

# Regulacija hepcidina u kroničnoj upali izazvanoj inhalacijskim anestetikima i željezo dekstranom u štakora

---

**Adrović, Emanuela**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:994238>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-18**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno – matematički fakultet  
Biološki odsjek

**Emanuela Adrović**

**Regulacija hepcidina u kroničnoj upali izazvanoj inhalacijskim anestetima i željezo  
dekstranom u štakora**

**Diplomski rad**

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić te neposrednim vodstvom Dyane Odeh, *spec. techn. aliment*. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

## ZAHVALE

*Ovaj projekt ne bi bio moguć bez podrške mnogih divnih ljudi:*

*Najveće zahvale idu mojoj mentorici prof. dr. sc. Nadi Oršolić bez čije stručnosti i pomoći na svakom koraku mog studiranja, ovaj rad ne bi bio ostvaren. Miris Vašeg cappuccina i motivacijskih bodrenja u ranim jutarnjim i kasnim večernjim satima bit će teško zaboraviti. Vaša pronicljivost i znanje potaknule su me da izoštrim svoje razmišljanje i podignem svoj rad na višu razinu.*

*Posebne zahvale idu neposrednoj voditeljici Dyani Odeh, spec. techn. aliment. koja me strpljivo i nesebično vodila kroz moje prve korake u znanstvenom svijetu. Dani savjeti vodit će me u znanstvenoj karijeri, ali i životu. Veliko hvala na pruženoj prilici za sudjelovanje na mnogim izazovnim projektima u protekle četiri godine i nezaboravnom prijateljstvu.*

*Ovim putem zahvalila bih se i ostalim marljivim zaposlenicima Zavoda asistentici Barbari Nikolić, asistentima Marku Glogoškom i Tomislavu Gojaku te stručnoj suradnici Idi Svetličić koji su mi svojim specifičnim humorom u zajedničkim druženjima uljepšavali vrijeme provedeno na fakultetu i Zavodu.*

*Zahvale za veliku podršku tijekom studiranja idu mojim kolegama jedinstvene generacije koja je svoje školovanje hrabro, strpljivo i snalažljivo privela kraju u ovo posebno vrijeme obilježeno pandemijom i u potresima, oštećenim laboratorijima našega grada.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno- matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

Regulacija hepcidina u kroničnoj upali izazvanoj inhalacijskim anestetikima i željezo  
dekstranom u štakora

Emanuela Adrović

Rooseveltov trg, 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

U radu je istražen učinak inhalacijskih anestetika u nazočnosti željeza na prooksidacijske/antioksidacijske učinke perifernih tkiva i organa u kroničnoj upali. Cilj rada je spoznati kako prekomjerni unos željeza mijenja fiziološke, funkcionalne značajke perifernih tkiva i kako različiti anestetici mijenjaju metabolizam stanica s obzirom na prijelazne metale kao inicijatore nastanka reaktivnih vrsta kisika (ROS) i upale kroz regulaciju hepcidina, transferina i makrofagne polarizacije. Štakori soja Y59 su intraperitonealno (*ip*) injicirani otopinom željezo dekstrana u dozi od 50 mg/kg ili su izloženi inhalacijskim anestetikima sevofluranu (2,4%) i izofluranu (1,3%) te kombinaciji tijekom 28 dana svaki drugi dan. Rezultati pokazuju da primjena anestetika smanjuje tjelesnu težinu štakora, povećava oksidacijski stres (OS) u perifernim tkivima vodeći M1 makrofagnoj polarizaciji. Prekomjerni unos željeza vodi nakupljanju željeza u perifernim tkivima, povećanju OS i upale te povećanju odnosa IL-12/IL-10 citokina prema M1 makrofagnom fenotipu. Kombinacija sevoflurana i željeza akumulira željezo u tkivima pokazujući protektivni učinak željeza i M2 fenotip makrofaga. Kombinacija željezo dekstrana i izoflurana kod štakora vodi hipoksiji, pojačanom otpuštanju željeza iz makrofaga retikulo-endotelnog sustava te pojačanoj eritropoezi. Razina hepcidina u jetri regulirana je složenom međureakcijom upale, oksidacijskog stresa, razine slobodnog željeza, eritropoezom i hipoksijom.

(118 stranica, 24 slika, 17 tablica, 164 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

**Ključne riječi:** izofluran, sevofluran, homeostaza željeza, upala, oksidacijski stres, makrofagna polarizacija

**Mentor:** prof. dr. sc. Nada Oršolić

**Neposredni voditelj:** Dyana Odeh, *spec. techn. aliment.*

**Ocjenjivači:** prof. dr. sc. Nada Oršolić

izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner

izv. prof. dr. sc. Petar Kružić

**Rad prihvaćen:** 25. studenog. 2021.

|                          |
|--------------------------|
| BASIC DOCUMENTATION CARD |
|--------------------------|

University of Zagreb

Graduation thesis

Faculty of Zagreb

Department of Biology

Regulation of hepcidin in chronic inflammation induced by inhalation anaesthetics and iron dextran in rat

Emanuela Adrović

Rooseveltova trg, 6, 10 000 Zagreb, Croatia

The thesis investigates the effect of inhaled anaesthetics in the presence of iron on the prooxidative/antioxidant effects of peripheral tissues and organs in chronic inflammation. It intends to understand how excessive iron intake alters physiological, functional characteristics of peripheral tissues and whether different anaesthetics can alter cell metabolism regarding transition metals as initiators of reactive oxygen species (ROS) and inflammation through regulation of hepcidin, transferrin, and macrophage polarization. Y59 rats were injected intraperitoneally (*ip*) a solution of iron dextran at a dose of 50 mg/kg or were exposed to inhaled anaesthetics sevoflurane (2.4%) and isoflurane (1.3%) and the combination for 28 days every other day. The results show that anaesthetics reduce the rat's body weight and increase oxidative stress (OS) in peripheral tissues, leading to M1 macrophage polarization. Excessive iron intake leads to iron accumulation in peripheral tissues, an increase in OS and inflammation, and an increase in the ratio of IL-12/IL-10 cytokines to the M1 macrophage phenotype. The combination of sevoflurane and iron accumulates iron in tissues, showing iron's protective effect and the M2 phenotype of macrophages. The combination of iron dextran and isoflurane in rats leads to hypoxia, increased iron release from macrophages of the reticuloendothelial system and increased erythropoiesis. Hepcidin levels in the liver are regulated by a complex interreaction of inflammation, oxidative stress, free iron levels, erythropoiesis and hypoxia.

(118 pages, 24 figures, 17 tables, 164 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

**Keywords:** isoflurane, sevoflurane, iron homeostasis, inflammation, oxidative stress, macrophage polarization

**Supervisor:** PhD Nada Oršolić, Full Professor

**Assistant Supervisor:** Dyana Odeh, *spec. techn. aliment.*

**Reviews:** PhD Nada Oršolić, Full Professor

PhD Jasna Lajtner, Assoc. Prof.

PhD Petar Kružić, Assoc. Prof.

**Thesis accepted:** 25<sup>th</sup> of November, 2021

# **1 UVOD** **1**

---

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>1.1</b> | <b>HEPCIDIN</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1.1      | REGULACIJA EKSPRESIJE HAMP GENA   | 2         |
| 1.1.2      | REGULACIJA HEPCIDINA STATUSOM ŽELJEZA   | 5         |
| 1.1.3      | REGULACIJA HEPCIDINA UPALNOM REAKCIJOM  | 6         |
| 1.1.4      | ERITROPOEZA I HIPOKSIJA SUPRIMIRAJU AKTIVNOST HEPCIDINA   | 9         |
| <b>1.2</b> | <b>OKSIDACIJSKI STRES I UPALA</b>   | <b>10</b> |
| 1.2.1      | REAKTIVNI SPOJEVI KISIKA I DUŠIKA   | 11        |
| 1.2.2      | PRIRODNI ANTIOKSIDANSI  | 14        |
| 1.2.3      | MEHANIZAM OKSIDACIJSKOG STRESA PRI NORMALNIM FIZIOLOŠKIM FUNKCIJAMA I KOD OŠTEĆENJA BIOMOLEKULA | 17        |
| <b>1.3</b> | <b>INHALACIJSKI ANESTETICI</b>  | <b>19</b> |
| 1.3.1      | MEHANIZAM DJELOVANJA INHALACIJSKIH ANESTETIKA   | 20        |
| 1.3.2      | IZOFLURAN   | 21        |
| 1.3.3      | SEVOFLURAN  | 22        |
| 1.3.3.1    | Učinci metabolita izoflurana i sevoflurana na periferne organe                                  | 23        |
| 1.3.3.2    | Protuupalni učinci izoflurana i sevoflurana   | 24        |
| 1.3.3.3    | Proupalni učinci izoflurana i sevoflurana   | 26        |
| <b>1.4</b> | <b>TEŠKI METALI</b>   | <b>26</b> |
| 1.4.1      | ŽELJEZO U ORGANIZMU   | 27        |
| 1.4.2      | STATUS ŽELJEZA ODREĐUJE MAKROFAGNU POLARIZACIJU I TOK UPALNE REAKCIJE                           | 29        |

## **2 CILJ RADA** **32**

---

## **3 MATERIJALI I METODE** **33**

---

|            |                                   |           |
|------------|-----------------------------------|-----------|
| <b>3.1</b> | <b>MATERIJALI</b>                 | <b>33</b> |
| 3.1.1      | POKUSNE ŽIVOTINJE                 | 33        |
| 3.1.2      | KEMIJSKI SPOJEVI                  | 33        |
| 3.1.2.1    | Inhalacijski anestetik izofluran  | 33        |
| 3.1.2.2    | Inhalacijski anestetik sevofluran | 33        |
| 3.1.2.3    | Željezo dekstran                  | 33        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 3.1.2.4    | Vodena otopina željezo dekstrana   | 34        |
| <b>3.2</b> | <b>METODE</b>  | <b>34</b> |
| 3.2.1      | VAGANJE I PRAĆENJE PROMJENA TJELESNIH MASA LABORATORIJSKIH ŽIVOTINJA                 | 34        |
| 3.2.2      | OBRADA LABORATORIJSKIH ŠTAKORA   | 34        |
| 3.2.3      | RELATIVNI INDEKS TEŽINE ORGANA   | 36        |
| 3.2.4      | ODREĐIVANJE HEMATOLOŠKIH PARAMETARA  | 36        |
| 3.2.5      | ODREĐIVANJE BIOKEMIJSKIH PARAMETARA  | 36        |
| 3.2.6      | OSMOTSKA OTPORNOST ERITROCITA  | 37        |
| 3.2.7      | PRIPREMA ORGANA ZA ANALIZE   | 37        |
| 3.2.8      | METODE OKSIDACIJSKOG STRESA  | 38        |
| 3.2.8.1    | Određivanje koncentracije proteina prema Lowryju                                     | 38        |
| 3.2.8.2    | Određivanje lipidne peroksidacije  | 39        |
| 3.2.8.3    | Određivanje aktivnosti enzima katalaze   | 40        |
| 3.2.8.4    | Određivanje aktivnosti enzima superoksid dismutaze                                   | 41        |
| 3.2.8.5    | Određivanje koncentracije ukupnog glutationa   | 43        |
| 3.2.9      | ODREĐIVANJE ŽELJEZA METODOM INDUKTIVNO SPREGNUTE PLAZME S MASENOM<br>SPEKTROMETRIJOM | 44        |
| 3.2.10     | ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE DUŠIKOVOG OKSIDA   | 45        |
| 3.2.11     | ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ENZIMA ARGINAZE   | 47        |
| 3.2.11.1   | Određivanje koncentracije upalnih citokina   | 48        |
| 3.2.11.2   | Određivanje koncentracije hepcidina  | 49        |
| 3.2.11.3   | Određivanje koncentracije feritina   | 51        |
| 3.2.12     | STATISTIČKA OBRADA PODATAKA  | 52        |
| <b>4</b>   | <b>REZULTATI</b>   | <b>53</b> |
| <b>4.1</b> | <b>PROMJENA TJELESNE MASE ŽIVOTINJA</b>  | <b>53</b> |
| <b>4.2</b> | <b>RELATIVNA TEŽINA ORGANA</b>   | <b>54</b> |
| <b>4.3</b> | <b>REZULTATI HEMATOLOŠKIH PARAMETARA</b>   | <b>55</b> |
| 4.3.1      | ANALIZA UKUPNOG BROJA ERITROCITA   | 55        |
| 4.3.2      | ANALIZA OSTALIH HEMATOLOŠKIH PARAMETARA  | 56        |
| 4.3.3      | ANALIZA UKUPNOG BROJ LEUKOCITA   | 58        |
| 4.3.4      | ANALIZA DIFERENCIJALNE KRVNE SLIKE   | 58        |
| <b>4.4</b> | <b>ANALIZA BIOKEMIJSKIH PARAMETARA</b>   | <b>59</b> |



|                 |  |                   |
|-----------------|--|-------------------|
| <b>4.5</b>      | <b>REZULTATI OSMOTSKE OTPORNOSTI ERITROCITA</b>  | <b>63</b>         |
| <b>4.6</b>      | <b>REZULTATI PARAMETRA OKSIDACIJSKOG STRESA U PERIFERNIM ORGANIMA</b>                                  | <b>64</b>         |
| 4.6.1           | PARAMETRI OKSIDACIJSKOG STRESA U JETRI   | 64                |
| 4.6.2           | PARAMETRI OKSIDACIJSKOG STRESA U BUBREGU   | 68                |
| 4.6.3           | PARAMETRI OKSIDACIJSKOG STRESA U PLUĆIMA   | 72                |
| 4.6.4           | PARAMETRI OKSIDACIJSKOG STRESA U SLEZENI   | 76                |
| <b>4.7</b>      | <b>ANALIZA KONCENTRACIJE ŽELJEZA METODOM INDUKTIVNO SPREGNUTE PLAZME S<br/>MASENOM SPEKTROMETRIJOM</b> | <b>80</b>         |
| <b>4.8</b>      | <b>AKTIVNOST DUŠIKOVOG OKSIDA</b>  | <b>82</b>         |
| <b>4.9</b>      | <b>AKTIVNOST ENZIMA ARGINAZE</b>   | <b>85</b>         |
| <b>4.10</b>     | <b>KONCENTRACIJE UPALNIH CITOKINA</b>  | <b>85</b>         |
| <b>4.11</b>     | <b>KONCENTRACIJE HEPCIDINA I FERITINA U SERUMU</b>   | <b>87</b>         |
| <b><u>5</u></b> | <b><u>RASPRAVA</u></b>   | <b><u>89</u></b>  |
| <b><u>6</u></b> | <b><u>ZAKLJUČAK</u></b>  | <b><u>98</u></b>  |
| <b><u>7</u></b> | <b><u>LITERATURA</u></b>   | <b><u>100</u></b> |

## Popis kratica

BMP – koštani morfogogenetski proteini (engl. *bone morphogenic protein*)

BMP6 – koštani morfogogenetski protein 6 (engl. *bone morphogenic protein 6*)

BMP2 – koštani morfogogenetski protein 2 (engl. *bone morphogenic protein 2*)

BMPR-I – koštani morfogogenetski receptor proteina tipa I (engl. *bone morphogenic protein type I*)

BMPR-II – koštani morfogogenetski receptor proteina tipa II (engl. *bone morphogenic protein type II*)

CAT – katalaza (engl. *catalase*)

CLP – podvezivanje i probijanje cekuma (engl. *cecal ligation puncture*)

CNS – središnji živčani sustav (engl. *central nervous system*)

DMT1 – prijenosnik za dvovalentne ione metala (engl. *divalent metal transporter 1*)

DTNB – 5,5`-ditiobis(2-nitrobenzojeva kiselina) (engl. *5,5dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)*)

ELISA – imunološki test s protutijelima (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

Erk1/2 – protein-kinaza reguliran izvanstanični kompleks (engl. *extracellular signal-regulated protein kinase*)

Fe<sub>2</sub>Tf – željezo vezano za transferinski nosač

GABA<sub>A</sub> – receptora gama-aminomaslačne kiseline tipa A (engl. *gamma-aminobutyric acid type A receptor*)

GDF15 – faktor rasta i diferencijacije 15 (engl. *growth differentiation factor 15*)

GM-CSF – faktor stimulacije granulocitno-makrofagnih kolonija (engl. *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*)

GPx – glutation peroksidaza (engl. *glutathione peroxidase*)

GSH – ukupni glutation (engl. *total glutathione*)

GSSG – oksidirani oblik glutationa (engl. *glutathione disulfide*)

HAMP – hepcidin antimikrobni peptid (engl. *hepcidine antimicrobial peptide*)

HFE – humani protein hemokromatoze (engl. *human hemochromatosis protein*)

HIF – hipoksijom inducirani faktori (engl. *hypoxia-inducible transcription factors*).

HJV – hemojuvenilni koreceptor (engl. *hemojuvelin*)

HRP – avidin-konjugiran s peroksidazom iz hrena (engl. *horseradish peroxidase*)

IFN- $\gamma$  – interferon gama (engl. *interferon gamma*)

IL-1 $\beta$  – interleukin 1 beta (engl. *interleukin 1 beta*)

IL-4 – interleukin 4 (engl. *interleukin 4*)

IL-6 – interleukin 6 (engl. *interleukin 6*)

IL-10 – interleukin 10 (engl. *interleukin 10*)

IL-13 – interleukin 13 (engl. *interleukin 13*)

ip – intraperitonealno

IP3 – inozitol trifosfat (engl. *inositol triphosphate*)

IRE-željezo-odgovorni elementi (engl. *iron responsive elements*)

IRIDA – anemija uzrokovana nedostatkom željeza (engl. *Iron-refractory iron deficiency anemia*)

IRP – regulatorni proteini željeza (engl. *iron regulatory proteins*)

JAK – Janus kinaza (engl. *Janus kinase*)

JAK2 – Janus kinaza 2 (engl. *Janus kinase 2*)

LEAP-1 – antimikrobni peptid jetre-1 (engl. *liver-expressed antimicrobial peptide-1*)

LPS – lipopolisaharidi (engl. *lipopolisaccharides*)

MAC – minimalna alveolarna koncentracija (engl. *minimum alveolar concentration*)

MDA – malondialdehid (engl. *malondialdehyde*)

mRNA – glasnička ribonukleinska kiselina (engl. *messenger ribonucleic acid*)

MT2 – transmembranska serinska proteaza matriptaza-2 (engl. *matriptase-2*)

NED – N-1-naftiletilendiamin dihidroklorid (engl. *N-1-naphylethylenediamine dihydrochloride*)

NF- $\kappa$ B – nuklearni čimbenik – kapa B (engl. *nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells*)

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

NADPH-P450 – citokrom P450 reduktaza (engl. *cytochrome P450 reductase*)

NMDA – ionotropni glutamat (engl. *N-methyl D-aspartate*)

PUFA – višestruko nezasićene masne kiseline (engl. *polyunsaturated fatty acid*)

RANTES – kemokinski ligand 5 (engl. *chemokine ligand 5, CCL5 or regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*)

RES – retikulo-endotelni sustav (engl. *the reticuloendothelial system*)

rGSH – reducirani oblik glutationa (engl. *glutathione*)

RNS – reaktivni dušikovi spojevi (engl. *reactive nitrogen species*)

ROS – reaktivne vrste kisika (engl. *reactive oxygen species*)

sHJV – topljiv hemojuvelin (engl. *soluble hemojuvelin*)

SMAD – SMAD proteini (engl. *sons of mothers against decapentaplegic*)

SMAD1 – SMAD protein 1 (engl. *sons of mothers against decapentaplegic 1*)  
SMAD5 – SMAD protein 5 (engl. *sons of mothers against decapentaplegic 5*)  
SMAD7 – SMAD protein 7 (engl. *sons of mothers against decapentaplegic 7*)  
SMAD8 – SMAD protein 8 (engl. *sons of mothers against decapentaplegic 8*)  
SOD – superoksid dismutaza (engl. *superoxide dismutase*)  
STAT – signalni pretvarač i aktivator transkripcije (engl. *signal transducer and activator of transcription*)  
STAT3 – signalni pretvarač i aktivator transkripcije 3 (engl. *signal transducer and activator of transcription 3*)  
STAT5 – signalni pretvarač i aktivator transkripcije 5 (engl. *signal transducer and activator of transcription 5*)  
TfR – transferinski receptor (engl. *transferrin receptors*)  
TfR1 – transferinski receptr 1 (engl. *transferrin receptor 1*)  
TfR2 – transferinski receptor 2 (engl. *transferrin receptor 2*)  
TGF- $\beta$  – transformacijski faktori rasta beta (engl. *transforming growth factor beta*)  
TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (engl. *3,3',5,5'-tetramethylbenzidine*)  
TNF- $\alpha$  – čimbenik nekroze tumora alfa (engl. *tumor necrosis factor–alpha*)  
TNF-1 $\alpha$  – čimbenik nekroze tumora 1 alfa (engl. *tumor necrosis factor 1 alpha*)  
2-TBA – 2-tiobarbituratna kiselina (engl. *2-thiobarbituric acid*)  
8-OH-G – 8-hidroksigvanozin (engl. *8-hydroxyguanosine*)

# 1 UVOD

## 1.1 Heparidin

Heparidin je peptidni hormon i glavni regulator metabolizma željeza u tijelu. Izvorno nazvan antimikrobni peptid jetre-1 (engl. *liver-expressed antimicrobial peptide-1*, LEAP-1) otkriven 2000-tih godina u ljudskom serumu, a kasnije u urinu, kojemu se zbog antimikrobnih svojstva pridavala glavna uloga u urođenoj imunosti (Park i sur., 2001). Povezanost heparidina i metabolizma željeza otkrivena je tek kasnije na *knockout* miševima kojima je izbačen gen za heparidin (engl. *knockout mice*), zvan heparidin antimikrobni peptid (engl. *heparidine antimicrobial peptide*, HAMP) gdje su životinjski modeli pokazali akumulaciju željeza u parenhimskim tkivima i krvi (Pigeon i sur., 2001; Lunova i sur., 2016). Nadalje, transgenični mišji modeli, kojima je inducirana prekomjerna ekspresija gena za heparidin, pokazali su razvoj teškog oblika anemije (Nicolas, Bennoun i sur., 2002).

U skladu sa svojom primarno otkrivenom ulogom posrednika urođene imunosti, struktura heparidina visoko je očuvana među sisavcima. Proces translacije heparidinske glasničke ribonukleinske kiseline (engl. *messenger ribonucleic acid*, mRNA) uključuje tri bitna oblika: 1) preproheparidin, sastavljen od 84 aminokiseline, 2) proheparidin, od 64 aminokiseline i 3) aktivni oblik heparidina, od 25 aminokiselina. Heparidin se u krvi nalazi u svom aktivnom obliku, sastavljen od 8 cisteinskih ostataka povezanih s 4 disulfidna mosta (Reichert i sur., 2017) te pričvršćen za alfa 2-makroglobulin (Peslova i sur., 2009). U urinu i plazmi pronađene su 3 dodatne izoforme heparidina sastavljene od 20, 22 i 24 aminokiseline. Primijećeno je da se tijekom patoloških stanja, poput sepse, koncentracije izoformi povećaju (Reichert i sur., 2017) što potvrđuje njihovu ulogu u imunosti, odnosno antimikrobno djelovanje, dok aktivni oblik heparidina, osim antimikrobne uloge, ima ulogu i u održavanju homeostaze željeza (Agarwal i Yee, 2019).

Sintetizirani aktivni heparidin preko krvi odlazi do tri glavna mjesta djelovanja: 1) u enterocitima inhibira duodenalnu apsorpciju željeza, 2) u makrofagima retikulo-endotelnog sustava (engl. *the reticuloendothelial system*, RES) koči recikliranje željeza iz hema te 3) u stanicama hepatocita inhibira oslobađanje uskladištenog (rezervnog) željeza. Heparidin vrši svoju ulogu u održavanju homeostaze željeza preko heparidin-feroportin povratne sprege. Feroportin je jedini poznati transmembranski protein odgovoran za izlaz željeza, koji se nalazi u makrofagima, enterocitima i hepatocitima, a prilikom vezanja heparidina i feroportina dolazi do njihove inaktivacije i lizosomske razgradnje (Kowdley i sur., 2021). Time se zaustavlja

mobilizacija željeza iz navedenih stanica u krv što rezultira smanjenjem željeza u krvi, ograničava dostupnost željeza drugim organima te dovodi do akumulacije željeza u makrofagima, enterocitima i hepatocitima (Arruda i sur., 2020). Osim što se hepcidin iz cirkulacije uklanja internalizacijom i razgradnjom s feroportinom, može se ukloniti i bubrežnom ekskrecijom (Agarwal i Yee, 2019).

Sustav hepcidin-feroportin može biti narušen mutacijama koje utječu na njihovu količinu ili funkcionalnost što uzrokuje ozbiljne poremećaje u homeostazi željeza. Prekomjerne količine hepcidina u organizmu dovode do anemije uzrokovane nedostatkom željeza (engl. *Iron-refractory iron deficiency anemia*, IRIDA). Povišen hepcidin inhibira apsorpciju željeza u crijevima te uzrokuje zadržavanje željeza u makrofagima i hepatocitima što dovodi do niskih koncentracija željeza u krvi te pojave mikrocitne anemije (Nemeth i Ganz, 2021). Snižene količine hepcidina u organizmu dovode do neadekvatne apsorpcije i nakupljanja željeza u tijelu. Primjerice, mutacije u dijelu genoma koji regulira ekspresiju gena za hepcidin uzrokuje nakupljanje željeza, a stanje se naziva nasljedna hemokromatoza (Reichert i sur., 2017). Hemokromatoza je bolest koju karakterizira povećana apsorpcija željeza u crijevima, preopterećenje željeza u tijelu, te visoka plazmatska koncentracija željeza vezanog za transferin. U takvim oboljenjima dolazi do pojave željeza u krvi koje nije vezano za transferin, a ono uzrokuje zatajenje organa i smrt. Mutacije u dijelu genoma koji reguliraju ekspresiju gena za feroportin uzrokuje preopterećenje željezom u makrofagima (Nemeth i Ganz, 2021). Stoga, mjerenje koncentracije hepcidina ima veliko značenje u dijagnostici stanja s narušenom homeostazom željeza u organizmu.

Određivanje hepcidina, ponajviše iz krvi, vrši se: 1) imunološkim testovima koji posjeduju protutijela (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) za hepcidin, a detektiraju i vrlo niske koncentracije hormona, te 2) masenom spektrofotometrijom kojom je moguće detektirati karakteristični aktivni oblik hormona.

### 1.1.1 Regulacija ekspresije HAMP gena

Hepcidin je peptidni hormon kojeg prvenstveno luče hepatociti, a sintetiziran je genom HAMP na 19. kromosomu (Agarwal i Yee, 2019). Ekspresiju gena HAMP moguće je regulirati na transkripcijskoj razini putem četiri načina: statusom željeza (plazmatskim željezom i rezervama željeza), upalnom reakcijom, hipoksijom te eritropoezom (Reichert i sur., 2017). Osim transkripcijske regulacije gena, dokazane su i posttranskripcijske modifikacije koje mijenjaju razinu hepcidinske mRNA (Xin i sur., 2016). Ekspresiju gena HAMP potiču povećana saturacija transferina, visoke razine kisika i upalni procesi u organizmu, dok se

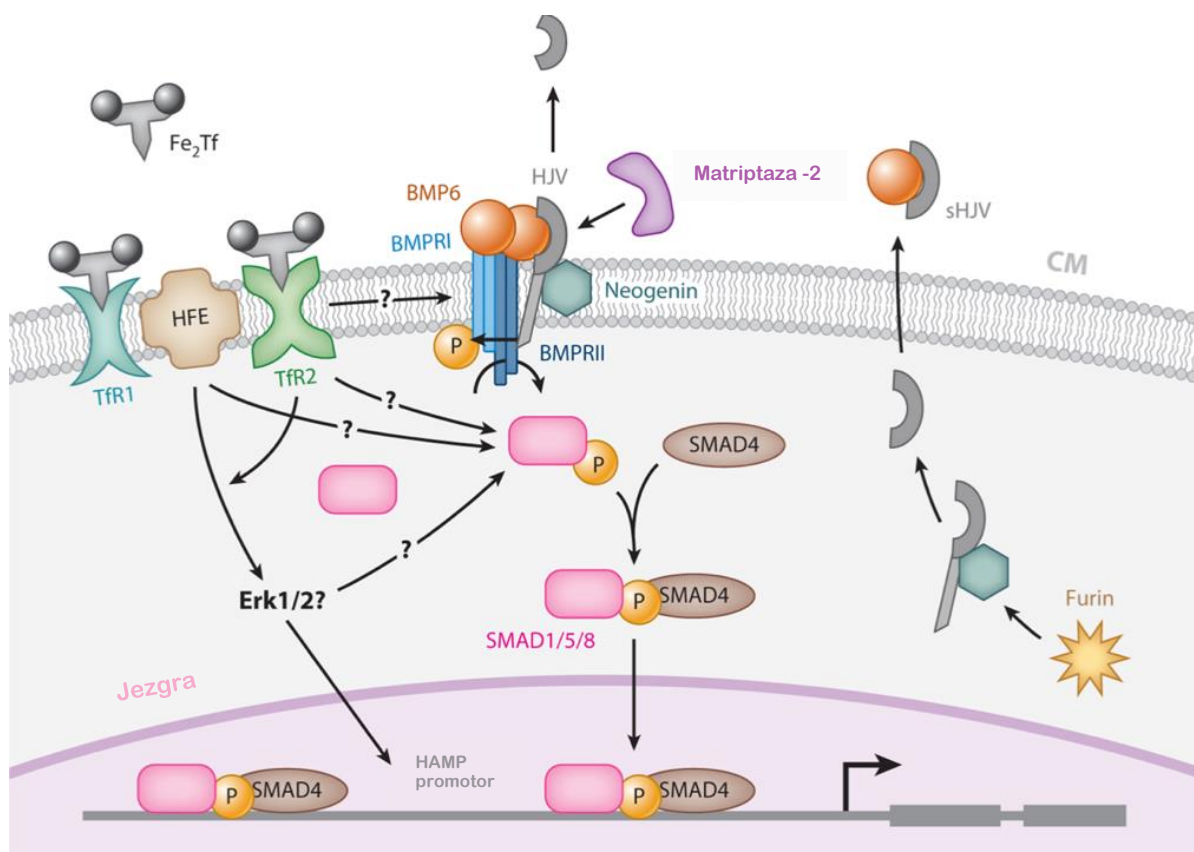
ekspresija gena smanjuje s niskim razinama željeza, procesom eritropoeze i hipoksijom (Udipi i sur., 2012; Meynard i sur., 2014). Meynard i suradnici (2014) ističu dodatne faktore koji smanjuju ekspresiju hepcidina u jetri, uključujući epidermalni faktor rasta, faktor rasta hepatocita, čimbenik nekroze tumora alfa (engl. *tumor necrosis factor–alpha*, TNF- $\alpha$ ) te estrogen i testosteron, no njihova uloga u održavanju homeostaze željeza nije potpuno razjašnjena.

Gen HAMP transkribira hepcidinsku mRNA kroz tri signalna puta: 1) prvi put ide preko koštanih morfogenetskih proteina i SMAD proteina (engl. *bone morphogenic protein/sons of mothers against decapentaplegic*, BMPs/SMAD), 2) drugi signalni put ide preko transferinskih receptora i ljudskog proteina hemokromatoze (engl. *transferrin receptors/human hemochromatosis protein*, TfR/HFE), a 3) treći preko Janus kinaze i signalnog pretvarača i aktivatora transkripcije (engl. *Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*, JAK/STAT) koji je povezan s upalnim procesom (Slika 1) (Arruda i sur., 2020). Molekule BMP, faktori rasta, uključuju molekule iz obitelji transformacijskih faktora rasta beta (engl. *transforming growth factor beta*, TGF- $\beta$ ). Molekule BMP vežu se za istoimene tip I i tip II receptore koštanih morfogenetskih proteina (engl. *bone morphogenic protein type I*, BMPR-I i *bone morphogenic protein type II*, BMPR-II), te ih fosforiliraju. Aktivirani receptorski kompleksi dalje fosforiliraju proteine SMAD, poput SMAD1 (engl. *sons of mothers against decapentaplegic 1*), SMAD5 (engl. *sons of mothers against decapentaplegic 5*) i SMAD8 (engl. *sons of mothers against decapentaplegic 8*). Aktivirani proteini SMAD tvore komplekse s proteinom SMAD4 (engl. *sons of mothers against decapentaplegic 4*), a takvi kompleksi se premještaju u jezgru i vežu za specifična mjesta na genu HAMP kako bi potaknuli transkripciju hepcidinske mRNA (Kautz i sur., 2008; Reichert i sur., 2017). SMAD7 (engl. *sons of mothers against decapentaplegic 7*) protein suprimira hepcidinsku mRNA u stanicama jetre (Mleczo-Sanecka i sur., 2010). Dokazano je kako hemojuvenilni koreceptor (engl. *hemojuvelin*, HJV) aktivira signalni put BMP/SMAD olakšavajući aktivaciju kompleksa BMPR-I i BMPR-II (Kautz i sur., 2008; Reichert i sur., 2017). Novija istraživanja na mišjim modelima ukazuju da transferinski receptori 1 (engl. *transferrin receptor 1*, TfR1) i transferinski receptori 2 (engl. *transferrin receptor 2*, TfR2) zajedno s proteinom HFE reguliraju ekspresiju gena HAMP u održavanju homeostaze željeza, no mehanizmi nisu potpuno razjašnjeni. Neizravni put regulacije uključuje zaseban utjecaj molekula TfR2 i HFE na ekspresiju gena HAMP aktivirajući signalni put BMP/SMAD, ne stupajući u međureakciju s molekulama BMP izravno već djelujući na receptore BMP, BMPR-I i BMPR-II (Corradini i sur., 2010; Kawabata 2019). Direktni utjecaj kompleksa TfR1/TfR2/HFE na regulaciju gena HAMP nije potpuno

razjašnjen, ali istraživanja govore da molekule transferina utječu na kompleks TfR1/TfR2/HFE jedino kada su zasićene molekulama željeza. Sjedanjem zasićenog transferina na TfR1 aktivira se molekula HFE koja se veže za TfR2. Daljnji put se pokreće jedino kada se za kompleks TfR2/HFE veže još jedan zasićeni transferin, a zatim se fosforilira protein-kinaza regulirana izvanstaničnim signalima (engl. *extracellular signal-regulated protein kinase*, Erk1/2) (Parrow i Fleming, 2014) koja izravno ili posljedično s kompleksom SMAD kontrolira regulaciju gena HAMP (Tangudu i sur., 2019). Regulacija ekspresije gena HAMP putem signalnog puta JAK/STAT započinje vezanjem specifičnog liganda na receptor JAK, što rezultira multimerizacijom njegovih podjedinica. Eritropoetin i hormon rasta s receptorom JAK tvore homodimere, dok upalni citokini i interferoni tvore heterodimere (Fleming, 2007). Aktivirani receptor JAK fosforilira kompleks STAT koji posljedično dimerizira te se premješta u jezgru kako bi se vezao za specifične dijelove genoma te izazvao ekspresiju gena HAMP (Arruda i sur., 2020).

Gen HAMP negativno je reguliran putem dva mehanizma: transmembranskom serinskom proteazom matriptazom-2 (engl. *matriptase-2*, MT2) i proteinom furinom (Slika 1). MT2, otkrivena tek 2002. godine, smatra se glavnim negativnim regulatorom signalnog puta BMP/SMAD. Uloga joj je otkrivena 2008. godine na *knockout* miševima kojima je izbačen gen za MT2, a koji su pokazali hiperaktivnost signalnog puta BMP/SMAD (Silvestri i sur., 2008). MT2 djeluje proteolitički, cijepajući i razgrađujući prvenstveno membranski HJV, ali i druge proteine na membrani hepatocita vezane za metabolizam željeza. Novija istraživanja sugeriraju ulogu neogenina u stabilizaciji kompleksa MT2/HJV (Krijt i sur., 2021). Krijt i suradnici (2021) su dokazali da postoje i drugi regulacijski proteini ekspresije hepcidina, danas još nepoznati, koji također cijepaju molekule HJV na stanicama hepatocita te naglašavaju potrebu za daljnjim istraživanjima. Drugi dokazani negativni regulator ekspresije gena HAMP je protein konvertaza, zvan furin. Smatra se da furin cijepa citoplazmatske molekule HJV, stvarajući topljive HJV (engl. *soluble hemojuvelin*, sHJV) koje se vežu za isto aktivno mjesto na receptorima BMP, kao i BMP molekule, te na taj način reguliraju, odnosno zaustavljaju signalni put BMP/SMAD (Parrow i Fleming, 2014).





**Slika 1.** Pregled signalizacija koje dovode do ekspresije i supresije gena HAMP u homeostazi željeza. Molekule BMP, primjerice BMP6, vežu istoimene receptore BMPRI/BMPRII na membrani stanica. Receptorski kompleks se fosforilira i aktivira te posljedično uzrokuje fosforilaciju kompleksa SMAD1/5/8 koji zajedno s proteinom SMAD4 odlazi u jezgru sjedajući na promotor gena HAMP. Koreceptor HJV pojačava signal receptora BMPRI/BMPRII olakšavajući njihovu aktivaciju. Interakcija kompleksa Tfr1/HFE/Tfr2 sa zasićenim transferinskim nosačima, Fe<sub>2</sub>Tf koji nose dvije molekule željeza, uzrokuju njihovu aktivaciju te putem još nedovoljno razjašnjenih mehanizama dolazi do ekspresije gena HAMP. MT2 i furin suprimiraju ekspresiju tako da MT2 cijepa transmembranske molekule HJV, dok furin cijepa HJV stvarajući sHJV koji sjedaju na receptore BMP istiskujući molekule BMP. Neogenin stabilizira kompleks MT2/HJV (preuzeto i prilagođeno prema Parrow i Fleming, 2014). Kratice: gen HAMP – gen za hepcidin, molekule BMP – koštani morfogenetski proteini, BMP6 – koštani morfogenetski protein 6, kompleks BMPRI/BMPRII – kompleks receptora koštanog morfogenetskog proteina tipa I/ koštanog morfogenetskog proteina tipa II, kompleks SMAD1/5/8 – kompleks SMAD proteina 1, 5 i 8, SMAD4 – SMAD 4 protein, HJV koreceptor – hemojuvenilni koreceptor, kompleks Tfr1/HFE/Tfr2 – kompleks transferinski receptor 1/ljudski protein hemokromatoze/transferinski receptor 2, Fe<sub>2</sub>Tf – željezo vezano za transferinski nosač, MT2 - transmembranska serinska proteaza matriptaza-2, sHJV - topljiv hemojuvelin

### 1.1.2 Regulacija hepcidina statusom željeza

Najčešći oblik regulacije hormona povratnom spregom je putem produkta čiju koncentraciju regulira sam hormon u ovom slučaju željezo. Prema statusu željeza u tijelu, postoje tri glavna puta kojima hepcidin regulira homeostazu željeza: inhibicijom apsorpcije

željeza iz hrane u dvanaesniku, kontrolom kretanja zalihe željeza sadržane u hepatocitima i blokiranjem otpuštanja željeza koje recikliraju makrofagi. Povećane koncentracije željeza u plazmi dovode do povećane transkripcije hepcidina. Hepcidin zatim odlazi u krv te vežući se za transmembranski receptor feroportin djeluje na: 1) bazolateralnu membranu enterocita u dvanaesniku, čime se inhibira daljnja apsorpcija željeza, 2) stanice hepatocita, čime inhibira mobilizaciju željeznih rezervi, te 3) stanice RES-a, čime inhibira recikliranje željeza. Obrnuti proces odvija se u niskim koncentracijama željeza u plazmi (Reichert i sur., 2017).

U regulaciji transkripcije hepcidina važna je signalna kaskada BMP/SMAD. Hepatociti indirektno osjećaju prisutnost većih količina željeza putem željezo-induciranih molekula BMP nastalih u sinusoidnim endotelnim stanicama jetre (Enns i sur., 2013). Dokazano je kako veći status željeza u krvi potiče ekspresiju mRNA koštanih morfogenetskih proteina 6 (engl. *bone morphogenic protein 6*, BMP6) u miševa nakon čega molekule BMP aktiviraju kaskadni put BMP/SMAD. Isto tako, niže razine željeza u krvi potiskuju ekspresiju Bmp6 mRNA u miševa (Kautz i sur., 2008). Dokaz uloge molekula BMP6 kao posrednika između željeza i gena HAMP ustanovljena je u *knockout* miševima u kojima je izbrisan gen za BMP6. Miševi su pokazivali nisku ekspresiju hepcidina te ozbiljno opterećenje željezom u krvi (Meynard i sur., 2009). Unatoč većim razinama željeza u krvi tih miševa nisu uočene fosforilacije kompleksa SMAD1/5/8 niti premještanje kompleksa SMAD u jezgre stanica što upućuje na specifičnu funkciju BMP6 u održavanju homeostaze željeza (Parrow i Fleming, 2014). Kautz i suradnici (2008), također su uočili blago povećanu ekspresiju mRNA koštanih morfogenetskih proteina 2 (engl. *bone morphogenic protein 2*, BMP2) u miševa primjenom prehrane obogaćene željezom, što ukazuje da osim BMP6, BMP2 je također željezom-induciran te aktivira signalni put BMP/SMAD. Koncentracija izvanstaničnog željeza izravno aktivira signalni put TfR/HFE. Transferin zasićen sa željezom veže TfR1 čime se molekula HFE otpušta s TfR1 i veže za receptor TfR2. Sjedanje zasićenog transferina na kompleks TfR2/HFE, putem nerazjašnjenih kaskadnih mehanizama uzrokuje prijenos signala u stanicu te potiče sintezu hepcidina (Ganz i Nemeth, 2015; Arruda i sur., 2020).

