Genotoksični učinak anestetika Sevoflurana i ionizirajućeg zračenja u miševa soja Swiss albino

Krsnik, Dajana

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:197366

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

Dajana Krsnik

GENOTOKSIČNI UČINAK ANESTETIKA SEVOFLURANA I IONIZIRAJUĆEG ZRAČENJA U MIŠEVA SOJA SWISS ALBINO

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad je izrađen dijelom na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a dijelom u Jedinici za mutagenezu Instituta za medicinska istraživanja i medicnu rada, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Vesne Benković, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno- matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

ZAHVALA

Ogromnu zahvalnost, u prvom redu, dugujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Vesni Benković na predloženoj temi, stručnoj pomoći, brojnim savjetima, utrošenom vremenu, razumijevanju i predanosti ovom radu.

Iskreno zahvaljujem svim suradnicima koji su dali i najmanji doprinos pri izradi ovog rada svojim stručnim savjetima te omogućavanjem potrebne opreme.

Posebnu zahvalnost iskazujem svojoj obitelji, osobito roditeljima što su mi bili potpora tijekom cjelokupnog studija te na svim riječima ohrabrenja u teškim trenutcima.

Na kraju zahvaljujem prijateljicama te svim kolegama i kolegicama s fakulteta na prijateljstvu i nesebičnoj pomoći tijekom studija, koji bez njih ne bi bio prošao tako lako i zabavno.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek
Diplomski rad

GENOTOKSIČNI UČINAK ANESTETIKA SEVOFLURANA I IONIZIRAJUĆEG ZRAČENJA U MIŠEVA SOJA SWISS ALBINO

Dajana Krsnik

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Unatoč brojnim prednostima raznih medicinskih aplikacija (npr. radioterapiji), zračenje može biti štetno i poznato je kao karcinogen za žive organizme. Glavna biomolekula od interesa je DNA. Sevofluran je nezapaljivi, inhalacijski anestetik koji osigurava brzu i učinkovitu hipnozu s niskom akumulacijom u tkivu i minimalnom iritacijom respiratornog trakta. Međutim, metabolizam sevoflurana može imati važan utjecaj na njegovu toksičnost. U ovom istraživanju se proučavalo kombinirano djelovanje ionizirajućeg zračenja (2 Gy) i sevoflurana (2,4 vol%) na oštećenja DNA u leukocitima periferne krvi te u stanicama jetre, bubrega i mozga miševa soja Swiss albino. Učinak se promatrao tehnikom alkalnog komet testa neposredno nakon te 2, 6 i 24 sata nakon izlaganja zračenju i anesteziji. Rezultati su pokazali da je najveći genotoksični učinak u leukocitima periferne krvi i stanicama bubrega bio 2 sata nakon tretmana, dok je na stanicama jetre i mozga najveća razina citotoksičnosti bila 24 sata nakon izlaganja navedenim agensima. Za procjenu razlika u količini popravka DNA među različitim stanicama, korišten je stanični indeks popravka koji je pokazao da najmanju osjetljivost na tretman genotoksičnim agensima imaju leukociti periferne krvi, a da su najosjetljivije stanice jetre.

(53 stranice, 11 slika, 12 tablica, 121 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: leukociti, jetra, bubreg, mozak, komet test, stanični indeks popravka DNA

Voditelj: dr. sc. Vesna Benković, izvanredni profesor

Ocjenitelji: dr. sc. Vesna Benković, izvanredni profesor
dr. sc. Renata Matoničkin Kepčija, izvanredni profesor
dr. sc. Gordana Rusak, redoviti profesor

Rad prihvaćen: 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology
Graduation thesis

GENOTOXIC EFFECT OF ANESTHETIC SEVOFLURANE AND IONIZING RADIATION IN SWISS ALBINO MICE

Dajana Krsnik

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Despite of many advantages of various medical aplications (i.e. radiotherapy), radiation can be harmful and it's well known as carcinogen for living organisms. The main biomolecule of interest is DNA. Sevoflurane is nonflammable, inhalation anesthetic which provides fast and efficient hypnosis with low accumulation in tissue and minimal irritation of respiratory tract. However, metabolism of sevoflurane may have an important influence for its toxicity. This research studied individual and combined effect of ionizing radiation (2 Gy) and sevoflurane (2,4 %) on DNA damage in peripheral blood leukocytes as well as in liver, kidney and brain cells of Swiss albino mice. Effect has been observed by alkaline comet assay immediately after, and 2, 6 and 24 hours after exposure to radiation and anesthesia. Results have shown that the most significant genotoxic effect in peripheral blood leukocytes and kidney cells was 2 hours after treatment, whilst in liver and brain cells the cytotoxicity was at the highest level 24 hours after exposure to these agents. Cell repair indeks, used to assess the difference in the amount of DNA repair among various cell types, shown that the least sensitive to treatment with genotoxic agents were peripheral blood leukocytes, and the most sensitive were liver cells.

(53 Pages, 11 figures, 12 tables, 121 references, original in Croatian)

Thesis deposited int he Central biological library

Keywords: leukocytes, liver, kidney, brain, comet assay, cellular DNA repair indeks

Supervisor: dr. sc. Vesna Benković, PhD, Associate Professor

Reviewers: dr. sc. Vesna Benković, PhD, Associate Professor
dr. sc. Renata Matoničkin Kepčija, Associate Professor
dr. sc. Gordana Rusak, Full Professor

Thesis accepted: 2016.

KRATICE

ROS – reaktivni kisikovi radikali (od engl. *reactive oxygen species*)

RNS – reaktivne dušikove vrste (od.engl. *reactive nitrogen species*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

SSB – jednolančani lomovi (od engl. *single-strand break*)

DSB – dvolančani lomovi (od engl. *double-strand break*)

TM – repni moment (od engl. *tail moment*)

TI – postotak DNA u repu (od engl. *tail intensity*)

TL – dužina repa kometa od (engl. *tail lenght*)

TA – ukupna površina kometa (od engl. *total area*).

CRI – stanični indeks popravka DNA (od engl. *cellular DNA repair indeks*)

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

CMR – cerebralna metabolička stopa (od engl. *cerebral metabolic rate*)

$GABA_A$ – gama-aminobutirična kiselina-A

HFIP – heksafluoroizopropanol

NHEJ – spajanje nehomolognih krajeva (od engl. *non-homologous end joining*)

HR – homologna rekombinacija (od engl. *homologous recombination*)

SCGE – gel-elektroforeza pojedinih stanica (od engl. *single cell gel electrophoresis assay*)

ALS – alkalno labilna mjesta (od engl. *alkali-labile sites*)

LMP – nisko talište (od engl. *low melting point*)

NMP – normalno talište (od engl. *normal melting point*)

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

LTN – DNA s jako dugim repovima dužine veće od 95-te percentile

(od engl. *long-tailed nucleus*)

SADRŽAJ:

1. UVOD 1

1.1. IONIZIRAJUĆE ZRAČENJE 1

1.1.1. DJELOVANJE ZRAČENJA NA ŽIVI ORGANIZAM 3

1.1.2. GENOTOKSIČNI UČINAK IONIZIRAJUĆEG ZRAČENJA 9

1.1.3. DOZE ZRAČENJA 11

1.2. ANESTEZIJA 12

1.2.1. MEHANIZAM DJELOVANJA OPĆIH ANESTETIKA 13

1.2.2. INHALACIJSKI ANESTETICI 14

1.2.3. FARMAKOKINETIKA I FARMAKODINAMIKA INHALACIJSKIH ANESTETIKA 15

1.2.4. SEVOFLURAN 17

1.2.5. GENOTOKSIČNOST SEVOFLURANA U USPOREDBI S OSTALIM OPĆIM ANESTETICIMA 18

1.3. MEHANIZMI OBRANE STANICE OD OŠTEĆENJA 19

1.4. CILJ 22

2. MATERIJALI I METODE 23

2.1. SWISS ALBINO MIŠEVI 23

2.2. SEVOFLURAN I IONIZIRAJUĆE ZRAČENJE 23

2.3. UZORCI 23

2.4. KOMET TEST 24

2.5. STANIČNI INDEKS POPRAVKA DNA (CRI) 28

2.6. STATISTIKA 28

3. REZULTATI 29

3.1. OŠTEĆENJA DNA U LIMFOCITIMA PERIFERNE KRVI NAKON IZLAGANJA SEVOFLURANU I IONIZIRAJUĆEM ZRAČENJU (2Gy) 29

3.2. OŠTEĆENJA DNA U STANICAMA BUBREGA NAKON IZLAGANJA SEVOFLURANU (2,4 vol %) I IONIZIRAJUĆEM ZRAČENJU U DOZI OD 2 Gy 31

3.3. OŠTEĆENJA DNA U STANICAMA JETRE NAKON IZLAGANJA SEVOFLURANU I IONIZIRAJUĆEM ZRAČENJU (2 Gy) 33

3.4. OŠTEĆENJA DNA U STANICAMA MOZGA NAKON IZLAGANJA SEVOFLURANU (2,4 vol%) I IONIZIRAJUĆEM ZRAČENJU (2 Gy) 35

3.5. ANALIZA BROJA STANICA S DUGIM REPOVIMA U KRVI I TKIVU BUBREGA, JETRE I MOZGA 37

3.6. DINAMIKA POPRAVKA PRIMARNIH OŠTEĆENJA U STANICAMA KRVI, BUBREGA, JETRE I MOZGA 38

4. RASPRAVA 41

5. ZAKLJUČAK 44

6. POPIS LITERATURE 45

1. UVOD

1.1. IONIZIRAJUĆE ZRAČENJE

Zračenje ili radijacija je prirodna pojava prijenosa energije kroz prostor u obliku fotona (osnovnih kvanta energije) ili elementarnih čestica među koje spadaju elektroni, neutroni te alfa i beta čestice. Čestično ili korpuskularno zračenje nastaje raspadom atomske jezgre ili ubrzanjem čestica u električnom polju dok elektromagnetsko zračenje (roj brzih fotona) nastaje prijelazom elektrona s više na nižu energijsku razinu u elektronskom omotaču atoma, zatim kočenjem brzih elektrona te nuklearnim procesima. Elektromagnetsko zračenje dijeli se u dvije kategorije: neionizirajuće zračenje u koje spadaju infracrvena svjetlost, mikrovalovi i radiovalovi te ionizirajuće zračenje koje obuhvaća x-zrake, gama (γ) zrake, alfa (α) i beta (β) čestice, neutrone i protone (McFadyen i sur., 2011; PWGSC, 2012). Pojam ionizacija podrazumijeva nastajanje električki nabijenih čestica, iona, iz neutralnih atoma ili molekula. Ionizirajuće zračenje definira se kao svaka vrsta zračenja sastavljena od čestica ili fotona koje imaju dovoljno energije za izbacivanje elektrona iz njegove orbite u atomu čime se proizvode ioni i uzrokuju trenutne kemijske promjene u biološkom tkivu. Te promjene produciraju metaboličke poremećaje koji nakon nekoliko dana ili tjedana mogu dovesti do oštećenja stanice ili naposljetku do stanične smrti ili smrti organizma (Holbert, 2008).

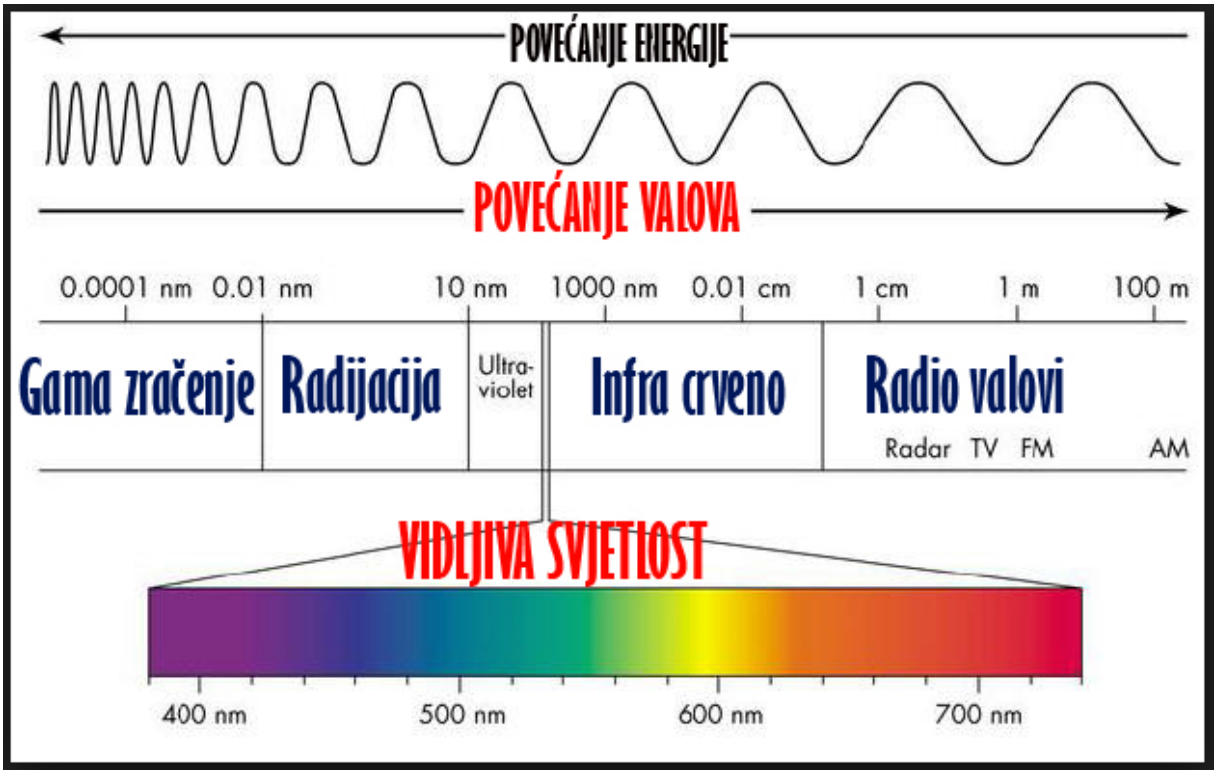
Ionizirajuće zračenje je penetrirajuće, odnosno foton može penetrirati kroz materiju bez interakcije, može se potpuno apsorbirati raspodjelom svoje energije ili se može reflektirati i osloboditi dio svoje energije na sljedeće načine:

1. fotoelektronskim interakcijama foton predaje svu svoju energiju nekom od elektrona u atomskom omotaču, obično vanjskom. Elektron je tada izbačen iz atoma.
2. nekoherentnim (Comptonovo) raspršenjem dio energije fotona je apsorbiran i foton se reflektira s reduciranom energijom u drugom smjeru;
3. koherentnim (Rayleighovo) raspršenjem jedina promjena je smjer fotona;
4. foton reagira s jezgrom na takav način da se njegova energija pretvori u materiju koja proizvodi parove čestica, elektrone i pozitivno nabijene pozitrone. To se događa samo s fotonima s viškom energije od 1,022 MeV (Hall i Giaccia, 2011).

