot, care vor intensifica leziunile oxidative [228].

Datele literaturii referitor la efectele NO $\cdot$  în contextul leziunii I/R sunt controversate, pe de o parte sunt menționate efectele citotoxice, pe de altă parte se sugerează efectul benefic, protector [70]. Aceste contradicții sunt cel mai probabil datorate faptului că rezultatul acțiunii NO $\cdot$  este dependent de concentrația acestuia [64], iar o producere excesivă sau dimpotrivă, o diminuarea a sintezei în diverse condiții experimentale în diferite cercetări ar duce și la concluzii variate și contradictorii.

Studiul experimental efectuat de Sakin O. și coaut. (2019) a scos în evidență faptul că NO $\cdot$  este un vasodilatator puternic, având un rol important în afectarea tisulară ovariană condiționată de I/R. Aceștia au concluzionat că protecția mediată de NO $\cdot$  este datorată acțiunii GMPc, deoarece utilizând inhibitori ai fosfodiesterazei-5 (PDE-5), enzimă care catabolizează GMPc, au observat reducerea leziunilor provocate de ischemie/reperfuzie în ovare. O creștere a nivelului de GMPc asigură o relaxare musculară treptată și o majorare a fluxului sangvin spre țesut [232]. Rezultate similare au înregistrat și Şahin Ç. și coaut. (2020). Ei au raportat faptul că inhibitorii de PDE-5 facilitează acumularea de GMPc în celule. Această creștere de GMPc, pe lângă efectul vasodilatator, ar atenua peroxidarea lipidelor și ar reduce activitatea NADPH oxidazei, una dintre principalele surse SRO în condiții de stres oxidativ [219]. Deci, protecția mediată de NO $\cdot$  este strâns legată de nivelul de GMPc intracelular, iar o reducere a cantității acestui mesager secund ar favoriza amplificarea leziunilor.

În literatura științifică sunt date care indică faptul că micșorarea cantității de glutatation în celulele endoteliale duce la o descreștere a sintezei NO $\cdot$ , iar acest efect este, probabil, legat de o reducere nespecifică a capacității redox a celulelor [77]. Supraîncărcarea celulelor cu SRO duce la o scădere a biodisponibilității oxidului nitric care este implicat în producerea de peroxinitrit, despre care se cunoaște că lezează sever celulele. Scăderea disponibilității NO $\cdot$  duce la o redistribuire a circulației în perioada de reperfuzie, cunoscut ca „fenomen non-reflux”, care conduce la deteriorarea țesuturilor [143].

Similar cu unele date din literatura de specialitate [233] și în cercetarea noastră ischemia a redus cantitatea DNO atât în ser, cât și în omogenat. Kobayashi J. și coaut. (2018) au indicat faptul că nivelurile de nitriți ai țesuturilor scad după o ischemie persistentă în ficat, inimă și mușchii scheletului, indicând epuizarea nitritului în timpul ischemiei. Nitritul din țesut servește ca un rezervor și donator de NO $\cdot$  în condiții de hipoxie și acidoză, care are un rol important în protejarea celulelor și țesuturilor în timpul întreruperii circulației sangvine, inducând vasodilatația, reducând

consumul de oxigen prin inhibarea complexelor mitocondriale I, IV și V, deschizând canale de  $K^+$  dependente de ATP, prevenind eliberarea citocromului c și blocând deschiderea mPTP. Există studii care au demonstrat că nitritul administrat oral, intraperitoneal sau intravenos atenuază leziunile induse de I/R asupra inimii, creierului, rinichilor și ficatului. Acest lucru sugerează faptul că nitriții endogeni conferă toleranță la ischemie. Prin urmare, administrarea profilactică de nitriți poate fi eficientă în protejarea țesuturilor de I/R [233]. Concomitent, putem presupune că rezistența ovarelor la ischemie ar putea fi datorată capacității acestora de a utiliza eficient DNO, așa cum am observat că aceștia sunt consumați după manevra de torsionare, cantitatea lor scăzând semnificativ în omogenat comparativ cu lotul martor.

Kobayashi J. și coaut. (2018) susțin faptul că nitritul protejează țesuturile hipoxice împotriva leziunilor de reperfuzie, limitând generarea de SRO prin S-nitrozilarea subunității ND3 a complexului I, care devine susceptibilă la această modificare numai în timpul ischemiei [233].

Totuși, nu toate studiile raportează diminuarea DNO în condițiile unei torsiuni ovariene. Ergun Y. și coaut. (2010) au constatat majorarea DNO în lotul cu animale expus doar torsiunii ovariene atât în ser, cât și în țesut comparativ cu lotul de animale fără TO [234]. Acest fapt poate fi datorat diferențelor ce există între cercetarea noastră și cea a lui Ergun Y. și coaut. (2010) legate de procedura de torsionare. În cercetarea noastră ischemia ovariană a fost provocată prin răsucirea anexei de 3 ori în direcția acelor de ceasornic, ceea ce constituie aproximativ  $1080^\circ$ , pe când în cealaltă lucrare este menționat că rotirea anexei a fost realizată la  $360^\circ$ . Shalev J. și coaut. (2001) au arătat prin măsurări ale fluxului sangvin la Doppler că acest grad de torsionare nu este însoțit de întreruperea definitivă a fluxului sangvin [235]. Deci, o torsionare de  $360^\circ$  nu ar opri alimentarea cu oxigen a țesutului. În aceste condiții, enzima NOS, dispunând de oxigen, va produce oxid nitric, concomitent crescând și DNO.

O explicație a creșterii cantității DNO în serul sangvin și omogenatul ovarian constatată după 1 oră de reperfuzie atât simplă, cât și controlată comparativ cu lotul de animale expuse doar ischemiei ovariene din cercetarea noastră ar putea fi că nitric oxid sintazele își intensifică activitatea. Unii cercetători presupun că un rol important în acest proces îl are fenomenul de vasoconstricție, indus de o intensificare a activității sistemului nervos simpatic după procedura de torsiune/detorsiune, cu o reducere a fluxului sangvin spre țesuturi și organe. Această ipoteză a fost postulată de Tuncer A.A. și coaut. (2016), care în felul acesta au argumentat creșterea cantității de nitric oxid sintază (NOS) în ovarul contralateral celui expus torsiunii/detorsiunii ovariene [15]. Astfel, după restabilirea fluxului sangvin spre ovare se asigură și necesarul de oxigen pentru enzima NOS care va genera oxid nitric, crescând concomitent și cantitatea substanțelor derivate din acest radical liber.

În studiul nostru observăm majorarea DNO în omogenatul ovarian mai exprimat la distanță (după 24 ore) decât în perioada inițială (după 1 oră) de la restabilirea fluxului sangvin. Rezultate similare au fost înregistrate de Beyazit F. și coaut. (2018), care au raportat creșteri ale DNO în țesutul ovarian după aplicarea torsiunii ovariene pentru 3 ore și detorsiunii pentru 6 ore comparativ cu lotul de animale fără torsiune [236]. Alte cercetări au arătat că și o perioadă de reperfuzie de 3 ore a fost suficientă pentru a induce producerea statistic semnificativă a DNO în țesutul ovarian [237]. Este foarte probabil ca în perioada inițială de revascularizare  $\text{NO}\cdot$  să fie consumat pentru producerea de peroxinitrit și intensificarea leziunilor oxidative, iar odată cu trecerea timpului să diminueze producerea de anion superoxid, respectiv cu micșorarea cantității de peroxinitrit, astfel încât  $\text{NO}\cdot$  să fie transformat în DNO, a căror cantitate va crește.

Noi am constatat faptul că după 1 oră de la restabilirea fluxului sangvin atât în tipul simplu, cât și controlat de reperfuzie cantitatea DNO în omogenat s-a modificat statistic ne semnificativ comparativ cu lotul martor, presupunând că în prima fază a reperfuziei  $\text{NO}\cdot$  ar fi preponderent implicat în generarea de peroxinitrit, așa cum restabilirea circulației sangvine este însoțită și de intensificarea producerii de anion superoxid.

Unii cercetători postulează faptul că PcI atenuază efectele I/R prin reintroducerea treptată a oxigenului în țesuturile ischemice și prin diluarea metaboliților toxici. Cu toate acestea, s-a descoperit că PcI activează calea RISK, cunoscută ca și calea kinazei de salvare a leziunilor de reperfuzie, care implică și semnalizarea mediată de  $\text{NO}\cdot$ . Acest lucru a fost verificat prin studii de inhibare farmacologică a componentelor căii RISK și prin măsurarea nivelurilor, și activităților enzimatică ale nitric oxid sintazei endoteliale, și nitric oxid sintazei inductibile [233]. A fost demonstrat în cercetări pe animale că oxidul nitric endogen produs de nitric oxid sintaza endotelială este implicat în postcondiționarea ischemică. Inhibarea farmacologică a activității nitric oxid sintazei endoteliale a redus considerabil efectele protectoare ale postcondiționării. În schimb, multe studii au demonstrat efectele citoprotectoare ale administrării unui donator de oxid nitric în primele minute de reperfuzie, deși acest efect al donatorilor de oxid nitric nu este observat în mod constant. Se știe că oxidul nitric activează guanilat ciclaza care duce la generarea de GMPc și la activarea ulterioară a protein kinazei dependente de GMPc (PKG) [237], care, probabil asigură protecția la aplicarea reperfuziei controlate prin întârzierea normalizării pH-ului celular datorită inhibării PKG-dependente a pompei  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  [239]. Inerte J. și coaut. (2013) au demonstrat că postcondiționarea ischemică și creșterea semnalizării GMPc/PKG dependentă de  $\text{NO}\cdot$  se datorează și formării unor cantități reduse de anion superoxid la debutul reperfuziei, cu diminuarea oxidării tetrahidrobiopterinei, cofactor necesar pentru activitatea enzimei NOS, ceea ce reduce decuplarea NOS și crește disponibilitatea  $\text{NO}\cdot$  [239].

Astfel,  $\text{NO}^\cdot$  poate avea un rol dual în afecțiuni caracterizate prin I/R, iar efectele sale ar putea fi dependente atât de concentrația acestuia, cât și a altor radicali. În condițiile în care sunt produse cantități mari de anioni superoxid cu depășirea capacităților enzimelor antioxidante din prima linie de a asigura o protecția eficientă,  $\text{NO}^\cdot$  ar avea un potențial lezional sporit datorită implicării în formarea de peroxinitrit. Putem presupune că o funcționare adecvată a enzimelor antioxidante cu neutralizarea radicalului superoxid ar avea efecte benefice evidente prin asigurarea unei biodisponibilități adecvate a  $\text{NO}^\cdot$ , care ar putea fi implicat în asigurarea protecției celulare și tisulare, inclusiv în momentul reperfuziei. Deci, una dintre strategiile terapeutice care ar trebui dezvoltate în viitor ar trebui orientate spre reducerea nivelului de anion superoxid. Un nivel scăzut al acestui radical ar însemna și o cantitate mai mică de peroxinitrit care se generează, respectiv cu diminuarea injuriilor țesuturilor.

Leziunea cauzată de ischemie/reperfuzie este cunoscută ca fenomenul în timpul căruia are loc deteriorarea celulelor unui organ cauzată de hipoxie, care este paradoxal exacerbată după restabilirea aprovizionării cu oxigen. Acest proces este unul dinamic care implică două faze interdependente, și anume, afectarea ischemică locală și leziunea de reperfuzie mediată de inflamație. Acest concept a fost demonstrat în mai multe sisteme și organe, cum ar fi sistemul nervos central, ficatul, inima, plămânul, intestinul, mușchiul scheletic și rinichii [227].

**PPOA**-urile sunt o familie de compuși proteici oxidați, care sunt formați prin reacția proteinelor plasmatică cu oxidanți clorurați. *In vivo*, generarea de oxidanți clorurați este o caracteristică a celulelor fagocitare care posedă mieloperoxidază, singura enzimă care este capabilă să producă un oxidant de acest tip [115].

În cercetarea noastră nu au fost stabilite diferențe statistic semnificative între cantitățile de PPOA obținute în loturile martor și control atât în omogenat, cât și în ser,  $p > 0,05$  (figura 13).

Torsiunea ovariană a indus intensificarea producerii de PPOA în țesut cu aproximativ 26% (de la  $5,695 \pm 0,246 \mu\text{mol/g.prot.}$  până la  $7,183 \pm 0,495 \mu\text{mol/g.prot.}$ ,  $p > 0,05$ ) comparativ cu lotul martor. Reperfuzia atât simplă, cât și controlată a amplificat sinteza de PPOA, astfel că în omogenat au fost înregistrate majorări cu aproape 66% în lotul cu 1 oră reperfuzie simplă (de la  $5,695 \pm 0,246 \mu\text{mol/g.prot.}$  până la  $9,434 \pm 0,236 \mu\text{mol/g.prot.}$ ,  $p < 0,001$ ), 48% în lotul cu 1 oră reperfuzie controlată (de la  $5,695 \pm 0,246 \mu\text{mol/g.prot.}$  până la  $8,401 \pm 0,407 \mu\text{mol/g.prot.}$ ,  $p = 0,001$ ), 70% în lotul cu 24 ore reperfuzie simplă (de la  $5,695 \pm 0,246 \mu\text{mol/g.prot.}$  până la  $9,660 \pm 0,125 \mu\text{mol/g.prot.}$ ,  $p < 0,001$ ), 69% în lotul cu 24 ore reperfuzie controlată (de la  $5,695 \pm 0,246 \mu\text{mol/g.prot.}$  până la  $9,617 \pm 0,130 \mu\text{mol/g.prot.}$ ,  $p < 0,001$ ) comparativ cu lotul martor (figura 13). Astfel, se observă că reperfuzia *on-off* nu a prevenit creșterea PPOA în omogenatul ovarian.

Comparativ cu lotul cu ischemie ovariană s-a atestat o majorare a PPOA în țesut cu aproximativ 31% în lotul cu 1 oră reperfuzie simplă (de la  $7,183 \pm 0,495 \mu\text{mol/g.prot.}$  până la

9,434±0,236 μmol/g.prot., p=0,016), 17% în lotul cu 1 oră reperfuzie *on-off* (de la 7,183±0,495 μmol/g.prot. până la 8,401±0,407 μmol/g.prot., p>0,05) și, respectiv cu 34% în loturile cu 24 ore reperfuzie atât simplă (de la 7,183±0,495 μmol/g.prot. până la 9,660±0,125 μmol/g.prot., p=0,008), cât și controlată (de la 7,183±0,495 μmol/g.prot. până la 9,617±0,130 μmol/g.prot., p=0,009).

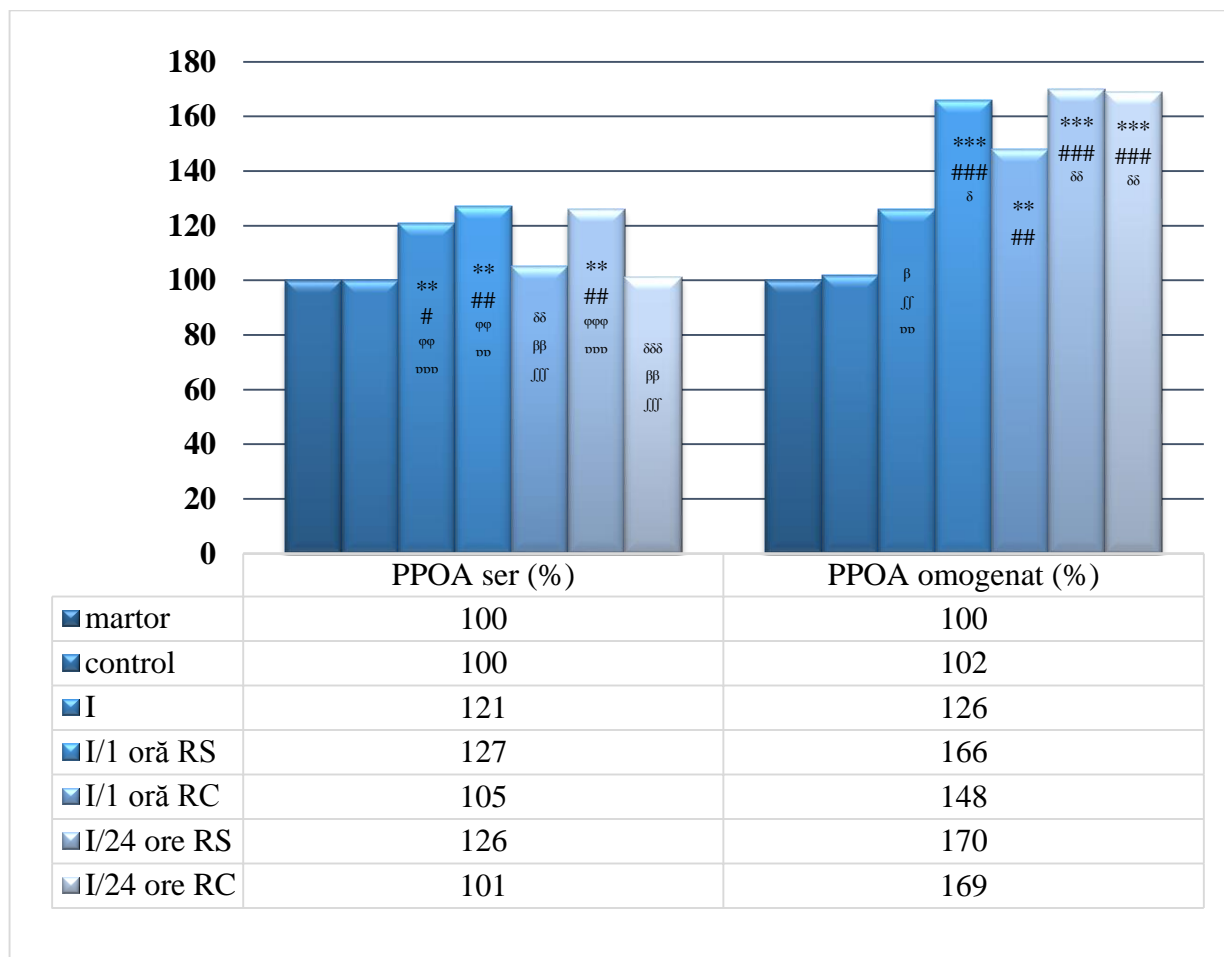


Figura 13. **Produșii proteici de oxidare avansată din serul sangvin și omogenatul ovarian în torsiunea/detorsiunea ovariană experimentală**

Notă: I – ischemie; RS – reperfuzie simplă; RC – reperfuzie controlată (*on-off*); PPOA – produșii proteici de oxidare avansată. Diferență statistic semnificativă comparativ cu:

- lotul martor: \* – p<0,05; \*\* – p<0,01; \*\*\* – p<0,001;
- lotul control: # – p<0,05; ## – p<0,01; ### – p<0,001;
- lotul ischemie: δ – p<0,05; δδ – p<0,01; δδδ – p<0,001;
- lotul ischemie/1 oră reperfuzie simplă: β – p<0,05; ββ – p<0,01; βββ – p<0,001;
- lotul ischemie/1 oră reperfuzie controlată: φ – p<0,05; φφ – p<0,01; φφφ – p<0,001;
- lotul ischemie/24 ore reperfuzie simplă: ∫ – p<0,05; ∫∫ – p<0,01; ∫∫∫ – p<0,001;
- lotul ischemie/24 ore reperfuzie controlată: ∪ – p<0,05; ∪∪ – p<0,01; ∪∪∪ – p<0,001.

Torsiunea ovariană a crescut cantitatea de PPOA în serul sangvin cu peste 20% (de la 26,415±1,028 μmol/L până la 31,885±0,734 μmol/L, p=0,007) comparativ cu lotul martor. Evaluarea atât după 1 oră, cât și după 24 ore a reperfuziei simple a arătat o sporire a sintezei PPOA în ser cu aproape 27% (de la 26,415±1,028 μmol/L până la 33,412±1,092 μmol/L, p=0,003),

respectiv 26% (de la  $26,415 \pm 1,028$   $\mu\text{mol/L}$  până la  $33,234 \pm 0,598$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $p=0,001$ ) comparativ cu lotul martor. Reperfuzia *on-off* nu a determinat majorări statistic semnificative ale PPOA în serul sangvin comparativ cu lotul martor,  $p>0,05$  (figura 13).

Comparativ cu lotul cu ischemie ovariană în loturile cu reperfuzie simplă s-au consemnat valori mai mari ale PPOA în ser cu doar 4% (de la  $31,885 \pm 0,734$   $\mu\text{mol/L}$  până la  $33,412 \pm 1,092$   $\mu\text{mol/L}$  după 1 oră,  $p>0,05$ , respectiv până la  $33,234 \pm 0,598$   $\mu\text{mol/L}$  după 24 ore de reperfuzie,  $p>0,05$ ).

În loturile cu reperfuzie controlată s-a înregistrat o reducere statistic semnificativă a cantității de PPOA în ser comparativ cu lotul expus doar ischemiei ovariene cu aproape 13% după 1 oră, respectiv cu 17% după 24 ore (de la  $31,885 \pm 0,734$   $\mu\text{mol/L}$  până la  $27,824 \pm 0,495$   $\mu\text{mol/L}$  după 1 oră,  $p=0,005$ , respectiv până la  $26,580 \pm 0,569$   $\mu\text{mol/L}$  după 24 ore,  $p<0,001$ ).

În loturile cu reperfuzie controlată comparativ cu loturile cu reperfuzie simplă au fost notate valori statistic semnificativ mai mici de PPOA în serul sangvin cu aproape 17% după 1 oră (de la  $33,412 \pm 1,092$   $\mu\text{mol/L}$  în lotul cu 1 oră reperfuzie simplă până la  $27,824 \pm 0,495$   $\mu\text{mol/L}$  în lotul cu 1 oră reperfuzie controlată,  $p=0,007$ ), respectiv cu 20% mai mici după 24 ore (de la  $33,234 \pm 0,598$   $\mu\text{mol/L}$  în lotul cu 24 ore reperfuzie simplă până la  $26,580 \pm 0,569$   $\mu\text{mol/L}$  în lotul cu 24 ore reperfuzie controlată,  $p<0,001$ ).

A fost identificată o corelație puternic negativă ( $r_s=-0,770$ ,  $p=0,009$ ) între cantitatea de PPOA din serul sangvin și omogenatul ovarian doar în lotul cu ischemie/24 ore reperfuzie controlată (tabelul A2.1).

Se cunoaște că leziuni noi apar în timpul reoxigenării din cauza amplificării sintezei SRO de către celulele epiteliale, endoteliale, trombocite, cât și de către leucocitele activate care ajung în zona afectată [140]. Ozlem K. și coaut. (2018) precizează faptul că în torsionarea ovariană neutrofilele vor infiltra organul și vor intensifica sinteza de SRO [43], printre care și SRO clorurate, cu majorarea ulterioară a PPOA.

Melekoglu R. și coaut. (2018), studiind parametrii histopatologici în ischemia/reperfuzia ovariană, au confirmat infiltrarea cu leucocite polimorfonucleare a țesutului ovarian supus procedurii I/R [165]. Celik Kavak E. și coaut. (2018) în cercetarea lor au arătat o creștere statistic semnificativă a numărului de celule inflamatorii în ovarele supuse I/R comparativ atât cu lotul de animale fără TO, cât și cu lotul de animale expuse doar TO pentru 3 ore [27]. Astfel, un eveniment important după detorsionare, pe lângă faptul că se asigură restabilirea fluxului sangvin, esențială pentru a preveni necroza, este faptul că se predispon ovarele unui proces inflamator, care poate agrava leziunile deja existente, cauzate doar de ischemie.

Se cunoaște faptul că ischemia induce modificări tisulare care odată cu reperfuzia face organul să fie mai susceptibil la inflamație. Astfel, după reperfuzie, neutrofilele acumulate duc la



eliberarea de SRO, respectiv la stres oxidativ [28]. Activitatea crescută a leucocitelor polimorfonucleare, care ajung în număr mare în regiunea ischemică, are un rol important în deteriorarea celulară postreperfuzie [46].

Sunt date care indică faptul că gradul de leziune postreperfuzie a fost asociat cu gradul de activare a neutrofilelor și infiltrarea de către acestea a țesuturilor [46].

Studiile *in vitro* au arătat că o sursă de PPOA poate fi expunerea albuminei la acidul hipocloros, iar formarea PPOA fiind corelată cu concentrația de oxidant clorurat adăugat, ceea ce a și dus la concluzia că PPOA-urile rezultă din interacțiunea dintre oxidanți și proteinele plasmatică [115]. Totuși, modificările structurale ale albuminei pot duce la formarea atât de PPOA, cât și de AIM. Cercetătorii evidențiază faptul că PPOA sunt generate prin mecanism proinflamator, pe când AIM sunt mai degrabă un produs final al stresului oxidativ [118].

Valori de referință ale PPOA pentru subiectul sănătos nu sunt disponibile în literatură [114].

Au fost remarcate mai multe enzime care sunt implicate în procesul patologic, printre care este și MPO. Aceasta generează oxidanți clorurați, care interacționează cu proteinele, modificându-le structura și transformându-le în PPOA [111]. În literatură este precizat faptul că neutrofilele produc leziuni tisulare însoțite de inflamație, care sunt legate de un nivel înalt al MPO, iar o intervenție care ar asigura o inhibare a producerii enzimei de către PNL ar reduce semnificativ prejudiciile determinate de I/R [46].

Importanța utilizării anumitor substanțe cu efect antiinflamator cu scopul diminuării leziunilor I/R ovariene este reflectată în mai multe cercetări. Astfel, Osmanağaoğlu M.A. și coaut. (2012) au raportat diminuarea infiltrării ovarelor cu celule proinflamatoare și reducerea leziunilor oxidative după administrarea metilprednisolonului [29], iar Kumbasar S. și coaut. (2016) au demonstrat că metamizolul sodic poate diminua afectarea postreperfuzie a ovarelor [46].

Majorarea atât a expresiei genice, cât și a activității MPO în torsiunea ovariană a fost confirmată de studiul efectuat de Kumbasar S. și coaut. (2016), care, concomitent, a observat și o creștere a PNL în țesutul ovarian al șobolanilor expuși fenomenului I/R comparativ cu lotul de animale sănătoase [46]. O intensificare a activității MPO și o majorare a PNL în țesutul ovarian supus I/R au fost identificate și în lucrarea publicată de Cadirci E. și coaut. (2010) [240]. Aceleași constatări au fost făcute și de Yapca O.E. și coaut. (2014), arătând că activitatea MPO sporește mai mult în țesutul ovarian expus I/R comparativ cu țesutul sănătos [24]. Concomitent, Ersoy G.S. și coaut. (2016) au scos în evidență faptul că și după 24 ore de la restabilirea fluxului sangvin spre un ovar ischemizat pentru 3 ore, activitatea MPO în țesut se menține înaltă semnificativ comparativ cu lotul de animale fără torsiune ovariană [241]. Datele publicate de Sapmaz-Metin și coaut. (2013) au arătat intensificarea activității MPO și în serul animalelor expuse torsiunii ovariene, cu

o continuă majorare la aplicarea detorsiunii pentru o perioadă de 24 ore. Totuși, diferențele înregistrate între loturile experimentale au fost statistic ne semnificative [242].

Deci, MPO prin acțiunea sa este capabilă să genereze SRO care, în același timp, vor mări și nivelul de PPOA [111] chiar și după 24 ore de la înlăturarea torsiunii.

În cercetarea noastră, odată cu inducerea ischemiei ovariene a crescut cantitatea de PPOA atât în ser, cu aproximativ 21%, cât și în omogenat, cu aproape 26% (figura 13), rezultatele noastre fiind în concordanță cu datele din literatura de specialitate, Uyanikoglu H. și coaut. (2018) stabilind nivelurile serice de PPOA mai mari la pacientele cu torsiune ovariană comparativ cu lotul de femei sănătoase [192]. Această majorare serică a PPOA susține faptul că torsiunea ovariană este însoțită de acumularea de neutrofile, intensificarea activității MPO, eliberare de oxidanți clorurați și inflamație. Aceasta explică de ce în anumite cercetări experimentale au fost consemnate rezultate favorabile în urma administrării de substanțe cu efect antiinflamator în lotul de animale supuse torsiunii ovariene comparativ cu alte loturi de animale cu torsiune, dar care nu au primit tratament medicamentos, autorii constatând o reducere a infiltrării organului cu PNL, respectiv și a semnelor histologice ale inflamației [29, 46].

În studiul nostru am înregistrat cantități mai mici cu aproape 20% ( $p < 0,01$ ) de PPOA în ser în loturile cu reperfuzie controlată comparativ cu loturile cu reperfuzie simplă, ceea ce sugerează o diminuare a producerii de oxidanți clorurați la aplicarea manevrei *on-off*, aceasta, posibil, fiind determinată de implicarea unui număr mai mic de neutrofile în procesul patologic.

În literatura de specialitate, pe lângă faptul că PPOA sunt prezentate ca structuri proteice modificate în rezultatul intensificării stresului oxidativ, cu participarea PNL, mai sunt descrise și ca niște compuși ce au acțiuni negative directe, amplificând răspunsul inflamator [111, 221]. Referitor la acest aspect, Piwowar A. (2010) precizează că PPOA deja formate pot interacționa cu neutrofilele prin intermediul unor receptori specifici, cunoscuți ca RAGE. Aceasta va amplifica activitatea MPO și NADPH oxidazei, care vor majora SRO, iar prin acțiunea MPO și concentrația de acid hipocloros produs, astfel accelerându-se transformarea proteinelor în PPOA cu creșterea cantității acestor produși [111].

Un nivel seric mai mic al PPOA în loturile *on-off* comparativ cu loturile cu reperfuzie simplă indică faptul că s-ar putea de prevenit prin reperfuzia controlată atât apariția leziunilor suplimentare ale ovarelor, cât și afectarea altor organe și țesuturi situate la distanță de ovarul afectat prin limitarea activării neutrofilelor prin mecanism PPOA-RAGE-dependent. Prin urmare, este foarte probabil că aplicarea tehnicii *on-off* în managementul torsiunii ovariene să aibă un efect protector asupra organelor și țesuturilor, reducând producerea de oxidanți clorurați și intensitatea reacțiilor inflamatoare în care sunt implicate PPOA [221].

După 1 oră de reperfuzie controlată cantitatea de PPOA în omogenatul ovarian a fost mai mică comparativ cu cea măsurată după 24 ore de la restabilirea fluxului sangvin, acesta fiind un indiciu al faptului că manevra *on-off* ar avea o acțiune protectoare în perioada inițială (după 1 oră). Așa cum după 24 ore de la detorsionare nu se observă diferențe statistic semnificative între valorile PPOA din cele două loturi experimentale, una dintre concluzii este că singură, procedura *on-off*, nu este capabilă să preîntâmpine întru totul exacerbarea leziunilor oxidative [221], posibil, impunându-se în acest caz și administrarea concomitentă de substanțe cu proprietăți antioxidante sau antiinflamatoare, așa cum în mai multe cercetări experimentale s-au arătat efecte benefice în urma utilizării lor [29, 45, 46, 48, 242-244].

Așa cum a fost stabilit de Piwowar A. (2010), PPOA pot genera un răspuns inflamator, interacționând cu receptorii RAGE [111] despre care se știe că se află și pe membranele celulelor ovariene [245]. Astfel, cantitățile înalte de PPOA care au fost măsurate după 24 ore de reperfuzie în țesutul ovarian pot fi datorate unei intensificări a răspunsului inflamator din cauza interacțiunii PPOA, deja formate, cu RAGE în perioada inițială de după detorsionare (după 1 oră). Deci, s-ar putea presupune existența unui cerc vicios în care majorarea PPOA stimulează producerea altor PPOA în țesut, care vor fi ulterior identificate după 24 ore de la detorsionarea ovarelor [221].

În literatura de specialitate sunt date care menționează faptul că nivelul proteinelor oxidate reflectă echilibrul dintre rata de oxidare a proteinelor și rata de degradare a acestor molecule oxidate. Acest echilibru este determinat de numeroși factori printre care sunt cei care duc la formarea de SRO, pe de o parte, și cei legați de cantitatea și/sau activitatea proteazelor care degradează proteinele modificate oxidativ [107]. Deci, menținerea cantităților crescute de PPOA și AIM după 24 de ore de reperfuzie în cele 2 loturi care au fost evaluate la distanță ar putea fi datorată și vitezei diferite de degradare, în condițiile în care proteazele sunt de natură proteică, astfel încât sunt susceptibile și ele la deteriorare în momentul în care sunt expuse stresului oxidativ.

Deoarece rezultatele înregistrate nu au arătat corelații între cantitatea de PPOA din serul sangvin și omogenat decât în lotul cu 24 ore reperfuzie controlată, schimbările care au loc în țesut în torsiunea ovariană nu pot fi apreciate în baza nivelului de PPOA din ser, așa cum o descreștere a PPOA în ser nu a fost însoțită de o diminuare similară în țesut [221].

Datorită faptului că nivelul de PPOA a fost mai mare în loturile cu reperfuzie simplă comparativ cu loturile cu reperfuzie controlată, putem considera că manevra *on-off*, aplicată în tratamentul torsiunii ovariene, ar putea reduce producerea de SRO, astfel preîntâmpinând leziunile suplimentare datorate restabilirii fluxului sangvin [221].

Nu au fost înregistrate diferențe statistic semnificative între cantitățile de AGE obținute în loturile martor și control atât în ser, cât și în omogenat,  $p > 0,05$  (tabelul 3).

Tabelul 3. Efectul torsiunii/detorsiunii ovariene asupra cantității produșilor finali de glicare avansată din serul sangvin și omogenatul ovarian

Loturi de studiu	AGE	
	ser, $\mu\text{g/L}$	omogenat, $\mu\text{g/g.prot.}$
Martor	224,913 $\pm$ 6,490 (100%)	37,930 $\pm$ 0,882 (100%)
Control	225,262 $\pm$ 4,143 (100%)	38,580 $\pm$ 0,596 (103%)
Ischemie	231,387 $\pm$ 3,563 (103%) $\beta\beta\beta$ $\varphi\varphi\varphi$ $\text{J}$ $\text{vdd}$	45,056 $\pm$ 1,707 (119%) * # $\beta\beta\beta$ $\text{J}$ $\text{vdd}$
Ischemie/1 oră reperfuzie simplă	346,757 $\pm$ 1,009 (154%) *** ### $\delta\delta\delta$ $\varphi\varphi$ $\text{J}$ $\text{vdd}$	68,142 $\pm$ 1,114 (180%) *** ### $\delta\delta\delta$ $\text{vdd}$
Ischemie/1 oră reperfuzie controlată ( <i>on-off</i> )	328,763 $\pm$ 3,299 (146%) *** ### $\delta\delta\delta$ $\beta\beta$ $\text{J}$ $\text{vdd}$	46,917 $\pm$ 5,896 (124%) $\text{J}$
Ischemie/24 ore reperfuzie simplă	363,473 $\pm$ 3,754 (162%) *** ### $\delta\delta\delta$ $\beta\beta$ $\varphi\varphi\varphi$ $\text{vdd}$	74,175 $\pm$ 1,463 (196%) *** ### $\delta\delta\delta$ $\varphi$ $\text{vdd}$
Ischemie/24 ore reperfuzie controlată ( <i>on-off</i> )	307,913 $\pm$ 1,415 (137%) *** ### $\delta\delta\delta$ $\beta\beta\beta$ $\varphi\varphi$ $\text{J}$	56,356 $\pm$ 1,454 (149%) *** ### $\delta\delta$ $\beta\beta\beta$ $\text{J}$

Notă: AGE – produși finali de glicare avansată. Diferență statistic semnificativă comparativ cu:

- lotul martor: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ ;
- lotul control: # –  $p < 0,05$ ; ## –  $p < 0,01$ ; ### –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie:  $\delta$  –  $p < 0,05$ ;  $\delta\delta$  –  $p < 0,01$ ;  $\delta\delta\delta$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/1 oră reperfuzie simplă:  $\beta$  –  $p < 0,05$ ;  $\beta\beta$  –  $p < 0,01$ ;  $\beta\beta\beta$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/1 oră reperfuzie controlată:  $\varphi$  –  $p < 0,05$ ;  $\varphi\varphi$  –  $p < 0,01$ ;  $\varphi\varphi\varphi$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/24 ore reperfuzie simplă:  $\text{J}$  –  $p < 0,05$ ;  $\text{J}$  –  $p < 0,01$ ;  $\text{J}$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/24 ore reperfuzie controlată:  $\text{v}$  –  $p < 0,05$ ;  $\text{vdd}$  –  $p < 0,01$ ;  $\text{vdd}$  –  $p < 0,001$ .

Torsiunea ovariană a amplificat formarea de AGE în omogenat cu circa 19% comparativ cu lotul martor,  $p=0,031$ . Reperfuzia simplă s-a remarcat ca un factor ce induce producerea de AGE, care s-au majorat cu aproape 80% în lotul cu 1 oră reperfuzie, respectiv cu aproximativ 96% în lotul cu 24 ore reperfuzie comparativ cu lotul martor,  $p < 0,001$  (tabelul 3).

La aplicarea manevrei *on-off* AGE au manifestat o tendință de creștere în țesutul ovarian cu aproape 24%,  $p > 0,05$ , în lotul cu 1 oră reperfuzie și s-au majorat semnificativ cu aproximativ 49%,  $p < 0,001$ , în lotul cu 24 ore reperfuzie comparativ cu lotul martor. Reperfuzia s-a evidențiat prin intensificarea generării de AGE în țesutul ovarian, fenomenul fiind mai pronunțat în tipul simplu decât în cel controlat, fapt confirmat de creșterile observate cu 80% vs. 24% după 1 oră, diferența între loturi fiind, însă, statistic nesemnificativă,  $p > 0,05$ , și, respectiv 96% vs. 49% după 24 ore,  $p < 0,001$  (tabelul 3).