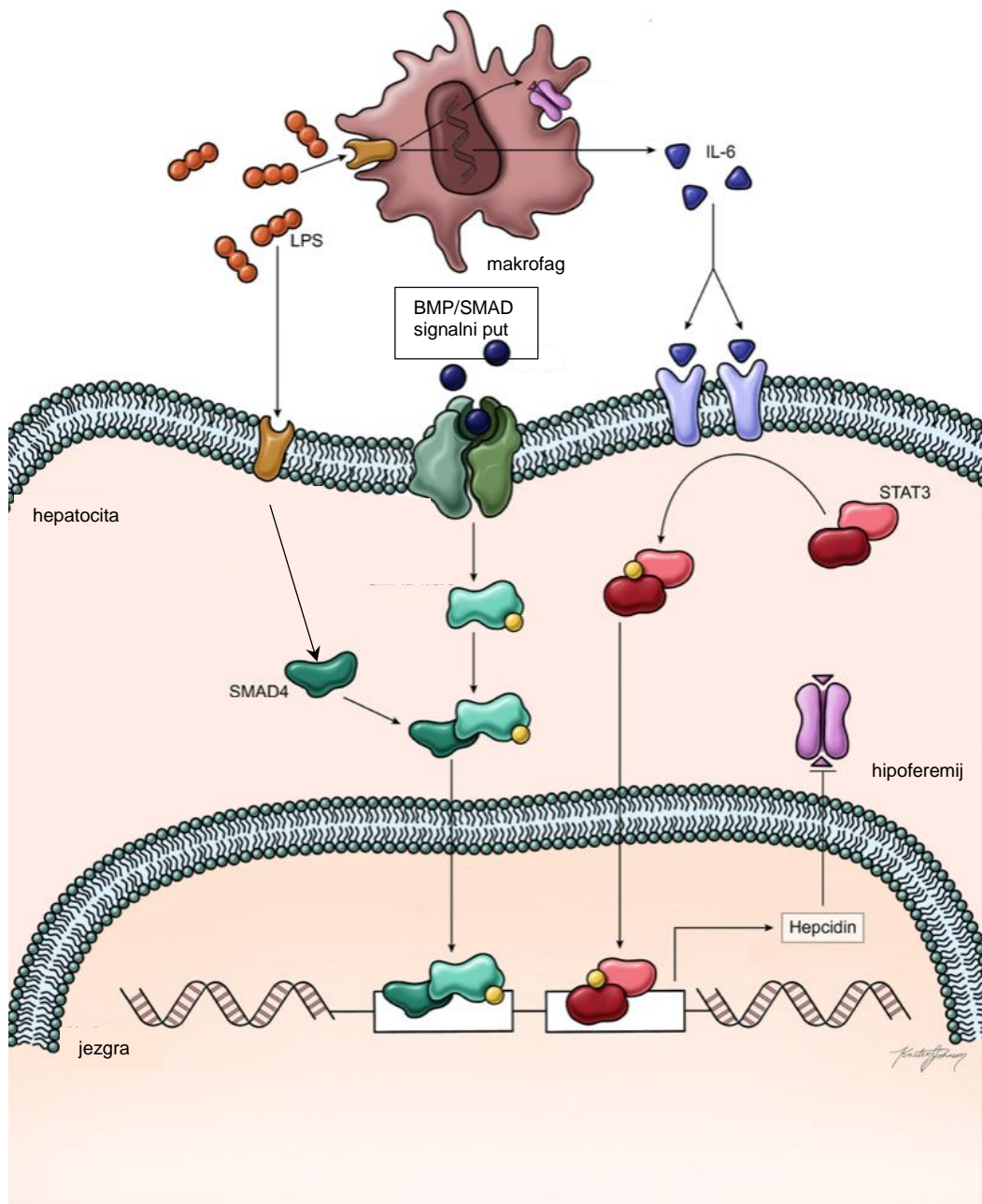
Smanjeni status željeza u krvi inducira transkripciju gena za MT2, koji razgradnjom receptora HJV na staničnoj membrani deaktivira signalni put BMP te utječe na smanjenje sinteze hepcidina (Enns i sur., 2012).

### 1.1.3 Regulacija hepcidina upalnom reakcijom

Petlju povratne sprege hepcidin-feroportin prekidaju infekcija i upala, koji djelujući na ekspresiju gena HAMP induciraju proizvodnju hormona hepcidina. Time se smanjuje

koncentracija željeza u plazmi te se inhibira apsorpcija željeza u dvanaesniku i mobilizacija željeza iz makrofaga i hepatocita. Obzirom na ovisnost većine mikroorganizama o željezu, pretpostavljeno je da hipoferemija izazvana infekcijom ima obrambenu ulogu domaćina (Slika 2). Lipopolisaharidi (engl. *lipopolisaccharides*, LPS) mogu izravno poticati ekspresiju gena HAMP i aktivirati signalni put BMP/SMAD, što je u skladu s tvrdnjom Weinberga (1977) koji je prvi zamijetio da je indukcija hepcidina s LPS važan antimikrobni mehanizam temeljen na ograničavanju dostupnosti željeza patogenima. Dugotrajna hipoferemija može dovesti do anemije kronične bolesti, stanja koje je djelomično uzrokovano ograničenjem eritropoeze (Ganz i Nemeth, 2015). Istraživanja na *knockout* miševima koji imaju nedostatak hepcidina, nakon upalne stimulacije nisu uspjeli razviti hipoferemiju, a koncentracija željeza u serumu se čak i povećala, dok anemija nije bila uočena ili je bila blažeg oblika (Kim i sur., 2014; Ganz i Nemeth, 2015). Također, u upalnim procesima uzrokovanim infekcijama, autoimunim ili zloćudnim bolestima stimulira se proizvodnja makrofaga, proupalnih i protuupalnih citokina, a upravo se oni smatraju ključnim regulatorima ekspresije hepcidina (Ganz i Nemeth, 2015; White, 2015; Agarwal i Yee, 2019).

Citokini, poput interleukina 6 (engl. *interleukin 6*, IL-6) izravno reguliraju proizvodnju hepcidina aktivacijom signalnog puta Janus kinaze 2 i signalnog pretvarača i aktivatora transkripcije 3 (engl. *Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3*, JAK2/STAT3) na hepatocitima i leukocitima (Silva i Faustino, 2015). LPS nastao prilikom upale ili infekcije također uzrokuje povećanu proizvodnju proupalnog citokina IL-6 u makrofagima. U uvjetima akutne ili kronične upale, IL-6 se veže na vlastiti receptor kojeg tvore 2 podjedinice: alfa podjedinica, glikoprotein IL-6-R i beta podjedinica, glikoprotein 130. Aktivacija receptora izaziva autofosforilaciju i dimerizaciju kompleksa JAK2 koji zatim fosforilira protein STAT3. Fosforilirana molekula STAT3 se dimerizira te kao takva odlazi u jezgru i potiče transkripciju vežući se za promotor gena HAMP (White, 2015).



**Slika 2.** Povećana proizvodnja hepcidina i hipoferemija kao odgovor na upalnu reakciju. Povećani LPS, nastao prilikom upale ili infekcije, uzrokuje povećanu proizvodnju proupalnog citokina IL-6 u makrofagima. IL-6 se zatim veže za vlastiti receptor na hepatocitima te uzrokuje aktivaciju signalnog puta JAK2/STAT3 putem kaskadnih reakcija. Dimerizirani i fosforilirani STAT3 odlazi u jezgru i povećava transkripciju hepcidinske mRNA vezanjem za određeni promotor na genu HAMP. S druge strane, LPS može izravno regulirati ekspresiju gena aktivirajući BMP signalni put /SMAD. Povećane razine hepcidina uzrokuju sistemska hipoferemiju (preuzeto i prilagođeno prema Camaschella i sur., 2020).

Kratice: LPS – lipopolisaharidi, IL-6 – interleukin 6, kompleks JAK2/STAT3 – kompleks Janus kinaze 2 i signalnog pretvarača i aktivatora transkripcije 3, gen HAMP– gen za hepcidin, kompleks BMP/SMAD – kompleks koštanih morfo-genetskih proteina i SMAD proteina.

#### 1.1.4 Eritropoeza i hipoksija suprimiraju aktivnost hepcidina

U hipoksiji i anemiji snižene su koncentracije kisika u tkivima, a njih registrira centar u bubrežima nakon čega kreće pojačano lučenje hormona eritropoetina i proces eritropoeze. Eritropoetin se veže za receptore na površini prekursora eritrocita te inducira njihovu proliferaciju i diferencijaciju u zrele eritrocite. Kako bi eritrociti mogli prenositi kisik, prilikom sazrijevanja potrebno je ugraditi željezo u hem grupu. Za proces eritropoeze potrebno je 20-25 mg željeza od čega većina dolazi iz recikliranja starih eritrocita putem makrofaga RES-a. Bez željeza sazrijevanje eritrocita je onemogućeno, a može doći do mikrocitne hipokromne anemije. Zbog toga se ekspresija gena HAMP i sinteza hepcidina smanjuje omogućavajući mobilizaciju željeza iz makrofaga RES-a i povećanu apsorpciju željeza u crijevima. Svi mehanizmi reguliraju ekspresiju gena HAMP na razini transkripcije, no mehanizmi kojima se inhibira ekspresija gena HAMP tijekom eritropoeze, nisu dovoljno istraženi (Nicolas, Chauvet i sur., 2002).

U eritropoezi, eritroidni prekursori sintetiziraju ključne molekule za koje se smatra da sudjeluju u supresiji gena HAMP: 1) nedavno identificirani hormon eritroferon i 2) faktor rasta i diferencijacije 15 (engl. *growth differentiation factor 15*, GDF15). Eritroferon se sintetizira u koštanoj srži i slezeni putem signalnog puta Janus kinaze 2 i signalnog pretvarača i aktivatora transkripcije 5 (engl. *signal transducer and activator of transcription 5*, STAT5), a njegova uloga u homeostazi željeza pokazala se ključnom u istraživanju Kautz i suradnika (2014) kada su otkrili smanjene razine hepcidinske mRNA i hormona hepcidina prilikom injiciranja eritroferona u miševе. Također su dokazali da hipoksija i eritropoeza indirektno potiskuju ekspresiju gena HAMP uzrokujući lučenje eritroidnih prekursora iz koštane srži koji djeluju na jetru i potiskuju ekspresiju hepcidina (Kautz i sur., 2014). Eritroidni prekursori stvaraju GDF15 u kasnom stadiju diferencijacije te je upravo on predložen kao mehanizam kojim se suzbija ekspresija gena HAMP tijekom neučinkovite eritropoeze, primjerice β-talasemije i anemije (Tanno i sur., 2007; Tamary i sur., 2008). Serumi tih pacijenata pokazali su ovisnost razine hepcidinske mRNA s razinama molekule GDF15, no mišji modeli β-talasemije nisu pokazali ovisnost ta dva faktora što je otežalo istraživanja uloge GDF15 u regulaciji hepcidina (Frazer i sur., 2012; Kim i Nemeth, 2015).

Glavni modulatori metabolizma željeza i eritropoeze u stanju hipoksije su faktori inducirani hipoksijom (engl. *hypoxia-inducible transcription factors*, HIF), a razine kisika u stanicama reguliraju proizvodnju HIF proteina. Pri normalnim razinama kisika HIF podjedinice se razgrađuju preko proteosoma. Pri stanju snižene razine kisika HIF podjedinice pojačavaju

ekspresiju gena za eritropoetin te suprimiraju ekspresiju gena za hepcidin (Peyssonnaud i sur., 2007; Silva i Faustino, 2015).

## 1.2 Oksidacijski stres i upala

Reaktivne vrste kisika (engl. *reactive oxygen species*, ROS) definiraju se kao molekule s najmanje jednim atomom kisika i većom reaktivnošću od molekularnog kisika (Herb i Schramm, 2021), a nastaju u organizmu tijekom normalnih fizioloških procesa prilikom redukcije i ekscitacije molekularnog kisika (Štefan i sur., 2007). U procesu staničnog disanja, na unutarnjoj strani mitohondrija, molekularni kisik se procesom oksidativne fosforilacije uz pomoć citokrom C oksidaze reducira do vode, prilikom čega kao međuproizvodi nastaju reaktivni kisikovi spojevi. ROS su dakle djelomično reducirane molekule kisika koje uključuju skupinu molekula zvanu slobodni kisikovi radikali, ali i druge reaktivne neradikalske vrste (Tablica 1) (Su i sur., 2019). Početno se smatralo kako su samo fagocitne stanice odgovorne za proizvodnju ROS-a s ulogom obrane organizma od stranih tvari. Kasnije je otkrivena važnost slobodnih radikala za normalno funkcioniranje metabolizma, a glavnu ulogu imaju u staničnim signalizacijama uključujući apoptozu, ekspresiju gena i aktiviranje staničnih signalnih kaskada (Hancock i sur., 2001). Zbog nesparenog elektrona, slobodni radikali su vrlo reaktivni zbog čega organizam posjeduje antioksidacijske mehanizme kojima ih kontroliraju. Razni enzimski i neenzimski antioksidacijski sustavi doprinose ravnoteži slobodnih radikala, a nekoliko je glavnih enzimskih sustava: superoksid dismutaza (engl. *superoxide dismutase*, SOD), katalaza (engl. *catalase*, CAT) i glutation peroksidaza (engl. *glutathione peroxidase*, GPx) (Štefan i sur., 2007).

Međutim, neravnotežom proizvodnje i uklanjanja slobodnih radikala kisika može doći do njihovog nakupljanja što uzrokuje staničnu disfunkciju, odnosno oksidacijski stres. U tom slučaju, slobodni radikali mogu oštetiti makromolekule, poput proteina, lipida i deoksiribonukleinske kiseline (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA) pri čemu često dolazi do oksidacije tih biomolekula (Lee i sur., 2015). Oksidirani proteini, lipidi, DNA i glikozilirani proizvodi rezultiraju oštećenjem neurona koji se uglavnom javljaju kod poremećaja CNS-a. Nastali ROS u tkivu mozga može modulirati sinaptičku i nesinaptičku komunikaciju neurona što rezultira neuropalom, staničnom smrću, neurodegeneracijom i gubitkom pamćenja (Popa-Wagner i sur., 2013). Česta meta slobodnih radikala su višestruko nezasićene masne kiseline (engl. *polyunsaturated fatty acid*, PUFA), a to rezultira pojavnom lipidne peroksidacije. Povećana lipidna peroksidacija prijeti razvoju ateroskleroze i drugih upalnih procesa, a može

doći i do staničnih smrti (Štefan i sur., 2007). Dakle, nakupljanje oksidacijskog stresa u organizmu ima važnu ulogu u etiologiji različitih kroničnih stanja, poput neurodegenerativnih bolesti, bolesti kardiovaskularnog sustava, ali i raka (Lee i sur., 2015). Zbog velike važnosti pravovremenog otkrivanja, razvijeno je nekoliko biomarkera staničnog stresa: a) mjerenje razine slobodnih radikala; b) mjerenje oštećenja DNA, lipida i proteina c) mjerenje aktivnosti enzimskih antioksidansa (Štefan i sur., 2007).

Oksidacijski stres ima vrlo važnu ulogu u odgovoru organizma na kroničnu upalu putem novačenja imunoloških stanica. Otkriveno je kako stanični stres potiče aktivaciju raznih upalnih transkripcijskih faktora, poput nuklearnog čimbenika-kapa B (engl. *nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells*, NF-κB), aktivatora proteina-1, tumor proteina p53, signalnog prijenosnika, signalnog pretvarača i aktivatora transkripcije 3, hipoksije-induciranog faktora 1-alfa i nuklearnog čimbenika eritroid-2 povezanog s čimbenikom transkripcije, što je popraćeno proizvodnjom raznih upalnih medijatora koji moduliraju upalni odgovor (Lee i sur., 2015). Također, velike količine upalnih medijatora izazvanih kroničnom upalom uzrokuju i moduliraju oksidacijski stres (Lee i sur., 2015).

### 1.2.1 Reaktivni spojevi kisika i dušika

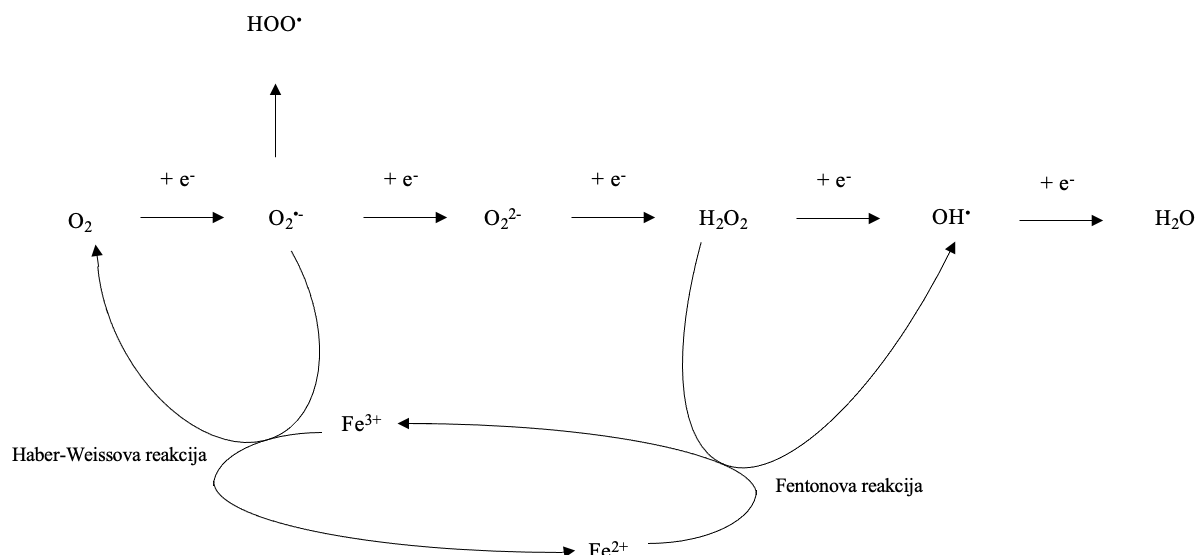
Molekularni kisik ( $O_2$ ) primarni je stanični akceptor elektrona u aerobnom disanju koji ima temeljnu ulogu stvaranja ATP-a u mitohondrijima. No,  $O_2$  je snažno oksidacijsko sredstvo te kao nusprodukt stanične sredine zasićene kisikom, reakcijama redukcije stvara ROS. Reaktivni kisikovi spojevi dijele se na: 1) slobodne radikale, u koje spadaju superoksidni ( $O_2^-$ ), hidroksilni ( $OH^\bullet$ ), peroksilni ( $RO_2^\bullet$ ), alkoksilni ( $RO^\bullet$ ) i hidroperoksilni anioni ( $HO_2^\bullet$ ) te na 2) čestice koje nisu slobodni radikali, ali su također reaktivni, a u njih se ubrajaju vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), hipokloritna kiselina ( $HOCl$ ), ozon ( $O_3$ ) i singletni kisik ( $^1O_2$ ) (Tablica 1) (Štefan i sur., 2007). Nastajanje ROS-a iz  $O_2$  može biti kaskadnim reakcijama prijenosa elektrona ili prijenosom energije. Iako je za reakcijske kaskade potrebna inicijalna energija, dokazano je kako su reakcije egzotermne te se mogu dogoditi spontano (Bhattacharjee, 2019).

**Tablica 1.** Prikaz reaktivnih kisikovih spojeva i njihove podjele na slobodne radikale i čestice koje nisu slobodni radikali (preuzeto i prilagođeno prema Štefan i sur., 2007)

| Slobodni radikali               | Čestice koje nisu slobodni radikali |
|---------------------------------|-------------------------------------|
| superoksidni, $O_2^{\cdot -}$   | vodikov preoksid, $H_2O_2$          |
| hidroksilni, $OH^{\cdot}$       | hipokloritna kiselina, $HClO$       |
| peroksilni, $RO_2^{\cdot}$      | ozon, $O_3$                         |
| alkoksilni, $RO^{\cdot}$        | singletni kisik, $^1O_2$            |
| hidroperoksilni, $HO_2^{\cdot}$ |                                     |

Tijekom normalnog staničnog metabolizma,  $O_2$  se reducira do vode ( $H_2O$ ) putem kaskadnih reakcija redukcije u kojima nastaju reaktivni spojevi kisika (Slika 3). Primitkom jednog elektrona, odnosno djelomičnom redukcijom  $O_2$ , nastaje  $O_2^{\cdot -}$ , dok primitkom dva elektrona, odnosno potpunom redukcijom, nastaje peroksidni anion ( $O_2^{2-}$ ). U kiseljoj sredini  $O_2^{\cdot -}$  veže proton te nastaje još reaktivniji perhidroksilni anion ( $HOO^{\cdot}$ ). Peroksidni anion reakcijom protoniranja prelazi u vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) koji se ne ubraja u slobodne radikale već u reaktivne kisikove spojeve.  $H_2O_2$  jako je oksidacijsko sredstvo te daljnjom njegovom redukcijom nastaje reaktivni  $OH^{\cdot}$ , a na kraju voda. Metalni ioni, koji se mogu naći u kompleksu citokroma C, u stanicama su prisutni u oksidiranom ( $Fe^{3+}$ ) i reduciranom obliku ( $Fe^{2+}$ ), te vrlo lako podliježu redoks-reakcijama u prisutnosti reaktivnih kisikovih spojeva. U prvoj redoks reakciji, naziva Haber-Weissova reakcija, oksidirani metal ( $metal^{n+1}$ ) biva reduciran pomoću superoksidnog radikala pri čemu nastaju molekularni kisik i reducirani ion metala ( $metal^{n+}$ ). Reducirani metalni ion stupa u drugu redoks reakciju, naziva Fentonova reakcija, prilikom čega se reducirani ion metala ( $metal^{n+}$ ) oksidira putem  $H_2O_2$ , a nastaju hidroksilni radikal i oksidirani ion metala ( $metal^{n+1}$ ). Vodikov peroksid, pod utjecajem henskog enzima, mijeloperoksidaze, može stvoriti i druge radikale poput hipoklorne kiseline, vrlo snažnog oksidansa i antimikrobnog agensa, a taj proces karakterističan je za fagocite. Slobodni radikali su vrlo nestabilne kemijske molekule koje zahtijevaju kontrolu putem raznih antioksidacijskih mehanizama. Enzimi poput SOD, CAT i GPx kontroliraju razinu ROS-a u stanicama kako ne bi došlo do njihovog nakupljanja te posljedično tome oksidacijskog stresa (Bhattacharjee, 2019).





**Slika 3.** Prikaz reakcija tijekom normalnog staničnog metabolizma u kojem od  $O_2$  do  $H_2O$  putem kaskadnih reakcija redukcije nastaju i reaktivni spojevi kisika.

U organizmu slobodni kisikovi radikali nastaju tijekom uobičajenih metaboličkih staničnih procesa, a njihov nastanak može biti induciran i određenim vanjskim procesima. Stoga, izvore superoksidnog radikala možemo podijeliti na 1) enzimске, 2) stanične i 3) egzogene. U enzimске izvore ubrajaju se katalitičke reakcije nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, NADPH) oksidaze, citokrom P450 reduktaze (engl. *cytochrome P450 reductase*, NADPH-P450), ksantin oksidaze i superoksid dismutaze. Na razini stanice, superoksidni radikali nastaju u respiratornom lancu djelovanjem mikrosomalne oksigenaze u leukocitima i tijekom procesa fagocitoze (Štefan i sur., 2007). Tijekom fagocitoze u makrofagima, neutrofilima i eozinofilima kontinuirano nastaju reaktivni kisikovi spojevi, a nastaju vrlo jakim oksidacijskim metabolizmom tzv. oksidacijskim praskom pri čemu se stvaraju superoksid, vodikov peroksid, hidroksilni radikal, hipoklorna kiselina i dušikov (II) oksid (Herb i Schramm, 2021). Vanjski procesi nastanka radikala su djelovanja UV-svijetla, X-zraka, toksičnih kemikalija, aromatskih nitrospojeva (Štefan i sur., 2007), a danas se smatra kako inhalacijski anestetici svojim imunomodulatornim učincima mogu pridonijeti razvoju oksidacijskog stresa i upalnim procesima (Lee i sur., 2015).

Uz reaktivne kisikove spojeve, u zdravom metabolizmu veliku važnost imaju i reaktivni dušikovi spojevi (engl. *reactive nitrogen species*, RNS) od kojih su najvažniji dušikov (II) oksid ( $NO^{\bullet}$ ) i dušikov (IV) oksid ( $NO_2^{\bullet}$ ), ali i molekule poput dušične kiseline ( $HNO_2$ ), peroksinitrata ( $ONOO^-$ ), peroksinitritne kiseline ( $ONOOH$ ), alkil peroksinitrata ( $ROONO$ ) i nitrozilnog kationa ( $NO^+$ ) (Herb i Schramm, 2021).  $NO^{\bullet}$  nastaje u endotelnim i živčanim stanicama te

sudjeluje u regulaciji krvnog tlaka, inhibiciji agregacije trombocita i proliferaciji glatkih mišića, ali ima ulogu i u moždanom infarktu i septičkom šoku (Ma i sur., 2018). Također, nastaje u aktiviranim makrofagima kao međuproizvod oksidacije arginina djelovanjem sintaze dušikovog oksida gdje pomaže u ubijanju unutarstaničnih parazita, odnosno uzrokuje citotoksičnu aktivnost makrofaga te sudjeluje u oštećenju tkiva kod kronične upale, a može dovesti i do nitroziliranja proteina s potencijalno oslabljenim ili promijenjenim funkcijama (Rath i sur., 2014).  $\text{NO}^\bullet$  je radikal s vrlo kratkim poluživotom od približno 3 do 5 sekunde, a reagira s raznim molekulama, primjerice superoksidom stvarajući vrlo toksičan peroksinitrit koji može potaknuti proces lipidne peroksidacije. Peroksinitrit s lipofilnim peroksilnim radikalima ( $\text{ROO}^\bullet$ ) stvara relativno stabilan  $\text{ROONO}$  koji zaustavlja proces lipidne peroksidacije, čime  $\text{NO}^\bullet$  indirektno štiti lipide biomembrana od oštećenja radikala (Rath i sur., 2014; Ma i sur., 2018).

### 1.2.2 Prirodni antioksidansi

Antioksidansi nastoje uravnotežiti slobodne radikale nastale tijekom metaboličkih procesa, a definiraju se kao tvari koje u manjim koncentracijama u odnosu na supstrate, dovode do odgađanja ili inhibicije oksidacije supstrata (Štefan i sur., 2007). Prirodni antioksidansi se na temelju njihovog kemijskog sastava dijele na: enzime (SOD, CAT, GPx i tioredoksin), neenzime koji uključuju vitamine i njihove analoge (vitamini A, C i E; koenzim Q10 i flavonoidi), minerale (selenij i cink) i metabolite (bilirubin i melatonin) (Su i sur., 2019), a na temelju njihove uloge u obrani dijele se na četiri skupine: 1) preventivni antioksidansi, 2) sakupljači radikala, 3) antioksidansi koji obnavljaju i 4) antioksidansi koji se oslanjaju na mehanizme prilagodbe.

Prema ulozi, prva skupina antioksidansa sprječava nastanak oksidacijskih procesa kontrolirajući nastanak radikalnih vrsta na način da neutraliziraju sve slobodne radikale koji mogu potaknuti proizvodnju drugih radikala. Djeluju vrlo brzo na nekoliko načina: dismutiraju superoksidni anion, razgrađuju vodikov peroksid i hidroperokside stvarajući tzv. bezopasne vrste poput molekularnog kisika, te vežu metalne ione poput feritina. U prvu skupinu ubrajamo najbitnije enzime oksidacijskog stresa: SOD, CAT, GPx te citokrom oksidazu (Noguchi i sur., 2000; Pisoschi i sur., 2021). Druga skupina antioksidansa neutralizira, odnosno uklanja radikale donacijom elektrona pri čemu radikali postaju bezopasne vrste. Ova skupina uključuje lipofilne antioksidanse, poput ubikvinola i alfa tokofenola te hidrofилne antioksidanse, poput vitamina C (askorbinska kiselina), mokraćne kiseline, a najznačajniji je glutation. U homeostatskim

uvjetima se antioksidans glutation uglavnom nalazi u stanici u reduciranom obliku, a samo 5% je oksidirani oblik. U reakciji s vodikovim peroksidom, sulfhidrilna skupina glutaciona predstavlja donor elektrona te se ona oksidira. Reducirani oblik glutaciona prelazi u oksidirani oblik, nastao kao posljedica djelovanja slobodnih radikala, održavajući omjer stabilnim. U oksidacijskom stresu omjer reduciranog naspram oksidiranog oblika je smanjen (Pizzorno i Katzinger, 2012). Treća skupina antioksidansa djeluje na oštećenja nastala slobodnim radikalima, a tvore ju enzimi koji popravljaju oksidaciju nastalu na DNA, lipidima i proteinima. Ova skupina uključuje enzime za popravak DNA, poput polimeraze, glikozilaze i nukleaze te proteolitičke enzime, poput peptidaza, proteaza i proteinaza prisutnih u citosolu i mitohondrijima stanica sisavaca. Četvrta skupina antioksidansa djeluje iskorištavanjem mehanizama prilagodbe, odnosno koriste signale koji potiču proizvodnju slobodnih radikala ili signale kod reakcija koje uključuju slobodne radikale. Ova skupina djeluje sprječavajući stvaranje slobodnih radikala ili reakcija koje uključuju slobodne radikale na način da signal koji generira određena vrsta slobodnog radikala potiče sintezu i transport odgovarajućeg antioksidansa na mjesto djelovanja (Noguchi i sur., 2000; Pisoschi i sur., 2021).

Prirodni antioksidansi učinkovito suzbijaju djelovanje ROS-a, a kako bi se postigla maksimalna zaštita nalaze se: 1) unutar stanica u citosolu i organelima, 2) unutar membrane stanica i 3) izvan stanica, a smještaj svakog te njihova uloga detaljno su pojašnjeni u Tablici 2. Nekontrolirana proizvodnja ROS-a važna je u patogenezi mnogih kliničkih poremećaja, a očituje se promijenjenim aktivnostima već spomenutih glavnih unutarstaničnih enzima oksidacijskog stresa. Iako se enzimi nalaze u stanici, dokazana je prisutnost glikoliziranih oblika GPx, SOD-a (Štefan i sur., 2007) i glutaciona (engl. *total glutathione*) u izvanstaničnoj tekućini (de Nicola i Ghibelli, 2014). Membranski antioksidansi djeluju na L-ROS, nastalih u lipofilnim sredinama membranskih sustava, a u njih ubrajamo vitamin E,  $\beta$ -karoten te koenzim Q. Glavna uloga vanstaničnih antioksidansa je održavanje iona željeza i bakra u nereaktivnim oblicima, te sprječavanje njihovog mogućeg međudjelovanja s  $O_2^-$  i  $H_2O_2$ , a među njih ubrajamo transferin, laktoferin, haptoglobin, hemopleksin, albumin, ceruloplazmin, EC-SOS, EC-GSHPx, bilirubin, urate i glukozu (Štefan i sur., 2007).

Nadalje, određene antioksidanse tijelo ne može sintetizirati te ih je potrebno unijeti prehranbenim proizvodima i dodacima prehrani, a tu spadaju vitamin C, tokoferoli, fenoli i karotenoidi.

**Tablica 2.** Smještaj i uloga prirodnih antioksidansa na djelovanje slobodnih kisikovih radikala (preuzeto i prilagođeno prema Štefan i sur., 2007)

| <b>Unutarstanični antioksidansi</b>      | <b>Uloge</b>  |
|--|---|
| Superoksid dismutaze                     | Katalitički uklanjaju superoksidne radikale   |
| Katalaza                                 | Uklanja vodikov peroksid kada je prisutan u velikim koncentracijama                                     |
| Glutation peroksidaze                    | Uklanjaju vodikov peroksid kada je prisutan u malim koncentracijama i uklanjaju organske hidroperokside |
| Citokrom oksidaze                        | Priječe oslobađanje aktivnih kisikovih spojeva tijekom redukcije molekularnog kisika u vodu             |
| <b>Membranski antioksidansi</b>          | <b>Uloge</b>  |
| Vitamin E                                | Antioksidacijsko djelovanje ostvaruje kidanjem lanaca   |
| B-karoten                                | Ima sposobnost uklanjanja singletnog kisika i slobodnih radikala  |
| Koenzim Q                                | Ima antioksidacijsko djelovanje u respiratornome lancu  |
| <b>Izvanstanični antioksidansi</b>       | <b>uloge</b>  |
| Transferin                               | Veže ione željeza   |
| Laktoferin                               | Veže željezo pri nižim vrijednostima pH   |
| Haptoglobin                              | Veže hemoglobin   |
| Hemopleksin                              | Veže hem  |
| Albumin                                  | Veže bakar, hem i uklanja hipokloritnu kiselinu   |
| Ceruloplazmin                            | Veže ione bakra, koristi vodikov peroksid za reoksidaciju bakra   |
| EC-SOD                                   | Katalitički uklanja superoksidni anion  |
| EC-GSHPx                                 | Katalitički uklanja hidroperokside  |
| Bilirubin                                | Uklanja peroksilne radikale   |
| Urati                                    | Uklanjaju radikale i vežu metale  |
| Glukoza                                  | Uklanja hidroksilne ione  |
| <b>Endogeni i egzogeni antioksidansi</b> | <b>Uloge</b>  |
| Glutation                                | Uklanja radikale, koristi se za konjugaciju, za regeneraciju askorbata te kao koenzim                   |
| Vitamin C                                | Uklanja slobodne radikale doniranjem elektrona, pri čemu nastaje slabo reaktivan askorбилni radikal     |
| Polifenoli                               | Uklanjaju slobodne radikale i vežu metalne ione   |
| Bilirubin                                | Uklanja peroksilne radikale   |

### 1.2.3 Mehanizam oksidacijskog stresa pri normalnim fiziološkim funkcijama i kod oštećenja biomolekula

U održivim razinama ROS se smatra bitnim za regulaciju normalnih fizioloških funkcija važnih za odvijanje staničnog ciklusa, proliferaciju, diferencijaciju, migraciju i staničnu smrt (Covarrubias i sur., 2008). ROS također igra važnu ulogu u imunološkom sustavu i održavanju redoks ravnoteže (Zhang i sur., 2016). Uloga ROS-a je i u aktivaciji različitih staničnih signalnih puteva i transkripcijskih faktora uključujući tumor supresor protein p53 koji održava stanicu živom i/ili potiče procese stanične smrti, poput autofagije i apoptoze. Apoptoza je visoko reguliran proces bitan za razvoj i opstanak višestaničnih organizama. Ti organizmi često moraju odbaciti suvišne ili potencijalno štetne stanice koje su nagomilale mutacije ili su zaražene patogenima. Apoptozu karakterizira skup morfoloških i biokemijskih značajki u kojima se zbivaju kaskadne reakcije samouništenja stanica. Stoga je pravilna regulacija procesa apoptoze bitna za održavanje zdravih stanica, a upravo je ROS glavni regulacijski put apoptoze posredovan mitohondrijima, receptorima smrti i endoplazmatskim retikulumom (Redza-Dutordoir i Averill-Bates, 2016). Oksidacijski stres, kojeg uzrokuje akumulacija ROS-a, manifestira se metaboličkom disfunkcijom, gubitkom funkcionalnih staničnih lipida i proteina, a dovodi i do nastanka genskih lezija, odnosno oštećenja DNA (Bhattacharjee, 2019).

Biomembrane su česta meta slobodnih radikala koji dovode do uništenja cjelovitosti membrana, odnosno lipidne peroksidacije. Dvostruka veza u masnim kiselinama oslabljuje vezu između atoma ugljika i vodika te time vodik postaje pogodnija meta ROS-u, a najpogođenije su PUFA. Lipidna peroksidacija je proces u kojem, najčešće  $\text{OH}^\bullet$ , ali i druge vrste ROS-a, uklanjaju elektrone iz metilenske skupine ( $-\text{CH}_2-$ ) lipida čime se molekula lipida oksidira. Najmnogobrojniji i najreaktivniji produkti lipidne peroksidacije su lipidno-reaktivne kisikove vrste (L-ROS), a također nastaju i međuproizvodi, poput aldehida, ketona, ugljikovodika, epoksida i aktivnih radikala. Intenzivna lipidna peroksidacija može dovesti do gubitka fluidnosti biomembrana, opadanja vrijednosti membranskog potencijala, povećanja permeabilnosti prema  $\text{H}^+$  i drugim ionima te do puknuća stanice (Štefan i sur., 2007). Oksidirani lipidi mogu igrati važnu ulogu u mnogim upalnim bolestima (Su i sur., 2019), dok peroksidacija može djelovati i kao signal programirane stanične smrti, a novija istraživanja pokazuju da uzrokuje i ferroptozu (Dixon i sur., 2012). Zbog toga su mnoge tehnike prilagođene dokazivanju oštećenja lipida prilikom staničnog stresa u različitim patološkim stanjima, a ustanovljeno je da tkiva s poremećajima brže nakupljaju L-ROS i ulaze u lipidnu peroksidaciju. Najčešće korištena metoda određivanja lipidne peroksidacije je mjerenjem količine molekula nastalih lipidnom

peroksidacijom, npr. malondialdehida (engl. *malondialdehyde*, MDA) (Štefan i sur., 2007), ali i mjerenjem drugih reaktivnih spojeva s tiobarbiturnom kiselinom (Domitrović i sur., 2006). MDA se u fiziološkim uvjetima nalazi u obliku enolatnog iona koji reagira s proteinima, pokazujući veliki afinitet prema lizinskom aminokiselinskom ostatku. MDA također može reagirati s bazom gvanin u DNA čime nastaju mutagena oštećenja. U organizmu MDA se metabolizira do malonatne kiseline koja je kompetitivni inhibitor mitohondrijske sukcinat dehidrogenaze. Prirodni antioksidansi poput tokoferola i manitola priječe nastanak lipidne peroksidacije (Štefan i sur., 2007).

ROS uzrokuje modifikacije aminokiselina izravnim ili neizravnim putem. Izravni put modifikacije uključuje modulacije aktivnosti proteina putem nitrozilacije, karbonilacije, stvaranja disulfidnih veza i glutationilacije. Neizravna modifikacija uključuje konjugaciju proteina s produktima lipidne peroksidacije (Yamauchi i sur., 2008). Aminokiseline se razlikuju prema osjetljivosti, a najosjetljivije su aminokiseline koje sadrže sumpor i tiolne skupine. Aktivirani kisik uklanja vodik iz tiola prilikom čega se aminokiselina oksidira, a nastaju tiolni radikali. Tiolni radikali ulaze u reakcije s kisikom što dalje pospješuje oksidaciju cisteinskih ostataka (Herb i Schramm, 2021). Akumulacije ROS-a također uzrokuju prijelome peptidnih lanaca, umrežavanje proteina (engl. *cross linking*), promjene električnog naboja peptida te osjetljivost proteina na proteolizu (Sharma i sur., 2012). Pri određivanju staničnog protein-redoks statusa mnogo je značajnije detektirati ukupnu koncentraciju tiola nego glutationa obzirom da oni predstavljaju veći redoks kapacitet (Held i Gibson, 2012).

Oštećenja je moguće uočiti i na DNA, a ona uključuju modifikacije, najčešće oksidacije DNA, cijepanje vodikovih veza, uklanjanje nukleotida, razne modifikacije baza i umrežavanje DNA proteina (Redza-Dutordoir i Averill-Bates, 2016). Oštećenja na DNA mogu rezultirati promjenama u kodiranim proteinima što može dovesti do neispravnosti ili potpune inaktivacije tih proteina (Dizdaroglu i Jaruga, 2012). Oksidacija baza podrazumijeva reakciju  $\text{OH}^\bullet$  s dvostrukim vezama purinskih, pirimidinskih baza te s DNA okosnicom. Najčešći produkt oksidacije baza je 8-hidroksigvanozin (engl. *8-hydroxyguanosine*, 8-OH-G). Oštećenja DNA također uključuju i različite mutagene promjene, primjerice mutacije CpG otoka ukazuju na djelovanje ROS-a na DNA (Dizdaroglu i Jaruga, 2012). Oksidacija šećera je rjeđa, a slobodni radikali nastali Fentonovom reakcijom zahvaćaju vodik iz deoksiriboze što najčešće dovodi do prekida lanca i stvaranja deoksiriboznog radikala (Evans i sur., 2004). Također, oštećenja mogu nastati i na DNA proteinima što dovodi do njihovog umreženja, a to može dovesti do smrti stanice. Mitohondrijska DNA podložnija je oksidacijskom stresu od jezgrine DNA zbog

nedostataka zaštitnih faktora i zbog neposredne blizine sustava u kojima se najčešće proizvodi ROS. Iako jezgra sadrži sustav popravka oštećene DNA, prekomjerne promjene uzrokovane ROS-om dovode do trajnog oštećenja DNA s potencijalno štetnim učincima na stanicu i organizam (Sharma i sur., 2012).

### 1.3 Inhalacijski anestetici

Inhalacijski anestetici su opojni lijekovi tekućeg i plinovitog stanja koji u organizam ulaze disanjem, a zatim difuzijom kroz alveo-kapilarnu membranu prelaze u krvotok, dopremajući se do ciljanih organa i središnjeg živčanog sustava (Deile i sur., 2013). Početkom suvremene anestezije smatra se 1846. godina kada je William Morton demonstrirao upotrebu etera kao prvog inhalacijskog anestetika (Katzung i sur., 2012). Iako zapaljiv, eter je predstavljao standardni opći anestetik sve do 1960-ih, premda je uzrokovao mnoge nuspojave poput postoperativne mučnine i povraćanja (Chang i sur., 2015). Od otkrića etera, slijedi razvoj anestezije, a 150 godina kasnije uvode se inhalacijski anestetici koji su po kemijskom sastavu halogeni eteri.

Uloga inhalacijskih anestetika je uvod i održavanje opće anestezije prilikom izvođenja operacijskih zahvata, a unošenje se vrši inhalacijom. Više čimbenika određuje terapijski indeks, a doza i učinak anestetika iskazuje se putem minimalne alveolarne koncentracije (engl. *minimum alveolar concentration*, MAC). MAC izražava koncentraciju anestetika u volumnom postotku (%) koja kod 50% pacijenata uzrokuje neodgovor na podražaj. MAC također ukazuje na količinu parcijalnog tlaka anestetika u mozgu pacijenata (Ehrenwerth i sur., 2020). Topljivost je jedan od najvažnijih čimbenika koji utječu na prijenos anestetika iz pluća u arterijsku krv, a definira relativni afinitet anestetika za krv. Vrijeme oporavka od anestezije najviše ovisi o brzini uklanjanja anestetika iz mozga, a ovisi i o topljivosti anestetika u krvi, plućnom protoku krvi, veličini ventilacije i topljivosti anestetika u tkivima. Trajanje izloženosti anestetiku također ima značajan utjecaj na vrijeme oporavka osobito u slučaju topljivih anestetika, primjerice izoflurana. Nakupljanje anestetika u mišićima, koži i masnom tkivu povećava se s produljenom izloženosti (Katzung i sur., 2012). Međutim, ni danas nisu u potpunosti razjašnjeni svi mehanizmi kojima inhalacijski anestetici vrše anesteziju kod životinja i ljudi unatoč njihovoj širokoj kliničkoj uporabi.