Za razliku od neionizirajućeg, ionizirajuće zračenje ima kratku valnu duljinu i visoku frekvenciju. Pomoću frekvencije (ν) i Planckove konstante (h ~ $6{,}626*10^{-34}$) može se izračunati energija fotona nekog zračenja prema sljedećoj formuli:

$$E=h*\nu$$

Valna duljina je omjer brzine prodiranja u nekom sredstvu (c) i frekvencije zračenja (Boya, 2003). Iz toga je vidljivo da je energija proporcionalna frekvenciji te obrnuto proporcionalna valnoj duljini zračenja. Na Slici 1 prikazana je shema elektromagnetskog spektra.



Slika 1. Spektar elektromagnetskog zračenja: preuzeto s https://matrixworldhr.com/2012/05/03/dnk-prirodni-svjetlosni-internet-i-bioenergetsko-polje-ljudi/

Svi živi organizmi svakodnevno su izloženi zračenju. Osim dijagnostičkom i terapeutskom medicinskom izlaganju, kronično smo izloženi zračenju kozmičkih zraka, radioaktivnih bioprodukata, raspadanje radioaktivnih elemenata (radon). Prirodne radioaktivne tvari nalaze se u zemlji (građevinskom materijalu, stijenama), u zraku, vodi i samom tijelu čovjeka. Dijagnostička aplikacija ionizirajućeg zračenja u medicini uključuje

korištenje x-zraka i radioizotopa u dijagnostičkom slikanju. Prirodno zračenje i radioaktivnost u okolišu čine velik dio akumulirane godišnje doze za ljude koji nisu profesionalno izloženi ionizirajućem zračenju iz drugih izvora tijekom dnevnih radnih aktivnosti (Desouky, 2015). Međutim, različite skupine ljudi su ponekad izloženi većim dozama zračenja i imaju povišen rizik za različite štetne zdravstvene tegobe. Među njima su žrtve nuklearnih nesreća, radnici u nuklearnim industrijama, čistači nuklearnog otpada, ljudi koji žive u domovima okruženim nuklearnim elektranama ili istraživačkim institutima s radiološkim objektima, astronauti profesionalno izloženi kozmičkom zračenju, članovi oružanih sila potencijalno izloženi namjernim izvorima zračenja te pacijenti podvrgnuti rutinskom dijagnostičkom ili terapeutskom zračenju u medicini. Razine izlaganja ovih ljudi variraju od malih do umjerenih i jako visokih doza, rezultirajući različitim rizikom za narušavanje zdravlja (Oršolić i sur., 2008).

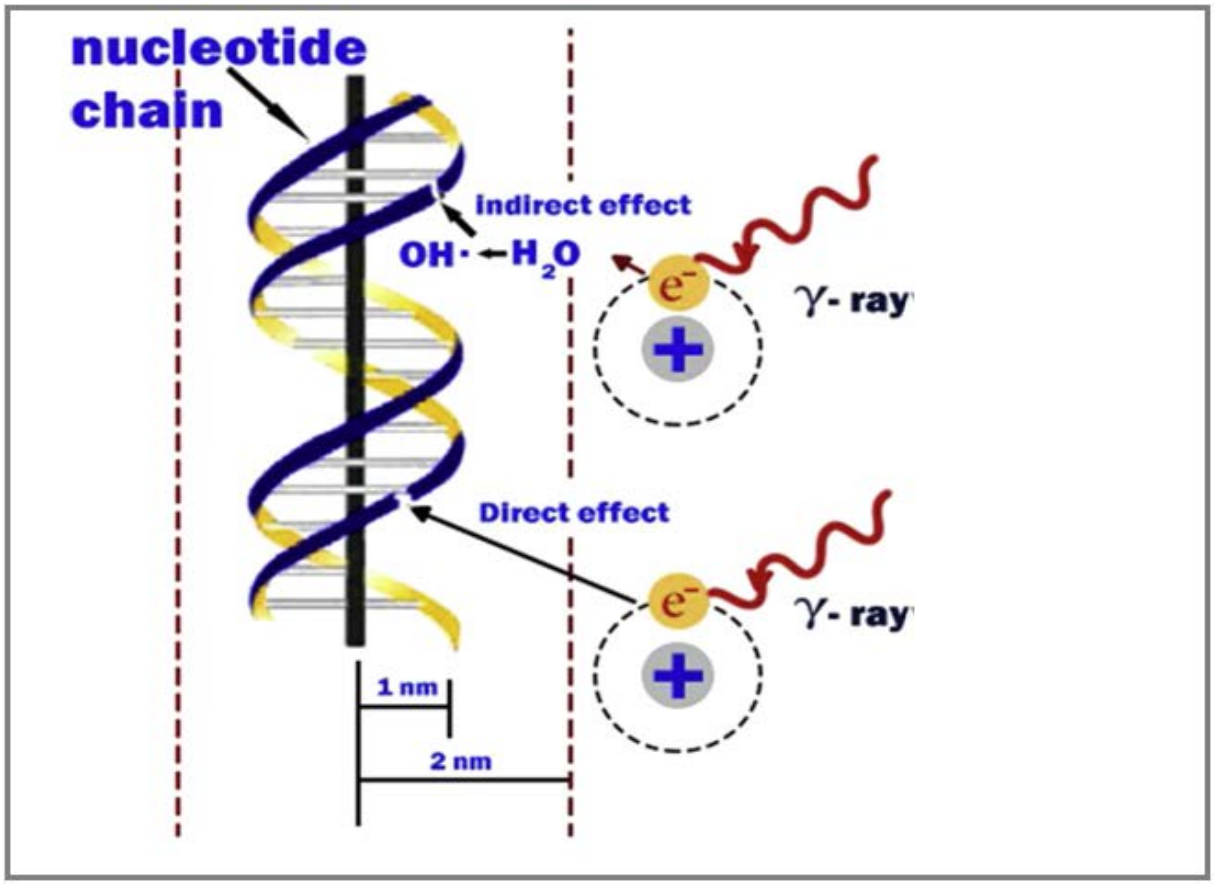
1.1.1. DJELOVANJE ZRAČENJA NA ŽIVI ORGANIZAM

Unatoč ogromnim prednostima raznih medicinskih aplikacija, zračenje može biti štetno i poznato je kao karcinogen za žive organizme. Štetni učinci zračenja su grupirani u dvije kategorije: deterministički i stohastički učinak (ICRP, 1977; ICRP, 1990). Deterministički učinci su bazirani na ubijanju stanica i karakterizirani su graničnom vrijednosti doze. Ispod granične vrijednosti nema kliničkih učinaka. Pri izlaganju dozama iznad granične vrijednosti, težina ozljeda raste s povećanjem doze. S druge strane, stohastički učinci, uključuju rak i štetne učinke bazirane na oštećenju DNA. Stohastički učinci su asocirani sa dugoročnim (kroničnim) izlaganjem niskim dozama zračenja. U tom slučaju, frekvencija odgovora, ali ne i težina, je proporcionalna dozi. Nadalje, ne postoji „sigurna“ doza za stohastičke učinke tj. smatra se da nema doze ionizirajućeg zračenja koja nije štetna (ICRP, 2008; Bashore, 2004).

Biološke posljedice izlaganja ionizirajućem zračenju su posredovane serijom fizičkih, kemijskih, biokemijskih i staničnih odgovora potaknutih nakon raspodjele energije zračenja u medij. Energija zračenja je značajno veća nego energija pohranjena u vezama mnogih molekula i može uzrokovati pucanje veze te generaciju sekundarnih elektrona (Hawas, 2013). Već dugo vremena se smatra da ionizirajuće zračenje uzrokuje razna oštećenja u organizmu kao što je stanična smrt, kromosomske aberacije, oštećenje DNA, mutageneza i

karcinogeneza (Desouky, 2015). Štetni učinci zračenja mogu se klasificirati kao rani i kasni. Rani štetni učinci događaju se tijekom tretmana ili neposredno nakon završetka i obično se razrješavaju tijekom tjedana. Kasni učinci prisutni su nekoliko mjeseci do godina nakon završetka tretmana i mogu biti trajni. Osim toga postoji potencijalni rizik za nastanak sekundarnih maligniteta, koji se obično manifestiraju 10 – 15 godina nakon tretmana (Hall i sur., 2016).

Oštećenja na stanici uzrokovana zračenjem mogu nastati direktnim ili indirektnim djelovanjem zračenja na stanične molekule. Direktni način je onaj u kojem određeni kvant energije djeluje direktno na DNA ili druge organske molekule, izravnim pogotkom nekog osjetljivog mjesta u toj molekulu, narušavajući njihovu strukturu. Pri tome dolazi do ekscitacije i ionizacije molekula, uslijed čega pucaju kovalentne veze i molekule se raspadaju na manje fragmente. Takve strukturne promjene vode staničnom oštećenju ili čak staničnoj smrti. Oštećene stanice koje prežive mogu kasnije inducirati karcinogenezu ili druge abnormalnosti. Taj proces nastaje pretežno zbog visokog LET (engl. *Linear Energy Transfer*) zračenja kao što su alfa čestice i neutroni te visokih doza zračenja. Indirektni (neizravni) način djelovanja uključuje zračenje koje pogađa molekule vode (radioliza vode). Ionizacijom i ekscitacijom molekula vode proizvode se molekule vodikovog peroksida, molekulski vodik (H_2) i brojni visoko aktivni radikali kao što su vodikov radikal (H·), hidroksilni radikal (OH·), hidroperoksilni radikal (HO·) i superoksid ($O_{2\cdot}$) te hidratizirani elektron i hidratizirani proton koji također reagiraju brzo s drugim molekulama mijenjajući ih (Slika 2). Većinski dio zračenjem induciranog oštećenja rezultat je indirektnog djelovanja jer voda sačinjava skoro 70% kompozicije stanice (Saha, 2013; Oršolić i sur., 2008). Slobodne radikale karakterizira nesparen(i) elektron(i) u strukturi pa se ponašaju kao snažni elektrofili, odnosno jaki oksidansi, što ih čini vrlo reaktivnima i zbog toga reagiraju s DNA i drugim staničnim molekulama. Broj slobodnih radikala nastalih zbog zračenja ovisi o ukupnoj dozi. Slobodni radikali postoje samo djelić sekunde. Naime, onog trenutka kada je i nastao, slobodni radikal odmah reagira s drugim molekulama (npr. nukleinske kiseline, lipidi, proteini, ugljikohidrati) i oštećuje ih (Desouky, 2015).



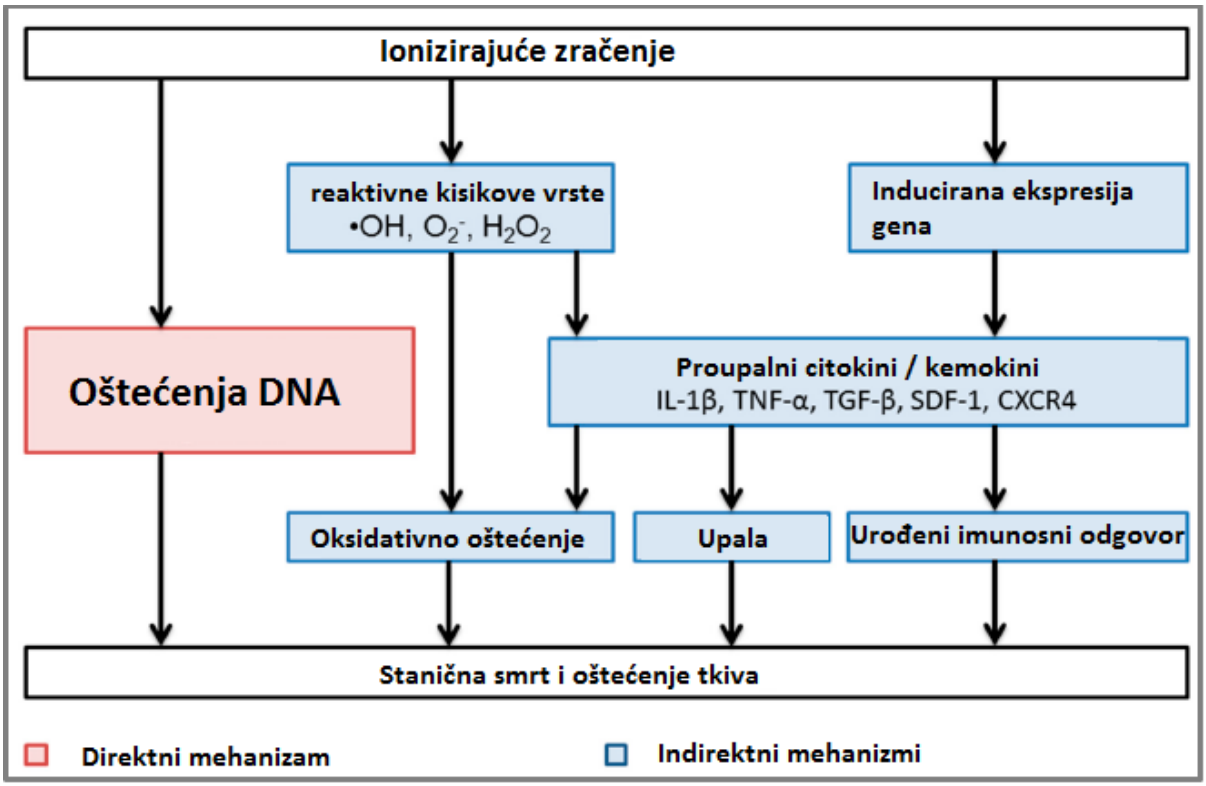
Slika 2. Direktni i indirektni učinci zračenja. Preuzeto iz Hall i Giaccia, 2011.