Ischemia ovarelor a mărit nesemnificativ producerea de AGE cu o augmentare a cantităților acestora în ser cu aproape 3% comparativ cu lotul martor,  $p > 0,05$ . Reperfuzia a avut un efect mai exprimat, înregistrându-se majorări semnificative. Astfel, AGE au crescut în ser cu aproximativ 54% în lotul cu 1 oră reperfuzie simplă, 46% în lotul cu 1 oră reperfuzie *on-off*, 62% în lotul cu 24

ore reperfuzie simplă și 37% în lotul cu 24 ore reperfuzie *on-off* comparativ cu lotul martor,  $p < 0,001$ . În același timp, s-a observat că sporirea cantităților de AGE în loturile cu reperfuzie simplă a fost mai pronunțată comparativ cu cele cu reperfuzie controlată, după cum urmează: 54% vs. 46% după 1 oră, diferența atestată între loturi fiind statistic semnificativă ( $p = 0,004$ ), respectiv 62% vs. 37% după 24 ore ( $p < 0,001$ ) (tabelul 3).

Comparativ cu lotul expus doar ischemiei ovariene după reperfuzie au fost consemnate creșteri ale AGE în ser cu aproape 50% în lotul cu 1 oră reperfuzie simplă (de la  $231,387 \pm 3,563$   $\mu\text{g/L}$  până la  $346,757 \pm 1,009$   $\mu\text{g/L}$ ,  $p < 0,001$ ), 42% în lotul cu 1 oră reperfuzie controlată (de la  $231,387 \pm 3,563$   $\mu\text{g/L}$  până la  $328,763 \pm 3,299$   $\mu\text{g/L}$ ,  $p < 0,001$ ), 57% în lotul cu 24 ore reperfuzie simplă (de la  $231,387 \pm 3,563$   $\mu\text{g/L}$  până la  $363,473 \pm 3,754$   $\mu\text{g/L}$ ,  $p < 0,001$ ) și cu aproximativ 33% în lotul cu 24 ore reperfuzie controlată (de la  $231,387 \pm 3,563$   $\mu\text{g/L}$  până la  $307,913 \pm 1,415$   $\mu\text{g/L}$ ,  $p < 0,001$ ).

S-a înregistrat o corelație moderat negativă ( $r_s = -0,661$ ,  $p = 0,038$ ) între nivelul de AGE din ser și omogenat doar în lotul de control (tabelul A2.1).

AGE, numite și „glicotoxine”, sunt produse secundare ale reacției Maillard, unde gruparea carbonil a carbohidraților interacționează non-enzimatic cu lipidele sau cu gruparea amino din proteine. Concomitent, trebuie de precizat că AGE-urile pot fi formate endogen de către organism sau pot avea origine exogenă la fumători sau prin aportul unor alimente care conțin niveluri ridicate de AGE, cum ar fi produsele fast-food [246].

Una dintre constatările noastre este că ischemia ovariană a indus formarea de AGE, fapt confirmat printr-o majorare a acestui biomarker în toate loturile cu torsione ovariană atât în ser, cât și în țesut. Rezultatele noastre sunt similare cu datele din literatura de specialitate unde se raportează faptul că stresul oxidativ și hipoxia accelerează generarea de AGE [247].

Deci, maladia este însoțită de amplificarea producerii SRO, așa cum cercetările deja au demonstrat legătura dintre intensificarea stresului oxidativ și generarea de AGE în diferite patologii [109].

Detorsionarea ovarelor cu restabilirea circulației sangvine au avut ca rezultat mărirea concentrațiilor de AGE atât în ser, cât și în omogenat, ceea ce indică faptul că s-a amplificat stresul oxidativ. Concomitent, rezultatele noastre au arătat niveluri de AGE mai mari în loturile cu reperfuzie simplă comparativ cu cele cărora li s-a aplicat manevra *on-off*. Deci, procesele oxidative au fost mai puțin exprimate prin postcondiționarea ischemică ovariană care a fost aplicată în primele secunde.

În același timp, înregistrările noastre reliefează faptul că aplicarea reperfuziei controlate este benefică ovarului în etapa inițială de tratament, majorarea AGE fiind mai exprimată la distanță, după 24 ore comparativ cu datele consemnate după 1 oră. Astfel, este evident faptul că singură

tehnica *on-off* nu este capabilă să asigure o protecție deplină și de durată împotriva SO, fiind necesare și alte acțiuni terapeutice. Totuși, comparând concentrațiile de AGE din loturile evaluate la 24 ore după revascularizare, se observă o sinteză mai redusă în lotul cu reperfuzie *on-off*, ceea ce scoate în evidență avantajele metodei propuse, fără alte intervenții, chiar și la distanță.

Așa cum AGE-urile își pot exercita efectul prin două căi diferite: calea independentă de receptor, cu legarea acestora la matricea extracelulară în multe organe sau prin calea dependentă de receptor, interacționând cu receptorul RAGE de la nivelul membranelor celulare [246], o cantitate crescută a acestora în serul sanguin poate condiționa apariția unor modificări patologice, la distanță de ovarul torsionat. Odată formate, AGE-urile pot deteriora structurile celulare printr-o serie de mecanisme, inclusiv prin formarea legăturilor încrucișate cu moleculele matricei extracelulare, cât și prin interacțiunea cu receptorii de pe suprafețele celulare, modificând astfel funcția celulelor cu care interacționează [247].

Deci, o producere scăzută a acestor compuși în anumite loturi experimentale, pe lângă faptul că indică un SO mai puțin exprimat, sugerează și o stare mai bună a organismului după manipulările de detorsionare prin metoda *on-off*, fiind limitate expunerile patologice ale altor celule la cantități mari de AGE.

Nu au fost înregistrate diferențe statistic semnificative între cantitățile de **DAM** la animalele din loturile martor și control atât în ser, cât și în omogenat,  $p > 0,05$  (figura 14).

Ischemia ovariană a sporit generarea DAM, observându-se o majorare a acesteia în țesut cu aproape 23% (de la  $2,317 \pm 0,072$   $\mu\text{mol/g.prot.}$  până la  $2,839 \pm 0,062$   $\mu\text{mol/g.prot.}$ ,  $p < 0,001$ ) comparativ cu lotul martor.

În omogenat a fost evident faptul că leziunilor ischemice li se adaugă și leziunile de reperfuzie simplă. Astfel, s-a stabilit o creștere a DAM cu aproximativ 15% în lotul cu 1 oră reperfuzie simplă (de la  $2,839 \pm 0,062$   $\mu\text{mol/g.prot.}$  până la  $3,265 \pm 0,049$   $\mu\text{mol/g.prot.}$ ,  $p < 0,001$ ), menținându-se valori crescute și după 24 ore cu aproape 17% (de la  $2,839 \pm 0,062$   $\mu\text{mol/g.prot.}$  până la  $3,333 \pm 0,081$   $\mu\text{mol/g.prot.}$ ,  $p < 0,001$ ) comparativ cu lotul cu ischemie ovariană.

Atât după 1 oră, cât și după 24 ore de la restabilirea controlată a circulației sanguine nu s-a intensificat sinteza DAM în țesutul ovarian, aceasta menținându-se la nivelul celor obținute în lotul cu ischemie,  $p > 0,05$ .

Torsiunea ovariană a majorat producerea de DAM în ser, întregistrându-se o creștere a acesteia în lotul cu ischemie cu aproximativ 8% (de la  $11,763 \pm 0,161$   $\mu\text{mol/L}$  până la  $12,716 \pm 0,102$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $p < 0,001$ ) comparativ cu lotul martor. Reperfuzia simplă a amplificat sinteza DAM, sugerându-se favorizarea factorilor ce intensifică stresul oxidativ. Astfel, în ser s-au determinat creșteri cu aproape 18% în lotul cu 1 oră reperfuzie simplă (de la  $11,763 \pm 0,161$   $\mu\text{mol/L}$  până la  $13,928 \pm 0,120$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $p < 0,001$ ), 8% în lotul cu 1 oră reperfuzie *on-off* (de la  $11,763 \pm 0,161$

$\mu\text{mol/L}$  până la  $12,716 \pm 0,159 \mu\text{mol/L}$ ,  $p < 0,001$ ), 15% în lotul cu 24 ore reperfuzie simplă (de la  $11,763 \pm 0,161 \mu\text{mol/L}$  până la  $13,571 \pm 0,189 \mu\text{mol/L}$ ,  $p < 0,001$ ), cu excepția lotului cu 24 ore reperfuzie *on-off* pentru care s-a sesizat o diferență de aproximativ 2%, fără semnificație statistică (de la  $11,763 \pm 0,161 \mu\text{mol/L}$  până la  $12,001 \pm 0,094 \mu\text{mol/L}$ ,  $p > 0,05$ ) comparativ cu lotul martor (figura 14).

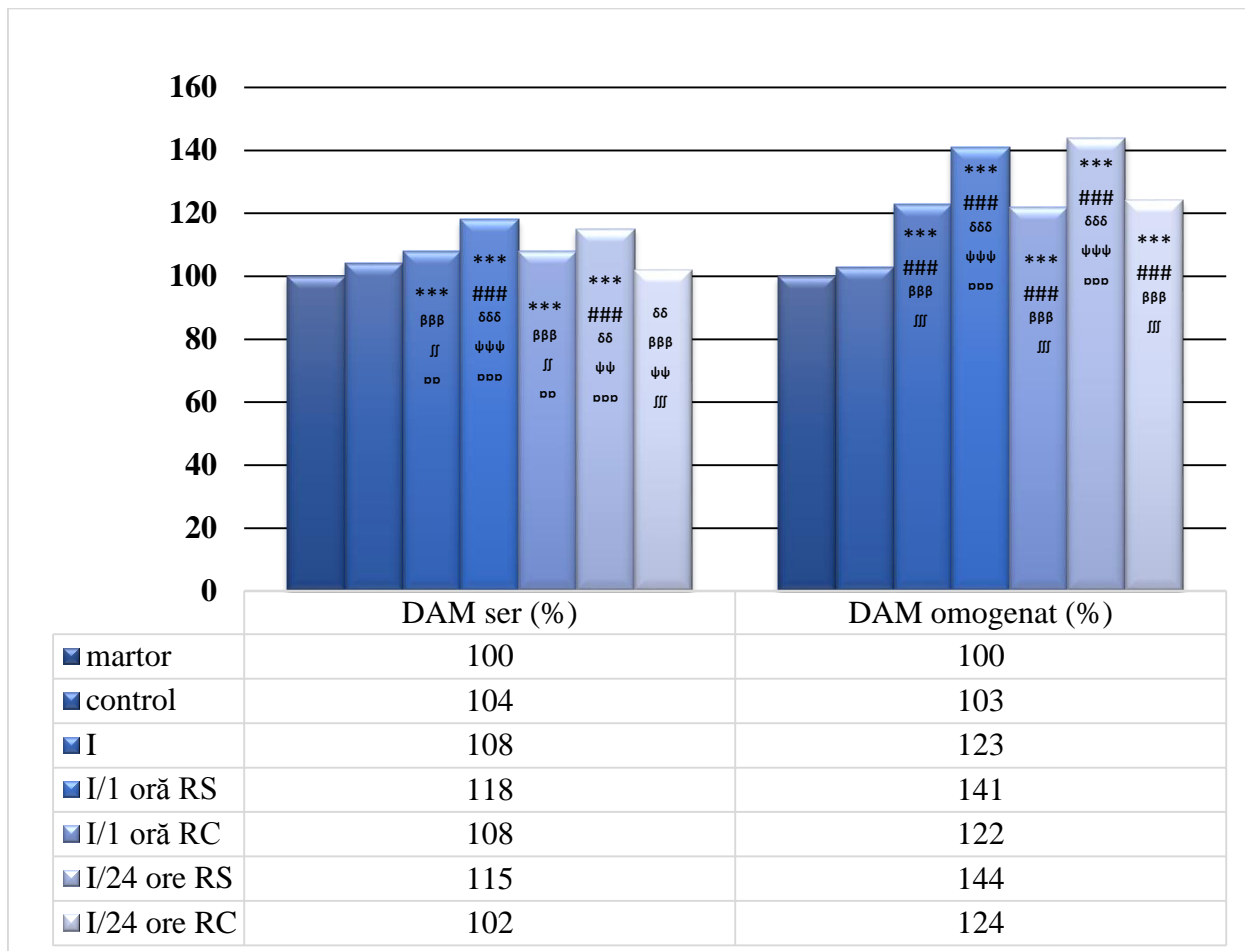


Figura 14. Cantitatea dialdehidei malonice din serul sangvin și omogenatul ovarian în torsionarea/detorsionarea ovariană experimentală

Notă: I – ischemie; RS – reperfuzie simplă; RC – reperfuzie controlată (*on-off*); DAM – dialdehida malonică. Diferență statistic semnificativă comparativ cu:

- lotul martor: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ ;
- lotul control: # –  $p < 0,05$ ; ## –  $p < 0,01$ ; ### –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie:  $\delta$  –  $p < 0,05$ ;  $\delta\delta$  –  $p < 0,01$ ;  $\delta\delta\delta$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/1 oră reperfuzie simplă:  $\beta$  –  $p < 0,05$ ;  $\beta\beta$  –  $p < 0,01$ ;  $\beta\beta\beta$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/1 oră reperfuzie controlată:  $\varphi$  –  $p < 0,05$ ;  $\varphi\varphi$  –  $p < 0,01$ ;  $\varphi\varphi\varphi$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/24 ore reperfuzie simplă:  $\jmath$  –  $p < 0,05$ ;  $\jmath\jmath$  –  $p < 0,01$ ;  $\jmath\jmath\jmath$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/24 ore reperfuzie controlată:  $\upsilon$  –  $p < 0,05$ ;  $\upsilon\upsilon$  –  $p < 0,01$ ;  $\upsilon\upsilon\upsilon$  –  $p < 0,001$ .

Comparativ cu lotul de animale care au fost expuse doar ischemiei ovariene, în serul sangvin s-a observat o majorare a DAM cu aproape 10% în lotul cu 1 oră reperfuzie simplă (de la  $12,716 \pm 0,102 \mu\text{mol/L}$  până la  $13,928 \pm 0,120 \mu\text{mol/L}$ ,  $p < 0,001$ ). După reperfuzia controlată de 1 oră nu au fost stabilite diferențe statistic semnificative comparativ cu lotul doar cu ischemie

ovariană,  $p > 0,05$ , iar după 24 ore de reperfuzie controlată valorile DAM au fost mai mici cu aproximativ 6% (de la  $12,716 \pm 0,102 \mu\text{mol/L}$  până la  $12,001 \pm 0,094 \mu\text{mol/L}$ ,  $p = 0,008$ ). În același timp, după 24 ore de reperfuzie simplă s-au înregistrat creșteri ale DAM cu aproape 7% (de la  $12,716 \pm 0,102 \mu\text{mol/L}$  până la  $13,571 \pm 0,189 \mu\text{mol/L}$ ,  $p = 0,001$ ) comparativ cu lotul cu torsione ovariană. Deci, TO a fost însoțită de creșterea concentrației DAM în ser, iar reperfuzia simplă a sporit producerea acesteia. Reperfuzia prin aplicarea manevrei *on-off* s-a arătat a fi un factor protector, fapt confirmat de cantitățile mai mici ale DAM măsurate în ser în loturile cu reperfuzie controlată comparativ cu loturile cu reperfuzie simplă, atât după 1 oră de reperfuzie,  $p < 0,001$ , cât și după 24 ore,  $p < 0,001$ , fapt susținut și prin restabilirea valorilor DAM serice specifice lotului martor la animalele experimentale cu 24 ore reperfuzie *on-off* (figura 14).

S-a determinat o corelație moderat pozitivă între nivelul DAM din ser și omogenatul ovarian în lotul cu 24 ore reperfuzie controlată ( $r_s = 0,681$ ,  $p = 0,03$ ). În celelalte loturi nu s-a identificat vreo corelație a indicelui biochimic studiat (tabelul A2.1).

Se știe că ischemia provoacă leziuni hipoxice, iar după detorsione alimentarea cu sânge poate ameliora starea ovarului. Totuși, perioada de reperfuzie duce la producerea excesivă de specii reactive de oxigen, astfel încât afectării ischemice la nivel celular i se adaugă și deteriorarea cauzată de intensificarea generării de SRO [41].

Deoarece țesutul ischemic primește o cantitate mare de oxigen molecular în timpul restabilirii circulației sangvine, leziunea ischemică acută este agravată de produsele stresului oxidativ, inclusiv de radicalii liberi și speciile reactive de oxigen. Aceste molecule provoacă peroxidarea lipidelor care afectează membranele și perturbă integritatea celulelor [15].

Radicalii liberi ai oxigenului, a căror producere crește excesiv din diverse motive, afectează lipidele din membrane care conțin acizi grași nesaturați mai mult decât alte biomolecule. Această interacțiune va duce la creșterea permeabilității membranelor și la deteriorarea severă a celulelor [24]. Lipidele membranare sunt structuri sensibile la stresul oxidativ, iar interacțiunea lor cu SRO determină creșterea produselor toxice, precum DAM [41]. Deci, concentrația crescută a DAM arată că țesuturile au fost expuse stresului oxidativ [24].

DAM este un produs final stabil al peroxidării lipidice și este, de asemenea, un indicator semnificativ al afectării țesutului dependentă de SRO [42], măsurarea acesteia în fluidele și țesuturile corpului fiind utilizată pentru a identifica prezența leziunilor oxidative [15, 22].

Se cunoaște faptul că oxidanții sunt generați în exces în timpul procesului de reoxigenare, dar producerea de SRO poate crește, de asemenea, și în hipoxia celulară, cel mai probabil prin implicarea complexelor lanțului transportator de electroni [70].



În mai multe cercetări care au inclus studierea leziunii I/R din torsiunea ovariană s-au detectat valori înalte ale DAM atât în serul sangvin [29, 43, 106, 154, 234], cât și în țesutul ovarian [13, 22, 27-29, 40, 43, 106, 165, 234, 241, 248, 249] comparativ cu lotul de animale fără torsiune.

Sunt publicații care au raportat creșteri ale DAM în țesutul ovarian torsionat. Osmanağaoğlu M.A. și coaut. (2012) au arătat că ischemia ovariană pentru o perioadă de timp mai scurtă decât cea din protocolul nostru experimental, și anume de 2 ore, este capabilă să inducă o modificare a metabolismului astfel încât să se intensifice procesul de peroxidare a lipidelor, cu o creștere a DAM atât în țesut, cât și în serul sangvin [29]. Karapinar O.S. și coaut. (2017) au consemnat faptul că o ischemie ovariană de 3 ore aproape că a dublat cantitatea de DAM în țesutul ovarian comparativ cu lotul experimental fără TO [248]. Inclusiv, Celik Kavak E. și coaut. (2018) au determinat o majorare statistic semnificativă a nivelului de DAM în omogenatul ovarian în lotul cu animale expuse torsiunii ovariene pentru 3 ore comparativ cu lotul de control [27]. Acest fapt este observat și de noi, măsurând cantități mai mari de DAM în omogenat în lotul cu torsiune comparativ atât cu lotul martor, cât și control,  $p < 0,001$  (figura 14).

Aceste rezultate confirmă faptul că în timpul ischemiei ovarele au fost expuse stresului oxidativ, iar peroxidarea lipidelor a fost intensă, indicând leziuni ale țesutului. Concomitent, datele obținute în cercetarea noastră arată că intensificarea stresului oxidativ este o verigă patogenetică importantă a lezării tisulare în torsiunea ovariană, care necesită intervenție din partea medicului pentru asigurarea unui echilibru redox și diminuarea acțiunii negative a SRO atât asupra lipidelor, cât și asupra altor molecule.

Evaluând efectele reperfuziei în TO, am constatat că date similare celor obținute de noi au fost raportate de Kara M. și coaut. (2012) care după torsionarea ovarelor pentru o perioadă de 3 ore și restabilirea fluxului sangvin pentru 1 oră au înregistrat majorări ale cantității de DAM tisulară [249], iar Ersoy G.S. și coaut. (2016), după ischemizarea ovarelor pentru o perioadă de 3 ore și detorsionarea acestora pentru 24 ore, au constatat că nivelul de DAM tisulară a crescut semnificativ comparativ cu lotul fără TO [241].

Yildirim N. și coaut. (2018) au consemnat faptul că TO induce mărirea cantității de DAM în țesut, iar detorsiunea intensifică stresul oxidativ cu agravarea leziunilor oxidative, reflectate prin obținerea unor valori mai mari de DAM după 3 ore de la revascularizare [13]. Aceleași constatări după 3 ore de la restabilirea fluxului sangvin au fost făcute de Refaie M.M. și coaut. (2018), care au mai observat diminuarea concomitentă a cantității de GSH și creștere a nivelului de DNO [237]. Nayki C. și coaut. (2018) au raportat majorarea statistic semnificativă a DAM tisulare după o ischemie de 2 ore, urmată de o reperfuzie de 2 ore comparativ cu lotul de control [250].

În lucrarea lui Ozlem K. și coaut. (2018) sunt prezentate date care indică faptul că și o durată mai scurtă a ischemiei ovariene, de 1 oră conform protocolului experimental, cu o restabilire a

circulației sangvine ulterior pentru 2 ore, este capabilă să inducă modificări oxidative ale lipidelor, care s-a manifestat prin creșterea statistic semnificativă a cantității de DAM atât în ser, cât și în țesutul ovarian comparativ cu lotul de animale intacte [43].

Melekoglu R. și coaut. (2018) în lucrarea lor relatează despre faptul că detorsionarea ovarelor este tratamentul recomandat atunci când se dorește păstrarea funcției ovariene. Totuși, aceștia precizează că în aceste condiții se impun măsuri profilactice împotriva leziunilor I/R [165].

Așa cum unii cercetători au indicat că celulele inflamatorii au un rol important în lezarea țesutului ovarian [27, 46], este posibil ca o mare parte din cantitatea de DAM măsurată în cercetarea noastră să își aibă originea din deteriorarea lipidelor membranare sub acțiunea SRO produse de către enzimele de care dispun aceste celule proinflamatorii. Astfel, o țintă terapeutică directă ar putea fi orientată anume spre diminuarea inflamației, care ar reduce și intensitatea peroxidării lipidelor, după cum sugerează Osmanağaoğlu M.A. și coaut. (2012) [29].

Lucrarea noastră scoate în evidență faptul că reperfuzia simplă după ischemie duce la deteriorarea mult mai gravă a țesutului comparativ doar cu leziunile cauzate de ischemie.

Lezarea ovarului în torsiunea ovariană începe odată cu hipoxia și ischemia ce afectează țesutul, și aceasta este asociată cu generarea de SRO. Concomitent, rezultatele obținute de noi sugerează că stresul oxidativ și inflamația cooperează în dezvoltarea leziunilor ovariene, ceea ce corespunde cu datele din literatură [42].

În același timp, s-a observat că DAM este unul dintre cei mai investigați biomarkeri în contextul leziunilor I/R. În mai multe studii recente DAM a fost utilizată pentru a evalua leziunile tisulare induse de amplificarea stresului oxidativ în I/R ovariană [13, 22, 27-29, 40, 43, 106, 165, 234, 241, 248, 249].

Rezultatele evaluării nivelului DAM din cercetarea noastră sunt în concordanță cu datele din literatura de specialitate. Studiul nostru a confirmat faptul că torsiunea ovariană este însoțită de o intensificare a stresului oxidativ în țesut.

Sunt mai multe publicații care au reliefat faptul că tratamentul torsiunii ovariene doar prin manevra de detorsionare nu poate preveni peroxidarea lipidelor, fiind necesare intervenții terapeutice suplimentare care să asigure protecția necesară [13, 22, 27-29, 40, 43, 106, 165, 234, 241, 248, 249].

Abordările actuale pentru afecțiunile caracterizate prin I/R includ intervenții farmacologice și mecanice. Până în prezent, abordările mecanice (precondiționare, postcondiționare și precondiționare ischemică la distanță) s-au dovedit a fi cele mai promițătoare [62]. Fenomenul de postcondiționare ischemică s-a dovedit a fi util în ischemia cardiacă, când după o perioadă de ischemie continuă, restabilirea fluxului sangvin se realizează treptat, aplicându-se manevre care includ perioade scurte de ischemie [171, 172]. Deci, în literatura de specialitate se remarcă faptul

că revascularizarea treptată, etapizată este o abordare utilă pentru a reduce leziunile I/R [85, 99, 184, 185].

În cercetarea lui Zhao Z.Q. și coaut. (2003), efectuată pe miocard, a fost consemnat efectul benefic al fenomenului de postcondiționare ischemică, care a fost asociat cu niveluri mai scăzute de DAM, sugerându-se o diminuare a procesului de peroxidare lipidică și reducerea generării de radicali liberi ai oxigenului [171].

Într-un studiu efectuat de Ingec M. și coaut. (2011), cu un model al reperfuziei controlate similar cu cel utilizat în această lucrare, cantitatea de DAM din țesutul ovarian a fost mai mare în lotul de animale supuse ischemiei ovariene comparativ cu lotul de animale intacte. Cel mai înalt nivel al DAM a fost notat în lotul la care s-a aplicat reperfuzia simplă, iar în lotul cu reperfuzie controlată cantitatea acestui biomarker a fost similară cu cea din lotul de animale sănătoase [99].

Rezultatele lucrării noastre sunt în concordanță cu rezultatele obținute de către alți cercetători, studiile lor relevând efectul benefic al diferitor forme de reperfuzie controlată în prevenirea aprofundării leziunilor ovariene [85, 99, 184, 185], cantitatea markerilor deteriorării tisulare fiind mai mică în loturile care au fost expuse manevrelor de reperfuzie controlată comparativ cu loturile la care reperfuzia a fost simplă.

În concluzie, tratamentul torsiunii ovariene prin detorsionare cu reperfuzie controlată a redus leziunile oxidative tisulare induse de fenomenul I/R. Cu toate acestea, sunt necesare studii suplimentare pentru a determina mecanismul exact prin care metoda *on-off* asigură protecție țesutului ovarian după revascularizare.

Se cunoaște faptul că Organizația Mondială a Sănătății a definit un biomarker ca orice substanță, structură sau proces care poate fi măsurat în organism sau în produsele sale și care poate influența sau prezice incidența rezultatului sau a bolii. Markerii stresului oxidativ îndeplinesc adesea prima parte a criteriilor (adică pot fi măsurați) și multe studii sugerează că stresul oxidativ poate influența boala, dar pentru a fi un biomarker relevant din punct de vedere clinic trebuie abordate și alte aspecte. Astfel, un biomarker util clinic ar trebui să îndeplinească unul dintre următoarele criterii: (1) este specific unei anumite boli (diagnostic), (2) are o valoare prognostică și (3) corelează cu activitatea bolii. Acest lucru permite ulterior evaluarea eficacității tratamentului [109].

Deci, la moment nu avem date suficiente pentru a face vreo recomandare de a utiliza biomarkerii stresului oxidativ pentru diagnosticul torsiunii ovariene. Totuși, ei ar putea avea utilitate pentru aprecierea intensității stresului oxidativ în TO, valorile de referință pentru indicii de laborator respectivi necesitând a fi determinate în studii ulterioare.

### 3.4. Influența torsionii/detorsionii ovariene asupra markerilor sistemului antioxidant

Leziunea ischemică este datorată scăderii fluxului sangvin și livrării insuficiente a oxigenului cu acumularea substanțelor finale ale metabolismul anaerob. Pe de altă parte, afectarea postreperfuzie este legată direct de radicalii liberi sau de reducerea activității sistemelor antioxidante celulare [99].

Radicalii liberi ai oxigenului au un rol esențial în deteriorarea celulară din torsionarea ovariană. Majorarea cantității de radicali liberi determină o scădere a rezervei ovariene prin afectarea unităților foliculare, așa cum foliculii primordiali nu au capacitate de regenerare. Prin urmare, riscul de infertilitate și menopauză precoce crește la femeile de vârstă reproductivă atunci când ovarele se torsionează [25].

Cercetările au arătat că sistemul de apărare antioxidant, care include componente enzimatică și neenzimatică, poate reduce producerea de radicali liberi și poate facilita neutralizarea radicalilor liberi deja formați [85].

Efectele acțiunii antioxidantilor depinde de concentrația lor, care este variabilă atât în fluidele, cât și în țesuturile organismului [21].

Nu au fost identificate diferențe statistic semnificative între activitatea **superoxid dismutazei (SOD)** din loturile martor și control atât în omogenatul ovarian (figura 15), cât și în serul sangvin (tabelul 4),  $p > 0,05$ .

Modificarea activității SOD în țesutul ovarian a fost mult mai exprimată decât în ser. Astfel, ischemia a indus o scădere semnificativă a activității enzimei cu aproximativ 24% (de la  $317,339 \pm 13,243$  u.c./g.prot. până la  $239,63 \pm 8,095$  u.c./g.prot.,  $p = 0,002$ ) comparativ cu lotul martor. Reperfuzia controlată de 1 oră a menținut activitatea enzimei aproximativ la nivelul celei din perioada de ischemie, fiind redusă cu aproape 25% (de la  $317,339 \pm 13,243$  u.c./g.prot. până la  $239,239 \pm 2,909$  u.c./g.prot.,  $p = 0,002$ ) comparativ cu lotul martor. După reperfuzia simplă de 1 oră s-a determinat micșorarea în continuare a activității SOD cu aproximativ 29% comparativ cu lotul martor (de la  $317,339 \pm 13,243$  u.c./g.prot. până la  $225,545 \pm 4,462$  u.c./g.prot.,  $p = 0,001$ ) (figura 15).

La distanță, după 24 ore de reperfuzie, în omogenatul ovarian a fost sesizată tendința de restabilire a activității SOD comparativ cu perioada inițială de reperfuzie. Astfel, după 24 ore de reperfuzie simplă activitatea SOD era diminuată cu aproape 18% (de la  $317,339 \pm 13,243$  u.c./g.prot. până la  $261,315 \pm 7,405$  u.c./g.prot.,  $p = 0,03$ ), iar în lotul cu reperfuzie *on-off* a fost înregistrată o tendință de reducere a activității enzimei cu aproximativ 15% (de la  $317,339 \pm 13,243$  u.c./g.prot. până la  $270,192 \pm 8,677$  u.c./g.prot.,  $p > 0,05$ ) comparativ cu lotul martor (figura 15).

Așadar, comparând rezultatele evaluării activității SOD în omogenatul ovarian al animalelor din loturile cu reperfuzie s-a stabilit că reperfuzia atât simplă, cât și controlată în faza inițială (după 1 oră) nu au ameliorat activitatea enzimei, dar dimpotrivă, au redus-o cu 29% în tipul simplu,

respectiv cu 25% în lotul cu modelul *on-off* comparativ cu lotul martor,  $p < 0,05$ . Totuși, în faza tardivă de reperfuzie (după 24 ore) atât în tipul simplu, cât și controlat diminuarea activității SOD a fost mai puțin exprimată decât după 1 oră, fiind notate valori mai mici comparativ cu lotul martor cu doar 18% în lotul cu reperfuzie simplă,  $p < 0,05$ , respectiv cu 15% în lotul *on-off*,  $p > 0,05$  (figura 15). Concomitent, comparativ cu lotul de animale expuse doar TO, în țesutul ovarian s-a observat tendința de descreștere a activității SOD după 1 oră de la detorsionare cu o majorare după 24 ore de la reluarea circulației.

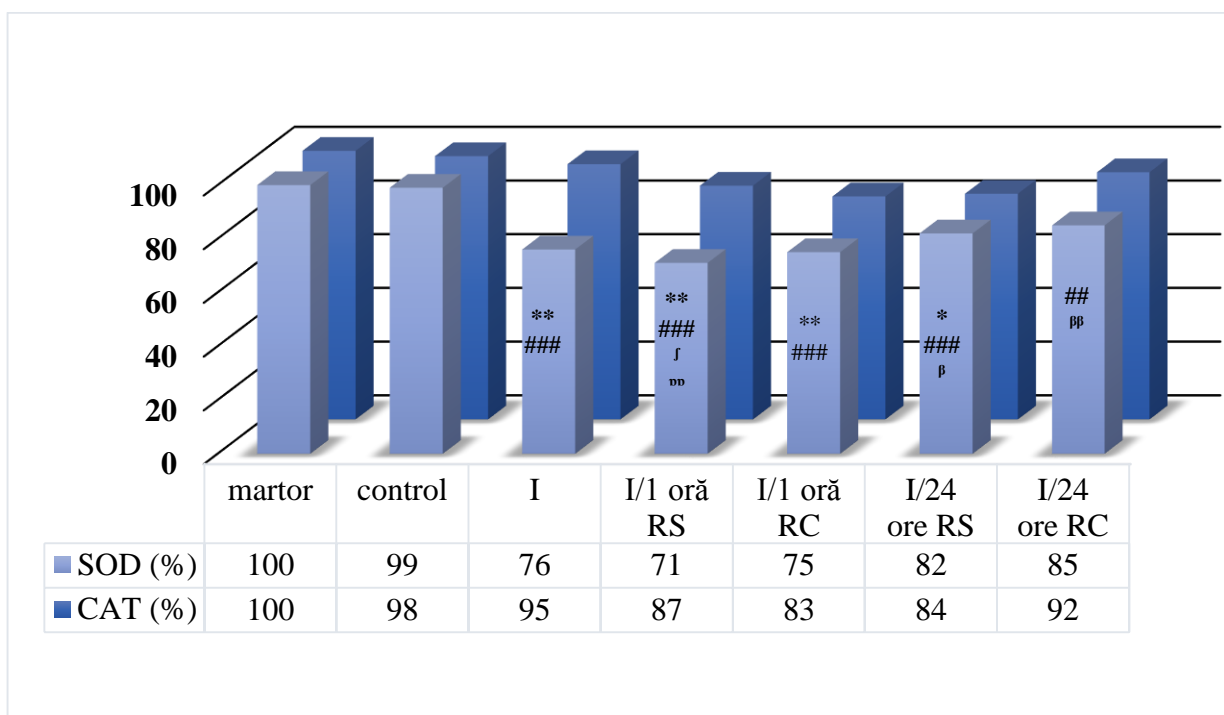


Figura 15. Efectul torsiunii/detorsionării ovariene experimentale asupra activității superoxid dismutazei și catalazei din omogenatul ovarian

Notă: I – ischemie; RS – reperfuzie simplă; RC – reperfuzie controlată (*on-off*); SOD – superoxid dismutaza; CAT – catalaza. Diferență statistic semnificativă comparativ cu:

- lotul martor: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ ;
- lotul control: # –  $p < 0,05$ ; ## –  $p < 0,01$ ; ### –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie:  $\delta$  –  $p < 0,05$ ;  $\delta\delta$  –  $p < 0,01$ ;  $\delta\delta\delta$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/1 oră reperfuzie simplă:  $\beta$  –  $p < 0,05$ ;  $\beta\beta$  –  $p < 0,01$ ;  $\beta\beta\beta$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/1 oră reperfuzie controlată:  $\varphi$  –  $p < 0,05$ ;  $\varphi\varphi$  –  $p < 0,01$ ;  $\varphi\varphi\varphi$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/24 ore reperfuzie simplă:  $\jmath$  –  $p < 0,05$ ;  $\jmath\jmath$  –  $p < 0,01$ ;  $\jmath\jmath\jmath$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/24 ore reperfuzie controlată:  $\upsilon$  –  $p < 0,05$ ;  $\upsilon\upsilon$  –  $p < 0,01$ ;  $\upsilon\upsilon\upsilon$  –  $p < 0,001$ .

În modelul experimental studiat nu au fost atestate modificări statistic semnificative ale activității SOD în serul sangvin al subiecților din toate loturile. S-a înregistrat o tendință de diminuare a activității enzimei în limitele 1-7%,  $p > 0,05$  (tabelul 4).

Nu au fost identificate corelații între activitatea SOD din omogenat și cea din serul sangvin în loturile experimentale (tabelul A3.1).

Tabelul 4. Activitatea superoxid dismutazei și catalazei din serul sangvin în torsiunea/detorsiunea ovariană

Loturi de studiu	SOD, u.c.	CAT, μmol/s/L
Martor	1294,017±26,853 (100%)	11,351±0,599 (100%)
Control	1251,282±19,035 (97%)	11,531±0,106 (102%)
Ischemie	1237,606±41,575 (96%)	10,270±0,297 (91%) <sup>#</sup>
Ischemie/1 oră reperfuzie simplă	1223,931±30,599 (95%)	10,210±0,126 (90%) <sup>###φφ</sup>
Ischemie/1 oră reperfuzie controlată ( <i>on-off</i> )	1200±12,167 (93%)	11,081±0,162 (98%) <sup>ββ</sup>
Ischemie/24 ore reperfuzie simplă	1285,470±31,292 (99%)	10,375±0,398 (91%)
Ischemie/24 ore reperfuzie controlată ( <i>on-off</i> )	1264,957±47,740 (98%)	11,006±0,202 (97%)

Notă: SOD – superoxid dismutaza; CAT – catalaza.

Diferență statistic semnificativă comparativ cu:

- lotul martor: \* – p<0,05; \*\* – p<0,01; \*\*\* – p<0,001;
- lotul control: # – p<0,05; ## – p<0,01; ### – p<0,001;
- lotul ischemie: δ – p<0,05; δδ – p<0,01; δδδ – p<0,001;
- lotul ischemie/1 oră reperfuzie simplă: β – p<0,05; ββ – p<0,01; βββ – p<0,001;
- lotul ischemie/1 oră reperfuzie controlată: φ – p<0,05; φφ – p<0,01; φφφ – p<0,001;
- lotul ischemie/24 ore reperfuzie simplă: ς – p<0,05; ςς – p<0,01; ςςς – p<0,001;
- lotul ischemie/24 ore reperfuzie controlată: ν – p<0,05; νν – p<0,01; ννν – p<0,001.

Există mai multe cercetări care au demonstrat o scădere a activității SOD în TO prin procedura de ischemie/reperfuzie [27, 40, 41, 43, 85, 154, 165, 249].