Nijedan od trenutno dostupnih halogenih anestetika nije idealno prilagođen svojoj funkciji, a često su zabilježeni njihovi negativni učinci i toksičnost ovisno o danoj dozi (Deile i sur., 2013). Metaboliti inhalacijskih anestetika izazivaju: 1) akutnu toksičnost, koja uključuje

trovanje ugljičnim monoksidom, nefrotoksičnost i hepatotoksičnost te 2) kroničnu toksičnost koja uključuje hematotoksičnost, teratogene učinke i rak (Deile i sur., 2013). Toksični metaboliti nastaju putem nekoliko mehanizama: 1) unutarstaničnim nakupljanjem metabolita, 2) stvaranjem haptena koji mogu dovesti do hiperosjetljivosti i imunoreakcije, i 3) stvaranjem reaktivnih metabolita koji dovode do nastanka slobodnih radikala. Vezanjem reaktivnih metabolita inhalacijskih anestetika za proteine tkiva nastaju hapten-protein konjugati. Nadalje, konjugati mogu sintetizirati specifična protutijela te prouzrokovati imunološki odgovor (Brozović i sur., 2006). Tek se posljednjih godina istražuju ne-anesteziološka obilježja inhalacijskih anestetika. Pojedinačna istraživanja pokazala su zaštitni učinak anestetika na određene organe kod pacijenata s ishemijom istih, a otkriće prozvali anestezijskim pred- i postkondicioniranjem ovisno o trenutku primjene anestetika naspram nastale ishemije organa (Shiraishi i sur., 2019; Yamamoto i sur., 2020). Time se stvara potreba novih istraživanja o toksičnim i protektivnim utjecajima na organe i procese u organizmima.

Eliminacija inhalacijskih anestetika iz tijela vrši se 1) izdisanjem u nepromijenjenom obliku te 2) izlučivanjem i metabolizmom. Metabolizira se samo 2-5% udahnutog anestetika (Khan i sur., 2014), a uključuje: 1) kataboličke reakcije faze I, odnosno reakcije hidrolize, 2) reakcije oksidacije i 3) anaboličke reakcije faze II koje uključuju dodavanje glukuronilne ili metilne skupine. Oksidacijskim metabolizmom, odnosno procesom biotransformacije posredovane enzimom iz obitelji citokrom oksidaza CYP, ponajviše CYP2E1, odnosno citokrom P450 2E1 (Nair, 2019), u jetri, bubrezima i plućima nastaju tzv. toksični metaboliti anestetika. Biotransformacijom većine halogenih anestetika nastaju trifluorooctena kiselina i fluoridni ioni (Torri, 2010), dok biotransformacijom sevoflurana nastaje heksofluoroizopropanol te rezultira najvišom razinom serumskog fluoridnog iona od trenutno dostupnih anestetika (Gallego i sur., 2015). U posljednje vrijeme ispituju se njihova potencijalna hepatotoksična i nefrotoksična djelovanja (Torri, 2010), a krajnji se proizvodi metabolizma izlučuju putem bubrega, jetre ili pluća (Nair, 2019).

### 1.3.1 Mehanizam djelovanja inhalacijskih anestetika

Prema knjizi *Miller's Anesthesia* (2021), mehanizmi djelovanja inhalacijskih anestetika klasificiraju se kao: 1) makroskopski, djelovanje na mozak i leđnu moždinu, 2) mikroskopski, djelovanje na sinapse i aksone i 3) molekularni, djelovanje na pre- i postsinaptičke membrane.

Budući da su gotovo svi inhalacijski anestetici topljivi u lipidima, u ranim fazama istraživanja dominantna teorija o mehanizmu njihovog djelovanja bila je Meyer-Overtonova teorija (Hao i sur., 2020). Teorija govori o djelovanju anestetika na modulaciju funkcija lipidnih



dvosloja, odnosno membrana živčanih stanica čime dolazi do promjena u konformaciji membranskih proteina, poput ionskih kanala, receptora i prijenosnika (Herold i sur., 2017). Međutim, klinički značajne koncentracije anestetika minimalno utječu na svojstva lipida, a značajno ometaju djelovanje mnogih molekularnih puteva čime navedena teorija ne objašnjava mnoge farmakološke učinke inhalacijskih anestetika (Hao i sur., 2020).

Kako bi anestetici mogli vršiti farmakološke radnje, poput amnezije, hipnoze, nesvijesti, nepokretnosti i analgezije, većina njih potiskuje ekscitacijski i povećava inhibicijski prijenos akcijskih potencijala, a najvažnije mjesto djelovanja je središnji živčani sustav (engl. *central nervous system*, CNS). Anestetici potiskuju ekscitacijsku neurotransmisiju modulirajući receptore glutamata i acetilkolina, dok potiču inhibiciju glicina i receptora gama-aminomaslačne kiseline tipa A (engl. *gamma-aminobutyric acid type A receptor*, GABA<sub>A</sub>) (Ikemoto i sur., 1998). Najvažniji ekscitacijski neurotransmiter CNS-a je glutamat kojeg otpušta presinaptički neuron u sinaptičku pukotinu. Vezanjem glutamata za ionotropni glutamatni (engl. *N-methyl D-aspartate*, NMDA) receptor na postsinaptičkom neuronu, dolazi do ulaska Ca<sup>2+</sup> iona u stanicu neurona što uzrokuje ekscitaciju signala. Inhalacijski anestetici moduliraju navedeni put tako da inhibiraju ekscitaciju akcijskog potencijala. Izofluran djeluje na presinaptički neuron smanjujući količinu oslobođenog glutamata (Eilers i sur., 1999), a sevofluran na postsinaptički neuron djelujući na NMDA receptore (Brosnan i Thiesen, 2012). Novija istraživanja pokazuju da se mehanizam inhibicije NMDA receptora postiže blokiranjem specifičnih presinaptičkih Na<sup>+</sup> i Ca<sup>2+</sup> kanala (Hao i sur., 2020). GABA<sub>A</sub> je jedan od najvažnijih inhibitornih receptora CNS-a, a predstavljaju ionotropne kloridne kanale koji povećavanjem vodljivosti Cl<sup>-</sup> iona dovode do hiperpolarizacije stanične membrane i inhibicije postsinaptičke neuronske ekscitabilnosti, odnosno smanjenja neuronske aktivnosti (Khan i sur., 2014), a izofluran dokazano potiče navedeno inhibitorno djelovanje. GABA<sub>A</sub> receptori α1β1γ2 konfiguracije pokazuju najveću modulaciju i djelovanje izofluranom, a α2β1γ2 konfiguracija pokazuje srednju modulaciju izofluranom (Jedlicka i sur., 2021). Također, izofluran i sevofluran dokazano moduliraju nikotinski acetilkolin receptor. Ovisno o dozi, anestetici se vežu na α4β2 i α3β4 podjedinice receptora acetilkolina čime se postiže blokada mišićne kontrakcije te se moduliraju funkcije CNS-a uključujući stvaranje memorije (Hao i sur., 2020). Izofluran se može vezati i u pore ionskih kanala, blokirajući ionske struje (Jedlicka i sur., 2021).

### 1.3.2 Izofluran

Izofluran, (2-kloro-2-(difluorometoksi)-1,1,1-trifluoroetan, CHF<sub>2</sub>-O-CHCl-CF<sub>3</sub>), je hlapljiv halogenirani eterski spoj, strukturni izomer enflurana, koji se zbog svog oštrog mirisa

i inertnosti često ne koristi za indukciju već prilikom održavanja opće anestezije. Nakon što je opovrgnuto istraživanje Nacionalnog instituta za rak 1976. godine o kancerogenosti izoflurana, Federalna uprava za lijekove odobrila je i uvela izofluran u kliničke upotrebe. MAC izoflurana je 1,17%, a koeficijent topljivosti u krvi iznosi 1,4 radi čega su potrebne manje količine izoflurana prilikom održavanja anestezije. Glavna uloga izoflurana postiže se njegovim različitim mehanizmima djelovanja. Najosnovniji mehanizam je inhibicija receptora GABA, NMDA i glutamata te djelovanje poput neurotransmitera glicina u CNS-u smanjujući neuronsku aktivnost čime se postižu amnezija i sedacija. Osim na CNS, izofluran djeluje i na druge organske sustave gdje postiže specifične toksične ili zaštitne učinke (Jones i sur., 1992). Više od 99% primijenjenog anestetika izdahne se plućima, a ostatak se metabolizira u toksične metabolite (Arıcı i sur., 2013). Izofluran prolazi minimalni metabolizam u jetri (0,2%), a glavna metabolizma odvija se putem enzima CYP2E1, dok biotransformacijom izoflurana nastaju trifluorooctena kiselina i fluoridni ion (Torri, 2010; Brozović i sur., 2017). Ovisno o dozi, također uzrokuje smanjenje renalnog i hepatalnog protoka krvi (Katzung i sur., 2012).

### 1.3.3 Sevofluran

Sevofluran, (fluorometil-2,2,2-trifluoro-1-(trifluorometil) etil eter) halogenirani metil-izopropil eter, strukturni izomer enflurana, koji je zbog slatkastog mirisa i niže respiratorne oštine od izoflurana odobren od strane američke Agencije za hranu i lijekove kod indukcije i održavanja opće anestezije u odraslih i pedijatrijskih pacijenata. Za razliku od izoflurana, koeficijent topljivosti u krvi je niži te iznosi 0,65, što znači da je njegova razina u krvi niža zbog čega se lakše eliminira iz mozga. Time se anestezija postiže brže, a oporavak je također brži u odnosu na izofluran (Katzung i sur., 2012; Lee i sur., 2015; Rocha i sur., 2015). MAC sevoflurana je veći od izoflurana, a iznosi 2,05% što ukazuje na veću dubinu anestezije naspram danog volumena. Iako se ne zna točan mehanizam kojim sevofluran osigurava hipnozu, amneziju, analgeziju, akineziju i blokiranje autonomnih centara, trenutno se smatra kako je za to odgovorna njegova moć inaktivacije postsinaptičkog GABA i glicin receptora te inaktivacije NMDA, nikotinskog, acetilkolinškog, serotoninškog i glutamatnog receptora u CNS-u. Osim na CNS, sevofluran djeluje i na druge organske sustave gdje postiže specifične toksične ili protektivne učinke. Respiratorne nuspojave sevoflurana vrlo su rijetke, osim kod pacijenata s već postojećom plućnom patologijom poput astme, kronične opstruktivne plućne bolesti i cistične fibroze (Campagna i sur., 2003; Mapelli i sur., 2021). Veći dio sevoflurana (5%), za razliku od izoflurana, prolazi metabolizam u jetri (Brozović i sur., 2017) putem više enzima iz obitelji CYP (CYP2A6, CYP2B6, CYP3A4, CYP2E1) (Fernández-Meré i sur., 2008).

Biotransformacijom sevoflurana nastaju anorganski fluoridni ioni i heks fluoroizopropanol, no zbog brze glukuronizacije i izlučivanja urinom, toksična djelovanja nisu povezana uz nastale upale nakon zahvata (Gallego i sur., 2015). Spoja A, nastao iz fluoridnih iona, potencijalno može izazvati oštećenja bubrega, međutim klinički znakovi nefrotoksičnosti nisu zabilježeni na ljudima, a smatra se kako to ovisi o dozi i vremenu izloženosti anestetiku (Gentz i Malan, 2001; Brozović i sur., 2017). Mnoga istraživanja bazirala su se tražeći protuupalne i/ili proupalne učinke inhalacijskih anestetika, a Yang i suradnici (2019) dokazali su kako je sevofluran, za razliku od izoflurana, prikladniji za korištenje zbog većih inhibitornih učinaka na upalne citokine i oksidacijski stres u životinjskim modelima s ozljedom jetre, no potrebno je još mnogo istraživanja na životinjskim modelima i ljudima kako bi se potvrdio mehanizam tih učinaka i rezultata (Yang i sur., 2018).

#### *1.3.3.1 Učinci metabolita izoflurana i sevoflurana na periferne organe*

Inhalacijski anestetici značajno djeluju na respiratorni sustav smanjujući respiracijski volumen i povećavajući frekvenciju disanja što dovodi do brzog plitkog disanja i smanjenja alveolarne ventilacije. Povećana frekvencija disanja ne nadoknađuje smanjenu alveolarnu ventilaciju jer se prvenstveno udiše mrtvi prostor, a posljedično raste PaCO<sub>2</sub>. Respiratornu depresiju dodatno potiče smanjenje osjetljivosti respiratornog centra na CO<sub>2</sub> što je također posljedica inhalacijskih anestetika (Khan i sur., 2014), a nastaje sustavna hipoksija. Kod duže primjene anestetika, respiratornu depresiju dodatno potiče i atelektaza dišnih puteva koja se razvija zbog smanjene mukocilijarne funkcije bronha u toku djelovanja anestetika, pri čemu dolazi do nakupljanja sluzi i začepljenja dišnih puteva. Iako svi anestetici do određene mjere kompenziraju nastalu hipoksiju bronhodilatacijom, iritacija dišnih puteva izazvana izofluranom pojačat će stupanj hipoksije u usporedbi sa sevofluranom (Katzung i sur., 2012).

Biotransformacijom izoflurana nastaju vrlo male količine trifluoroacetata, 0,2%, koja djelujući na jetrene proteine stvara kompleks koji može inducirati imunološki odgovor posredovan T stanicama što rezultira hepatitisom. No, koncentracije nastalih toksičnih metabolita iz izoflurana rijetko mogu izazvati jetrena oštećenja zbog njegovog sporog metabolizma i brzog izlučivanja toksičnih metabolita urinom (Khan i sur., 2014). Za razliku od trifluoroacetata, heks fluoroizopropanol ima manju sposobnost vezanja jetrenih proteina zbog čega sevofluran ima još niži hepatotoksični potencijal (Soubhia i sur., 2011), a u mnogim slučajevima nije ni zabilježen (Khan i sur., 2014).

Međutim, veće količine anorganskog fluoridnog iona, koji nastaje brzom biotransformacijom sevoflurana, dovodi do nastanka trifluorometil vinil etera, tzv. spoja A, koji

se često povezivao s oštećenjima bubrega te se sevofluran smatrao nefrotoksičnim u štakora (Anders, 2005; Rocha i sur., 2015). Klinički znakovi nefrotoksičnosti nisu uočeni prilikom primjene sevoflurana u ljudi (Brozović i sur., 2017), no određeni korišteni biljezi pokazuju nedosljednost prilikom određivanja nefrotoksičnosti. Biljezi, poput kreatinina ili dušika uree u krvi, ne procjenjuju moguće bubrežne ozlijede tubularne funkcije i glomerularne filtracije. Eger i suradnici (1997) ukazuju na nekonzistentnost nabrojanih biljega u svom istraživanju gdje su volonterima, obrađenim propisanim dozama sevoflurana, određene prolazne disfunkcije nefrona iako su pokazivali normalne razine kreatinina i dušika uree u krvi. Iako biotransformacijom izoflurana nastaju vrlo male količine anorganskog fluorida zbog sporog metabolizma, velik broj istraživanja prikazuje kontradiktorne rezultate prilikom ispitivanja njegove nefrotoksičnosti (Khan i sur., 2014).

Danas se sve češće raspravlja o potencijalnoj neurotoksičnosti inhalacijskih anestetika. Godine 2016. američka Uprava za hranu i lijekove izdala je upozorenje na produljenu (veću od 3 sata) ili ponovljenu uporabu inhalacijskih anestetika prilikom induciranja opće anestezije kod djece mlađe od 3 godine i trudnica u zadnjem tromjesečju (*Center for Drug Evaluation and Research*). Cilj mnogih studija, rađenih na skotnim ženjkama i novorođenim laboratorijskim životinjama, bio je utvrditi apoptozu neurona, inhibiciju neurogeneze ili funkciju neuronskih sinapsi koje dovode do neuronske disfunkcije ili poremećaja neurološkog razvoja prilikom izloženosti visokim razinama anestetika. No, takva istraživanja nisu uspješno provedena na ljudima, a u meta-analizama nedostaje usporedivost zbog različitosti karakteristika grupe. Time moguća neurotoksičnost ostaje neriješeno pitanje (Jedlicka i sur., 2021).

#### *1.3.3.2 Protuupalni učinci izoflurana i sevoflurana*

Istraživanja potvrđuju kako inhalacijski anestetici izofluran i sevofluran posjeduju zaštitna svojstva koja se pripisuju protuupalnim ili antiapoptotičkim djelovanjima. Predkondicioniranje izofluranom i sevofluranom ima preventivne učinke na razvoj ishemije u štakora tako što smanjuju razine posrednika upalnih reakcija i oksidacijskog stresa, povećavaju razine antioksidacijskih enzima te smanjuju apoptozu stanica regulacijom gena vezanih uz staničnu smrt (Bedirli i sur., 2012). Zabilježeno je da izofluran u dozi do 3% smanjuje kontrakciju miokarda i oksidacijski stres te ublažava simptome srčanih bolesti kod Zuckerovih štakora (Shen i sur., 2014). Protuupalni učinci anestetika zabilježeni su i prilikom postkondicioniranja nakon namjerno inducirane upalne reakcije određenim proupalnim supstancama. Jedana od proupalnih supstanci je zymosan, a rezultati istraživanja pokazali su povećanu stopu preživljavanja Zuckerovih štakora s 10% na 45%, nakon primjene

subanestetičke doze izoflurana od 0,7%. Rezultati su također pokazali smanjenu upalnu reakciju, a razine superoksid dismutaze i katalaze u krvi i plućnom tkivu bile su povećane što odgovara jačanju prirodnog antioksidacijskog sustava u tih miševa (Mu i sur., 2010). U drugom istraživanju doza izoflurana od 1,4% je smanjila razine interleukina 1 beta (engl. *interleukin 1 beta*, IL-1 $\beta$ ), IL-6, čimbenik nekroze tumora 1 alfa (engl. *tumor necrosis factor 1 alpha*, TNF-1 $\alpha$ ), upalnog proteina makrofaga 2, enzima sintaze dušikovog oksida i NF- $\kappa$ B u laboratorijskih miševa. Također, apoptoza plućnih stanica u tih miševa bila je inhibirana (Li i sur., 2013). Osim zymosana, LPS također služi u poticanju upalne reakcije u životinjskim modelima, a štakori obrađeni LPS-om i sevofluranom (1 MAC) pokazali su značajno snižene razine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i interleukina 10 (engl. *interleukin 10*, IL-10), u odnosu na kontrolu obrađenu samo LPS-om (Hofsteter i sur., 2007). U mišjem modelu sepse izazvane podvezivanjem i probijanjem cekuma (engl. *cecal ligation puncture*, CLP) zabilježen je učinak sevoflurana (1,2 MAC) na smanjenje razine IL-6 i povećanjem stope preživljavanja do 89% (Herrmann i sur., 2013). U istraživanju modela sepse izazvane CLP-om na štakorima, utvrđeno je da prethodna obrada 2% sevofluranom značajno povećava stopu preživljavanja sedmog dana nakon CLP-a za 75%, a obrada 1,5% izofluranom za 38%. Nakon obrade tih štakora s oba anestetika, rezultati pokazuju smanjene razine TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-1 $\beta$ , dušikovog oksida i MDA te povećani ukupni antioksidacijski kapacitet; sevofluran je pokazao veći protuupalni učinak i antioksidacijski kapacitet od izoflurana (Bedirli, Demirtas i sur., 2012). U slučaju modela transplantacije jetre, sevofluran se pokazao antioksidacijskim smanjivši lipidnu peroksidaciju u serumu obrađenim tiobarbituratnom kiselinom (Molin i sur., 2014).

Protuupalni učinci izoflurana i sevoflurana također su uočeni i na ljudima. Sve veći broj istraživanja ukazuje na sigurnost izoflurana i sevoflurana obzirom na oksidacijski stres i upalnu reakciju u pacijenata koji se podvrgavaju manjim operacijskim zahvatima. Rezultati istraživanja, nakon manjih operacijskih zahvata prilikom kojih su korišteni 1,9% sevofluran i 1,2% izofluran, nisu utvrdili posljedična DNA oštećenja u limfocitima i tkivima pacijenata (Braz i sur., 2011). Orosz i suradnici (2014) također su dokazali sigurnost 1,9% sevoflurana prilikom mjerenja DNA oštećenja i lipidne peroksidacije u pacijenata izloženim minimalnom operacijskom zahvatu.

No, potrebno je objediniti meta-analize s podacima pacijenata koji se podvrgavaju većem broju težih operacija i duljem izlaganju anestetika, te također uzeti u obzir aspekte, poput genske predispozicije i popratnih bolesti kako bi se odredila sigurnost izoflurana i sevoflurana, obzirom na oksidacijski stres i upalnu reakciju u tih pacijenata.

### 1.3.3.3 Proupalni učinci izoflurana i sevoflurana

Već se desetljećima pojavljuju kontroverzni rezultati koji potvrđuju i proupalne učinke anestezije, a razlog tome smatra se kako vrsta i trajanje opće anestezije također utječu na opseg perioperativne upale (Lee i sur., 2015). Dokazalo se da izloženost izofluranu može izazvati neurotoksičnost povezanu s neuropatogenezom Alzheimerove bolesti, uključujući nakupljanje  $\beta$ -amiloida i fosforilaciju Tau proteina, te uzrokovati deficite u ponašanju (Ni i sur., 2016). Dong i suradnici (2013) su istražujući mehanizme neuroupale pokazali da izofluran inducira aktivaciju kaspazi i nakupljanje  $\beta$ -amiloida, što dovodi do lakše endocitoze sinaptičkih NMDA receptora i kroničnog oštećenja u učenju i pamćenju. Nadalje, pokazalo se da izofluran modulira i otvara krvno-moždanu barijeru povećavajući prodiranje tvari u moždano tkivo.

Povećana koncentracija fluorida koji se smatra biomarkerom nefrotoksičnosti, a nastaje kao konačni produkt metabolizma sevoflurana, dokazano inhibira prirodni antioksidacijski sustav i umanjuje obranu od ROS-a. Također je dokazano da fluorid potiče stvaranje ROS-a u leukocitima zbog čega neki autori smatraju da je sevofluran sposoban proizvesti  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^-$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$  te pridonijeti lipidnoj peroksidaciji (Minguet i sur., 2017; Lee i sur., 2015), što dovodi do još većeg slabljenja antioksidacijskog sustava u više vrsta tkiva. Druga istraživanja podupiru te tvrdnje čiji rezultati pokazuju povećanu oksidaciju lipida i proteina nakon primjene sevoflurana kao inhalacijskog anestetika (Orhan i sur., 2012). Nadalje, prilikom izlaganja pacijenata 2% sevofluranu rezultati pokazuju povećano oštećenje DNA i smanjeni sadržaj glutaciona u perifernim limfocitima i drugim tkivima (Allewa, 2003).

## 1.4 Teški metali

Teški metali su anorganski elementi čija je gustoća veća od  $5\text{g/cm}^3$  (Järup, 2003). Temeljem njihove toksičnosti, razvrstani su u dvije skupine: 1) esencijalni teški metali, manje opasni pri niskim koncentracijama (cink, bakar, željezo i kobalt) i 2) neesencijalni teški metali, otrovni čak i pri vrlo niskim koncentracijama (kadmij, živa, arsen i krom) (Kim i sur., 2019). Esencijalni teški metali kofaktori su mnogih bioloških procesa, primjerice u iskorištavanju kisika, rastu stanica, brojnim enzimskim reakcijama, sintezi mnogih biomolekula, a sudjeluju i u imunološkim reakcijama (Cassat i Skaar, 2013). Homeostaza esencijalnih teških metala regulirana je sustavom proteina prijenosnika koji reguliraju njihovu apsorpciju, raspodjelu, skladištenje i izlučivanje iz tijela. Osim toga, organeli poput peroksisoma i mitohondrija služe kao spremnici metalnih iona i doprinose njihovoj ukupnoj homeostazi (Bleackley i MacGillivray, 2011).

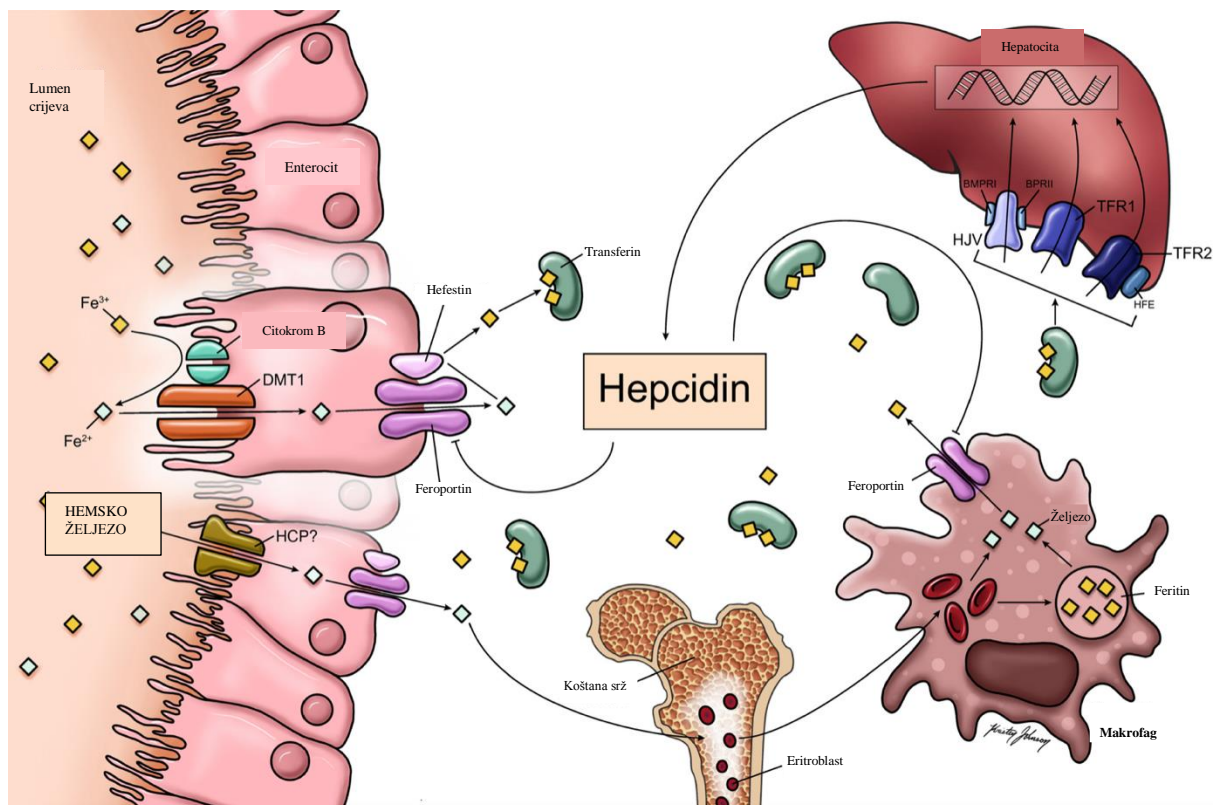
Poremećaj homeostaze metalnih iona može izazvati oksidacijski stres, odnosno povećano stvaranje ROS-a čime se nadjača prirodna antioksidacijska zaštita. Posljedice poremećaja homeostaze vide se i kod oštećenja DNA, peroksidacije lipida, modifikacije proteina, a u konačnici može doći i do apoptoze ili nekroze stanica (Fu i Xi, 2019). Nakupljanje teških metala ima važnu ulogu u etiologiji različitih kroničnih stanja, uključujući kroničnu upalu, rak, bolesti srca i krvožilnog sustava, poremećaje metabolizma šećera, ateroskleroze i neuroloških poremećaja poput Alzheimerera i Parkinsona (Jomova i Valko, 2011).

#### 1.4.1 Željezo u organizmu

Željezo je esencijalni prijelazni metal uključen u veliki broj biološki važnih reakcija u svim oblicima života. U ljudskom organizmu, oko 65% željeza vezano je za hemoglobin, 10% sastavni je dio mioglobina, citokroma i ostalih enzima koji sadrže željezo, a 25% vezano je u obliku feritina i hemosiderina u hepatocitima i makrofagima RES-a kao rezervno željezo (Cheng i Li, 2007). Mali dio željeza uvijek je vezan za plazmatski prijenosni protein transferin, no prijenosni sustav je vrlo dinamičan te se konstantno izmjenjuje (Udipi i sur., 2012). Homeostaza željeza na sustavnoj razini regulirana je povratnom spregom hepcidin-feroportin te brojnim prijenosnicima koji vežu slobodno željezo u tijelu i reguliraju njegovu apsorpciju, korištenje, skladištenje i recikliranje (Bogdan i sur., 2016; Čepelak i sur., 2020). Na staničnoj razini homeostaza je regulirana posttranskripcijskim mehanizmom posredovanim regulatornim proteinima željeza (engl. *iron regulatory proteins*, IRP) i željezo-odgovornim elementima (engl. *iron responsive elements*, IRE) (Cheng i Li, 2007). Proteini IRP vežu feritinsku i transferinsku mRNA regulirajući njihovu translaciju, a time metabolizam željeza (Zhou i Tan, 2017). Budući da nije poznat način reguliranog izlučivanja željeza iz tijela putem bubrega, sama apsorpcija strogo se kontrolira na sustavnoj i staničnoj razini kako bi se osigurala pravilna ravnoteža između optimalne i toksične razine željeza (Udipi i sur., 2012).

Željezo u namirnicama dolazi u dva oblika, kao hemsko i nehemsko željezo. Kako bi se nehemsko željezo apsorbiralo, slobodno željezo mora biti u reduciranom obliku,  $\text{Fe}^{2+}$ , čime se svi netopljivi nevezani  $\text{Fe}^{3+}$  ioni, u lumenu crijeva preko duodenalnog citokroma B, reduciraju do  $\text{Fe}^{2+}$  iona ili se izravno apsorbira vezano za proteine poput hema. Apsorpcija iona se odvija preko intestinalnih stanica, enterocita, gdje se putem prijenosnika za dvovalentne ione metala (engl. *divalent metal transporter 1*, DMT1) ioni željeza aktivno prenose. Mehanizam prijenosa hema u stanice enterocita odvija se endocitozom posredovanom receptorima. U enterocitima se željezo može pohraniti kao feritin ili kroz bazolateralnu membranu preko feroportina ući u cirkulaciju. Prilikom izlaska iz enterocita, željezo se pomoću hefestina oksidira u  $\text{Fe}^{3+}$  te se u

krvi veže za nosač transferin,  $\text{Fe}_2\text{Tf}$ . Transferin je protein sintetiziran u jetri, a veže do dva iona željeza. Jednom vezano za transferin, željezo putuje kroz cirkulaciju gdje ga preuzimaju razni organi za različite procese. Unos  $\text{Fe}_2\text{Tf}$  u stanice odvija se endocitozom dva kompleksa željeza s transferinom posredovanom transferinskim receptorima TfR1 i TfR2. Promjene u pH endosomu uzrokuju odvajanje željeza od transferina, a nakon redukcije feri-reduktazom u  $\text{Fe}^{2+}$ , izlazi u citosol putem receptora DMT1. Razine željeza u plazmi konstantno su nadgledane i regulirane, a o njima ovisi daljnji put željeza. Hrana osigurava samo 1-2 mg željeza dnevno, dok je dnevna potražnja 20-25 mg, a većina se ostvari putem recikliranja iz starih eritrocita obrađenih retikulo-endotelnim sustavom. Makrofagi prisutni u jetri, slezeni i koštanoj srži fagocitiraju stare eritrocite, a hem se katalizira hem-oksigenazom. Oslobođeno željezo iz hema se ponovo koristi u metaboličke svrhe ili se skladišti u obliku feritina u jetri ovisno o trenutnim razinama željeza u krvi. Mobilizacija željeza iz enterocita, makrofaga i hepatocita isključivo je regulirana razinama hormona hepcidina koji djeluje preko transmembranskog proteina feroportina (Slika 4) (Mackenzie i sur., 2008; Udipi i sur., 2012; Silva i Faustino, 2015).



**Slika 4.** Prikaz hepcidin-feroportin povratne sprege i uloge hepcidina kao glavnog regulatora u apsorpciji, spremanju i mobilizaciji željeza. Na razine željeza u plazmi utječu apsorpcija željeza u dvanaesniku, te zalihe željeza u hepatocitima i makrofagima RES-a. Nehemsko željezo prvo putem citokroma B prelazi iz  $\text{Fe}^{3+}$  u  $\text{Fe}^{2+}$  oblik, a zatim preko receptora DMT1 prelazi u enterocite, gdje se posprema ili putem feroportina odlazi u krvotok.



#### Nastavak Slike 4.

Prilikom izlaska iz enterocita, željezo se pomoću hefestina oksidira u  $\text{Fe}^{3+}$  te se u krvi veže za nosač transferin. Hemsko željezo u dvanaesniku je već vezano za proteinski nosač te se ono izravno apsorbira i prelazi u krvotok. Željezo osigurava eritropoezu u koštanoj srži određenih kostiju, a makrofagi RES-a akumuliraju željezo istrošenih eritrocita vežući ga za feritin. Prilikom procesa eritropoeze, makrofagi RES-a potiču stvaranje novih eritrocita na način da kroz feroportin otpuštaju spremljeno željezo i povećavaju razine željeza u krvi. Glavni regulator razine željeza u krvi je hormon hepcidin kojeg proizvode hepatociti. Hepcidin, putem signalnih puteva BMP/SMAD/HJV/BMPRI i -II i TfR1/TfR2/HFE osjeća povećane razine željeza u krvi, a kao odgovor inhibira daljnju apsorpciju iona u dvanaesniku, recikliranje željeza u makrofagima RES-a i mobilizaciju rezervi željeza iz hepatocita. (preuzeto i prilagođeno prema Camaschella i sur., 2020).

Kratice: DMT1 – prijenosnik za dvovalentne ione metala, RES – retikulo-endotelni sustav, kompleks BMP/SMAD/HJV – kompleks koštanih morfogenetskih proteina/SMAD proteina/hemojuvenilnog koreceptora, kompleks TfR1/TfR2/HFE – kompleks transferinskog receptora 1/transferinskog receptora 2/ljudskog proteina hemokromatoze

Unatoč niskim dnevnim potrebama, nedostatak željeza najčešći je nutritivni poremećaj u svijetu jer smanjuje sintezu hemoglobina, ograničavajući stvaranje eritroidnih prekursora, što posljedično vodi razvoju raznih vrsta anemija (Liu i Kaffes, 2012). Suprotno tome, višak željeza akumulira se u organizmu te pridonosi stvaranju ROS-a, a najviše oštećuje stanice jetre, srca, gušterače, CNS-a (Stankowski i sur., 2012), bubrega i slezene te dovodi do sustavne endokrine disfunkcije (Kohgo i sur., 2008; Nematbakhsh i sur., 2016). Odlaganje viška željeza u mozak povezano je pojavom neurodegeneracijskih poremećaja poput Parkinsonove bolesti, Alzheimerove bolesti i Friedrichove ataksije. Željezo se vrlo često nakuplja u mitohondrijima, a to je karakteristika sideroblastičnih anemija, eritropoetske protoporfirije i sindroma mijelodisplazije (Huang i sur., 2006). Zbog svega navedenog, regulacija homeostaze željeza visoko je kontrolirana povratnom spregom hepcidin-feroportin (Guidi i Santonastaso, 2010).

#### 1.4.2 Status željeza određuje makrofagnu polarizaciju i tok upalne reakcije

Homeostaza željeza usko je povezana s infekcijama i upalnim odgovorima zbog učinaka željeza na proliferaciju i diferencijaciju imunskih stanica, primjerice polarizaciju makrofaga (Ludwiczek i sur., 2003). Osim što se željezo u makrofagima veže za feritin, zabilježeno je da status željeza određuje polarizaciju makrofaga regulirajući ekspresiju gena vezanih za metabolizam željeza. Međutim, pojavljuju se kontroverzni rezultati i mišljenja o tome na koji način željezo utječe na upalni odgovor (Pagani i sur., 2011; Sindrilaru i sur., 2011; Zanganeh i sur., 2016; Hoeft i sur., 2017; Agoro i sur., 2018). Dok jedni tvrde da višak željeza suprimira prethodno izazvan upalni odgovor i time djeluje protuupalno, drugi govore da dodatak željeza

djeluje proupalno izazivajući i pogoršavajući upalne odgovore u tijelu. To sugerira da bi željezo moglo regulirati polarizaciju makrofaga utječući na različite signalne putove na temelju različitih modela. Stoga temeljni mehanizmi pomoću kojih željezo oblikuje polarizaciju makrofaga zaslužuju daljnja istraživanja.

Prema istraživanju Agore i suradnika (2018) prehrana bogata željezom ili intraperitonealni unos željezo dekstrana smanjuju proupalni odgovor prethodno uzrokovan LPS-om u miševa. Obrada miševa željezom povećala je ekspresiju markera M2, odnosno aktivnost arginaze (Arg-1) u jetrenim i peritonealnim makrofagima, dok je nedostatak željeza smanjio aktivnost Arg-1 i pomaknuo polarizaciju makrofaga u smjeru fenotipa M1. Odnosno, pod upalnim stanjem izazvanim LPS-om, prehrana s niskim sadržajem željeza potaknula je proupalni odgovor, dok se dodatkom željeza u prehrani potaknuo protuupalni odgovor tipa 2, a ravnoteža IL-12/IL-10 se smanjila (Agoro i sur., 2018). Kod protuupalnog fenotipa M2, negativno reguliran gen za feritin i pozitivno reguliran gen za ferroportin potiču apsorpciju hema i izlučivanje slobodnog željeza. Makrofagi M2 koriste arginin za proizvodnju ornitina i uree putem enzima Arg-1, a marker kojima se utvrđuje polarizacija M2 je citokin IL-10. Put arginaze ograničava dostupnost arginina za sintezu NO, a ornitin dalje djeluje u putevima sinteze poliamina i prolina koji su potrebni za staničnu proliferaciju i popravak tkiva (Xia i sur., 2021). Protuupalno djelovanje željeza potvrđuje prethodnu studiju Pagani i suradnika (2011) koja je dokazala kako nedostatak željeza u miševa potiče proizvodnju proupalnih citokina TNF- $\alpha$  i IL-6 u makrofagima jetre, slezene i u serumu miševa nakon tretiranja LPS-om.

Druga istraživanja otkrila su pojačanu LPS upalu nakon davanja visoke doze (1 g/kg) intraperitonealnog željezo dekstrana (Hoeft i sur., 2017). Agoro i suradnici (2018) potvrdili su proupalno djelovanje željeza, a rezultati su pokazali veću aktivnost sintaze dušikovog oksida i ekspresiju proupalnih citokina nakon visoke doze željezo dekstrana u LPS izazvanoj upali. Kod proupalnog fenotipa M1 ekspresija gena HAMP i gena za feritin je pozitivno regulirana, dok su gen za ferroportin i geni IRP negativno regulirani. Makrofagi M1 koriste arginin za proizvodnju NO i citulina putem sintaze dušikovog oksida, a markeri kojima se potvrđuje M1 polarizacija su sintaza dušikovog oksida te citokini TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  (Xia i sur., 2021). Međutim, Agoro i suradnici (2018) sugeriraju da ovisno o razini preopterećenja željezom, sustavnim ili enteričnim putem, učinak na upalu može biti proupalni ako se radi o ekstremno visokim dozama, ali i protuupalni pri umjerenijim dozama preopterećenja.

U slučaju povećane razine željeza u organizmu, premašuje se kapacitet nosača transferina da ga održava u redoks-neaktivnom stanju. Nevezano željezo primarno apsorbira jetra te postaje redoks-aktivno utječući i pridonoseći nastanku reaktivnih kisikovih vrsta u

stanicama jetre (Mackenzie i sur., 2008). Oksidacijski stres izazvan željezom može dovesti do izmjene genskog materijala te do mutageneze, karcinogeneze i starenja. Hidroksilni radikal proizveden Fentonovom reakcijom, u kojoj se ion željeza oksidira, može se vezati za dvostruke veze u DNA bazama pri čemu se one oksidiraju u primjerice 8-hidroksigvanozin. U mnogim tkivima raka zabilježeno je DNA oštećenje posredovano slobodnim radikalima (Marnett, 2000). Trenutna saznanja pokazuju kako Fentonova reakcija najviše pridonosi nakupljanju ROS-a u mitohondrijima što dovodi do lipidne peroksidacije, a posljedično do ferroptoze (Dixon i sur., 2012; Kuhn i sur., 2015; Muckenthaler i sur., 2017). Dixon i suradnici, 2012. godine prvi puta su opisali koncept ferroptoze kao ne-apoptotski način regulirane stanične smrti ovisne o nakupljanju željeza u stanicama te nastanku i nakupljanju L-ROS-a. Proces ferroptoze događa se i u različitim patološkim stanjima poput neurodegeneracije, ishemijsko-reperfuzijske ozljede, upalnih reakcija i raka (Galaris i sur., 2019).

## 2 Cilj rada

Cilj rada jest istražiti učinak inhalacijskih anestetika u nazočnosti željeza na prooksidacijske/antioksidacijske učinke perifernih tkiva i organa u kroničnoj upali, te spoznati koja tkiva najviše nakupljaju metale prema fiziološkim, funkcionalnim značajkama te tkivnim barijerama i mogu li različiti anestetici mijenjati metabolizam stanica s obzirom na željezo kao prijelazni metal i kao inicijator nastanka ROS-a i upale kroz regulaciju hepcidina i feritina te makrofagne polarizacije.

### 3 MATERIJALI I METODE

#### 3.1 Materijali

##### 3.1.1 Pokusne životinje

U istraživanju sam koristila oba spola visokosrodnog soja štakora Y59 u dobi od 3 mjeseca, uzgojena na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno - matematičkog fakulteta u Zagrebu. Životinje su svakodnevno hranjenje standardnom hranom za laboratorijske životinje (Standard Diet GLP, 4RF21, Mucedola, Settimo Milanese MI, Italija), a pristup vodi je bio neograničen. Uvjeti održavanja su bili standardni, dnevni ritam od 12 sati dana i 12 sati noći, temperatura od 24 °C uz kontroliranu vlažnost zraka. Istraživanje sam provela na ukupno 48 Y59 štakora, podijeljena prema sličnim tjelesnim težinama u 6 skupina sa po 8 životinja, a svaka skupina imala je različit način obrade. Cijelo istraživanje bilo je u skladu etičkih načela važećih u Republici Hrvatskoj (Zakon o zaštiti životinja, NN 102/2017) i Vodiču za držanje i korištenje laboratorijskih životinja (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHHS (NIH) Publ # 86-23).