Oštećenja uzrokovana reaktivnim kisikovim vrstama su glavni čimbenici koji doprinose starenju i razvoju degenerativnih bolesti starenja kao što su karcinom, kardiovaskularne bolesti, disfunkcija mozga, katarakta, dijabetes i pad imunosnog sustava. Najbolje proučeni radikali su superoksidni anion i hidroksilni radikal. $O_2\cdot^-$ oksidira antioksidativne vitamine (tokoferol i askorbat), kateholamine i tiole te inaktivira razne enzime kao što su katalaza i peroksidaza. Hidroksilni radikal, sa životnim vijekom od nekoliko nanosekundi, najvažniji je slobodni radikal od biološke i toksikološke važnosti, zbog njegovog moćnog oksidativnog potencijala i nasumične reaktivnosti sa staničnim komponentama, kao što su lipidi membrana, proteini enzima i DNA (Oršolić i sur., 2008). Smatra se da je ROS važan medijator apoptotske smrti stanice; uključeni su u narušavanje membranskog potencijala mitohondrija i oslobađanje citokroma c u citosol, koji nakon vezanja s Apaf-1 formira apoptotski kompleks. Taj kompleks inicira kaskadu raznih kaspaza aktivacijom kaspaze 9 (Lyng i sur., 2006). Generacija ROS-a je također uključena u p53- i Fas- induciranu apoptozu (Nijhuis i sur., 2006). Poznato je da oštećenja DNA putem ROS-a i

reaktivnih dušikovih vrsta (RNS- od engl. *reactive nitrogen species*) iniciraju kaskadu signala i rezultiraju aktivacijom transkripcije specifičnih grupa gena koji mogu dovesti do apoptoze (Oršolić i sur., 2008). ROS, kao signalne molekule, reguliraju ekspresiju gena čiji produkti obavljaju različite funkcije u imunosnom odgovoru, kontroli proliferacije i diferencijacijskim procesima. Narušena ravnoteža ROS-a pak može aktivirati neke signalne putove ili inhibirati ostale te tako narušiti ekspresiju gena (Mohora i sur., 2009).

Osim produkcijom slobodnih radikala, indirektna toksičnost nakon zračenja može nastati kroz upalne procese. Dokazano je da su aktivacija makrofaga i upalni odgovor u hematopoetskom sustavu rane posljedice izlaganja ionizirajućem zračenju *in vivo* (Lorimore i sur., 2001). Poznato je da aktivirani makrofazi produciraju klastogene faktore, preko intermedijatora superoksida i NO-a te su sposobni inducirati genske mutacije, modifikacije baza, lomove DNA i citogenetička oštećenja u susjednim stanicama (Wright, 1998). Nakon ozračivanja dolazi i do inicijacije proupalnih rekacija u okolnom tkivu koje rezultiraju proizvodnjom brojnih proupalnih citokina i kemokina (interleukin-1, interleukin-6, tumor nekrozis faktor α i transformirajući faktor rasta β) ubrzo nakon ozračivanja. Ti medijatori potom iniciraju dugoročne upalne odgovore i kao rezultat kronične upale javljaju se ozljede tkiva (Slika 3). Proupalni odgovori su primarno odgovorni za dugoročnu toksičnost povezanu sa zračenjem, dok je produkcija slobodnih radikala povezana s kratkoročnom toksičnošću (Hall i sur., 2016).

Posljedice direktnih i indirektnih djelovanja su razvoj bioloških i psiholoških promjena koje se mogu manifestirati sekundama ili desetljećima kasnije. Genetičke i epigenetičke promjene mogu biti uključene u evoluciju ovih alteracija (Koturbash, 2008).



Slika 3. Direktni i indirektni mehanizmi stanične smrti i oštećenja tkiva povezani s izlaganjem ionizirajućem zračenju. Preuzeto i preuređeno iz Hall i sur., 2016.

Specifični stanični odgovori promatrani u odgovoru na nisku dozu zračenja opisani su kao radioadaptivni odgovor, zračenjem induciran odgovor *bystander*, hiper-radioosjetljivost na niske doze i genomska nestabilnost. Svi ovi fenomeni se javljaju u odgovoru na zračenje koja uključuje posredne molekule odnosno molekule koje nisu direktno u interakciji sa zračenjem (Waldren, 2004). Postoje brojna razmatranja, u kojima stanice koje nisu direktno pogođene ionizirajućim zračenjem pokazuju odgovore slične onima od stanica koje su direktno ozračene. U današnje vrijeme prihvaćeno je da štetni učinci ionizirajućeg zračenja nisu ograničeni samo na ozračene stanice, nego i na neozračene, susjedne stanice ili čak i na udaljene stanice što se manifestira različitim biološkim promjenama (Desouky, 2015). Ioniziranim zračenjem inducirani učinci *bystander* (RIBE) (engl. *radiation-induced bystander effects*) se definiraju kao biološki događaji u neozračenim stanicama nastali kao rezultat izlaganja drugih stanica u populaciji zračenju (Nagasawa i Little, 1992).

Indirektni učinci uključuju mnoge biološke putove koji su uključeni u signalizaciju odgovora ozračenih stanica i prijenos signala na neozračene stanice, a različiti stanični tipovi će različito odgovarati na stimulirani signalizirajući put. Mehanizmi koji vode tom fenomenu

nisu poznati, ali čini se da signal *bystander* može biti prenesen direktno kontaktnom među stanicama ili putem topljivih faktora otpuštenih u medij (Little, 2006). Među faktore koji propagiraju učinak *bystander* spadaju TGF-β, interleukin 8, serotonin i drugi. Drugi mehanizam RIBE-a se bazira na mogućnosti ozračenih stanica da izlučuju unutarstanično stvorene niskomolekularne faktore (npr. ROS, citokini, kalcijevi ioni, siRNA) koje potom primaju neozračene stanice (Merrifield i Kovalchuk, 2013). Reaktivni radikali, nastali direktno iz ozračenih stanica kao radiolitički produkti ili indirektno kroz upalne procese, prolaze do susjednih stanica pasivnom difuzijom, aktivnim transportom ili čvrstim spojevima (engl. *gap - junctions*) (Azzam i sur., 2003). Iako većina ROS-a ima kratak životni vijek i uzrokuje lokalno oštećenje, vodikov peroksid ima relativno dug životni vijek i može migrirati kroz plazmatske membrane na daleke udaljenosti i uzrokovati oštećenje DNA na udaljenim mjestima (Sokolov i sur., 2007). Među faktorima koji igraju ulogu u spomenutom učinku je dušični oksid (NO) koji ima ulogu u stimulaciji i propagaciji RIBE-a. Hidrofobna svojstva NO-a, koja mu dopuštaju difuziju kroz citoplazmu i plazmatske membrane, dopuštaju tim signalizirajućim molekulama da se lako šire od ozračenih do susjednih stanica. NO nastao u ozračenom tkivu posreduje staničnu regulaciju kroz posttranslacijske modifikacije brojnih regulatornih proteina. Najbolje proučavane od ovih modifikacija su S-nitrozilacija (reverzibilna oksidacija cisteina) i nitracija tirozina. Ove modifikacije mogu doregulirati funkciju mnogih proteina modulirajući različite NO ovisne učinke među koje spadaju stimulacija genomske nestabilnosti (GI) i akumulacija DNA pogrešaka u stanicama (Yakovlev, 2015). Proizvodnja NO-a i reaktivnih dušikovih vrsta pomoću inducibilne dušikov oksid sintetaze (iNOS) je kritično svojstvo upalnog okoliša (Vane, 1994). Aktivacija iNOS-a i prekomjerna produkcija NO-a nakon ionizirajućeg zračenja stimulira specifične mehanizme koji amplificiraju signal. Kada je nekoliko stanica u populaciji individualno ozračeno, signalizirajući faktori, uključujući NO, se oslobađaju iz ozračenih stanica i reagiraju sa susjednim neozračenim stanicama. Zauzvrat te stanice oslobađaju NO ili druge faktore koji potiču propagaciju početnog događaja. S takvom serijom kaskadnih reakcija, originalni signalni faktori proizvedeni u direktno ozračenim stanicama mogu biti umnoženi tako da RIBE može biti propagiran relativno daleko od mjesta ozračenja (Yakovlev, 2015).

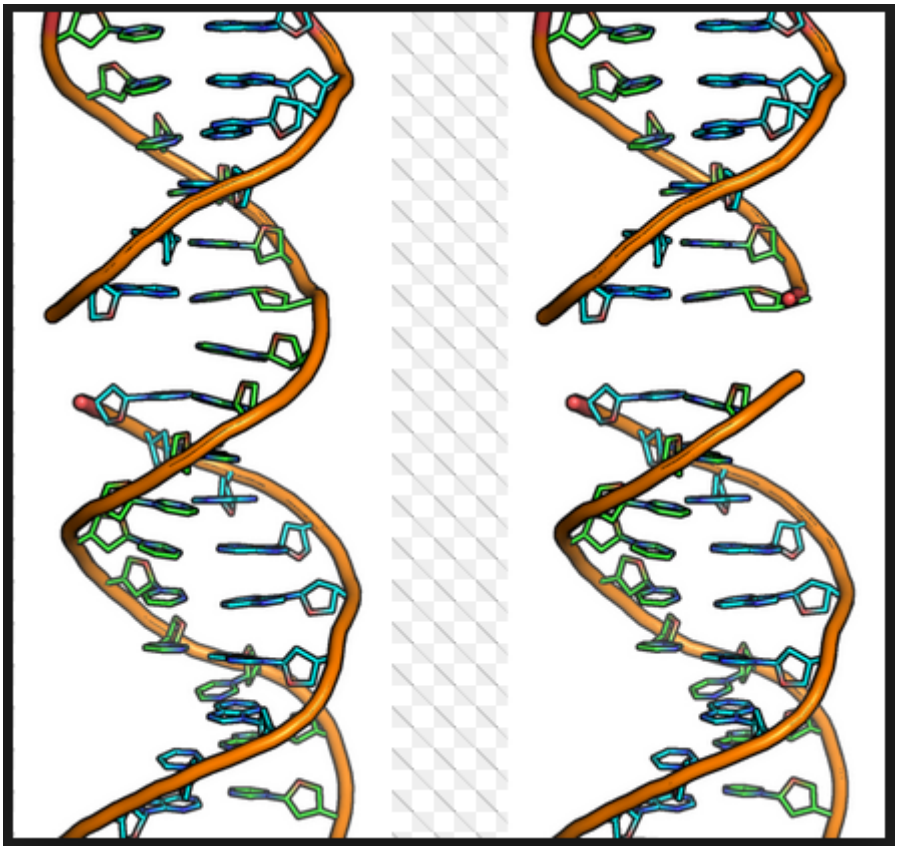
1.1.2. GENOTOKSIČNI UČINAK IONIZIRAJUĆEG ZRAČENJA

Učinak zračenja na živi organizam može se podijeliti na somatski i genetički. Somatski učinak očituje se na razini cjelokupnog organizma, dok se genetički učinak očituje na razini kromosoma i gena. Dobro je poznato da ionizirajuće zračenje oštećuje DNA i producira spektar različitih lezija oštećenja u staničnoj DNA, uključujući: više od 20 tipova oštećenja baza, jednolančani (SSB – od engl. *single strand break*) i dvolančani (DSB – od engl. *double strand break*) lomovi, oštećenja purinskih i pirimidinskih baza, prekidanje vodikovih veza i slično (Slika 4). Izlaganje stanice kliničkoj dozi ionizirajućeg zračenja uglavnom uzrokuje: 1000 jednolančanih lomova, 40 dvolančanih lomova i 3000 oštećenja baza po Grayu (Gy) (Hall i sur., 2016). Takva rana oštećenja mogu dovesti do kromosomskih aberacija i time povećati rizik od mutageneze i karcinogeneze (Martínez i sur., 2010).

Zračenje odlaže energiju u biomolekule stanica tijekom prolaska što uzrokuje kemijske modifikacije biomolekula i kao posljedica definira prostornu distribuciju induciranih lezija. Glavna biomolekula od interesa je DNA (Lomax i sur., 2013). Ionizirajuće zračenje inducira DNA oštećenja djelomično reakcijom baza (Pouget i sur., 2002) s radiolitički formiranim hidroksilnim radikalima pri čemu nastaju adukti baza. Općenito među komponentama nukleinske kiseline, gvanin je najčešći cilj za oksidativne reakcije posredovane s OH-. Modificirana baza 8-OHdG, oksidativni adukt formiran od deoksigvanozina smatra se osjetljivim markerom za DNA oštećenja tijekom napada hidroksilnog radikala na C8 gvanina. Takvo oštećenje se uglavnom uspješno popravi, ali ako je nepopravljeno, prisutnost 8-OHdG u DNA uzorcima može uzrokovati narušenu inkorporaciju nukleotida u replicirani (novonastali) lanac, što može pridonijeti razvoju raka (El-Behhawy i sur., 2015).