Similar cu datele din literatură [43] și în studiul nostru s-a observat reducerea activității SOD în torsiunea ovariană atât în țesut, cât și în ser. Astfel, Ozlem K. și coaut. (2018) raportează micșorări statistic semnificative ale activității SOD atât în serul sangvin, cât și în țesut chiar și în urma expunerii animalelor la o ischemie ovariană de o durată mai scurtă, de 1 oră conform protocolului experimental, cu reperfuzie ulterioară pentru 2 ore [43] comparativ cu studiul nostru. Deci, I/R diminuează activitatea SOD, ceea ce poate favoriza creșterea cantității de SRO disponibile pentru interacțiune cu diferite molecule, cu lezare ulterioară a lor [43].

Celik Kavak E. și coaut. (2018) au evidențiat faptul că torsiunea/detorsiunea ovariană are un efect mai exprimat asupra SOD din țesut decât doar torsiunea propriu-zisă, activitatea acesteia reducându-se, totuși, statistic nesemnificativ [27]. Date similare au fost raportate și de Kara M. și coaut. (2012) care după ischemizarea ovarelor pentru o perioadă de 3 ore și restabilirea fluxului sangvin pentru 1 oră au înregistrat scăderi ale activității SOD tisulare comparativ cu lotul de control [249].

Ingec M. și coaut. (2011), studiind efectele reperfuziei controlate în TO, au înregistrat o diminuare a activității SOD din țesutul ovarian în lotul de animale expuse ischemiei ovariene comparativ cu lotul de animale sănătoase. Cel mai scăzut nivel al activității SOD a fost consemnat în lotul la care s-a aplicat reperfuzia simplă, iar în lotul cu reperfuzie controlată activitatea enzimei a fost similară cu cea din lotul de animale intacte [99]. În același timp, și în cercetarea noastră a fost remarcată o descreștere statistic semnificativă a activității SOD în omogenat odată cu torsionarea ovarelor comparativ cu lotul martor ( $p=0,002$ ). Totuși, după 1 oră de la restabilirea circulației sangvine s-a constatat că reperfuzia simplă a avut tendința de a aprofunda diferența observată în activitatea enzimei comparativ cu lotul martor ( $p=0,001$ ), iar reperfuzia controlată a menținut activitatea SOD la valorile lotului de animale expus doar torsiunii ovariane ( $p>0,05$ ), fiind, însă, mult redusă comparativ cu lotul martor ( $p=0,002$ ). Inclusiv peste 24 ore s-a apreciat o activitate scăzută a SOD, comparativ cu lotul martor, totuși, în creștere comparativ cu loturile evaluate după 1 oră de reperfuzie (figura 15). Rezultatul înregistrat după 24 ore de reperfuzie simplă este în concordanță cu datele obținute de alți cercetători. Astfel, Ersoy G.S. și coaut. (2016) raportează faptul că după 24 ore de la restabilirea fluxului sangvin activitatea SOD în țesut este redusă statistic semnificativ comparativ cu lotul de animale fără torsiune ovariană [241].

Studiul nostru reliefează faptul că I/R din torsiunea ovariană a avut un efect negativ asupra SOD tisulare, provocând un declin în activitatea acesteia, care s-a menținut scăzută și după 24 ore de la revascularizare, sugerând faptul că această enzimă, care se află în prima linie de protecție antioxidantă, nu este capabilă să asigure singură apărarea la un nivel corespunzător împotriva SRO, astfel, înregistrându-se leziuni oxidative marcate prin niveluri crescute de DAM, PPOA și AGE. Există chiar date care arată că și după 48 de ore de la restabilirea circulației sangvine activitatea SOD din țesut a fost redusă comparativ cu lotul de control, totuși, fiind mai mare decât după 1 oră de la detorsionare [251], indicând despre o refacere lentă a SOD, ceea ce sugerează necesitatea unei intervenții cu scop de protecție a activității enzimelor antioxidante, chiar din primele momente de la stabilirea diagnosticului.

Nu au fost stabilite diferențe între activitatea **catalazei (CAT)** din loturile martor și control atât în omogenat (figura 15), cât și în ser (tabelul 4),  $p>0,05$ .

Ischemia nu a afectat activitatea CAT din țesutul ovarian, care s-a redus doar cu 5% (de la  $32,423\pm 2,151$   $\mu\text{mol/s/g.prot.}$  până la  $30,860\pm 0,496$   $\mu\text{mol/s/g.prot.}$ ,  $p>0,05$ ) comparativ cu lotul martor. Reperfuzia a accentuat tendința de diminuare a activității enzimei cu aproximativ 13% în lotul cu 1 oră reperfuzie simplă (de la  $32,423\pm 2,151$   $\mu\text{mol/s/g.prot.}$  până la  $28,041\pm 1,793$   $\mu\text{mol/s/g.prot.}$ ,  $p>0,05$ ), 17% în lotul cu 1 oră reperfuzie controlată (de la  $32,423\pm 2,151$   $\mu\text{mol/s/g.prot.}$  până la  $26,988\pm 1,597$   $\mu\text{mol/s/g.prot.}$ ,  $p>0,05$ ), 16% în lotul cu 24 ore reperfuzie simplă (de la  $32,423\pm 2,151$   $\mu\text{mol/s/g.prot.}$  până la  $27,112\pm 1,446$   $\mu\text{mol/s/g.prot.}$ ,  $p>0,05$ ) și cu

aproape 8% în lotul cu 24 ore reperfuzie controlată (de la  $32,423 \pm 2,151 \mu\text{mol/s/g.prot.}$  până la  $29,934 \pm 2,158 \mu\text{mol/s/g.prot.}$ ,  $p > 0,05$ ) comparativ cu lotul martor (figura 15).

În serul sangvin s-a remarcat tendința de scădere a activității CAT la aplicarea manevrei de torsionare a ovarelor. Comparativ cu lotul martor în lotul cu ischemie enzima și-a micșorat activitatea cu aproape 9% și s-a menținut redusă inclusiv în loturile cu reperfuzie simplă,  $p > 0,05$ . Reperfuzia controlată a ameliorat activitatea CAT în ser, valorile înregistrate fiind apropiate de cele din lotul martor,  $p > 0,05$ . Măsurarea activității enzimei după 1 oră de la restabilirea fluxului sangvin a arătat diferențe statistic semnificative între cele două loturi, stabilindu-se o activitate mai mare cu aproape 9% în lotul *on-off* comparativ cu lotul cu reperfuzie simplă (de la  $10,210 \pm 0,126 \mu\text{mol/s/L}$  până la  $11,081 \pm 0,162 \mu\text{mol/s/L}$ ,  $p = 0,008$ ). La distanță (după 24 ore) s-a observat aceeași tendință, activitatea CAT fiind mai mare în lotul cu reperfuzie controlată comparativ cu lotul cu reperfuzie simplă, însă fără vreo semnificație statistică,  $p > 0,05$  (tabelul 4).

S-a identificat o corelație moderat negativă ( $r_s = -0,677$ ,  $p = 0,032$ ) între activitatea CAT din ser și cea din omogenatul ovarian în lotul cu 1 oră reperfuzie controlată (tabelul A3.1).

Datele din literatura de specialitate legate de activitatea catalaziei în torsiunea ovariană experimentală sunt contradictorii.

Similar cu datele înregistrate de noi, Karapinar O.S. și coaut. (2017) au consemnat faptul că o ischemie ovariană de 3 ore diminuează activitatea CAT în țesut, aceasta reducându-se și după restabilirea fluxului sangvin ovarian [248]. Concomitent, Ozlem K. și coaut. (2018), Celik Kavak E. și coaut. (2018) și Ugurel V. și coaut. (2017) în cercetările lor au relevat faptul că torsiunea ovariană modifică activitatea catalazei, micșorând-o esențial [27, 43, 154]. Ozlem K. și coaut. (2018) au arătat că activitatea CAT scade atât în țesut, cât și în ser [43].

Celik Kavak E. și coaut. (2018) au consemnat faptul că ischemia/reperfuzia are un efect negativ asupra activității CAT din țesutul ovarian, activitatea acesteia reducându-se statistic semnificativ comparativ cu lotul de control [27].

Melekoglu R. și coaut. (2018) au scos în evidență faptul că tratamentul torsiunii ovariene, doar prin manevra de detorsionare nu este suficientă să asigure o activitate a CAT similară cu cea din lotul de control sau poate chiar mai înaltă pentru a garanta o protecție antioxidantă adecvată, fapt confirmat printr-un nivel mai mare al DAM în lotul cu I/R comparativ cu lotul fără torsiune ovariană [165].

Astfel, similar cu unele date din literatură [43] și în studiul nostru s-a observat că activitatea CAT se reduce în torsiunea ovariană atât în țesut, cât și în ser. Ozlem K. și coaut. (2018) au înregistrat micșorări statistic semnificative ale activității CAT atât în ser, cât și în țesut chiar și în urma expunerii animalelor la o ischemie ovariană de doar 1 oră, cu reperfuzie ulterioară pentru 2 ore [43] comparativ cu studiul nostru. Acest rezultat indică faptul că I/R reduce activitatea CAT,



ceea ce cauzează un dezechilibru care va determina amplificarea leziunilor oxidative, fapt confirmat printr-un nivel statistic semnificativ mai mare al DAM în acest lot comparativ cu lotul de animale intacte [43]. Bakan V. și coaut. (2009) au raportat că și după 48 de ore activitatea CAT din țesut se menține scăzută comparativ cu lotul experimental fără TO, totuși, fiind mai mare decât după 1 oră de la reperfuzie [251], ceea ce sugerează că restabilirea capacităților de funcționare ale enzimei la un nivel corespunzător celui de la animalele intacte poate să necesite o perioadă mai mare de timp, impunându-se, deci, implicarea altor enzime și molecule pentru asigurarea protecției antioxidante adecvate a ovarului. Concomitent, Bakan V. și coaut. (2009) au presupus că diminuarea activității CAT și SOD din torsiunea ovariană experimentală ar putea fi datorate epuizării enzimelor în timpul stresului oxidativ [251].

Există, însă, și publicații care relatează despre o creștere a activității CAT în țesutul ovarian în loturile experimentale comparativ cu lotul de control [23, 47]. Totuși, în cercetarea lui Eryilmaz O.G. și coaut. (2016) activitatea CAT, chiar dacă mai mare decât în lotul fără torsiune, s-a redus după reperfuzia de 3 ore comparativ cu lotul de animale care a fost expus doar ischemiei ovariene [23].

Atasever M. și coaut. (2017) au constatat intensificarea activității CAT după aplicarea ischemiei ovariene comparativ cu lotul de control, cu o continuă augmentare și după restabilirea fluxului sangvin [47]. Aceste rezultate sunt contrare celor consemnate în cercetarea noastră, unde a fost observată tendința de diminuare a activității enzimei atât în ser, cât și în omogenatul ovarian și posibil sunt determinate de diferențele legate de protocolul experimental.

În studiul nostru s-a remarcat reducerea activității **glutation peroxidazei (GPO)** în omogenat în toate loturile cu TO comparativ cu lotul martor, pe când în ser, invers, tendința a fost de creștere (tabelul 5).

În țesutul ovarian nu s-au înregistrat diferențe ale activității GPO între loturile martor și control,  $p > 0,05$ . Ischemia ovariană s-a manifestat printr-o tendință de scădere a activității enzimei cu aproape 12% comparativ cu lotul martor,  $p > 0,05$ . Reperfuzia simplă a aprofundat diminuarea activității GPO, care a ajuns la aproximativ 28% după 1 oră și 18% după 24 ore sub nivelul lotului martor,  $p < 0,001$ .

În loturile cu reperfuzie controlată s-a stabilit o micșorare a activității GPO în țesut, mai exprimat în perioada inițială (după 1 oră), fiind notate valori cu aproximativ 13% mai mici comparativ cu lotul cu lotul martor,  $p > 0,05$ .

În același timp, s-au sesizat diferențe ale activității enzimei în omogenat între loturile cu reperfuzie *on-off* de aproximativ 11% (de la  $300,896 \pm 14,606$  nmol/s/g.prot. după 1 oră de reperfuzie până la  $334,338 \pm 27,316$  nmol/s/g.prot. după 24 ore de reperfuzie,  $p > 0,05$ ). După 24 ore



A fost identificată o corelație înalt negativă ( $r_s=-0,806$ ,  $p=0,005$ ) între activitatea GPO din ser și cea din omogenatul ovarian doar în lotul cu 24 ore reperfuzie simplă (tabelul A3.2).

Datele din literatura de specialitate referitor la activitatea enzimelor antioxidante în condiții de SO sunt contradictorii. Jo S.H. și coaut. (2001) menționează faptul că anumite enzime cheie implicate în protecția antioxidantă, precum CAT, SOD și GPO, cresc în cantitate în situații de stres ca o măsură compensatorie, datorită activării factorului de transcripție nuclear *kB*, care este activat în urma expunerii la SRO [97].

Concomitent, alte publicații relatează despre faptul că activitatea GPO diminuează în țesuturile care sunt supuse stresului oxidativ, inclusiv în situații ce presupun ischemie/reperfuzie ovariană [24, 27, 45, 51, 85, 165, 248], ceea ce este observat și în studiul nostru.

Similar cu datele înregistrate de noi, Karapinar O.S. și coaut. (2017) au consemnat faptul că o ischemie ovariană de 3 ore diminuează activitatea GPO în țesut comparativ cu lotul de animale fără TO, aceasta continuând să se reducă și mai accentuat după restabilirea fluxului sangvin [248].

Celik Kavak E. și coaut. (2018) au înregistrat o activitate statistic semnificativ mai mică a GPO din țesutul ovarian al animalelor lotului expus ischemiei/reperfuziei comparativ cu lotul de control [27].

Rezultatele cercetării noastre indică faptul că una dintre cauzele intensificării leziunilor în torsionarea/detorsionarea ovariană ar putea fi explicată prin micșorarea activității GPO în omogenatul ovarian, așa cum această enzimă are un rol deosebit în transformarea peroxizilor, împiedicând formarea de produse toxice pentru componentele celulare [24].

Melekoglu R. și coaut. (2018), de asemenea, au consemnat diminuarea activității GPO în ovarele animalelor expuse I/R, scoțând în evidență faptul că managementul torsionării ovariene necesită și alte intervenții, iar doar restabilirea fluxului sangvin nu este suficientă să asigure o activitate a GPO similară cu cea din lotul de animale care nu au fost expuse TO sau poate chiar mai înaltă pentru a garanta o protecție antioxidantă optimă, fapt confirmat printr-un nivel mai mare al DAM în lotul cu I/R comparativ cu lotul fără intervenție pe ovare. Concomitent, Melekoglu R. și coaut. (2018) postulează că așa cum DAM este unul dintre produsele finale ale peroxidării lipidelor, iar nivelul crescut al acesteia indică stres oxidativ, o activitate înaltă a SOD, CAT și GPO ar sugera refacerea țesuturilor după deteriorarea oxidativă [165].

Cercetarea noastră relevă faptul că activitatea GPO în țesutul ovarian poate fi influențată de tipul de reperfuzie. Efectele benefice ale tipului *on-off* sunt dovedite prin menținerea activității enzimei după 1 oră de reperfuzie aproape de nivelurile măsurate după ischemia de 3 ore și restabilirea în proporție de 97% după 24 ore. Contrar rezultatelor înregistrate în loturile *on-off*, în cele cu reperfuzie simplă GPO se menține scăzută, fiind consemnate valori sub cele măsurate în lotul doar cu ischemie ovariană chiar și după 24 ore de la revascularizare. Tendința de creștere a

activității GPO în ser după detorsionare ar putea fi datorată efectelor influxului de oxigen molecular în condițiile amplificării SO.

Nu au fost stabilite diferențe statistic semnificative între activitatea **glutathion reductazei (GR)** din loturile martor și control atât în omogenatul ovarian, cât și în serul sangvin din studiul nostru,  $p > 0,05$  (tabelul 5).

Activitatea GR din țesutul ovarian a avut o tendință de descreștere. Torsiunea ovariană a diminuat activitatea GR cu circa 6%, comparativ cu lotul martor,  $p > 0,05$ . Reperfuzia a accentuat diferența față de lotul martor, observându-se micșorări cu aproape 17% în lotul cu 1 oră reperfuzie simplă,  $p = 0,006$ , 19% în lotul cu 1 oră reperfuzie *on-off*,  $p = 0,006$ , 18% în lotul cu 24 ore reperfuzie simplă,  $p = 0,003$ , și 10% în lotul cu 24 ore reperfuzie controlată,  $p > 0,05$  (tabelul 5).

Comparativ cu lotul expus doar ischemiei ovariene s-au distins reduceri importante ale activității GR din omogenat cu aproximativ 11% în lotul cu 1 oră reperfuzie simplă (de la  $206,262 \pm 3,067$  nmol/s/g.prot. până la  $183,305 \pm 5,140$  nmol/s/g.prot.,  $p = 0,022$ ), 13% în lotul cu 1 oră reperfuzie *on-off* (de la  $206,262 \pm 3,067$  nmol/s/g.prot. până la  $178,904 \pm 6,790$  nmol/s/g.prot.,  $p = 0,036$ ), 12% în lotul cu 24 ore reperfuzie simplă (de la  $206,262 \pm 3,067$  nmol/s/g.prot. până la  $181,716 \pm 3,620$  nmol/s/g.prot.,  $p = 0,001$ ) și mai puțin evidentă în lotul cu 24 ore reperfuzie *on-off*, unde s-a constatat o diminuare cu doar 4% (de la  $206,262 \pm 3,067$  nmol/s/g.prot. până la  $197,576 \pm 8,169$  nmol/s/g.prot.,  $p > 0,05$ ).

Torsiunea ovariană a intensificat activitatea GR în ser cu circa 25% comparativ cu lotul martor,  $p = 0,045$ . Reperfuzia simplă, în perioada inițială (după 1 oră), a menținut activitatea GR aproape la același nivel cu cel din perioada de ischemie,  $p > 0,05$ , însă după 24 ore s-a constatat o tendință de majorare cu aproape 5% (de la  $2,879 \pm 0,048$   $\mu\text{mol/s/L}$ , până la  $3,023 \pm 0,053$   $\mu\text{mol/s/L}$ ,  $p > 0,05$ ), această creștere fiind statistic semnificativă comparativ cu lotul martor, după cele 24 ore de reperfuzie simplă valorile înregistrate fiind cu aproximativ 31% mai mari,  $p = 0,011$  (tabelul 5).

În loturile cu reperfuzie controlată activitatea GR în ser manifestă o tendință de creștere cu aproape 16% după 1 oră,  $p > 0,05$ , ulterior majorându-se semnificativ după 24 ore cu aproape 26%,  $p = 0,047$ , comparativ cu lotul martor (tabelul 5). Totuși, comparativ cu lotul cu ischemie ovariană, în perioada inițială (după 1 oră) s-a remarcat faptul că activitatea enzimei s-a diminuat cu aproximativ 7% (de la  $2,879 \pm 0,048$   $\mu\text{mol/s/L}$  până la  $2,678 \pm 0,127$   $\mu\text{mol/s/L}$ ,  $p > 0,05$ ), ca apoi, după 24 ore să fie înregistrate valori apropiate celor din lotul animalelor expuse doar torsiunii ovariene,  $p > 0,05$ .

Astfel, în serul sangvin s-a observat o activitate a GR mai mare în loturile cu reperfuzie simplă comparativ cu loturile cu reperfuzie controlată, atât în perioada inițială (după 1 oră): 24% vs. 16%, cât și la distanță (după 24 ore): 31% vs. 26%. Concomitent, s-a consemnat o activitate

mai mică a enzimei după 1 oră de la restabilirea fluxului sangvin (24% și 16%) comparativ cu înregistrările efectuate după 24 ore, care au evidențiat valori mai mari (31% și 26%) (tabelul 5).

Nu au fost identificate corelații între activitatea GR din ser și cea din omogenatul ovarian în loturile de cercetare (tabelul A3.2).

Rezultatele noastre referitor la activitatea GR din serul sangvin și omogenat relevă că TO intensifică activitatea enzimei în ser și o reduce în omogenat.

Rolul GR, enzimă dependentă de NADPH, este de a menține eficacitatea antioxidantă a glutathionului, prin transformarea glutathionului oxidat (GSSG) în glutathion redus (GSH). Se cunoaște că GR are o activitate mai mare în țesutul sănătos comparativ cu țesutul deteriorat și s-a dovedit că activitatea GR scade concomitent cu lezarea țesuturilor [24, 45].

Se știe că ovocitele, celulele granuloase și celulele luteinice exprimă un nivel ridicat de GR [67]. În literatura de specialitate se menționează faptul că GR are o activitate mai mare în țesutul ovarian care nu a fost expus fenomenului I/R comparativ cu loturile la care s-a efectuat torsionarea, respectiv detorsionarea ovariană, activitatea enzimei scăzând [24, 45, 51].

Reducerea activității GR din omogenat în cercetarea noastră poate fi asociată indirect cu o afectare oxidativă intensă legată de procesul de restabilire a circulației sangvine în țesutul ischemizat, confirmând necesitatea impunerii unor măsuri de diminuarea a SO în tratamentul torsionării ovariene. În același timp, intuim că activitatea GR serice ar putea fi influențată de cea a GPO, observându-se că ambele cresc, sugerându-se astfel existența unor căi reglatoare comune care ar asigura protecția împotriva leziunilor suplimentare a subiecților expuși TO. Presupunem că reglarea activității serice a acestor două enzime ar fi dependentă de nivelul de SRO, totuși, această ipoteză necesită studii suplimentare pentru confirmare.

Nu au fost constatate diferențe statistic semnificative în activitatea **glutathion-S-transferazei (GST)** din loturile martor și control atât în omogenat, cât și în ser,  $p > 0,05$ , modificarea activității enzimei din cercetarea noastră fiind ilustrată în figura 16.

În omogenatul ovarian s-a consemnat o micșorare a activității GST odată cu torsionarea ovarelor. Așadar, în lotul cu ischemie ovariană s-a stabilit descreșterea activității GST cu aproximativ 36% (de la  $76,018 \pm 1,222$  nmol/s/g.prot. până la  $48,865 \pm 2,909$  nmol/s/g.prot.,  $p < 0,001$ ) comparativ cu lotul martor.

Reperfuția de 1 oră a avut un efect pozitiv diminuând diferențele față de lotul martor, stabilindu-se o activitate a GST în țesut mai mică cu aproape 26% în lotul cu reperfuție simplă (de la  $76,018 \pm 1,222$  nmol/s/g.prot. până la  $56,412 \pm 3,95$  nmol/s/g.prot.,  $p = 0,008$ ), respectiv 18% în lotul cu reperfuție *on-off* (de la  $76,018 \pm 1,222$  nmol/s/g.prot. până la  $62,378 \pm 6,694$  nmol/s/g.prot.,  $p > 0,05$ ). S-a constatat faptul că în lotul cu reperfuție simplă activitatea GST a scăzut mai mult comparativ cu lotul cu reperfuție controlată,  $p > 0,05$ .

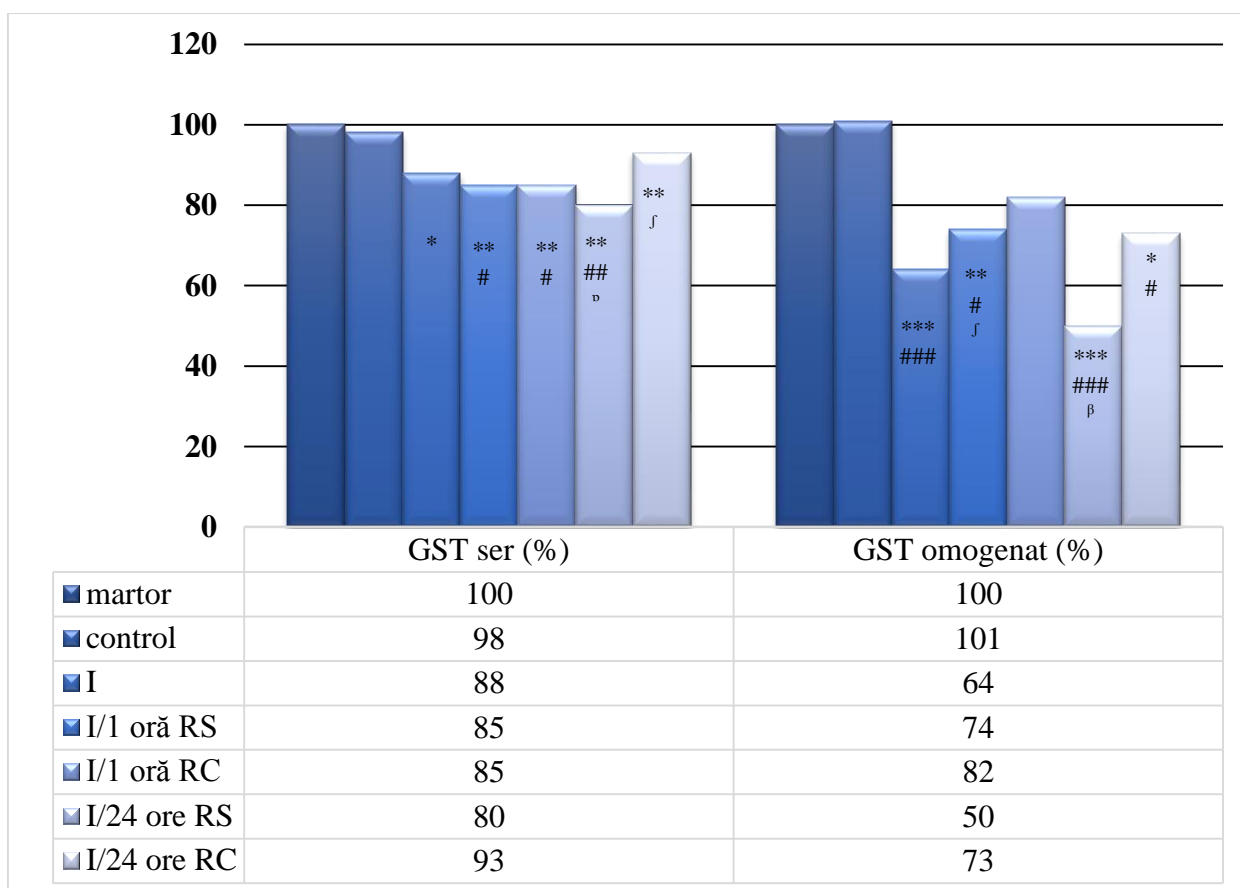


Figura 16. Activitatea glutation-S-transferazei din serul sangvin și omogenatul ovarian în torsiunea/detorsiunea ovariană experimentală

Notă: I – ischemie; RS – reperfuzie simplă; RC – reperfuzie controlată (*on-off*); GST – glutation-S-transferaza. Diferență statistic semnificativă comparativ cu:

- lotul martor: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ ;
- lotul control: # –  $p < 0,05$ ; ## –  $p < 0,01$ ; ### –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie:  $\delta$  –  $p < 0,05$ ;  $\delta\delta$  –  $p < 0,01$ ;  $\delta\delta\delta$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/1 oră reperfuzie simplă:  $\beta$  –  $p < 0,05$ ;  $\beta\beta$  –  $p < 0,01$ ;  $\beta\beta\beta$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/1 oră reperfuzie controlată:  $\varphi$  –  $p < 0,05$ ;  $\varphi\varphi$  –  $p < 0,01$ ;  $\varphi\varphi\varphi$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/24 ore reperfuzie simplă:  $\int$  –  $p < 0,05$ ;  $\int\int$  –  $p < 0,01$ ;  $\int\int\int$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/24 ore reperfuzie controlată:  $\infty$  –  $p < 0,05$ ;  $\infty\infty$  –  $p < 0,01$ ;  $\infty\infty\infty$  –  $p < 0,001$ .

După 24 ore de reperfuzie simplă s-a observat descreștere a activității enzimei în țesut cu aproape 50% (de la  $76,018 \pm 1,222$  nmol/s/g.prot. până la  $38,28 \pm 1,616$  nmol/s/g.prot.,  $p < 0,001$ ) comparativ cu lotul martor, iar comparativ cu perioada inițială de reperfuzie simplă (după 1 oră) enzima și-a diminuat activitatea cu aproximativ 32% (de la  $56,412 \pm 3,95$  nmol/s/g.prot. până la  $38,28 \pm 1,616$  nmol/s/g.prot.,  $p = 0,015$ ). După 24 ore de reperfuzie controlată s-a apreciat o scădere a activității GST cu aproape 27% (de la  $76,018 \pm 1,222$  nmol/s/g.prot. până la  $55,525 \pm 5,291$  nmol/s/g.prot.,  $p = 0,04$ ) comparativ cu lotul martor. Astfel, este evident faptul că reperfuzia simplă vs. reperfuzia controlată a avut un efect de diminuare a activității GST în țesut, fenomen care a luat amploare odată cu trecerea timpului și fiind mai pronunțat în tipul simplu de reperfuzie, fapt

confirmat prin valori mai mici înregistrate la 1 oră după restabilirea fluxului sangvin cu 26% vs. 18%, respectiv după 24 ore cu 50% vs. 27% comparativ cu lotul martor.

Torsiunea ovariană a micșorat activitatea GST în ser cu aproximativ 12% (de la 84,147±1,019 nmol/s/L până la 73,603±2,161 nmol/s/L, p=0,01) comparativ cu lotul martor.

Reperfuzia după 1 oră atât în tipul simplu, cât și controlat a aprofundat declinul în activitatea GST cu aproape 15% (de la 84,147±1,019 nmol/s/L până la 71,397±2,336 nmol/s/L în tipul simplu, p=0,004, și până la 71,880±2,376 nmol/s/L în tipul controlat, p=0,006) comparativ cu lotul martor.

La distanță, după 24 ore de reperfuzie, s-au observat efecte opuse asupra activității GST în dependență de tipul de reperfuzie aplicat. Astfel, în tipul simplu activitatea a continuat să scadă cu aproximativ 20% (de la 84,147±1,019 nmol/s/L până la 67,055±2,531 nmol/s/L, p=0,001) comparativ cu lotul martor, iar în lotul cu reperfuzie controlată dimpotrivă, activitatea a crescut comparativ cu ceea ce a fost notat după 1 oră de reperfuzie, înregistrându-se diferențe comparativ cu lotul martor de doar 7% (de la 84,147±1,019 nmol/s/L până la 77,944±0,824 nmol/s/L, p=0,003).

Comparându-se rezultatele obținute în ser în loturile cu 24 ore reperfuzie s-a sesizat faptul că activitatea GST s-a ameliorat în lotul cu reperfuzie controlată comparativ cu expunerea la reperfuzia simplă, p=0,022.

Nu au fost identificate corelații între activitatea GST din serul sangvin și omogenatul ovarian în loturile de cercetare (tabelul A3.2).

Există publicații în care s-a raportat că activitatea GST a fost suprimată în leziunile tisulare oxidative induse de ischemie [24, 45, 51, 164]. Unul dintre rolurile pe care le are GST este de a lega substanțele străine de gruparea -SH a cisteinei din glutatation, neutralizându-le astfel regiunile electrofile și protejând celulele de efectele nocive ale acestora [24, 45]. Concomitent, GST poate preveni unele modificări oxidative prin conjugarea reversibilă a glutatationului cu anumite proteine prin procesul de S-glutatationilare [100]. Deci, activitatea GST în diferite condiții metabolice este dependentă de disponibilitatea glutatationului.

Diminuarea activității GST în studiul nostru în loturile cu TO poate fi datorată epuizării GSH de către alte enzime, cum ar fi GPO, sau scăderii activității GR din țesut.

În cercetarea noastră s-a evidențiat o tendință de reducere a cantității **glutatationului total (GT)** din omogenat odată cu aplicarea torsiunii ovariene (tabelul 6). Astfel, în lotul cu ischemie s-au înregistrat valori mai mici ale GT cu aproape 13% comparativ cu lotul martor, p>0,05. În loturile cu reperfuzie simplă au fost consemnate cifre ale GT cu aproximativ 7% (după 1 oră), respectiv cu 10% (după 24 ore) mai mici comparativ cu lotul martor, p>0,05. În loturile cu reperfuzie controlată (*on-off*) descreșterea GT a fost cu circa 6% (după 1 oră), p>0,05, respectiv cu aproape 10% (după 24 ore), p=0,012, comparativ cu lotul martor.

Nu au fost identificate diferențe statistic semnificative între nivelul GT din serul sangvin între loturile de cercetare,  $p > 0,05$ . Totuși, a fost observată tendința de creștere a cantității acestuia după 24 ore de reperfuzie cu circa 14% în tipul simplu și cu aproximativ 6% în tipul *on-off* comparativ cu lotul martor,  $p > 0,05$  (tabelul 6).

Tabelul 6. **Influența torsiunii/detorsiunii ovariene asupra nivelului de glutatation total și glutatation redus din serul sangvin și omogenatul ovarian**

Loturile de studiu	GT		GSH	
	ser, nmol/L	omogenat, pmol/g.prot.	ser, nmol/L	omogenat, pmol/g.prot.
Martor	200,916±4,549 (100%)	51,913±1,034 (100%)	146,484±5,311 (100%)	32,171±0,397 (100%)
Control	209,124±10,151 (104%)	51,214±3,021 (99%)	145,357±12,048 (99%)	32,198±0,873 (100%)
Ischemie	206,124±9,245 (103%)	45,265±2,572 (87%)	127,328±4,765 (87%)	24,841±2,571 (77%)
Ischemie/1 oră reperfuzie simplă	197,633±4,059 (98%)	48,356±3,002 (93%)	119,440±4,182 (82%) *	20,934±0,42 (65%) *** ## <sup>ddd</sup>
Ischemie/1 oră reperfuzie <i>on-off</i>	199,822±2,651 (100%)	48.607±0,481 (94%)	129,582±4,522 (89%)	23,055±0,644 (72%) *** ## <sup>dd</sup>
Ischemie /24 ore reperfuzie simplă	228,823±9,023 (114%)	46,449±4,329 (90%)	126,201±3,680 (86%)	24,828±1,247 (77%) ** ##
Ischemie/24 ore reperfuzie <i>on-off</i>	212,407±6,805 (106%)	46,633±0,804 (90%) *	136,342±3,921 (93%)	27,552±0,595 (86%) *** ## <sup>βββ φφ</sup>

Notă: GT – glutatation total; GSH – glutatation redus. Diferență statistic semnificativă comparativ cu:

- lotul martor: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ ;
- lotul control: # –  $p < 0,05$ ; ## –  $p < 0,01$ ; ### –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie: <sup>δ</sup> –  $p < 0,05$ ; <sup>δδ</sup> –  $p < 0,01$ ; <sup>δδδ</sup> –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/1 oră reperfuzie simplă: <sup>β</sup> –  $p < 0,05$ ; <sup>ββ</sup> –  $p < 0,01$ ; <sup>βββ</sup> –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/1 oră reperfuzie controlată: <sup>φ</sup> –  $p < 0,05$ ; <sup>φφ</sup> –  $p < 0,01$ ; <sup>φφφ</sup> –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/24 ore reperfuzie simplă: <sup>∫</sup> –  $p < 0,05$ ; <sup>∫∫</sup> –  $p < 0,01$ ; <sup>∫∫∫</sup> –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/24 ore reperfuzie controlată: <sup>∩</sup> –  $p < 0,05$ ; <sup>∩∩</sup> –  $p < 0,01$ ; <sup>∩∩∩</sup> –  $p < 0,001$ .

Nu au fost identificate corelații între cantitatea GT din serul sangvin și cea din omogenatul ovarian în loturile experimentale (tabelul A3.2).

Glutatationul este tiolul cu greutate moleculară mică predominant din celulele animale [94]. Cercetările experimentale ale lui Avci V. și coaut. (2020) referitor la homeostazia tiol-disulfidă din torsiunea ovariană au consemnat reducerea cantității totale a tiolilor la expunerea ovarelor torsiunii/detorsiunii comparativ cu lotul de control și cu lotul de animale doar cu torsiune ovariană [25].

Similar cu datele din literatura de specialitate și în studiul nostru se observă o reducere a cantității de GT disponibilă țesutului ovarian la aplicarea I/R comparativ cu loturile de animale care nu au fost expuse torsiunii ovariene. Nayki C. și coaut. (2018) au raportat diminuarea statistic



semnificativă a GT tisular chiar și după o ischemie de 2 ore, urmată de o reperfuzie de 2 ore comparativ cu lotul experimental fără TO [250]. Astfel, se constată un consum al GT de către celulele ovariene.

Într-o cercetare cu un model experimental asemănător cu cel utilizat în această lucrare s-au determinat cantități de glutatation total tisulare mai mici în lotul cu ischemie comparativ cu lotul cu animale sănătoase, iar cel mai mic nivel al acestui parametru a fost stabilit în lotul cu reperfuzie simplă, pe când în lotul cu reperfuzie controlată nivelul era apropiat valorilor notate pentru lotul cu animale intacte [99].

În studiul nostru TO a redus cantitatea de GT în omogenat, însă s-a observat că tipul de reperfuzie nu a influențat acest proces, așa cum nu au fost constatate diferențe statistic semnificative între loturi nici după 1 oră, nici după 24 ore de la restabilirea fluxului sangvin, utilizarea GT de către celulele ovariene fiind similară în ambele forme de detorsionare. Totuși, a fost consemnată tendința de diminuare a nivelului de GT din țesut odată cu trecerea timpului, așa cum în loturile evaluate după 24 ore de reperfuzie acesta a fost mai mic decât după 1 oră,  $p > 0,05$ .

Townsend D.M. (2009) reliefează faptul că nivelul de glutatation celular poate fi modificat de enzima GST ca răspuns la producerea de SRO, fiind utilizat în procesul de S-glutationilare [100]. Astfel, un factor major care afectează homeostazia glutatationului este utilizarea acestuia în reacții de conjugare, în special de către GST, iar un determinant important al răspunsului celular la stresul oxidativ ar putea fi legat de cantitatea și forma glutatationului, oxidat sau redus.