##### 3.1.2 Kemijski spojevi

###### 3.1.2.1 *Inhalacijski anestetik izofluran*

U obradi laboratorijskih životinja koristila sam inhalacijski anestetik izofluran, kemijske formule  $C_3H_2ClF_5O$ , molarne mase  $M_r = 184,49$  g/mol, proizvođača Baxter.

###### 3.1.2.2 *Inhalacijski anestetik sevofluran*

U obradi laboratorijskih životinja koristila sam inhalacijski anestetik sevofluran, kemijske formule  $C_4H_3F_7O$ , molarne mase  $M_r = 200,055$  g/mol, proizvođača Baxter.

###### 3.1.2.3 *Željezo dekstran*

U pripremi vodene otopine željezo dekstrana koristila sam željezo dekstran, kemijski spoj formule  $FeH_2O_4S$ , molarne mase  $M_r = 153,92$  g/mol, proizvođača Santa Cruz Biotechnology, SAD.

#### 3.1.2.4 Vodena otopina željezo dekstrana

Vodenu otopinu željezo dekstrana sam pripremila otapanjem 50 mg  $\text{FeH}_2\text{O}_4\text{S}$  po jednom kilogramu životinje u pročišćenoj vodi (*aqua pro*), proizvođača B. Braun Adria d. o. o., Hrvatska koju sam koristila pri obradi životinja.

### 3.2 Metode

#### 3.2.1 Vaganje i praćenje promjena tjelesnih masa laboratorijskih životinja

Neposredno prije početka istraživanja, životinje su pojedinačno izvagane digitalnom vagom (ABS 220 – 4, proizvođač: Kern & Sohn, Njemačka), te su na temelju slične tjelesne mase ( $\pm 10$  g) razvrstane u 6 skupina. Tijekom istraživanja, životinje sam jednom tjedno ponovno vagala digitalnom vagom, čime sam pratila promjene tjelesnih masa.

#### 3.2.2 Obrada laboratorijskih štakora

Patofiziološke promjene, čiji sam utjecaj pratila u istraživanju, izazvane su sljedećim kemijskim spojevima i/ili otopinama: inhalacijskim anestheticima izofluranom i sevofluranom, te vodenom otopinom željezo dekstrana.

Pokusne životinje sam na temelju slične tjelesne mase ( $\pm 10$  g) razvrstala u 6 skupina sa po 8 životinja (Tablica 3). Prva skupina predstavljala je kontrolu koja je obrađena intraperitonealno (*ip*) s 0,5 mL otopine natrijeva klorida ( $\text{NaCl}$ ). Druga skupina bila je izložena 2,4% inhalacijskom anestetiku sevofluranu, a treća skupina 1,3% inhalacijskom anestetiku izofluranu. Četvrta skupina obrađena je *ip* s 50 mg/kg vodene otopine željezo dekstrana. Peta skupina je dva sata nakon *ip* injiciranja vodene otopine željezo dekstrana primala 2,4% inhalacijski anestetik sevofluran, a šesta je dva sata nakon *ip* injiciranja vodene otopine željezo dekstrana primala 1,3% inhalacijski anestetik izofluran. Svi inhalacijski anestetici primani su puna dva sata, a svi laboratorijski štakori u istraživanju bili su obrađeni svaki drugi dan kroz ukupno 28 dana.

**Tablica 3.** Eksperimentalni dizajn i način obrade laboratorijskih životinja

| Naziv skupine                 | Oznaka skupine | Kemijski spojevi i/ili otopine za obradu životinja                   | Doze kemijskih spojeva i/ili otopina  | Način obrade                         |
|-------------------------------|----------------|--|---|--------------------------------------|
| Kontrola                      | 0              | NaCl   | 0,5 mL  | <i>ip</i>                            |
| Sevofluran                    | 1              | Inhalacijski anestetik sevofluran                                    | 2,40%   | Inhalacijski                         |
| Izofluran                     | 2              | Inhalacijski anestetik izofluran                                     | 1,30%   | Inhalacijski                         |
| Željezo dekstran              | 3              | Vodena otopina željezo dekstrana                                     | 50 mg/kg FeH <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S u 0,5 mL <i>aqua pro</i>   | <i>ip</i>                            |
| Sevofluran + željezo dekstran | 4              | Vodena otopina željezo dekstrana i inhalacijski anestetik sevofluran | Kombinacija 50 mg/kg FeH <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S u 0,5 mL <i>aqua pro</i> s 2,4% C <sub>4</sub> H <sub>3</sub> F <sub>7</sub> O   | Kombinacija <i>ip</i> i inhalacijski |
| Izofluran + željezo dekstran  | 5              | Vodena otopina željezo dekstrana i inhalacijski anestetik izofluran  | Kombinacija 50 mg/kg FeH <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S u 0,5 mL <i>aqua pro</i> s 1,3% C <sub>3</sub> H <sub>2</sub> ClF <sub>5</sub> O | Kombinacija <i>ip</i> i inhalacijski |

Kratice: *ip* - intraperitonealno

Nakon 28 dana obrade životinja, životinje su anestetizirane i analgezirane *ip* injiciranjem kombinacije Xylapana® (Vetoquinol Biowet Sp., Gorzow, R. Poljska) i Narketana® (Vetoquinol S.A. BP 189 Lure Cedex, Francuska), te žrtvovane kako bi se prikupila tkiva i organi poput krvi, slezene, jetre, bubrega i pluća. Uzorke krvi za hematološke analize prikupila sam u vakutajnere (engl. *BD Vacutainer Blood Collection System*) s EDTA antikoagulansom (Becton Dickinson, Plymouth, UK), dok sam za biokemijske analize prikupila u vakutajnere bez antikoagulansa. Organe sam očistila od masnog tkiva i izvagala te sve pohranila na -80 °C do daljnjih analiza.

### 3.2.3 Relativni indeks težine organa

Relativna težina organa izražena je u g/100 g, a izračunala sam je prema sljedećoj formuli [1]:

$$\text{relativna težina organa} = \frac{\text{ukupna težina organa} \times 100}{\text{konačna težina organa}} \quad [1]$$

### 3.2.4 Određivanje hematoloških parametara

Hematološki parametri mjereni su istog dana nakon što su životinje bile anestetizirane, a koristila se krv prikupljena u vakutajnere s antikoagulansom EDTA. Određeni su sljedeći hematološki parametri: broj eritrocita, leukocita, trombocita, koncentracija hemoglobina, hematokrit, diferencijalna krvna slika, sadržaj hemoglobina u eritrocitima (MCH), raspodjela eritrocita po veličini (RDW), volumen eritrocita (MCV) i koncentracija hemoglobina u eritrocitima (MCHC); a određeni su analitičkim metodama na elektronskom brojaču Horiba ABX169 (Micros, Francuska).

### 3.2.5 Određivanje biokemijskih parametara

Biokemijski parametri mjereni su istog dana nakon što su životinje bile anestetizirane, a koristio se serum dobiven iz krvi prikupljenoj u vakutajnere bez antikoagulansa. Krv se potom centrifugirala (Centrifuga 5702, proizvođač: Eppendorf, Njemačka) 10 minuta na 2200 okretaja/minuti kako bi se izdvojio serum. Određeni su sljedeći biokemijski parametri: alanin aminotransferaza, albumin, alkalna fosfataza, amilaza, dušik uree u krvi, kreatinin, glukoza u krvi, ukupni bilirubin, ukupni proteini, natrij, fosfor, kalcij, kalij i globulin; a određeni su pomoću VetScan® kompleta (engl. *Comprehensive Diagnostic Profile reagent rotor*) na VetScan® VS2 uređaju (Abaxis, UK).



### 3.2.6 Osmotska otpornost eritrocita

Osmotska otpornost eritrocita temelji se na sposobnosti membrane eritrocita prema promjenama gradijenta osmotskog tlaka otopine. Kada se eritrociti nalaze u izotoničnoj otopini, 0,9% NaCl, preko membrane eritrocita, neto izlaz i ulaz vode iznosi nula, čime se uspostavlja osmotska ravnoteža izvanstanične i stanične tekućine. Eritrociti u hipotoničnom mediju, manjem od 0,9% NaCl, bubre zbog većeg ulaza vode iz medija zbog čega može doći do hemolize stanica. U tom slučaju hemoglobin izlazi iz stanica te okolni medij boji žarko crvenom bojom. Cilj metode je uspostaviti gradijent hipotoničnih otopina, a oslobođeni hemoglobin, odnosno crveno obojenje otopine ukazat će na stupanj hemolize stanica. Osmotska otpornost eritrocita služi kao indikator stupnja metaboličkih poremećaja eritrocita, oštećenja membrana eritrocita, poremećaja u strukturi hemoglobina ili sinteze enzima.

Koristila sam krv prikupljenu u vakutajnere s EDTA antikoagulansom. Pripremila sam niz epruveta s po 0,9 mL 0,9 %; 0,8 %; 0,7 %; 0,6 %; 0,5 %; 0,4 %; 0,3 %; 0,2 %; 0,1 % i 0,0 % otopine NaCl tako da svaki uzorak ima svoj gradijent otopina. U epruvete sam dodala 0,01 mL uzorka krvi te inkubirala 30 minuta. Zatim sam epruvete centrifugirala (Centrifuga 5702, proizvođač: Eppendorf, Njemačka) 10 minuta na 2200 okretaja/minuti, a nadtalog sam mjerila na spektrofotometru (Libra S22, proizvođač: Biochrom) pri 540 nm. Slijepa proba predstavlja 0,9% otopinu NaCl, a njena apsorbancija iznosi 0.

### 3.2.7 Priprema organa za analize

Od svakog organa odvagala sam 75 - 100 mg tkiva digitalnom vagom (ABS 220 – 4, proizvođač: Kern & Sohn, Njemačka) i stavila u Eppendorf epruvete volumena 2 mL. Kako bih postigla omjer tkiva i fosfatnog pufera (engl. *phosphate buffered saline*, PBS) 1:10, u iste epruvete dodala sam 10 puta više PBS-a. Uzorke sam potom homogenizirala ultrazvučnom sondom (Homogenizator: Sonoplus mini, proizvođač: Bandelin, Njemačka), a nakon toga centrifugirala (ultracentrifuga Mikro 200R: Hettich, Njemačka) na 15 000 okretaja/minuti kroz 15 minuta pri 4 °C. Supernatant sam odvojila te dodatkom određenog volumena PBS pufera pripremila razrjeđenja od 10x i 40x za ostale analize. Ostatak organa, homogenata i razrjeđenja pohranila sam na -80 °C do daljnjih analiza.

### 3.2.8 Metode oksidacijskog stresa

#### 3.2.8.1 Određivanje koncentracije proteina prema Lowryju

Za mjerenje koncentracije proteina iz homogenata tkiva laboratorijskih životinja koristila sam protokol koji su predložili Lowry i suradnici (1951). Metoda se zasniva na dvjema reakcijama: prva je redukcija divalentnih iona bakra ( $\text{Cu}^{2+}$ ) u monovalentne ione bakra ( $\text{Cu}^+$ ), radi njihovog povezivanja s aminokiselinama tirozinom, triptofanom i cisteinom iz uzoraka u lužnatim uvjetima; a druga je reakcija aminokiselinskih ostataka tirozina, triptofana i cisteina s Folin-Ciocalteu reagensom, pri čemu se reagens reducira, a krajnji produkt reakcije je volframov i molibdenov oksid koji otopini daju plavo obojenje. Priprema i sastav otopina opisani su u Tablici 4.

**Tablica 4.** Otopine i način pripreme otopina za određivanje koncentracije proteina prema Lowryju u tkivima obrađenih laboratorijskih životinja

| Otopine   | Dobivanje otopina  |
|---|--|
| Otopina A: 2% (w/v) $\text{Na}_2\text{CO}_3$ u 0,1 M NaOH   | 9,6 g $\text{Na}_2\text{CO}_3$ + 480 mL 0,1 M NaOH   |
| Otopina B: (w/v) $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 4\text{H}_2\text{O}$ u $\text{dH}_2\text{O}$ | 0,1 g $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 4\text{H}_2\text{O}$ + 10 mL $\text{dH}_2\text{O}$ |
| Otopina C: (w/v) $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ u $\text{dH}_2\text{O}$                     | 0,05 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ + 10 mL $\text{dH}_2\text{O}$                    |
| Otopina D   | otopina A : otopina B: otopina C = 48:1:1  |
| Otopina E   | Folin - Ciocalteu reagens : $\text{dH}_2\text{O}$ = 2:1  |

Lowryjevom metodom izmjerila sam količinu proteina iz homogenata bubrega i pluća razrjeđenja 10x, te jetre i slezene, razrjeđenja 40x. U prethodno označene staklene epruvete dodala sam 100  $\mu\text{L}$  uzorka te u svaku dodala 2 mL otopine D. Otopine sam inkubirala 10 minuta na sobnoj temperaturi, a potom dodala 200  $\mu\text{L}$  otopine E. Sastav epruvete promiješala sam na vorteksu (Vortex Genius 3, proizvođač: IKA, SAD) te inkubirala 30 minuta na sobnoj temperaturi bez prisustva svjetla. Apsorbanciju sam mjerila na spektrofotometru (Libra S22, proizvođač: Biochrom) na valnoj duljini od 600 nm.

Kao standard i kod izrade baždarnog grafa koristila sam seriju razrjeđenja govedeg serumskog albumina (engl. *bovine serum albumin*, BSA) poznatih koncentracija (Tablica 5).

Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji BSA izračunala sam nagib pravca preko kojeg sam potom odredila koncentracije proteina u uzorcima izražene u mg/mL uzorka, prema sljedećoj formuli [2]:

$$c(\text{proteina}) = \left( \frac{A_{\text{uzorka}} - b_{\text{standardne krivulje}}}{y_{\text{standardne krivulje}}} \right) \times \text{razrjeđenja uzorka} \quad [2]$$

**Tablica 5.** Način pripreme serijskih razrjeđenja otopine standarda govedeg serumskog albumina kod izrade baždarnog grafa

| Koncentracija BSA | RADNA OTOPINA                               |
|-------------------|---|
| 20                | 1000 µL BSA (2mg/mL)                        |
| 10                | 500 µL 20 BSA + 500 µL dH <sub>2</sub> O    |
| 5                 | 500 µL 10 BSA + 500 µL dH <sub>2</sub> O    |
| 2,5               | 500 µL 5 BSA + 500 µL dH <sub>2</sub> O     |
| 1,25              | 500 µL 2,5 BSA + 500 µL dH <sub>2</sub> O   |
| 0,625             | 500 µL 1,25 BSA + 500 µL dH <sub>2</sub> O  |
| 0,312             | 500 µL 0,625 BSA + 500 µL dH <sub>2</sub> O |
| 0,156             | 500 µL 0,312 BSA + 500 µL dH <sub>2</sub> O |
| 0                 | 1 mL dH <sub>2</sub> O                      |

### 3.2.8.2 Određivanje lipidne peroksidacije

Za mjerenje lipidne peroksidacije koristila sam metodu koju su predložili Jayakumar i suradnici (2007), a cilj je odrediti koncentraciju malondialdehida u organima obrađenih laboratorijskih životinja. Radi se o prilagođenoj metodi, a zasniva se na tzv. tiobarbituratnom testu u kojem, pri kiselim uvjetima na temperaturi od 95 °C, molekula MDA reagira s dvije molekule 2-tiobarbituratne kiseline (engl. *2-thiobarbituric acid*, 2-TBA) pri čemu nastaje kromogeni MDA-TBA<sub>2</sub> kompleks, a intenzitet crvenog obojenja odgovara koncentraciji MDA u uzorcima. Priprema i sastav otopina opisani su u Tablici 6.

**Tablica 6.** Otopine i način pripreme otopina za određivanje lipidne peroksidacije, odnosno koncentracije MDA u tkivima obrađenih laboratorijskih životinja.

| Otopine             | Dobivanje otopina   |
|---------------------|---|
| 8,1% SDS            | 0,81 g SDS + 10 mL dH <sub>2</sub> O  |
| 20% octena kiselina | 20 mL 99,5% octene kiseline + 2,31mL 37% HCl + dH <sub>2</sub> O do 50 mL, podesiti pH na 3,5 + dH <sub>2</sub> O do 100 mL |
| 0,8% TBA            | 0,8 g TBA + 40 mL dH <sub>2</sub> O + 500 5 M NaOH + dH <sub>2</sub> O do 100 mL  |
| Otopina A           | 100 μL 0,8% SDS + 750 μL 20% octene kiseline + 750 μL 0,81% TBA   |

Koncentraciju MDA mjerila sam iz homogenata tkiva jetre, pluća, bubrega, i slezene obrađenih laboratorijskih životinja. U prethodno označene Eppendorf epruvete dodala sam 100 μL urozka, a za slijepu probu koristila sam PBS pufer. U sve epruvete dodala sam 1,6 mL otopine A te inkubirala sat vremena u vodenoj kupelji na 95 °C. Uzorke sam naglo ohladila na ledu 10 min, zbog čega su se na dnu počele formirati folikule. Kako bi spustila folikule na dno, epruvete sam centrifugirala (Centrifuge 5702, proizvođač: Eppendorf, Njemačka) 15 minuta na 15 000 okretaja/minuti, a potom iz supernatanta mjerila apsorbanciju na spektrofotometru (Libra S22, proizvođač: Biochrom) pri 532 nm. Ukupna koncentracija MDA izražena je kao nmol/mg proteina, a izračunala sam ju prema sljedećoj formuli [3]:

$$c(\text{MDA}) = \frac{A_{\text{uzorka}} \times V_{\text{reakcijske smjese}}}{\varepsilon(\text{MDA}) \times V_{\text{uzorka}} \times C_{\text{proteina u uzorku}}} \quad [3]$$

pri čemu je:

$\varepsilon(\text{MDA})$  = molarni ekstinkcijski koeficijent, a iznosi  $1,56 \times 10^5/\text{M cm}$

### 3.2.8.3 Određivanje aktivnosti enzima katalaze

Za određivanje aktivnosti enzima katalaze koristila sam metodu po Aebiju (1984), kojom se određuje količina potrošenog vodikovog peroksida u organima obrađenih laboratorijskih životinja. Kod staničnog stresa enzim katalaza razgrađuje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na vodik i kisik, a aktivnost enzima određuje se prema količini razgrađenog H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u jednoj minuti. Odnosno, pad apsorbancije je mjera katalazne aktivnosti definirana količinom enzima koji razgrađuje 1 μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u danj jedinici vremena tijekom jedne minute.

Aktivnost katalaze određena je u homogenatima jetre i slezene, razrjeđenja 40x, i homogenatima bubrega i pluća, razrjeđenja 10x. U kivete volumena 1 mL dodala sam 20  $\mu$ L uzorka i 980  $\mu$ L 10 mM  $H_2O_2$ . Slijepu probu predstavljala je posebna kiveta volumena 1 mL u koju sam dodala 20  $\mu$ L PBS-a i 980  $\mu$ L 10mM vodikovog peroksida. Enzimsku aktivnost mjerila sam spektrofotometrijski (UV-160, proizvođač: Shimadzu, Japan) na valnoj duljini od 240 nm unutar jedne minute. Koncentracija razgrađenog  $H_2O_2$  izražena je u U/mg, a računala sam ju prema sljedećoj formuli [4]:

$$c(H_2O_2) = \frac{A_{uzorka}}{\varepsilon(H_2O_2) \times 1} \times \text{razrjeđenje uzorka} \quad [4]$$

pri čemu je:

$\varepsilon(H_2O_2)$  = molarni ekstinkcijski koeficijent vodikovog peroksida, a iznosi 39,4 m/Mcm

#### 3.2.8.4 *Određivanje aktivnosti enzima superoksid dismutaze*

Za mjerenje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) odabrala sam metodu po Flohéu i Öttingu (1971), a ona se temelji na inhibiciji redukcije citokroma c u sustavu ksantin/ksantin oksidaza (engl. *xanthine oxygenase*, XOD). SOD katalizira reakciju dismutacije slobodnih superoksidnih radikala u molekularni kisik i vodikov peroksid, smanjujući oštećenje stanice. Aktivnost SOD-a dobiva se iz inhibitorne aktivnosti XOD-a. Priprema i sastav otopina opisani su u Tablici 7.

**Tablica 7.** Otopine i način pripreme otopina za određivanje aktivnosti enzima superoksid dismutaze u tkivima obrađenih laboratorijskih životinja

| Otopine               | Dobivanje otopina  |
|-----------------------|--|
| 50 mM PBS             | 17 mL NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O (1,56 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O + 50 mL dH <sub>2</sub> O) + 180 mL Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (5,678 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 200 mL dH <sub>2</sub> O), podesiti pH na 7,8 + dH <sub>2</sub> O do 800 mL |
| Otopina C             | 7,44 mg EDTA + 200 mL 50 mM PBS  |
| 0,05 mM Citokrom c    | 29 mg citokroma c + 190 mL Otopina C   |
| 1 mM otopina ksantina | 3 mg ksantina + 19,74 mL 1 mM NaOH   |
| Otopina A             | 190 mL 0,05 mM citokroma c (29 mg citokroma c + Otopina C do 190 mL) + 19 mL 1 mM otopine ksantina   |
| Otopina B             | 40 µL ksantin oksidaze + 960 µL dH <sub>2</sub> O  |

Aktivnost SOD-a mjerila sam u homogenatima jetre i slezene, razrjeđenja 40x te bubrega i pluća, razrjeđenja 10x. U ovoj metodi koristila sam dvije slijepa probe. Prvu slijepu probu čini otopina A kojoj sam mjerila apsorbanciju na spektrofotometru (UV-160, proizvođač: Shimadzu, Japan) na valnoj duljini od 550 nm tijekom 3 minute. Druga slijepa proba sastoji se od 1,45 mL otopine A, 25 µL PBS-a te početnog volumena XOD-a od 25 µL, a povećanjem volumena namještala sam enzimsku aktivnost XOD-a koja treba iznositi 0,025 U/min. U svaku reakcijsku smjesu dodala sam 25 µL uzorka, 1,45 mL otopine A te odgovarajući volumen XOD-a, te izmjerila apsorbanciju. Za određivanje aktivnosti SOD-a prvo sam izračunala postotak inhibicije XOD-a prema sljedećoj formuli [5]:

$$\% \text{ inhibicije} = 100 - \frac{\Delta A_{\text{uzorka}}}{\Delta A_{\text{slijepa probe}}} \times 100 \quad [5]$$

Iz postotka inhibicije zatim sam dobila aktivnost SOD-a izraženu kao U/mL uzorka prema formuli [6]:

$$\text{Aktivnost SOD} = 10^{\frac{\% \text{ inhibicije} + 12.757}{30.982}} \quad [6]$$

### 3.2.8.5 Određivanje koncentracije ukupnog glutationa

Za mjerenje koncentracije ukupnog glutationa (GSH) iz homogenata laboratorijskih životinja koristila sam modificirani protokol koji je predložio Tietze (1969), a ukupni glutation čine oksidirani (engl. *glutathione disulfide*, GSSG) i reducirani oblik (engl. *glutathione*, rGSH). Metoda se zasniva na dvjema reakcijama: prva je reakcija redukcije 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeve kiseline (engl. *5,5dithio-bis-2-nitrobenzoic acid*, DTNB), zvane Ellmanov reagens, u reakciji s katalitičkim količinama rGSH pri čemu nastaje žuto obojeni produkt 5-tio-2-nitrobenzojeva kiselina (engl. *2-thio-5-nitrobenzoic acid*, TNB) i GSSG; a druga je reakcija u kojoj se nastali TNB i GSSG recikliraju u reakciji kataliziranoj glutation-reduktazom (engl. *glutathione reductase*, GR) uz nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, NADPH) kao elektron donor. Brzina reciklirajuće reakcije jednaka je brzini prve reakcije (jednadžbe [7] i [8]). Porast apsorbancije mjerila sam spektrofotometrijski, a konačni rezultat prikazuje koncentraciju GSH nastalu zbrajanjem koncentracija GSSG i rGSH. Priprema i sastav otopina opisani su u Tablici 8.



**Tablica 8.** Otopine i način pripreme otopina za određivanje koncentracije ukupnog glutationa u tkivima obrađenih laboratorijskih životinja

| Otopine                                  | Dobivanje otopina  |
|--|--|
| 0,035 M HCl                              | 7 mL 0,1 M HCl + 193 mL dH <sub>2</sub> O  |
| 50 mM PBS                                | 17 mL 1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O (3 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O + dH <sub>2</sub> O do 17 mL) + 183 mL 1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12H <sub>2</sub> O (65,5 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12H <sub>2</sub> O + dH <sub>2</sub> O do 183 mL) |
| 0,5 M EDTA                               | 37,2 g EDTA + 200 mL dH <sub>2</sub> O   |
| Otopina C                                | 200 mL 0,5 M PBS + 200 mL 0,5 M EDTA   |
| Otopina A (10 mM DTNB), Ellmanov reagens | 100 µL 8,1% SDS + 750 µL 20% octene kiseline + 750 µL 0,81% TBA  |
| Otopina B                                | 9980 µL 0,8 mM NADPH (6,67 mg NADPH + 0,5 M PBS do 10 mL + otopine C do 10 mL) + 20 µL GR  |
| Otopina standarda                        | 0,6 mg GSH + 10 mL otopine C   |

Metodom određivanja GSH, određena je koncentracija rGSH i GSSG u homogenatima jetre i slezene, razrjeđenja 40x, i homogenatima bubrega i pluća, razrjeđenja 10x. U mikrotitarsku pločicu s 96 jažica ispipetirala sam 20  $\mu\text{L}$  uzoraka, 40  $\mu\text{L}$  0,035 M HCl te 40  $\mu\text{L}$  10 mM DTNB te pločicu inkubirala 10 minuta. Apsorbanciju sam mjerila na spektrofotometru (Microplate Reader Model 550, proizvođač Bio-Rad, SAD) na valnoj duljini od 412 nm. U istu pločicu potom sam dodala 100  $\mu\text{L}$  otopine B te izmjerila apsorbanciju tijekom 5 minuta.

Kao standard i kod izrade baždarnog grafa koristila sam seriju razrjeđenja GSH poznatih koncentracija od 0 do 60  $\mu\text{g/mL}$ .

Ukupna koncentracija GSH izražena je kao mU/mg proteina, a izračunata je prema formuli [9]:

$$c(\text{GSH}) = \frac{\Delta A_{\text{uzorak}} \cdot V_{\text{reakcijske smjese}} (\text{mL})}{\varepsilon \cdot V_{\text{uzorka}} (\text{mL}) \cdot c_{\text{proteina}} (\text{mg/mL})} \cdot d \quad [9]$$

pri čemu je:

$\varepsilon(\text{DTNB})$  = molarni ekstinkcijski koeficijent Ellmanovog reagensa, a iznosi 8,22  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

$d$  = faktor razrjeđenja uzorka

### 3.2.9 Određivanje željeza metodom induktivno spregnute plazme s masenom spektrometrijom

Koncentracija esencijalnog metala željeza mjerila se iz organa obrađenih laboratorijskih životinja metodom induktivno spregnute plazme s masenom spektrometrijom (engl. *inductively coupled plasma mass spectrometry*, ICPMS). Prije samog mjerenja, pripremljeni su uzorci tkiva na način da se izvaganim organima dodalo 3 mL 65%-tne dušične kiseline (čistoće s.p., Merck, Njemačka) i 3 mL deionizane vode. Tkiva su zatim razorena prema programu za biološke uzorke u visokotlačnom mikrovalnom uređaju UltraCLAVE IV (Milestone, Italija). Zatim se uzorcima doda deionizirana voda do volumena od 5 mL te razrijedi 1%-tnom (v/v) dušičnom kiselinom, a svakom uzorku doda se otopina unutarnjeg standarda u koncentraciji od 3  $\mu\text{g/L}$  (Ge, Rh, Lu, Ir i Tb u 1%  $\text{HNO}_3$ ).

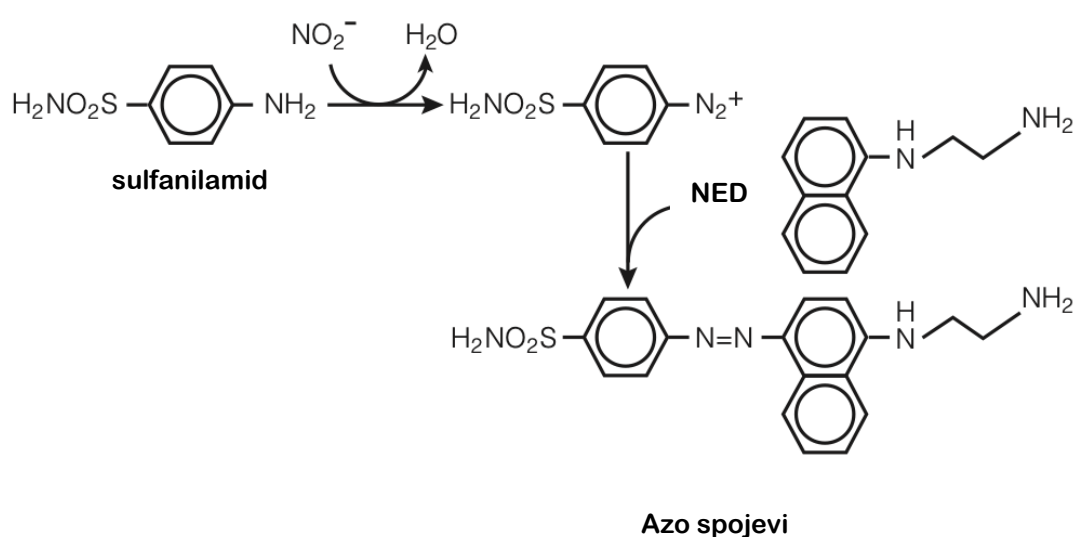
Koncentracija željeza mjerila se ICPMS metodom na uređaju Agilent 7500cx (Agilent Technologies, Njemačka). Parametri i osjetljivost uređaja podešavaju se pomoću smjese koja sadrži 1  $\mu\text{g/L}$  elemenata litija, magnezija, kobalta, itrija, cerija, talija i selenija, a smjese



standarda pripremaju se iz monoelementarnih standardnih otopina s 5%-tnom (v/v) dušičnom kiselinom. Potrebno je pripaziti na uvjete prilikom mjerenja, poput osjetljivosti uz minimalne interferencije te na granicu detekcije i kvantifikacije. Prilikom ispitivanja točnosti i preciznosti metode koriste se komercijalno dostupne reference, poput govede jetre 1577b, 1577b (NIST, SAD), konjskog bubrega H8 (IAEA, Austrija), mišića morskog psa DORM-2 (NRCC, Kanada), životinjske kosti H5 (IAEA, Austrija), svinjskog bubrega BCR-186R (IRMM, Belgija), seruma Seronorm<sup>TM</sup> Trace Elements Serum Level I, II (Sero AS, Norveška) i plazme ClinChek<sup>®</sup>-Control Level I, II (RECIPE, Njemačka).

### 3.2.10 Određivanje koncentracije dušikovog oksida

Jedan od načina ispitivanja koncentracije NO u pojedinim organima obrađenih životinja je putem kompleta za ispitivanje prisutnosti nitrita ( $\text{NO}_2^-$ ), jednog od dva primarna, stabilna i nehlapljiva produkta razgradnje NO, a test je poznatiji pod imenom Griessov test (engl. *Griess Reagent System*). Komplet se oslanja na reakciji diazotacije (Slika 5), koju je izvorno opisao Peter Griess 1879. godine (Griess, 1879), u kojoj sulfanilamid i N-1-naftiletilendiamin dihidroklorid (engl. *N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride*, NED), u kiselim uvjetima daju obojene azo spojeve što ukazuje na prisutnost  $\text{NO}_2^-$ . Koncentracija  $\text{NO}_2^-$  mjeri se spektrofotometrijski, a zatim se iz grafa prosječnih vrijednosti apsorbancija standarda izračuna prosječna vrijednost apsorbancija uzorka. Prema korištenom protokolu granica detekcije nitrita je  $2,5 \mu\text{M}$ .



**Slika 5.** Prikaz kemijske reakcije diazotacije sulfanilamida i NED u kiselim uvjetima pri čemu nastaju obojeni azo spojevi (preuzeto i prilagođeno prema *Griess Reagent System*, 2019)



### 3.2.11 Određivanje aktivnosti enzima arginaze

Kako bi izmjerili koncentraciju enzima Arg-1 u pojedinim tkivima obrađenih laboratorijskih životinja, koristila sam komplet za ispitivanje arginazne aktivnosti (engl. *Arginase activity assay kit, Sigma-Aldrich*), proizvođača Merck, SAD. Komplet mjeri aktivnost Arg-1 katalizacijom hidrolize arginina u ornitin i ureu. Dobivena urea reagira s reagensom za razvoj boje te se prema jačini obojenja određuje prisutnost Arg-1. Jedna jedinica Arg-1 je količina enzima koja će pretvoriti 1,0  $\mu\text{mol}$  arginina u ornitin i ureu tijekom jedne minute pri pH 9,5 i 37 °C. Priprema i sastav otopina opisani su u Tablici 9.

**Tablica 9.** Otopine i način pripreme otopina za određivanje aktivnosti enzima arginaze u tkivima obrađenih laboratorijskih životinja

| Otopine                       | Dobivanje otopina   |
|-------------------------------|---|
| 5x supstratni pufer           | 8 $\mu\text{L}$ pufera za arginin + 2 $\mu\text{L}$ Mn otopine  |
| Otopina uree                  | 100 $\mu\text{L}$ otopine A (dobiveni u kompletu) + 100 $\mu\text{L}$ otopine B (dobiveni u kompletu) |
| Standardna radna otopina uree | 24 $\mu\text{L}$ 50 mg/dL urea standarda + 176 $\mu\text{L}$ dH <sub>2</sub> O                        |

Arg-1 aktivnost izmjerila sam iz homogeniranih tkiva bubrega i slezene, razrjeđenja 40x. U mikrotitarsku pločicu ispipetirala sam 40  $\mu\text{L}$  svakog uzorka, 50  $\mu\text{L}$  radne otopine urea standarda i 50  $\mu\text{L}$  ultračiste vode, sve u duplikatu. U dvije jažice dodala sam svaki uzorak, te sam u prvu jažicu dodala 10  $\mu\text{L}$  5x supstratnog pufera, dok je druga jažica predstavljala slijepu probu. Zatim sam pločicu stavila 1 minutu na tresilicu, a potom ju inkubirala 2 sata na 37 °C. Radi zaustavljanja Arg-1 aktivnosti u sve jažice dodala sam 200  $\mu\text{L}$  otopine uree, a u jažice koje predstavljaju slijepu probu dodala još 10  $\mu\text{L}$  5x supstratnog pufera kako bi volumen u jažicama bio isti. Pločicu sam lagano protresla te ju inkubirala 60 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbanciju sam mjerila na spektrofotometru (Ao Absorbance Microplate Reader, proizvođač: Azure Biosystems, SAD) na valnoj duljini od 430 nm, a aktivnost Arg-1 odredila sljedećom formulom [10]:

$$\text{aktivnost Arg} - 1 = \frac{A_{\text{uzorka}} - A_{\text{slijepa proba}}}{A_{\text{urea standard radne otopine}} - A_{\text{vode}}} \times \frac{(1 \text{ mM} \times 50 \times 10^3)}{(V_{\text{uzorka u jažicama}} \times T)} \quad [10]$$

pri čemu su:

1 mM = koncentracija urea standarda

50 = volumen reakcije u  $\mu\text{L}$

$10^3$  = konverzija mjerne jedinice iz mM u  $\mu\text{M}$

### 3.2.11.1 Određivanje koncentracije upalnih citokina

Prilikom ispitivanja koncentracije citokina u serumu obrađenih laboratorijskih životinja koristila sam komplet za upalne citokine (engl. *Rat Inflammatory Cytokines Multi-Analyte ELISArray kit*) proizvođača Qiagen, Njemačka. Komplet primjenjuje ELISA *sendvič* tehniku. Mikrotitarska pločica dobivena u kompletu prethodno je prevučena s dvanaest protutijela specifičnih za upalne citokine: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , faktor stimulacije granulocitno-makrofagnih kolonija (engl. *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*, GM-CSF) i kemokinski ligand 5 (engl. *chemokine ligand 5*, CCL5 or *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*, RANTES). Priprema i sastav otopina opisani su u Tablici 10.

**Tablica 10.** Otopine i način pripreme otopina za određivanje koncentracije upalnih citokina u serumu obrađenih laboratorijskih životinja

| Otopine                             | Dobivanje otopina  |
|-------------------------------------|--|
| <i>Assay buffer</i>                 | 0,6 mL 10% BSA otopine + 29,4 mL <i>Assay buffer stock</i>                                 |
| <i>Sample dilution buffer</i>       | 2 mL 10% BSA otopine + 18 mL <i>Sample Dilution buffer stock</i>                           |
| Otopina za ispiranje                | 50 mL koncentrirane otopine za ispiranje + 450 mL $\text{dH}_2\text{O}$                    |
| Razrijeđena detekcijska protutijela | u svaku epruvetu s detekcijskim protutijelima dodati 855 $\mu\text{L}$ <i>Assay buffer</i> |
| Avidin-HRP radna otopina            | 11 $\mu\text{L}$ Avidin-HRP konjugata + 11 mL <i>Assay buffer</i>                          |

Kratica: Avidin-HRP - avidin-konjugiran s hrenovom peroksidazom

Prvo sam priredila pozitivnu i negativnu kontrolu. U pripremi pozitivne kontrole u jednu Eppendorf epruvetu složila sam koncentrirani antigen standardni koktel tako što sam 10  $\mu\text{L}$  svih 12 antigen standarda otopila u 880  $\mu\text{L}$  *Sample dilution buffer*. Za dobivanje konačnog antigen standardnog koktela, 200  $\mu\text{L}$  koncentriranog antigen standardnog koktela razrijedila sam u 800  $\mu\text{L}$  *Sample dilution buffer*. Zatim sam u sve jažice mikrotitarske pločice ispipetirala

po 50  $\mu\text{L}$  *Assay buffer*. Negativna kontrola predstavljala je A red mikrotitarske pločice u koji sam dodala 50  $\mu\text{L}$  *Sample dilution buffer*, a pozitivna kontrola predstavljala je H red mikrotitarske pločice gdje sam dodala 50  $\mu\text{L}$  pripremljenog konačnog antigen standardnog koktela. U sve jažice od B do G reda dodala sam 50  $\mu\text{L}$  uzorka seruma, razrjeđenja 2x, protresla pločicu 10 sekundi te inkubirala 2 sata na sobnoj temperaturi. Pomoću staničevine uklonila sam svu tekućinu iz jažica, a potom pločicu isprala 3 puta s 350  $\mu\text{L}$  otopine za ispiranje. Zatim sam u odgovarajuće jažice s uzorcima dodala 100  $\mu\text{L}$  odgovarajućih razrijeđenih detekcijskih protutijela, protresla pločicu 10 sekundi te inkubirala 1 sat na sobnoj temperaturi. Po isteku inkubacije ponovila sam postupak ispiranja 3 puta. U svaku jažicu dodala sam 100  $\mu\text{L}$  radne otopine avidina-konjugiranog s hrenovom peroksidazom (engl. *horseradish peroxidase*, HRP), protresla pločicu 10 sekundi te inkubirala 30 minuta na sobnoj temperaturi bez prisutnosti svjetla. Pomoću staničevine uklonila sam svu tekućinu iz jažica te ponovila postupak ispiranja 4 puta. Potom sam u sve jažice stavila 100  $\mu\text{L}$  *Development Solution* i inkubirala 15 minuta na sobnoj temperaturi bez prisutnosti svjetla. Nakon razvitka plavog obojenja u svaku jažicu dodala sam 100  $\mu\text{L}$  *Stop Solution* čime je došlo do nastanka žutog obojenja. Po završetku pipetiranja apsorbanciju sam mjerila na spektrofotometru (Ao Absorbance Microplate Reader, proizvođač: Azure Biosystems, SAD) na valnoj duljini od 450 nm.

Kako bih dobila korigiranu vrijednost apsorbancija, apsorbanciju sam izmjerila i pri 540 nm. Uobičajene vrijednosti apsorbancije uzorka trebaju varirati od 0,00 do 2,50.

### 3.2.11.2 Određivanje koncentracije hepcidina

Prilikom ispitivanja koncentracije hepcidina u serumu obrađenih laboratorijskih životinja koristila sam komplet za hepcidin (engl. *Enzyme-linked immunosorbent assay kit for hepcidin*) proizvođača Cloud-Clone Corp., SAD. Komplet primjenjuje ELISA kompetitivnu tehniku. Mikrotitarska pločica, dobivena u kompletu, prethodno je prevučena s protutijelima specifičnim za hepcidin. Priprema i sastav otopina opisani su u Tablici 11.

**Tablica 11.** Otopine i način pripreme otopina za određivanje koncentracije hepcidina u serumu obrađenih laboratorijskih životinja.

| Otopine              | Dobivanje otopina   |
|----------------------|---|
| Radna otopina A      | <i>Detection Reagent A + Assay Diluent A</i> u omjeru 100:1         |
| Radna otopina B      | <i>Detection Reagent B + Assay Diluent B</i> u omjeru 100:1         |
| Otopina za ispiranje | 20 mL koncentrirane otopine za ispiranje + 580 mL dH <sub>2</sub> O |

Prvo sam pripremila standard za izradu baždarne krivulje. Označila sam 5 Eppendorf epruveta sljedećim koncentracijama standarda: 33,33 ng/mL, 11,11 ng/mL, 3,70 ng/mL, 1,23 ng/mL i 0 ng/mL. *Stock Standard* pripremila sam otapajući dobiveni standard s 500 µL *Standard Diluent* te dobila koncentraciju od 100 ng/mL. U označene epruvete ispipetirala sam 600 µL *Standard Diluent*, a zatim sam provela četiri serije dvostrukih razrjeđenja prebacujući 300 µL od najveće prema najnižoj koncentraciji počevši od *Stock Standard* sve do četvrt epruvete (1,23 ng/mL koncentracije standarda). Zadnja epruveta, koncentracije 0 ng/mL, sadržavala je samo *Standard Diluent*, a predstavljala je slijepu probu. Seriju dvostrukih razrjeđenja za izradu baždarne krivulje napravila sam u duplikatu te na mikrotitarsku pločicu ispipetirala 50 µL svakog standarda. U ostale jažice dodala sam 50 µL uzorka seruma razrjeđenih 2x, a zatim u jažice sa standardom i uzorcima dodala radnu otopinu A, lagano protresla te inkubirala sat vremena na 37 °C. Pomoću staničevine uklonila sam svu tekućinu iz jažica, a potom pločicu isprala 3 puta s 350 µL otopine za ispiranje. Nakon ispiranja, u sve jažice dodala sam 100 µL radne otopine B te inkubirala 30 minuta na 37 °C. Pomoću staničevine uklonila sam svu tekućinu iz jažica te ponovila postupak ispiranja 5 puta. Zatim sam u sve jažice dodala 90 µL *Substrate solution* te inkubirala 10-20 minuta na 37 °C bez prisustva svjetlosti. Nakon što je tekućina poplavila, u sve jažice dodala sam 50 µL *Stop solution* čime je otopina poprimila žuto obojenje. Po završetku pipetiranja, apsorbanciju sam mjerila na spektrofotometru (Ao Absorbance Microplate Reader, proizvođač: Azure Biosystems, SAD) na valnoj duljini od 450 nm.