Kisik povećava radiosenzitivnost, djelomično reagirajući s osnovnim radikalima pri čemu nastaje forma dugoživućeg peroksilnog radikala, koji može uzrokovati nastanak jednolančanih lomova DNA (Bamatraf i sur., 1998). Smatra se da su najštetnije lezije inducirane ionizirajućim zračenjem dvolančani lomovi, lomovi fosfodiesterske osnovice na oba polinukleotidna lanca DNA (Hanai i sur., 1998). Jednolančani lomovi se popravljaju relativno lako dok dvolančani lomovi imaju mnogo ozbiljnije posljedice. Potonji su povezani s citotoksičnim učincima ionizirajućeg zračenja i smatraju se primarnim lezijama uključenim u staničnu smrt (Oršolić i sur., 2008). Ako su nepopravljeni, DSB pridonosi kromosomskim

aberacijama (dicentrici, recipročne translokacije, prstenovi) koje mogu dovesti do raznih ljudskih bolesti uključujući rak (Jackson i Bartek, 2009.).



Slika 4. Jednolančani (lijevo) i dvolančani (desno) lom molekule DNA.
Preuzeto s: http://www.bioquicknews.com/node/2696;

Lomovi nastaju direktno djelovanjem ionizirajućeg zračenja ili kroz reakcije s radikalima kao što je OH·. SSB se generalno popravlja kroz jedan sat (pri čemu neoštećeni lanac služi kao kalup za popravak), ali ako se modifikacije baza dogode blizu mjesta jednolančanog loma, popravak je težak (Eccles i sur., 2011) jer posljedično može nastati DSB tijekom replikacije. Naime, u zračeju LET, oko 70% odložene energije inducira izolirane lezije, što se pridodaje oksidativnom teretu stanice (Nikjoo i sur., 1998; 1999). Puno važnije je da oko 30% odložene energije inducira grupirana mjesta oštećenja (engl. *clustered damage sites*). Kod visokog LET-a, oko 90% depozirane energije rezultira grupiranim mjestima oštećenja uključujući i dvolančane lomove. Poznato je da takva grupirana mjesta, koja su strukturno i kemijski kompleksna, imaju reduciranu sposobnost popravka u usporedbi s individualnim lezijama (Jenner i sur., 1993; Riballo i sur., 2004; Eccles i sur., 2011). Grupirana mjesta oštećenja koja nisu dvolančani lomovi (engl. *non-DSB clustered damage*

sites) sadržavaju dvije ili više lezija unutar jednog do dva zavoja DNA uzvojnice koji mogu biti na oba lanca ili u tandemu (dvije ili više lezija na istom lancu DNA). Kako se jačina ionizacije zračenja povećava, kompleksnost i doprinos grupiranih mjesta raste (Nikjoo i sur., 2001). Smatra se da DSB induciran replikacijom nastaje kada nepopravljena grupirana mjesta oštećenja (koja nisu DSB) susretnu replikacijsku viljušku i produciraju replikacijom inducirani DSB (Harper i sur., 2010; Groth i sur., 2012), koji zahtjeva homolognu rekombinaciju za svoj popravak (Alleva i sur., 2001; Hair i sur., 2010).

1.1.3. DOZE ZRAČENJA

Ionizirajuće zračenje izaziva različita oštećenja u živim stanicama, čiji je stupanj ovisan o količini apsorbirane energije, topografskoj i vremenskoj raspodjeli doze, načinu ozračivanja, vrsti ionizirajućeg zračenja te osjetljivosti tkiva (McFadyen i sur., 2011).

Apsorbirana doza (D) definira se kao srednja energija koju je ionizirajuće zračenje prenijelo masi tvari (ICRP 2007). SI jedinica apsorbirane doze je J/kg i naziva se gray (Gy). Za procjenu oštećenja bioloških tkiva uveden je pojam ekvivaletna doza ili dozni moment (H) koja predstavlja umnožak apsorbirane doze i faktora koji se naziva relativni biološki učinak zračenja (RBE od engl. *Relative Biological Effectiveness*) ili faktor kvalitete (QF). Mjerna jedinica ekvivalentne doze je 1 sievert (1 Sv = J/kg). Za gama, beta i X-zrake ovaj faktor iznosi 1 tako da su absorbirana doza i ekvivalentna doza numerički jednake. Za alfa čestice, ovaj faktor je 20 tako da je ekvivalentna doza dvadeset puta absorbirana doza (Okano i sur., 2010; PWGSC, 2012). Ista ekvivalentna doza će međutim na različitim organima predstavljati različit rizik za mogući razvoj oboljenja, stoga je uvedena i efektivna doza (E) koja služi za procjenu oštećenja koje ionizirajuće zračenje proizvodi na različitim organima, a računa se kao zbroj ekvivalentnih doza u pojedinim dijelovima tijela (organima ili tkivima), pomnožena s tzv. težinskim faktorima ozračivanja (ICRP, 2007). Iznos je izveden iz svih organa ili tkiva za koje se smatra da su osjetljivi na indukciju stohastičnih učinaka kao što je razvoj raka. Jedinica za efektivnu dozu je J/kg odnosno sievert (Sv) (Ludlow i sur., 2008; Kim i Mupparapu, 2009).

Učinci na organizam su obrnuto proporcionalni vremenskom intervalu zračenja. Ako je jedna doza raspoređena kroz kraće vrijeme učinak će biti teži nego da je ista doza

raspoređena kroz dulje vrijeme. Uz vremensku, važna je i prostorna raspodjela apsorbirane energije, odnosno linearni prijenos energije (LET od engl. *Linear Energy Transfer*). LET je količina energije koja se rasipa po duljini puta ionizirajuće čestice (Hall i Giaccia, 2006). Fotoni x zraka i γ zraka odlažu energiju u tkiva na visoko reflektirajuć način, što ih karakterizira kao niski LET. Teške nabijene čestice su visoki LET i reagiraju s materijom odlažući energiju na drukčiji način od fotona. Budući da imaju veliku masu, u usporedbi s elektronima, nabijene čestice putuju ravnim putanjama dok penetriraju kroz tkivo (Furusawa, 2014; Weber i Kraft, 2009).

1.2. ANESTEZIJA

Anestezija je umjetno izazvana neosjetljivost cijelog tijela ili dijela tijela radi omogućavanja bezbolnog izvođenja operacije (Endacott, 1997). Lijekovi koji se primjenjuju u tu svrhu nazivaju se anestetici. Vrste anestezije se u širem smislu dijele na opću, regionalnu i lokalnu anesteziju.

Regionalna anestezija obuhvaća niz anestezioloških postupaka kojima se postiže privremeni gubitak osjeta, a često i motorike samo u određenom dijelu tijela. Najčešće se postiže tako da se lijek koji sprječava provođenje impulsa živcima, lokalni anestetik, ubrizga u neposrednu okolinu živ(a)ca koji opskrbljuje osjetno (i motorički) određeni dio tijela na kojem će se vršiti operativni zahvat (Oremuš, 2016). Opća anestezija je stanje posvemašnje neosjetljivosti za vanjske podražaje koje je izazvano reverzibilnom depresijom živčanih stanica. Pojam uključuje gubitak svijesti, svih bolnih osjeta, gašenje obrambenih refleksa, a često i relaksaciju skeletnih mišića (Jukić i sur., 2015). Cilj je postići odgovarajuću dubinu sedacije, dovoljno duboku da spriječi pomicanja pacijenata i dovoljno plitku kako bi se izbjegao rizik od apneje i gubitka refleksa (Grah, 2013).

Bolesnik se u opću anesteziju može uvesti i održavati primjenom tvari intravenskim, inhalacijskim ili kombiniranim putem. Ključ planiranja bilo koje od strategija leži u razumijevanju farmakokinetike lijekova koji su na raspolaganju. Tako farmakokinetika intravenskih hipnotika omogućava brz uvod u besvjesno stanje, međutim koncentracije anestetika u plazmi se ne mogu snižavati na drugi način izuzev njegovim metaboliziranjem zahtijevajući od anesteziologa stalnu procjenu dužine djelovanja pri doziranju. Inhalacijski anestetici, nasuprot tome, minimalno se metaboliziraju i njihovo uklanjanje iz plazme ovisi o

interakciji između plazmatskih koncentracija i alveolarnih koncentracija. U svakodnevnoj praksi stoga je najčešći uvod intravenskim lijekovima te održavanje dominantno inhalacijskim (Jukić i sur., 2015).

1.2.1. MEHANIZAM DJELOVANJA OPĆIH ANESTETIKA

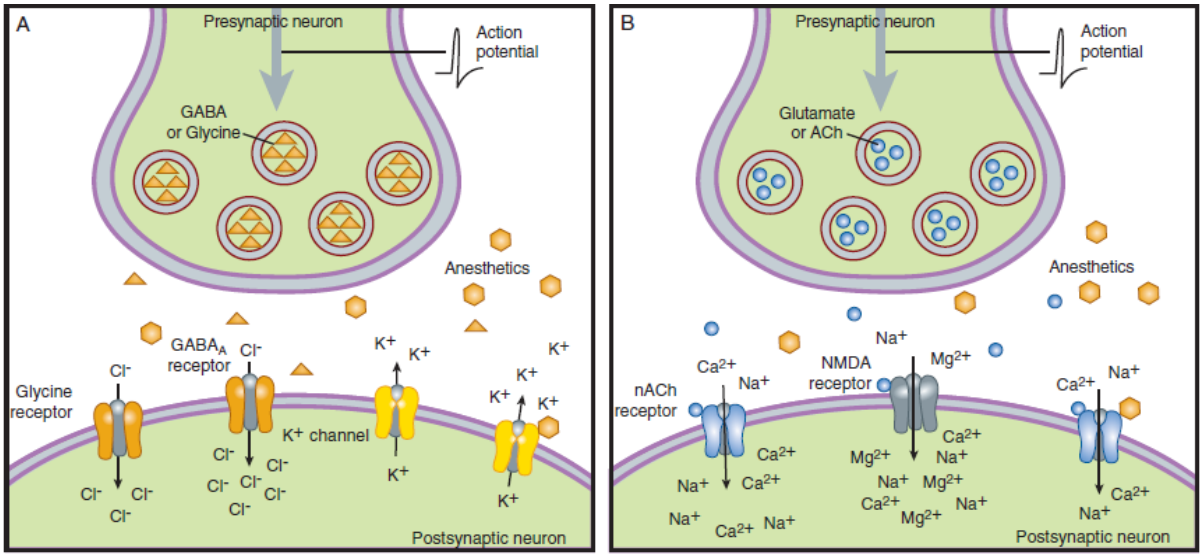
Djelovanje općih anestetika je godinama bilo zanemarivano jer se vjerovalo da djeluju nespecifično na sve stanice. Međutim, raznovrsni neurofarmakološki učinci općih anestetika se javljaju ovisno o osjetljivosti različitih neuralnih područja na djelovanje anestetika (Hemmings, 2006). Cilj djelovanja općih anestetika je postizanje bolesnikove: 1) nesvjesnosti, 2) amnezije, 3) analgezije, 4) nepokretnosti i 5) slabljenja odgovora autonomnoga živčanog sustava na bolnu stimulaciju.

Točni mehanizmi djelovanja anestetika još uvijek nisu posve poznati, ali neke ključne točke su ipak identificirane i shvaćene kao fokus djelovanja anestetika, primjerice sinapse neurona u retikularnoj formaciji koja se smatra važnim čvorištem u procesu svijesti (Jukić i sur., 2015). Djelovanjem na presinaptički neuron može se djelovati na oslobađanje neurotransmitora, dok postsinaptičko djelovanje može promijeniti frekvenciju amplitude ili prolaz impulsa kroz sinapsu.

Opći anestetici smanjuju prijenos bolnih podražaja od kralježnične moždine prema mozgu, a supraspinalno deprimiraju brojne regije i uzrokuju smanjenje protoka krvi i metabolizma glukoze u mozgu (Campagna, 2003). Imobilnost se javlja kao posljedica depresije spinalnih refleksa, a amnezija djelovanjem na hipokapmus, amigdalu, entorinalni i perinalni korteks. Već pri niskim vrijednostima MAC-a (0,2 – 0,4) pouzdano su spriječena oba tipa pamćenja (eksplicitno i implicitno). Hipnotički učinak nastaje djelovanjem na neuronske putove talamusa, korteksa i moždanog debla, regija uključenih u stvaranje svijesti (Hemmings, 2006).

Kloridni (gama-aminobutirična kiselina-A [$GABA_A$] i glicin receptori) kao i kalijevi kanali su primarni inhibitorni ionski kanali koji se smatraju ciljem djelovanja anestetika. Ekscitatorni ionski kanali koji su mete anesteticima, uključuju one koji se aktiviraju acetilkolinom (nikotinski i muskarinski receptori), ekscitatornim aminokiselinama (AMPA,

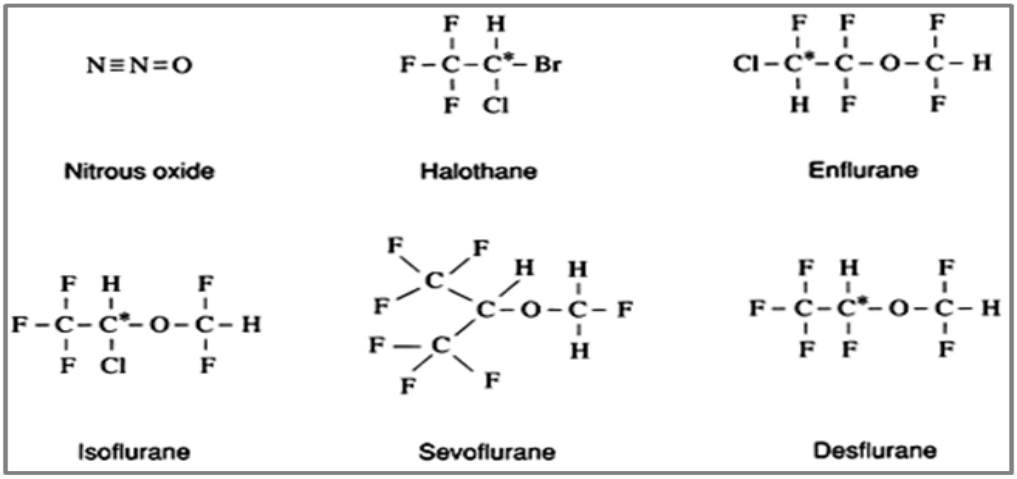
kainatni i NMDA receptori) ili serotoninom (5-HT_2 i 5-HT_3 receptori) (Katzung i sur., 2012) (Slika 5).