Tendința de majorare a GT în ser observată în loturile experimentale după 24 ore de la detorsionare ar putea fi datorată implicării și reacției altor organe la TO, cum ar fi ficatul, despre care se știe că joacă un rol central în homeostazia interorganică a GSH, exportând o mare parte din glutatationul pe care îl sintetizează în plasmă [252].

Nu au fost stabilite diferențe între cantitatea de **glutatation redus (GSH)** din loturile martor și control atât în omogenat, cât și în ser,  $p > 0,05$  (tabelul 6).

În omogenat torsiunea ovariană a indus o tendință de reducere a cantității de GSH cu aproximativ 23% comparativ cu lotul martor,  $p > 0,05$ . Reperfuzia în perioada inițială, după 1 oră, a continuat să aprofundeze diferențele față de lotul martor, observându-se descreșterea cu circa 35% a nivelului de GSH în lotul cu reperfuzie simplă,  $p < 0,001$ , și cu aproape 28% în lotul cu reperfuzie *on-off*,  $p < 0,001$ , comparativ cu lotul martor (tabelul 6). Comparativ cu lotul de animale expus doar ischemiei ovariene, în loturile cu 1 oră reperfuzie s-a sesizat micșorarea GSH, mai exprimat în lotul cu reperfuzie simplă,  $p > 0,05$ .

După 24 ore de reperfuzie, în tipul simplu, s-a constatat un nivel scăzut de GSH în omogenatul ovarian cu aproximativ 23%,  $p = 0,002$ , iar în tipul *on-off*, cu 14%,  $p < 0,001$ , comparativ cu lotul martor (tabelul 6). Astfel, s-a identificat o utilizare ovariană mai intensă a GSH în loturile

cu reperfuzie simplă vs. loturile cu reperfuzie controlată, consemnându-se valori mai mici cu 35% vs. 28% după 1 oră, respectiv cu 23% vs. 14% după 24 ore comparativ cu lotul martor.

Aceeași tendință de micșorare a cantității de GSH a fost stabilită și în ser, unde ischemia l-a redus cu aproape 13% comparativ cu lotul martor,  $p > 0,05$ . Ulterior, la reperfuzie GSH s-a menținut scăzut, mai exprimat în loturile cu reperfuzie simplă decât în cele cu reperfuzie *on-off*. Astfel, în loturile cu 1 oră reperfuzie, în tipul simplu GSH s-a micșorat cu aproximativ 18%,  $p = 0,013$ , iar în tipul controlat, cu aproape 11%,  $p > 0,05$ , comparativ cu lotul martor. În loturile cu 24 ore reperfuzie cantitatea GSH a fost mai mică cu circa 14% în tipul simplu,  $p > 0,05$ , și cu aproape 7% în tipul controlat,  $p > 0,05$ , comparativ cu lotul martor (tabelul 6).

Așadar, în ser s-a remarcat efectul benefic al reperfuziei prin aplicarea manevrei *on-off* în restabilirea nivelului de GSH, fapt confirmat de înregistrările efectuate după reperfuzia simplă vs. controlată când cantitatea GSH a fost mai mică cu 18% vs. 11% (după 1 oră) și 14% vs. 7% (după 24 ore) comparativ cu lotul martor.

Nu au fost stabilite corelații între cantitatea GSH din serul sanguin și cea din omogenat în loturile de cercetare (tabelul A3.2).

GSH, fiind o moleculă antioxidantă cu ajutorul căreia poate fi evaluat potențialul de protecție în condiții de stres oxidativ, a fost măsurată în mai multe studii experimentale. S-a constatat că ischemia ovariană reduce cantitatea de GSH, acest fapt fiind amplificat de reperfuzie [99]. GSH, ca antioxidant, reacționează cu peroxizii și radicalii liberi, transformându-i în produse inofensive, protejând astfel celulele împotriva posibilelor leziuni oxidative [45].

Se consideră că un nivel ridicat de GSH arată vitalitatea celulelor în timp ce o scădere a cantității de GSH arată slăbirea și deteriorarea sistemului de apărare celulară [24].

Cercetarea efectuată de Melekoglu R. și coaut. (2018) a înregistrat date similare cu ale noastre, unde cantitatea de GSH din țesutul ovarian s-a redus după expunerea ovarelor la fenomenul I/R [165]. În același timp, Celik Kavak E. și coaut. (2018) au demonstrat că atât torsiunea, cât și torsiunea/detorsiunea sunt capabile să reducă semnificativ cantitatea de GSH din țesut [27]. Descrșteri statistic semnificative ale nivelului de GSH tisular după 3 ore de ischemie ovariană, urmate de 24 ore de reperfuzie simplă au fost notate și de Ersoy G.S. și coaut. (2016) [241]. Astfel, în diferite publicații științifice sunt raportate rezultate care arată un consum al GSH în TO, ceea ce este observat și în urma analizei datelor noastre.

Una dintre cauzele micșorării cantității tisulare de GSH în torsiunea ovariană ar putea fi datorată interacțiunii acestuia cu  $\text{NO}^{\cdot}$ , având loc o reacție de S-nitrozilare cu formarea GSNO (S-nitrozoglutation) [228]. Această ipoteză este susținută de faptul că în studiul nostru în țesutul ovarian atât activitatea GPO, cât și cea a GST, care sunt enzime consumatoare de GSH, s-a redus comparativ cu lotul martor, indicând că principalul motiv al diminuării GSH ar putea fi altul.

Concomitent, această teorie ar putea fi argumentată și de supoziția că ovarele utilizează DNO pentru a se proteja de efectele ischemiei, transformând intens nitritul în oxid nitric, care, la rândul său, dacă este în concentrații mari interacționează cu GSH, scăzându-i cantitatea.

Nu au fost stabilite diferențe între cantitatea de **glutation oxidat (GSSG)** măsurată în omogenat în loturile martor și control,  $p > 0,05$ . Ischemia ovariană nu a determinat o majorare semnificativă a GSSG în țesut comparativ cu lotul martor ( $19,742 \pm 1,210$  pmol/g.prot. vs.  $20,423 \pm 2,324$  pmol/g.prot.,  $p > 0,05$ ). Reperfuzia în perioada inițială (după 1 oră) a amplificat formarea GSSG cu aproximativ 39% în tipul simplu (de la  $19,742 \pm 1,210$  pmol/g.prot. până la  $27,421 \pm 2,753$  pmol/g.prot.,  $p > 0,05$ ) și cu aproape 29% în tipul controlat (de la  $19,742 \pm 1,210$  pmol/g.prot. până la  $25,552 \pm 0,562$  pmol/g.prot.,  $p = 0,011$ ) comparativ cu lotul martor. După 24 ore de reperfuzie tendința GSSG a fost de a scădea comparativ cu perioada inițială de reperfuzie. Astfel, în lotul fără manevra *on-off* GSSG s-a menținut crescut cu doar 10% (de la  $19,742 \pm 1,210$  pmol/g.prot. până la  $21,621 \pm 3,726$  pmol/g.prot.,  $p > 0,05$ ) comparativ cu lotul martor, iar în lotul la care s-a aplicat tehnica *on-off* nivelul de GSSG a fost apropiat de cel înregistrat în lotul martor, valorile fiind cu aproape 3% mai mici ( $19,742 \pm 1,210$  pmol/g.prot. vs.  $19,081 \pm 0,551$  pmol/g.prot.,  $p > 0,05$ ) (figura 17).

Nu au fost remarcate diferențe statistic semnificative între cantitatea de GSSG din ser între loturile martor și control,  $p > 0,05$  (figura 17). Totuși, s-a observat o tendință de creștere cu aproximativ 17% (de la  $54,432 \pm 7,649$  nmol/L până la  $63,767 \pm 5,515$  nmol/L) a GSSG în ser datorită intervenției noastre.

Ischemia a indus o tendință de majorare a GSSG în ser, fiind notate valori cu aproape 45% mai mari comparativ cu lotul martor (de la  $54,432 \pm 7,649$  nmol/L până la  $78,786 \pm 9,116$  nmol/L,  $p > 0,05$ ).

După reperfuzia simplă de 1 oră s-a consemnat un nivel al GSSG mai mare cu circa 44% (de la  $54,432 \pm 7,649$  nmol/L până la  $78,192 \pm 2,959$  nmol/L,  $p > 0,05$ ), iar după 24 ore, cu aproape 89% (de la  $54,432 \pm 7,649$  nmol/L până la  $102,622 \pm 9,856$  nmol/L,  $p = 0,017$ ) comparativ cu lotul martor.

Comparativ cu lotul de animale expus doar torsionii ovariene, reperfuzia simplă de 1 oră a menținut cantitatea de GSSG la același nivel,  $p > 0,05$ , însă după 24 ore s-a evidențiat o augmentare cu aproape 30% (de la  $78,786 \pm 9,116$  nmol/L până la  $102,622 \pm 9,856$  nmol/L,  $p > 0,05$ ). Așadar, s-a constatat că reperfuzia simplă a sporit conținutul de glutacion oxidat în ser după 24 ore de la restabilirea circulației sangvine, sugerând faptul că procesele oxidative s-au amplificat după 1 oră de la detorsiunea ovarelor.

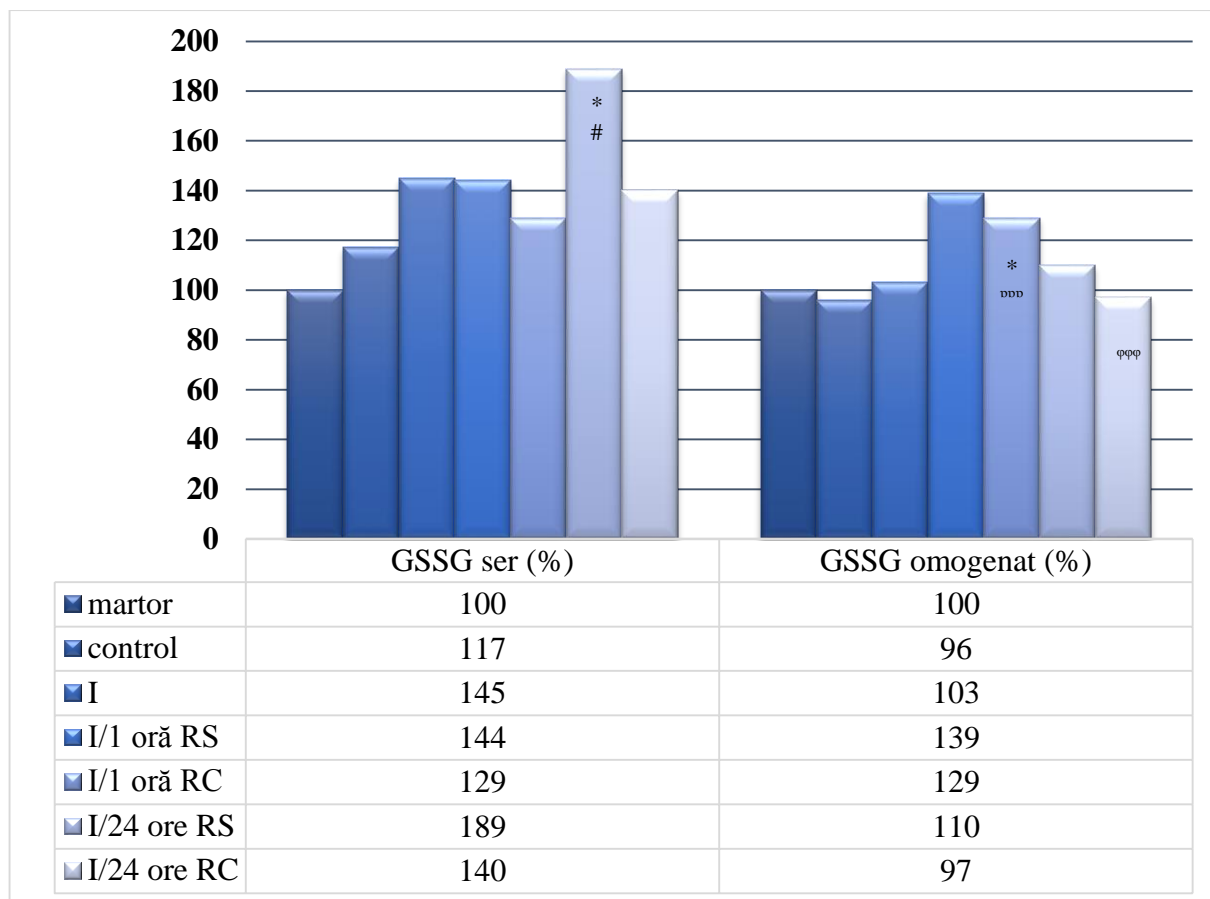


Figura 17. Nivelul glutationului oxidat din serul sangvin și omogenatul ovarian în torsiunea/detorsiunea ovariană experimentală

Notă: I – ischemie; RS – reperfuție simplă; RC – reperfuție controlată (*on-off*); GSSG – glutation oxidat. Diferență statistic semnificativă comparativ cu:

- lotul martor: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ ;
- lotul control: # –  $p < 0,05$ ; ## –  $p < 0,01$ ; ### –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie:  $\delta$  –  $p < 0,05$ ;  $\delta\delta$  –  $p < 0,01$ ;  $\delta\delta\delta$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/1 oră reperfuție simplă:  $\beta$  –  $p < 0,05$ ;  $\beta\beta$  –  $p < 0,01$ ;  $\beta\beta\beta$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/1 oră reperfuție controlată:  $\varphi$  –  $p < 0,05$ ;  $\varphi\varphi$  –  $p < 0,01$ ;  $\varphi\varphi\varphi$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/24 ore reperfuție simplă:  $\int$  –  $p < 0,05$ ;  $\int\int$  –  $p < 0,01$ ;  $\int\int\int$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/24 ore reperfuție controlată:  $\cup$  –  $p < 0,05$ ;  $\cup\cup$  –  $p < 0,01$ ;  $\cup\cup\cup$  –  $p < 0,001$ .

Reperfuția controlată a avut un efect mai puțin exprimat asupra producerii de GSSG în ser, obținându-se valori cu circa 29% mai mari în lotul cu 1 oră reperfuție *on-off* (de la  $54,432 \pm 7,649$  nmol/L până la  $70,240 \pm 4,349$  nmol/L,  $p > 0,05$ ), respectiv cu 40% mai mari în lotul cu 24 ore reperfuție *on-off* (de la  $54,432 \pm 7,649$  nmol/L până la  $76,064 \pm 5,623$  nmol/L,  $p > 0,05$ ) comparativ cu lotul martor (figura 17). Astfel, în ser în loturile cu reperfuție simplă s-a produs mai mult GSSG comparativ cu loturile cu reperfuție controlată, fapt susținut de creșterile GSSG după 1 oră cu 44% vs. 29%, respectiv după 24 ore cu 89% vs. 40% comparativ cu lotul martor.

Comparând rezultatele GSSG măsurate în ser în loturile cu reperfuție controlată cu cele din lotul cu ischemie s-a observat o diminuare a proceselor oxidative în urma aplicării manevrei *on-off*, fapt susținut de o reducere a cantității de glutation oxidat cu aproximativ 11% după 1 oră de

reperfuzie (de la 78,786±9,116 nmol/L până la 70,240±4,349 nmol/L,  $p>0,05$ ) și cu aproape 4% după 24 ore (de la 78,786±9,116 nmol/L până la 76,064±5,623 nmol/L,  $p>0,05$ ).

A fost identificată o corelație puternic negativă între cantitatea GSSG din ser și cea din omogenatul ovarian ( $r_s=-0,915$ ,  $p<0,001$ ) doar în lotul cu ischemie/24 ore reperfuzie controlată (tabelul A3.2).

Există cercetări care arată că expunerea la hipoxie va induce scăderea activității enzimelor antioxidante, precum și reducerea conținutului de glutation celular. Astfel de modificări, care reprezintă o reglare posibilă adaptativă în hipoxie, ar predispuce celulele la creșterea producerii de SRO după reoxigenarea mitocondriilor [70].

GSH este o moleculă care protejează celulele împotriva efectelor citotoxice ale radicalilor liberi. Yayla M. și coaut. (2018) presupun că reducerea activității SOD și a cantității de GSH în ischemie și reperfuzie poate fi datorată supraproducerii de anioni superoxid [44]. Sunt publicații care consemnează faptul că SRO scad antioxidanții naturali, precum glutationul (GSH) și superoxid dismutaza, care se micșorează la aplicarea manevrelor I/R ovariene [40].

Reperfuzia după ischemie reduce nivelul de GSH [28, 45, 51] și este raportată ca provocând daune severe țesutului ovarian [45, 51]. Inclusiv în cercetări efectuate pe oameni rezultatele înregistrate sugerează că în caz de torsiune ovariană GSH este consumat de către organism [192]. Oxidarea GSH și generarea de glutation oxidat (GSSG) sunt menționate în literatură ca o dovadă a stresului oxidativ și a unui dezechilibru redox. În general, orice afecțiune asociată cu producerea de SRO va scădea nivelul de GSH [109], ceea ce este consemnat și în cercetarea noastră.

Se cunoaște faptul că NADPH-ul este un cofactor esențial pentru restabilirea glutationului redus (GSH) din glutation oxidat (GSSG), care este cel mai abundent și important antioxidant din celulele mamiferelor. Concomitent, NADPH-ul este utilizat pentru a transforma tioredoxina oxidată în tioredoxină redusă, care, de asemenea, are un rol în sistemul de protecție antioxidantă [98]. În literatura de specialitate au fost identificate rezultate care consemnează faptul implicării glucozo-6-fosfat dehidrogenazei și izocitrat dehidrogenazei citoplasmatică NADP<sup>+</sup>-dependente în producerea de NADPH în ovare [253]. Activitatea acestor enzime și, respectiv, producerea de NADPH este diferită în diverse țesuturi, sugerându-se posibilitatea existenței unei protecții sau leziuni diferențiate dependentă de tipul țesutului [97].

Glucozo-6-fosfat dehidrogenaza este o sursă majoră de NADPH celular care are rolul de a diminua SO, crescând concentrația de GSH [97].

În cercetarea noastră nu au fost consemnate diferențe între activitatea **glucozo-6-fosfat dehidrogenazei (G6PDH)** din loturile martor, control și ischemie ovariană atât în omogenat, cât și în ser,  $p>0,05$  (figura 18).

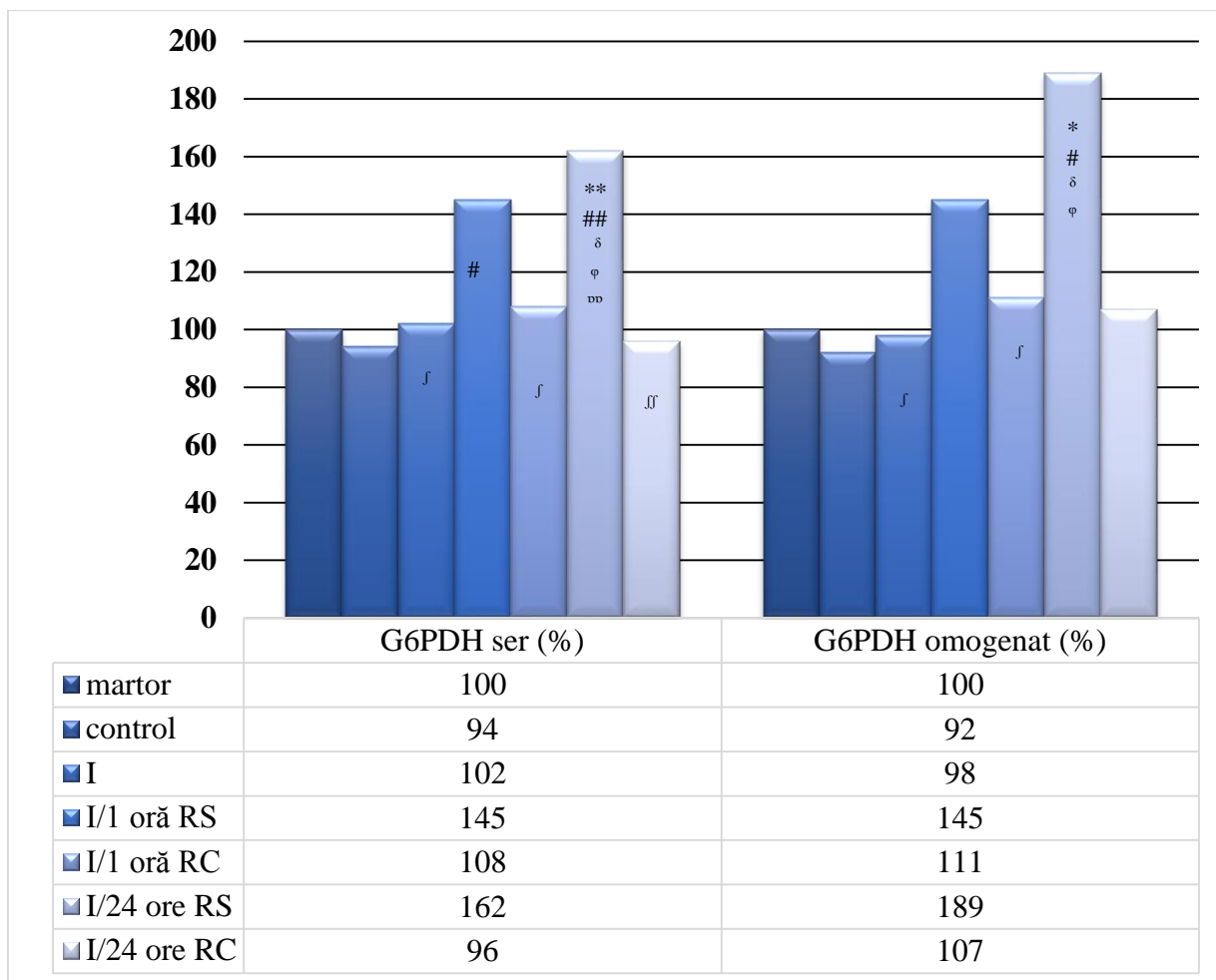


Figura 18. Acțiunea torsiunii/detorsiunii ovariene experimentale asupra activității glucozo-6-fosfat dehidrogenazei din serul sangvin și omogenatul ovarian

Notă: I – ischemie; RS – reperfuție simplă; RC – reperfuție controlată (*on-off*); G6PDH – glucozo-6-fosfat dehidrogenaza. Diferență statistic semnificativă comparativ cu:

- lotul martor: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ ;
- lotul control: # –  $p < 0,05$ ; ## –  $p < 0,01$ ; ### –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie:  $\delta$  –  $p < 0,05$ ;  $\delta\delta$  –  $p < 0,01$ ;  $\delta\delta\delta$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/1 oră reperfuție simplă:  $\beta$  –  $p < 0,05$ ;  $\beta\beta$  –  $p < 0,01$ ;  $\beta\beta\beta$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/1 oră reperfuție controlată:  $\varphi$  –  $p < 0,05$ ;  $\varphi\varphi$  –  $p < 0,01$ ;  $\varphi\varphi\varphi$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/24 ore reperfuție simplă:  $\int$  –  $p < 0,05$ ;  $\int\int$  –  $p < 0,01$ ;  $\int\int\int$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/24 ore reperfuție controlată:  $\cup$  –  $p < 0,05$ ;  $\cup\cup$  –  $p < 0,01$ ;  $\cup\cup\cup$  –  $p < 0,001$ .

Reperfuția a modificat activitatea G6PDH, observându-se tendințe de creștere a acesteia atât în omogenat, cât și ser.

În omogenatul ovarian s-a constatat intensificarea activității enzimei în loturile cu reperfuție simplă comparativ cu cea ce s-a consemnat în loturile cu reperfuție controlată. Astfel, comparând activitatea G6PDH din lotul martor cu cea din loturile cu reperfuție, s-a evidențiat sporirea activității în toate loturile de cercetare, după cum urmează: cu aproximativ 45% în lotul cu 1 oră reperfuție simplă (de la  $7,316 \pm 0,765$  nmol/s/g.prot. până la  $10,610 \pm 1,294$  nmol/s/g.prot.,  $p > 0,05$ ), 11% în lotul cu 1 oră reperfuție controlată (de la  $7,316 \pm 0,765$  nmol/s/g.prot. până la  $8,087 \pm 0,434$

nmol/s/g.prot.,  $p > 0,05$ ), 89% în lotul cu 24 ore reperfuzie simplă (de la  $7,316 \pm 0,765$  nmol/s/g.prot. până la  $13,804 \pm 1,491$  nmol/s/g.prot.,  $p = 0,023$ ) și cu doar 7% în lotul cu 24 ore reperfuzie controlată (de la  $7,316 \pm 0,765$  nmol/s/g.prot. până la  $7,836 \pm 0,967$  nmol/s/g.prot.,  $p > 0,05$ ). Deci, creșterile cu aproximativ 45%, respectiv 89% în loturile cu reperfuzie simplă comparativ cu 11%, respectiv 7% în loturile *on-off* indică clar că activitatea G6PDH este influențată de modelul de reperfuzie. Comparativ cu lotul de animale expus doar torsionii ovariene s-a identificat o sporire statistic semnificativă a G6PDH doar în lotul de animale cu 24 ore reperfuzie simplă (cu aproape 93%, de la  $7,168 \pm 0,529$  nmol/s/g.prot. până la  $13,804 \pm 1,491$  nmol/s/g.prot.,  $p = 0,018$ ), în celelalte loturi cu reperfuzie consemnându-se doar o tendință de mărire,  $p > 0,05$ .

Analizându-se rezultatele obținute în ser în perioada inițială (la 1 oră după reperfuzie), s-a consemnat o tendință de majorare a activității G6PDH, mai exprimat în lotul cu reperfuzie simplă, cu aproximativ 45% (de la  $24,852 \pm 2,426$  nmol/s/L până la  $36,106 \pm 2,620$  nmol/s/L,  $p > 0,05$ ) comparativ cu lotul martor. După 24 ore de reperfuzie simplă activitatea G6PDH s-a menținut înaltă, determinându-se o majorare statistic semnificativă cu aproape 62% (de la  $24,852 \pm 2,426$  nmol/s/L până la  $40,326 \pm 3,904$  nmol/s/L,  $p = 0,007$ ) comparativ cu lotul martor și cu 59% (de la  $25,321 \pm 2,634$  nmol/s/L până la  $40,326 \pm 3,904$  nmol/s/L,  $p = 0,01$ ) comparativ cu lotul doar cu ischemie ovariană.

Nu au fost stabilite diferențe statistic semnificative între activitatea G6PDH din serul animalelor din loturile cu reperfuzie controlată comparativ cu cea măsurată în loturile martor și ischemie,  $p > 0,05$ . Comparând rezultatele notate în loturile cu reperfuzie simplă și controlată, s-a remarcat faptul că activitatea enzimei a fost mai intensă în loturile care nu au fost supuse procedurii *on-off*. Diferența respectivă a fost evidentă după 24 ore de la detorsionare, unde în lotul fără intervenție *on-off* s-au determinat valori aproape duble ale G6PDH comparativ cu cele măsurate în lotul cu 24 ore reperfuzie controlată ( $40,326 \pm 3,904$  nmol/s/L vs.  $23,914 \pm 3,385$  nmol/s/L,  $p = 0,003$ ).

Nu au fost înregistrate corelații între activitatea G6PDH din ser și cea din omogenatul ovarian în loturile de cercetare (tabelul A3.1).

G6PDH, enzimă reglatoare din calea pentozo-fosfaților, produce NADPH pentru a susține reciclarea glutatationului. Astfel, G6PDH catalizează conversia glucozo-6-fosfatului în 6-fosfogluconolactonă cu transformarea  $\text{NADP}^+$  în NADPH. Activitatea acestei enzime este un factor determinant important al raportului  $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$  din citoplasmă care contribuie la suplینirea sistemului antioxidant cu glutatıon redus, datorită acțiunii enzimei GR. Totuși, prin modificarea concentrației de NADPH, activitatea G6PDH poate influența și producerea de superoxid de către enzime ca NADPH oxidaza, nitric oxid sintaza și xantin oxidaza. Astfel, Hecker P.A. și coaut. (2012) au remarcat că o creștere a activității G6PDH va determina majorarea atât a

NADPH, cât și a anionului superoxid, iar inhibarea enzimei va reduce atât cantitatea de NADPH, cât și producerea de SRO [254]. Deci, este posibil ca una dintre cauzele aprofundării leziunilor oxidative din perioada de reperfuzie să fie datorată intensificării producerii de NADPH de către G6PDH ca răspuns la stresul oxidativ. Astfel, putem presupune că implicarea mai multor substanțe cu efect antioxidant care acționează prin diferite căi, blocând producerea de SRO și diminuând necesitatea includerii excesive a G6PDH în asigurarea protecției antioxidante ar aduce mai multe beneficii decât stimularea propriu-zisă a activității de regenerare a NADPH-ului, despre care s-a menționat anterior că poate fi utilizat de anumite enzime pentru sinteza de SRO.

Așa cum activitatea G6PDH a fost mai mare în loturile cu reperfuzie simplă comparativ cu celelalte loturi de cercetare, constatându-se concomitent și o majorare a cantității de DAM, PPOA și AGE, presupunem că în torsiunea ovariană G6PDH este mai mult implicată în susținerea proceselor oxidative decât în asigurarea protecției antioxidante. Ipoteza consumului de NADPH de către enzimele prooxidante în TO din cercetarea noastră este susținută de faptul menținerii reduse a activității tisulare a GR după reperfuzie, posibil din cauza lipsei unei cantități adecvate de NADPH, cât și a majorării cantității de GSSG.

Clasificarea izocitrat dehidrogenazelor este făcută în baza cofactorilor și localizarea lor intracelulară. Astfel, sunt distinse următoarele izoenzime: citoplasmatică și mitocondrială NADP<sup>+</sup>-dependente, și mitocondrială NAD<sup>+</sup>-dependentă [97, 98]. În studiul nostru am măsurat activitatea formei citoplasmatică. Decizia de a măsura activitatea acestei enzime în TO a avut la bază informațiile din literatura de specialitate care au arătat faptul că ea este capabilă să protejeze celulele de SO [255, 256], neexistând deficiențe în a utiliza izocitrat dehidrogenaza ca un indicator al potențialului redox al NADPH-ului liber citoplasmatic [257]. Așa cum principiul metodei are la bază creșterea densității optice a soluției în urma intensificării producerii de NADPH + H<sup>+</sup>, ca rezultat al decarboxilării oxidative a izocitratului, o mărire a densității optice este utilizată atât pentru estimarea activității enzimei [196], cât și pentru evaluarea capacității acesteia de a genera NADPH în condiții patologice specifice, cum ar fi torsiunea/detorsiunea ovariană experimentală.

Studiile au arătat că NADPH-ul este un cofactor important în diferite căi de biosinteză și participă inclusiv la regenerarea glutatationului redus, care este o moleculă importantă ce asigură protecția celulelor, preîntâmpinând leziunile oxidative. În același timp, s-a demonstrat faptul că izocitrat dehidrogenaza citoplasmatică NADP<sup>+</sup>-dependentă are un rol deosebit în reciclarea eficientă a glutatationului, iar celulele care dispun de cantități mai mici de enzimă sunt mult mai sensibile la SRO, suferind peroxidări ale lipidelor și leziuni ale AND-ului [258].

Cercetarea noastră nu a relevat diferențe statistice semnificative în activitatea **izocitrat dehidrogenazei citoplasmatică NADP<sup>+</sup>-dependente (ICDH)** între loturile experimentale atât în omogenat, cât și în ser,  $p > 0,05$  (tabelul 7). Totuși, s-a observat tendința de reducere a activității



enzimei odată cu torsionarea ovarelor și provocarea ischemiei. Reperfuzia a diminuat în continuare activitatea ICDH, mai exprimat în perioada inițială de reperfuzie (după 1 oră) și după 24 ore de reperfuzie simplă, mai puțin în lotul cu 24 ore de reperfuzie controlată, însă diferențele constatate au fost fără semnificație statistică,  $p>0,05$ .

**Tabelul 7. Activitatea izocitrat dehidrogenazei citoplasmatică NADP<sup>+</sup>-dependente din serul sangvin și omogenatul ovarian în torsiunea/detorsiunea ovariană**

Loturi de studiu	ICDH	
	ser, nmol/s/L	omogenat, nmol/s/g.prot.
Martor	77,371±4,955 (100%)	8,572±0,141 (100%)
Control	76,433±2,525 (99%)	8,48±0,393 (99%)
Ischemie	74,557±3,002 (96%)	8,3±0,198 (97%)
Ischemie/1 oră reperfuzie simplă	71,275±2,401 (92%)	8,217±0,318 (96%)
Ischemie/1 oră reperfuzie controlată ( <i>on-off</i> )	72,682±2,903 (94%)	8,154±0,073 (95%)
Ischemie/24 ore reperfuzie simplă	71,744±3,428 (93%)	8,091±0,275 (95%)
Ischemie/24 ore reperfuzie controlată ( <i>on-off</i> )	73,62±2,62 (95%)	8,482±0,227 (99%)

Notă: ICDH – izocitrat dehidrogenaza citoplasmatică NADP<sup>+</sup>-dependentă. Fără diferențe statistic semnificative între toate loturile de studiu,  $p>0,05$ .

A fost stabilită o corelație puternic negativă ( $r_s=-0,707$ ,  $p=0,022$ ) între activitatea ICDH din ser și cea din omogenatul ovarian doar în lotul cu ischemie/1 oră reperfuzie controlată (tabelul A3.1).

Cercetările experimentale efectuate pe rinichi de către Kim J. și coaut. (2009) au consemnat faptul că I/R reduce semnificativ atât expresia, cât și activitatea ICDH, micșorând producerea de NADPH și măbind raportul dintre glutatationul oxidat și glutatationul total [98].

Similar cu datele din literatură unde sunt raportate rezultatele acțiunii I/R asupra ICDH [98] și în studiul nostru au fost observate reduceri ale activității enzimei, totuși, nesemnificative. Una dintre concluziile noastre legate de lipsa intensificării activității ICDH în condiții de SO, demonstrată deja prin creșterea markerilor leziunilor oxidative precum DAM, PPOA, cât și a GSSG este că această enzimă nu este în mod evident implicată în asigurarea protecției celulare în torsiunea ovariană. Kim J. și coaut. (2009) presupun chiar că o reducere a activității ICDH ar putea fi nu doar un rezultat al leziunii I/R, dar și o cauză a acesteia [98].

Contrar celor constatate de Flint A.P.F. și coaut. (1970), care au raportat o activitate mult mai înaltă în ovare a ICDH comparativ cu G6PDH [253], noi am obținut valori în creștere pentru

activitatea G6PDH odată cu aplicarea manevrelor care sunt responsabile de intensificarea SO atât în omogenat, cât și în ser, iar activitatea ICDH fiind fără modificări semnificative între loturile experimentale. Aceasta poate fi sugestiv pentru faptul că în torsiunea ovariană G6PDH ar avea un rol esențial în asigurarea celulelor cu NADPH cu scopul suprimării SO ca și consecință a fenomenului I/R, ceea ce ar necesita, probabil, și o asigurare cu substrat corespunzător, incluzând administrarea de glucoză. Așa cum glucoza este utilizată în primul rând ca substrat energetic, utilizarea ei în generarea de NADPH ar presupune menținerea unor niveluri corespunzătoare plasmatică și celulare, astfel încât și sinteza de ATP să aibă loc în concentrații ce ar permite o funcționare adecvată. Deci, una dintre ipotezele care ar necesita verificare în cercetări ulterioare este că administrarea de glucoză în TO ar avea efect protector, reducând producerea SRO datorită menținerii activității G6PDH la un nivel optim necesităților celulelor.

În același timp, o activitate mai mică a ICDH și G6PDH în anumite loturi de studiu ar putea fi explicată prin faptul că NADPH-ul produs de către acestea acționează ca un inhibitor competitiv [253], reducându-le rata reacției. Astfel, am presupune existența unui lanț de reacții în TO care ar explica parțial rezultatele consemnate, după cum urmează: 1) amplificarea SO cu o creștere a cantității de SRO, 2) intervenția sistemului antioxidant pentru neutralizarea acestora, concomitent cu micșorarea nivelului de GSH și majorarea de GSSG, 3) includerea enzimelor generatoare de NADPH cu amplificarea sintezei acestuia, ulterior, 4) cu o mărire a GSH și micșorare a GSSG, dar și 5) o inhibiție competitivă a ICDH și G6PDH, pe măsură ce cantitatea de NADPH crește.

Posibil că în torsiunea ovariană fenomenul de inhibiție competitivă este mult mai exprimat asupra ICDH decât asupra G6PDH.

Intervenția noastră a determinat o majorare a **ceruloplasminei (CP)** cu aproape 9% în lotul de control comparativ cu lotul martor (de la  $396,718 \pm 2,109$  mg/L, până la  $432,762 \pm 8,760$  mg/L,  $p=0,028$ ) (figura 19).

Torsiunea ovariană a menținut crescut nivelul CP, fiind înregistrate valori cu aproape 7% mai mari comparativ cu lotul martor (de la  $396,718 \pm 2,109$  mg/L până la  $425,614 \pm 3,039$  mg/L,  $p<0,001$ ).

Reperfuzia a indus activarea proceselor care au majorat statistic semnificativ CP în serul sangvin cu aproximativ 16% în ambele loturi cu reperfuzie de 1 oră (de la  $396,718 \pm 2,109$  mg/L până la  $460,153 \pm 6,650$  mg/L în tipul simplu de reperfuzie,  $p<0,001$ , și până la  $458,423 \pm 3,262$  mg/L în tipul controlat,  $p<0,001$ ). După 24 ore de reperfuzie s-a observat menținerea valorilor înalte ale CP. Astfel, în lotul cu reperfuzie simplă s-a înregistrat un nivel al CP cu aproape 17% mai mare decât în lotul martor (de la  $396,718 \pm 2,109$  mg/L până la  $465,27 \pm 5,334$  mg/L,  $p<0,001$ ), iar în lotul cu reperfuzie controlată cu aproximativ 12% mai înalt (de la  $396,718 \pm 2,109$  mg/L până la  $443,899 \pm 4,343$  mg/L,  $p<0,001$ ).