Prilikom određivanja koncentracije hepcidina u serumu, odredila sam jednadžbu pravca iz standardne krivulje ovisnosti logaritamske koncentracije hepcidina o apsorbanciji, a koncentraciju izrazila u ng/mL.

### 3.2.11.3 Određivanje koncentracije feritina

Prilikom ispitivanja koncentracije feritina u serumu obrađenih laboratorijskih životinja, koristila sam komplet za feritin (engl. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Ferritin*) proizvođača Cloud-Clone Corp., SAD. Komplet primjenjuje ELISA *sendvič* tehniku. Mikrotitarska pločica, dobivena u kompletu, prethodno je prevučena protutijelima specifičnim za feritin. Priprema i sastav otopina opisani su u Tablici 12.

**Tablica 12.** Otopine i način pripreme otopina za određivanje koncentracije feritina u serumu obrađenih laboratorijskih životinja

| Otopine              | Dobivanje otopina   |
|----------------------|---|
| Radna otopina A      | <i>Detection reagent A</i> + <i>Assay Diluent A</i> u omjeru 100:1  |
| Radna otopina B      | <i>Detection reagent B</i> + <i>Assay Diluent B</i> u omjeru 100:1  |
| Otopina za ispiranje | 20 mL koncentrirane otopine za ispiranje + 580 mL dH <sub>2</sub> O |

Prvo sam pripremila standard za izradu baždarne krivulje. Označila sam 7 Eppendorf epruveta sljedećim koncentracijama standarda: 100 ng/mL, 50 ng/mL, 25 ng/mL, 12,5 ng/mL, 6,25 ng/mL, 3,12 ng/mL i 0 ng/mL. *Stock Standard* pripremila sam otapajući dobiveni standard s 1000 µL *Standard Diluent* te dobila koncentraciju od 200 ng/mL standarda. U označene epruvete ispipetirala sam 500 µL *Standard Diluent*, a zatim sam provela šest serija dvostrukih razrjeđenja, prebacujući 500 µL od najveće prema najnižoj koncentraciji počevši od *Stock Standard* sve do šeste epruvete (3,12 ng/mL koncentracija standarda). Zadnja epruveta, koncentracije 0 ng/mL, sadržavala je samo *Standard Diluent*, a predstavljala je slijepu probu. Seriju dvostrukih razrjeđenja za izradu baždarne krivulje napravila sam u duplikatu te na mikrotitarsku pločicu ispipetirala 100 µL svakog standarda. U ostale jažice dodala sam 100 µL uzorka seruma razrjeđenog 2x, te pločicu inkubirala sat vremena na 37 °C. Uklonila sam svu tekućinu iz jažica, a potom u sve jažice dodala 100 µL radne otopine A, lagano protresla te inkubirala sat vremena na 37 °C. Zatim sam ponovno uklonila svu tekućinu iz jažica, te potom pločicu isprala 3 puta s 350 µL otopine za ispiranje. Nakon ispiranja, u sve jažice dodala sam 100 µL radne otopine B te inkubirala 30 minuta na 37 °C. Po isteku inkubacije uklonila sam svu tekućinu iz jažica te ponovila postupak ispiranja 5 puta. Zatim sam u sve jažice dodala 90

$\mu\text{L}$  *Substrate solution* te inkubirala 20 minuta na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  bez prisustva svjetlosti. Nakon što se razvilo plavo obojenje u sve jažice dodala sam  $50\ \mu\text{L}$  *Stop solution* čime je došlo do nastanka žutog obojenja. Po završetku pipetiranja, apsorbanciju sam mjerila na spektrofotometru (Ao Absorbance Microplate Reader, proizvođač: Azure Biosystems, SAD) na valnoj duljini od  $450\ \text{nm}$ .

Prilikom određivanja koncentracije feritina u serumu, odredila sam jednadžbu pravca iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji standardne otopine feritina, a koncentraciju izrazila u  $\text{ng/mL}$ .

### 3.2.12 Statistička obrada podataka

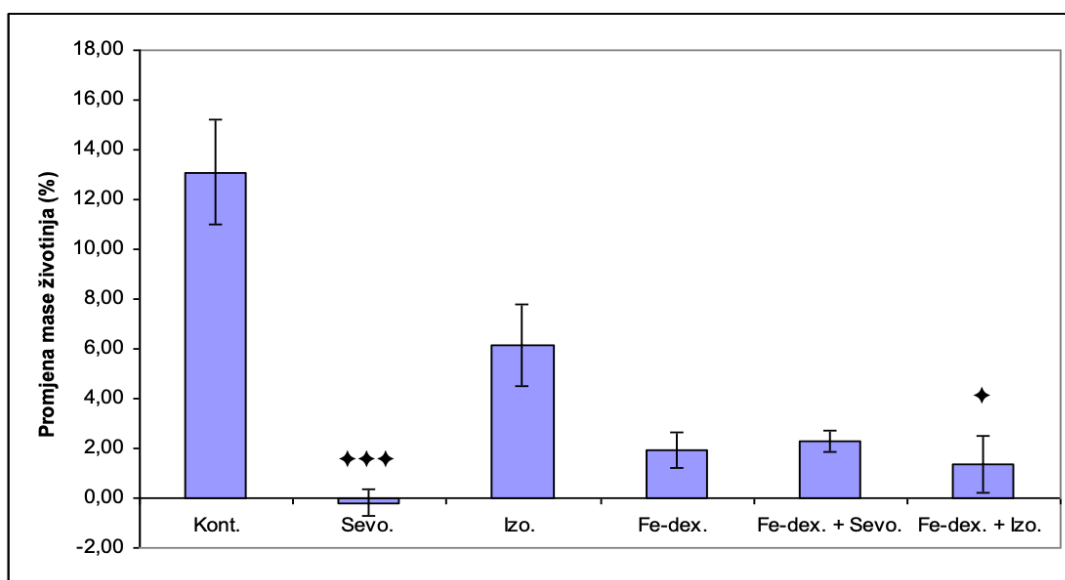
Prilikom obrade podataka korišten je računalni program Microsoft Excel (2019), a statistička analiza dobivenih rezultata obrađena je pomoću programa STATISTICA 13 (StatSoft, Tulsa, OK, USA), uz razinu značajnosti  $P \leq 0,05$ . Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost (SV) uzimajući u obzir standardnu pogrešku (SP),  $SV \pm SP$ , a analiza podataka provedena je s Kruskal-Wallis testom. Dodatna analiza rezultata obuhvaćala je višestruku usporedbu srednjih vrijednosti uzoraka. Rezultati su prikazani grafički pomoću box-plota i tablično.



## 4 REZULTATI

### 4.1 Promjena tjelesne mase životinja

Kako bih procijenila toksičnost inhalacijskih anestetika, željezo dekstrana i njihovih kombinacija na razini cjelokupnog organizma jednom tjedno pratila sam promjenu tjelesne mase životinja. Rezultati promjene tjelesnih masa životinja prikazani su na Slici 7 na kojoj su istaknute značajno niže promjene masa u skupinama obrađenim sevofluranom ( $P < 0,001$ ) i željezo dekstranom + izofluranom ( $P < 0,05$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu.



**Slika 7.** Promjena tjelesnih masa štakora obrađenih inhalacijskim anestheticima i željezo dekstranom te njihovom kombinacijom

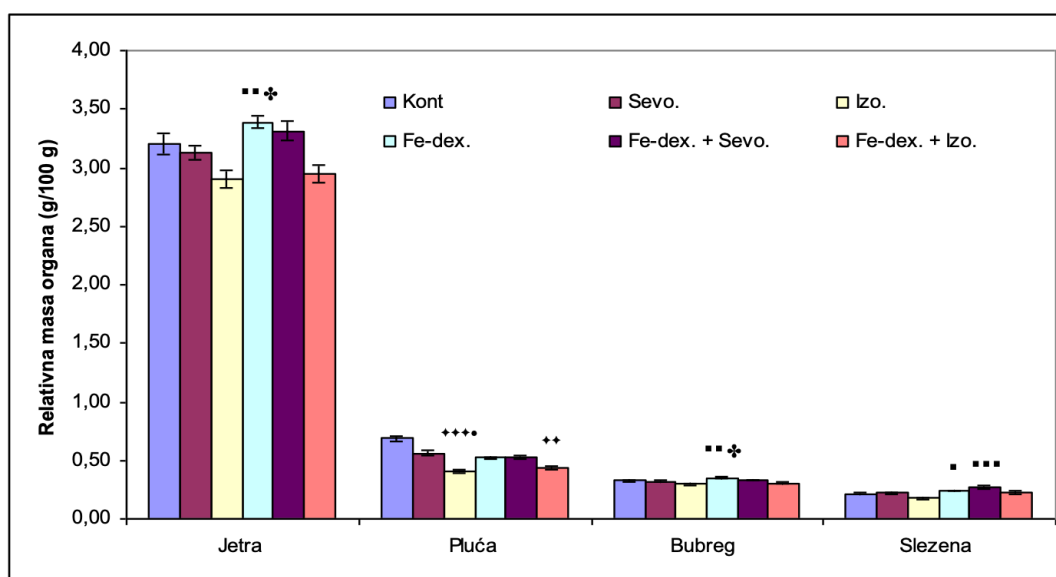
Životinje (N=8) su obrađene *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izložene 2,4% sevofluranom i 1,3% izofluranom te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SP$ .

\*Statistički značajno u usporedbi s kontrolnom skupinom (\* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, Fe-dex. – željezo dekstran, Fe-dex. + Sevo. – željezo dekstran i sevofluran, Fe-dex. + Izo. – željezo dekstran i izofluran.

## 4.2 Relativna težina organa

Pored ukupne tjelesne mase, pratila sam i relativnu težina pojedinih organa kako bih procijenila nastalu upalu. Rezultati relativne težine organa jetre, pluća, bubrega i slezene prikazani su na Slici 8. Relativna težina jetre u skupini obrađenoj željezo dekstranom statistički je značajno viša u odnosu na skupine obrađene izofluranom ( $P < 0,01$ ) i željezo dekstranom + izofluranom ( $P < 0,05$ ). Relativna težina pluća u skupinama obrađenim izofluranom ( $P < 0,001$ ) i željezo dekstranom + izofluranom ( $P < 0,01$ ) statistički je značajno niža u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je skupina obrađena izofluranom statistički značajno niža i u odnosu na skupinu obrađenu sevofluranom ( $P < 0,05$ ). Relativna težina bubrega u skupini obrađenoj željezo dekstranom statistički je značajno viša u odnosu na skupine obrađene izofluranom ( $P < 0,01$ ) i željezo dekstranom + izofluranom ( $P < 0,05$ ). Relativna težina slezene u skupinama obrađenim željezo dekstranom ( $P < 0,01$ ) i željezo dekstranom + sevofluranom ( $P < 0,001$ ) statistički je značajno viša u odnosu na skupinu obrađenu izofluranom.



**Slika 8.** Relativna težina organa jetre, pluća, bubrega i slezene štakora obrađenih inhalacijskim anestheticima i željezo dekstranom te njihovom kombinacijom

Životinje ( $N=8$ ) su obrađene *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izložene 2,4% sevofluranom i 1,3% izofluranom te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SP$ .

\*Statistički značajno u usporedbi s kontrolnom skupinom (\*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ );

• Statistički značajno u usporedbi sa skupinom izloženom sevofluranu ( $P < 0,05$ );

■ Statistički značajno u usporedbi sa skupinom izloženom izofluranu (■ $P < 0,05$ ; ■■ $P < 0,01$ ; ■■■ $P < 0,001$ );

\*Statistički značajno u usporedbi sa skupinom obrađenom željezo dekstranom i izofluranom (\* $P < 0,05$ ).

## Nastavak Slike 8.

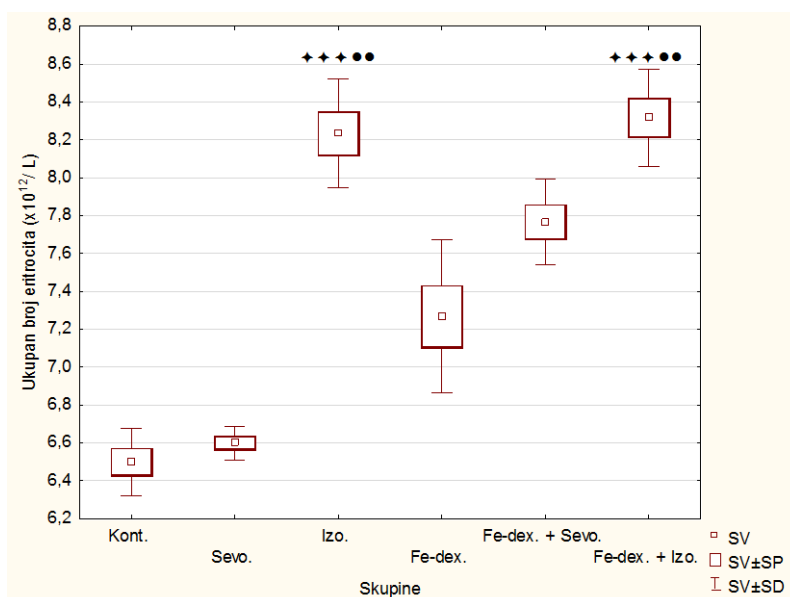
Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, Fe-dex. – željezo dekstran, Fe-dex. + Sevo. – željezo dekstran i sevofluran, Fe-dex. + Izo. – željezo dekstran i izofluran.

### 4.3 Rezultati hematoloških parametara

Kako bih procijenila potencijalnu toksičnost inhalacijskih anestetika, željezo dekstrana i njihovih kombinacija na eritrocite i eritropoezu te utvrdila potencijalna proupalna svojstva mjerila sam hematološke parametre u krvi.

#### 4.3.1 Analiza ukupnog broja eritrocita

Ukupan broj eritrocita u skupinama obrađenim izofluranom i željezo dekstranom + izofluranom statistički je značajno veći u odnosu na skupinu obrađenu sevofluranom i kontrolnu skupinu (Slika 9).



**Slika 9.** Ukupan broj eritrocita u krvi štakora obrađenih inhalacijskim anestetici i željezo dekstranom te njihovom kombinacijom

Životinje (N=8) su obrađene *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izložene 2,4% sevofluranom i 1,3% izofluranom te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SP.

♦ Statistički značajno u usporedbi s kontrolnom skupinom (♦♦♦ $P < 0,001$ );

• Statistički značajno u usporedbi sa skupinom izloženom sevofluranu (♦♦ $P < 0,01$ ).

Nastavak Slike 9.

Kratice: *ip* – intraperitonealno, *SV* – srednja vrijednost, *SP* – standardna pogreška, *SD* – standardna devijacija, *Kont.* – kontrola, *Sevo.* – sevofluran, *Izo.* – izofluran, *Fe-dex.* – željezo dekstran, *Fe-dex. + Sevo.* – željezo dekstran i sevofluran, *Fe-dex. + Izo.* – željezo dekstran i izofluran.

#### 4.3.2 Analiza ostalih hematoloških parametara

Rezultati ostalih hematoloških parametara prikazani su u Tablici 13. Najveće promjene u ostalim hematološkim parametrima vidljive su u skupinama obrađenim izofluranom i željezo dekstranom + izofluranom. Kod skupine izložene izofluranom vrijednost hemoglobina, postotak hematokrita i MCV su statistički značajno viši u odnosu na kontrolnu skupinu, dok su vrijednosti hemoglobina i hematokrita više i u odnosu na skupinu izloženu sevofluranom. Koncentracija MCHC je statistički značajno niža u skupini izloženoj izofluranom kao i u skupini obrađenoj željezo dekstranom + izofluranom u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je kod skupine obrađene željezo dekstranom + izofluranom niža i u odnosu na skupine obrađene sevofluranom, željezo dekstranom i željezo dekstranom + sevofluranom. Također, i kod skupine obrađene željezo dekstranom + izofluranom vrijednost hemoglobina, postotak hematokrita i MCV su statistički značajno viši u odnosu na kontrolnu skupinu. U toj skupini su vrijednost hemoglobina i postotak hematokrita statistički značajno viši i u odnosu na skupinu izloženu sevofluranom, dok je vrijednost MCH statistički značajno niža u odnosu na kontrolnu skupinu i skupinu izloženu sevofluranom. Promjene u razini hemoglobina pokazala je i skupina obrađena željezo dekstranom + sevofluranom gdje je razina hemoglobina bila statistički značajno viša u odnosu na kontrolnu skupinu i skupinu obrađenu sevofluranom.

**Tablica 13.** Vrijednosti ostalih hematoloških parametara iz krvi štakora obrađenih inhalacijskim anestetikima i željezo dekstranom te njihovom kombinacijom

| <b>ANALIZA OSTALIH HEMATOLOŠKIH POKAZATELJA (SV ± SP)</b> |                              |                              |                            |                              |                                 |                |
|---|------------------------------|------------------------------|----------------------------|------------------------------|---------------------------------|----------------|
| <b>SKUPINE</b>  | <b>Hemoglobin (g/L)</b>      | <b>Hematokrit (%)</b>        | <b>MCV (fL)</b>            | <b>MCH (pg)</b>              | <b>MCHC (g/L)</b>               | <b>RDW (%)</b> |
| <b>Kontrolna skupina</b>                                  | 130,33 ± 2,69                | 35,33 ± 0,56                 | 54,33 ± 0,21               | 20,33 ± 0,21                 | 370,67 ± 4,23                   | 13,33 ± 0,42   |
| <b>Sevofluran</b>   | 132,33 ± 0,76                | 36,33 ± 0,21                 | 55,33 ± 0,21               | 20,00 ± 0,00                 | 361,00 ± 2,03                   | 13,67 ± 0,21   |
| <b>Izofluran</b>  | 156,33 ± 1,65 <sup>***</sup> | 46,33 ± 0,56 <sup>****</sup> | 56,00 ± 0,00 <sup>**</sup> | 19,00 ± 0,00                 | 339,00 ± 1,46 <sup>†</sup>      | 13,00 ± 0,00   |
| <b>Fe-dex.</b>  | 143,67 ± 3,39                | 40,00 ± 0,97                 | 55,00 ± 0,00               | 19,67 ± 0,21                 | 359,33 ± 3,31                   | 12,33 ± 0,21   |
| <b>Fe-dex. + sevofluran</b>                               | 154,67 ± 0,92 <sup>**</sup>  | 42,67 ± 0,56                 | 55,00 ± 0,00               | 19,67 ± 0,21                 | 360,33 ± 2,14                   | 12,67 ± 0,21   |
| <b>Fe-dex. + izofluran</b>                                | 154,17 ± 2,27 <sup>**</sup>  | 46,83 ± 0,60 <sup>****</sup> | 56,00 ± 0,00 <sup>**</sup> | 18,17 ± 0,17 <sup>****</sup> | 330,00 ± 0,82 <sup>****▲♦</sup> | 12,33 ± 0,21   |

Životinje (N=8) su obrađene *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izložene 2,4% sevofluranom i 1,3% izofluranom te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SP.

<sup>†</sup> Statistički značajno u usporedbi s kontrolnom skupinom (<sup>†</sup>*P* < 0,05; <sup>\*\*</sup>*P* < 0,01; <sup>\*\*\*</sup>*P* < 0,001);

<sup>•</sup> Statistički značajno u usporedbi sa skupinom izloženom sevofluranu (<sup>•</sup>*P* < 0,05; <sup>\*\*</sup>*P* < 0,01);

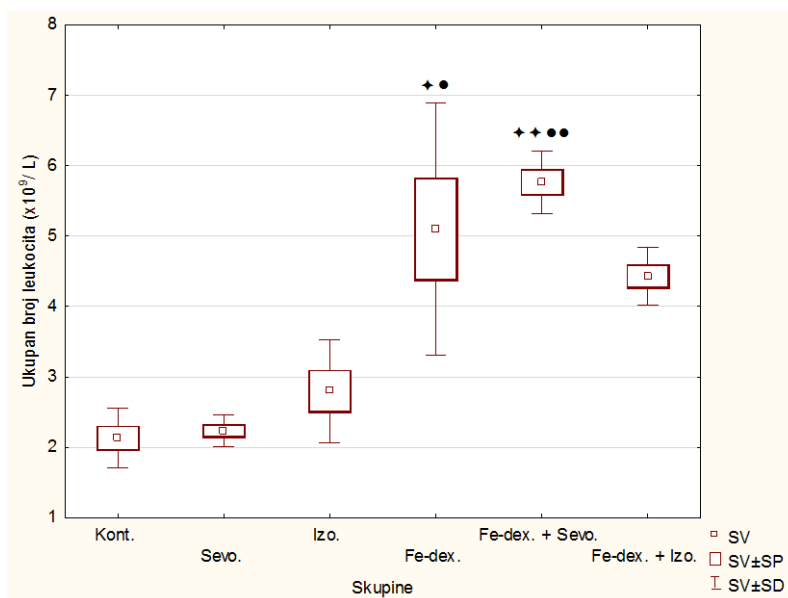
<sup>▲</sup> Statistički značajno u usporedbi sa skupinom obrađenom željezo dekstranom (<sup>▲</sup>*P* < 0,05);

<sup>♦</sup> Statistički značajno u usporedbi sa skupinom obrađenom željezo dekstranom i sevofluranom (<sup>♦</sup>*P* < 0,05).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, MCV – volumen eritrocita, MCH – sadržaj hemoglobina u eritrocitima, MCHC – koncentracija hemoglobina u eritrocitima, RDW – raspodjela eritrocita po veličini, Fe-dex. – željezo dekstran.

### 4.3.3 Analiza ukupnog broj leukocita

Ukupan broj leukocita u skupinama obrađenim željezo dekstranom i željezo dekstranom + sevofluranom statistički je značajno veći u odnosu na skupinu obrađenu sevofluranom i kontrolnu skupinu (Slika 10).



**Slika 10.** Ukupan broj leukocita štakora obrađenih inhalacijskim anestetici i željezo dekstranom te njihovom kombinacijom

Životinje (N=8) su obrađene *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izložene 2,4% sevofluranom i 1,3% izofluranom te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SP.

† Statistički značajno u usporedbi s kontrolnom skupinom († $P < 0,05$ ; †† $P < 0,01$ );

• Statistički značajno u usporedbi sa skupinom izloženom sevofluranu (• $P < 0,05$ ; •• $P < 0,01$ );

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, Fe-dex. – željezo dekstran, Fe-dex. + Sevo. – željezo dekstran i sevofluran, Fe-dex. + Izo. – željezo dekstran i izofluran.

### 4.3.4 Analiza diferencijalne krvne slike

Rezultati diferencijalne krvne slike podrazumijevaju postotke neutrofila, limfocita, monocita i eozinofila, a prikazani su u Tablici 1. Postotak limfocita u skupini obrađenoj izofluranom statistički je značajno manji u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,05$ ). Postoci ostalih leukocita nisu značajno promijenjeni ni u jednoj obrađenoj skupini.

**Tablica 14.** Analiza diferencijalne krvne slike štakora obrađenih inhalacijskim anestetima i željezo dekstranom te njihovom kombinacijom

| <b>ANALIZA DIFERENCIJALNE KRVNE SLIKE (SV ± SP)</b> |                       |                      |                     |                       |
|---|-----------------------|----------------------|---------------------|-----------------------|
| <b>SKUPINE</b>                                      | <b>Neutrofili (%)</b> | <b>Limfociti (%)</b> | <b>Monociti (%)</b> | <b>Eozinofili (%)</b> |
| <b>Kontrolna skupina</b>                            | 31,00 ± 2,19          | 68,00 ± 2,56         | 1,00 ± 0,00         | 1,00 ± 0,00           |
| <b>Sevofluran</b>                                   | 35,33 ± 1,84          | 63,33 ± 1,65         | 1,50 ± 0,29         | 0,00 ± 0,00           |
| <b>Izofluran</b>                                    | 47,33 ± 2,02          | 52,00 ± 2,19*        | 1,00 ± 0,00         | 1,00 ± 0,00           |
| <b>Fe-dex.</b>                                      | 33,33 ± 4,02          | 65,67 ± 4,20         | 1,50 ± 0,29         | 0,00 ± 0,00           |
| <b>Fe-dex. + sevofluran</b>                         | 40,00 ± 2,28          | 60,00 ± 2,28         | 0,00 ± 0,00         | 0,00 ± 0,00           |
| <b>Fe-dex. + izofluran</b>                          | 39,83 ± 6,69          | 60,00 ± 6,78         | 1,00 ± 0,00         | 0,00 ± 0,00           |

Životinje (N=8) su obrađene *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izložene 2,4% sevofluranom i 1,3% izofluranom te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SP.

\*Statistički značajno u usporedbi s kontrolnom skupinom (\* $P < 0,05$ ).

Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Fe-dex. – željezo dekstran.

#### 4.4 Analiza biokemijskih parametara

Kako bih procijenila oštećenje bubrega i jetre, promjene u enzimima, proteinima, metabolitima i supstratima, pored hematoloških parametara analizirala sam i biokemijske parametre. Rezultati analize enzima i proteina prikazani su u Tablici 15, dok su metaboliti i supstrati prikazani u Tablici 16. Koncentracija alkalne fosfataze u skupini obrađenoj željezo dekstranom statistički je značajno veća u odnosu na skupine obrađene sevofluranom ( $P < 0,05$ ) i željezo dekstranom + izofluranom ( $P < 0,05$ ). Koncentracija alanin aminotransferaze u skupinama obrađenim željezo dekstranom i željezo dekstranom + sevofluranom statistički je značajno niža u odnosu na skupinu izloženu izofluranom i kontrolnu skupinu. Koncentracija amilaze u skupini obrađenoj željezo dekstranom + sevofluranom statistički je niža u odnosu na skupine izložene sevofluranom ( $P < 0,01$ ), izofluranom ( $P < 0,01$ ) i na kontrolnu skupinu ( $P <$

0,01). Koncentracija albumina u skupinama obrađenim sevofluranom i željezo dekstranom + izofluranom statistički je značajno niža u odnosu na kontrolnu skupinu i skupinu obrađenu izofluranom. Koncentracija ukupnih proteina u skupini obrađenoj izofluranom statistički je značajno veća u odnosu na skupine obrađene sevofluranom ( $P < 0,05$ ) i željezo dekstranom + izofluranom ( $P < 0,05$ ). Koncentracija globulina u skupini obrađenoj željezo dekstranom + sevofluranom statistički je značajno veća u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,05$ ). Rezultati metabolita i supstrata pokazuju da je koncentracija dušika uree u krvi u skupini izloženoj sevofluranom statistički značajno viša u odnosu na skupinu obrađenu željezo dekstranom + sevofluranom ( $P < 0,01$ ). Koncentracija glukoze u krvi u skupinama obrađenim izofluranom ( $P < 0,05$ ) i željezo dekstranom + izofluranom ( $P < 0,001$ ) statistički je značajno veća u odnosu na skupinu izloženu sevofluranom, dok je u skupini obrađenoj željezo dekstranom + izofluranom statistički veća i u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,01$ ). Koncentracija fosfora u skupini izloženoj sevofluranom je statistički značajno niža u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,05$ ) i skupinu obrađenu željezo dekstranom + izofluranom ( $P < 0,05$ ). Koncentracija iona natrija i kalija u skupini izloženoj izofluranom statistički je značajno veća u odnosu na skupinu izloženu sevofluranom ( $P < 0,05$ ). Također, koncentracija kalija u skupini obrađenoj željezo dekstranom statistički je značajno niža u odnosu na skupinu obrađenu izofluranom ( $P < 0,001$ ) i željezo dekstranom + izofluranom ( $P < 0,001$ ). Koncentracija ukupnog bilirubina, kreatinina i iona kalcija nije bila statistički značajno promijenjena ni u jednoj obrađenoj skupini.



**Tablica 15.** Biokemijske vrijednosti enzima i proteina iz krvi štakora obrađenih inhalacijskim anesteticiima i željezo dekstranom te njihovom kombinacijom

| ANALIZA BIOKEMIJSKIH PARAMETARA – ENZIMI I PROTEINI (X ± SP) |                             |                             |                               |                             |                            |                           |
|--|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| SKUPINE  | ALP (U/L)                   | ALT (U/L)                   | AMY (U/L)                     | ALB (g/L)                   | TP (g/L)                   | GLOB (g/L)                |
| Kontrolna skupina  | 150,00 ± 3,82               | 42,33 ± 1,48                | 670,67 ± 12,79                | 57,50 ± 0,99                | 71,67 ± 2,06               | 14,00 ± 0,89              |
| Sevofluran   | 123,67 ± 2,64               | 34,00 ± 0,73                | 708,00 ± 30,01                | 50,67 ± 0,92 <sup>♦♦■</sup> | 65,33 ± 0,92               | 14,67 ± 0,84              |
| Izofluran  | 154,67 ± 4,42               | 42,33 ± 1,17                | 671,00 ± 0,97                 | 56,33 ± 0,76                | 72,67 ± 1,12 <sup>•*</sup> | 16,00 ± 0,97              |
| Fe-dex.  | 164,33 ± 9,12 <sup>•*</sup> | 31,00 ± 0,97 <sup>♦♦■</sup> | 538,67 ± 10,70                | 54,67 ± 0,42                | 72,33 ± 1,12               | 17,33 ± 1,38              |
| Fe-dex. + sevofluran   | 132,67 ± 5,06               | 28,33 ± 1,73 <sup>♦♦■</sup> | 487,00 ± 20,12 <sup>♦♦■</sup> | 52,50 ± 1,20                | 72,83 ± 1,47               | 20,17 ± 1,38 <sup>♦</sup> |
| Fe-dex. + izofluran  | 118,00 ± 7,96               | 39,00 ± 0,73                | 561,00 ± 28,22                | 50,33 ± 0,21 <sup>♦♦■</sup> | 65,33 ± 0,92               | 15,00 ± 0,97              |

Životinje (N=8) su obrađene *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izložene 2,4% sevofluranom i 1,3% izofluranom te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SP.

♦Statistički značajno u usporedbi s kontrolnom skupinom (♦*P* < 0,05; ♦♦*P* < 0,01);

• Statistički značajno u usporedbi sa skupinom izloženom sevofluranu (•*P* < 0,05);

■ Statistički značajno u usporedbi sa skupinom izloženom izofluranu (■*P* < 0,05, ■■*P* < 0,01);

\*Statistički značajno u usporedbi sa skupinom obrađenom željezo dekstranom i izofluranom (\**P* < 0,05).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, ALP – alkalna fosfataza, ALT – alanin aminotransferaza, AMY – amilaza, ALB – albumin, TP – ukupni protein, GLOB – globulin, Fe-dex. – željezo dekstran.

**Tablica 16.** Biokemijske vrijednosti metabolita i supstrata iz krvi štakora obrađenih inhalacijskim anestetima i željezo dekstranom te njihovom kombinacijom

| ANALIZA BIOKEMIJSKIH PARAMETARA – METABOLITI I SUPSTRATI (X ± SP) |               |               |              |                   |               |                           |                          |                         |
|---|---------------|---------------|--------------|-------------------|---------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|
| SKUPINE   | TBIL (μmol/L) | BUN (mmol/L)  | CRE (umol/L) | GLU (mmol/L)      | PHOS (mmol/L) | Ca <sup>2+</sup> (mmol/L) | Na <sup>+</sup> (mmol/L) | K <sup>+</sup> (mmol/L) |
| <b>Kontrolna skupina</b>  | 4,67 ± 0,21   | 7,03 ± 0,27   | 38,00 ± 3,52 | 15,4 ± 0,28       | 2,75 ± 0,03   | 2,59 ± 0,03               | 138,33 ± 1,73            | 5,77 ± 0,13             |
| <b>Sevofluran</b>   | 4,33 ± 0,21   | 6,63 ± 0,38♦♦ | 41,67 ± 5,35 | 10,67 ± 0,55      | 2,04 ± 0,05♦♦ | 2,52 ± 0,03               | 134,33 ± 0,76            | 5,17 ± 0,08             |
| <b>Izofluran</b>  | 4,67 ± 0,21   | 6,10 ± 0,33   | 38,67 ± 4,01 | 16,17 ± 0,39*     | 2,11 ± 0,15   | 2,46 ± 0,01               | 139,67 ± 0,76*           | 6,67 ± 0,35*            |
| <b>Fe-dex.</b>  | 5,00 ± 0,00   | 6,07 ± 0,44   | 38,33 ± 2,01 | 14,97 ± 0,44      | 2,34 ± 0,14   | 2,56 ± 0,04               | 136,33 ± 0,76            | 4,80 ± 0,10♦♦♦♦♦        |
| <b>Fe-dex. + Sevofluran</b>                                       | 4,50 ± 0,22   | 4,55 ± 0,34   | 44,17 ± 2,83 | 14,93 ± 0,55      | 2,47 ± 0,11   | 2,51 ± 0,10               | 136,67 ± 11,12           | 5,77 ± 0,15             |
| <b>Fe-dex. + Izofluran</b>  | 5,00 ± 0,00   | 5,33 ± 0,33   | 40,33 ± 2,08 | 19,37 ± 0,31♦♦♦♦♦ | 2,53 ± 0,08   | 2,53 ± 0,02               | 136,67 ± 0,56            | 6,33 ± 0,02             |

Životinje (N=8) su obrađene *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izložene 2,4% sevofluranom i 1,3% izofluranom te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SP.

♦Statistički značajno u usporedbi s kontrolnom skupinom (\**P* < 0,05; ♦♦*P* < 0,01);

• Statistički značajno u usporedbi sa skupinom izloženom sevofluranu (\**P* < 0,05; ♦♦♦*P* < 0,001);

▪ Statistički značajno u usporedbi sa skupinom izloženom izofluranu (♦♦♦♦*P* < 0,001);

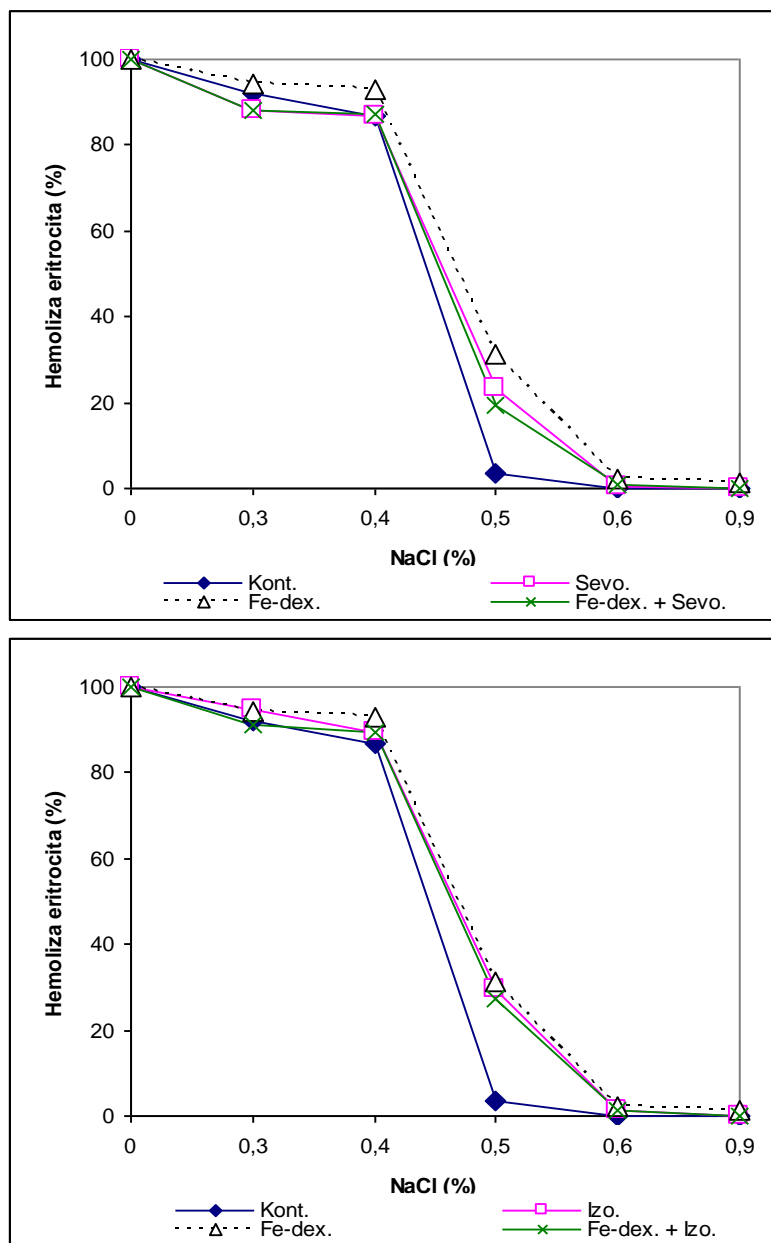
♦♦ Statistički značajno u usporedbi sa skupinom obrađenom željezo dekstranom i sevofluranom (♦♦*P* < 0,01);

\* Statistički značajno u usporedbi sa skupinom obrađenom željezo dekstranom i izofluranom (\**P* < 0,05; ♦♦♦*P* < 0,001).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, TBIL – ukupni bilirubin, BUN – dušik uree u krvi, CRE – kreatinin, GLU – glukoza u krvi, PHOS – fosfor, Ca<sup>2+</sup> – kalcij, Na<sup>+</sup> – natrij, K<sup>+</sup> – kalij, Fe-dex. – željezo dekstran.

#### 4.5 Rezultati osmotske otpornosti eritrocita

Kod štakora obrađenih inhalacijskim anestheticima, željezo dekstranom i njihovim kombinacijama, 100%-tna hemoliza eritrocita dogodila se pri 0,1% koncentraciji NaCl, dok se 50%-tna hemoliza dogodila pri koncentraciji od 0,45% NaCl (Slika 11).



**Slika 11.** Osmotska otpornost eritrocita štakora obrađenih inhalacijskim anestheticima i željezo dekstranom te njihovom kombinacijom

Životinje (N=8) su obrađene *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izložene 2,4% sevofluranom i 1,3% izofluranom te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SP.

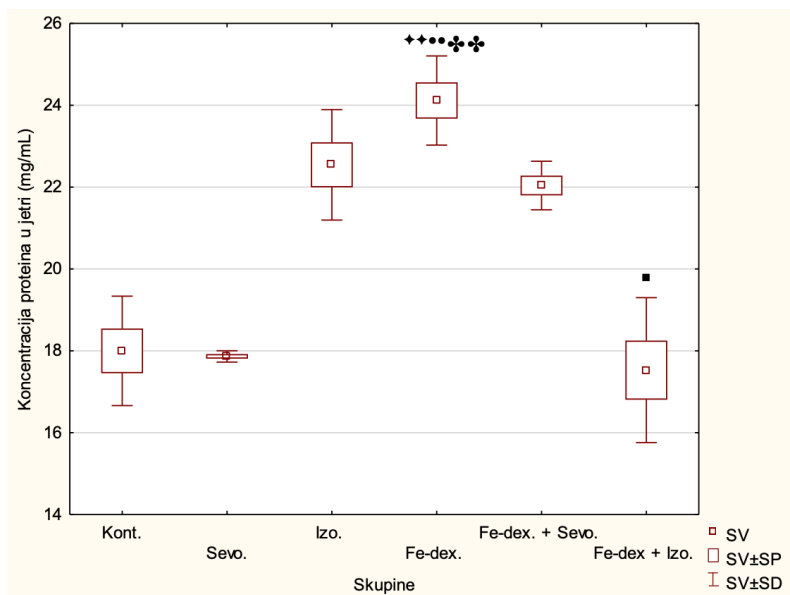
Kratice: *ip* – intraperitonealno, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, Fe-dex. – željezo dekstran, Fe-dex. + Sevo. – željezo dekstran i sevofluran, Fe-dex. + Izo. – željezo dekstran i izofluran.

#### 4.6 Rezultati parametra oksidacijskog stresa u perifernim organima

Kod štakora obrađenih inhalacijskim anestheticima, željezo dekstranom i njihovim kombinacijama analizirala sam proteine, malondialdehid i aktivnost antioksidacijskih enzima glutaciona, superoksid dismutaze i katalaze u tkivu jetre, pluća, bubrega i slezene.

##### 4.6.1 Parametri oksidacijskog stresa u jetri

Parametri oksidacijskog stresa mjereni u jetri prikazani su na Slici 12 i Slici 13. Koncentracija proteina u jetri kod skupine obrađene željezo dekstranom statistički je značajno viša u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,01$ ) te skupine obrađene sevofluranom ( $P < 0,01$ ) i željezo dekstranom + izofluranom ( $P < 0,01$ ). Također, koncentracija proteina u jetri kod skupine obrađene željezo dekstranom + izofluranom statistički je značajno niža u odnosu na skupinu obrađenu izofluranom ( $P < 0,05$ ). Koncentracija MDA u jetri kod skupine izložene željezo dekstranom statistički je značajno viša u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,05$ ). Također, koncentracija MDA u jetri kod skupina obrađenim željezo dekstranom + sevofluranom i željezo dekstranom + izofluranom statistički je značajno viša u odnosu na kontrolnu skupinu te skupinu izloženu izofluranom. Koncentracija GSH u jetri kod skupina obrađenih željezo dekstranom i željezo dekstranom + sevofluranom statistički je značajno niža u odnosu na skupine obrađene sevofluranom i izofluranom, dok je kod skupine obrađene željezo dekstranom + sevofluranom značajno niža i u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,05$ ). Aktivnost SOD u jetri kod skupina obrađenih sevofluranom ( $P < 0,001$ ), izofluranom ( $P < 0,05$ ) i željezo dekstranom + sevofluranom ( $P < 0,05$ ) statistički je značajno viša u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je kod skupine izložene sevofluranom značajno viša i u odnosu na skupinu obrađenu željezo dekstranom + izofluranom ( $P < 0,01$ ). Aktivnost CAT u jetri kod skupina obrađenih sevofluranom ( $P < 0,05$ ), izofluranom ( $P < 0,01$ ) i željezo dekstranom + izofluranom ( $P < 0,001$ ) statistički je značajno viša u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je kod skupine obrađene željezo dekstranom + izofluranom značajno viša i u odnosu na skupine obrađene željezo dekstranom ( $P < 0,01$ ) i željezo dekstranom + sevofluranom ( $P < 0,05$ ).