Slika 5. Pretpostavljena mjesta anestetičkog djelovanja. ACh, acetylcholine; GABAA, γ-aminobutirična kiselina-A. Preuzeta iz Katzung i sur., 2012.

1.2.2. INHALACIJSKI ANESTETICI

Inhalacijski anestetici dietileter, kloroform, trikloretilen i ciklopropan pripadaju dalekoj prošlosti. Danas su u uporabi isključivo fluorinirajući inhalacijski anestetici. Od njih je u kliničkoj praksi prvi bio fluoroksen, koji je izbačen 1974., zatim halotan koji se danas rijetko koristi zbog hepatotoksičnosti. Metoksifluran je uveden 1960., ali nakon desetak godina je izbačen zbog nefrotoksičnosti, dok je enfluran uveden 1963., ali je izbačen zbog kardiovaskularne depresije i prokonvulzivnog djelovanja. Većinom se koriste hlapljivi anestetici izofluran, sevofluran i desfluran, te plin dušični oksid čije su strukturne formule prikazane na Slici 6 (Jukić i sur., 2015). Hlapljivi anestetici imaju nizak tlak para i stoga visoku točku vrelišta pa su na sobnoj temperaturi (20°C) u tekućem agregatnom stanju dok plinoviti imaju visok tlak para i nisku točku vrelišta što ih čini plinovima na sobnoj temperaturi (Katzung i sur., 2012).



Slika 6. Kemijska struktura inhalacijskih anestetika. Preuzeta iz Jukić i sur., 2015.

Inhalacijski anestetici se dostavljaju u dišni put putem isparivača. To je najprihvatljiviji način kojim bi se pretvorio tekući inhalacijski anestetik u oblik koji bi se mogao dostaviti bolesniku inhalacijskim putem, tj. u obliku pare. Isparivač je uređaj koji se obično nalazi priključen na anestezijski aparat, a dostavlja zadanu koncentraciju hlapljivog anestetika. Isparivanje inhalacijskoga anestetika ovisi o temperaturi i protoku plinova. Današnji isparivači doziraju točnu koncentraciju hlapljivog anestetika u svim uvjetima. Svaki inhalacijski anestetik ima svoj specifični isparivač (Jukić i sur., 2015). Mogu se primjenjivati u smjesi plinova s kisikom i dušičnim oksidulom, sa samim kisikom, s kisikom i zrakom, ili kao dio opće anestezije u kombinaciji s intravenskim anesteticima (Brozović, 2007).

1.2.3. FARMAKOKINETIKA I FARMAKODINAMIKA INHALACIJSKIH ANESTETIKA

Inhalacijski anestetici apsorbiraju se tijekom promjene plina u alveolama. Apsorpcija iz alveola u krv te distribucija i odjeljivanje u dijelove tijela je važna odrednica kinetike ovih agenasa. Svojstva idealnog anestetika su: treba se uvesti bezbolno, treba imati trenutan početak djelovanja, minimalne neželjene učinke, brz oporavak i ne smije voditi intraoperativnom poremećaju ponašanja (Smith i sur., 1994). Nekoliko faktora određuje da se to postigne: apsorpcija, distribucija i eliminacija lijeka (Katzung i sur., 2012).

Alveolarna koncentracija je sila koja određuje apsorpciju inhaliranog anestetika. Dva parametra odlučuju koliko će se brzo mijenjati alveolarna koncentracija: udahnuta

koncentracija ili parcijalni tlak te alveolarna ventilacija. Povećanje parcijalnog tlaka u alveoli se obično izražava kao stopa alveolarne koncentracije (F_A od engl. *alveolar concentration*) kroz udahnutu koncentraciju (F_I od engl. *inspired concentration*); što prije F_A/F_I pristupi jedinici (jedan predstavlja ravnotežu), anestezija će se brže dogoditi. Drugi parametar koji kontrolira izjednačenje alveolarne i udahnute koncentracije je alveolarna ventilacija. Povećanje alveolarne ventilacije će ubrzati izjednačenje. Faktori koji kontroliraju apsorpciju, odnosno transfer anestetika iz pluća u arterijsku krv, su farmakokinetički parametri jedinstveni anestetiku kao i faktori pacijenta. Jedan od najvažnijih među njima je topljivost anestetičkog agensa. Krvno-plinski particijski koeficijent je koristan indeks topljivosti i definira relativan afinitet anestetika za krv u usporedbi onome koji ima udahnuti plin. Particijski koeficijent sevoflurana, desflurana i dušikovog oksida koji su relativno netopljivi u krvi je ekstremno nizak. U tom slučaju, relativno malo molekula je potrebno da poraste parcijalni tlak; stoga, arterijska napetost brzo raste. Suprotno, za anestetike umjerene do visoke topljivosti, kao što su halotan i izofluran, više molekula se otopi prije nego se parcijalni tlak značajno promijeni, i arterijska napetost plina raste sporije. Ostali faktori koji utječu na apsorpciju i distribuciju su prijelaz anestetika iz krvi u druge tkivne odjeljke, tzv. srčani izlaz (engl. *Cardiac output*) te razlika parcijalnih tlakova između alveola i venske krvi (Katzung i sur., 2012). Primarno mjesto metaboliziranja inhalacijskih anestetika je jetra (Waskell, 1994; Baden i Rice, 2000).

Jakost anestetika se opisuje pomoću minimalne alveolarne koncentracije (MAC od engl. *minimal alveolar concentration*). To je ona alveolarna koncentracija inhalacijskog anestetika dostatna da spriječi pokret u 50% bolesnika na bolni podražaj (kirurška incizija). Što inhalacijski anestetik ima manji MAC, to je potentniji. Vrijednost MAC-a izražava se u postotcima, tj. radi se o postotku alveolarne koncentracije plinova koju zauzima dotični anestetik (Jukić i sur., 2015). Ovo djelovanje je regulirano primarno inhibicijom neurona leđne moždine.

Inhalirani anestetici smanjuju metaboličku aktivnost mozga. Smanjena cerebralna metabolička stopa (CMR od engl. *cerebral metabolic rate*) reducira protok krvi u mozgu. Međutim, hlapljivi anestetici također uzrokuju cerebralnu vazodilataciju koja može povećati protok krvi kroz mozak. Taj učinak ovisi o koncentraciji anestetika. Na 0,5 MAC, redukcija CMR-a je veća od vazodilatacije uzrokovane anestetikom, stoga je smanjen protok krvi kroz mozak. Suprotno, pri 1,5 MAC, vazodilatacija je veća od redukcije CMR-a pa je protok krvi

veći. Pri 1 MAC, učinci su u ravnoteži i protok cerebralne krvi je nepromijenjen (Katzung i sur., 2012).

Stariji pacijenti su generalno osjetljiviji na analgetike i sedative. Varijabilnost farmakokinetike i dinamike je visoka pa su manje doze potrebne za klinički učinak u usporedbi s odraslom populacijom te je produljeno trajanje djelovanja. Stoga doziranje treba pažljivo titrirati po principu: „početi nisko – ići polako“ (Schofield, 2014).

Vrijeme oporavka od inhalacijske anestezije ovisi o stopi eliminacije anestetika iz mozga. Među najbitnijim faktorima koji to reguliraju su krvno plinski particijski koeficijent (engl. *blood-gas partition coefficient*) i tkivna topljivost anestetika. Inhalirani anestetici koji su relativno netopljivi u krvi i mozgu imaju bržu stopu emilinacije (NO, desfluran, sevofluran) i vode bržem oporavku od anestezije u usporedbi s topljivijim anesteticima (halotan i izofluran). Moderni inhalacijski anestetici se eliminiraju uglavnom ventilacijom i metaboliziraju se u maloj mjeri; stoga, metabolizam ovih lijekova ne igra značajnu ulogu u terminaciji njihovog djelovanja. Međutim, jetreni metabolizam može pridonijeti eliminaciji i oporavku za neke starije hlapljive anestetike. Npr. halotan se eliminira puno brže nego enfluran, zbog toga što je preko 40% udahnutog halotana metabolizirano tijekom prosječne anestetičke procedure, dok je manje od 10% enflurana metabolizirano u istom periodu. Redoslijed opsega jetrenog metabolizma za inhalirane anestetike je halotan > enfluran > sevofluran > izofluran > desfluran > NO (Katzung i sur., 2012).

1.2.4. SEVOFLURAN

Sevofluran je snažan inhalacijski anestetik novije generacije. Razvijen u kasnim 1960-im, ali je odobren za kliničku primjenu 1995. (Braz i sur., 2011). Kemijska formula sevoflurana je CH2F-O-CH-(CF3)2, a sinonimi su mu 1,1,1,3,3,3 – heksafluoro – 2 – (fluorometoksi) propan te fluorometil – heksafluororizopropil – eter.

Sevofluran je nezapaljiv, visoko fluoriran anestetik koji osigurava učinkovitu hipnozu s niskom akumulacijom u tkivu i minimalnom iritacijom mukoznih membrana (Migliari i sur., 2009; Patel i Goa, 1996). Zbog slatkog mirisa, koristi se za anesteziju kod odraslih i djece (Braz i sur., 2011). Među hlapljivim anesteticima, sevofluran je manje iritantan za respriratorni trakt i ima nisku topljivost u krvi, što rezultira brzom indukcijom anestezije i brzim oporavkom (Strum i Eger, 1987; Nathanson i sur., 1995), stoga postoje pretpostavke da može upotpuniti kriterije idealnog anestetika.

MAC sevoflurana je 2,05 vol%. Sevofluran ima brzu apsorpciju i ekskreciju iz tijela (Kharasch, 1996). Metabolizira se oko 5% udahnutog sevoflurana, uglavnom preko 2E1 odjeljka citokroma P-450 u jetri, a manji dio sevoflurana se deflorira u bubregu putem citokroma P-450 (Brozović, 2007). Sevofluran se metabolizira do anorganskog fluorida i organskog metabolita HFIP (engl. *Hexafluoroisopropanol*) (Holaday i Smith, 1981). Kocentracija fluoridnih iona u plazmi doseže vrhunac unutar jednog sata (Frink i sur., 1994) i proporcionalna je dozi (Frink i sur., 1992; Kobayashi i sur., 1992; Smith i sur., 1992). HFIP se ne defluorira niti oksidira, ali brzo konjugira s HFIP- glukuronidom i izlučuje urinom (Holaday i Smith, 1981). Povišena koncentracija HFIP-a može dovesti do depresije centralnog živčanog sustava u miševa *in vivo* te prouzročiti citotoksičnost stanica jetre *in vitro* (Kharasch, 1995). U kontaktu s CO2 absorberom u anestezijskom krugu može se razgrađivati u spoj A (engl. *compound A*) ili PIFE – pentafluoroizopropenil fluorometil eter. Kod štakora ovaj spoj izaziva bubrežno oštećenje (Jukić i sur., 2015), a u stanicama jajnika kineskog hrčka povećava učestalost razmjene sestrinskih kromatida (SCE) (Braz i sur., 2011). Kod ljudi je situacija manje jasna.

Točan mehanizam djelovanja sevoflurana se ne zna, ali smatra se da djeluje kao pozitivni alosterički modulator $GABA_A$ receptora (Schüttler i Schwilden, 2008). Sevofluran pojačava amplitudu odgovora na nisku koncentraciju GABA i produljuje trajanje sinaptičke inhibicije posredovane GABA-om tako da drži kanal otvorenim. Pri suprakliničkim koncentracijama sposoban je izravno aktivirati kanal bez prisutnosti GABA-e. Međutim, vezno mjesto sevoflurana i dalje ostaje nejasno (Katzung, 2012). Također djeluje i kao antagonist NMDA receptora (Brosnan i Thiesan, 2012), potiče strujanje glicinskih receptora, a inhibira strujanje nACh (Van Dort, 2008) i $5\text{-}HT_3$ receptora (Hang i sur., 2010).

1.2.5. GENOTOKSIČNOST SEVOFLURANA U USPOREDBI S OSTALIM OPĆIM ANESTETICIMA

Iako se sigurnost anestezije dramatično poboljšala, još uvijek postoje neke nuspojave i neočekivani rezultati (Broz i sur., 2011). Metabolizam inhalacijskih anestetika može imati važnu implikaciju za njihovu toksičnost, bilo akutnu ili kroničnu.

Akutna toksičnost uključuje: nefrotoksičnost; hematotoksičnost (inhalirani anestetici, interakcijom s jakim bazama, mogu proizvesti ugljikov monoksid koji ima veliku sklonost

vezanja za hemoglobin, smanjujući ispostavu kisika u tkiva); zloćudnu hipertermiju – nasljedni genetski poremećaj skeletnih mišića koji se pojavljuje kod osjetljivih pojedinaca izloženih hlapljivim anesteticima pod općom anestezijom; hepatotoksičnost koja je uglavnom vezana za halotan, dok je kod ostalih inhalacijskih anestetika rijetka (Katzung i sur., 2012).