A fost evidentă diferența dintre cantitatea CP măsurată în lotul cu ischemie și cea din loturile cu reperfuzie. Astfel, comparativ cu lotul cu ischemie au fost înregistrate creșteri semnificative cu aproximativ 8% în loturile cu 1 oră reperfuzie (de la 425,614±3,039 mg/L până la 460,153±6,650 mg/L în tipul simplu, p=0,006, și, respectiv până la 458,423±3,262 mg/L în tipul *on-off*, p<0,001), cu aproape 9% în lotul cu 24 ore reperfuzie simplă (de la 425,614±3,039 mg/L până la 465,27±5,334 mg/L, p<0,001), respectiv 4% în lotul cu 24 ore reperfuzie *on-off* (de la 425,614±3,039 mg/L până la 443,899±4,343 mg/L, p=0,041). Nu au fost identificate diferențe statistic semnificative între nivelul CP măsurat în loturile cu reperfuzie simplă și cele cu reperfuzie controlată atât după 1 oră, cât și după 24 ore de la restabilirea fluxului sangvin, p>0,05.

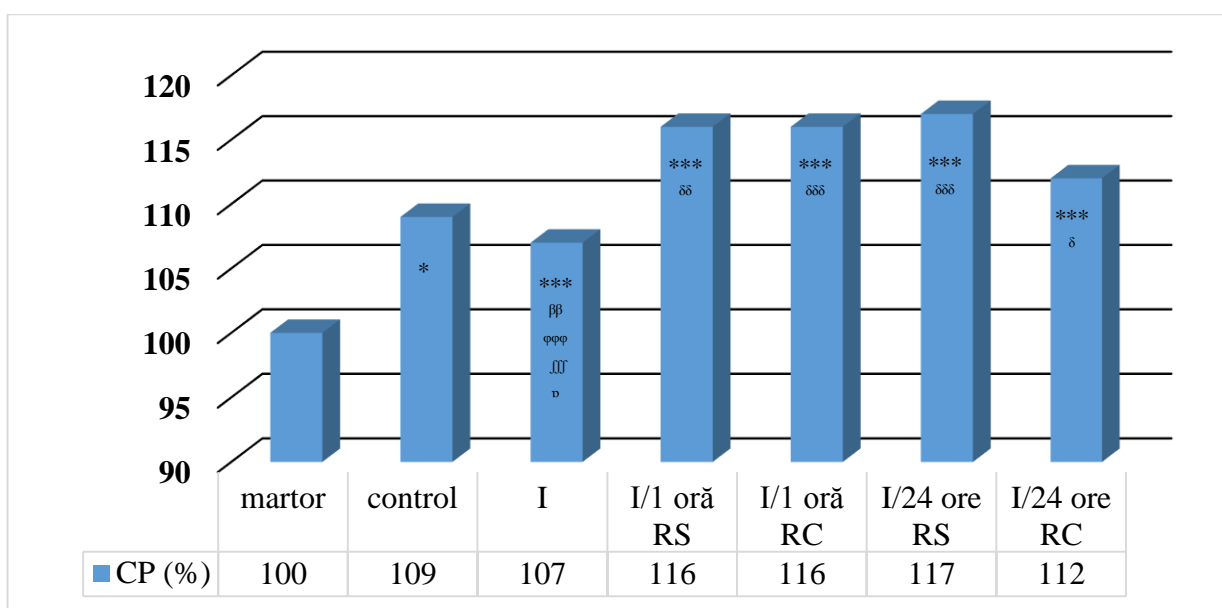


Figura 19. Ceruloplasmina din serul sangvin în torsiunea ovariană experimentală

Notă: I – ischemie; RS – reperfuzie simplă; RC – reperfuzie controlată (*on-off*); CP – ceruloplasmina. Diferență statistic semnificativă comparativ cu:

- lotul martor: \* – p<0,05; \*\* – p<0,01; \*\*\* – p<0,001;
- lotul control: # – p<0,05; ## – p<0,01; ### – p<0,001;
- lotul ischemie: δ – p<0,05; δδ – p<0,01; δδδ – p<0,001;
- lotul ischemie/1 oră reperfuzie simplă: β – p<0,05; ββ – p<0,01; βββ – p<0,001;
- lotul ischemie/1 oră reperfuzie controlată: φ – p<0,05; φφ – p<0,01; φφφ – p<0,001;
- lotul ischemie/24 ore reperfuzie simplă: ∫ – p<0,05; ∫∫ – p<0,01; ∫∫∫ – p<0,001;
- lotul ischemie/24 ore reperfuzie controlată: ∪ – p<0,05; ∪∪ – p<0,01; ∪∪∪ – p<0,001.

Ceruloplasmina este o glicoproteină plasmatică care are mai multe caracteristici, cum ar fi că este o feroxidază, participă în transportul cuprului, are proprietăți antioxidante, activitate antiinflamatoare, dar și proinflamatoare. Proprietățile antioxidante și antiinflamatoare sunt legate de activitatea ceruloplasminei în calitate de feroxidază, catalizând oxidarea Fe<sup>2+</sup> la Fe<sup>3+</sup> [259], care este preluat de transferină și, astfel, se împiedică participarea Fe<sup>2+</sup> la generarea radicalilor hidroxil. De asemenea, se presupune că efectul antiinflamator al ceruloplasminei ar fi datorat acțiunii inhibitorii asupra producerii de acid hipocloros de către MPO [84]. Acest proces de inhibare ar fi

posibil din cauza interacțiunii electrostatice dintre cele două proteine, care ar avea loc datorită naturii cationice a MPO și anionice a ceruloplasminei [84, 102]. Efectul proinflamator al ceruloplasminei este asociat cu formarea radicalului hidroxil prin reacția de tip Fenton cu participarea  $\text{Cu}^{2+}$ , care este legat slab de CP [259].

CP este cunoscută ca o proteină de fază acută care crește de 2 sau chiar de 3 ori în afecțiuni inflamatoare [259]. Diferențele dintre nivelurile de CP înregistrate în loturile cu ischemie și ischemie/reperfuzie au fost ne semnificative statistic ( $p > 0,05$ ) comparativ cu lotul de control, totuși, comparativ cu lotul martor cantitatea de CP a fost statistic semnificativ mai mare ( $p < 0,001$ ), ceea ce ne sugerează că intervenția noastră induce activarea proceselor specifice care vor majora concentrația de CP în ser [260].

Atasever M. și coaut. (2017) au constatat reducerea cantității de CP după aplicarea ischemiei ovariene comparativ cu lotul de control [47], micșorare care a fost sesizată și în cercetarea noastră (de la  $432,762 \pm 8,760$  mg/L până la  $425,614 \pm 3,039$  mg/L,  $p > 0,05$ ). Însă, odată cu restabilirea fluxului sangvin, fără vreo altă intervenție terapeutică, Atasever M. și coaut. (2017) au remarcat o creștere a CP în lotul cu I/R comparativ cu lotul expus doar ischemiei ovariene, dar fără a depăși valorile consemnate în lotul de control [47], ceea ce este contrar rezultatelor noastre care au relevat o majorare a CP în loturile cu I/R peste nivelurile măsurate în lotul de control,  $p > 0,05$ , diferența fiind mult mai evidentă comparativ cu lotul martor,  $p < 0,001$ , și comparativ cu lotul de animale expus doar ischemiei ovariene,  $p < 0,05$ .

Fiind o proteină de fază acută, valorile CP ar fi trebuit să crească semnificativ în loturile cu torsiune și torsiune/detorsiune comparativ cu lotul de control [260], așa cum deja s-a observat în studiu că procesele inflamatorii sunt intense în aceste loturi, fapt demonstrat prin cantități mai mari de PPOA măsurate după aplicarea ischemiei ovariene și amplificate de restabilirea fluxului sangvin. Astfel, presupunem că ceruloplasmina a fost consumată atât în timpul protecției antioxidante [260], cât și antiinflamatoare, așa cum în literatura de specialitate sunt date care indică faptul că mieloperoxidaza, enzimă prooxidantă, și ceruloplasmina pot interacționa și forma complexe care au fost observate în plasma și serul pacienților care sufereau de afecțiuni inflamatoare [84]. Deci, una dintre ipotezele noastre este că CP ar fi implicată în diminuarea SO și inflamației în TO prin interacțiunea cu MPO și reducerea acțiunii nocive a acesteia.

Cercetarea noastră a remarcat reducerea protecției antioxidante tisulare în urma expunerii ovarelor torsiunii și, ulterior, reperfuziei, marcate prin valori mai mici în omogenat ale SOD, CAT, GR, GPO, GST, GT, GSH, ICDH și cu o majorare a cantității de GSSG. Concomitent, s-a observat că nu în toate loturile experimentale este prezentă corelația sangvino-tisulară a parametrilor examinați, ceea ce nu ne permite să facem concluzii favorabile referitor la prezența unei interdependențe a fenomenelor care au loc în ovare cu expresia biochimică sangvină a acestora.

Totodată, se pare că CP are un rol important în TO prin influențarea procesului inflamator, iar intensificarea activității tisulare a G6PDH în perioada de reperfuzie să fie un trigger pentru amplificarea leziunilor oxidative.

### 3.5. Sinteza rezultatelor studiului

În cercetarea noastră ne-am propus să identificăm modificările metabolice ale deteriorării structural-funcționale a ovarelor torsionate și mecanismele de compensare, precum și elucidarea potențialului preventiv al tehnicii *on-off* de restabilire a circulației sangvine în organ.

Trebuie să menționăm că pentru a stabili fără dubii dacă schimbările metabolice identificate sunt induse de torsiunea ovariană, a fost inclus în studiu un lot suplimentar – de control. Animalele acestui lot au fost supuse doar laparotomiei. Lipsa diferențelor statistic semnificative ale indicilor de laborator mășurați în loturile control și martor în omogenatul ovarian (tabelul 1, pag. 42) ne permite să conchidem că laparotomia nu influențează markerii biochimici evaluați în țesutul ovarian și schimbările sunt produse de patologia cercetată.

Am stabilit că torsiunea ovariană, odată cu blocarea completă a fluxului sangvin, a intensificat metabolismul anaerob, a crescut producerea de SRO, a indus modificarea oxidativă a diferitor molecule (figura 20) și a redus activitatea de protecție antioxidantă a unor enzime din țesutul ovarian (figura 21).

Astfel, la animalele din **lotul experimental expus ischemiei ovariene** s-a constatat majorarea în omogenat a cantității de lactat cu aproape 38%,  $p=0,006$ , și a activității LDH-P cu 30%,  $p<0,001$  (figura 20), iar nivelul de AIM rămânând apropiat de cel din lotul martor, însă cu o ușoară tendință de creștere,  $p>0,05$  (tabelul 2, pag. 52). Deci, este evident faptul declanșării în celule a mecanismelor de adaptare în condițiile întreruperii alimentării cu oxigen, oxidarea anaerobă a glucozei asigurând energia necesară supraviețuirii. Modificări similare ale markerilor ischemiei au fost consemnate și în serul sangvin, unde s-a apreciat o mărire a valorilor lactatului cu aproape 66%,  $p<0,001$  (figura 11, pag. 45), activității LDH-P cu 20%,  $p=0,002$  (figura 11, pag. 45), iar cantitatea de AIM detectată fiind mai mare cu aproximativ 19%,  $p<0,001$  (tabelul 2, pag. 52), comparativ cu lotul martor. În același timp, ischemia a redus semnificativ activitatea LDH-L în serul sangvin cu aproape 25%,  $p=0,04$  (figura 11, pag. 45) și nesemnificativ în omogenat cu 9%,  $p>0,05$  (figura 10, pag. 44), comparativ cu lotul martor. Chiar dacă nu au fost stabilite corelații sangvino-tisulare ale acestor indici studiați la modelarea TO, datele înregistrate sugerează necesitatea evaluării atente a unei paciente cu acuze la dureri abdominale inferioare pentru excluderea torsiunii ovariene atunci când lactatul, LDH-P și/sau AIM serice sunt înalte.

Totodată, în omogenatul șobolanilor lotului doar cu TO s-a remarcat un consum al DNO, fiind determinate valori ale acestora cu aproape 11% mai mici decât în lotul martor,  $p=0,003$

(figura 20). Presupunem că DNO au fost implicați în producerea de oxid nitric, iar rezistența ovarelor la ischemie ar putea fi datorată capacității acestora de a utiliza DNO cu scopul producerii de NO<sup>•</sup>, despre care se știe că este un reglator al funcției mitocondriale, în concentrații nanomolare inhibând reversibil citocromul c oxidaza, reglând formarea de SRO și reducând eliberarea citocromului c, și apoptoza [231].

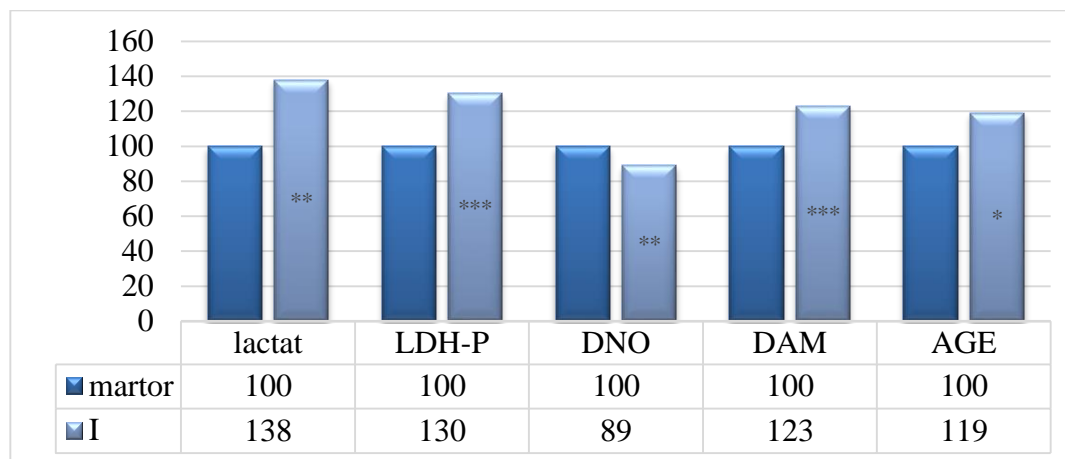


Figura 20. Efectele ischemiei ovariene asupra nivelului de lactat, DNO, DAM, AGE și activității LDH-P din omogenat

Notă: I – ischemie; LDH-P – lactat dehidrogenaza-piruvat; DNO – derivații oxidului nitric; DAM – dialdehida malonică; AGE – produși finali de glicare avansată. Diferență statistic semnificativă comparativ cu: lotul martor: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ .

Concomitent, s-a observat că ischemizarea ovarelor, fără reperfuzie, a intensificat formarea de DAM, AGE și PPOA, care sunt cunoscute ca markeri ai leziunilor oxidative. Astfel, în omogenat s-au distins niveluri mai mari de DAM – cu 23%,  $p < 0,001$  (figura 20), de AGE – cu 19%,  $p = 0,031$  (figura 20), și o tendință de creștere a PPOA, marcată prin cantități mai mari cu aproximativ 26%,  $p > 0,05$  (figura 13, pag. 63), comparativ cu lotul martor. În serul sangvin al animalelor doar cu TO au fost determinate valori crescute ale DAM – cu 8%,  $p < 0,001$ , (figura 14, pag. 71), ale PPOA – cu aproape 21%,  $p = 0,007$  (figura 13, pag. 63), AGE-ul menținându-se la niveluri apropiate celor din lotul martor,  $p > 0,05$  (tabelul 3, pag. 68). Rezultatele obținute confirmă faptul că afecțiunea este însoțită de amplificarea stresului oxidativ, iar una dintre abordările terapeutice ar trebui să fie orientată și asupra diminuării formării de radicali liberi, chiar până la intervenția de detorsionare.

Unele enzime antioxidante studiate de noi în TO nu și-au modificat semnificativ activitatea în țesut după 3 ore de ischemie, menținându-și funcția apropiată de cea constatată în lotul martor, totuși, insuficientă pentru a preveni dereglările oxidative. Astfel, noi nu am identificat schimbări statistic semnificative ( $p > 0,05$ ) în omogenat în lotul cu torsiune ovariană ale activității CAT, GPO, GR, G6PDH și ICDH, cu excepția scăderii statistic semnificative a SOD – cu 24%,  $p = 0,002$ , și a GST – cu 36%,  $p < 0,001$  (figura 21). Se pare că diminuarea reacției de dismutare a anionului

superoxid în perioada de ischemie este unul dintre mecanismele care induce apariția de leziuni oxidative tisulare consemnate în cercetarea noastră. În același timp, protecția antioxidantă tisulară în această perioadă este susținută de către CAT, GR, GPO, G6PDH și ICDH, care și-au menținut activitatea similară cu cea stabilită în lotul martor. Suplimentar, am sesizat o tendință de creștere a consumului de glutatation total și glutatation redus de către celulele ovariene, valorile acestora fiind mai mici cu aproximativ 13%, respectiv cu 23%,  $p > 0,05$  (tabelul 6, pag. 88) după TO comparativ cu lotul martor, ceea ce ar atesta răspunsul compensator, protector al celulelor ovariene expuse unor concentrații înalte de radicali liberi, prin amplificarea mecanismelor de neutralizare glutatation-dependente.

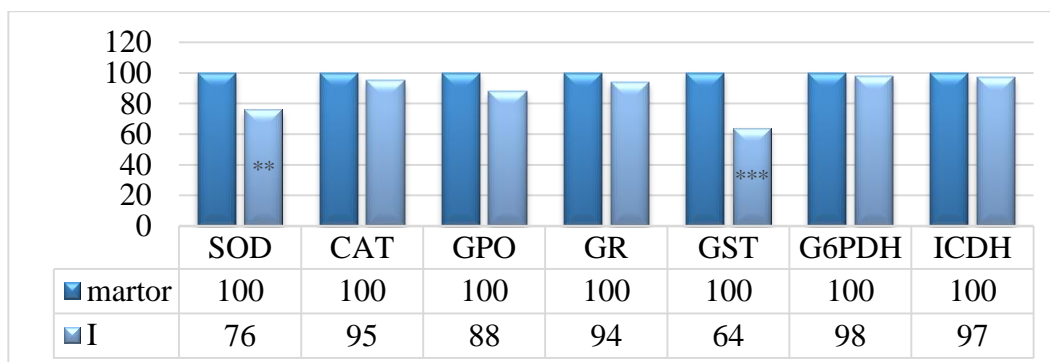


Figura 21. **Activitatea unor enzime antioxidante din omogenat în ischemia ovariană**

Notă: I – ischemie; SOD – superoxid dismutaza; CAT – catalaza; GPO – glutatation peroxidaza; GR – glutatation reductaza; GST – glutatation-S-transferaza; G6PDH – glucozo-6-fosfat dehidrogenaza; ICDH – izocitrat dehidrogenaza citoplasmatică NADP<sup>+</sup>-dependentă;. Diferență statistic semnificativă comparativ cu: lotul martor: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ .

Totodată, după modelarea torsiunii ovariene, GR, enzimă importantă în reciclarea glutatationului, și-a majorat activitatea în ser cu aproape 25%,  $p = 0,045$  (tabelul 5, pag. 82), iar CP a crescut cu aproximativ 7%,  $p < 0,001$  (figura 19, pag. 99), ceea ce sugerează implicarea acestora în menținerea echilibrată a stării redox a organismului în condiții de ischemie provocată, inclusiv prin legarea ionilor de fier și prevenirea reacției Fenton și a producerii subsecvente a SRO.

Deci, activitatea antioxidantă este relativ adaptată în TO, însă deficiențele în activitatea SOD din țesut impun evaluarea unor strategii de tratament cu antioxidanți ce sunt capabili să capteze SRO, posibil, astfel, reducând-se și leziunile oxidative.

Așa cum tratamentul conservator al TO prevede detorsionarea anexei pentru restabilirea fluxului sangvin, s-a efectuat o analiză comparativă a rezultatelor obținute în **loturile cu reperfuzie** pentru a aprecia utilitatea metodei propuse de reperfuzie controlată în reducerea leziunilor oxidative.

S-a constatat că tipul de reperfuzie nu a avut un impact esențial asupra intensității proceselor anaerobe din țesutul ovarian, așa cum după 1 oră de la restabilirea fluxului sangvin au fost măsurate cantități de lactat și o activitate a LDH-P similare cu cele din perioada de ischemie,  $p > 0,05$ . Însă,

după 24 ore de la detorsiune a fost observată diminuarea nivelului de lactat din omogenat, consemnându-se valori apropiate de cele din lotul martor,  $p>0,05$  (figura 10, pag. 44). Preluarea lactatului din ovare după revascularizarea acestora ar putea explica creșterile serice consemnate (figura 11, pag. 45) și modificările corespunzătoare tisulare din cercetarea noastră (figura 10, pag. 44). Utilizarea lactatului în ciclul Cori pentru a fi transformat în glucoză și a susține producerea de energie [221, 222] de la nivel tisular pare să fie una dintre modificările adaptive pentru asigurarea cu substrat energetic a celulelor, inclusiv a celor ovariene. Odată cu trecerea timpului (după 24 ore) s-a remarcat o tendință de descreștere serică a cantității de lactat (figura 11, pag. 45), în condițiile menținerii activității enzimei LDH-P din țesutul ovarian la un nivel apropiat de cel din lotul expus doar torsionării ovariene,  $p>0,05$  (figura 10, pag. 44), ceea ce poate atesta restabilirea capacității ovarelor de a utiliza lactatul și alte substraturi energetice datorită reactivării proceselor de oxidare aerobă.

Tipul de reperfuzie și durata acesteia nu au avut o influență semnificativă asupra AIM (tabelul 2, pag. 52) din țesutul ovarian, reliefându-se doar o tendință de creștere, mai exprimată în loturile cu reperfuzie simplă vs. loturile cu reperfuzie controlată: cu 22% vs. 15% după 1 oră și cu 18% vs. 13% după 24 ore comparativ cu lotul martor,  $p>0,05$ . Însă, în serul sangvin valorile acestui biomarker s-au majorat statistic semnificativ cu aproape 22% vs. 12% după 1 oră, respectiv cu 20% vs. 13% după 24 ore comparativ cu lotul martor,  $p<0,001$ . Concomitent, înregistrarea unui nivel seric mai mic al AIM în loturile *on-off* comparativ cu lotul expus doar TO,  $p<0,05$ , și menținerea valorilor acestui indice în ambele loturi cu detorsiune simplă apropiate celor din lotul doar cu ischemie ovariană,  $p>0,05$ , este dovada faptului că manevra *on-off* reduce afectarea albuminei și-i asigură o capacitate mai înaltă de a fixa  $\text{Co}^{2+}$  decât în condiții de reperfuzie simplă.

Metoda de **reperfuzie controlată** vs. **reperfuzie simplă** a avut un efect favorabil asupra diminuării modificărilor oxidative ale diferitor molecule, relevând avantajul tehnicii de detorsionare *on-off* (figura 22). Însă, trebuie să precizăm că doar aplicarea manevrei *on-off* nu poate să combată toate evenimentele oxidative care sunt legate de momentul restabilirii circulației sangvine din țesutul ovarian și manifestate, în special, la distanță (după 24 ore). Astfel, după 1 oră de la reperfuzia controlată am înregistrat o tendință de creștere a AGE cu 24%,  $p>0,05$ , care a trecut de pragul semnificației statistice peste 24 ore, fiind măsurate cantități mai mari cu 49%,  $p<0,001$ , comparativ cu lotul martor. Totodată, nivelul de AGE consemnat după 24 ore a fost semnificativ mai mare, inclusiv comparativ cu lotul doar cu TO,  $p<0,01$  (tabelul 3, pag. 68). Majorări statistic semnificative în omogenat au fost notate și pentru PPOA – cu aproximativ 48%,  $p=0,001$ , după 1 oră, respectiv cu 69% – după 24 ore,  $p<0,001$ , peste valorile înregistrate în lotul martor, care, însă, după 1 oră au fost apropiate de cele din lotul cu ischemie ovariană, observându-se doar o tendință de majorare – cu 17%,  $p>0,05$ , pe când după 24 ore, creșterea a fost cu aproape



34%,  $p=0,009$ , peste nivelul lotului doar cu ischemie ovariană (figura 13, pag. 63). Concomitent, cantitatea de DAM măsurată în țesutul ovarian după aplicarea tehnicii *on-off* a fost cu aproximativ 22% după 1 oră, respectiv cu 24% după 24 ore,  $p<0,001$ , peste valorile determinate în lotul martor, însă apropiate de cele din lotul cu ischemie,  $p>0,05$  (figura 14, pag. 71), ceea ce dovedește capacitatea reperfuziei controlate de a preveni intensificarea peroxidării lipidelor după restabilirea circulației sangvine în ovarul ischemizat. În același timp, reperfuzia simplă a țesutului ovarian, expus ischemiei pentru o perioadă de 3 ore, a demonstrat exacerbarea lezării oxidative, fapt confirmat prin mărirea cantităților de DAM – cu 41% după 1 oră, respectiv cu 44% după 24 ore,  $p<0,001$  (figura 14, pag. 71), de PPOA – cu 66% după 1 oră, respectiv cu 70% după 24 ore,  $p<0,001$  (figura 13, pag. 63), de AGE – cu 80% după 1 oră, respectiv cu 96% după 24 ore,  $p<0,001$  (tabelul 3, pag. 68), peste nivelurile lotului martor, depășind statistic semnificativ inclusiv valorile stabilite în lotul de animale expuse doar ischemiei ovariene,  $p<0,05$ .

În ambele loturi cu detorsione controlată în serul sangvin am observat un nivel de PPOA mai mic decât în lotul de animale doar cu TO,  $p<0,01$ , și foarte apropiat celui din lotul martor,  $p>0,05$  (figura 13, pag. 63). Suplimentar, a fost înregistrată și o tendință de creștere a GSSG din ser cu 29% după 1 oră, respectiv cu aproape 40% după 24 ore de la aplicarea postcondiționării ischemice,  $p>0,05$ , comparativ cu lotul martor, însă fără a depăși valorile notate în lotul doar cu ischemie ovariană,  $p>0,05$  (figura 17, pag. 92). Concomitent, cantitatea de DAM serică după 1 oră de la detorsionarea *on-off* a fost apropiată de cea din lotul cu TO,  $p>0,05$ , în ambele loturi indicele peroxidării lipidelor fiind cu aproximativ 8% mai mare,  $p<0,001$ , comparativ cu valorile consemnate în lotul martor, și, ajungând la un nivel apropiat celui din lotul de referință (martor) după 24 ore, diferențele fiind ne semnificative,  $p>0,05$  (figura 14, pag. 71).

Chiar dacă cantitatea de AGE serică a fost statistic semnificativ mai mare în loturile cu reperfuzie controlată comparativ atât cu lotul martor (cu 46% după 1 oră, respectiv cu 37% după 24 ore), cât și cu cel doar cu ischemie ovariană (cu 42% după 1 oră, respectiv cu 33% după 24 ore),  $p<0,001$ , fără a se observa vreo ameliorare evidentă, totuși, comparativ cu loturile cu reperfuzie simplă, valorile AGE au fost în descreștere după tehnica *on-off*,  $p<0,01$  (tabelul 3, pag. 68), ceea ce relevă avantajul Pcl.

După reperfuzia simplă aceste schimbări caracterizate prin creșteri ale nivelurilor serice ale indicilor biochimici ai leziunilor oxidative au fost mult mai exprimate decât după tehnica *on-off*. Astfel, PPOA-ul s-a mărit cu peste 26% în ambele loturi,  $p<0,01$  (figura 13, pag. 63), AGE-ul – cu 54% după 1 oră, respectiv cu 62% după 24 ore,  $p<0,001$  (tabelul 3, pag. 68), iar DAM-ul – cu 18% după 1 oră, respectiv cu 15% după 24 ore,  $p<0,001$  (figura 14, pag. 71), comparativ cu lotul martor, fiind peste valorile notate în lotul doar cu TO. Prin urmare putem reliefa faptul că în tratamentul TO detorsionarea cu reluarea circulației sangvine este absolut necesară atunci când se

dorește păstrarea organului, însă aceasta nu este eficientă pentru preîntâmpinarea afectării oxidative a diferitor molecule.

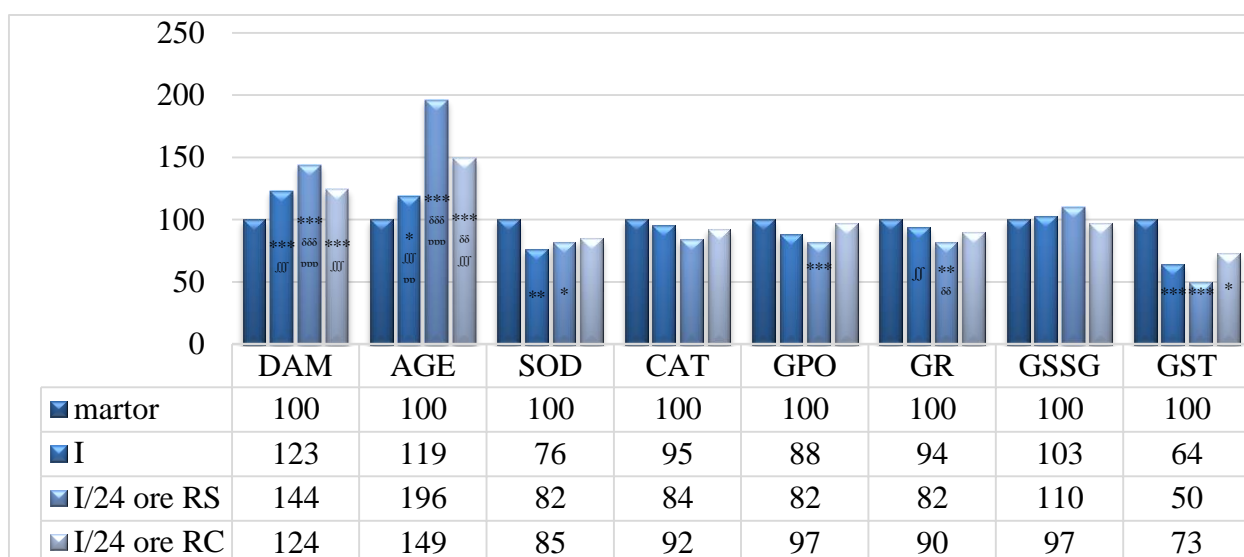


Figura 22. **Modificări metabolice tisulare postreperfuție în torsiunea ovariană**

Notă: I – ischemie; RS – reperfuție simplă; RC – reperfuție controlată; DAM – dialdehida malonică; AGE – produși finali de glicare avansată; SOD – superoxid dismutaza; CAT – catalaza; GPO – glutation peroxidaza; GR – glutation reductaza; GST – glutation-S-transferaza; GSSG – glutation oxidat. Diferență statistic semnificativă comparativ cu:

- lotul martor: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie:  $\delta$  –  $p < 0,05$ ;  $\delta\delta$  –  $p < 0,01$ ;  $\delta\delta\delta$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/24 ore reperfuție simplă:  $\delta$  –  $p < 0,05$ ;  $\delta\delta$  –  $p < 0,01$ ;  $\delta\delta\delta$  –  $p < 0,001$ ;
- lotul ischemie/24 ore reperfuție controlată:  $\nu$  –  $p < 0,05$ ;  $\nu\nu$  –  $p < 0,01$ ;  $\nu\nu\nu$  –  $p < 0,001$ .

Studiul nostru a identificat modificări în activitatea sistemului antioxidant ca rezultat al detorsionării ovarelor torsionate. **Reperfuția controlată vs. reperfuția simplă** s-a distins prin faptul că a menținut activitatea unor enzime antioxidante din ovare la un nivel mai înalt, astfel încât să mențină nivelul de GSSG din omogenat la nivelul considerat de referință (lotul martor), ceea ce a asigurat o protecție mai mare a țesutului ovarian împotriva stresului oxidativ, în mod evident după 24 ore de la manevra de detorsionare (figura 22).

În același timp, după 1 oră de la aplicarea tehnicii *on-off* în omogenat s-a constatat menținerea CAT (figura 15, pag. 77), GPO (tabelul 5, pag. 82), GST (figura 16, pag. 86), GT (tabelul 6, pag. 88) și ICDH (tabelul 7, pag. 97) la un nivel apropiat de cel din lotul martor,  $p > 0,05$ , consemnându-se doar o tendință de scădere, pe când activitatea G6PDH (figura 18, pag. 94) a avut o tendință de creștere, însă fără a trece de pragul semnificației statistice,  $p > 0,05$ . În același timp, s-a înregistrat o diminuare statistic semnificativă a activității SOD cu aproape 25%,  $p = 0,002$ , comparativ cu lotul martor, care, însă, a rămas apropiată de cea observată în lotul doar cu ischemie ovariană,  $p > 0,05$  (figura 15, pag. 77), și o reducere a activității GR cu 19%,  $p = 0,006$ , comparativ cu lotul martor, valorile fiind mai mici și decât cele din lotul doar cu TO – cu 13%,  $p = 0,036$  (tabelul 5, pag. 82). Concomitent, a fost notat un consum al GSH, nivelul său fiind sub 28%,  $p < 0,001$ , față

de cel măsurat în lotul martor, dar care nu a fost diferit comparativ cu cel din lotul doar cu ischemie ovariană,  $p > 0,05$  (tabelul 6, pag. 88), ceea ce reprezintă o modificare adaptivă a activității sistemului antioxidant pentru asigurarea protecției celulelor.

După 24 ore de reperfuzie controlată activitatea CAT, GPO (figura 22, pag. 106), G6PDH (figura 18, pag. 94) și ICDH (tabelul 7, pag. 97) a rămas aproximativ la nivelul celei din lotul martor,  $p > 0,05$ , și s-a observat restabilirea activității SOD și a GR (figura 22, pag. 106), cifrele notate fiind apropiate de cele din lotul martor,  $p > 0,05$ , totuși, cu păstarea unui consum de GT și GSH, și o activitate a GST similare cu cea din lotul de animale expuse doar ischemiei ovariene,  $p > 0,05$ , valorile notate fiind pentru GT cu 10%,  $p = 0,012$ , pentru GSH cu 14%,  $p < 0,001$  (tabelul 6, pag. 88), și pentru GST cu 27%,  $p = 0,04$  (figura 22, pag. 106), mai mici comparativ cu lotul martor.

S-a stabilit că reducerea activității GR în perioada inițială de reperfuzie controlată (după 1 oră) are consecințe nefavorabile asupra procesului de reciclare a glutatationului din ovare, crescând nivelul de GSSG cu aproape 29%,  $p = 0,011$  (figura 17, pag. 92) peste valorile lotului martor, ca odată cu restabilirea activității GR, după 24 ore, și cantitatea de GSSG să se micșoreze până la un nivel apropiat de cel din lotul martor și sub valorile lotului doar cu TO,  $p > 0,05$ .

După reperfuzia simplă a țesutului ovarian nu a fost observată restabilirea activității SOD și GR la nivelul considerat drept referință în cercetarea noastră (lotul martor), așa cum am constatat după aplicarea tehnicii *on-off*, majoritatea parametrilor evaluați după detorsionarea simplă menținându-și valorile apropiate de cele din lotul doar cu ischemie ovariană chiar și după 24 ore de la restabilirea fluxului sangvin (SOD, GPO, GST, GT, GSH). Astfel, comparativ cu lotul de referință (martor), în omogenatul animalelor din loturile cu reperfuzie simplă au fost observate reduceri importante ale activității SOD atât după 1 oră, cu 29%,  $p = 0,001$ , cât și după 24 ore, cu 18%,  $p = 0,03$  (figura 15, pag. 77), a GPO – cu 28% după 1 oră și 18% după 24 ore,  $p < 0,001$  (tabelul 5, pag. 82), a GR – cu 17% după 1 oră,  $p = 0,006$ , respectiv cu 18% după 24 ore,  $p = 0,003$  (tabelul 5, pag. 82), a GST – cu 26% după 1 oră,  $p = 0,008$ , și 50% după 24 ore,  $p < 0,001$  (figura 16, pag. 86), și a cantității de GSH – cu 35% după 1 oră,  $p < 0,001$ , respectiv cu 23% după 24 ore,  $p = 0,002$  (tabelul 6, pag. 88), cu o tendință de creștere concomitentă a nivelului de GSSG cu 39% după 1 oră, respectiv cu 10% după 24 ore,  $p > 0,05$  (figura 17, pag. 92), marcându-se și o majorare a activității G6PDH cu 45% după 1 oră,  $p > 0,05$ , respectiv cu 89% după 24 ore,  $p = 0,023$  (figura 18, pag. 94).

Activitatea CAT (figura 15, pag. 77) și ICDH (tabelul 7, pag. 97) nu a înregistrat modificări semnificative în țesutul ovarian în studiul nostru, în loturile cu reperfuzie simplă, observându-se doar o tendință de reducere, comparativ atât cu lotul martor, cât și cu cel doar cu ischemie ovariană,  $p > 0,05$ .

Aprofundarea leziunilor oxidative ovariene constatate după detorsiunea simplă din cercetarea noastră ar putea fi datorate reducerii însemnate a activității enzimei GR, consemnate prin valori statistic semnificativ mai mici în loturile cu reperfuzie simplă comparativ cu lotul doar cu ischemie ovariană,  $p < 0,05$  (tabelul 5, pag. 82). Așa cum eficacitatea antioxidantă a acestei enzime depinde de NADPH, a cărui sinteză pare să nu aibă de suferit la restabilirea circulației sangvine, fiind chiar observată o intensificare a activității G6PDH după 24 ore de la detorsiune cu peste 93%,  $p = 0,018$ , peste nivelul lotului doar cu TO (figura 18, pag. 94), presupunem un consum tisular preferențial al NADPH-ului de către enzimele prooxidante.