**Slika 12.** Koncentracija proteina u tkivu jetre štakora obrađenih inhalacijskim anestheticima i željezo dekstranom te njihovom kombinacijom

Životinje (N=8) su obrađene *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izložene 2,4% sevofluranom i 1,3% izofluranom te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SP.

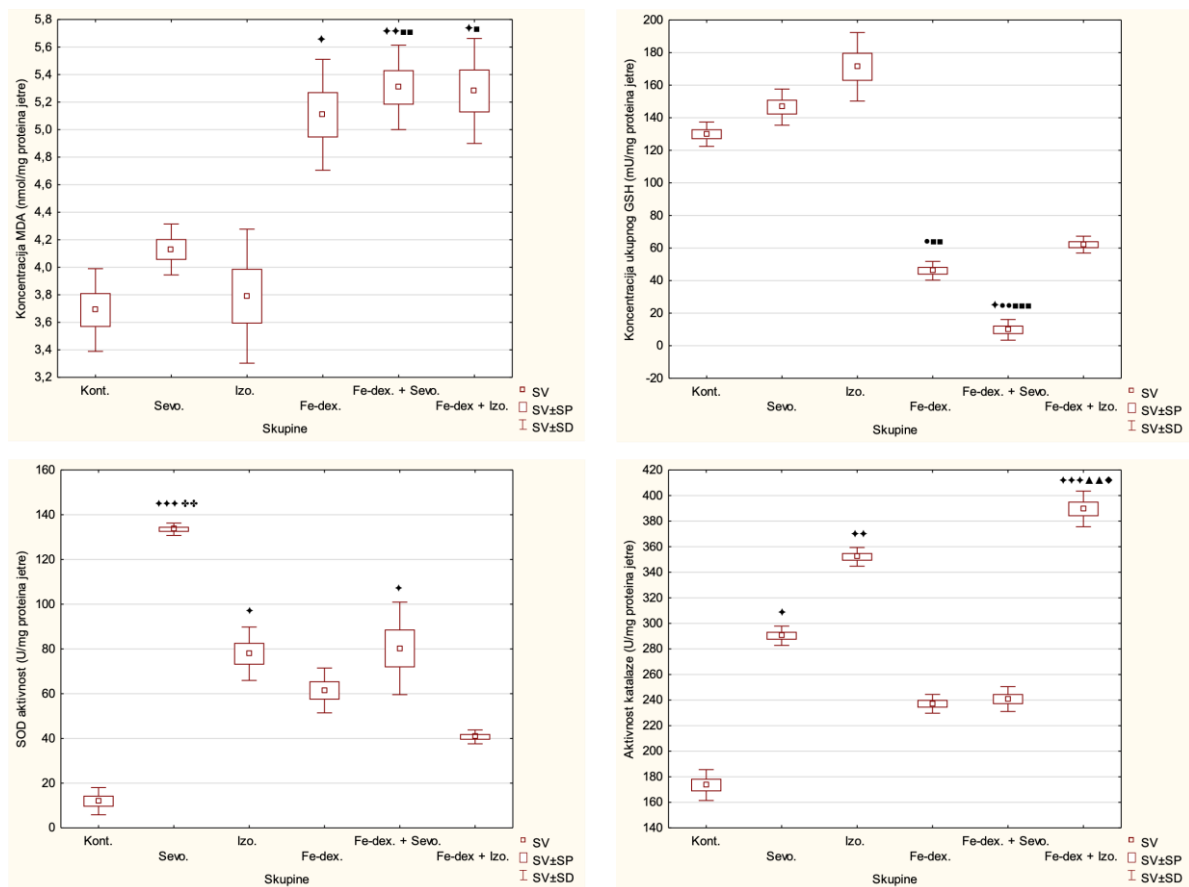
♦Statistički značajno u usporedbi s kontrolnom skupinom (\*\* $P < 0,01$ );

•Statistički značajno u usporedbi sa skupinom izloženom sevofluranu (\*\* $P < 0,01$ );

▪Statistički značajno u usporedbi sa skupinom izloženom izofluranu ( $P < 0,05$ );

\*Statistički značajno u usporedbi sa skupinom obrađenom željezo dekstranom i izofluranom (\*\* $P < 0,01$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, Fe-dex. – željezo dekstran, Fe-dex. + Sevo. – željezo dekstran i sevofluran, Fe-dex. + Izo. – željezo dekstran i izofluran.



**Slika 13.** Koncentracija malondialdehida, ukupnog glutatona i aktivnost SOD i CAT u tkivu jetre štakora obrađenih inhalacijskim anestheticima i željezo dekstranom te njihovom kombinacijom

Životinje (N=8) su obrađene *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izložene 2,4% sevofluranom i 1,3% izofluranom te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SP.

\*Statistički značajno u usporedbi s kontrolnom skupinom (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ );

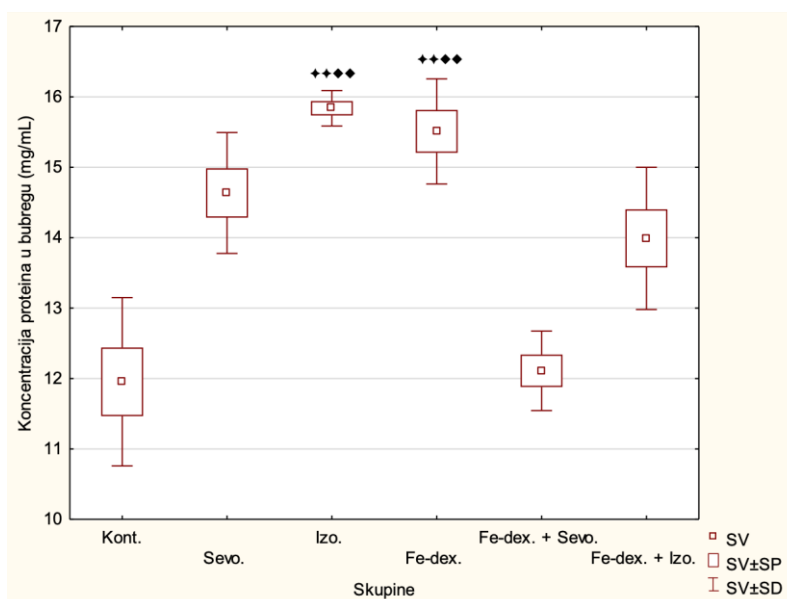
Nastavak Slike 13.

- Statistički značajno u usporedbi sa skupinom izloženom sevofluranu ( $\bullet P < 0,05$ ;  $\bullet\bullet P < 0,01$ );
- Statistički značajno u usporedbi sa skupinom izloženom izofluranu ( $\blacksquare P < 0,05$ ;  $\blacksquare\blacksquare P < 0,01$ ;  $\blacksquare\blacksquare\blacksquare P < 0,001$ );
- ▲ Statistički značajno u usporedbi sa skupinom obrađenom željezo dekstranom ( $\blacktriangle\blacktriangle P < 0,01$ );
- ◆ Statistički značajno u usporedbi sa skupinom obrađenom željezo dekstranom i sevofluranom ( $\blacklozen P < 0,05$ );
- \* Statistički značajno u usporedbi sa skupinom obrađenom željezo dekstranom i izofluranom ( $\ast\ast P < 0,01$ ).

Kratice: MDA – malondialdehid, GSH – ukupni glutation, SOD – superoksid dismutaza, CAT – katalaza, *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, Fe-dex. – željezo dekstran, Fe-dex. + Sevo. – željezo dekstran i sevofluran, Fe-dex. + Izo. – željezo dekstran i izofluran.

#### 4.6.2 Parametri oksidacijskog stresa u bubregu

Parametri oksidacijskog stresa mjereni u bubrezima prikazani su na Slici 14 i Slici 15. Koncentracija proteina u bubrezima kod skupina obrađenih izofluranom i željezo dekstranom statistički je značajno viša u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,01$ ) i skupinu obrađenu željezo dekstranom + sevofluranom ( $P < 0,01$ ). Koncentracija MDA u bubrezima kod skupine izložene izofluranom statistički je značajno viša u odnosu na skupinu obrađenu željezo dekstranom + sevofluranom ( $P < 0,05$ ). Koncentracija GSH u bubrezima kod skupina obrađenih sevofluranom ( $P < 0,01$ ), željezo dekstranom ( $P < 0,01$ ) i željezo dekstranom + izofluranom ( $P < 0,05$ ) statistički je značajno niža u odnosu na kontrolnu skupinu. Aktivnost SOD u bubrezima kod skupine obrađene željezo dekstranom statistički je značajno niža u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,001$ ), dok je u skupini obrađenoj željezo dekstranom + izofluranom statistički značajno veća u odnosu na skupine obrađene sevofluranom ( $P < 0,05$ ) i željezo dekstranom ( $P < 0,001$ ). Aktivnost CAT u bubrezima kod skupina obrađenih izofluranom ( $P < 0,01$ ), željezo dekstranom + sevofluranom ( $P < 0,01$ ) i željezo dekstranom + izofluranom ( $P < 0,05$ ) statistički je značajno viša u odnosu na kontrolnu skupinu.



**Slika 14.** Koncentracija proteina u tkivu bubrega štakora obrađenih inhalacijskim anestheticima i željezo dekstranom te njihovom kombinacijom

Životinje ( $N=8$ ) su obrađene *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izložene 2,4% sevofluranom i 1,3% izofluranom te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SP$ .

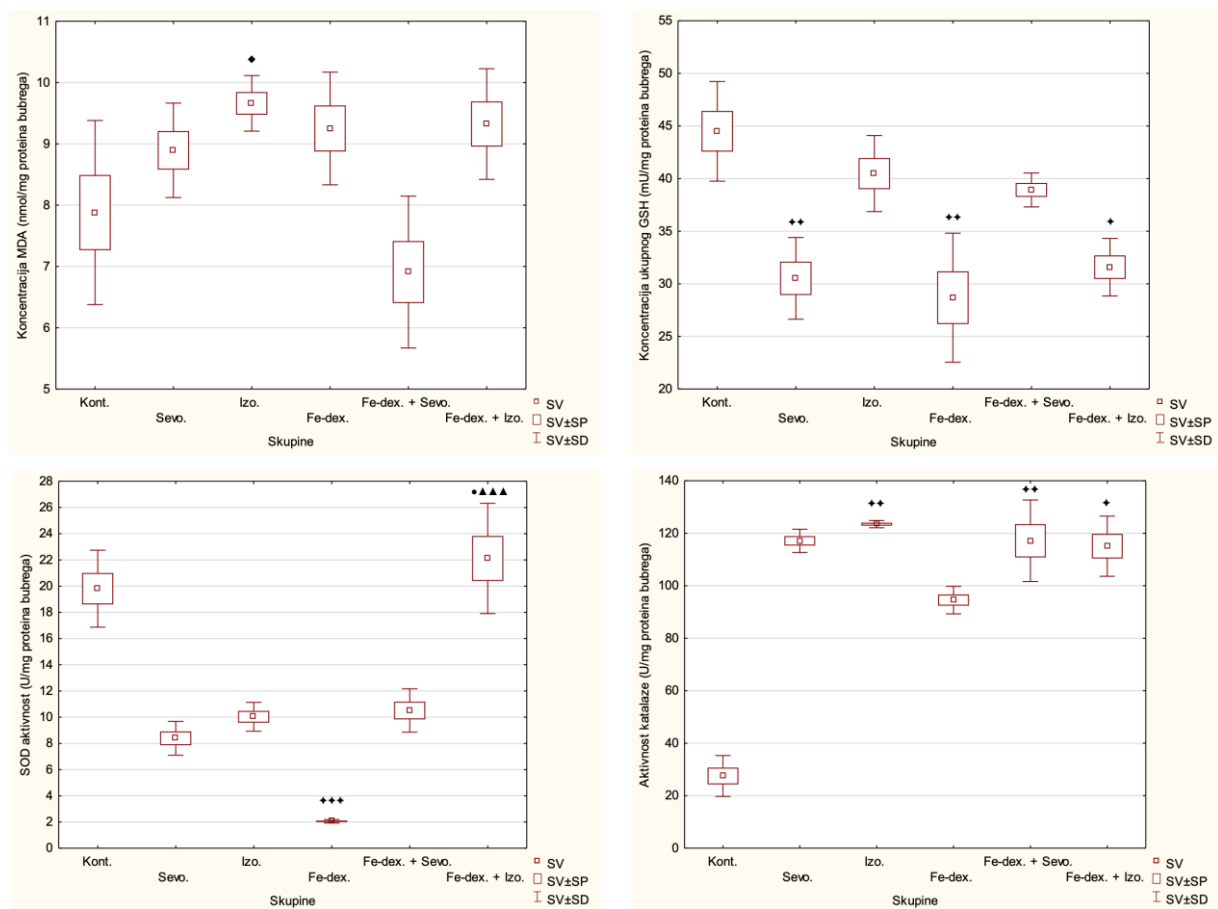
♦ Statistički značajno u usporedbi s kontrolnom skupinom ( $**P < 0,01$ );

♦♦ Statistički značajno u usporedbi sa skupinom obrađenom željezo dekstranom i sevofluranom ( $♦♦P < 0,05$ ).



Nastavak Slike 14.

Kratice: *ip* – intraperitonealno, *SV* – srednja vrijednost, *SP* – standardna pogreška, *SD* – standardna devijacija, *Kont.* – kontrola, *Sevo.* – sevofluran, *Izo.* – izofluran, *Fe-dex.* – željezo dekstran, *Fe-dex. + Sevo.* – željezo dekstran i sevofluran, *Fe-dex. + Izo.* – željezo dekstran i izofluran.



**Slika 15.** Koncentracija malondialdehida, ukupnog glutaciona i aktivnost SOD i CAT u tkivu bubrega štakora obrađenih inhalacijskim anestheticima i željezo dekstranom te njihovom kombinacijom

Životinje (N=8) su obrađene *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izložene 2,4% sevofluranom i 1,3% izofluranom te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SP.

♦Statistički značajno u usporedbi s kontrolnom skupinom (♦ $P < 0,05$ ; ♦♦ $P < 0,01$ ; ♦♦♦ $P < 0,001$ );

Nastavak Slike 15.

• Statistički značajno u usporedbi sa skupinom izloženom sevofluranu ( $\bullet P < 0,05$ );

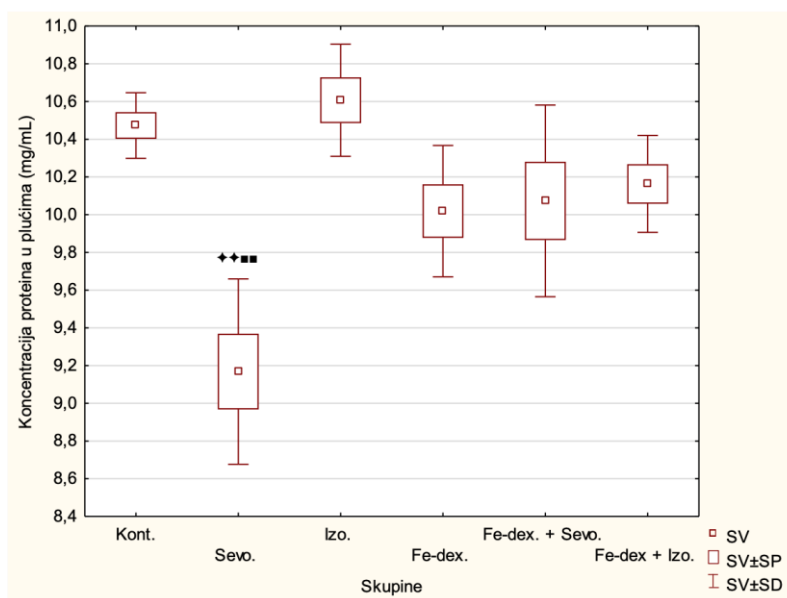
▲ Statistički značajno u usporedbi sa skupinom izloženom željezo dekstranu ( $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle P < 0,01$ );

◆ Statistički značajno u usporedbi sa skupinom obrađenom željezo dekstranom i sevofluranom ( $\blacklozenge P < 0,05$ ).

Kratice: MDA – malondialdehid, GSH – ukupni glutation, SOD – superoksid dismutaza, CAT – katalaza, *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, Fe-dex. – željezo dekstran, Fe-dex. + Sevo. – željezo dekstran i sevofluran, Fe-dex. + Izo. – željezo dekstran i izofluran.

#### 4.6.3 Parametri oksidacijskog stresa u plućima

Parametri oksidacijskog stresa mjereni u plućima prikazani su na Slici 16 i Slici 17. Koncentracija proteina u plućima kod skupine izložene sevofluranom statistički je značajno niža u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,01$ ) i skupinu izloženu izofluranom ( $P < 0,01$ ). Koncentracija MDA u plućima kod skupina obrađenih sevofluranom ( $P < 0,01$ ), željezo dekstranom ( $P < 0,01$ ) i željezo dekstranom + sevofluranom ( $P < 0,01$ ) statistički je značajno viša u odnosu na kontrolnu skupinu. Koncentracija GSH u plućima kod skupine obrađene željezo dekstranom + izofluranom statistički je značajno niža u odnosu na skupine obrađene sevofluranom ( $P < 0,01$ ), željezo dekstranom ( $P < 0,01$ ) i željezo dekstranom + sevofluranom ( $P < 0,05$ ). Aktivnost SOD u plućima kod skupina obrađenih izofluranom ( $P < 0,05$ ), željezo dekstranom ( $P < 0,001$ ) i željezo dekstranom + sevofluranom ( $P < 0,001$ ) statistički je značajno viša u odnosu na skupinu obrađenu sevofluranom, dok je kod skupina obrađenih željezo dekstranom i željezo dekstranom + sevofluranom značajno viša i u odnosu na kontrolnu skupinu. Aktivnost CAT u plućima kod skupina obrađenih izofluranom ( $P < 0,05$ ) i željezo dekstranom + sevofluranom ( $P < 0,01$ ) statistički je značajno viša u odnosu na kontrolnu skupinu.



**Slika 16.** Koncentracija proteina u tkivu pluća štakora obrađenih inhalacijskim anestetikima i željezo dekstranom te njihovom kombinacijom

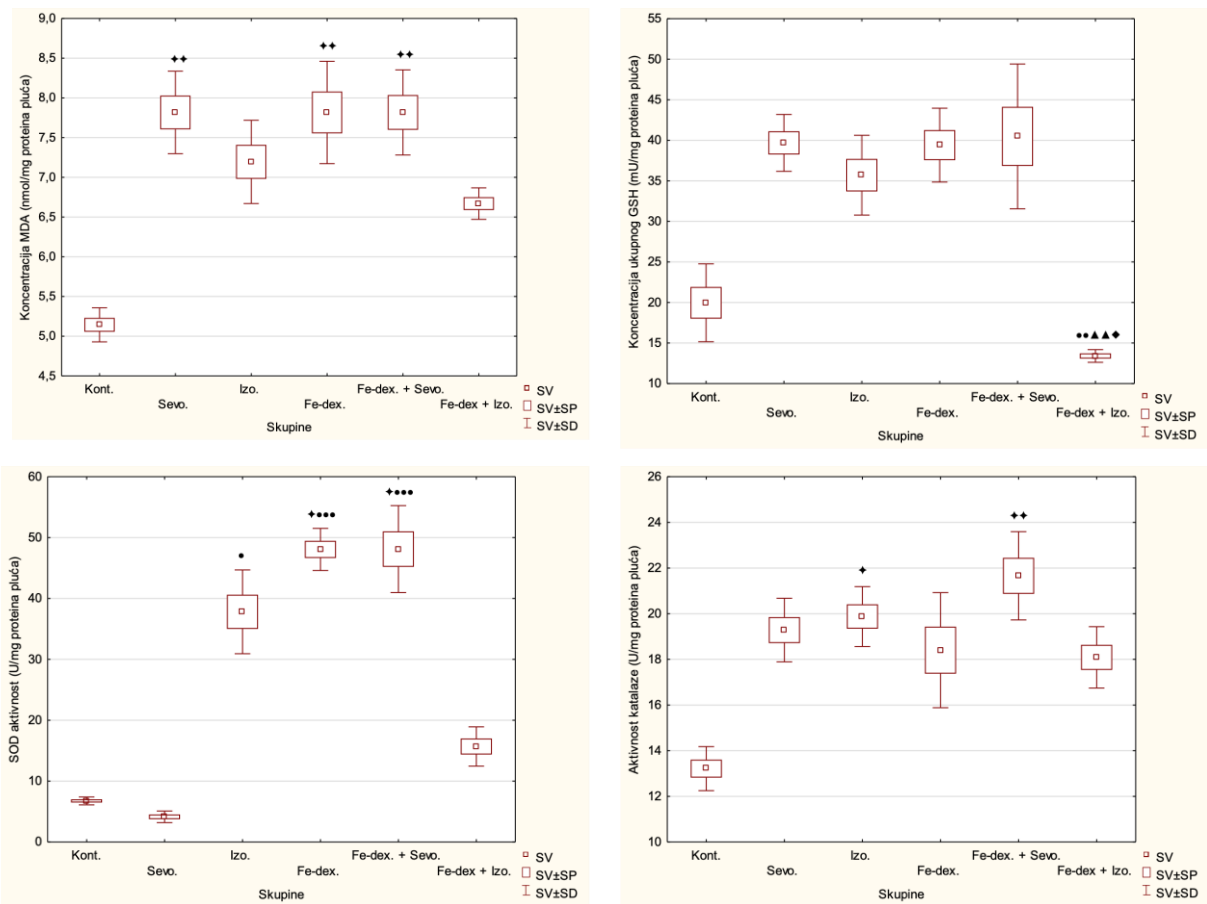
Životinje (N=8) su obrađene *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izložene 2,4% sevofluranom i 1,3% izofluranom te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SP.

\*Statistički značajno u usporedbi s kontrolnom skupinom (\*\* $P < 0,01$ );

## Nastavak Slike 16.

▪ Statistički značajno u usporedbi sa skupinom izloženom izofluranu (\*\* $P < 0,01$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, *SV* – srednja vrijednost, *SP* – standardna pogreška, *SD* – standardna devijacija, *Kont.* – kontrola, *Sevo.* – sevofluran, *Izo.* – izofluran, *Fe-dex.* – željezo dekstran, *Fe-dex. + Sevo.* – željezo dekstran i sevofluran, *Fe-dex. + Izo.* – željezo dekstran i izofluran.



**Slika 17.** Koncentracija malondialdehida, ukupnog glutatona i aktivnost SOD i CAT u tkivu pluća štakora obrađenih inhalacijskim anestheticima i željezo dekstranom te njihovom kombinacijom

Životinje (N=8) su obrađene *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izložene 2,4% sevofluranom i 1,3% izofluranom te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SP.

\*Statistički značajno u usporedbi s kontrolnom skupinom (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ );

•Statistički značajno u usporedbi sa skupinom izloženom sevofluranu (• $P < 0,05$ ; •• $P < 0,01$ ; ••• $P < 0,001$ );

Nastavak Slike 17.

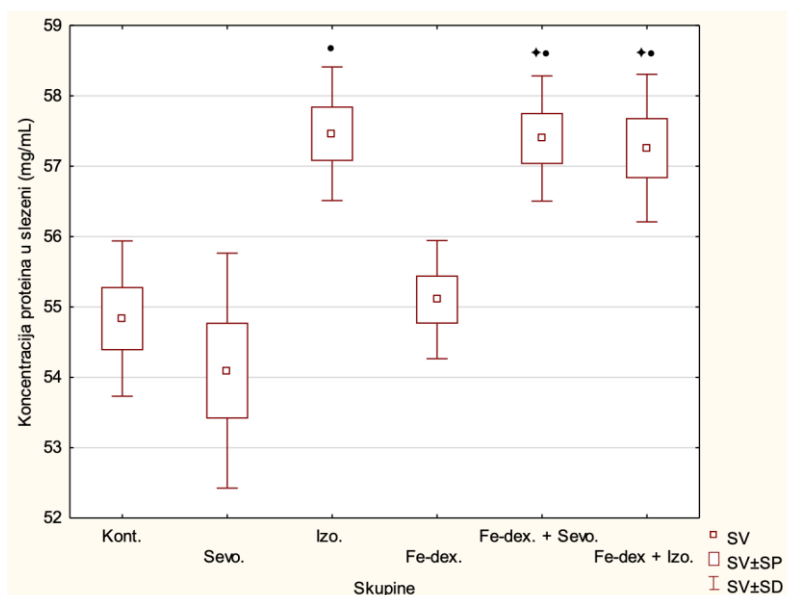
▲ Statistički značajno u usporedbi sa skupinom obrađenom željezo dekstranom (▲▲  $P < 0,01$ );

◆ Statistički značajno u usporedbi sa skupinom obrađenom željezo dekstranom i sevofluranom (◆  $P < 0,05$ ).

Kratice: MDA – malondialdehid, GSH – ukupni glutation, SOD – superoksid dismutaza, CAT – katalaza, *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, Fe-dex. – željezo dekstran, Fe-dex. + Sevo. – željezo dekstran i sevofluran, Fe-dex. + Izo. – željezo dekstran i izofluran.

#### 4.6.4 Parametri oksidacijskog stresa u slezeni

Parametri oksidacijskog stresa mjereni u slezeni prikazani su na Slici 18 i Slici 19. Koncentracija proteina u slezeni kod skupina obrađenih izofluranom, željezo dekstranom + sevofluranom i željezo dekstranom + izofluranom statistički je značajno viša u odnosu na skupinu obrađenu sevofluranom, dok je kod skupina obrađenih željezo dekstranom + sevofluranom i željezo dekstranom + izofluranom značajno viša i u odnosu na kontrolnu skupinu. Koncentracija MDA u slezeni kod skupina obrađenih željezo dekstranom + sevofluranom ( $P < 0,01$ ) i željezo dekstranom + izofluranom ( $P < 0,05$ ) statistički je značajno niža u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je kod skupine obrađene željezo dekstranom + sevofluranom značajno niža i u odnosu na skupinu izloženu sevofluranom ( $P < 0,05$ ). Koncentracija GSH u slezeni kod skupine izložene sevofluranom statistički je značajno viša u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,001$ ). Aktivnost SOD u slezeni kod skupina obrađenih željezo dekstranom + sevofluranom i željezo dekstranom + izofluranom statistički je značajno viša u odnosu na skupine obrađene sevofluranom i izofluranom. Aktivnost CAT u slezeni kod skupina obrađenih sevofluranom ( $P < 0,001$ ), izofluranom ( $P < 0,001$ ) i željezo dekstranom + sevofluranom ( $P < 0,05$ ) statistički je značajno viša u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je kod skupine izložene sevofluranom značajno viša i u odnosu na skupine obrađene željezo dekstranom ( $P < 0,05$ ) i željezo dekstranom + izofluranom ( $P < 0,05$ ).



**Slika 18.** Koncentracija proteina u tkivu slezene štakora obrađenih inhalacijskim anestetikima i željezo dekstranom te njihovom kombinacijom



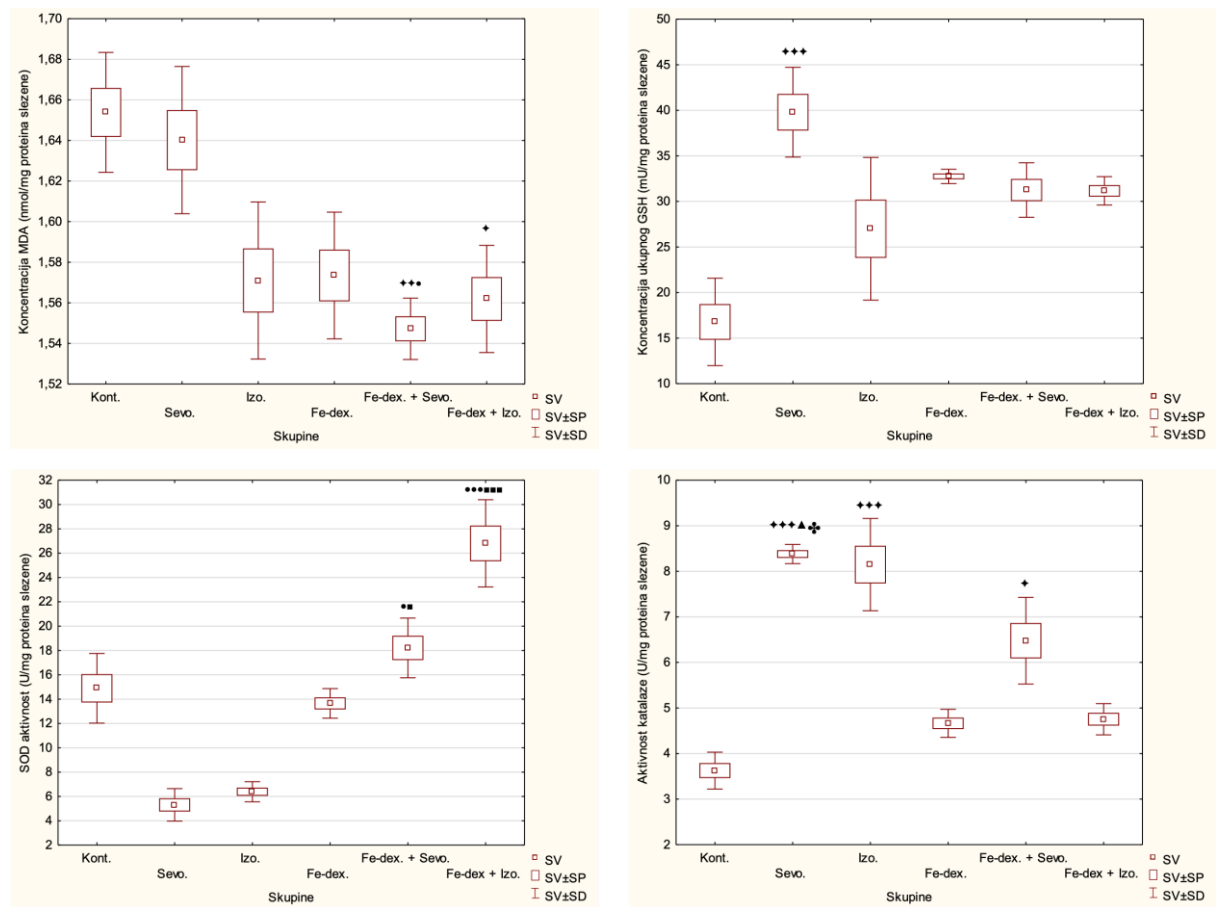
### Nastavak Slike 18.

Životinje (N=8) su obrađene *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izložene 2,4% sevofluranom i 1,3% izofluranom te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SP.

♦Statistički značajno u usporedbi s kontrolnom skupinom ( $^*P < 0,05$ );

•Statistički značajno u usporedbi sa skupinom izloženom sevofluranu ( $^{\bullet}P < 0,05$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, Fe-dex. – željezo dekstran, Fe-dex. + Sevo. – željezo dekstran i sevofluran, Fe-dex. + Izo. – željezo dekstran i izofluran.



**Slika 19.** Koncentracija malondialdehida, ukupnog glutationa i aktivnost SOD i CAT u tkivu slezene štakora obrađenih inhalacijskim anestheticima i željezo dekstranom te njihovom kombinacijom

Životinje (N=8) su obrađene *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izložene 2,4% sevofluranom i 1,3% izofluranom te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SP.

†Statistički značajno u usporedbi s kontrolnom skupinom († $P < 0,05$ ; †† $P < 0,01$ ; ††† $P < 0,001$ );

Nastavak Slike 19.

• Statistički značajno u usporedbi sa skupinom izloženom sevofluranu ( $\bullet P < 0,05$ ;  $\bullet\bullet\bullet P < 0,001$ );

▪ Statistički značajno u usporedbi sa skupinom izloženom izofluranu ( $\blacksquare P < 0,05$ ;  $\blacksquare\blacksquare\blacksquare P < 0,001$ );

▲ Statistički značajno u usporedbi sa skupinom obrađenom željezo dekstranom ( $\blacktriangle P < 0,05$ );

\* Statistički značajno u usporedbi sa skupinom obrađenom željezo dekstranom i izofluranom ( $*P < 0,05$ ).

Kratice: MDA – malondialdehid, GSH – ukupni glutation, SOD – superoksid dismutaza, CAT – katalaza, *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, Fe-dex. – željezo dekstran, Fe-dex. + Sevo. – željezo dekstran i sevofluran, Fe-dex. + Izo. – željezo dekstran i izofluran.

#### 4.7 Analiza koncentracije željeza metodom induktivno spregnute plazme s masenom spektrometrijom

Kako bih pronašla tkiva koja su najviše nakupila željezo te poveznicu između razine akumulacije željeza i inhalacijskih anestetika u perifernim tkivima analizirala sam koncentraciju željeza metodom induktivno spregnute plazme s masenom spektrometrijom. Analiza koncentracije željeza u tkivu jetre, pluća, bubrega i slezene prikazana je u Tablici 17. Koncentracija željeza u jetri u skupinama obrađenim željezo dekstranom i željezo dekstranom + sevofluranom statistički je značajno veća u odnosu na skupine obrađene izofluranom i željezo dekstranom + izofluranom, dok je u skupini obrađenoj željezo dekstranom + sevofluranom značajno veća i u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,05$ ). Koncentracija željeza u plućima u skupinama obrađenim željezo dekstranom i željezo dekstranom + sevofluranom statistički je značajno veća u odnosu na kontrolnu skupinu i skupinu izloženu sevofluranom. Koncentracija željeza u bubrezima u skupinama obrađenim željezo dekstranom ( $P < 0,01$ ) i željezo dekstranom + sevofluranom ( $P < 0,001$ ) statistički je značajno veća u odnosu na skupinu obrađenu željezo dekstranom + izofluranom, dok je u skupini obrađenoj željezo dekstranom + sevofluranom značajno veća i u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,01$ ) i skupinu izloženu sevofluranom ( $P < 0,05$ ). Koncentracija željeza u slezeni u skupinama obrađenim sevofluranom ( $P < 0,05$ ), željezo dekstranom ( $P < 0,001$ ) i željezo dekstranom + sevofluranom ( $P < 0,001$ ) statistički je značajno veća u odnosu na skupinu obrađenu željezo dekstranom + izofluranom, dok je u skupinama obrađenim željezo dekstranom ( $P < 0,05$ ) i željezo dekstranom + sevofluranom ( $P < 0,05$ ) značajno veća i u odnosu na skupinu izloženu izofluranom.

**Tablica 17.** Koncentracija željeza u organima jetre, pluća, bubrega i slezene štakora obrađenih inhalacijskim anestetici i željezo dekstranom te njihovom kombinacijom

| KONCENTRACIJA ŽELJEZA U ORGANIMA (X ± SP) |                                     |                                |                                |                                    |
|---|-------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| SKUPINE                                   | Jetra (mg/kg)                       | Pluća (mg/kg)                  | Bubreg (mg/kg)                 | Slezena (mg/kg)                    |
| Kontrolna skupina                         | 409,79 ± 6,86                       | 75,38 ± 5,63                   | 71,92 ± 3,40                   | 1742,01 ± 92,17                    |
| Sevofluran                                | 754,33 ± 28,78                      | 83,23 ± 1,80                   | 76,14 ± 0,45                   | 2712,07 ± 32,59*                   |
| Izofluran                                 | 262,63 ± 2,97                       | 116,56 ± 5,64                  | 85,31 ± 3,10                   | 1312,69 ± 38,23                    |
| Fe-dex.                                   | 7797,17 ± 88,12 <sup>▪▪*</sup>      | 218,00 ± 8,37 <sup>♦♦♦</sup>   | 173,87 ± 2,74 <sup>♦♦</sup>    | 11069,39 ± 161,33 <sup>▪▪♦♦*</sup> |
| Fe-dex. + sevofluran                      | 10945,52 ± 11,14 <sup>♦▪▪▪♦♦*</sup> | 314,09 ± 4,68 <sup>♦♦♦♦♦</sup> | 218,23 ± 6,07 <sup>♦♦♦♦♦</sup> | 9696,14 ± 1328,18 <sup>▪▪♦♦*</sup> |
| Fe-dex. + izofluran                       | 285,02 ± 6,28                       | 103,45 ± 3,77                  | 28,41 ± 0,61                   | 172,64 ± 43,68                     |

Životinje (N=8) su obrađene *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izložene 2,4% sevofluranom i 1,3% izofluranom te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SP.

♦Statistički značajno u usporedbi s kontrolnom skupinom (♦*P* < 0,05; ♦♦*P* < 0,01; ♦♦♦*P* < 0,001);

•Statistički značajno u usporedbi sa skupinom izloženom sevofluranu (•*P* < 0,05; ••*P* < 0,001);

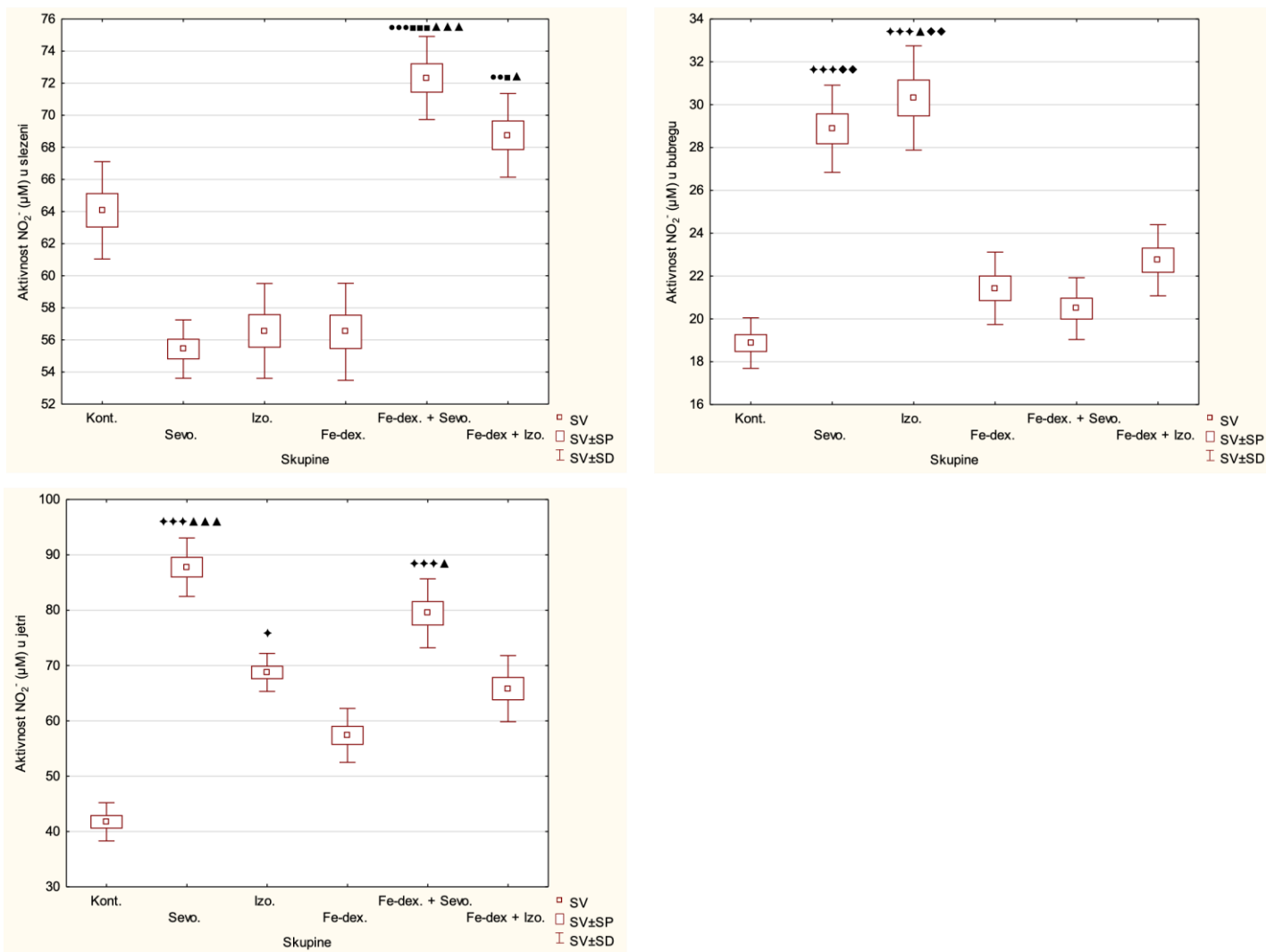
▪Statistički značajno u usporedbi sa skupinom izloženom izofluranu (▪*P* < 0,05; ▪▪*P* < 0,01; ▪▪▪*P* < 0,001);

\*Statistički značajno u usporedbi sa skupinom obrađenom željezo dekstranom i izofluranom (\**P* < 0,05; \*\**P* < 0,01; \*\*\**P* < 0,001).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Fe-dex. – željezo dekstran.

#### 4.8 Aktivnost dušikovog oksida

Za procjenu makrofagne polarizacije u štakora obrađenih inhalacijskim anestheticima, željezo dekstranom i njihovim kombinacijama analizirala sam aktivnost NO u tkivima slezene, bubrega i jetre (Slika 20). Aktivnost NO u slezeni kod skupina obrađenih željezo dekstranom + sevofluranom i željezo dekstranom + izofluranom statistički je značajno veća u odnosu skupine obrađene sevofluranom, izofluranom i željezo dekstranom. Aktivnost NO u bubrezima kod skupina izloženih sevofluranom i izofluranom statistički je značajno veća u odnosu na kontrolnu skupinu i skupinu obrađenu željezo dekstranom + sevofluranom, dok je u skupini izloženoj izofluranom značajno veća i u odnosu na skupinu obrađenu željezo dekstranom ( $P < 0,05$ ). Aktivnost NO u jetri kod skupina obrađenih sevofluranom ( $P < 0,001$ ), izofluranom ( $P < 0,05$ ) i željezo dekstranom + sevofluranom ( $P < 0,001$ ) statistički je značajno veća u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je u skupinama obrađenim sevofluranom ( $P < 0,001$ ) i željezo dekstranom + sevofluranom ( $P < 0,05$ ) značajno veća i u odnosu na skupinu obrađenu željezo dekstranom.