Kronična toksičnost se odnosi na mutagenost, teratogenost i reproduktivne učinke. U normalnim uvjetima, inhalirani anestetici nisu mutageni ni karcinogeni za pacijente. Dušični oksid može biti izravno teratogen u životinja pri visokim izlaganjima. Halotan, enfluran, izofluran, desfluran i sevofluran mogu biti teratogeni u glodavaca kao rezultat fizioloških promjena povezanih s anestezijom prije nego kao izravan teratogeni učinak. Epidemiološke studije sugeriraju porast stope raka u osoblju operacijskih sala koji su bili izloženi anestetičkoj koncentraciji u tragovima (Katzung i sur., 2012).

Glavni mehanizmi toksičnosti su unutarstanično nakupljanje metabolita u toksičnoj količini, zatim stvaranje haptena koji mogu dovesti do sistemske preosjetljivosti ili imunog odgovora te stvaranje reaktivnih metabolita koji se mogu kovalentno vezati za tkivne makromolekule ili stvoriti razarajuće slobodne radikale (Brozović, 2007). Životni vijek nukleofilnih metabolita s nesparenim elektronima je kratak, reaktivnost velika kao i posljedična oštećenja stanica. Obzirom da su inhalacijski anestetici lipofilni, oštećenja od njihovih slobodnih radikala su najveća na lipidnim membranama; dolazi do peroksidacije membrana odvajanjem hidrogena od α-metilen ugljikovog atoma u masnim kiselinama (Baden i Rice, 2000).

Istraživanja su pokazala da sevofluran i izofluran imaju slične genotoksične odgovore u pacijenata koji su podvrgnuti trbušnoj operaciji. U tih bolesnika, oštećenja DNA su se povećala 60 i 120 minuta nakon anestezije do prvog dana poslije anestezije i vratila su se na početne vrijednosti 3 dana nakon operacije (Karabiyik i sur., 2001).

1.3. MEHANIZMI OBRANE STANICE OD OŠTEĆENJA

Biološki sustav je tijekom evolucije razvio odgovarajuće antioksidativne mehanizme za zaštitu staničnih komponenti od oksidativnog oštećenja. Osim toga razvio je i razne mehanizme za popravak nastalih oštećenja i uklanjanje oštećenih molekula da njihovo nakupljanje ne izazove nova oštećenja. Antioksidativna obrana organizma uključuje seriju unutarstaničnih antioksidativnih enzimskih i neenzimskih reakcija, čija je uloga „uhvatiti“

slobodne radikale te ih inaktivirati. Hvatanje slobodnih radikala je važan mehanizam u sprječavanju oksidativnog oštećenja stanice.

Osnovni obrambeni sustav protiv kisikovih slobodnih radikala su enzimi: superoksid dismutaza (SOD), GSH peroksidaza (GSHPx), glutation reduktaza (GR) i katalaza (CAT). Neenzimski antioksidativni sustav su uglavnom niskomolekularne tvari, kao što su vitamin C i E, flavonoidi, karotenoidi, peptidi sa SH grupama (glutation, metalotioneini) i brojni drugi fiziološki aktivni spojevi. Reducirani GSH je endogeni antioksidans koji djeluje kao prva linija obrambenog sustava. GSH ima važnu ulogu u detoksificiranju raznih elektrofilnih komponenata i peroksida. SOD je važan obrambeni enzim koji katalizira dismutaciju superoksidnih aniona i nalazi se u svim stanicama koje metaboliziraju kisik, dok je CAT hemoprotein koji katalizira redukciju vodikovog peroksida i štiti tkivo od visoko reaktivnih hidroksilnih radikala, a nalazi se u svim stanicama organizma. Reducirana aktivnost SOD i CAT u organizmu nakon izlaganja zračenju ili anesteticima može rezultirati štetnim učincima zbog nakupljanja superoksidnih radikala i vodikovog peroksida. GSHPx detoksificira H_2O_2 do H_2O kroz oksidaciju reduciranog glutationa. Glutation sintetaza, najvažnija biološka molekula koja štiti od kemijski inducirane toksičnosti, sudjeluje u eliminaciji reaktivnih intermedijara redukcijom hidroperoksida u prisutnosti glutation peroksidaze. Smanjena razina glutation sintetaze u ozračenim životinjama predstavlja povećano iskorištavanje zbog oksidativnog stresa. Stoga, antioksidativni status stanice je važna odrednica osjetljivosti stanice na oksidativna oštećenja (Oršolić i sur., 2008).

Stanična molekula od najvećeg interesa je DNA. U molekuli DNA događaju se različite kemijske promjene, bilo spontano, bilo kao posljedica izloženosti kemikalijama (npr. anestetici) ili zračenju. Takva oštećenja mogu blokirati replikaciju ili transkripciju i rezultirati visokom učestalošću mutacija, stoga su stanice, kako bi održale integritet svojega genoma, morale razviti mehanizme za popravak oštećenja DNA. Mehanizmi popravka DNA mogu se podijeliti u tri opće skupine:

a) izravni obrat kemijske reakcije odgovorne za oštećenje DNA;

b) uklanjanje oštećenih baza nakon čega slijedi njihova zamjena novosintetiziranom DNA;

c) rekombinacijski popravak (Cooper i Hausman, 2004).

Stanično oštećenje reverzibilno je do određene točke; teški ili trajni stres stanica vodi ireverzibilnom oštećenju stanica i umiranju stanica procesom apoptoze ili nekroze (Brozović 2007).

Većina oštećenja ograničena na jedan lanac DNA popravlja se uklanjanjem oštećene baze nakon čega slijedi ponovna sinteza uklonjenog područja. U popravku izrezivanjem, oštećena DNA biva prepoznata i uklonjena bilo u obliku slobodnih baza (BER od engl. *base excision repair*) ili nukleotida (NER od engl. *nucleotide excision repair*). Nastala pukotina se zatim popunjava sintezom novog lanca DNA korištenjem neoštećenog komplementarnog lanca kao kalupa (Cooper i Hausman, 2004). Popravak izrezivanjem baza je ugrožen kada je baza za uklanjanje blizu svršetka DSB (Dobbs i sur., 2008), dosljedno zapažanju da se kompleksni DSB spoje prije nego se uklone modificirane baze (Datta i sur., 2011).

Neka se oštećenja mogu popraviti izravnim obratom oštećenja, npr. pirimidinski dimeri nastali kao rezultat izlaganja ultraljubičastom (UV) svjetlu. Proces se naziva fotoreaktivacija jer se za kidanje strukture ciklobutanskog prstena (koji spaja dva susjedna pirimidina) koristi energija vidljive svjetlosti, a vrši se pomoću fotoreaktivacijskih enzima (DNA fotoliaza) (Cooper i Hausman, 2004).

Rekombinacijski popravak pruža glavni mehanizam za popravljanje dvolančanih lomova koja se mogu pojaviti u molekuli DNA kao posljedica ionizirajućeg zračenja ili djelovanja nekih kemijskih čimbenika (lijekovi). Zasniva se na zamjeni oštećene DNA rekombinacijom s neoštećenom molekulom. Ovaj mehanizam se učestalo koristi za popravak oštećenja na koja se nailazi za vrijeme replikacije DNA kada prisutnost timinskih dimera ili drugih lezija, koje ne mogu biti kopirane djelovanjem normalne replikacije DNA-polimeraze, blokira napredovanje replikacijskih rašlji. Rekombinacijski popravak ovisi o činjenici da je jedan lanac roditeljske DNA ostao neoštećen i da je replikacijom dao normalnu sestrinsku molekulu, koja sada može biti iskorištena za popravak oštećenoga lanca (Cooper i Hausman, 2004).

U stanicama sisavaca, DSB se popravljaju pomoću dva glavna rekombinacijska puta, nazvani spajanje nehomolognih krajeva (NHEJ od engl. *non-homologous end joining*) i homologna rekombinacija (HR od engl. *homologous recombination*). NHEJ je glavni put popravka trenutno nastalih (engl. *prompt*) DSB-ova kroz sve faze staničnog ciklusa, dok HR nudi veću točnost popravka (Van Gent i sur., 2001; Lieber, 2010). HR je posredovan grupom proteina RAD52, koja, među ostalima, uključuje RAD50, RAD51, RAD52 i RAD54 (Oršolić i sur., 2008). Dokazi upućuju da je većina dvolančanih lomova uzrokovana LET zračenjem popravljena unutar 30-60 minuta, dok je mala frakcija lomova, do 20% od ukupnog broja,

sporije popravljena u stanicama sisavaca i neki mogu opstati duže od 24 sata (Asaithamby i sur., 2008; Jakob i sur., 2011).

Oštećenje DNA, kao i oštećenje cijele stanice reverzibilno je do određene točke. Ako je mehanizam popravka DNA nučinkovit, zbog teškog ili trajnog stresa, nastaje ireverzibilno oštećenje stanice. Stanica tada umire procesom apoptoze ili nekroze, no ako stanica preživi, oštećeni DNA lanac koji se replicira vodi mutagenezi i karcinogenezi te se povećava rizik za nastanak brojnih genetičkih bolesti (Brozović, 2007; Oršolić i sur., 2008).

1.4. CILJ

Cilj ovog rada je istražit genotoksično djelovanje ionizirajućeg zračenja u dozi od 2 Gy u kombinaciji sa anestetikom sevofluranom. Istraživanje ćemo provesti na modelu *in vivo* (Swiss albino miševima), primjenom alkalnog komet testa na stanicama periferne krvi, mozga, bubrega i jetre. Dinamiku popravka oštećenja pratit ćemo uzimanjem uzoraka neposredno nakon (nulto vrijeme) te u periodu od 2, 6 i 24 sata nakon izlaganja zračenju i sevofluranu. Osjetljivost stanica različitih tkiva utvrditi ćemo izračunavanjem staničnog indeksa popravka (CRI – od engl. *Cellular DNA repair indeks*).

2. MATERIJALI I METODE

2.1. SWISS ALBINO MIŠEVI

Istraživanje je napravljeno na Swiss albino miševima uzgojenima na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka na Prirodoslovno -matematičkom fakultetu (PMF-u) Sveučilišta u Zagrebu, a provedeno je prema Vodiču za držanje i korištenje laboratorijskih životinja (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHSS (NIH) Publ # 86-23). Miševi su bili stari 60 ± 5 dana. Uzgajani su 12 sati na danjem svjetlu i 12 sati u mraku na temperaturi od 25 °C, a hranjeni su standardnom hranom za laboratorijske životinje (Standard Diet GLP, 4RF 1, Mucedola, Settimo Milanese MI, Italija), uz konstantnu dostupnost vode *ad libitum*. Provedbu pokusa odobrilo je Etičko povjerenstvo PMF-a Sveučilišta u Zagrebu.

2.2. SEVOFLURAN I IONIZIRAJUĆE ZRAČENJE

Inhalacijski anestetik sevofluran (2,4 vol%), proizveden u Abbott Laboratories Ltd, (Queenborough, Velika Britanija) korišten je za anesteziju miševa. Sevofluran je primijenjen u kombinaciji sa kisikom (50:50), pomoću indukcijske komore povezane na anestezijski aparat (Sulla 800; Dräger, Njemačka). Tretman je trajao 2 sata nakon čega su miševi nepomično spavali i spontano disali.

Nakon anestezije životinje su izložene ionizirajućem zračenju (X-zrakama) u dozi od 2 Gy-a u Kliničkoj bolnici Sveti Duh (Zagreb). Brzina zračenja je bila 1.88 Gy/min, a za izvor je korišten kobalt (^{60}Co–Theratron Phoenix teletherapy unit, Atomic Energy Ltd.).

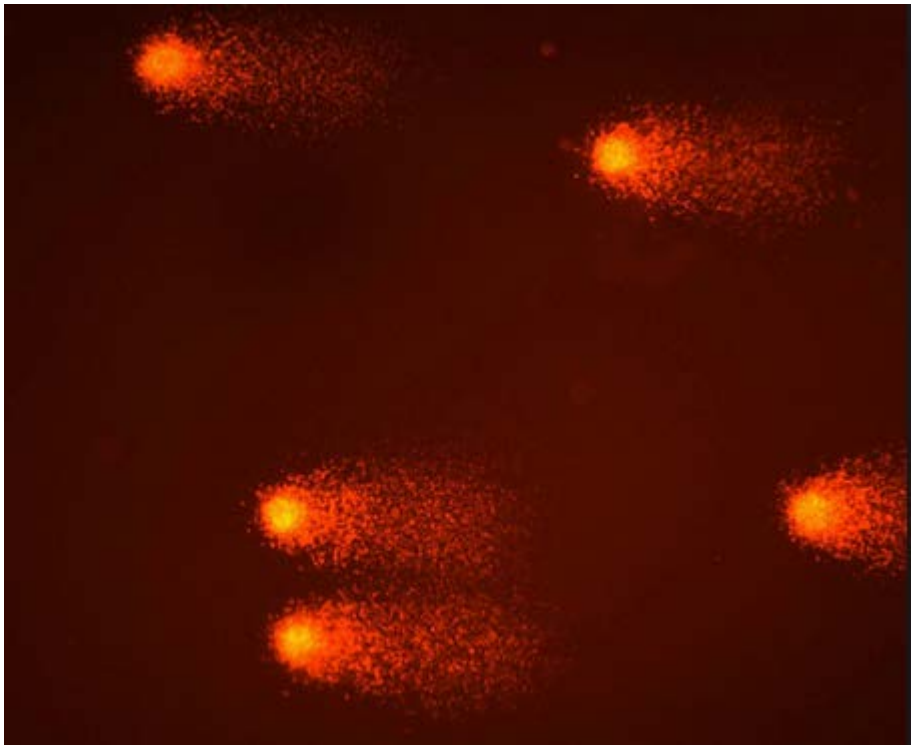
2.3. UZORCI

Miševi su podijeljeni u pet skupina (u svakoj skupini je bilo 5 životinja): 1. kontrolna skupina; 2. skupina koja je žrtvovana neposredno nakon tretmana inhalacijskim anestetikom sevofluranom i ionizirajućim zračenjem; 3. skupina miševa koji su žrtvovani 2 sata nakon tretmana sevofluranom i zračenjem; 4. skupina žrtvovana 6 sati nakon izlaganja sevofluranu i zračenju; 5. skupina miševa žrtvovanih 24 sata nakon izlaganja sevofluranu i ionizirajućem zračenju. Životinje su žrtvovane cervikalnom dislokacijom (prema Zakonu o zaštiti životinja (NN 135/06)).