Astfel, putem conchide că așa cum activitatea G6PDH a fost mai mare în loturile cu reperfuzie simplă comparativ cu celelalte loturi de cercetare, constatându-se și o majorare a cantității de DAM, PPOA și AGE, după detorsiunea ovariană G6PDH a fost mai mult implicată în susținerea proceselor oxidative, decât în asigurarea protecției antioxidante, așa cum deja a fost demonstrat că NADPH-ul poate fi utilizat de către NADPH oxidaze, nitric oxid sintaze (NOS) pentru producerea de radicali liberi. Ipoteza consumului tisular de NADPH de către enzimele prooxidante în torsiunea/detorsiunea ovariană din cercetarea noastră este susținută de faptul menținerii reduse a activității tisulare a GR, cât și a majorării cantității de GSSG, posibil din cauza lipsei unei concentrații suficiente de NADPH.

Totodată, se pare că CP are un rol important în TO prin influențarea procesului patologic după restabilirea circulației sangvine, iar creșterea sa statistic semnificativă în toate loturile cu reperfuzie peste nivelul înregistrat în lotul doar cu ischemie ovariană,  $p < 0,05$ , vine să susțină protecția antioxidantă a organismului, în special datorită activității sale de feroxidază, împiedicând participarea  $Fe^{2+}$  la generarea radicalilor hidroxil [259]. În același timp, este probabil ca o anumită cantitate de CP să fie consumată ca rezultat al interacțiunii cu MPO [84], așa cum majorarea CP în loturile cu reperfuzie nu a fost statistic semnificativă comparativ cu lotul de control (figura 19, pag. 99).

Studiul nostru nu a stabilit vreo legătură reciprocă între modificarea concentrației markerilor sistemului antioxidant din țesutul ovarian și serul sangvin, ceea ce ne indică faptul că expresia biochimică serică a indicilor mășurați nu este suficientă astfel încât să fie recomandați de sine stătător în practica clinică cu scop de diagnostic sau evaluare a eficienței tratamentului.

Rezultatele studiului DNO (figura 12, pag. 56) în loturile cu reperfuzie din TO ne-a sugerat rolul dual al  $NO\cdot$ , efectele sale posibil fiind dependente atât de concentrația acestuia, cât și a altor radicali, cum ar fi anionul superoxid. În condițiile în care sunt produse cantități mari de  $O_2^{\cdot-}$  cu depășirea capacităților enzimelor antioxidante din prima linie de a asigura o protecție eficientă,  $NO\cdot$  ar avea un potențial lezional sporit datorită implicării în formarea de peroxinitrit și nu de DNO. Nivelul DNO din omogenatul animalelor din loturile cu 1 oră reperfuzie s-a modificat

nesemnificativ comparativ cu lotul martor,  $p > 0,05$ , posibil din cauza implicării  $\text{NO}^\cdot$  mai mult în producerea de peroxinitrit decât de DNO. În aceste loturi, totuși, DNO au crescut comparativ cu lotul expus doar ischemiei, dar fără vreo semnificație statistică în lotul cu reperfuzie simplă,  $p > 0,05$ , și statistic semnificativ în cel cu reperfuzie controlată,  $p = 0,001$ . Acest fapt reliefează încă o dată efectul protector al reperfuziei *on-off*, confirmat printr-un consum mai exprimat al  $\text{NO}^\cdot$  pentru formarea de DNO, probabil reducându-se astfel cantitatea de peroxinitrit generat. Odată cu restabilirea funcționalității enzimelor antioxidante, după 24 ore, s-a majorat și cantitatea de DNO din țesut, statistic semnificativ comparativ cu lotul cu ischemie ovariană, atât după reperfuzia simplă,  $p < 0,001$ , cât și după reperfuzia *on-off*,  $p = 0,006$ , ceea ce poate fi apreciat ca o utilizare mai scăzută a oxidului nitric pentru producerea de peroxinitrit comparativ cu perioada inițială (după 1 oră). Putem presupune că o activitate adecvată a enzimelor antioxidante cu neutralizarea radicalului superoxid ar avea efecte benefice evidente prin asigurarea unei concentrații suficiente de  $\text{NO}^\cdot$  care ar putea fi implicat în asigurarea protecției celulare și tisulare, inclusiv în momentul reperfuziei. Deci, una dintre strategiile terapeutice care ar trebui dezvoltate în viitor ar trebui orientate spre reducerea nivelului de anion superoxid. Un nivel scăzut al acestui radical ar însemna și o cantitate mai mică de peroxinitrit care se generează, respectiv cu diminuarea leziunilor țesuturilor. Lipsa prezenței corelațiilor între nivelul DNO din serul sangvin și omogenatul ovarian în toate loturile experimentale ne arată că nu există o legătură evidentă între fenomenele patologice care implică oxidul nitric, care au loc în țesut în TO și serul sangvin.

Cercetarea noastră reliefează faptul că torsiunea ovariană induce modificări metabolice caracterizate prin majorarea cantității markerilor biochimici indicatori ai ischemiei tisulare atât în țesutul ovarian, cât și în ser. Ischemia ovariană provoacă acumularea produselor metabolismului anaerob, manifestată prin creșterea lactatului, iar acest proces poate fi reversibil dacă se restabilește alimentarea cu sânge.

Lactatul, LDH-P și AIM serici sunt biomarkeri care ar putea fi utilizați la suspectarea torsiunii ovariene pentru detectarea ischemiei, totuși, sunt necesare cercetări suplimentare pentru a stabili valorile *cut-off* aplicabile subiecților umani.

Rezultatele studiului nostru sugerează că rezistența ovarelor la ischemie ar putea fi datorată atât activității intense a enzimei LDH-P, cât și utilizării eficiente de către țesutul ovarian a DNO. Posibil că o administrare profilactică de substanțe medicamentoase pe bază de nitriți ar putea să protejeze ovarul împotriva leziunilor I/R. Această ipoteză, însă, necesită studii ulterioare.

Concomitent, s-a constatat că torsiunea ovariană este o patologie însoțită de stres oxidativ, în care leziunile oxidative se intensifică la restabilirea fluxului sangvin.

Cercetarea a scos în evidență că tratamentul torsiunii ovariene prin manevra de detorsionare, obligatorie pentru păstrarea organului, agravează leziunile inițiale produse doar de ischemie, fapt

confirmat prin creșteri după reperfuzie a indicilor stresului oxidativ (PPOA, AGE, DAM), care pot fi agravate de infiltrarea leucocitară și inflamație, fapt confirmat prin cantități crescute de PPOA în loturile experimentale.

La moment nu avem date suficiente pentru a face vreo recomandare de a utiliza de sine stătător biomarkerii stresului oxidativ evaluați în studiul nostru pentru diagnosticul torsionii ovariene. Totuși, ei ar putea completa spectrul de markeri de laborator aplicați în diagnosticul TO și a monitorizării evoluției stării patologice, precum și a eficienței tratamentului aplicat, valorile de referință pentru indicii de laborator respectivi necesitând a fi determinate prin investigații ulterioare.

Rezultatele lucrării noastre sunt în concordanță cu rezultatele obținute de către Ingec M. și coaut. [99], cantitatea markerilor deteriorării oxidative fiind mai mică după aplicarea manevrei de reperfuzie controlată comparativ cu reperfuzia simplă. Astfel, tratamentul torsionii ovariene prin detorsionare cu reperfuzie *on-off* a redus leziunile oxidative tisulare provocate de fenomenul I/R. Cu toate acestea, sunt necesare evaluări adiționale pentru a identifica mecanismul exact prin care metoda *on-off* asigură protecția țesutului ovarian după revascularizare.

Așa cum unii indici ai leziunilor oxidative (PPOA, AGE) în țesut au fost mai mici în perioada inițială de reperfuzie controlată (după 1 oră), crescând cantitatea acestora la distanță (după 24 ore), se impune necesitatea administrării concomitente a unor substanțe cu efect antioxidant și/sau antiinflamator, pentru a preveni exacerbarea leziunilor [29, 45, 46, 48, 242-244].

Mecanismele de apărare antioxidante ovariene au fost afectate în TO. Cercetarea noastră a remarcat reducerea protecției antioxidante tisulare în urma expunerii ovarelor torsionii și, ulterior, reperfuziei. Totuși, ameliorarea activității SOD și GR după manevra *on-off*, cu apropierea valorilor acestora după 24 ore de cele de referință (din lotul martor), comparativ cu reperfuzia simplă, evidențiază rolul benefic al reperfuzie controlate.

Concomitent, s-a constatat că nu în toate loturile experimentale este prezentă corelația sangvino-tisulară a parametrilor examinați, ceea ce nu ne permite să facem concluzii favorabile referitor la prezența unei interdependențe absolute a fenomenelor care au loc în ovare cu expresia biochimică sangvină a acestora.

Trebuie de luat în considerare faptul că rezultatele înregistrate în studiul nostru sunt în urma expunerii TO animalelor de laborator și este posibil ca unele constatări să nu fie valabile și pentru subiecții umani. Astfel, este indispensabilă continuarea cercetărilor pe femei suspecte de TO cu verificarea ipotezelor deja formulate în această lucrare referitor la utilitatea unor parametri biochimici studiați în diagnosticul și/sau monitorizarea evoluției acestei stări patologice cu repercusiuni severe asupra fertilității.

## CONCLUZII GENERALE

1. În torsiunea ovariană metabolismul este adaptat condițiilor întreruperii fluxului sangvin, fapt reflectat printr-un nivel tisular crescut de lactat (cu 38%,  $p=0,006$ ) și o activitate intensă a enzimei LDH-P (cu 30%,  $p<0,001$ ), producerea energiei pe cale anaerobă susținând funcțiile vitale și supraviețuirea celulelor. Creșterea consumului tisular de DNO (cu 11%,  $p=0,003$ ) ar putea conferi rezistență ovarelor la ischemie.

2. Torsiunea ovariană induce amplificarea proceselor oxidative patologice în ovare și afectarea structural-funcțională a celulelor, exprimată prin majorarea DAM (cu 23%,  $p<0,001$ ) și AGE (cu 19%,  $p=0,031$ ), sugestive pentru o exacerbare a producerii de radicali liberi.

3. Diminuarea capacității enzimei SOD (cu 24%,  $p=0,002$ ) de a dismuta anionul superoxid și reducerea activității GST (cu 36%,  $p<0,001$ ) din ovarele torsionate ar fi factori responsabili de crearea dezechilibrului caracteristic stresului oxidativ. Totuși, protecția antioxidantă tisulară în această perioadă este susținută de către CAT, GR, GPO, G6PDH și ICDH, care și-au menținut activitatea similară cu cea din lotul de martor.

4. Modificările serice ale indicilor biochimici de laborator studiați nu sunt expresia schimbărilor tisulare, dat fiind prezența unui număr redus de corelații sangvino-tisulare ale parametrilor evaluați doar în anumite loturi de cercetare, ceea ce nu reprezintă un argument al utilizării lor pentru aprecierea schimbărilor care au loc în țesut în torsiunea ovariană în baza măsurărilor serice.

5. Reperfuzia controlată comparativ cu cea simplă și-a demonstrat avantajul prin capacitatea sa de a preveni intensificarea peroxidării lipidelor din ovare după reluarea circulației sangvine (DAM,  $p>0,05$ ) și parțial deteriorarea structurilor celulare (AGE), prin restabilirea activității enzimelor SOD și GR, și a cantității de GSSG din omogenat la nivelul considerat de referință (martor), după 24 ore de la detorsionare, și prevenirea exacerbării dereglărilor funcției CAT, GPO și GST.

## RECOMANDĂRI PRACTICE

1. Lucrarea noastră poate fi o bază pentru extinderea cercetărilor referitoare la torsiunea ovariană, iar modelul experimental de torsiune ovariană aplicat în studiul nostru este unul care poate fi utilizat în cercetări experimentale similare.

2. Se recomandă utilizarea evaluării activității LDH-P și a cantității lactatului, și AIM serice în practica clinică la suspectarea cauzei ischemice a durerilor abdominale inferioare, pentru completarea indicilor ce fundamentează aplicarea laparoscopiei diagnostice ca “standard de aur” pentru confirmarea diagnosticului de TO.

3. Se propune utilizarea markerilor cercetați în această lucrare (DAM, PPOA, AGE) pentru monitorizarea efectelor reperfuziei și/sau tratamentului medicamentos în evoluția torsiunii ovariene.

4. Tehnica de reperfuzie controlată, propusă și testată în acest studiu, este recomandată a fi utilizată în tratamentul chirurgical de conservare a ovarelor la pacientele cu torsiune ovariană, așa cum aplicarea acesteia a arătat o diminuare a leziunilor oxidative și un grad mai înalt de protecție antioxidantă, având avantajul de a fi ușor de aplicat și nefiind necesare costuri suplimentare.

5. La luarea deciziei terapeutice se recomandă să se țină cont de faptul că singură, metoda *on-off* de detorsionare a organului nu preîntâmpină întru totul efectele negative ale reperfuziei, impunându-se și alte intervenții de diminuare a stresului oxidativ și a consecințelor lui.



## BIBLIOGRAFIE

1. Krishnan S., Kaur H., Bali J., Rao K. Ovarian torsion in infertility management - Missing the diagnosis means losing the ovary: A high price to pay. *J Hum Reprod Sci.* 2011; 4(1): p. 39–42. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3136068/> [accesat la 28.06.2020]
2. Kart C., Aran T., Guven S., Karahan S.C., Yulug E. Acute increase in plasma D-dimer level in ovarian torsion: an experimental study. *Human Reproduction.* 2011; 26(3): p. 564–568. Disponibil la: <https://academic.oup.com/humrep/article/26/3/564/2914139> [accesat la 28.06.2020]
3. Chu K., Zhang Q., Sun N., Ding H., Li W. Conservative laparoscopic management of adnexal torsion based on a 17-year follow-up experience. *J Int Med Res.* 2018; 46(4): p. 1685–1689. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6091833/> [accesat la 28.06.2020]
4. Tonolini M., Foti P.V., Costanzo V., Mammino L., Palmucci S., Cianci A., et al. Cross-sectional imaging of acute gynaecologic disorders: CT and MRI findings with differential diagnosis—part I: corpus luteum and haemorrhagic ovarian cysts, genital causes of haemoperitoneum and adnexal torsion. *Insights Imaging.* 2019; 10(1): 119. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6920287/> [accesat la 28.06.2020]
5. Halimeh R., Tomassian S., El Hage M., Metri N., Bersaoui M., Daou R., et al. Laparoscopic Adnexal Detorsion in a 20-Week Pregnant Patient: A Case Report and Literature Review. *Case Rep Obstet Gynecol.* 2019; 2019: 1093626. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6877964/> [accesat la 28.06.2020]
6. Gunaydin M., Sipahi M., Kesicioglu T., Usta M., Tezcan B., et al. The value of plasma SCUBE1 and oxidative stress parameters in the early diagnosis of acute ovarian torsion. *Bratisl Med J.* 2019; 120(6): p. 456-461. Disponibil la: [http://www.elis.sk/index.php?page=shop.product\\_details&flypage=flypage.tpl&product\\_id=6197&category\\_id=146&option=com\\_virtuemart&vmcchk=1&Itemid=1](http://www.elis.sk/index.php?page=shop.product_details&flypage=flypage.tpl&product_id=6197&category_id=146&option=com_virtuemart&vmcchk=1&Itemid=1) [accesat la 28.06.2020]
7. Huang C., Hong M.K., Ding D.C. A review of ovary torsion. *Ci Ji Yi Xue Za Zhi.* 2017; 29(3): p. 143-147. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5615993/> [accesat la 28.06.2020]
8. El-Ebeissy H., Shalaby R., Helel A.A.E.G. Laparoscopic management of ovarian torsion in children and adolescent. *J Am Sci.* 2014; 10(7): p. 56-61. Disponibil la: [https://www.researchgate.net/publication/317265124\\_Laparoscopic\\_Management\\_of\\_Ovarian\\_Torsion\\_in\\_Children\\_and\\_Adolescent](https://www.researchgate.net/publication/317265124_Laparoscopic_Management_of_Ovarian_Torsion_in_Children_and_Adolescent) [accesat la 28.06.2020]
9. Bolli P., Schädelin S., Holland-Cunz S., Zimmermann P. Ovarian torsion in children: Development of a predictive score. *Medicine (Baltimore).* 2017; 96(43): e8299. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5671833/> [accesat la 28.06.2020]
10. Lazăr C., Mișina A., Tagadiuc O. Rolul indicilor de laborator în diagnosticul torsiunii ovariene (revista literaturii). *Moldovan Journal of Health Sciences (Revista de Științe ale Sănătății din Moldova).* 2018; 16(2): p. 52-61. ISSN 2345-1467. Disponibil la: [https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare\\_articol/65758](https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/65758) [accesat la 28.06.2020]
11. Topçu H.O., İskender C.T., Ceran U., Kaymak O., Timur H., Uygur D., et al. Evaluation of the diagnostic accuracy of serum D-Dimer levels in pregnant women with adnexal torsion. *Diagnostics (Basel).* 2015; 5(1): p. 1-9. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4665548/> [accesat la 28.06.2020]

12. Dincgeç B., Bozkurt M., Öndes B., Yumru A.E., Yumru C. Adnexal torsion in the first trimester of a spontaneous pregnancy: detorsion and oophoropexy. *Proc Obstet Gynecol.* 2013; 3(3): p. 1-7. Disponibil la: <https://ir.uiowa.edu/pog/vol3/iss3/4/> [accesat la 28.06.2020]
13. Yildirim N., Simsek D., Kose S., Yildirim A.G.S., Guven C., et al. The protective effect of Ginkgo biloba in a rat model of ovarian ischemia/reperfusion injury: Improvement in histological and biochemical parameters. *Adv Clin Exp Med.* 2018; 27(5): p. 591-597. Disponibil la: <http://www.advances.umed.wroc.pl/pdf/2018/27/5/591.pdf> [accesat la 28.06.2020]
14. Ganla K.N., Choudhary R.A., Vora P.H., Athavale U.V. Sildenafil Citrate: Novel Therapy in the Management of Ovarian Torsion. *J Hum Reprod Sci.* 2019; 12(4): p. 351-354. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6937764/> [accesat la 28.06.2020]
15. Tuncer A.A., Bozkurt M.F., Koken T., Dogan N., Pektaş M.K., Baskin Embleton D. The Protective Effects of Alpha-Lipoic Acid and Coenzyme Q10 Combination on Ovarian Ischemia-Reperfusion Injury: An Experimental Study. *Adv Med.* 2016; 2016: 3415046. Disponibil la: <https://www.hindawi.com/journals/amed/2016/3415046/> [accesat la 28.06.2020]
16. Wang Z., Zhang D., Zhang H., Guo X., Zheng J., Xie H. Characteristics of the patients with adnexal torsion and outcomes of different surgical procedures: A retrospective study. *Medicine (Baltimore).* 2019; 98(5): e14321. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6380708/> [accesat la 28.06.2020]
17. Mişina A., Madan D., Tagadiuc O., Lazăr C., Fuior L. Diagnosticul și tratamentul torsiunii ovariene la copii și adolescente. *Archives of the Balkan Medical Union.* 2015; 50(2), supl. 1: p. 84-89. ISSN 0041-6940.
18. Sleiman Z., Karaman E., Terzic M., Terzic S., Falzone G., Garzon S. Fertility Preservation in Benign Gynecological Diseases: Current Approaches and Future Perspectives. *J Reprod Infertil.* 2019; 20(4): p. 201-208. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6928401/> [accesat la 28.06.2020]
19. Ercan Ö., Köstü B., Bakacak M., Coşkun B., Tohma A., Mavigök E. Neutrophil to Lymphocyte ratio in the diagnosis of adnexal torsion. *Int J Clin Exp Med.* 2015; 8(9): p. 16095-16100. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4659007/> [accesat la 28.06.2020]
20. Soyman Z., Keleşçi S., Sal V., Şevket O., Bayındır N., et al. Effects of Apigenin on Experimental Ischemia/Reperfusion Injury in the Rat Ovary. *Balkan Med J.* 2017; 34(5): p. 444–449. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5635632/> [accesat la 28.06.2020]
21. Laganà A.S., Sofo V., Salmeri F.M., Palmara V.I., Triolo O., Terzić M.M., et al. Oxidative Stress during Ovarian Torsion in Pediatric and Adolescent Patients: Changing The Perspective of The Disease. *Int J Fertil Steril.* 2016; 9(4): p. 416–423. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4793162/> [accesat la 28.06.2020]
22. Görkem Ü., Togrul C., Sahin I., Coskun B., Ozat M., Güngör T., et al. Protective Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) on Ischemia-Reperfusion Injury in Rat Ovary. *Int. J. Morphol.* 2017; 35(1): p. 141-147. Disponibil la: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022017000100023> [accesat la 29.06.2020]
23. Eryılmaz O.G., Kansu-Celik H., Sarikaya E., Avcı A., Ozel S. Thymoquinone Effect (an Active Metabolite of the Plant Nigella sativa) on Ischemia-Reperfusion Injury in Rat Ovary. *Journal of Reproductive Endocrinology & Infertility.* 2016; 1(3). Disponibil la: <https://reproductive-endocrinology-infertility.imedpub.com/thymoquinone-effect-an-active->

metabolite-of-the-plant-nigella-sativa-onischemiareperfusion-injury-in-rat-ovary.pdf  
[accesat la 29.06.2020]

24. Yapca O.E., Turan M.I., Borekci B., Akcay F., Suleyman H. Bilateral ovarian ischemia/reperfusion injury and treatment options in rats with an induced model of diabetes. *Iran J Basic Med Sci.* 2014; 17(4): p. 294–302. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4046235/> [accesat la 29.06.2020]
25. Avci V., Huyut Z., Altindağ F., Ayengin K., Alp H.H. Thiol-Disulphide Homeostasis in Ovarian Torsion-Detorsion: An Experimental Rat Model. *J Clin Obstet Gynecol.* 2020; 30(1): p. 1-7. Disponibil la: <https://www.jcog.com.tr/article/en-thiol-disulphide-homeostasis-in-ovarian-torsion-detorsion-an-experimental-rat-model-88160.html> [accesat la 29.06.2020]
26. Manizheh S.-M., Maryamalsadat K.-S., Jafar S.-R., Mohammad-Reza R., Leila R., Nadereh R., et al. The Ovario-Protective Effect of Erythropoietin against Oxidative Damage Associated with Reperfusion Following Ovarian Torsion in Rat. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences.* 2011; 6(1): p. 18-24. Disponibil la: <https://thescipub.com/abstract/10.3844/ajavsp.2011.18.24> [accesat la 29.06.2020]
27. Celik Kavak E., Gulcu Bulmus F., Bulmus O., Kavak S.B., Kocaman N. Magnesium: does it reduce ischemia/reperfusion injury in an adnexal torsion rat model? *Drug Des Devel Ther.* 2018; 12: p. 409–415. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5836654/> [accesat la 29.06.2020]
28. Ahmed S.M., Abdelzاهر W.Y. Zafirlukast alleviates ovarian histological and biochemical alterations induced by ischemia–reperfusion in rats. *Kasr Al Ainy Med J.* 2016; 22: p. 129-135. Disponibil la: <http://www.kamj.eg.net/article.asp?issn=1687-4625;year=2016;volume=22;issue=3;spage=129;epage=135;aualst=Ahmed> [accesat la 29.06.2020]
29. Osmanağaoğlu M.A., Kesim M., Yuluğ E., Menteşe A., Karahan C.S. The Effect of High Dose Methylprednisolone on Experimental Ovarian Torsion/Reperfusion Injury in Rats. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2012; 72(1): p. 70–74. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4168535/> [accesat la 29.06.2020]
30. Baş H., Kara Ö., Kara M., Pandir D. Protective effect of vardenafil on ischemia–reperfusion injury in rat ovary. *Turk J Med Sci.* 2013; 43: p. 684-689. Disponibil la: [https://www.researchgate.net/publication/272700584\\_Protective\\_effect\\_of\\_vardenafil\\_on\\_ischemia-reperfusion\\_injury\\_in\\_rat\\_ovary](https://www.researchgate.net/publication/272700584_Protective_effect_of_vardenafil_on_ischemia-reperfusion_injury_in_rat_ovary) [accesat la 29.06.2020]
31. Ingeç M., Calik M., Gundogdu C., Kurt A., Yilmaz M., Isaoglu U., et al. Biological and histopathological investigations of moclobemide on injured ovarian tissue following induction of ischemia-reperfusion in rats. *Int J Fertil Steril.* 2012; 6(1): p. 19–26. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4260643/> [accesat la 29.06.2020]
32. Kumbasar S., Yapca O.E., Bilen H., Suleyman B., Ozgeris F.B., Borekci B., et al. The effect of Lacidipine on Ischemia-Reperfusion Induced oxidative damage in ovaries of female rats. *Biomed Res- India.* 2012; 23(4): p. 495-500. Disponibil la: <https://www.alliedacademies.org/articles/the-effect-of-lacidipine-on-ischemiareperfusion-induced-oxidative-damage-in-ovaries-of-female-rats.pdf> [accesat la 29.06.2020]
33. Kumbasar S., Cetin N., Yapca O.E., Sener E., Isaoglu U., Yilmaz M., et al. Exogenous ATP administration prevents ischemia/reperfusion-induced oxidative stress and tissue injury by modulation of hypoxanthine metabolic pathway in rat ovary. *Ciência Rural.* 2014; 44(7): p. 1257-1263. Disponibil la: <https://www.scielo.br/pdf/cr/v44n7/0103-8478-cr-44-07-01257.pdf> [accesat la 29.06.2020]

34. Borekci B., Gundogdu C., Altunkaynak B.Z., Calık M., Altunkaynak M.E., Unal D., et al. The protective effect of dehydroepiandrosterone on ovarian tissues after torsion-detorsion injury: a stereological and histopathological study. *Eurasian J Med.* 2009; 41: p. 22-27. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4261661/> [accesat la 29.06.2020]
35. Köleli I. Mean platelet volume in early diagnosis of adnexal torsion. *Balkan Med J.* 2015; 32(4): p. 410-413. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4692342/> [accesat la 29.06.2020]
36. Ruder E.H., Hartman T.J., Goldman M.B. Impact of oxidative stress on female fertility. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2009; 21(3): p. 219–222. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2749720/> [accesat la 29.06.2020]
37. Yapca O.E., Borekci B., Suleyman H. Ischemia-reperfusion damage. *Eurasian J Med.* 2013; 45(2): p. 126–127. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4261480/> [accesat la 29.06.2020]
38. Eken M.K., Ersoy G.S., Kaygusuz E.I., Devranoğlu B., Takır M., Çilingir O.T., et al. Etanercept protects ovarian reserve against ischemia/reperfusion injury in a rat model. *Arch Med Sci.* 2019; 15(4): p. 1104–1112. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6657239/> [accesat la 29.06.2020]
39. Lazăr C., Mişina A., Cuţescu I., Tagadiuc O. Mechanisms of reactive oxygen species production in the lesions caused by ischemia/reperfusion. *Archives of the Balkan Medical Union.* 2016; 51(1), supl. 1: p. 199-204. ISSN 0041-6940.
40. Aslan M., Senturk G E., Akkaya H., Sahin S., Yılmaz B. The effect of oxytocin and Kisspeptin-10 in ovary and uterus of ischemia-reperfusion injured rats. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2017; 56(4): p. 456-462. Disponibil la: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1028455917301304?via%3Dihub> [accesat la 29.06.2020]
41. Tokgoz V.Y., Sipahi M., Keskin O., Guvendi G.F., Takir S. Protective effects of vitamin D on ischemia-reperfusion injury of the ovary in a rat model. *Iran J Basic Med Sci.* 2018; 21(6): p. 593–599. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6015247/> [accesat la 29.06.2020]
42. Koc K., Erol H.S., Colak S., Cerig S., Yildirim S., Geyikoglu F. The protective effect of propolis on rat ovary against ischemia-reperfusion injury: Immunohistochemical, biochemical and histopathological evaluations. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2019; 111: p. 631-637. Disponibil la: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332218354660?via%3Dihub> [accesat la 29.06.2020]
43. Ozlem K., Birkan Y., Mustafa K., Emin K. Protective effect of Vaccinium myrtillus on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2018; 57(6): p. 836-841. Disponibil la: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1028455918302365?via%3Dihub> [accesat la 29.06.2020]
44. Yayla M., Cetin D., Adali Y., Kilicle P.A., Toktay E. Potential therapeutic effect of pomegranate seed oil on ovarian ischemia/reperfusion injury in rats. *Iran J Basic Med Sci.* 2018; 21(12): p. 1262–1268. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6312678/> [accesat la 29.06.2020]
45. Najafpour A., Azizizadeh H. Interaperitoneal Administration of Alpha-Tocopherol Loaded Nanoparticles Improves Ischemia-Reperfusion Injury in Rat Ovaries Torsion and Detorsion

- Model. *Bull Emerg Trauma*. 2018; 6(3): p. 207–216. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6078481/> [accesat la 29.06.2020]
46. Kumbasar S., Salman S., Al R.A., Ozturk C., Yarali O., Alp H.H., et al. The effect of metamizole on ischemia/reperfusion injury in the rat ovary: An analysis of biochemistry, molecular gene expression, and histopathology. *Indian J Pharmacol*. 2016; 48(1): p. 32–36. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4778203/> [accesat la 29.06.2020]
  47. Atasever M., Bakacak Z. Nigella Sativa Oil Protects the Rat Ovary from Oxidative Injury Due to Ischemia-Reperfusion. *Med Sci Monit*. 2017; 23: p. 5027–5033. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5665610/> [accesat la 29.06.2020]
  48. Sağsöz N., Kisa U., Apan A. Ischaemia-reperfusion injury of rat ovary and the effects of vitamin C, mannitol and verapamil. *Hum Reprod*. 2002 ; 17(11): p. 2972-2976. Disponibil la: <https://academic.oup.com/humrep/article/17/11/2972/635328> [accesat la 29.06.2020]
  49. Saber M., Eimani H., Mehranjani M.S., Shahverdi A., Momeni H.R., Fathi R., et al. The effect of Verapamil on ischaemia/reperfusion injury in mouse ovarian tissue transplantation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018; 108: p. 1313-1319. Disponibil la: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332218333195?via%3Dihub> [accesat la 29.06.2020]
  50. Yıldırım Ş., Topaloğlu N., Tekin M., Küçük A., Erdem H., Erbaş M., et al. Protective role of Proanthocyanidin in experimental ovarian torsion. *Medical Journal of The Islamic Republic of Iran (MJIRI)*. 2015; 29: 185. Disponibil la: [http://mjiri.iums.ac.ir/browse.php?a\\_id=2720&sid=1&slc\\_lang=en](http://mjiri.iums.ac.ir/browse.php?a_id=2720&sid=1&slc_lang=en) [accesat la 29.06.2020]
  51. Behrooz-Lak T., Ebrahimpour M., Zarei L., Pourjabali M., Farhad N., et al. Systemic administration of curcumin nanoparticles protects ischemia-reperfusion injury in ovaries: An animal model study. *Rev Assoc Med Bra*. 2018; 64(1): p. 22-31. Disponibil la: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-42302018000100022&lng=en&tlng=en](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302018000100022&lng=en&tlng=en) [accesat la 29.06.2020]
  52. Merhi Z., Garg B., Moseley-LaRue R., Moseley A.R., Smith A.H., Zhang J. Ozone therapy: a potential therapeutic adjunct for improving female reproductive health. *Med Gas Res*. 2019; 9(2): p. 101–105. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6607862/> [accesat la 29.06.2020]
  53. Cipak Gasparovic A., Zarkovic N., Zarkovic K., Semen K., Kaminsky D., Yelisyeyeva O., et al. Biomarkers of oxidative and nitro-oxidative stress: conventional and novel approaches. *Br J Pharmacol*. 2017; 174(12): p. 1771–1783. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5446576/> [accesat la 29.06.2020]
  54. Pizzino G., Irrera N., Cucinotta M., Pallio G., Mannino F., Arcoraci V., et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*. 2017; 2017: 8416763. Disponibil la: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2017/8416763/> [accesat la 29.06.2020]
  55. Marrocco I., Altieri F., Peluso I. Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. *Oxid Med Cell Longev*. 2017; 2017: 6501046. Disponibil la: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2017/6501046/> [accesat la 29.06.2020]
  56. Adwas A.A., Elsayed A.S.I., Azab A.E., Quwaydir F.A. Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. *J Appl Biotechnol Bioeng*. 2019; 6(1): p. 43–47. Disponibil la: <https://medcraveonline.com/JABB/JABB-06-00173.pdf> [accesat la 29.06.2020]

57. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006; 141(2): p. 312–322. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1475431/> [accesat la 29.06.2020]
58. Kohen R., Nyska A. Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicol pathol.* 2002; 30(6): p. 620-650. Disponibil la: <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1080/01926230290166724> [accesat la 29.06.2020]
59. Phaniendra A., Jestadi D.B., Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem.* 2015; 30(1): p. 11–26. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4310837/> [accesat la 29.06.2020]
60. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? *J Neurochem.* 2006; 97(6): p. 1634-1658. Disponibil la: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x> [accesat la 29.06.2020]
61. Lü J.M., Lin P.H., Yao Q., Chen C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med.* 2010; 14(4): p. 840–860. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2927345/> [accesat la 28.06.2020]
62. Rodríguez-Lara S.Q., Cardona-Muñoz E.G., Ramírez-Lizardo E.J., Totsuka-Sutto S.E., Castillo-Romero A., et al. Alternative interventions to prevent oxidative damage following ischemia/reperfusion. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016: 7190943. Disponibil la: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/7190943/> [accesat la 29.06.2020]
63. Hussain T., Tan B., Yin Y., Blachier F., Tossou M.C., Rahu N. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016: 7432797. Disponibil la: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/7432797/> [accesat la 29.06.2020]
64. Agarwal A., Aponte-Mellado A., Premkumar B.J., Shaman A., Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol.* 2012; 10: 49. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3527168/> [accesat la 29.06.2020]
65. Sugino N. Reactive oxygen species in ovarian physiology. *Reprod Med Biol.* 2005; 4(1): p. 31–44. Disponibil la: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1447-0578.2005.00086.x> [accesat la 29.06.2020]
66. Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 2010; 4(8): p. 118–126. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3249911/> [accesat la 29.06.2020]
67. Fujii J., Iuchi Y., Okada F. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005; 3: 43. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1224869/> [accesat la 29.06.2020]
68. Cui H., Kong Y., Zhang H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *J Signal Transduct.* 2012; 2012: 646354. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3184498/> [accesat la 29.06.2020]
69. Burton G.J., Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Prac Res Clin Obstet Gynaecol.* 2011; 25(3): p. 287-299. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3101336/> [accesat la 29.06.2020]

70. Li C., Jackson R.M. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002 ; 282(2): p. C227-C241. Disponibil la: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpcell.00112.2001> [accesat la 29.06.2020]
71. Pontes H.B., Neto E.D., Pontes J.C., Vendas Cruz G.S., Miranda J.V., Sampaio T.L., et al. Ischemia and Reperfusion Injury : General Aspects and Mechanisms. *EC Cardiology.* 2016; 2(5): p. 240-248. Disponibil la: <https://www.econicon.com/eccy/pdf/ECCY-02-000036.pdf> [accesat la 29.06.2020]
72. Agarwal A., Gupta S., Sharma R.K. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005; 3: 28. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1215514/> [accesat la 29.06.2020]
73. Dumanschi C., Ivanov V. Evoluția oxidului nitric la diferite etape după angioplastia coronariană în funcție de stentul utilizat. *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale.* 2019; 1(61): p. 132-136. ISSN 1857-0011. Disponibil la: [https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare\\_articol/75770](https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/75770) [accesat la 29.06.2020]
74. Simionov L., Ivanov V., Popovici M., Ciobanu L., Cobeț V., Popovici I., et al. Dinamica biomarkerilor în funcție de terapia pacienților supuși angioplastiei coronariene. *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale.* 2016; 2(51): p. 116-122. ISSN 1857-0011. Disponibil la: [https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare\\_articol/49837](https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/49837) [accesat la 29.06.2020]
75. Brunel A., Lang J., Couture M., Boucher J.L., Dorlet P., et al. Oxygen activation in NO synthases: evidence for a direct role of the substrate. *FEBS Open Bio.* 2016; 6(5): p. 386–397. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4856417/> [accesat la 29.06.2020]
76. Basini G., Grasselli F. Nitric oxide in follicle development and oocyte competence. *Reproduction.* 2015; 150(1): p. R1-R9. Disponibil la: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/150/1/R1.xml> [accesat la 29.06.2020]
77. Rosselli M., Keller P.J., Dubey R.K. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum Reprod Update.* 1998; 4(1): p. 3–24. Disponibil la: <https://www.zora.uzh.ch/id/eprint/155008/> [accesat la 29.06.2020]
78. Godber B.L., Doel J.J., Sapkota G.P., Blake D.R., Stevens C.R., Eisenthal R., et al. Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. *J Biol Chem.* 2000; 275: p. 7757-7763. Disponibil la: <https://www.jbc.org/content/275/11/7757.full.pdf> [accesat la 29.06.2020]
79. Granger D.N., Kvietys P.R. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol.* 2015; 6: p. 524–551. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4625011/> [accesat la 29.06.2020]
80. Cortese-Krott M.M., Fernandez B.O., Kelm M., Butler A.R., Feelisch M. On the chemical biology of the nitrite/sulfide interaction. *Nitric Oxide.* 2015; 46: p. 14-24. Disponibil la: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1089860314005163?via%3Dihub> [accesat la 29.06.2020]
81. Wu M.-Y., Yiang G.-T., Liao W.-T., Tsai A. P.-Y., Cheng Y.-L., Cheng P.-W., et al. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cell Physiol Biochem.* 2018; 46: p. 1650-1667. Disponibil la: <https://www.karger.com/Article/FullText/489241> [accesat la 29.06.2020]
82. Saksela M., Lapatto R., Raivio K.O. Irreversible conversion of xanthine dehydrogenase into xanthine oxidase by a mitochondrial protease. *FEBS letters.* 1999; 443(2): p. 117-120. Disponibil la: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001457939801686X> [accesat la 29.06.2020]

83. Gardiner G.J., Deffit S.N., McLetchie S., Pérez L., Walline C.C., Blum J.S. A role for NADPH oxidase in antigen presentation. *Front Immunol.* 2013; 4: 295. Disponibil la: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2013.00295/full> [accesat la 29.06.2020]
84. Chapman A.L., Mocatta T.J., Shiva S., Seidel A., Chen B., Khalilova I., et al. Ceruloplasmin is an endogenous inhibitor of myeloperoxidase. *J Biol Chem.* 2013; 288(9): p. 6465-6477. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3585080/> [accesat la 29.06.2020]
85. Aksoy A.N. Ovarian Ischemia-Reperfusion Injury: A Brief Review. *SM J Gynecol Obstet.* 2015; 1(2): 1008. Disponibil la: <https://smjournals.com/gynecology-obstetrics/fulltext/smjgo-v1-1008.php> [accesat la 29.06.2020]
86. Zhang F., Ru N., Shang Z.H., Chen J.F., Yan C., Li Y., et al. Daidzein ameliorates spinal cord ischemia/reperfusion injury-induced neurological function deficits in Sprague-Dawley rats through PI3K/Akt signaling pathway. *Exp Ther Med.* 2017; 14(5): p. 4878-4886. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5704268/> [accesat la 29.06.2020]
87. Kunwar A., Priyadarsini K.I. Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *J Med Allied Sci.* 2011 ; 1(2): p. 53-60. Disponibil la: <https://www.bibliomed.org/mnsfulltext/154/154-1449484220.pdf?1593420158> [accesat la 29.06.2020]
88. El-Bahr S.M. Biochemistry of Free Radicals and Oxidative Stress. *Science International.* 2013; 1: p. 111-117. Disponibil la: <http://docsdrive.com/pdfs/scienceinternational/sciintl/2013/111-117.pdf> [accesat la 29.06.2020]
89. Hsu J.L., Hsieh Y., Tu C., O'Connor D., Nick H.S., Silverman D.N. Catalytic properties of human manganese superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1996; 271(30): p. 17687-17691. Disponibil la: <https://www.jbc.org/content/271/30/17687.full.pdf> [accesat la 29.06.2020]
90. Weiss R.H., Fretland D.J., Baron D.A., Ryan U.S., Riley D.P. Manganese-based superoxide dismutase mimetics inhibit neutrophil infiltration in vivo. *J Biol Chem.* 1996; 271(42): p. 26149-26156. Disponibil la: <https://www.jbc.org/content/271/42/26149.full.pdf> [accesat la 29.06.2020]
91. Herbette S., Roeckel-Drevet P., Drevet J.R. Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. *FEBS Journal.* 2007; 274: p. 2163-2180. Disponibil la: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1742-4658.2007.05774.x> [accesat la 29.06.2020]
92. Hasanvand A., Abbaszadeh A., Darabi S., Nazari A., Gholami M., Kharazmkia A. Evaluation of selenium on kidney function following ischemic injury in rats; protective effects and antioxidant activity. *J Renal Inj Prev.* 2016; 6(2): p. 93-98. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5423291/> [accesat la 29.06.2020]
93. Reiter R.J., Tan D.X., Rosales-Corral S., Galano A., Zhou X.J., Xu B. Mitochondria: Central Organelles for Melatonin's Antioxidant and Anti-Aging Actions. *Molecules.* 2018; 23(2): 509. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6017324/> [accesat la 29.06.2020]
94. Wu G., Fang Y.-Z., Yang S., Lupton J.R., Turner N.D. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *J Nutr.* 2004; 134(3): p. 489-492. Disponibil la: <https://academic.oup.com/jn/article/134/3/489/4688681> [accesat la 29.06.2020]
95. Negrei C., Bălănescu A., Ilie M., Margină D., Bălălău D., Baconi D., et al. Relevanța determinării unor parametri de stres oxidativ asupra diagnosticării afecțiunilor cardiovasculare asociate poliartritei reumatoide. *Revista Medicină Internă.* 2009; 5: p. 1-7.