**Slika 20.** Koncentracija  $\text{NO}$  u tkivu slezene, bubrega i jetre štakora obrađenih inhalacijskim anestetikima i željezo dekstranom te njihovom kombinacijom

## Nastavak Slike 20.

Životinje (N=8) su obrađene *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izložene 2,4% sevofluranom i 1,3% izofluranom te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SP.

† Statistički značajno u usporedbi s kontrolnom skupinom (†  $P < 0,05$ ; †††  $P < 0,001$ );

• Statistički značajno u usporedbi sa skupinom izloženom sevofluranu (••  $P < 0,01$ ; •••  $P < 0,001$ );

▪ Statistički značajno u usporedbi sa skupinom izloženom izofluranu (▪  $P < 0,05$ , ▪▪▪  $P < 0,001$ );

^ Statistički značajno u usporedbi sa skupinom obrađenom željezo dekstranom (^  $P < 0,05$ ; ^^  $P < 0,001$ );

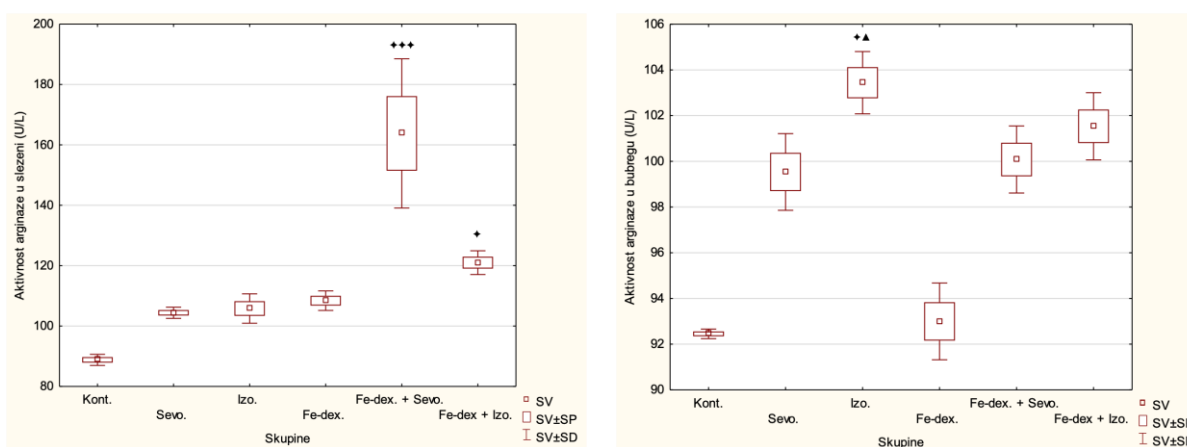
♦ Statistički značajno u usporedbi sa skupinom obrađenom željezo dekstranom i sevofluranom (♦♦  $P < 0,001$ ).

Kratice: NO – dušikov oksid, *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, Fe-dex. – željezo dekstran, Fe-dex. + Sevo. – željezo dekstran i sevofluran, Fe-dex. + Izo. – željezo dekstran i izofluran.



#### 4.9 Aktivnost enzima arginaze

Osim mjerenja NO, drugi biljeg za određivanje makrofagne polarizacije je enzim Arg-1 određen u tkivima slezene i bubrega u štakora obrađenih inhalacijskim anestheticima, željezo dekstranom i njihovim kombinacijama (Slika 21). Aktivnost Arg-1 u slezeni u skupinama obrađenim željezo dekstranom + sevofluranom ( $P < 0,001$ ) i željezo dekstranom + izofluranom ( $P < 0,05$ ) statistički je značajno veća u odnosu na kontrolnu skupinu. Aktivnost Arg-1 u bubrezima u skupini izloženoj izofluranom statistički je značajno veća u odnosu na skupinu obrađenu željezo dekstranom ( $P < 0,05$ ) i kontrolnu skupinu ( $P < 0,05$ ).



**Slika 21.** Aktivnost Arg-1 u tkivu slezene i bubrega štakora obrađenih inhalacijskim anestheticima i željezo dekstranom te njihovom kombinacijom

Životinje (N=8) su obrađene *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izložene 2,4% sevofluranom i 1,3% izofluranom te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SP.

♦ Statistički značajno u usporedbi s kontrolnom skupinom (♦  $P < 0,05$ ; ♦♦♦  $P < 0,001$ );

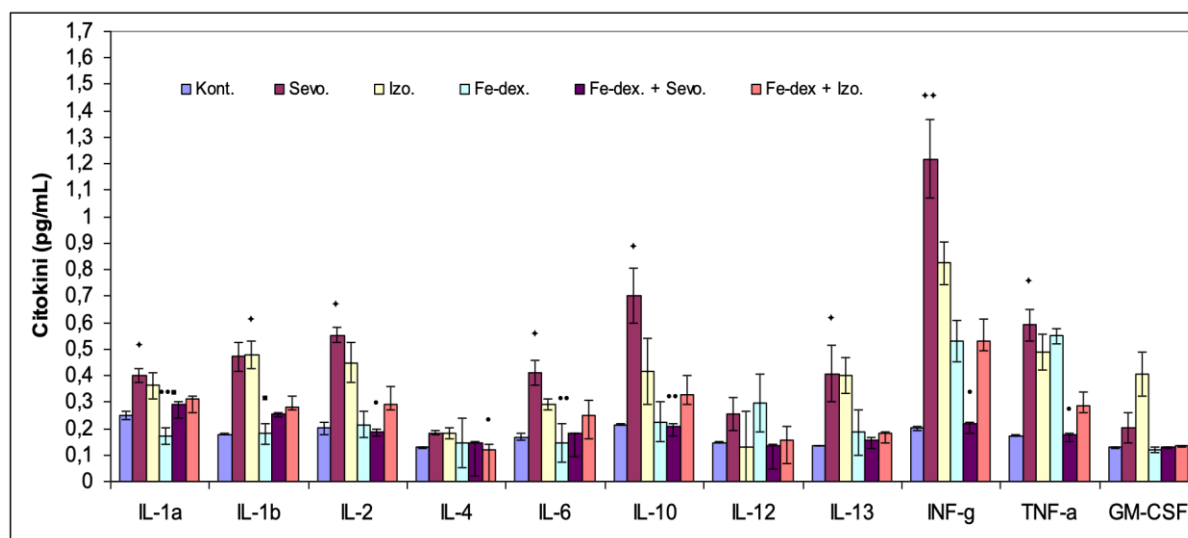
▲ Statistički značajno u usporedbi sa skupinom obrađenom željezo dekstranom (▲  $P < 0,05$ ).

Kratice: Arg-1 – arginaza, *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, Fe-dex. – željezo dekstran, Fe-dex. + Sevo. – željezo dekstran i sevofluran, Fe-dex. + Izo. – željezo dekstran i izofluran.

#### 4.10 Koncentracije upalnih citokina

Analizirano je ukupno 12 upalnih citokina iz seruma štakora obrađenih inhalacijskim anestheticima, željezo dekstranom i njihovim kombinacijama, a rezultati mjerenja prikazani su na Slici 22 i Slici 23. U skupini izloženoj sevofluranom koncentracija IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  i RANTES-a statistički je značajno viša u odnosu na kontrolnu

skupinu. Skupina izložena izofluranom pokazala je samo statistički značajno višu koncentraciju IL-1 $\beta$ . U skupini obrađenoj željezo dekstranom koncentracija IL-1 $\alpha$  i IL-6 statistički je značajno niža u odnosu na skupinu izloženu sevofluranom, dok je koncentracija IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$  značajno niža u odnosu na skupinu izloženu izofluranom. U skupini obrađenoj željezo dekstranom + sevofluranom koncentracije IL-2, IL-10, IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  statistički su značajno niže u odnosu na skupinu izloženu sevofluranom. U skupini obrađenoj željezo dekstranom + izofluranom koncentracija IL-4 statistički je značajno niža u odnosu na skupinu izloženu sevofluranom ( $P < 0,05$ ).



**Slika 22.** Koncentracije upalnih citokina u serumu štakora obrađenih inhalacijskim anestetici i željezo dekstranom te njihovom kombinacijom

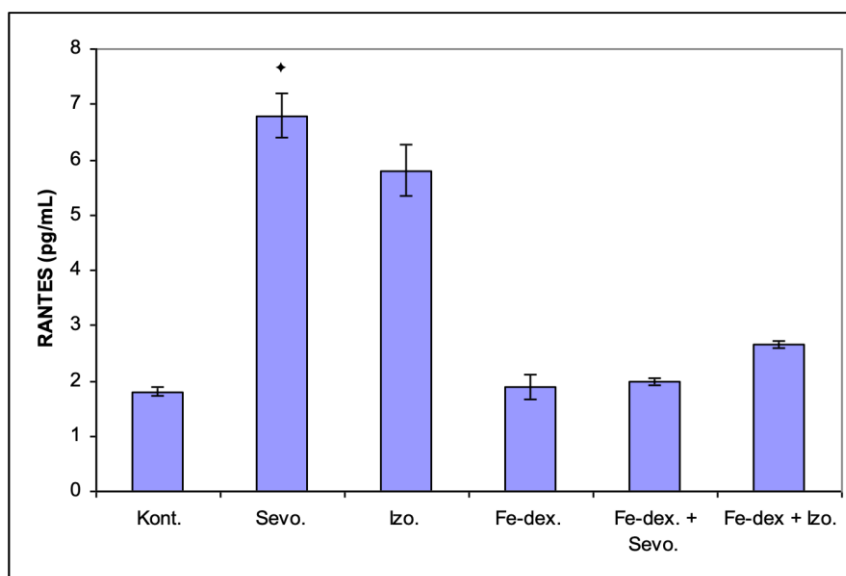
Životinje (N=8) su obrađene *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izložene 2,4% sevofluranom i 1,3% izofluranom te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV $\pm$ SP.

♦Statistički značajno u usporedbi s kontrolnom skupinom (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ );

•Statistički značajno u usporedbi sa skupinom izloženom sevofluranu (• $P < 0,05$ ; •• $P < 0,01$ );

▪Statistički značajno u usporedbi sa skupinom izloženom izofluranu (▪ $P < 0,05$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, Fe-dex. – željezo dekstran, Fe-dex. + Sevo. – željezo dekstran i sevofluran, Fe-dex. + Izo. – željezo dekstran i izofluran, IL-1 $\alpha$  – interleukin 1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  – interleukin 1 $\beta$ , IL-2 – interleukin 2, IL-4 – interleukin 4, IL-6 – interleukin 6, IL-10 – interleukin 10, IL-12 – interleukin 12, IL-13 – interleukin 13, IFN- $\gamma$  – interferon  $\gamma$ , TNF- $\alpha$  – čimbenik nekroze tumora  $\alpha$ , GM-CSF – faktor stimulacije granulocitno-makforagnih kolonija.



**Slika 23.** Koncentracija RANTES-a u serumu štakora obrađenih inhalacijskim anestheticima i željezo dekstranom te njihovom kombinacijom

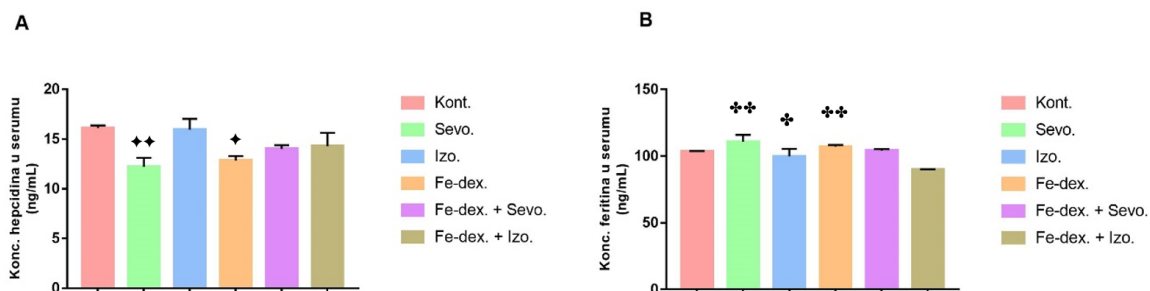
Životinje (N=8) su obrađene *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izložene 2,4% sevofluranom i 1,3% izofluranom te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SP.

\*Statistički značajno u usporedbi s kontrolnom skupinom (\* $P < 0,05$ ).

Kratice: RANTES – kemokinski ligand 5, *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, Fe-dex. – željezo dekstran, Fe-dex. + Sevo. – željezo dekstran i sevofluran, Fe-dex. + Izo. – željezo dekstran i izofluran.

#### 4.11 Koncentracije hepcidina i feritina u serumu

Iz seruma štakora obrađenih inhalacijskim anestheticima, željezo dekstranom i njihovim kombinacijama analizirane su koncentracije hepcidina i feritina (Slika 24). Koncentracija hepcidina u skupinama obrađenim sevofluranom ( $P < 0,01$ ) i željezo dekstranom ( $P < 0,05$ ) je statistički značajno niža u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 24A). Koncentracija feritina u skupinama obrađenim sevofluranom ( $P < 0,01$ ), izofluranom ( $P < 0,05$ ) i željezo dekstranom ( $P < 0,01$ ) statistički je značajno viša u odnosu na skupinu obrađenu željezo dekstranom + izofluranom (Slika 24B).



**Slika 24.** Koncentracije hepcidina (A) i feritina (B) u serumu štakora obrađenih inhalacijskim anestheticima i željezo dekstranom te njihovom kombinacijom

Životinje (N=8) su obrađene *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izložene 2,4% sevofluranom i 1,3% izofluranom te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SP.

\*Statistički značajno u usporedbi s kontrolnom skupinom (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ );

\*Statistički značajno u usporedbi sa skupinom obrađenom željezo dekstranom i izofluranom (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Konc. – koncentracija, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, Fe-dex. – željezo dekstran, Fe-dex. + Sevo. – željezo dekstran i sevofluran, Fe-dex. + Izo. – željezo dekstran i izofluran.

## 5 Rasprava

Nijedan od trenutno dostupnih halogenih anestetika nije idealno prilagođen svojoj funkciji, a često su zabilježeni njihovi negativni učinci i toksičnost ovisno o danoj dozi (Deile i sur., 2013). Mnoga istraživanja ispituju njihova potencijalna hepatotoksična i nefrotoksična djelovanja (Torri, 2010) jer se krajnji proizvodi metabolizma anestetika, njihovi toksični metaboliti izlučuju putem bubrega, jetre ili pluća pomoću enzima iz obitelji citokrom oksidaza CYP, ponajviše CYP2E1, odnosno citokrom P450 2E1 (Nair, 2019). Povećana koncentracija fluorida koji se smatra biomarkerom nefrotoksičnosti, a nastaje kao konačni produkt metabolizma sevoflurana i izoflurana, dokazano inhibira prirodni antioksidacijski sustav i umanjuje obranu od ROS-a. Također je dokazano da fluorid potiče stvaranje ROS-a u leukocitima, zbog čega neki autori smatraju da je sevofluran sposoban proizvesti  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^-$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$  te pridonijeti lipidnoj peroksidaciji u mnogim tkivima i organima (Lee i sur., 2015; Minguet i sur., 2017). No, već desetljećima se pojavljuju kontroverzni rezultati koji potvrđuju proupalne učinke anestezije, ali i protuupalne učinke na životinjskim modelima u kojima je prethodno izazvana upala, ishemija ili sepsa, a anestetici su umanjili upalu i smrtnost. Protuupalni učinci pripisuju se još nedovoljno istraženim višestrukim putevima regulacije (Gerber i sur., 2019) radi čega se posljednjih godina istražuju i ne-anesteziološka obilježja inhalacijskih anestetika poput zaštitnog učinka prilikom kratkotrajnog izlaganja sevofluranu i izofluranu (Bedirli i sur., 2012). No, potrebno je objediniti meta-analize s podacima pacijenata koji se podvrgavaju težim i većim brojem operacija, pa tako i anestetika, te uzeti u obzir i aspekte poput vrste anestetika, trajanje zahvata, genske predispozicije i popratnih bolesti kako bi se odredila sigurnost izoflurana i sevoflurana obzirom na oksidacijski stres i upalnu reakciju u ljudi (Lee i sur., 2015).

Osim toga višak željeza akumulira se u organizmu ometajući normalnu funkciju mitohondrija i brojnih enzima pogoršavajući odgovor tijela na upalu i uzrokujući oksidacijski stres (Wessling-Resnick, 2010). Također, višak željeza vodi ka pojavi brojnih neurodegeneracijskih poremećaja poput Parkinsonove, Alzheimerove bolesti i Friedrichove ataksije, a najviše oštećuje stanice jetre, srca, gušterače, CNS-a te dovodi do endokrine disfunkcije (Kohgo i sur., 2008; Stankowski i sur., 2012). No, zabilježeni su i kontroverzni rezultati upalnog odgovora prema statusu željeza, a neki tvrde da umjerene razine željeza, unesenog dijetalnim ili intraperitonealnim putem djeluju protuupalno pokrećući ekspresiju M2 fenotipa u makrofagima na smanjenje proupalnog odgovora, dok sustavno preopterećenje željezom podržava upalnu reakciju pokrećući M1 populaciju makrofaga (Agoro i sur., 2018).

Prema tome svrha rada bio je istražiti učinak inhalacijskih anestetika, izoflurana i sevoflurana pojedinačno te u nazočnosti željeza na prooksidacijske i/ili antioksidacijske učinke perifernih tkiva i organa u kroničnoj upali. Također, spoznati koja tkiva najviše nakupljaju metale prema fiziološkim, funkcionalnim značajkama te tkivnim barijerama i mogu li anestetici mijenjati metabolizam stanica obzirom na prijelazne metale kao inicijatore nastanka ROS-a i upale kroz regulaciju hepcidina i feritina te makrofagne polarizacije.

Dobar pokazatelj toksičnosti i promjena u metabolizmu je promjena tjelesne mase životinja. Rezultati ukazuju na gubitak tjelesne mase koji je uočen u svim skupinama, a najviše se očitovao u skupini obrađenoj sevofluranom (-3%) u odnosu na kontrolnu skupinu (+13%) (Slika 7). Smanjenje tjelesne mase u svim skupinama izloženim jednim od anestetika smatra se posljedicom djelovanja anestetika na pad metaboličke aktivnosti CNS-a, a posljedično tome i na deficit u kretanju i unosu hrane sve dok traje faza buđenja i oporavka (Katzung i sur., 2012). Uz to, Orliaguet i suradnici (2001) su otkrili da s povećanjem postnatalne dobi vrijednost MAC-a sevoflurana i izoflurana značajno raste dosežući najveću vrijednost kod štakora starih 9 dana, a nakon toga se smanjuje. Prema njihovom istraživanju, vrijednost MAC-a kod odraslih štakora (10-12 tjedana) za izofluran iznosi 1,12% (1,07-1,18%), a sevofluran 1,97% (1,84-2,10%) (Orliaguet i sur., 2001). Prema tome, gubitak težine u skupini izloženoj 2,4% sevofluranom (Slika 7) može biti objašnjena prevelikom dozom obzirom na njihovu težinu i/ili obzirom na konstantnu obradu životinja. Svakako treba uzeti u obzir da je do pada tjelesne mase došlo i zbog stresa prilikom konstantne obrade životinja svaki drugi dan kroz ukupno 28 dana.

Jetra kao i bubrezi i slezena imaju mnogobrojne funkcije u tijelu, a njihova oštećenja (bilo bolestima ili toksinima) mogu utjecati na razne organske sustave i osnovni metabolizam svih stanica. Stoga, mjerenje relativne težine organa jetre, pluća, bubrega i slezene je jedan od najosjetljivijih pokazatelja toksičnosti lijekova i primijenjenih spojeva. U skupinama obrađenim željezo dekstranom i željezo dekstranom + sevofluranom primijećene su veće težine jetre, slezene i bubrega u odnosu na ostale skupine (Slika 8). Prema rezultatima se čini da je brojnost makrofaga retikulo-endotelnog sustava ključna za hvatanje i nakupljanje željeza u jetri i slezeni, ali i bubregu na što ukazuje veća koncentracija željeza u navedenim organima (Tablica 17). Višak željeza u tijelu posebice pogađa jetru, srce, gušteraču i CNS (Kohgo i sur., 2008). Injiciranjem željeza intraperitonealnim putem, peritonealni makrofagi prvi dolaze u doticaj sa željezom te ga fagocitiraju (Agoro i sur., 2018). Točnije, vezano željezo isprva se nagomilava u sustavu tkivnih makrofaga jetre, slezene, koštane srži i drugih organa (faza sideroze), a nakon popunjenog kapaciteta ovog sustava počinje se odlagati u parenhimske

stanice organa, kao što su jetra, srčani mišić, gušterača i druge žlijezde s unutarnjim izlučivanjem dovodeći do njihova oštećenja i disfunkcije. Nakupljanje željeza u retikulo-endotelnom sustavu jest važan obrambeni odgovor organizma u sprječavanju nastanka upale zbog prisutnosti patogena kojima je željezo ključno za njihovu razmnožavanje i širenje (Gaetano i sur., 2010). S druge strane, pad u težini pluća uočen je u skupinama obrađenim izofluranom i željezo dekstranom + izofluranom u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 8). Objašnjenje smanjene težine pluća temelji se na mehanizmu djelovanja anestetika i smanjenju mukocilijarne funkcije epitelnih stanica što dovodi do nakupljanja sluzi tijekom dužeg izlaganja anestetiku. Posljedično začepljenje dišnih puteva dovodi do kolapsa alveola i razvoja atelektaze, a time i hipoksemije i respiratorne infekcije (Katzung i sur., 2012). Manje težine ostalih organa u skupinama obrađenim izofluranom i željezo dekstranom + izofluranom ukazuje na moguću hipoksiju i posljedično propadanje dijela stanica tih tkiva uzrokovano anestetikom. Citotoksičnost uzrokovana izofluranom nije uočena pri kratkotrajnoj primjeni izoflurana, ali dugotrajna primjena ukazuje na oštećenja DNA u limfocitima i drugim stanicama tkiva (Karabiyik i sur., 2001; Kim i sur., 2006). Nadalje, niska koncentracija željeza u jetri, bubrežima i slezeni u skupinama obrađenim izofluranom i željezo dekstranom + izofluranom potvrđuje naša opažanja (Tablica 17).

Inhalacijski anestetici značajno djeluju na respiratorni sustav smanjujući respiracijski volumen i povećavajući frekvenciju disanja što dovodi do brzog plitkog disanja, smanjenja alveolarne ventilacije te posljedično sustavne hipoksije. Respiratornu depresiju dodatno potiče smanjeni ventilacijski odgovor na povišene razine CO<sub>2</sub> u krvi tj. smanjeni ventilacijski odgovor na hipoksiju. Kod duže primjene anestetika respiratornu depresiju dodatno potiče i atelektaza dišnih puteva. Iako svi anestetici do određene mjere kompenziraju nastalu hipoksiju bronhodilatacijom, iritacija dišnih puteva izazvana izofluranom pojačava stupanj hipoksije u usporedbi sa sevofluranom (Katzung i sur., 2012). Osim toga, Li i suradnici (2006) dokazali su povećanje razine HIF-1 $\alpha$  primjenom izoflurana u kulturi stanica hepatocita, Hep3B. Povećane razine HIF-1 $\alpha$  u organizmu potiču proizvodnju eritropoetina u jetri i bubrežima i nastanak eritrocita što je u skladu s našim rezultatima u skupinama obrađenim izofluranom i željezo dekstranom + izofluranom (Slika 9).

Također, analiza hematoloških parametara potvrđuje prisutnost hipoksije i posljedično povećanje ukupnog broja eritrocita u svim skupinama, posebice u skupinama obrađenim izofluranom i željezo dekstranom + izofluranom (Slika 9) gdje je vidljivo povećanje skoro svih hematoloških pokazatelja u odnosu na ostale skupine (Tablica 13). Pojačanu eritropoezu

potvrđuje i povišeni MCV (Tablica 13) u svim skupinama posebice skupinama obrađenim izofluranom i željezo dekstranom + izofluranom.

Prema Li i sur. (2006), višestruki signalni putevi direktno aktiviraju gene odgovorne za sustavnu hipoksiju u stanicama nakon izlaganja izofluranu. Citotoksičnost izoflurana potvrđuje i analiza diferencijalne krvne slike i značajno manji broj limfocita u skupini izlaganoj izofluranom u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 14) što upućuje na oštećenje DNA te apoptozu limfocita nakon produljenog vremena izlaganja izofluranu (Şardaş i sur., 1998; Kim i sur., 2006). Wei i suradnici (2008) potvrđuju apoptozu limfocita ovisnu o koncentraciji i vremenu izlaganja izofluranu, a kao mehanizam navode aktivaciju inozitol trifosfata (engl. *inositol triphosphate*, IP3) na membrani endoplazmatskog retikuluma koji uzrokuje prekomjerno oslobađanje kalcija u citosol te nakupljanje kalcija u mitohondriju. Tako primjerice neuroni s pojačanom aktivnošću IP3, u slučajevima Alzheimerove i Huntingtonove bolesti, mogu biti posebno osjetljivi na citotoksičnost izoflurana (Wei i sur., 2008). Izofluran i prisutnost hipoksije uzrokuje povećano oštećenje stanica vodeći upali što potvrđuje povećani broj neutrofila (Tablica 14), dok ukupni broj leukocitnih stanica nije znatnije porastao u skupinama izlaganim anestheticima (Slika 10) zbog pada postotka limfocita koji pokazuju pojačanu osjetljivost na anesteziju. Prisutnost upale ipak pokazuje povećana koncentracija RANTES-a (Slika 23) čije je povećanje ključno za migraciju i novačenje stanica T, dendritičkih stanica, eozinofila, stanica NK, mastocita i bazofila, a najviše ga proizvode makrofagi s ulogom jačanja upalnog procesa u oštećenom tkivu (Marques i sur., 2013). Ukupni broj leukocita je bio povećan u skupini obrađenoj sa željezo dekstranom i u kombinaciji s anestheticima (Slika 10), dok je razina RANTES-a bila niža zbog dostatne količine upalnih stanica u krvi.

Prisutnost upale i oksidacijskog stresa povezane su s promjenama u morfologiji eritrocita putem oksidacije membranskih i citoskeletnih proteina. Oksidacijski stres mijenja strukturu i funkciju membrane, što dovodi do povećanja osmotske krhkosti membrane eritrocita i smanjenja stanične fluidnosti, te je osmotska otpornost eritrocita izvrstan pokazatelj nazočnosti toksičnih metabolita koji narušavaju osmotsku cjelovitost stanica. Povećana hemoliza vidljiva je u svim skupinama u kojima je u 0,5%-tnoj otopini NaCl uočeno 20-30% liziranih eritrocita (Slika 11). Liza eritrocita rezultat je oksidacijskog oštećenja eritrocitne membrane te smanjene fluidnosti i sposobnosti otpora osmotskim promjenama (osmotskoj rezistenciji) (Mohanty i sur., 2014).

Prisutnost oksidacijskog stresa potvrđena je i analizom biokemijskih pokazatelja koji ukazuju na oštećenja jetre i drugih organa te povećanu razinu enzima, proteina, metabolita i supstrata te patofiziološke posljedice djelovanja anestetika i željezo dekstrana. Tako niska



razina ALP u skupinama obrađenim sevofluranom i željezo dekstranom + izofluranom potvrđuje njihovu pothranjenost (Slika 7), poremećaje u absorpciji, anemiji, nedostatku vitamina B12, B6, magnezija i folne kiseline (Sharma i sur., 2013). Skupine obrađene željezo dekstranom i željezo dekstranom + sevofluranom pokazuju najniže razine ALT i AMY što može biti posljedica težih intoksikacija jetre te njenog oštećenja zbog nakupljanja željeza (Tablica 17) i nastanka ROS-a (Slika 13). Skupine obrađene izofluranom i kombinacijom željezo dekstrana + izoflurana pokazuju više razine glukoze u krvi (Tablica 16) odnosno hiperglikemiju kao posljedicu spriječene egzocitoze inzulina iz beta stanica gušterače posljedično nastale štetnim djelovanjem izoflurana (Graves i sur., 2016). Niske koncentracije glukoze u krvi u skupini izloženoj sevofluranom (Tablica 16) služe kao još jedan parametar koji potvrđuje njihovu pothranjenost (Slika 7).

Povećana razina proteina u stanicama jetre (Slika 12) i bubrega (Slika 14) potvrđuje utjecaj izoflurana na povećanje ekspresije proteina HIF-1 $\alpha$  i njegovu ulogu u regulaciji brojnih gena u stanicama jetre i bubrega (Li i sur., 2006). Povećana razina ukupnih proteina u bubregu može biti posljedica i povećane eritropoeze, odnosno povećane koncentracije hormona eritropoetina koji je po kemijskom sastavu glikoprotein, a luče ga bubrezi kao odgovor na sustavnu hipoksiju. Na povećanje ekspresije proteina vezanih uz metabolizam, pohranu ili prijenos željeza sugerira veća koncentracija proteina u tkivu jetre u skupinama obrađenim željezo dekstranom i željezo dekstranom + sevofluranom (Slika 12) (Ganz i Nemeth, 2006; Walker i Agarwal, 2016; Prasnicka i sur., 2019). Istraživanje Silve i suradnika (2015) potvrđuje povećanu ekspresiju gena i proteina u jetri vezanih uz metabolizam lipida kao posljedice oksidacijskog stresa uslijed obrade štakora željezo dekstranom. Oksidacijski stres i upala vode oštećenju glomerula bubrega te promjena koje vode tubulointersticijskoj fibrozi. Čini se da u skupini obrađenoj željezo dekstranom + izofluranom nije došlo do povećane koncentracije proteina u tkivu jetre zbog oštećenja DNA, hipoksije i propadanja stanica jetre uslijed dugotrajnog izlaganja životinja izofluranu (Karabiyik i sur., 2001; Kim i sur., 2006). Skupine obrađene kombinacijama anestetika i željeza također pokazuju povišene razine proteina slezene u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 18) što je pokazatelj nastale upale i stvaranja upalnih molekula zbog prisutnosti toksičnih metabolita.

Oštećenja bubrega i jetre posljedica su narušene homeostaze između antioksidacijskog sustava i povećanog oksidacijskog stresa u stanicama izazvanog anestheticima i željezo dekstranom. Dok veće aktivnosti antioksidacijskih enzima (GSH, SOD i CAT) govore o prisutnosti ROS-a, njihove niske vrijednosti pokazatelj su iscrpljenja antioksidacijskog sustava te ih povežujemo s nastalim oštećenjima i toksičnim djelovanjima ROS-a. Izlazak GSH iz

stanica uočen je u zdravih hepatocita i makrofaga radi uloge održavanja antioksidacijske zaštite u izvanstaničnom prostoru, no njegovo pasivno izlaženje te niže razine uočene su neposredno prije smrti stanica (de Nicola i Ghibelli, 2014). Najveće iscrpljenje GSH, često povezano s višim koncentracijama MDA, vidljivo je u tkivu jetre i bubrega nakon primjene anestetika i željezo dekstrana što potvrđuje njihovo hepatotoksično i nefrotoksično djelovanje i staničnu smrt procesom apoptoze (Slika 13 i Slika 15). Dodatno, Aydın i suradnici (2021) potvrdili su da željezo dekstran uzrokuje lipidnu peroksidaciju uz iscrpljenje antioksidansa GSH u jetri te smrt stanica apoptozom nakon nakupljanja željeza. Potencijalno nefrotoksično djelovanje željezo dekstrana podupire i iscrpljenje aktivnosti enzima SOD (Slika 15) što sugerira nastanak visoke koncentracije superoksid radikala (Casanueva i Viteri, 2003). Nešto manje iscrpljenje GSH uočeno je i u tkivu pluća kod skupine obrađene željezo dekstranom + izofluranom (Slika 17) kao odgovor na hipoksiju.

Makrofagi imaju ključnu ulogu u imunosti i u homeostazi tkiva štiteći organizam od infekcije, kao i održavanju bitnih tkivno specifičnih funkcija. Brojne uloge makrofaga u imunosnoj funkciji uključuju prepoznavanje patogena, obradu antigena, upalu, proždiranje patogena i oštećenih stanica tkiva, imunosnu regulaciju kao i važnu ulogu u usmjeravanju imunosnog odgovora, reorganizaciji tkiva i tkivnog popravka. Makrofagi također igraju bitnu ulogu u homeostazi željeza reciklirajući željezo, kao ključni element u funkcioniranju svih stanica i održavanje brojnih funkcija u organizmu. Kod sisavaca većina željeza koji se koristi za proizvodnju hemoglobina je reciklirana nakon fagocitoze ostarjelih crvenih krvnih stanica od strane makrofaga, dok je ograničen unos željeza iz hrane apsorbiranog kroz enterocite. Jasno je da međureakcija između homeostaze željeza, hepcidina i feroportina može utjecati na imunosnu funkciju makrofaga i njihovu polarizaciju. Najvažniji pokazatelji makrofagne polarizacije su NO, Arg-1, odnos Th1/Th2 citokina kao i razina ROS-a. Rezultati makrofagne polarizacije i tijekom upalne reakcije prikazani su na Slikama 20, 21 i 22.

M1 makrofagi putem sintaze dušikovog oksida metaboliziraju L-arginin do NO i citrulina, dok M2 makrofagi putem enzima Arg-1 metaboliziraju L-arginin do ornitina i uree. Ravnoteža između potrošnje L-arginina arginazom ili sintazom dušikovog oksida određuje ishod upalne reakcije u kojoj veće koncentracije NO ukazuju na rast upalne reakcije, a veća aktivnost Arg-1 ukazuje na odmaklu upalnu reakciju te proces cijeljenja i popravka tkiva (Rath i sur., 2014). Kod svih skupina obrađenih anestheticima radi se o mješovitoj M1/M2 populaciji makrofaga, a na to ukazuju značajno veće razine NO i Arg-1 aktivnost u tkivu slezene kod skupina obrađenim kombinacijama i u tkivu bubrega kod skupina obrađenih samo anestheticima (Slika 20 i Slika 21) što ukazuje na upalnu reakciju nastalu metabolitima anestetika, ali i na

kompenzacijski odgovor makrofaga na reparaciju i remodeliranje tkiva. U jetri dominira M1 populacija makrofaga; razina NO kao i razina Th1 citokina je povećana u svim skupinama, posebice u skupinama obrađenim sevofluranom, izofluranom te željezo dekstranom + sevofuranom (Slika 20).

Odnos između IL-12 i IL-10 najbolje ukazuje na polarizaciju makrofaga. Najveća razina upalnih citokina u serumu (IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) vidljiva je u skupini izloženoj sevofluranom te manje u skupini izloženoj izofluranom što ukazuje na M1 polarizaciju (Slika 22). IFN- $\gamma$  je jedan od od ključnih citokina koji potiču aktivnost M1 makrofaga i pokretanje upale te pojačane aktivnosti makrofaga kao antigen predočnih stanica. S druge strane, skupine izložene samo anestheticima pokazuju i povećanje protuupalnih citokina u serumu, ponajviše IL-10, što potvrđuje kompenzacijsku ili regulatornu prirodu anestetika preko drugog signalnog puta pokretanjem antiupalnog procesa (Slika 22) kao odgovora na oštećenje tkiva izazvano povećanjem razine ROS-a te pokretanje procesa remodeliranja tkiva. Čini se da su višestruki signalni putevi uključeni u odgovoru na povećanu razinu anestetika. Prema dobivenim rezultatima, čini se da u skupinama obrađenim samo anestheticima u početku prevladava proupalna M1 populacija makrofaga, a poslije zbog nastalih oštećenja i promijenjenih okolišnih uvjeta dolazi do pojavnosti drugih regulatornih signala i pokretanja procesa regeneracije tkiva (Rath i sur., 2014). Skupina izložena izofluranu pokazuje najveću razinu GM-CSF (Slika 22), što potvrđuje citotoksični učinak izoflurana na tkiva (Kim i sur., 2006). GM-CSF zajedno s IL-1 potiče pojačanu diferencijaciju matičnih stanica u smjeru mijeloidne i eritroidne loze (Moore i Warren, 1987), odgađa apoptozu neutrofila i njihovo propadanje tijekom upalnih reakcija održavajući njihovu brojnost (Tablica 14) (Derouet i sur., 2004).

Istraživanje Agora i suradnika (2018) ističe kako odnos IL-12/IL-10 može pomoći pri utvrđivanju makrofagne polarizacije, prilikom čega njihov veliki omjer ukazuje na prisutnost M1 populacije, dok manji omjer ukazuje na M2 populaciju. Vođeni time, veći omjer IL-12/IL-10 u serumu u skupini obrađenoj željezo dekstranom (Slika 22) ukazuje na prisutnost M1 makrofagne populacije te govori o prisustvu sustavne upale izazvane željezom. Ovi rezultati su u skladu s povećanjem ROS-a u jetri kao i povećanjem oštećenja jetre i pojavnosti nealkoholne masne bolesti jetre (engl. *nonalcoholic fatty liver disease*, NAFLD). NAFLD je metabolički sindrom jetre kojeg karakterizira povećano nakupljanje lipidnih kapljica u hepatocitima, koje rezultira upalom, oštećenjem i nekrozom istih, što potiče nealkoholni steatohepatitis (engl. *nonalcoholic steatohepatitis*, NASH), napredovanje fibroze i cirozu, a ponekad i razvoj hepatocelularnog karcinoma (Handa i sur., 2019). Skupina obrađena kombinacijom željezo dekstrana + sevoflurana ne pokazuje očekivano povišene razine

proupalnih citokina (Slika 22), što potvrđuje da u promijenjenim uvjetima prisutnost sevoflurana može potaknuti protuupalni odgovor što je u skladu sa istraživanjem Gerbera i suradnika (2019). Štoviše, autori sugeriraju na višestruke puteve regulacije sevoflurana i njegovo protuupalno djelovanje u uvjetima izazvane upale. U navedenom radu upalna reakcija bila je izazvana bakterijom *Escherichia coli* gdje autori sugeriraju da sevofluran može inhibirati NF- $\kappa$ B, ali da drugi signalni put može aktivirati izravno povećanje NO, čime se pospješuje fagocitoza i baktericidno svojstvo peritonealnih makrofaga (Gerber i sur., 2019). Nadalje, Agora i suradnici (2018) pokazuju da intraperitonealno injiciranje željezo dekstrana u uvjetima upale inducirane lipopolisaharidima u miševa može izazvati protuupalni učinak. Navedeni radovi jasno ukazuju da okolišni uvjeti utječu na makrofagnu heterogenost i plastičnost. Potvrdu makrofagne plastičnosti i okolišnih uvjeta vidimo i u skupini obrađenoj kombinacijom željezo dekstrana + izoflurana gdje je vidljiva povećana razina upalnog citokina IFN- $\gamma$  (Slika 22), oksidacijskog stresa i iscrpljenje antioksidacijskog sustava izazvanim tom kombinacijom u tkivima jetre (Slika 13), bubrega (Slika 15) i pluća (Slika 17). Ipak praćenjem razine Th1/Th2 citokina i razine RANTES-a, zapaža se da kombinacija željezo dekstrana i anestezika smanjuje razinu citokina u krvi prema vrijednostima kontrolne skupine; točnije polarizacija makrofaga ide prema M2 fenotipu i protuupalnom učinku. Naime, podaci pokazuju da hipoksijom potaknuta polarizacija makrofaga prema fenotipu M2 modificira upalno mikrookruženje smanjujući oslobađanje proupalnih citokina.

Hepcidin je jetreni hormon koji regulira homeostazu željeza, a koji je primarno pod kontrolom upalnih medijatora kao što su IL-6, LPS i drugi. On se veže za ferroportin, transmembranski protein koji prenosi željezo iz unutrašnjosti stanice u međustanični prostor i dovodi do njegove razgradnje, smanjenja apsorpcije željeza iz crijeva i izlaska iz retikuloendotelnog sustava. Koncentracije hepcidina su obratno proporcionalne s koncentracijama feritina u serumu životinja, a najznačajnija promjena njihovih koncentracija izražena je u skupinama obrađenim sevofluranom i željezo dekstranom u kojima niske vrijednosti hepcidina (Slika 24A) koreliraju s visokim vrijednostima feritina (Slika 24B). Transkripcija hepcidina u jetri regulirana je složenom međureakcijom upale, statusom željeza, eritropoezom i hipoksijom. Cirkulirajuće željezo, tkivno željezo i upala djeluju pozitivno na sintezu hepcidina, dok eritropoeza i tkivna hipoksija djeluju suprotno potiskujući njegovu proizvodnju (Wang i Babitt, 2016). Dodatni čimbenici koji smanjuju ekspresiju hepcidina u jetri su epidermalni faktor rasta, faktor rasta hepatocita, TNF- $\alpha$  te estrogen i testosteron, no njihova uloga u održavanju homeostaze željeza nije još potpuno razjašnjena (Shanmugam i

sur., 2012; Meynard i sur., 2014). Iako upalni citokini, poput IL-1 $\beta$  i IL-6, čije su koncentracije u serumu evidentno veće (Slika 22) pozitivno utječu na sintezu hepcidina, veća koncentracija upalnog citokina TNF- $\alpha$ , ponajviše u skupinama obrađenim sevofluranom i željezo dekstranom (Slika 22) umanjila je djeovanje upalnih citokina na sintezu hepcidina te doprinijela smanjenju njegove razine kod tih skupina (Slika 24A). U skupini obrađenoj željezo dekstranom bi zbog prisutnosti proupalnog M1 makrofagnog fenotipa očekivali veće razine hepcidina, no zbog kronične upale došlo je do kompenzacijskog mehanizma u organizmu te posljedično smanjenja razine hepcidina u serumu jer bi kronično visoke razine hepcidina mogle poremetiti homeostazu željeza te izazvati anemiju (Udipi i sur., 2012). Nadalje, prisutnost oksidacijskog stresa u stanicama jetre (Slika 13) potiče lučenje faktora rasta hepatocita i epidermalnog faktora rasta koji sudjeluju u procesu regeneracije oštećenih stanica jetre. Faktori rasta dodatno doprinose smanjenju razine hepcidina u skupinama obrađenim sevofluranom i željezo dekstranom (Slika 24A) djelujući na kinazu Erk, a time na signalni put BMP u sintezi hepcidina (Goodnough i sur., 2012).