Iz svake skupine uzeti su uzorci leukocita periferne krvi te tkiva jetre, bubrega i mozga. Na 1 gram svakog tkiva dodano je 1 mL pufera za homogenizaciju (0,075 M NaCl i 0,024 M Na_2EDTA) nakon čega su tkiva mehanički usitnjena do jednostanične suspenzije. Pufer je držan u hladnjaku na + 4° C.

2.4. KOMET TEST

Analiza oštećenja DNA osigurava korisne informacije u pogledu ranih bioloških učinaka zbog izlaganja štetnim kemikalijama i/ili zračenju te ima veliku važnost u kliničkim istraživanjima. Jedna od brzih, točnih i osjetljivih metoda, koja se koristi u istraživanjima za detektiranje oštećenja DNA *in vitro* i *in vivo,* je komet test ili gel- elektroforeza pojedinih stanica (SCG ili SCGE od engl. *single cell gel electrophoresis assay*). 1984. godine, švedski znanstvenici Östling i Johanson (1984) razvili su ovu metodu za mjerenje dvolančanih lomova DNA pod neutralnim uvjetima. Kasnije, Singh i sur. (1988) uveli su modificiranu verziju, koja koristi alkalne uvijete što poboljšava specifičnost i ponovljivost ove tehnike. Naime, uz dvolančane, sposobna je mjeriti i jednolančane lomove DNA, alkalno labilna (apurinska) mjesta, oštećenja parova baza i apoptotične stanice. Budući da gotovo svi genotoksični agensi induciraju SSB i/ili ALS u većoj mjeri nego što induciraju DSB, alkalna verzija testa nudi povećanu osjetljivost za identifikaciju genotoksičnosti agensa. Komet test se bazira na kvantifikaciji denaturiranih fragmenata DNA koji migriraju izvan stanične jezgre tijekom elektroforeze pri čemu oštećene stanice poprimaju oblik kometa, po čemu su te stanice i dobile naziv „komet“ kao i metoda naziv „komet test“ (Liao i sur., 2009) (Slika 7).



Slika 7. Analiza DNA oštećenja komet testom.
Preuzeto s: http://www.nioh.ac.za/?page=genotoxicity_assessment_unit&id=98

Jedinstveno svojstvo komet testa je njegova mogućnost za identifikaciju i kvantifikaciju stanične heterogenosti u odgovoru na izlaganje genotoksičnim agensima, i on je prvi razvijeni test koji je sposoban identificirati oštećenja DNA u pojedinačnoj stanici (Olive i Durand, 2005). Komet test ima brojne prednosti u usporedbi s drugim genotoksičnim testovima. Osim već spomenute mogućnosti da identificira DNA oštećenja na razini pojedine stanice, ovaj test je osjetljiv na niske razine DNA oštećenja, zahtijeva malen broj stanica po uzorku, jednostavno se koristi, niske je cijene, a izvedba mu je kratkotrajna. Također, ovaj test je fleksibilan budući da se može koristiti za procjenu različitih tipova DNA oštećenja, i prilagodljiv je za različite eksperimentalne zahtjeve (Tice i sur., 2000). Komet test ima široku upotrebu u različitim područjima uključujući ljudski biomonitoring, genotoksikologiju, okolišni monitoring, dijagnozi genetičkih bolesti i fundamentalnim istraživanjima DNA oštećenja i procesa popravku odgovoru na genotoksične agense (Amaeze i sur., 2015; Forchhammer i sur., 2012).

U ovom radu koristili smo komet test u alkalnim uvjetima (pH < 13) za istraživanje DNA oštećenja i procesa popravaka u različitim tipovima stanica miša, soja *Swiss albino,* u odgovoru na izlaganje ionizirajućem zračenju (2Gy) i anestetiku sevofluranu.

Nakon što su dobivene suspenzije stanica pojedinih tkiva (krvi/ jetre/ bubrega/mozga), osnovni koraci u komet testa uključuju pripremu stakalaca sa stanicama vezanim na agarozni gel, lizu stanica da se oslobodi DNA, odmotavanje DNA, elektroforezu, neutralizaciju lužinom, bojanje DNA i analizu i mjerenje dobivenih kometa. Izvođenje ovih koraka na odgovarajući način omogućava pouzdanu detekciju DNA oštećenja induciranog genotoksičnim agensima.

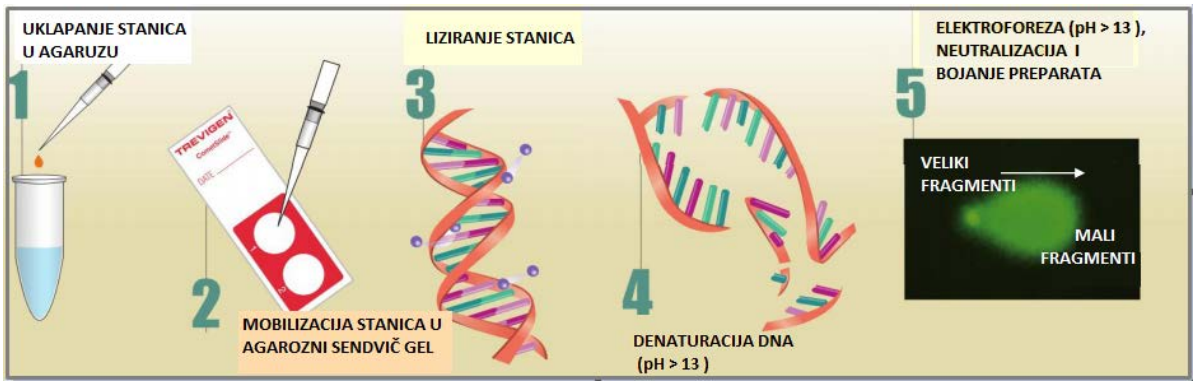
Za pripremu uzoraka koristili smo „sendvič „ gel na brušenim stakalcima (Surgipath, SAD) od tri različita sloja agaroze. 5 µL sedimentiranih stanica (pojedinog tkiva) pomiješano je sa 100 µL 0,5 % LMP agaroze (LMP od engl. *low melting point*) da se dobije 10000 stanica po stakalcu. Taj agarozni sloj sa stanicama je nanesen između donjeg sloja, 0,6 % NMP agaroze (NMP od engl. *normal melting point*) i gornjeg sloja kojeg čini 0,5 % LMP agaroza. Koncentracija stanica u agarozi, kao i koncentracija same agaroze, važni su parametri za provedbu uspješne analize. Treba voditi računa o broju stanica po vidljivom polju, budući da prevelika gustoća stanica može rezultirati značajnom proporcijom preklapajućih kometa, posebno pri visokoj stopi migracije DNA. S druge strane, previsoka koncentracija agaroze može narušiti opseg migracije DNA. Stakalca su šifrirana i inkubirana 10 minuta na ledu tijekom polimerizacije svakog sloja gela.

Nakon očvršćivanja agaroznog sendviča, stakalca su uronjena u hladnu otopinu za lizu staničnih struktura gdje su inkubirana 24 sata na 4˚C. Otopina se sastoji od 10 mM Tris-hidroksilne kiseline (HCl), 2,5 M natrijevog klorida (NaCl), 100 mM Na_2EDTA, 1% natrijevog sarkozinata (pH 10) u kojeg su neposredno prije upotrebe dodani 1% Triton X-100 i 10% dimetil sulfoksid (DSMO).

Prije elektroforeze, stakalca su inkubirana u lužnatoj (pH 13) otopini za elektroforezu koja sadržava 1mM EDTA i 300 mM natrijeva hidroksida (NaOH). Navedena otopina, odnosno denaturacijski pufer uzrokuje razmotavanje dvolančane DNA kako bi se dobile jednolančane DNA, te izrazila mjesta osjetljiva na lužine (ALS engl. *alkali-labile sites*) i SSB. Inkubacijski period je trajao 20 min na 4˚C. Preparati su u kadici za elektroforezu posloženi u vodoravan položaj, a nakon denaturacije provedena je elektroforeza pri naponu od 25 V i struji jakosti 300 mA, tijekom 20 min u istom alkalnom puferu.

Po završetku elektroforeze, lužina u gelu je neutralizirana ispiranjem stakalaca s Tris-HCl puferom (pH 7,5). Provedena su 3 ispiranja puferom po 5 minuta, nakon čega su preparati osušeni na filter papiru. Tijekom neutralizacije, odvojeni DNA lanci (tretmanom lužinom) u glavi kometa se smjesta renaturiraju u njihovu početnu strukturu superzavojnice, dok DNA u repu ostaje jednolančana.

Prije analize, preparati su rehidrirani u Tris-HCl puferu (pH 7,5) i obojani etidijevim bromidom, fluorescentnom bojom koja veže DNA i omogućava vizualizaciju pomoću fluorescentnog mikroskopa. Etidijev bromid se ugrađuje u prostor između parova baza dvostruke zavojnice, i fluorescira kada ga se obasja UV svijetlom. Ključni koraci u izvedbi alkalnog komet testa prikazani su na Slici 8. Sve navedene kemikalije korištene za izvedbu komet testa dobivene su od Sigme, izuzev NaCl i NaOH koji su dobiveni od Kemike.



Slika 8. Ključni koraci u izvedbi alkalnog komet testa.
Preuzeto i preuređeno s: http://www.amsbio.com/comet-assays.aspx

Svako stakalce sa uzorcima, analizirano je koristeći epifluorescencijski mikroskop (Opton, Njemačka) s ekscitacijskim filterom 515 nm – 560 nm. Analizirano je 200 stanica svakog pojedinog tkiva iz svakog vremenskog perioda (0h, 2h, 6h, 24h), odnosno 50 stanica po svakom stakalcu, pomoću računalnog, analitičkog sustava Comet assay IV. Povećanje slike kometa bilo je 160x, a mjerena su 4 parametra kometa: dužina repa (udaljenost migracije fragmenata DNA od tijela jezgre, što je zabilježeno kao udaljenost od opsega glave kometa do zadnje vidljive točke u repu) izražena u mikrometrima; repni intenzitet (postotak DNA u repu), repni moment (umnožak dužine repa kometa i postotka DNA u repu); te ukupna površina kometa u broju piksela. Stanice su nasumično birane, a iz analize su isključeni rubovi i eventualno oštećeni dijelovi gela kao i krhotine koje preklapaju komet, kometi blizu mjehurića zraka i kometi bez vidljive glave.

Za bolju procjenu oštećenja, izračunat je broj stanica s dugačkim repovima (LTN-ova od engl. *long-tailed nucleus*) tako da se izbroje kometi svih tretiranih skupina čija je vrijednost dužine repa veća od vrijednosti prethodno izračunatog 95-tog percentila kontrolnih vrijednosti dužine repa.

2.5. STANIČNI INDEKS POPRAVKA DNA (CRI)

Poznato je da stanice različitih tkiva pokazuju različitu osjetljivost na izlaganje toksičnim agensima poput inhalacijskih anestetika i ionizirajućeg zračenja. Za višekratno ozračivanje nižim dozama potrebna je veća ukupna doza da bi došlo do oštećenja jer stanica posjeduje mehanizme popravka (Karbownik i Reiter, 2000; Huw Reed i Waters, 2005). Za kvantifikaciju efikasnosti popravka lomova DNA u stanici, koristili smo stanični indeks popravka DNA (CRI od engl. *cellular DNA repair indeks*) koji se temelji na parametrima kometa (Nair i Nair, 2010), budući da je brzina opadanja vrijednosti parametra vezana za popravak DNA. CRI za pojedine parametre kometa se definira kao postotak smanjenja oštećenja (početne vrijednosti parametra) tijekom popravka, odnosno postotak popravka, a računa se sljedećom formulom (Nair i Nair, 2013):

CRI = [1-(vrijednost parametra kometa u vremenu t_1/ vrijednost parametra kometa u vremenu t_0)] * 100

2.6. STATISTIKA

Rezultati dobiveni komet testom analizirani su opisnom (deskriptivnom) statistikom te su izdvojene i u tablici prikazane sljedeće vrijednosti: srednja vrijednost (SV) sa standardnom greškom (SG), medijan (Med) te raspon vrijednost (Min – Max). Za statističku analizu, vrijednosti parametara kometa su logaritmirane s funkcijom $\log_{10}$ (v1+1) te obrađene računalnim softverom STATISTICA 9,0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, SAD) za Windows. Korištena je Break down ANOVA analiza sa post hoc Scheffeovom modifikacijom za usporedbu razlika u DNA oštećenju. Neparametrijski x^2 –test, sa statističkom značajnosti ($p<0,05$), primijenjen je za uspoređivanje svih skupina te za uspoređivanje kometa s dugim repovima (LTN-ova).

3. REZULTATI

Cilj ovog istraživanja bilo je proučiti kombinirano djelovanje ionizirajućeg zračenja (2 Gy) i anestetika sevoflurana (2,4 vol%) na stanice krvi, jetre, bubrega i mozga te ustanoviti tkivno specifične razlike između krvi i navedenih organa u različitim vremenskim intervalima (neposredno nakon te 2, 6 i 24 sata nakon izlaganja navedenim agensima). Istraživanje je provedeno na Swiss albino miševima, a za procjenu oštećenja DNA u navedenim stanicama korištena je metoda alkalnog komet testa.