- Disponibil la: <http://www.medicina-interna.ro/articol.php?articol=510> [accesat la 29.06.2020]
96. **Lazăr C.**, Tagadiuc O., Protopop S., Mișina A., Pantea V. Aspecte ale metabolismului în țesutul ovarian. *Buletin de Perinatologie*. 2016; 4(72): p. 52-58. ISSN 1810-5289. Disponibil la: [https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare\\_articol/49646](https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/49646) [accesat la 29.06.2020]
  97. Jo S.H., Son M.K., Koh H.J., Lee S.M., Song I.H., Kim Y.O., et al. Control of mitochondrial redox balance and cellular defense against oxidative damage by mitochondrial NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase. *J Biol Chem*. 2001; 276(28): 16168-16176. Disponibil la: <https://www.jbc.org/content/276/19/16168.full.pdf> [accesat la 29.06.2020]
  98. Kim J., Kim K.Y., Jang H.S., Yoshida T., Tsuchiya K., Nitta K., et al. Role of cytosolic NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase in ischemia-reperfusion injury in mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009; 296(3): p. F622-F633. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2660191/> [accesat la 29.06.2020]
  99. Ingec M., Isaoglu U., Yilmaz M., Calik M., Polat B., Alp H.H., et al. Prevention of ischemia-reperfusion injury in rat ovarian tissue with the on-off method. *J Physiol Pharmacol*. 2011; 62(5): p. 575-582. Disponibil la: [http://www.jpp.krakow.pl/journal/archive/10\\_11/pdf/575\\_10\\_11\\_article.pdf](http://www.jpp.krakow.pl/journal/archive/10_11/pdf/575_10_11_article.pdf) [accesat la 29.06.2020]
  100. Townsend D.M., Manevich Y., He L., Hutchens S., Pazoles C.J., Tew K.D. Novel role for glutathione S-transferase  $\pi$  regulator of protein S-glutathionylation following oxidative and nitrosative stress. *J Biol Chem*. 2009; 284(1): p. 436-445. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2610519/> [accesat la 29.06.2020]
  101. Chen W., Seefeldt T., Young A., Zhang X., Zhao Y., Ruffolo J., et al. Microtubule S-glutathionylation as a potential approach for antimetabolic agents. *BMC Cancer*. 2012; 12: 245. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3534152/> [accesat la 29.06.2020]
  102. Segelmark M., Persson B., Hellmark T., Wieslander J. Binding and inhibition of myeloperoxidase (MPO). A major function of ceruloplasmin? *Clin Exp Immunol*. 1997; 108: p. 167-174. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1904617/> [accesat la 29.06.2020]
  103. Ayala A., Muñoz M.F., Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 2014: 360438. Disponibil la: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2014/360438/> [accesat la 29.06.2020]
  104. Gaschler M.M., Stockwell B.R. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017; 482(3): p. 419-425. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5319403/> [accesat la 29.06.2020]
  105. Siddique Y.H., Ara G., Afzal M. Estimation of lipid peroxidation induced by hydrogen peroxide in cultured human lymphocytes. *Dose Response*. 2012; 10(1): p. 1-10. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3299524/> [accesat la 29.06.2020]
  106. Yaman Tunc S., Agacayak E., Goruk N.Y., Icen M.S., Turgut A., Alabalik U., et al. Protective effects of honokiol on ischemia/reperfusion injury of rat ovary: an experimental study. *Drug Des Devel Ther*. 2016; 10: p. 1077-1083. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4789835/> [accesat la 29.06.2020]
  107. Berlett B.S., Stadtman E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*. 1997; 272(33): p. 20313-20316. Disponibil la: <https://www.jbc.org/content/272/33/20313.full.pdf> [accesat la 29.06.2020]

108. Dalle-Donne I., Aldini G., Carini M., Colombo R., Rossi R., Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med.* 2006; 10(2): p. 389–406. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3933129/> [accesat la 29.06.2020]
109. Frijhoff J., Winyard P.G., Zarkovic N., Davies S.S., Stocker R., Cheng D., et al. Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2015; 23(14): p. 1144–1170. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4657513/> [accesat la 29.06.2020]
110. Reeg S., Grune T. Protein Oxidation in Aging: Does It Play a Role in Aging Progression? *Antioxid Redox Signal.* 2015; 23(3): p. 239–255. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4507125/> [accesat la 29.06.2020]
111. Piwowar A. Advanced oxidation protein products. Part I. Mechanism of the formation, characteristics and property. *Pol Merkur Lekarski.* 2010; 28(164): p. 166-169. Disponibil la: [https://www.researchgate.net/publication/43048169\\_Advanced\\_oxidation\\_protein\\_products\\_Part\\_I\\_Mechanism\\_of\\_the\\_formation\\_characteristics\\_and\\_property](https://www.researchgate.net/publication/43048169_Advanced_oxidation_protein_products_Part_I_Mechanism_of_the_formation_characteristics_and_property) [accesat la 29.06.2020]
112. Piwowar A. Biochemical and clinical aspects of advanced oxidation protein products in kidney diseases and metabolic disturbances. *Postepy Hig Med Dosw.* 2014; 68: p. 179-190. Disponibil la: <https://phmd.pl/resources/html/article/details?id=55693&language=en> [accesat la 29.06.2020]
113. Gryszczyńska B., Budzyń M., Formanowicz D., Formanowicz P., Krasieński Z., et al. Advanced Oxidation Protein Products and Carbonylated Proteins Levels in Endovascular and Open Repair of an Abdominal Aortic Aneurysm: The Effect of Pre-, Intra-, and Postoperative Treatment. *Biomed Res Int.* 2019; 2019: 7976043. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6530117/> [accesat la 29.06.2020]
114. Gryszczyńska B., Formanowicz D., Budzyń M., Wanic-Kossowska M., Pawliczak E., Formanowicz P., et al. Advanced Oxidation Protein Products and Carbonylated Proteins as Biomarkers of Oxidative Stress in Selected Atherosclerosis-Mediated Diseases. *Biomed Res Int.* 2017; 2017: 4975264. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5572583/> [accesat la 29.06.2020]
115. Cao W., Hou F.F., Nie J. AOPPs and the progression of kidney disease. *Kidney Int Suppl.* 2014; 4(1): p. 102–106. Disponibil la: [https://www.kisupplements.org/article/S2157-1716\(15\)31201-6/fulltext](https://www.kisupplements.org/article/S2157-1716(15)31201-6/fulltext) [accesat la 29.06.2020]
116. Kratz E.M., Piwowar A. Melatonin, advanced oxidation protein products and total antioxidant capacity as seminal parameters of prooxidant-antioxidant balance and their connection with expression of metalloproteinases in context of male fertility. *J Physiol Pharmacol.* 2017; 68(5): p. 659-668. Disponibil la: [http://www.jpp.krakow.pl/journal/archive/10\\_17/pdf/659\\_10\\_17\\_article.pdf](http://www.jpp.krakow.pl/journal/archive/10_17/pdf/659_10_17_article.pdf) [accesat la 29.06.2020]
117. Kar K., Sinha S. Correlation between Advanced Oxidation Protein Products (AOPP) and Antioxidant status in Type 2 diabetics in Southern Asian Region. *Sch. J. App. Med. Sci.* 2014; 2(2B): p. 647-652. Disponibil la: <http://saspublisher.com/wp-content/uploads/2014/03/SJAMS-22B647-652.pdf> [accesat la 29.06.2020]
118. Gaze D.C. Ischemia modified albumin: a novel biomarker for the detection of cardiac ischemia. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2009; 24(4): p. 333-341. Disponibil la: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/dmpk/24/4/24\\_4\\_333/article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/dmpk/24/4/24_4_333/article) [accesat la 29.06.2020]
119. Yildirim A., Yildirim S., Topaloglu N., Tekin M., Kucuk A., Erdem H., et al. Correlation of ischemia-modified albumin levels and histopathologic findings in experimental ovarian

- torsion. *Turk J Emerg Med.* 2016; 16(1): p. 8-11. Disponibil la: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452247316000030> [accesat la 29.06.2020]
120. Sinha M.K., Gaze D.C., Tippins J.R., Collinson P.O., Kaski J.C. Ischemia modified albumin is a sensitive marker of myocardial ischemia after percutaneous coronary intervention. *Circulation.* 2003; 107(19): p. 2403-2405. Disponibil la: <https://www.ahajournals.org/doi/epub/10.1161/01.CIR.0000072764.18315.6B> [accesat la 29.06.2020]
121. Gudumac V., Tagadiuc O. Metodă de determinare a capacității albuminei ischemic modificate de legare a cobaltului. Brevet de invenție nr. MD 4054 din 11.06.2009. Disponibil la: <http://www.db.agepi.md/Inventions/details/a%202009%200116/Des~a%202009%200116>. [accesat la 29.06.2020]
122. Aran T., Guven S., Unsal M.A., Alver A., Mentese A., Yulug E. Serum ischemia-modified albumin as a novel marker of ovarian torsion: an experimental study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010; 150(1): p. 72-75. Disponibil la: [https://www.ejog.org/article/S0301-2115\(10\)00040-0/fulltext](https://www.ejog.org/article/S0301-2115(10)00040-0/fulltext) [accesat la 29.06.2020]
123. Karatas Gurgun A., Kaban I., Aka N., Mentese A., Aker F., Uras A.R. The Role of ischemia Modified Albumin and D-dimer as Early or Late Biochemical Markers in Ovarian Torsion. *J Obstet Gynaecol Res.* 2017; 43(5): p. 895-901. Disponibil la: <https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jog.13281> [accesat la 29.06.2020]
124. Gencer M., Karaca T., Güngör A.N., Hacıvelioğlu S.Ö., Demirtaş S., Turkon H., et al. The protective effect of quercetin on IMA levels and apoptosis in experimental ovarian ischemia-reperfusion injury. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2014; 177: p. 135-140. Disponibil la: [https://www.ejog.org/article/S0301-2115\(14\)00189-4/fulltext](https://www.ejog.org/article/S0301-2115(14)00189-4/fulltext) [accesat la 29.06.2020]
125. Guven S., Kart C., Guven E.S.G., Cetin E.C., Menteşe A. Is the measurement of serum ischemia-modified albumin the best test to diagnose ovarian torsion? *Gynecol Obstet Invest.* 2015; 79(4): p. 269-275. Disponibil la: <https://www.karger.com/Article/Abstract/367787> [accesat la 29.06.2020]
126. Yeniocak S., Saraç F., Yazıcıoğlu M., Karabulut N., Ünal A., Yücetaş E., et al. The Diagnostic Values of Ischemia-Modified Albumin in Patients with Acute Abdominal Pain and Its Role in Differentiating Acute Abdomen. *Emergency Medicine International.* 2020; 2020: 7925975. Disponibil la: <https://www.hindawi.com/journals/emi/2020/7925975/> [accesat la 29.06.2020]
127. Timercan T., Şveţ I., Pantea V., Ambros A., Lîsîi L. Advanced glycation end products in isoproterenol-induced acute myocardial infarction. *Med Pharm Rep.* 2019; 92(3): p. 235-238. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6709963/> [accesat la 29.06.2020]
128. Zhou T., Chuang C.C., Zuo L. Molecular Characterization of Reactive Oxygen Species in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 864946. Disponibil la: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/864946/> [accesat la 29.06.2020]
129. Lazăr C., Protopop S., Mişina A., Tagadiuc O. Efectele speciilor reactive de oxigen asupra sistemului de reproducere feminin. *Buletinul Academiei de Ştiinţe a Moldovei. Ştiinţe Medicale.* 2017; 2(54): p. 83-90. ISSN 1857-0011. Disponibil la: [https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare\\_articol/54131](https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/54131) [accesat la 29.06.2020]
130. Tiwari M., Prasad S., Tripathi A., Pandey A.N., Singh A.K., Shrivastav T.G., et al. Involvement of Reactive Oxygen Species in Meiotic Cell Cycle Regulation and Apoptosis in Mammalian Oocytes. *Reactive Oxygen Species.* 2016; 1(2): p. 110–111. Disponibil la: <http://dx.doi.org/10.20455/ros.2016.817> [accesat la 29.06.2020]

131. Shkolnik K., Tadmor A., Ben-Dor S., Nevo N., Galiani D., Dekel N. Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108(4): p. 1462–1467. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3029775/> [accesat la 29.06.2020]
132. Matos L., Stevenson D., Gomes F., Silva-Carvalho J.L., Almeida H. Superoxide dismutase expression in human cumulus oophorus cells. *Mol Hum Reprod*. 2009; 15(7): p. 411–419. Disponibil la: <https://academic.oup.com/molehr/article/15/7/411/1021413> [accesat la 29.06.2020]
133. Shahpar S., Minoo I.M., Vahid N., Goudarz S.H. Physiological Effects of NO-cGMP Pathway on Ovarian Steroidogenesis in Rat. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2007; 10: p. 1175-1179. Disponibil la: <http://docsdrive.com/pdfs/ansinet/pjbs/2007/1175-1179.pdf> [accesat la 29.06.2020]
134. Hanke C.J., Drewett J.G., Myers C.R., Campbell W.B. Nitric oxide inhibits aldosterone synthesis by a guanylyl cyclase-independent effect. *Endocrinology*. 1998; 139(10): p. 4053–4060. Disponibil la: <https://academic.oup.com/endo/article/139/10/4053/2986856> [accesat la 29.06.2020]
135. Taskin O., Birincioglu M., Aydin A., Buhur A., Burak F., Yilmaz I., et al. The effects of twisted ischaemic adnexa managed by detorsion on ovarian viability and histology: an ischaemia–reperfusion rodent model. *Hum Reprod*. 1998; 13(10): p. 2823-2827. Disponibil la: <https://academic.oup.com/humrep/article/13/10/2823/681819> [accesat la 29.06.2020]
136. Baufeld A., Vanselow J. Lactate promotes specific differentiation in bovine granulosa cells depending on lactate uptake thus mimicking an early post-LH stage. *Reprod Biol Endocrinol*. 2018; 16(1): 15. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5819637/> [accesat la 29.06.2020]
137. Fadhilah, Yoshioka S., Nishimura R., Okuda K. Hypoxia promotes progesterone synthesis during luteinization in bovine granulosa cells. *J Reprod Dev*. 2014; 60(3): p. 194-201. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4085383/> [accesat la 29.06.2020]
138. Kim J., Bagchi I.C., Bagchi M.K. Signaling by hypoxia-inducible factors is critical for ovulation in mice. *Endocrinology*. 2009; 150(7): p. 3392–3400. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2703551/> [accesat la 29.06.2020]
139. Soltani M., Moghimian M., Abtahi-Eivari S.H., Shoorei H., Khaki A., Shokoohi M. Protective Effects of Matricaria chamomilla Extract on Torsion/ Detorsion-Induced Tissue Damage and Oxidative Stress in Adult Rat Testis. *Int J Fertil Steril*. 2018; 12(3): p. 242–248. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6018175/> [accesat la 29.06.2020]
140. Ambrosi N., Guerrieri D., Caro F., Sanchez F., Haeublein G., Casadei D., et al. Alpha Lipoic Acid: A Therapeutic Strategy that Tend to Limit the Action of Free Radicals in Transplantation. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(1): 102. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5796052/> [accesat la 29.06.2020]
141. Cui X.G., Han Z.T., He S.H., Wu X.D., Chen T.R., Shao C.H., et al. HIF1/2 $\alpha$  mediates hypoxia-induced LDHA expression in human pancreatic cancer cells. *Oncotarget*. 2017; 8(15): p. 24840–24852. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5421893/> [accesat la 29.06.2020]
142. Eltzschig H.K., Collard C.D. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull*. 2004; 70: p. 71–86. Disponibil la: <https://academic.oup.com/bmb/article/70/1/71/332341> [accesat la 29.06.2020]

143. Pontes H.B.D., Pontes J.C.D.V., Neto A., Vendas G.S.D.C., Miranda J.V.C., Dias L.D.E.S., et al. Evaluation of the Effects of Atorvastatin and Ischemic Postconditioning Preventing on the Ischemia and Reperfusion Injury: Experimental Study in Rats. *Braz J Cardiovasc Surg.* 2018; 33(1): p. 72-81. Disponibil la: <https://cdn.publisher.gn1.link/bjcv.org/pdf/v33n1a14.pdf> [accesat la 29.06.2020]
144. Sanderson T.H., Reynolds C.A., Kumar R., Przyklenk K., Hüttemann M. Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation. *Mol Neurobiol.* 2013; 47(1): p. 9–23. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3725766/> [accesat la 29.06.2020]
145. Santos C.H.M.D., Aydos R.D., Nogueira Neto E., Mijji L.N.O., Cassino P.C., Alves I.I., et al. Ischemic Postconditioning Assessment in the Liver of Rats Undergoing Mesenteric Ischemia and Reperfusion. *Braz J Cardiovasc Surg.* 2016; 31(4): p. 287-290. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5094425/> [accesat la 29.06.2020]
146. Liu F.C., Tsai H.I., Yu H.P. Organ-Protective Effects of Red Wine Extract, Resveratrol, in Oxidative Stress-Mediated Reperfusion Injury. *Oxid Med Cell Longev.* 2015; 2015: 568634. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4487914/> [accesat la 29.06.2020]
147. Ambros A. Studiul complex și integral al proceselor de oxidare peroxidică a lipidelor și al sistemului antioxidant în etapele timpurii ale răspunsului metabolic al rinichilor la acțiunea traumei mecanice. Autoreferatul tezei de doctor în științe medicale. Chișinău, 1996. CZU: 617.58-001.4+616.61+577.125
148. Tagadiuc O. Rolul proceselor de oxidare peroxidică a lipidelor și a sistemului antioxidant în etapele timpurii ale răspunsului metabolic al ficatului la acțiunea factorului traumatic mecanic. Autoreferatul tezei de doctor în științe medicale. Chișinău, 1994. CZU: 612.015+616.36-011.36/-92
149. Kezic A., Spasojevic I., Lezaic V., Bajcetic M. Mitochondria-Targeted Antioxidants: Future Perspectives in Kidney Ischemia Reperfusion Injury. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016: 2950503. Disponibil la: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/2950503/> [accesat la 29.06.2020]
150. Zweier J.L., Talukder M.A. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2006; 70(2): p. 181-190. Disponibil la: <https://academic.oup.com/circres/article/70/2/181/282732> [accesat la 29.06.2020]
151. Guan L.Y., Fu P.Y., Li P.D., Li Z.N., Liu H.Y., Xin M.G., et al. Mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effects of nitric oxide. *World J Gastrointest Surg.* 2014; 6(7): p. 122–128. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4110529/> [accesat la 29.06.2020]
152. Kunz L., Richter J.S., Mayerhofer A. The adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channel in endocrine cells of the human ovary: role in membrane potential generation and steroidogenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91(5): p. 1950–1955. Disponibil la: <https://academic.oup.com/jcem/article/91/5/1950/2874268> [accesat la 29.06.2020]
153. Du Q., Jovanović S., Sukhodub A., Barratt E., Drew E., Whalley K.M., et al. Human oocytes express ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Hum Reprod.* 2010; 25(11): p. 2774-2782. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2955558/> [accesat la 29.06.2020]
154. Ugurel V., Cicek A.C., Cemek M., Demirtas S., Kocaman A.T., Karaca T. Antioxidant and antiapoptotic effects of erdosteine in a rat model of ovarian ischemia-reperfusion injury. *Iran*

- J Basic Med Sci.* 2017; 20(1): p. 53–58. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5243975/> [accesat la 29.06.2020]
155. Burke T.J., Arnold P.E., Gordon J.A., Bulger R.E., Dobyán D.C., et al. Protective effect of intrarenal calcium membrane blockers before or after renal ischemia. Functional, morphological, and mitochondrial studies. *J Clin Invest.* 1984; 74(5): p. 1830–1841. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC425363/> [accesat la 29.06.2020]
156. Gateau-Roesch O., Argaud L., Ovize M. Mitochondrial permeability transition pore and postconditioning. *Cardiovasc Res.* 2006; 70(2): p. 264–273. Disponibil la: <https://academic.oup.com/circres/article/70/2/264/283439> [accesat la 29.06.2020]
157. Mandava K., Batchu U.R. Biochemical role of xanthine oxidoreductase and its natural inhibitors: an overview. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 2016; 8(10): p. 57–65. Disponibil la: <https://innovareacademics.in/journals/index.php/ijpps/article/view/13927> [accesat la 29.06.2020]
158. Chung H.Y., Baek B.S., Song S.H., Kim M.S., Huh J.I., Shim K.H., et al. Xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase and oxidative stress. *Age (Omaha).* 1997; 20(3): p. 127–140. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3455892/> [accesat la 29.06.2020]
159. Turrens J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003; 552(Pt 2): p. 335–344. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2343396/> [accesat la 29.06.2020]
160. Carden D.L., Granger D.N. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol.* 2000; 190(3): p. 255–266. Disponibil la: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/%28SICI%291096-9896%28200002%29190%3A3%3C255%3A%3AAID-PATH526%3E3.0.CO%3B2-6> [accesat la 29.06.2020]
161. Francischetti I., Moreno J.B., Scholz M., Yoshida W.B. Leukocytes and the inflammatory response in ischemia-reperfusion injury. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2010; 25(4): p. 575–584. Disponibil la: [https://cdn.publisher.gn1.link/bjcv.org/pdf/en\\_v25n4a23.pdf](https://cdn.publisher.gn1.link/bjcv.org/pdf/en_v25n4a23.pdf) [accesat la 29.06.2020]
162. Bulkley G.B. Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review. *Br J Cancer Suppl.* 1987; 8: p. 66–73. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2149484/> [accesat la 29.06.2020]
163. Kalogeris T., Bao Y., Korthuis R.J. Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biol.* 2014; 2: p. 702–714. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4060303/> [accesat la 29.06.2020]
164. Parhizkar P., Mohammadi R., Shahrooz R., Mohammadi V. Effects of Pyrroloquinoline Quinone (PQQ) on Ischemia-Reperfusion Injury in Rat Ovaries: Histological and Biochemical Assessments. *Bull Emerg Trauma.* 2019; 7(1): p. 35–40. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6360009/> [accesat la 29.06.2020]
165. Melekoglu R., Ciftci O., Eraslan S., Alan S., Basak N. The Protective Effects of Glycyrrhetic Acid and Chrysin against Ischemia-Reperfusion Injury in Rat Ovaries. *Biomed Res Int.* 2018; 2018: 5421308. Disponibil la: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2018/5421308/> [accesat la 29.06.2020]
166. Grisham M.B., Hernandez L.A., Granger D.N. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am. J. Physiol.* 1986; 251(4 Pt 1): p. G567–574. Disponibil la:

<https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajpgi.1986.251.4.G567> [accesat la 29.06.2020]

167. Kharbanda R.K., Peters M., Walton B., Kattenhorn M., Mullen M., Klein N., et al. Ischemic preconditioning prevents endothelial injury and systemic neutrophil activation during ischemia-reperfusion in humans in vivo. *Circulation*. 2001; 103(12): p. 1624-1630. Disponibil la: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.CIR.103.12.1624> [accesat la 29.06.2020]
168. Khastar H., Kadkhodae M., Sadeghipour H. R., Seifi B., Hadjati J., Najafi A., et al. Liver Oxidative Stress after Renal Ischemia-Reperfusion Injury is Leukocyte Dependent in Inbred Mice. *Iran J Basic Med Sci*. 2011; 14(6): p. 534-539. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3586855/> [accesat la 29.06.2020]
169. Eser A., Hizli D., Haltas H., Namuslu M., Kosus A., Kosus N., et al. Effects of curcumin on ovarian ischemia-reperfusion injury in a rat model. *Biomed Rep*. 2015; 3(6): p. 807-813. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4660605/> [accesat la 29.06.2020]
170. Argaud L., Gateau-Roesch O., Raisky O., Loufouat J., Robert D., et al. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation*. 2005; 111(2): p. 194-197. Disponibil la: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.cir.0000151290.04952.3b> [accesat la 29.06.2020]
171. Zhao Z.Q., Corvera J.S., Halkos M.E., Kerendi F., Wang N.P., et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 285(2): p. H579-588. Disponibil la: <https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajpheart.01064.2002> [accesat la 29.06.2020]
172. Kin H., Zhao Z.Q., Sun H.Y., Wang N.P., Corvera J.S., et al. Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res*. 2004; 62(1): p. 74-85. Disponibil la: <https://academic.oup.com/circovasres/article/62/1/74/372980> [accesat la 29.06.2020]
173. Yokoyama S., Nakagawa I., Ogawa Y., Morisaki Y., Motoyama Y., Park Y.S., et al. Ischemic postconditioning prevents surge of presynaptic glutamate release by activating mitochondrial ATP-dependent potassium channels in the mouse hippocampus. *PLoS ONE*. 2019; 14(4): e0215104. Disponibil la: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0215104> [accesat la 29.06.2020]
174. Santos C.H.M.D., Dourado D.M., Silva B.A.K.D., Pontes H.B.D., Neto A., Vendas G.S. D.C., et al. Effect of Ischemic Postconditioning and Atorvastatin in the Prevention of Remote Lung Reperfusion Injury. *Braz J Cardiovasc Surg*. 2018; 33(2): p. 115-121. Disponibil la: <https://cdn.publisher.gn1.link/bjcvcs.org/pdf/v33n2a03.pdf> [accesat la 29.06.2020]
175. Jivraj N., Liew F., Marber M. Ischaemic postconditioning: cardiac protection after the event. *Anaesthesia*. 2015; 70(5): p. 598-612. Disponibil la: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/anae.12974> [accesat la 29.06.2020]
176. Barsukevich V., Basalay M., Sanchez J., Mrochek A., Whittle J., Ackland G.L., et al. Distinct cardioprotective mechanisms of immediate, early and delayed ischaemic postconditioning. *Basic Res Cardiol*. 2015; 110(1): 452. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4250560/> [accesat la 29.06.2020]
177. Ma D., Feng L., Deng F., Feng J.C. Overview of Experimental and Clinical Findings regarding the Neuroprotective Effects of Cerebral Ischemic Postconditioning. *Biomed Res Int*. 2017; 2017: 6891645. Disponibil la: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/6891645/> [accesat la 29.06.2020]

178. Dorsa R.C., Pontes J.C.D.V., Antonioli A.C.B., Silva G.V.R.D., Benfatti R.A., Santos C.H.M.D., et al. Effect of remote ischemic postconditioning in inflammatory changes of the lung parenchyma of rats submitted to ischemia and reperfusion. *Braz J Cardiovasc Surg.* 2015; 30(3): p. 353-359. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4541782/> [accesat la 29.06.2020]
179. Nakamura R.K., Santos C.H.M.D., Mijji L.N.O., Arakaki M.S., Maedo C. M., Érnica Filho M., et al. Very short cycles of postconditioning have no protective effect against reperfusion injury. Experimental study in rats. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2014; 29(4): p. 521-526. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4408813/> [accesat la 29.06.2020]
180. Pagliaro P., Femminò S., Popara J., Penna C. Mitochondria in Cardiac Postconditioning. *Front Physiol.* 2018; 9: 287. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5879113/> [accesat la 29.06.2020]
181. Di Lisa F., Menabò R., Canton M., Barile M., Bernardi P. Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore Causes Depletion of Mitochondrial and Cytosolic NAD<sup>+</sup> and Is a Causative Event in the Death of Myocytes in Postischemic Reperfusion of the Heart. *J Biol Chem.* 2001; 276(4): p. 2571-2575. Disponibil la: <https://www.jbc.org/content/276/4/2571.full.pdf> [accesat la 29.06.2020]
182. Kin H., Zatta A.J., Lofye M.T., Amerson B.S., Halkos M E., Kerendi F., et al. Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine. *Cardiovasc Res.* 2005; 67(1): p. 124-133. Disponibil la: <https://academic.oup.com/circres/article/67/1/124/341655> [accesat la 29.06.2020]
183. Theodoraki K., Karmanioliou I., Tympa A., Tasoulis M.K., Nastos C., Vassiliou I., et al. Beyond Preconditioning: Postconditioning as an Alternative Technique in the Prevention of Liver Ischemia-Reperfusion Injury. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016: 8235921. Disponibil la: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/8235921/> [accesat la 29.06.2020]
184. Yapca O.E., Kumbasar S., Salman S., Yarali O., Sener E., Mammadov R., et al. Controlled reperfusion for different durations in the treatment of ischemia-reperfusion injury of the rat ovary: evaluation of biochemical features, molecular gene expression, and histopathology. *Can J Physiol Pharmacol.* 2015; 93(4): p. 269-274. Disponibil la: <https://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/cjpp-2014-0359#.Xvnnm0zbIU> [accesat la 29.06.2020]
185. Ozkisacik S., Yazici M., Gursoy H., Culhaci N. Does gradual detorsion protect the ovary against ischemia-reperfusion injury in rats? *Pediatr Surg Int.* 2014; 30(4): p. 437-440. Disponibil la: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00383-014-3480-3> [accesat la 29.06.2020]
186. Erdem A.O., Ozkisacik S., Coskun O.D., Dogan S., Culhaci N., Yazici M. The long-term protective effect of hypothermia and gradual detorsion on ovarian tissue in adnexal torsion/detorsion model in rats. *J Pediatr Surg.* 2019. Disponibil la: [https://www.jpedsurg.org/article/S0022-3468\(19\)30757-2/fulltext](https://www.jpedsurg.org/article/S0022-3468(19)30757-2/fulltext) [accesat la 29.06.2020]
187. Estimating the Number of Animals. Disponibil la: <http://rsawa.research.ucla.edu/arc/estimating-animals/> [accesat la 29.06.2020]
188. Tannenbaum J., Bennett B.T. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2015; 54(2): p. 120-132. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4382615/> [accesat la 29.06.2020]
189. Ciudin E., Marinescu D. Patologia animalelor de laborator și tehnica experimentală. *Editura Moldogrup, Iași*, 1997, p. 170-173.



190. McDonald J.H. Handbook of biological statistics (3rd ed.). *Sparky House Publishing, Baltimore, Maryland*. 2014. Disponibil la: <http://www.biostathandbook.com/index.html> [accesat la 29.06.2020]
191. Mostajeran F., Naderi M., Adibi S. Effects of melatonin on histopathological changes after experimental ovarian torsion-detorsion in cat. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. 2007; 5(5): p. 177-181. Disponibil la: <http://journals.ssu.ac.ir/ijrmnew/article-1-88-en.html> [accesat la 29.06.2020]
192. Uyanikoglu H., Hilali N.G., Yardimci M., Koyuncu I. A new biomarker for the early diagnosis of ovarian torsion: SCUBE-1. *Clin Exp Reprod Med*. 2018; 45(2): p. 94–99. Disponibil la: <https://ecerm.org/journal/view.php?doi=10.5653/cerm.2018.45.2.94> [accesat la 29.06.2020]
193. Галактионова Л.П., Молчанов А.В., Ельчанинова С.А., Варшавский Б.Я. Состояние перекисного окисления у больных с язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки. *Лаб. Дело*. 1998; 6: p. 10-14.
194. Gudumac V., Tagadiuc O., Andronache L., Ştirba O., Pantea V. Procedeu de dozare a dialdehidei malonice în materialul biologic. Certificat de inovator nr. 5157 din 14.12.2012.
195. Метельская В.А., Гуманова Н.Г. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови человека. *Клин. лаб. д-ка*. 2005; 6: p. 15-18.
196. Gudumac V., Tagadiuc O., Rîvneac V., Sardari V., Pantea V., et al. *Investigații biochimice. Volumul II. Micrometode. Elaborare metodică*. Tipogr. "Elena-VI", 2010, 97 p. ISBN 978-9975-106-06-1
197. Capeillère-Blandin C., Gausson V., Descamps-Latscha B., Witko-Sarsat V. Biochemical and spectrophotometric significance of advanced oxidized protein products. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1689(2): p. 91-102. Disponibil la: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443904000237?via%3Dihub> [accesat la 29.06.2020]
198. Gudumac V., Tagadiuc O., Andronache L., Ştirba O., Sardari V. Procedeu de dozare a produşilor proteici de oxidare avansată. Certificat de inovator nr. 5164 din 14.12.2012.
199. Séro L., Sanguinet L., Blanchard P., Dang B.T., Morel S., et al. Tuning a 96-well microtiter plate fluorescence-based assay to identify AGE inhibitors in crude plant extracts. *Molecules*. 2013; 18(11): p. 14320-14339. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6270619/> [accesat la 29.06.2020]
200. Матюшин Б.Н., Логинов А.С., Ткачев В.Д. Определение супероксиддисмутазной активности в материале пункционной биопсии печени при ее хроническом поражении. *Лаб. дело*. 1991; 10: p. 30-33.
201. Дубинина Е.Е., Сальникова Л.А., Ефимова Л.Ф. Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови. *Лаб. дело*. 1983; 10: p. 30-33.
202. Tagadiuc O., Gudumac V., Pantea V. Procedeu de dozare a activităţii superoxid dismutazei. Certificat de inovator nr. 4891 din 15.07.2010.
203. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы. *Лаб. Дело*. 1988; 1: p. 16-19.
204. Băciu E., Nastas I. Procedeu de determinare a activităţii catalazei. Certificat de inovator nr. 3122 din 09.11.1996.
205. Wendel A. Glutathione peroxidase. In: Jakoby W.B., editor. *Enzymatic basis of detoxication. Academic Press NY*. 1980; 1: p. 333-353.