Sažimajući dobivene rezultate, jasno je da postoji višestruka regulacija i komunikacija između hepcidina, makrofaga, željeza i prisutnosti anestetika te da je potreban dublji uvid na molekularnoj razini praćenjem ekspresije gena ključnih u procesu regulacije u stanicama jetre te okolišnih uvjeta povezanih s makrofagnom polarizacijom.

## 6 Zaključak

Temeljem dobivenih rezultata izvodimo zaključke kako slijedi:

1. Višekratno dugotrajno izlaganje štakora sevofluranu ili izofluranu vodi metaboličkim promjenama, oksidacijskom stresu i upali što potvrđuju rezultati:
  - smanjene tjelesne mase štakora i relativne težine organa
  - povećanja razine MDA u jetri, bubregu i plućima
  - smanjenja razine GSH u jetri, bubregu i plućima
  - modulacije SOD i CAT aktivnosti u tkivima
  - polarizacije makrofaga prema M1 fenotipu; povećanje razine NO i smanjenje aktivnosti Arg-1
  - povećanja razine proupalnih Th1 citokina (IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ )
  - povećanja razine RANTES kemokina
  - povećanje hemolize eritrocita
2. Višekratno dugotrajno izlaganje izofluranu povećava hipoksiju tkiva u štakora; rezultate potvrđuje:
  - povećanje citotoksičnosti i propadanje stanica pluća, jetre, bubrega i slezene
  - povećanje broja eritrocita, hemoglobina, hematokrita, volumena eritrocita i drugih hematoloških pokazatelja
  - povećanje izlučivanja čimbenika GM-CSF
3. Dugotrajno intraperitonealno injiciranje željezo dekstrana u štakora mijenja metabolizam jedinke, povećava razinu ROS-a i upale
  - smanjuje tjelesnu masu štakora
  - povećava relativnu težinu organa zbog nakupljanja željeza i upalnih procesa
  - povećava ukupni broj leukocita i biokemijskih pokazatelja u serumu potvrđujući upalni proces
  - vodi nakupljanju željeza u makrofagima retikulo-endotelnog sustava jetre, pluća, bubrega i slezene
  - povećava razinu oksidacijskog stresa u jetri, bubregu i slezeni te vodi oštećenju tkiva
  - povećava hemolizu eritrocita

- utječe na makrofagnu polarizaciju vodeći prema M1 fenotipu što potvrđuje odnos između IL-12/IL-10
4. Kombinacija željezo dekstrana i sevoflurana u dugotrajnoj primjeni kod štakora smanjuje razvoj sustavne upale i pojačano akumulira razinu željeza u tkivima vodeći oštećenju tkiva
    - povećava razinu oksidacijskog stresa i željeza u tkivima vodeći njihovom oštećenju i povećanju biokemijskih pokazatelja
    - povećava nakupljanje željeza u makrofagima retikulo-endotelnog sustava jetre, pluća, bubrega i slezene
    - smanjuje razinu RANTES kemokina i citokina utječući na plastičnost makrofaga prema M2 fenotipu; smanjenoj razini NO i povećanju aktivnosti Arg-1
  5. Kombinacija željezo dekstrana i izoflurana u dugotrajnoj primjeni kod štakora vodi hipoksiji, pojačanom otpuštanju nakupljenog željeza iz makrofaga retikulo-endotelnog sustava te potiče proces eritropoeze što potvrđuju rezultati:
    - povećanja broja eritrocita, hemoglobina, hematokrita i drugih hematoloških pokazatelja
    - izrazita polarizacija makrofaga prema M2 fenotipu
    - smanjenja razine željeza u tkivima jetre, bubrega, pluća i slezene
    - smanjenja produkcije citokina u serumu
  6. Razina hepcidina u jetri regulirana je složenom međureakcijom upale, oksidacijskog stresa, razine slobodnog željeza, eritropoezom i hipoksijom
  7. Rezultati ukazuju na višestruku regulaciju i komunikaciju između hepcidina, makrofaga, željeza te prisutnosti anestetika, a potreban je dublji uvid u regulaciju ovih procesa na molekularnoj razini kao i jasnija slika promjena brojnih mikrookolišnih odrednica povezanih s receptorima i signalnim putevima koji utječu na plastičnost makrofaga, promjenjenu funkciju i polarizaciju M1/M2 fenotipa.

## 7 Literatura

- Agarwal, A. K., Yee, J. (2019) Hepcidin. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 26(4), 298–305.
- Agoro, R., Taleb, M., Quesniaux, V. F. J., Mura, C. (2018) Cell iron status influences macrophage polarization. *Plos One*, 13(5), 1–20.
- Alleva, R. (2003) Lymphocyte DNA damage precedes DNA repair or cell death after orthopaedic surgery under general anaesthesia. *Mutagenesis*, 18(5), 423–428.
- Anders, M. (2005) Formation and toxicity of anesthetic degradation products. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45(1), 147–176.
- Arici, S., Karaman, S., Dogru, S., Arici, A., Karaman, T., Tapar, H., Suren, M., Kaya, Z. (2013) Effects of isoflurane in an intoxication model: experimental study. *European Review for Medical and Pharmacological Science*, 17, 1738–1743.
- Arruda, S. F., Ramos, L. V., Barbosa, J. L. D. A., Hankins, N. A. C., Rodrigues, P. A. M., da Cunha, M. D. S. B. (2020) The Action of JAK/STAT3 and BMP/HJV/SMAD Signaling Pathways on Hepcidin Suppression by Tucum-do-Cerrado in a Normal and Iron-Enriched Diets. *Nutrients*, 12(5), 1–13.
- Bedirli, N., Bagriacik, E. U., Emmez, H., Yilmaz, G., Unal, Y., Ozkose, Z. (2012) Sevoflurane and Isoflurane Preconditioning Provides Neuroprotection by Inhibition of Apoptosis-related mRNA Expression in a Rat Model of Focal Cerebral Ischemia. *Journal of Neurosurgical Anesthesiology*, 24(4), 336–344.
- Bedirli, N., Demirtas, C. Y., Akkaya, T., Salman, B., Alper, M., Bedirli, A., Pasaoglu, H. (2012) Volatile anesthetic preconditioning attenuated sepsis induced lung inflammation. *Journal of Surgical Research*, 178(1), 17–23.
- Bhattacharjee, S. (2019) *Reactive Oxygen Species in Plant Biology*. India: Springer.



Bleackley, M. R., MacGillivray, R. T. A. (2011) Transition metal homeostasis: from yeast to human disease. *BioMetals*, 24(5), 785–809.

Bogdan, A. R., Miyazawa, M., Hashimoto, K., Tsuji, Y. (2016) Regulators of Iron Homeostasis: New Players in Metabolism, Cell Death, and Disease. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(3), 274–286.

Braz, M. G., Braz, L. G., Barbosa, B. S., Giacobino, J., Orosz, J. E., Salvadori, D. M., Braz, J. R. (2011) DNA damage in patients who underwent minimally invasive surgery under inhalation or intravenous anesthesia. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 726(2), 251–254.

Brosnan, R. J., Thiesen, R. (2012) Increased NMDA receptor inhibition at an increased Sevoflurane MAC. *BMC Anesthesiology*, 12(1), 1–7.

Brozović G., Oršolić N., Knežević F., Horvat Knežević A., Šakić K., Benković V., Vrdoljak D. V. (2006) Interactions between inhaled anesthetics and cytostatic agents. *Libri Oncologici* 34, 23–27.

Brozović, G., Oršolić, N., Rozgaj, R., Knežević, F., Knežević, A. H., Maričić, M., Krsnik, D., Benković, V. (2017) Sevoflurane and isoflurane genotoxicity in kidney cells of mice. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 68(3), 228–235.

Camaschella, C., Nai, A., Silvestri, L. (2020) Iron metabolism and iron disorders revisited in the hepcidin era. *Haematologica*, 105(2), 260–272.

Campagna, J. A., Miller, K. W., Forman, S. A. (2003) Mechanisms of Actions of Inhaled Anesthetics. *New England Journal of Medicine*, 348(21), 2110–2124.

Casanueva, E., Viteri, F. E. (2003) Iron and Oxidative Stress in Pregnancy. *The Journal of Nutrition*, 133(5), 1700–1708.

Cassat, J., Skaar, E. (2013) Iron in Infection and Immunity. *Cell Host & Microbe*, 13(5), 509–519.

Čepelak, I., Dodig, S., Dodig, D. E. (2020) Ferroptosis: regulated cell death. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 71(2), 99–109.

Chang, C. Y., Goldstein, E., Agarwal, N., Swan, K. G. (2015) Ether in the developing world: rethinking an abandoned agent. *BMC Anesthesiology*, 15(1). 1–5.

Cheng, Z., Li, Y. (2007) What Is Responsible for the Initiating Chemistry of Iron-Mediated Lipid Peroxidation: An Update. *ChemInform*, 38(22). 22–207.

Corradini, E., Schmidt, P. J., Meynard, D., Garuti, C., Montosi, G., Chen, S., Vukicevic, S., Pietrangelo, A., Lin, H. Y., Babitt, J. L. (2010) BMP6 Treatment Compensates for the Molecular Defect and Ameliorates Hemochromatosis in Hfe Knockout Mice. *Gastroenterology*, 139(5), 1721–1729.

Covarrubias, L., Hernández-García, D., Schnabel, D., Salas-Vidal, E., Castro-Obregón, S. (2008) Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active?. *Developmental Biology*, 320(1), 1–11.

de Nicola, M., Ghibelli, L. (2014) Glutathione depletion in survival and apoptotic pathways. *Frontiers in Pharmacology*, 5, 1–4.

Deile, M., Damm, M., Heller, A. (2013) Inhalative Anästhetika. *Der Anaesthetist*, 62(6), 493–504.

Derouet, M., Thomas, L., Cross, A., Moots, R. J., Edwards, S. W. (2004) Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor Signaling and Proteasome Inhibition Delay Neutrophil Apoptosis by Increasing the Stability of Mcl-1. *Journal of Biological Chemistry*, 279(26), 26915–26921.

Dixon, S., Lemberg, K., Lamprecht, M., Skouta, R., Zaitsev, E., Gleason, C., Patel, D., Bauer, A., Cantley, A., Yang, W., Morrison, B., Stockwell, B. (2012) Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell*, 149(5), 1060–1072.

Dizdaroglu, M., Jaruga, P. (2012) Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Research*, 46(4), 382–419.

Dong, Y., Wu, X., Zhang, G., Xu, Z., Zhang, Y., Gautam, V., Kovacs, D., Wu, A., Yue, Y., Xie, Z. (2013) Isoflurane Facilitates Synaptic NMDA Receptor Endocytosis in Mice Primary Neurons. *Current Molecular Medicine*, 13(4), 488–498.

Eger, E. I., Koblin, D. D., Bowland, T., Ionescu, P., Laster, M. J., Fang, Z., Gong, D., Sonner, J., Weiskopf, R. B. (1997) Nephrotoxicity of Sevoflurane Versus Desflurane Anesthesia in Volunteers. *Anesthesia & Analgesia*, 84(1), 160–168.

Ehrenwerth, J., Eisenkraft, J. B., Berry, J. M. (2020) *Anesthesia Equipment*. 3rd edn. Saunders, SAD.

Eilers, H., Kindler, C. H., Bickler, P. E. (1999) Different Effects of Volatile Anesthetics and Polyhalogenated Alkanes on Depolarization-Evoked Glutamate Release in Rat Cortical Brain Slices. *Anesthesia & Analgesia*, 88(5), 1168–1174.

Enns, C. A., Ahmed, R., Wang, J., Ueno, A., Worthen, C., Tsukamoto, H., Zhang, A. S. (2013) Increased Iron Loading Induces Bmp6 Expression in the Non-Parenchymal Cells of the Liver Independent of the BMP-Signaling Pathway. *Plos One*, 8(4), 1–5.

Enns, C. A., Ahmed, R., Zhang, A. S. (2012) Neogenin Interacts with Matriptase-2 to Facilitate Hemojuvelin Cleavage. *Journal of Biological Chemistry*, 287(42), 35104–35117.

Evans, M. D., Dizdaroglu, M., Cooke, M. S. (2004) Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 567(1), 1–61.

Fernández-Meré, L., Muñoz González, F., Sopena Zubiria, L., Álvarez Blanco, M. (2008) Sevoflurano y disfunción hepática. *Revista Española de Anestesiología y Reanimación*, 55(3), 184–185.

Fleming, R. E. (2007) Heparin Activation During Inflammation: Make It STAT. *Gastroenterology*, 132(1), 447–449.

Frazer, D. M., Wilkins, S. J., Darshan, D., Badrick, A. C., McLaren, G. D., Anderson, G. J. (2012) Stimulated erythropoiesis with secondary iron loading leads to a decrease in hepcidin despite an increase in bone morphogenetic protein 6 expression. *British Journal of Haematology*, 157(5), 615–626.

Fu, Z., Xi, S. (2019) The effects of heavy metals on human metabolism. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 30(3), 167–176.

Gaetano, C., Massimo, L., Alberto, M. (2010) Control of iron homeostasis as a key component of macrophage polarization. *Haematologica*, 95(11), 1801–1803.

Galaris, D., Barbouti, A., Pantopoulos, K. (2019) Iron homeostasis and oxidative stress: An intimate relationship. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1866(12), 1–15.

Gallego, L., Soro, M., Alvariño, A., Noguera, I., Belda, F. (2015) Integridad renal y hepática tras la sedación prolongada con sevoflurano administrado a través del dispositivo AnaConDa®: comparación con la sedación intravenosa con propofol en modelo animal. *Revista Española de Anestesiología y Reanimación*, 62(4), 191–203.

Ganz, T., Nemeth, E. (2006) Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1763(7), 690–699.

Ganz, T., Nemeth, E. (2015) Iron homeostasis in host defence and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 15(8), 500–510.

Gentz, B. A., Malan, T. P. (2001) Renal Toxicity with Sevoflurane. *Drugs*, 61(15), 2155–2162.

Gerber, T. J., Fehr, V. C. O., Oliveira, S. D. S., Hu, G., Dull, R., Bonini, M. G., Beck-Schimmer, B., Minshall, R. D. (2019) Sevoflurane Promotes Bactericidal Properties of

Macrophages through Enhanced Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Male Mice. *Anesthesiology*, 131(6), 1301–1315.

Goodnough, J. B., Ramos, E., Nemeth, E., Ganz, T. (2012) Inhibition of hepcidin transcription by growth factors. *Hepatology*, 56(1), 291–299.

Graves, S., Hernandez, R., England, C., Valdovinos, H., Jeffery, J., Barnhart, T., Cai, W., Nickles, R. (2016) TH-EF-207A-02: Imaging Pancreatic I2-Cell Function with 51/52Mn-PET. *Medical Physics*, 43(6), 3900.

Griess, P. (1879) Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen“. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 12(1), 426–428.

Guidi, G. C., Santonastaso, C. L. (2010) Advancements in anemias related to chronic conditions. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 48(9).

Hancock, J. T., Desikan, R., Neill, S. (2001) Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochemical Society Transactions*, 29(2), 345–349.

Handa, P., Thomas, S., Morgan- Stevenson, V., Maliken, B. D., Gochanour, E., Boukhar, S., Yeh, M. M., Kowdley, K. V. (2019) Iron alters macrophage polarization status and leads to steatohepatitis and fibrogenesis. *Journal of Leukocyte Biology*, 105(5), 1015–1026.

Hao, X., Ou, M., Zhang, D., Zhao, W., Yang, Y., Liu, J., Yang, H., Zhu, T., Li, Y., Zhou, C. (2020) The Effects of General Anesthetics on Synaptic Transmission. *Current Neuropharmacology*, 18(10), 936–965.

Held, J. M., Gibson, B. W. (2012) Regulatory Control or Oxidative Damage? Proteomic Approaches to Interrogate the Role of Cysteine Oxidation Status in Biological Processes. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11(4), 1–14.

Herb, M., Schramm, M. (2021) Functions of ROS in Macrophages and Antimicrobial Immunity. *Antioxidants*, 10(2), 313.

Herold, K. F., Andersen, O. S., Hemmings, H. C. (2017) Divergent effects of anesthetics on lipid bilayer properties and sodium channel function. *European Biophysics Journal*, 46(7), 617–626.

Herrmann, I. K., Castellon, M., Schwartz, D. E., Hasler, M., Urner, M., Hu, G., Minshall, R. D., Beck-Schimmer, B. (2013) Volatile Anesthetics Improve Survival after Cecal Ligation and Puncture. *Anesthesiology*, 119(4), 901–906.

Hoefl, K., Bloch, D. B., Graw, J. A., Malhotra, R., Ichinose, F., Bagchi, A. (2017) Iron Loading Exaggerates the Inflammatory Response to the Toll-like Receptor 4 Ligand Lipopolysaccharide by Altering Mitochondrial Homeostasis. *Anesthesiology*, 127(1), 121–135.

Hofstetter, C., Boost, K. A., Flondor, M., Basagan-Mogol, E., Betz, C., Homann, M., Muhl, H., Pfeilschifter, J., Zwissler, B. (2007) Anti-inflammatory effects of sevoflurane and mild hypothermia in endotoxemic rats. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 51(7), 893–899.

Huang, X. P., O'Brien, P. J., Templeton, D. M. (2006) Mitochondrial involvement in genetically determined transition metal toxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 163(1–2), 68–76.

Ikemoto, Y., Yamashita, M., Yano, T. (1998) Volatile anesthetics and a volatile convulsant differentially affect GABA<sub>A</sub> receptor–chloride channel complex. *Toxicology Letters*, 100–101, 225–231.

Järup, L. (2003) Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, 68(1), 167–182.

Jedlicka, J., Groene, P., Linhart, J., Raith, E., Mu stapha, D., Conzen, P. (2021). ‘Inhalationsanästhetika’. *Der Anaesthesist*, 70(4), 343–355.

Jomova, K., Valko, M. (2011) Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283(2–3), 65–87.

Jones, M. V., Brooks, P. A., Harrison, N. L. (1992) Enhancement of gamma-aminobutyric acid-activated Cl<sup>-</sup> currents in cultured rat hippocampal neurones by three volatile anaesthetics. *The Journal of Physiology*, 449(1), 279–293.

Karabiyik, L., ŞArdaş, S., Polat, U., Kocabaş, N., Karakaya, A. (2001) Comparison of genotoxicity of sevoflurane and isoflurane in human lymphocytes studied in vivo using the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 492(1–2), 99–107.

Katzung, B. G., Masters, S. B., Trevor, A. J. (2012) *Basic and Clinical Pharmacology*. 12th edn. McGraw-Hill Medical.

Kautz, L., Jung, G., Valore, E. V., Rivella, S., Nemeth, E., Ganz, T. (2014) Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nature Genetics*, 46(7), 678–684.

Kautz, L., Meynard, D., Monnier, A., Darnaud, V., Bouvet, R., Wang, R. H., Deng, C., Vaulont, S., Mosser, J., Coppin, H., Roth, M. P. (2008) Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver. *Blood*, 112(4), 1503–1509.

Kawabata, H. (2019) Transferrin and transferrin receptors update. *Free Radical Biology and Medicine*, 133, 46–54.

Khan, K. S., Hayes, I., Buggy, D. J. (2014) Pharmacology of anaesthetic agents II: inhalation anaesthetic agents. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain*, 14(3), 106–111.

Kim, A., Fung, E., Parikh, S. G., Valore, E. V., Gabayan, V., Nemeth, E., Ganz, T. (2014) A mouse model of anemia of inflammation: complex pathogenesis with partial dependence on hepcidin. *Blood*, 123(8), 1129–1136.

Kim, A., Nemeth, E. (2015) New insights into iron regulation and erythropoiesis. *Current Opinion in Hematology*, 22(3), 199–205.

Kim, H., Oh, E., Im, H., Mun, J., Yang, M., Khim, J. Y., Lee, E., Lim, S. H., Kong, M. H., Lee, M., Sul, D. (2006) Oxidative damages in the DNA, lipids, and proteins of rats exposed to isofluranes and alcohols. *Toxicology*, 220(2–3), 169–178.

Kim, J. J., Kim, Y. S., Kumar, V. (2019) Heavy metal toxicity: An update of chelating therapeutic strategies. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 54, 226–231.

Kohgo, Y., Ikuta, K., Ohtake, T., Torimoto, Y., Kato, J. (2008) Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *International Journal of Hematology*, 88(1), 7–15.

Kowdley, K. V., Gochanour, E. M., Sundaram, V., Shah, R. A., Handa, P. (2021) Hepcidin Signaling in Health and Disease: Ironing Out the Details. *Hepatology Communications*, 5(5), 723–735.

Krijt, J., Frýdlová, J., Gurieva, I., Příkryl, P., Bájecný, M., Steinbicker, A. U., Vokurka, M., Truksa, J. (2021) Matriptase-2 and Hemojuvelin in Hepcidin Regulation: In Vivo Immunoblot Studies in Mask Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2650.

Kuhn, H., Banthiya, S., van Leyen, K. (2015) Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(4), 308–330.

Lee, Y. M., Song, B. C., Yeum, K. J. (2015) Impact of Volatile Anesthetics on Oxidative Stress and Inflammation. *BioMed Research International*, 2015, 1–8.

Li, J. T., Wang, H., Li, W., Wang, L. F., Hou, L. C., Mu, J. L., Liu, X., Chen, H. J., Xie, K. L., Li, N. L., Gao, C. F. (2013) Anesthetic Isoflurane Posttreatment Attenuates Experimental Lung Injury by Inhibiting Inflammation and Apoptosis. *Mediators of Inflammation*, 2013, 1–16.

Li, Q., Wang, X., Yang, Y., Su, D. (2006) Up-regulation of Hypoxia Inducible Factor 1 $\alpha$  by Isoflurane in Hep3B Cells. *Anesthesiology*, 105(6), 1211–1219.



Li, Y., Xu, J., Xu, Y., Zhao, X. Y., Liu, Y., Wang, J., Wang, G. M., Lv, Y. T., Tang, Q. Y., Zhang, Z. (2018) Regulatory Effect of General Anesthetics on Activity of Potassium Channels. *Neuroscience Bulletin*, 34(5), 887–900.

Liu, K., Kaffes, A. J. (2012) Iron deficiency anaemia. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 24(2), 109–116.

Liu, Z., Zhang, M., Wang, M., Zhu, T., Huo, Q. (2020) Protective Effect of Isoflurane on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Rats Through P38MAPK Signaling Pathway. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, 10(8), 1225–1230.

Ludwiczek, S., Aigner, E., Theurl, I., Weiss, G. (2003) Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells. *Blood*, 101(10), 4148–4154.

Lunova, M., Schwarz, P., Nuraldeen, R., Levada, K., Kuscuoglu, D., Stütze, M., Vujić Spasić, M., Haybaeck, J., Ruchala, P., Jirsa, M., Deschemin, J. C., Vaulont, S., Trautwein, C., Strnad, P. (2016) Hepcidin knockout mice spontaneously develop chronic pancreatitis owing to cytoplasmic iron overload in acinar cells. *The Journal of Pathology*, 241(1), 104–114.

Ma, L., Hu, L., Feng, X., Wang, S. (2018) Nitrate and Nitrite in Health and Disease. *Aging and Disease*, 9(5), 938.

Mackenzie, E. L., Iwasaki, K., Tsuji, Y. (2008) Intracellular Iron Transport and Storage: From Molecular Mechanisms to Health Implications. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(6), 997–1030.

Mapelli, J., Gandolfi, D., Giuliani, E., Casali, S., Congi, L., Barbieri, A., D'Angelo, E., Bigiani, A. (2021) The effects of the general anesthetic sevoflurane on neurotransmission: an experimental and computational study. *Scientific Reports*, 11(1).

Marnett, L. J. (2000) Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21(3), 361–370.

Marques, R. E., Guabiraba, R., Russo, R. C., Teixeira, M. M. (2013) Targeting CCL5 in inflammation. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 17(12), 1439–1460.

Meynard, D., Babitt, J. L., Lin, H. Y. (2014) The liver: conductor of systemic iron balance. *Blood*, 123(2), 168–176.

Meynard, D., Kautz, L., Darnaud, V., Canonne-Hergaux, F., Coppin, H., Roth, M. P. (2009) Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nature Genetics*, 41(4), 478–481.

Miller, R. D. (2021) *Miller's Anesthesia*. 7th edn. Churchill Livingstone, an imprint of Elsevier Inc.

Minguet, G., Franck, T., Joris, J., Serteyn, D. (2017) Sevoflurane modulates the release of reactive oxygen species, myeloperoxidase, and elastase in human whole blood: Effects of different stimuli on neutrophil response to volatile anesthetic in vitro. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 30(4), 362–370.

Mleczko-Sanecka, K., Casanovas, G., Ragab, A., Breitkopf, K., Müller, A., Boutros, M., Dooley, S., Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U. (2010) SMAD7 controls iron metabolism as a potent inhibitor of hepcidin expression. *Blood*, 115(13), 2657–2665.

Mohanty, J. G., Nagababu, E., Rifkind, J. M. (2014) Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Frontiers in Physiology*, 5.

Molin, S. Z. D., Krueel, C. R., de Fraga, R. S., Alboim, C., de Oliveira, J. R., Alvares-da-Silva, M. R. (2014) Differential protective effects of anaesthesia with sevoflurane or isoflurane. *European Journal of Anaesthesiology*, 31(12), 695–700.

Moore, M. A., Warren, D. J. (1987) Synergy of interleukin 1 and granulocyte colony-stimulating factor: in vivo stimulation of stem-cell recovery and hematopoietic regeneration following 5-fluorouracil treatment of mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(20), 7134–7138.

- Mu, J., Xie, K., Hou, L., Peng, D., Shang, L., Ji, G., Li, J., Lu, Y., Xiong, L. (2010) Subanesthetic dose of isoflurane protects against zymosan-induced generalized inflammation and its associated acute lung injury in mice. *Shock*, 34(2), 183–189.
- Muckenthaler, M. U., Rivella, S., Hentze, M. W., Galy, B. (2017) A Red Carpet for Iron Metabolism. *Cell*, 168(3), 344–361.
- Nair, A. (2019) Pharmacogenomics of inhalational anesthetic agents. *Medical Gas Research*, 9(1).
- Nematbakhsh, M., Maleki, M., Samadi, M., Khanmoradi, M., Talebi, A., Nasri, H. (2016) The role of S-methylisothiourrea hemisulfate as inducible nitric oxide synthase inhibitor against kidney iron deposition in iron overload rats. *Advanced Biomedical Research*, 5(1), 96.
- Nemeth, E., Ganz, T. (2021) Hepcidin-Ferroportin Interaction Controls Systemic Iron Homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6493.
- Ni, C., Li, C., Dong, Y., Guo, X., Zhang, Y., Xie, Z. (2016) Anesthetic Isoflurane Induces DNA Damage Through Oxidative Stress and p53 Pathway. *Molecular Neurobiology*, 54(5), 3591–3605.
- Nicolas, G., Bennoun, M., Porteu, A., Mativet, S., Beaumont, C., Grandchamp, B., Siritto, M., Sawadogo, M., Kahn, A., Vaulont, S. (2002) Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(7), 4596–4601.
- Nicolas, G., Chauvet, C., Viatte, L., Danan, J. L., Bigard, X., Devaux, I., Beaumont, C., Kahn, A., Vaulont, S. (2002) The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, 110(7), 1037–1044.
- Noguchi, N., Watanabe, A., Shi, H. (2000) Diverse functions of antioxidants. *Free Radical Research*, 33(6), 809–817.

Orhan, H., Sahin, A., Sahin, G., Aypar, U., Vermeulen, N. P. (2012) Urinary lipid and protein oxidation products upon halothane, isoflurane, or sevoflurane anesthesia in humans: potential biomarkers for a subclinical nephrotoxicity. *Biomarkers*, 18(1), 73–81.

Orliaguet, G., Vivien, B., Langeron, O., Bouhemad, B., Coriat, P., Riou, B. (2001) Minimum Alveolar Concentration of Volatile Anesthetics in Rats during Postnatal Maturation. *Anesthesiology*, 95(3), 734–739.

Orosz, J. E. B., Braz, L. G., Ferreira, A. L. A., Amorim, R. B., Salvadori, D. M. F., Yeum, K. J., Braz, J. R. C., Braz, M. G. (2014) Balanced anesthesia with sevoflurane does not alter redox status in patients undergoing surgical procedures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 773, 29–33.

Pagani, A., Nai, A., Corna, G., Bosurgi, L., Rovere-Querini, P., Camaschella, C., Silvestri, L. (2011) Low hepcidin accounts for the proinflammatory status associated with iron deficiency. *Blood*, 118(3), 736–746.

Park, C. H., Valore, E. V., Waring, A. J., Ganz, T. (2001) Hepcidin, a Urinary Antimicrobial Peptide Synthesized in the Liver. *Journal of Biological Chemistry*, 276(11), 7806–7810.

Parrow, N. L., Fleming, R. E. (2014) Bone Morphogenetic Proteins as Regulators of Iron Metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 34(1), 77–94.

Peslova, G., Petrak, J., Kuzelova, K., Hrdy, I., Halada, P., Kuchel, P. W., Soe-Lin, S., Ponka, P., Sutak, R., Becker, E., Huang, M. L. H., Suryo Rahmanto, Y., Richardson, D. R., Vyoral, D. (2009) Hepcidin, the hormone of iron metabolism, is bound specifically to  $\alpha$ -2-macroglobulin in blood. *Blood*, 113(24), 6225–6236.

Peyssonaux, C., Zinkernagel, A. S., Schuepbach, R. A., Rankin, E., Vaulont, S., Haase, V. H., Nizet, V., Johnson, R. S. (2007) Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *Journal of Clinical Investigation*, 117(7), 1926–1932.

Pigeon, C., Ilyin, G., Courselaud, B., Leroyer, P., Turlin, B., Brissot, P., Loréal, O. (2001) A New Mouse Liver-specific Gene, Encoding a Protein Homologous to Human Antimicrobial

Peptide Hecpidin, Is Overexpressed during Iron Overload. *Journal of Biological Chemistry*, 276(11), 7811–7819.

Pisoschi, A. M., Pop, A., Iordache, F., Stanca, L., Predoi, G., Serban, A. I. (2021) Oxidative stress mitigation by antioxidants - An overview on their chemistry and influences on health status. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 209, 1–52

Pizzorno, J. E., Katzinger, J. J. (2012) Glutathione: Physiological and Clinical Relevance. *Journal of Restorative Medicine*, 1(1), 24–37.

Popa-Wagner, A., Mitran, S., Sivanesan, S., Chang, E., Buga, A. M. (2013) ROS and Brain Diseases: The Good, the Bad, and the Ugly. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 1–14.

Prasnicka, A., Lastuvkova, H., Alaei Faradonbeh, F., Cermanova, J., Hroch, M., Mokry, J., Dolezelova, E., Pavek, P., Zizalova, K., Vitek, L., Nachtigal, P., Micuda, S. (2019) Iron overload reduces synthesis and elimination of bile acids in rat liver. *Scientific Reports*, 9(1).

Rath, M., Müller, I., Kropf, P., Closs, E. I., Munder, M. (2014) Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Frontiers in Immunology*, 5.

Redza-Dutordoir, M., Averill-Bates, D. A. (2016) Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(12), 2977–2992.

Reichert, C. O., da Cunha, J., Levy, D., Maselli, L. M. F., Bydlowski, S. P., Spada, C. (2017) Hecpidin: Homeostasis and Diseases Related to Iron Metabolism. *Acta Haematologica*, 137(4), 220–236.

Rocha, T. L. A., Dias-Junior, C. A., Possomato-Vieira, J. S., Gonçalves-Rizzi, V. H., Nogueira, F. R., de Souza, K. M., Braz, L. G., Braz, M. G. (2015) Sevoflurane Induces DNA Damage Whereas Isoflurane Leads to Higher Antioxidative Status in Anesthetized Rats. *BioMed Research International*, 2015, 1–6.

Şardaş, S., Karabiyik, L., Aygün, N., Karakaya, A. (1998) DNA damage evaluated by the alkaline comet assay in lymphocytes of humans anaesthetized with isoflurane. *Toxicology Letters*, 95, 37.

Shanmugam, N. K. N., Ellenbogen, S., Trebicka, E., Wang, L., Mukhopadhyay, S., Lacy-Hulbert, A., Gallini, C. A., Garrett, W. S., Cherayil, B. J. (2012) Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Inhibits Expression of the Iron Regulating Hormone Hepcidin in Murine Models of Innate Colitis. *Plos One*, 7(5), 1–9.

Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., Pessarakli, M. (2012) Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, 2012, 1–26.

Sharma, U., Pal, D., Prasad, R. (2013) Alkaline Phosphatase: An Overview. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 29(3), 269–278.

Shen, X., Bhatt, N., Xu, J., Meng, T., Aon, M. A., O'Rourke, B., Berkowitz, D. E., Cortassa, S., Gao, W. D. (2014) Effect of Isoflurane on Myocardial Energetic and Oxidative Stress in Cardiac Muscle from Zucker Diabetic Fatty Rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 349(1), 21–28.

Shiraishi, S., Cho, S., Akiyama, D., Ichinomiya, T., Shibata, I., Yoshitomi, O., Maekawa, T., Ozawa, E., Miyaaki, H., Hara, T. (2019) Sevoflurane has postconditioning as well as preconditioning properties against hepatic warm ischemia–reperfusion injury in rats. *Journal of Anesthesia*, 33(3), 390–398.

Silva, B., Faustino, P. (2015) An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1852(7), 1347–1359.

Silvestri, L., Pagani, A., Nai, A., de Domenico, I., Kaplan, J., Camaschella, C. (2008) The Serine Protease Matriptase-2 (TMPRSS6) Inhibits Heparin Activation by Cleaving Membrane Hemojuvelin. *Cell Metabolism*, 8(6), 502–511.

Sindrilaru, A., Peters, T., Wieschalka, S., Baican, C., Baican, A., Peter, H., Hainzl, A., Schatz, S., Qi, Y., Schlecht, A., Weiss, J. M., Wlaschek, M., Sunderkötter, C., Scharffetter-Kochanek, K. (2011) An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. *Journal of Clinical Investigation*, 121(3), 985–997.

Aydın, F. S., Hukkamlı, B., Budak, H. (2021) Coaction of hepatic thioredoxin and glutathione systems in iron overload- induced oxidative stress. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 35(4) 1–10.

Soubhia, A. F., Lauz, S., Montero, E. F. D. S., Menezes, A., Mespaque, L. B., Facin, E. (2011) O efeito dos anestésicos inalatórios halotano e sevoflurano em um modelo experimental de lesão hepática. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 61(5), 597–603.

Stankowski, J. N., Dawson, V. L., Dawson, T. M. (2012) Ironing out tau's role in parkinsonism. *Nature Medicine*, 18(2), 197–198.

Štefan, L., Tepšić, T., Zavidic, T., Urukalo, M., Tota, D., Domitrović, R. (2007) Lipidna peroksidacija - uzroci i posljedice. *Medicina*, 43, 84–93.

Su, L. J., Zhang, J. H., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., Jiang, F., Peng, Z. Y. (2019) Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1–13.

Tamary, H., Shalev, H., Perez-Avraham, G., Zoldan, M., Levi, I., Swinkels, D. W., Tanno, T., Miller, J. L. (2008) Elevated growth differentiation factor 15 expression in patients with congenital dyserythropoietic anemia type I. *Blood*, 112(13), 5241–5244.

Tangudu, N. K., Buth, N., Strnad, P., Cirstea, I. C., Spasić, M. V. (2019) Deregulation of Hepatic Mek1/2–Erk1/2 Signaling Module in Iron Overload Conditions. *Pharmaceuticals*, 12(2), 1–15.

Tanno, T., Bhanu, N. V., Oneal, P. A., Goh, S. H., Staker, P., Lee, Y. T., Moroney, J. W., Reed, C. H., Luban, N. L., Wang, R. H., Eling, T. E., Childs, R., Ganz, T., Leitman, S. F., Fucharoen, S., Miller, J. L. (2007) High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nature Medicine*, 13(9), 1096–1101.

Torri, G. (2010) Inhalation anesthetics: a review. *Minerva Anestesiologica*, 75(3), 215–228.

Udipi, S., Ghugre, P., Gokhale, C. (2012) Iron, Oxidative Stress and Health. *Oxidative Stress - Molecular Mechanisms and Biological Effects*, 70(2).

Walker, V. J., Agarwal, A. (2016) Targeting Iron Homeostasis in Acute Kidney Injury. *Seminars in Nephrology*, 36(1), 62–70.

Wang, C. Y., Babitt, J. L. (2016) Hepcidin regulation in the anemia of inflammation. *Current Opinion in Hematology*, 23(3), 189–197.

Wei, H., Liang, G., Yang, H., Wang, Q., Hawkins, B., Madesh, M., Wang, S., Eckenhoff, R. (2008) The Common Inhalational Anesthetic Isoflurane Induces Apoptosis via Activation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors. *Anesthesiology*, 108(2), 251–260.

Weinberg, E. D. (1977) Infection and iron metabolism. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 30(9), 1485–1490.

Wessling-Resnick, M. (2010) Iron Homeostasis and the Inflammatory Response. *Annual Review of Nutrition*, 30(1), 105–122.

White, J. A. (2015) The Regulation and Expression of Hepcidin in Carcinogenesis as a Result of Iron Overload Disorders: An Extended Literature Review. *Journal of Cancer Prevention & Current Research*, 3(2).

Xia, Y., Li, Y., Wu, X., Zhang, Q., Chen, S., Ma, X., Yu, M. (2021) Ironing Out the Details: How Iron Orchestrates Macrophage Polarization. *Frontiers in Immunology*, 12.



Xin, H., Wang, M., Tang, W., Shen, Z., Miao, L., Wu, W., Li, C., Wang, X., Xin, X., Zhu, Y. Z. (2016) Hydrogen Sulfide Attenuates Inflammatory Hepcidin by Reducing IL-6 Secretion and Promoting SIRT1-Mediated STAT3 Deacetylation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 24(2), 70–83.

Yamamoto, M., Morita, T., Ishikawa, M., Sakamoto, A. (2020) Specific microRNAs are involved in the reno- protective effects of sevoflurane preconditioning and ischemic preconditioning against ischemia reperfusion injury in rats. *International Journal of Molecular Medicine*, 45(4), 1141-1149.

Yamauchi, Y., Furutera, A., Seki, K., Toyoda, Y., Tanaka, K., Sugimoto, Y. (2008) Malondialdehyde generated from peroxidized linolenic acid causes protein modification in heat-stressed plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(8–9), 786–793.

Yang, L., Shen, Q., Xia, Y., Lei, X., Peng, J. (2018) Sevoflurane-induced neurotoxicity is driven by OXR1 post-transcriptional downregulation involving hsa-miR-302e. *Molecular Medicine Reports*, 18(5), 4657–4665.

Yang, P., Du, Y., Zeng, H., Xing, H., Tian, C., Zou, X. (2019) Comparison of Inflammatory Markers Between the Sevoflurane and Isoflurane Anesthesia in a Rat Model of Liver Ischemia/Reperfusion Injury. *Transplantation Proceedings*, 51(6), 2071–2075.

Zanganeh, S., Hutter, G., Spitler, R., Lenkov, O., Mahmoudi, M., Shaw, A., Pajarinen, J. S., Nejadnik, H., Goodman, S., Moseley, M., Coussens, L. M., Daldrup-Link, H. E. (2016) Iron oxide nanoparticles inhibit tumour growth by inducing pro-inflammatory macrophage polarization in tumour tissues. *Nature Nanotechnology*, 11(11), 986–994.

Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., Dong, W. (2016) ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–18.

Zhou, Z. D., Tan, E. K. (2017) Iron regulatory protein (IRP)-iron responsive element (IRE) signaling pathway in human neurodegenerative diseases. *Molecular Neurodegeneration*, 12(1).

Korišteni mrežni izvori:

*FDA Drug Safety Communication: FDA review results in new warnings about using general anesthetics and sedation drugs in young children and pregnant women*, Center for Drug Evaluation and Research, U.S. Food and Drug Administration (2018) Dostupno na: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-drug-safety-communication-fda-review-results-new-warnings-about-using-general-anesthetics-and> (pristupljeno 10. listopada 2021).

*Griess Reagent System*, Promega (2019) Dostupno na: <https://nld.promega.com/products/cell-health-assays/oxidative-stress-assays/griess-reagent-system/?catNum=G2930> (pristupljeno 6. listopada 2021).

*Hemochromatosis (Iron Overload): Causes, Symptoms, Treatment, Diet & More*, Cleveland Clinic (2021) Dostupno na: <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/14971-hemochromatosis-iron-overload> (pristupljeno 13. listopada 2021).

## Životopis

### Osobne informacije

Ime i prezime: Emanuela Adrović

Datum rođenja: 2. prosinca 1997

### Obrazovanje:

**2019. – 2021.** Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno – matematički fakultet, Biološki odsjek  
Diplomski sveučilišni studij Eksperimentalna biologija, modul:  
Fiziologija i imunobiologija

**2016. – 2019.** Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno – matematički fakultet, Biološki odsjek  
Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

### Razmjena studenata:

**kolovoz 2020. – siječanj 2021.** Gothenburg, Švedska  
Chalmers university of Technology  
Department of Biotechnology and Chemical  
Engineering

### Laboratorijska stručna praksa:

**2019. – 2020.** Prirodoslovno matematički fakultet, Zavod za mikrobiologiju,  
Zagreb  
Pod voditeljstvom doc. dr. sc. Silvije Černi  
Lančana reakcija polimerazom uz reverznu transkripciju (RT-PCR),  
ugniježđena lančana reakcija polimerazom, TA-kloniranje, analiza  
polimorfizma konformacije jednolančanih molekula DNA (SSCP),  
određivanje virusnih haplotipova i analiza nukleotidnih slijedova

### Volontiranje:

**kolovoz 2019. – rujan 2019.** Kids saving the Rainforest, rezervat za divlje životinje,  
Quepos, Costa Rica

Osposobljavanje za rad s ozlijeđenim tropskim vrstama, priprema ishrane te obogaćivanje kaveza u Centru za rehabilitaciju divljih životinja

Projekti i dostignuća: Položen tečaj za osposobljavanje osoba koje rade sa pokusnim životinjama; LabAnim A kategorija

Aktivno sudjelovanje na 6. Europskom kongresu imunologije (ECI 2021) s dva postera

Demonstrator na kolegiju Imunologija i imunogenetika