206. Tagadiuc O., Andronache L., Știrba O., Sardari V., Pantea V. Determinarea glutation peroxidazei. Certificat de inovator nr. 5161 din 26.10.2012.
207. Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 1974; 249(22): p. 7130-7139. Disponibil la: <https://www.jbc.org/content/249/22/7130.long> [accesat la 29.06.2020]
208. Tagadiuc O., Sardari V., Andronache L., Știrba O., Pantea V. Determinarea glutation-S-transferazei (GST). Certificat de inovator nr.5163 din 29.10.2012.
209. Власова С.Н., Шабунина Е.И., Переслегина И.А. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей. *Лаб. Дело.* 1990; 8: p. 19-22.
210. Gudumac V., Tagadiuc O., Andronache L., Știrba O., Sardari V. Determinarea glutation reductazei în eritrocite și ser sangvin. Certificat de inovator nr. 5172 din 06.11.2012.
211. Akerboom T.P., Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 1981; 77: p. 373-382. Disponibil la: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687981770502> [accesat la 29.06.2020]
212. Andronache L. *Protocoale standardizate de cercetare a metabolismului glutationic (ghid practic)*. Tipogr. "Elan Poligraf", 2014, 44 p. ISBN 978-9975-66-432-5.
213. Mortensen E. The nitroprusside method for determination of reduced glutathione. *Scand J Clin Lab Invest.* 1964; 16: p. 87-97. Disponibil la: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/00365516409060487> [accesat la 29.06.2020]
214. Andronache L., Tagadiuc O., Gudumac V., Gulea A. Optimizarea procedeeului nitroprusidic de evaluare a glutationului redus în materialul biologic. *Analele Științifice ale USMF „N. Testemițanu”*. 2009; nr. 1(10), p. 184-189. ISSN 1857-1719. Disponibil la: [https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare\\_articol/2128](https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/2128) [accesat la 29.06.2020]
215. Colb V.G., Camishnicov V.S. *Справочник по клинической химии*. Minsk, 1982.
216. Кочетов Г.А. *Практическое руководство по энзимологии*. М.: Высшая школа, 1971, 352 с.
217. Zhang G., Gao S., Li X., Zhang L., Tan H., Xu L., et al. Pharmacological preconditioning with lactic acid and hydrogen rich saline alleviates myocardial reperfusion injury in rats. *Sci Rep.* 2015; 5: 9858. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4415575/> [accesat la 29.06.2020]
218. Gourdin M., Dubois P. Impact of Ischemia on Cellular Metabolism. *Artery Bypass.* 2013; 17. Disponibil la: <https://www.intechopen.com/books/artery-bypass/impact-of-ischemia-on-cellular-metabolism> [accesat la 29.06.2020]
219. Şahin Ç., Yıldırım, N., Hortu İ., Akdemir A., Özşener S., Yiğittürk G., et al. Tadalafil attenuates ischemic damage as well as reperfusion injury in the rat ovary. *J Turk Ger Gynecol Assoc.* 2020; 21(1): p. 35-40. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7075395/> [accesat la 29.06.2020]
220. Gladden L.B. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. *J Physiol.* 2004; 558(Pt 1): p. 5-30. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1664920/> [accesat la 29.06.2020]
221. Lazăr C., Vozian M., Pantea V., Svet I., Mishina A., Tagadiuc O. The effect of controlled reperfusion on experimental ovarian torsion. *Russian Open Medical Journal.* 2019; 8(4): e0404. Disponibil la: <https://romj.org/2019-0404> [accesat la 29.06.2020]

222. Sun S., Li H., Chen J., Qian Q. Lactic acid: no longer an inert and end-product of glycolysis. *Physiology*. 2017; 32(6): p. 453-463. Disponibil la: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physiol.00016.2017> [accesat la 29.06.2020]
223. Lazăr C., Vozian M., Pantea V., Mișina A., Tagadiuc O. Ischemia modified albumin in experimental ovarian torsion with and without controlled reperfusion. *Rev Romana Med Lab*. 2019; 27(1): p. 43-50. Disponibil la: <http://www.rrml.ro/articole/articol.php?year=2019&vol=1&poz=5> [accesat la 29.06.2020]
224. Mertoglu C., Gunay M., Gurel A., Gungor M., Gul V. Ischemic modified albumin increases in acute kidney injury. *Rev Romana Med Lab*. 2018; 26(1): p. 37-43. Disponibil la: <http://www.rrml.ro/articole/articol.php?year=2018&vol=1&poz=3> [accesat la 29.06.2020]
225. Shen X.L., Lin C.J., Han L.L., Lin L., Pan L., Pu X.D. Assessment of ischemia-modified albumin levels for emergency room diagnosis of acute coronary syndrome. *Int J Cardiol*. 2011; 149(3): p. 296-298. Disponibil la: [https://www.internationaljournalofcardiology.com/article/S0167-5273\(10\)00071-9/fulltext](https://www.internationaljournalofcardiology.com/article/S0167-5273(10)00071-9/fulltext) [accesat la 29.06.2020]
226. Lippi G., Montagnana M., Guidi G.C. Albumin cobalt binding and ischemia modified albumin generation: an endogenous response to ischemia? *Int J Cardiol*. 2006; 108(3): p. 410-411. Disponibil la: [https://www.internationaljournalofcardiology.com/article/S0167-5273\(05\)00586-3/fulltext](https://www.internationaljournalofcardiology.com/article/S0167-5273(05)00586-3/fulltext) [accesat la 29.06.2020]
227. Papadopoulos D., Siempis T., Theodorakou E., Tsoulfas G. Hepatic ischemia and reperfusion injury and trauma: current concepts. *Arch Trauma Res*. 2013; 2(2): p. 63-70. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3876547/> [accesat la 29.06.2020]
228. Waltz P., Escobar D., Botero A.M., Zuckerbraun B.S. Nitrate/Nitrite as Critical Mediators to Limit Oxidative Injury and Inflammation. *Antioxid Redox Signal*. 2015; 23(4): p. 328-339. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4692126/> [accesat la 29.06.2020]
229. Cherif-Sayadi A., Hadj Ayed-Tka K., Zaouali M.A., Bejaoui M., Hadj-Abdallah N., Bouhlel A., et al. Nitrite enhances liver graft protection against cold ischemia reperfusion injury through a NOS independent pathway. *Libyan J Med*. 2017; 12(1): 1308780. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5418943/> [accesat la 29.06.2020]
230. Carlstrom M., Montenegro M.F. Therapeutic value of stimulating the nitrate-nitrite-nitric oxide pathway to attenuate oxidative stress and restore nitric oxide bioavailability in cardiorenal disease. *J Intern Med*. 2019; 285(1): p. 2-18. Disponibil la: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/joim.12818> [accesat la 29.06.2020]
231. Shiva S., Sack M.N., Greer J.J., Duranski M., Ringwood L.A., Burwell L., et al. Nitrite augments tolerance to ischemia/reperfusion injury via the modulation of mitochondrial electron transfer. *J Exp Med*. 2007; 204(9): p. 2089-2102. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2118713/> [accesat la 29.06.2020]
232. Sakin O., Anđın A.D., Akalın E.E., Cikman M.S., Basak K., Kaptanagasi A.O. Comparison of the protective effects of sildenafil, vardenafil and tadalafil treatments in ischemia-reperfusion injury in rat ovary. *Ginekol Pol*. 2019; 90(9): p. 513-519. Disponibil la: [https://journals.viamedica.pl/ginekologia\\_polska/article/view/64795](https://journals.viamedica.pl/ginekologia_polska/article/view/64795) [accesat la 29.06.2020]
233. Kobayashi J., Murata I. Nitrite as a pharmacological intervention for the successful treatment of crush syndrome. *Physiol Rep*. 2018; 6(5): e13633. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5840435/> [accesat la 29.06.2020]
234. Ergun Y., Koc A., Dolapcioglu K., Akaydin Y., Dogruer G., Kontas T., et al. The protective effect of erythropoietin and dimethylsulfoxide on ischemia-reperfusion injury in rat ovary.

- Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010; 152(2): p. 186-190. Disponibil la: [https://www.ejog.org/article/S0301-2115\(10\)00270-8/fulltext](https://www.ejog.org/article/S0301-2115(10)00270-8/fulltext) [accesat la 29.06.2020]
235. Shalev J., Mashlach R., Bar-Hava I., Girtler O., Bar J., Dicker D., et al. Subtorsion of the ovary: sonographic features and clinical management. *J Ultrasound Med.* 2001; 20(8): p. 849-854. Disponibil la: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.7863/jum.2001.20.8.849> [accesat la 29.06.2020]
236. Beyazit F., Büyük B., Turkon H., Elmas S., Uzun M. Adalimumab mitigates ovarian ischemia–reperfusion injury in rats by regulating oxidative stress, apoptosis and resolution of inflammation. *J Obstet Gynaecol Res.* 2019; 45(2): p. 358-367. Disponibil la: <https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jog.13846> [accesat la 29.06.2020]
237. Refaie M.M., El-Hussieny M. Protective effect of pioglitazone on ovarian ischemia reperfusion injury of female rats via modulation of peroxisome proliferator activated receptor gamma and heme-oxygenase 1. *Int Immunopharmacol.* 2018; 62: p. 7-14. Disponibil la: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576918302881?via%3Dihub> [accesat la 29.06.2020]
238. Bice J.S., Baxter G.F. Postconditioning signalling in the heart: mechanisms and translatability. *Br J Pharmacol.* 2015; 172(8): p. 1933-1946. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4386973/> [accesat la 29.06.2020]
239. Inserte J., Hernando V., Vilardosa U., Abad E., Poncelas-Nozal M., Garcia-Dorado D. Activation of cGMP/Protein Kinase G Pathway in Postconditioned Myocardium Depends on Reduced Oxidative Stress and Preserved Endothelial Nitric Oxide Synthase Coupling. *J Am Heart Assoc.* 2013; 2(1): e005975. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3603241/> [accesat la 29.06.2020]
240. Cadirci E., Oral A., Odabasoglu F., Kilic C., Coskun K., Halici Z., et al. Atorvastatin reduces tissue damage in rat ovaries subjected to torsion and detorsion: Biochemical and histopathologic evaluation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2010; 381: p. 455–466. Disponibil la: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00210-010-0504-y> [accesat la 29.06.2020]
241. Ersoy G.S., Eken M., Tal R., Oztekin D., Devranoglu B., Kaygusuz E.I., et al. N-acetylcysteine leads to greater ovarian protection than enoxaparin sodium in a rat ovarian torsion model. *Reprod Biomed Online.* 2016; 33(1): p. 93-101. Disponibil la: [https://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483\(16\)30036-0/fulltext](https://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483(16)30036-0/fulltext) [accesat la 29.06.2020]
242. Sapmaz-Metin M., Topcu-Tarladacalisir Y., Uz Y.H., Inan M., Omurlu I.K., Cerkez Kayabekir A., et al. Vitamin E modulates apoptosis and c-jun N-terminal kinase activation in ovarian torsion-detorsion injury. *Exp Mol Pathol.* 2013; 95: p. 213–219. Disponibil la: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014480013000932?via%3Dihub> [accesat la 29.06.2020]
243. Akdemir A., Erbas O., Ergenoglu M., Ozgur Yeniel A., Oltulu F., Yavasoglu A., et al. Montelukast prevents ischaemia/reperfusion-induced ovarian damage in rats. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2014; 173: p. 71–76. Disponibil la: [https://www.ejog.org/article/S0301-2115\(13\)00597-6/fulltext](https://www.ejog.org/article/S0301-2115(13)00597-6/fulltext) [accesat la 29.06.2020]
244. Abali R., Tasdemir N., Yuksel M.A., Guzel S., Oznur M., Nalbantoglu B., et al. Protective effect of infliximab on ischemia/reperfusion injury in a rat ovary model: biochemical and histopathologic evaluation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013; 171(2): p. 353–357. Disponibil la: [https://www.ejog.org/article/S0301-2115\(13\)00492-2/fulltext](https://www.ejog.org/article/S0301-2115(13)00492-2/fulltext) [accesat la 29.06.2020]

245. Stensen M.H., Tanbo T., Storeng R., Fedorcsak P. Advanced glycation end products and their receptor contribute to ovarian ageing. *Hum Reprod.* 2014; 29(1): p. 125-134. Disponibil la: <https://academic.oup.com/humrep/article/29/1/125/631369> [accesat la 29.06.2020]
246. Garg D., Merhi Z. Relationship between Advanced Glycation End Products and Steroidogenesis in PCOS. *Reprod Biol Endocrinol.* 2016; 14(1): 71. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5073880/> [accesat la 29.06.2020]
247. Merhi Z. Advanced glycation end products and their relevance in female reproduction. *Hum Reprod.* 2014; 29(1): p. 135-145. Disponibil la: <https://academic.oup.com/humrep/article/29/1/135/628897> [accesat la 29.06.2020]
248. Karapinar O.S., Pinar N., Özcan O., Doğan E.A., Bayraktar S., Şahin H., et al. The effect of dexpanthenol on experimentally induced ovarian ischaemia/reperfusion injury: a biochemical and histopathological evaluation. *Arch Gynecol Obstet.* 2017; 295(3): p. 777-784. Disponibil la: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00404-017-4287-y> [accesat la 29.06.2020]
249. Kara M., Daglioglu Y.K., Kuyucu Y., Tuli A., Tap O. The effect of edaravone on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012; 162(2): p. 197-202. Disponibil la: [https://www.ejog.org/article/S0301-2115\(12\)00097-8/fulltext](https://www.ejog.org/article/S0301-2115(12)00097-8/fulltext) [accesat la 29.06.2020]
250. Nayki C., Nayki U., Keskin Cimen F., Kulhan M., Yapca O.E., Kurt N., et al. The effect of rutin on ovarian ischemia-reperfusion injury in a rat model. *Gynecol Endocrinol.* 2018; 34(9): p. 809-814. Disponibil la: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09513590.2018.1450378?journalCode=igye20> [accesat la 29.06.2020]
251. Bakan V., Çıralık H., Tolun F.İ., Atlı Y., Mil A., Öztürk Ş. Protective effect of erythropoietin on torsion/detorsion injury in rat model. *J Pediatr Surg.* 2009; 44(10): p. 1988-1994. Disponibil la: [https://www.jpedsurg.org/article/S0022-3468\(09\)00157-2/fulltext](https://www.jpedsurg.org/article/S0022-3468(09)00157-2/fulltext) [accesat la 29.06.2020]
252. Lu S.C. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1830(5): p. 3143-3153. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3549305/> [accesat la 29.06.2020]
253. Flint A.P.F., Denton R.M. The role of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-dependent malate dehydrogenase and isocitrate dehydrogenase in the supply of reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate for steroidogenesis in the superovulated rat ovary. *Biochem J.* 1970; 117(1): p. 73-83. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1178832/> [accesat la 29.06.2020]
254. Hecker P.A., Leopold J.A., Gupte S.A., Recchia F.A., Stanley W.C. Impact of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency on the pathophysiology of cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013; 304(4): p. H491-H500. Disponibil la: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpheart.00721.2012> [accesat la 29.06.2020]
255. Jo S.H., Lee S.H., Chun H.S., Lee S.M., Koh H.J., Lee S.E., et al. Cellular defense against UVB-induced phototoxicity by cytosolic NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 292: p. 542-549. Disponibil la: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006291X02966672> [accesat la 29.06.2020]
256. Kim S.Y., Lee S.M., Tak J.K., Choi K.S., Kwon T.K., Park J.W. Regulation of singlet oxygen-induced apoptosis by cytosolic NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase. *Mol Cell Biochem.* 2007; 302: p. 27-34. Disponibil la: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11010-007-9421-x> [accesat la 29.06.2020]

257. Sies H., Akerboom T.P.M., Tager J.M. Mitochondrial and cytosolic NADPH systems and isocitrate dehydrogenase indicator metabolites during ureogenesis from ammonia in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 1977; 72(2): p. 301-307. Disponibil la: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1432-1033.1977.tb11253.x> [accesat la 29.06.2020]
258. Lee S.M., Koh H.J., Park D.C., Song B.J., Huh T.L., Park J.W. Cytosolic NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase status modulates oxidative damage to cells. *Free Radic Biol Med.* 2002; 32(11): p. 1185-1196. Disponibil la: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0891584902008158?via%3Dihub> [accesat la 29.06.2020]
259. Inoue K., Sakano N., Ogino K., Sato Y., Wang D.-H., Kubo M., et al. Relationship between ceruloplasmin and oxidative biomarkers including ferritin among healthy Japanese. *J Clin Biochem Nutr.* 2013; 52(2): p. 160–166. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3593134/> [accesat la 29.06.2020]
260. Lazăr C. Ceruloplasmin in experimental ovarian torsion/detorsion. *Biological markers in fundamental and clinical medicine.* 2017; 1(3): p. 24-25. Disponibil la: <https://biologicalmarker.com/index.php/journal/article/view/11> [accesat la 29.06.2020]

## INFORMAȚII PRIVIND VALORIFICAREA REZULTATELOR CERCETĂRII

### LISTA PUBLICAȚIILOR ȘI MANIFESTĂRILOR ȘTIINȚIFICE

la care au fost prezentate rezultatele cercetărilor

la teza de doctor în științe medicale

cu tema „Caracteristica metabolică a ischemiei/reperfuziei

cauzate de torsiunea/detorsiunea ovariană”, realizată în cadrul Catedrei de biochimie și

biochimie clinică a dnei **Lazăr Cornelia**,

Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie ”Nicolae Testemițanu”

#### • Articole în reviste ISI, SCOPUS și alte baze de date internaționale:

1. **Lazăr C.**, Vozian M., Pantea V., Mișina A., Tagadiuc O. Ischemia modified albumin in experimental ovarian torsion with and without controlled reperfusion. *Rev Romana Med Lab.* 2019; 27(1): p. 43-50. ISSN online: 2284-5623; ISSN-L: 1841-6624; Disponibil la: <http://www.rrml.ro/articole/articol.php?year=2019&vol=1&poz=5> [accesat la 29.06.2020] (**Web of Science, IF<sub>ISI</sub>: 0,8**), publicat cu suportul European Scientific Center „Biomarkers” <https://escbm.org/page/view/grants>
2. **Lazăr C.**, Vozian M., Pantea V., Svet I., Mishina A., Tagadiuc O. The effect of controlled reperfusion on experimental ovarian torsion. *Russian Open Medical Journal.* 2019; 8(4): e0404. Disponibil la: <https://romj.org/2019-0404> [accesat la 29.06.2020] (**Web of Science, SCOPUS, IF<sub>CiteScore2019</sub>: 0,6**)

#### • Articole în reviste științifice naționale acreditate:

##### ✓ articole în reviste de categoria B:

3. **Lazăr C.**, Tagadiuc O., Protopop S., Mișina A., Pantea V. Aspecte ale metabolismului în țesutul ovarian. *Buletin de Perinatologie.* 2016; 4(72): p. 52-58. ISSN 1810-5289. Disponibil la: [https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare\\_articol/49646](https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/49646) [accesat la 29.06.2020]
4. **Lazăr C.**, Protopop S., Mișina A., Tagadiuc O. Efectele speciilor reactive de oxigen asupra sistemului de reproducere feminin. *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale.* 2017; 2(54): p. 83-90. ISSN 1857-0011. Disponibil la: [https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare\\_articol/54131](https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/54131) [accesat la 29.06.2020]
5. **Lazăr C.**, Mișina A., Tagadiuc O. Rolul indicilor de laborator în diagnosticul torsiunii ovariene (revista literaturii). *Moldovan Journal of Health Sciences (Revista de Științe ale Sănătății din Moldova).* 2018; 16(2): p. 52-61. ISSN 2345-1467. Disponibil la: [https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare\\_articol/65758](https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/65758) [accesat la 28.06.2020]

#### • Articole în culegeri științifice internaționale:

6. Mișina A., Madan D., Tagadiuc O., **Lazăr C.**, Fuior L. Diagnosticul și tratamentul torsiunii ovariene la copii și adolescente. *Archives of the Balkan Medical Union.* 2015; 50(2), supl. 1: p. 84-89. ISSN 0041-6940.
7. **Lazăr C.**, Mișina A., Cuțescu I., Tagadiuc O. Mechanisms of reactive oxygen species production in the lesions caused by ischemia/reperfusion. *Archives of the Balkan Medical Union.* 2016; 51(1), supl. 1: p. 199-204. ISSN 0041-6940.

#### • Rezumate/abstracte/teze în lucrările conferințelor științifice naționale și internaționale

8. **Lazăr C.** The main paths of reactive oxygen species production in disorders caused by ischemia/reperfusion. In: *Abstract book of 6th International Medical Congress for Students*

and Young Doctors MedEspera. Chişinău, Moldova, 12-14 mai, 2016, p. 251. ISBN 978-9975-3028-3-8.

9. **Лазэр К.**, Тагадюк О., Мишина А., Возиан М., Пантя В. Эффекты контролируемой реперфузии на уровень малонового диальдегида в сыворотке крови при ишемии-реперфузии яичников. *XXX Юбилейный международный конгресс курсом эндоскопии. Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний*. Moscova, 6–9 iunie, 2017, p. 92-93. ISBN 978-5-906484-36-9.
10. **Lazăr C.**, Pantea V., Vozian M., Misina A., Tagadiuc O. Simple reperfusion increases the AOPP in ovarian torsion. In Abstract book: *IBC - SOFIA 2017, 2nd INTERNATIONAL BIOMEDICAL CONGRESS of SOFIA 2017, November 17-19th 2017*. Sofia, Bulgaria, 2017, p. 38.
11. **Lazăr C.** Ceruloplasmin in experimental ovarian torsion/detorsion. In: *Biological markers in fundamental and clinical medicine*, vol. 1, nr. 3, 2017, p. 24-25. ISSN 2570-5911 (PRINT), ISSN 2570-5903 (ON-LINE).
12. **Lazăr C.** Advanced glycation end products in experimental ovarian torsion/detorsion. In: *Biological markers in fundamental and clinical medicine*, vol. 1, nr. 4, 2017, p. 10-11. ISSN 2570-5911 (PRINT), ISSN 2570-5903 (ON-LINE).
13. **Lazar C.**, Tagadiuc O., Misina A., Vozian M., Pantea V. Controlled reperfusion and oxidative stress-induced lesions in experimental ovarian torsion/detorsion. *Ukrainian scientific medical youth journal*, vol. 2(102), 2017, p. 44. ISSN 1996-353X.
14. **Lazăr C.** Ischemia-modified albumin in experimental ovarian torsion. In: *Biological markers in fundamental and clinical medicine*, vol. 2, nr. 1, 2018, p. 8-9. ISSN 2570-5911 (PRINT), ISSN 2570-5903 (ON-LINE).
15. **Lazăr C.** Lipid peroxidation in experimental ovarian torsion. In: *Abstract book of 7th International Medical Congress for Students and Young Doctors MedEspera*. Chişinău, Moldova, 3-5 mai, 2018, p. 199-200. ISBN 978-9975-3028-3-8.
16. **Lazăr C.** Este dialdehida malonică un marker util în torsiunea ovariană? In: *Culegere de rezumate științifice ale studenților, rezidenților și tinerilor cercetători a USMF "Nicolae Testemițanu"*, Chişinău, Moldova, 2018, p. 14. ISBN 978-9975-82-103-2.
17. **Lazăr C.** Are nowadays laboratory indices useful in ovarian torsion? In: *"BIMCO Journal" - Abstract book of the Bukovinian International Medical Congress 2019*, Cernăuți, Ucraina, p. 3. ISSN 2616-5392.
18. **Lazăr C.** Modificări oxidative ale proteinelor în torsiunea ovariană. In: *Culegere de rezumate științifice ale studenților, rezidenților și tinerilor cercetători a USMF "Nicolae Testemițanu"*, Chişinău, Moldova, 2019, p. 20. ISBN 978-9975-82-148-3.
19. **Lazăr C.** The effects of controlled reperfusion on oxidative damages in ovarian torsion. In: *"BIMCO Journal" - Abstract book of the Bukovinian International Medical Congress 2020*, Cernăuți, Ucraina, p. 8. ISSN 2616-5392.
- **Participări cu comunicări la foruri științifice:**
  - ✓ **internaționale**
20. **Lazăr C.** The main paths of reactive oxygen species production in disorders caused by ischemia/reperfusion. *6th International Medical Congress for Students and Young Doctors MedEspera*. USMF „Nicolae Testemițanu”, Chişinău, Moldova, 12-14 mai 2016.
21. **Lazăr C.**, Tagadiuc O., Misina A., Vozian M., Pantea V. Controlled reperfusion and oxidative stress-induced lesions in experimental ovarian torsion/detorsion. *Annual Young Medical Scientists' Conference 2017*, Bogomolets National Medical University, Kiev, Ucraina, 27-29



octombrie 2017.

22. **Lazăr C.** Ceruloplasmin in experimental ovarian torsion/detorsion. Conferința „*Biological markers in fundamental and applied biology. From theory to practice*”, European Scientific Center „Biomarkers”, or. Brno, Republica Cehă, 10 ianuarie 2018.
23. **Lazăr C.** Advanced glycation end products in experimental ovarian torsion/detorsion. Conferința „*Modern technologies of diagnostics and monitoring of therapy in experimental, clinical medicine and pharmacy*”, European Scientific Center „Biomarkers”, or. Brno, Republica Cehă, 15 ianuarie 2018.
24. **Lazăr C.** Ischemia-modified albumin in experimental ovarian torsion. Conferința științifico-practică “*Theoretical and practical aspects of the use of biological markers in fundamental and applied medicine and biology*”, European Scientific Center „Biomarkers”, or. Praga, Republica Cehă, 27-29 martie 2018.
25. **Lazăr C.** Lipid peroxidation in experimental ovarian torsion. *7th International Medical Congress for Students and Young Doctors MedEspera*. USMF „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Moldova, 3-5 mai, 2018.
26. **Lazăr C.** Are nowadays laboratory indices useful in ovarian torsion? *VI Bukovinian International Medical Congress, BIMCO 2019*, Bukovinian State Medical University, Cernăuți, Ucraina, 2-5 aprilie 2019.
27. **Lazăr C.** The effects of controlled reperfusion on oxidative damages in ovarian torsion. *VII Bukovinian International Medical Congress, BIMCO 2020*, Bukovinian State Medical University, Cernăuți, Ucraina, 7-8 aprilie 2020.

✓ **naționale**

28. **Lazăr C.** Aspecte biochimice ale torsiunii/detorsiunii ovariene experimentale. *Zilele Universității și Conferința științifică anuală consacrată aniversării a 90-a de la nașterea ilustrului medic și savant Nicolae Testemițanu*, USMF „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Moldova, 18-20 octombrie 2017.
29. **Lazăr C.** Dialdehida malonică – un marker util în torsiunea ovariană. *Zilele Universității și Conferința științifică anuală a cadrelor științifico-didactice, doctoranzilor, masteranzilor, rezidenților și studenților*, USMF “Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Moldova, 18 octombrie 2018.
30. **Lazăr C.** Modificări oxidative ale proteinelor în torsiunea ovariană. *Zilele Universității și Conferința științifică anuală a cadrelor științifico-didactice, doctoranzilor, masteranzilor, rezidenților și studenților*, USMF “Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Moldova, 17 octombrie 2019.

• **Participări cu postere la foruri științifice:**

✓ **internaționale**

31. **Lazăr C.** Simple reperfusion increases the AOPP in ovarian torsion. *IBC - SOFIA 2017, 2nd INTERNATIONAL BIOMEDICAL CONGRESS of SOFIA 2017*, Medical University – Sofia, Sofia, Bulgaria, 17-19 noiembrie 2017.

✓ **naționale**

32. **Lazăr C., Tagadiuc O.** Rolul mitocondriilor în declanșarea stresului oxidativ în patologii determinate de ischemie/reperfuzie. Conferința Științifică Anuală IMU a tinerilor specialiști „*Performanțe și perspective în urgențe medico-chirurgicale.*” Institutul de Medicină Urgentă, Chișinău, Moldova, 20 mai 2016.

**Distincții:**

1. **Locul 1** pentru participarea activă la *Zilele Universității și Conferința științifică anuală a cadrelor științifico-didactice, doctoranzilor, masteranzilor, rezidenților și studenților*, USMF “Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Moldova, 17 octombrie 2019.
2. **Locul 1** pentru participarea activă la *VI Bukovinian International Medical Congress 2019*, Bukovinian State Medical University, Cernăuți, Ucraina, 2-5 aprilie 2019.
3. **Locul 1** cu oferirea unui grant pentru participarea în cadrul conferinței științifico-practice „*Theoretical and practical aspects of the use of biological markers in fundamental and applied medicine and biology*”, 27-29 martie 2018, or. Praga, Republica Cehă. Grantul a fost oferit de către European Scientific Center „Biomarkers” <https://escbm.org/page/view/grants>
4. **Locul 3** pentru „the best science at the *Annual Young Medical Scientists' Conference 2017*”, Bogomolets National Medical University, Kiev, Ucraina, 27-29 octombrie 2017.

## **ANEXE**

**Anexa 1. Analiza corelației dintre indicii ischemiei din serul sangvin și omogenatul ovarian în torsiunea/detorsiunea ovariană experimentală**

**Tabelul A1.1. Rezultatele studiului corelației dintre indicii ischemiei din serul sangvin și omogenatul ovarian în torsiunea/detorsiunea ovariană experimentală**

<b>Loturile de studiu</b>	<b>AIM</b>	<b>Lactat</b>	<b>LDH-P</b>	<b>LDH-L</b>
Martor	$r_s=0,103$ $p=0,777$	$r_s=-0,503$ $p=0,138$	<b><math>r_s=-0,815</math></b> <b><math>p=0,004</math></b>	$r_s=-0,321$ $p=0,365$
Control	$r_s=0,17$ $p=0,638$	<b><math>r_s=0,673</math></b> <b><math>p=0,033</math></b>	$r_s=0,018$ $p=0,960$	$r_s=0,335$ $p=0,343$
Ischemie	$r_s=-0,358$ $p=0,310$	$r_s=0,333$ $p=0,347$	$r_s=-0,455$ $p=0,187$	$r_s=0,632$ $p=0,050$
Ischemie/1 oră reperfuzie simplă	$r_s=0,333$ $p=0,347$	$r_s=0,224$ $p=0,533$	$r_s=-0,455$ $p=0,187$	$r_s=0,055$ $p=0,881$
Ischemie/1 oră reperfuzie <i>on-off</i>	$r_s=0,252$ $p=0,483$	$r_s=0,201$ $p=0,578$	$r_s=-0,626$ $p=0,053$	$r_s=-0,139$ $p=0,701$
Ischemie/24 ore reperfuzie simplă	$r_s=-0,213$ $p=0,555$	$r_s=0,407$ $p=0,243$	$r_s=-0,055$ $p=0,881$	$r_s=0,103$ $p=0,777$
Ischemie/24 ore reperfuzie <i>on-off</i>	$r_s=-0,097$ $p=0,789$	$r_s=-0,479$ $p=0,162$	$r_s=-0,158$ $p=0,663$	$r_s=-0,505$ $p=0,137$

**Anexa 2. Examinarea corelației dintre markerii stresului oxidativ din serul sangvin și omogenatul ovarian în torsiunea/detorsiunea ovariană experimentală**

**Tabelul A2.1. Rezultatele studiului corelației dintre markerii stresului oxidativ din serul sangvin și omogenatul ovarian în torsiunea/detorsiunea ovariană experimentală**

<b>Loturile de studiu</b>	<b>DAM</b>	<b>DNO</b>	<b>AGE</b>	<b>PPOA</b>
Martor	$r_s=-0,401$ $p=0,250$	$r_s=0,128$ $p=0,725$	$r_s=-0,176$ $p=0,627$	$r_s=-0,407$ $p=0,243$
Control	$r_s=-0,352$ $p=0,319$	$r_s=-0,584$ $p=0,077$	<b><math>r_s=-0,661</math></b> <b><math>p=0,038</math></b>	$r_s=0,358$ $p=0,310$
Ischemie	$r_s=-0,228$ $p=0,526$	$r_s=-0,451$ $p=0,191$	$r_s=0,176$ $p=0,627$	$r_s=0,030$ $p=0,934$
Ischemie/1 oră reperfuzie simplă	$r_s=0,214$ $p=0,553$	<b><math>r_s=0,722</math></b> <b><math>p=0,018</math></b>	$r_s=0,042$ $p=0,907$	$r_s=-0,503$ $p=0,138$
Ischemie/1 oră reperfuzie <i>on-off</i>	$r_s=0,302$ $p=0,397$	$r_s=-0,152$ $p=0,675$	$r_s=0,333$ $p=0,347$	$r_s=0,224$ $p=0,533$
Ischemie/24 ore reperfuzie simplă	$r_s=-0,106$ $p=0,772$	$r_s=-0,379$ $p=0,280$	$r_s=-0,467$ $p=0,174$	$r_s=0,309$ $p=0,385$
Ischemie/24 ore reperfuzie <i>on-off</i>	<b><math>r_s=0,681</math></b> <b><math>p=0,03</math></b>	$r_s=0,489$ $p=0,151$	$r_s=-0,237$ $p=0,510$	<b><math>r_s=-0,770</math></b> <b><math>p=0,009</math></b>

Anexa 3. Studiul corelației dintre markerii sistemului antioxidant din serul sangvin și omogenatul ovarian în torsionarea/detorsionarea ovariană experimentală

Tabelul A3.1. Rezultatele studiului corelației dintre markerii sistemului antioxidant din serul sangvin și omogenatul ovarian în torsionarea/detorsionarea ovariană experimentală (1)

Loturile de studiu	SOD	CAT	ICDH	G6PDH
Martor	$r_s=-0,182$ $p=0,614$	$r_s=0,103$ $p=0,777$	$r_s=-0,252$ $p=0,483$	$r_s=0,414$ $p=0,235$
Control	$r_s=-0,073$ $p=0,841$	$r_s=0,295$ $p=0,407$	$r_s=-0,290$ $p=0,416$	$r_s=-0,308$ $p=0,387$
Ischemie	$r_s=-0,383$ $p=0,275$	$r_s=0,604$ $p=0,065$	$r_s=0,043$ $p=0,907$	$r_s=0,148$ $p=0,683$
Ischemie/1 oră reperfuzie simplă	$r_s=0,444$ $p=0,199$	$r_s=-0,024$ $p=0,947$	$r_s=0,095$ $p=0,794$	$r_s=0,542$ $p=0,106$
Ischemie/1 oră reperfuzie <i>on-off</i>	$r_s=0,529$ $p=0,116$	<b><math>r_s=-0,677</math></b> <b><math>p=0,032</math></b>	<b><math>r_s=-0,707</math></b> <b><math>p=0,022</math></b>	$r_s=0,128$ $p=0,724$
Ischemie/24 ore reperfuzie simplă	$r_s=-0,043$ $p=0,907$	$r_s=0,280$ $p=0,434$	$r_s=0,07$ $p=0,847$	$r_s=-0,234$ $p=0,515$
Ischemie/24 ore reperfuzie <i>on-off</i>	$r_s=-0,273$ $p=0,446$	$r_s=-0,055$ $p=0,881$	$r_s=-0,201$ $p=0,577$	$r_s=-0,506$ $p=0,135$

Tabelul A3.2. Rezultatele studiului corelației dintre markerii sistemului antioxidant din serul sangvin și omogenatul ovarian în torsionarea/detorsionarea ovariană experimentală (2)

Loturile de studiu	GT	GSH	GSSG	GPO	GST	GR
Martor	$r_s=0,255$ $p=0,476$	$r_s=-0,178$ $p=0,623$	$r_s=0,188$ $p=0,603$	$r_s=-0,176$ $p=0,627$	$r_s=-0,164$ $p=0,651$	$r_s=0,188$ $p=0,603$
Control	$r_s=-0,491$ $p=0,150$	$r_s=0,049$ $p=0,893$	$r_s=0,055$ $p=0,881$	$r_s=-0,345$ $p=0,328$	$r_s=-0,176$ $p=0,627$	$r_s=-0,432$ $p=0,213$
Ischemie	$r_s=0,134$ $p=0,713$	$r_s=0,222$ $p=0,537$	$r_s=-0,309$ $p=0,385$	$r_s=0,018$ $p=0,960$	$r_s=0,042$ $p=0,907$	$r_s=-0,018$ $p=0,960$
Ischemie/1 oră reperfuzie simplă	$r_s=-0,602$ $p=0,066$	$r_s=-0,335$ $p=0,343$	$r_s=-0,224$ $p=0,533$	$r_s=0,188$ $p=0,603$	$r_s=-0,406$ $p=0,244$	$r_s=-0,406$ $p=0,244$
Ischemie/1 oră reperfuzie <i>on-off</i>	$r_s=0,098$ $p=0,789$	$r_s=0,454$ $p=0,187$	$r_s=0,018$ $p=0,960$	$r_s=0,030$ $p=0,934$	$r_s=-0,37$ $p=0,293$	$r_s=-0,321$ $p=0,365$
Ischemie/24 ore reperfuzie simplă	$r_s=0,207$ $p=0,567$	$r_s=-0,198$ $p=0,584$	$r_s=0,358$ $p=0,310$	<b><math>r_s=-0,806</math></b> <b><math>p=0,005</math></b>	$r_s=-0,115$ $p=0,751$	$r_s=-0,188$ $p=0,603$
Ischemie/24 ore reperfuzie <i>on-off</i>	$r_s=-0,515$ $p=0,128$	$r_s=-0,151$ $p=0,677$	<b><math>r_s=-0,915</math></b> <b><math>p&lt;0,001</math></b>	$r_s=0,212$ $p=0,556$	$r_s=-0,523$ $p=0,121$	$r_s=-0,345$ $p=0,328$

### **Declarația privind asumarea răspunderii**

Subsemnata Lazăr Cornelia, declar pe răspundere personală, că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Lazăr Cornelia

Semnătura

Data

### **Declaration on accountability**

I declare the personal responsibility that information presented in this thesis are the result of my own research and scientific achievements. I realize that, otherwise, will suffer the consequences in accordance with law.

Lazăr Cornelia

Signature

Date

### **Déclaration sur la responsabilité**

Je déclare la responsabilité personnelle que les informations présentées dans cette thèse sont le résultat de mes propres recherches et réalisations scientifiques. Je me rends compte que, sinon, en subiront les conséquences conformément à la loi.

Lazăr Cornelia

Signature

Date