3.1. OŠTEĆENJA DNA U LIMFOCITIMA PERIFERNE KRVI NAKON IZLAGANJA SEVOFLURANU I IONIZIRAJUĆEM ZRAČENJU (2 Gy)

Analizirana su oštećenja DNA u limfocitima periferne krvi neposredno nakon, te 2, 6 i 24 sata nakon izlaganja sevofluranu i ionizirajućem zračenju (2 Gy). Koristeći četiri parametra deskriptivne statistike među koje spadaju: srednja vrijednost sa standardnom pogreškom, medijan, minimum te maksimum; promatrana su četiri parametra kometa: dužina repa (TL), intenzitet repa (TI), repni moment (TM) i ukupna površina (TA) (Tablica 1). U svim ispitivanim skupinama uočene su statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u parametrima TL i TA u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablice 2 i 3). Promatrajući parametar TM statistički značajno veće oštećenje je u skupinama kojima su uzorci uzeti 2 i 6 sati nakon tretmana sevofluranom i zračenjem u odnosnu na kontrolnu skupinu (Tablica 3). Vrijednosti svih parametara (TL, TI, TM, TA) bile su najviše u skupini u kojoj su uzorci uzeti 2 sata nakon izloženosti anestetiku sevofluranu i ionizirajućem zračenju. U svim tretiranim skupinama vrijednosti ispitivanih parametara nakon 24 sata i dalje su značajno više u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 1). Statističke značajnosti parametara između tretiranih skupina prikazane su u Tablicama 2 i 3.

Tablica 1. Rezultati komet testa na uzorcima leukocita periferne krvi u Swiss albino miševa nakon izlaganja sevofluranu i ionizirajućem zračenju u dozi od 2 Gy.

GRUPA	DUŽINA REPA (µm)			INTEZITET REPA (%)		
	SV ± SG	Med	Min-Max	SV ± SG	Med	Min-Max
kontrola	12,56 ± 0,11	12,18	8,97 - 16,67	4,10 ± 0,40	0,26	0,03 - 36,23
sevo + 2Gy 0h	18,42 ± 0,29	18,33	10,00 - 31,67	5,12 ± 0,42	2,31	0,00 - 34,18
sevo + 2Gy 2h	19,31 ± 0,47	17,92	8,75 - 37,50	6,86 ± 0,54	3,67	0,00 - 35,48
sevo + 2Gy 6h	14,58 ± 0,24	13,75	9,17 - 24,58	3,14 ± 0,29	1,14	0,00 - 6,28
sevo + 2Gy 24h	17,71 ± 0,28	17,08	10,00 - 26,67	6,33 ± 0,47	3,95	0,00 - 37,62
GRUPA	REPNI MOMENT			UKUPNA POVRŠINA		
	SV ± SG	Med	Min-Max	SV ± SG	Med	Min-Max
kontrola	0,38 ± 0,03	0,23	0,00 - 3,48	393,59 ± 7,22	372,68	214,49 - 857,95
sevo + 2Gy 0h	0,37 ± 0,03	0,2	0,00 - 2,91	553,72 ± 7,30	559,46	291,15 - 856,25
sevo + 2Gy 2h	0,65 ± 0,06	0,31	0,00 - 3,84	573,09 ± 17,71	499,83	197,74 - 1427,95
sevo + 2Gy 6h	0,22 ± 0,02	0,07	0,00 - 1,22	433,95 ± 7,05	416,75	259,38 - 755,56
sevo + 2Gy 24h	0,48 ± 0,04	0,31	0,00 - 3,32	490,11 ± 5,01	481,08	312,15 - 750,52

sevo – sevofluran, SV – srednja vrijednost, SG – standardna greška, med – medijan, min – minimum, max – maksimum

Tablica 2. Statističke značajnosti razlika između tretmana za vrijednosti parametara dužine repa i inteziteta repa kometa izmjerene na leukocitima periferne krvi [post hoc Scheffeov test, ($p<0,05$)]; statističke značajnosti za dužinu repa kometa prikazane su ružičastom bojom, a za intenzitet repa plavom bojom.

Intenzitet repa kometa	KRV	Dužina repa kometa				
	grupa	kontrola	sevo + 2Gy 0h	sevo + 2Gy 2h	sevo + 2Gy 6h	sevo + 2Gy 24h
	kontrola		0,000000	0,000000	0,000011	0,000000
	sevo + 2Gy 0h	n.z.		n.z.	0,000000	n.z.
	sevo + 2Gy 2h	n.z.	n.z.		0,000000	n.z.
	sevo + 2Gy 6h	n.z.	0,03595	0,00000		0,000000
	sevo + 2Gy 24h	n.z.	n.z.	n.z.	0,00000	

n.z. – nema značajnosti, sevo – sevofluran

Tablica 3. Statističke značajnosti razlika između tretmana za vrijednosti parametara repnog momenta i ukupne površine kometa izmjerene na leukocitima periferne krvi [post hoc Scheffeov test, ($p<0,05$)]; statističke značajnosti za repni moment kometa prikazane su ružičastom bojom, a za ukupnu površinu kometa plavom bojom.

Ukupna površina kometa	KRV	Repni moment kometa				
	grupa	kontrola	sevo + 2Gy 0h	sevo + 2Gy 2h	sevo + 2Gy 6h	sevo + 2Gy 24h
	kontrola		n.z.	0,003736	0,020849	n.z.
	sevo + 2Gy 0h	0,000000		0,001259	0,047211	n.z.
	sevo + 2Gy 2h	0,000000	n.z.		0,000000	n.z.
	sevo + 2Gy 6h	0,006877	0,000000	0,000000		0,000011
	sevo + 2Gy 24h	0,000000	0,001178	0,042894	0,000025	

n.z. – nema značajnosti, sevo – sevofluran

3.2. OŠTEĆENJA DNA U STANICAMA BUBREGA NAKON IZLAGANJA SEVOFLURANU (2,4 vol %) I IONIZIRAJUĆEM ZRAČENJU (2 Gy)

Neposredno nakon, te 2, 6 i 24 sata nakon izlaganja sevofluranu i ionizirajućem zračenju (2 Gy) analizirana su štećenja DNA u stanicama bubrega. Dužina repa kometa (TL), intenzitet repa (TI), repni moment (TM) te ukupna površina kometa (TA) analizirani su pomoću deskriptivne statistike, a rezultati su prikazani u Tablici 4. Dobivene vrijednosti parametara TL, TI i TM svih tretiranih skupina pokazuju statistički značajno veća oštećenja DNA u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablice 5 i 6), a najviše vrijednosti tih parametara bile su u stanicama uzorkovanim 2 sata nakon izlaganja anesteziji i zračenju. Vrijednosti spomenutih parametara kometa se nisu snizile na kontrolne vrijednosti ni 24 sata nakon izlaganja genotoksičnim agensima (Tablica 4). Parametar TA pokazuje statistički značajno veća oštećenja kod tretiranih skupina kojima su uzorci uzeti 2 i 24 sata u odnosu na kontrolu, a najviša vrijednost parametra TA bila je 24 sata nakon izlaganja spomenutim agensima (Tablice 4 i 6). Statističke značajnosti u razlici oštećenja među tretiranim skupinama prikazane su u Tablicama 5 i 6.

Tablica 4. Rezultati komet testa na stanicama bubrega u Swiss albino miševa nakon izlaganja sevofluranu i ionizirajućem zračenju u dozi od 2 Gy.

GRUPA	DUŽINA REPA (µm)			INTEZITET REPA (%)		
	SV ± SG	Med	Min-Max	SV ± SG	Med	Min-Max
kontrola	15,43 ± 0,28	15,00	6,25 - 24,17	5,37 ± 0,61	0,53	0,00 - 39,81
sevo + 2Gy 0h	19,81 ± 0,58	18,75	7,08 - 43,75	8,40 ± 0,64	5,44	0,00 - 34,92
sevo + 2Gy 2h	20,59 ± 0,63	19,58	5,83 - 44,17	11,86 ± 0,82	8,29	0,00 - 46,87
sevo + 2Gy 6h	20,21 ± 0,59	18,75	7,08 - 42,08	9,67 ± 0,66	7,58	0,00 - 38,93
sevo + 2Gy 24h	19,82 ± 0,48	19,17	7,92 - 40,00	8,31 ± 0,68	4,53	0,00 - 44,78
GRUPA	REPNI MOMENT			UKUPNA POVRŠINA		
	SV ± SG	Med	Min-Max	SV ± SG	Med	Min-Max
kontrola	0,39 ± 0,04	0,02	0,00 - 2,90	520,30 ± 11,17	540,54	1,00 - 994,62
sevo + 2Gy 0h	0,73 ± 0,06	0,45	0,00 - 4,18	520,17 ± 16,18	475,61	183,85 - 1539,58
sevo + 2Gy 2h	1,11 ± 0,09	0,67	0,00 - 6,53	568,15 ± 20,26	527,08	128,47 - 1801,22
sevo + 2Gy 6h	1,05 ± 0,09	0,62	0,00 - 5,89	686,26 ± 29,19	556,42	192,01 - 2601,22
sevo + 2Gy 24h	0,85 ± 0,08	0,40	0,00 - 5,81	716,80 ± 25,77	583,16	211,01 - 2432,81

sevo – sevofluran, SV – srednja vrijednost, SG – standardna greška, med – medijan, min – minimum, max – maksimum

Tablica 5. Statističke značajnosti razlika između tretmana za vrijednosti parametara dužine repa i inteziteta repa kometa izmjerene na stanicama bubrega [post hoc Scheffeov test, ($p<0,05$)]; statističke značajnosti za dužinu repa kometa prikazane su ružičastom bojom, a za intenzitet repa plavom bojom.

Intenzitet repa kometa	BUBREG	Dužina repa kometa				
	grupa	kontrola	sevo + 2Gy 0h	sevo + 2Gy 2h	sevo + 2Gy 6h	sevo + 2Gy 24h
	kontrola		0,00001	0,00000	0,00000	0,00000
	sevo + 2Gy 0h	0,000077		n.z.	n.z.	n.z.
	sevo + 2Gy 2h	0,000000	n.z.		n.z.	n.z.
	sevo + 2Gy 6h	0,000000	n.z.	n.z.		n.z.
	sevo + 2Gy 24h	0,000008	n.z.	n.z.	n.z.	

n.z. – nema značajnosti, sevo – sevofluran

Tablica 6. Statističke značajnosti razlika između tretmana za vrijednosti parametara repnog momenta i ukupne površine kometa izmjerene na stanicama bubrega [post hoc Scheffeov test, ($p<0,05$)]; statističke značajnosti za repni moment prikazane su ružičastom bojom, a za ukupnu površinu kometa plavom bojom.

Ukupna površina kometa	BUBREG	Repni moment kometa				
	grupa	kontrola	sevo + 2Gy 0h	sevo + 2Gy 2h	sevo + 2Gy 6h	sevo + 2Gy 24h
	kontrola		0,001212	0,000000	0,000000	0,000089
	sevo + 2Gy 0h	n.z.		0,034234	n.z.	n.z.
	sevo + 2Gy 2h	n.z.	n.z.		n.z.	n.z.
	sevo + 2Gy 6h	0,000085	0,029965	n.z.		n.z.
	sevo + 2Gy 24h	0,000000	0,000116	0,003599	n.z.	

n.z. – nema značajnosti, sevo – sevofluran

3.3. OŠTEĆENJA DNA U STANICAMA JETRE NAKON IZLAGANJA SEVOFLURANU I IONIZIRAJUĆEM ZRAČENJU (2 Gy)

Promatrana su štećenja DNA u stanicama jetre nakon kombiniranog izlaganja sevofluranu i ionizirajućem zračenju u dozi od 2 Gy. Četiri parametra kometa (dužina repa, TL; intezitet repa, TI; repni moment, TM; ukupna površina kometa, TA) analizirana su pomoću deskriptivne statistike. Dobivene su srednje vrijednosti sa standardnom pogreškom, minimalne i maksimalne vrijednosti te medijan (Tablica 7). Parametri TL, TI i TM svih skupina tretiranih anestetikom i zračenjem se statistički značajno razlikuju ($p<0,05$) u odnosu na iste parametre kontrolne skupine. Parametar TA pokazuje statistički značajno veća oštećenja DNA u periodima neposredno nakon (0 h) te 2 i 24 sata nakon tretmana sevofluranom i zračenjem (Tablice 8 i 9). Vrijednosti svih parametara kometa bile su najviše u stanicama uzorkovanim 24 sata nakon tretmana sevofluranom i zračenjem (Tablica 7). Statistički značajne razlike oštećenja između tretiranih skupina prikazane su u Tablicama 8 i 9.

Tablica 7. Rezultati komet testa na stanicama jetre u Swiss albino miševa nakon izlaganja sevofluranu i ionizirajućem zračenju u dozi od 2 Gy.

GRUPA	DUŽINA REPA (µm)			INTEZITET REPA (%)		
	SV ± SG	Med	Min-Max	SV ± SG	Med	Min-Max
kontrola	14,54 ± 0,24	14,17	7,08 - 22,08	2,49 ± 0,33	0,22	0,00 - 28,53
sevo + 2Gy 0h	17,53 ± 0,59	15,21	5,83 - 47,08	7,17 ± 0,58	3,54	0,00 - 38,39
sevo + 2Gy 2h	18,04 ± 0,48	16,67	6,67 - 40,00	9,55 ± 0,79	5,03	0,01 - 30,90
sevo + 2Gy 6h	18,15 ± 0,39	17,08	10,00 - 43,33	5,11 ± 0,45	3,00	0,00 - 34,61
sevo + 2Gy 24h	23,44 ± 0,76	20,42	8,33 - 48,75	11,86 ± 0,87	7,00	0,00 - 39,35
GRUPA	REPNI MOMENT			UKUPNA POVRŠINA		
	SV ± SG	Med	Min-Max	SV ± SG	Med	Min-Max
kontrola	0,17 ± 0,02	0,01	0,00 - 2,09	552,72 ± 12,82	559,38	184,38 - 1030,73
sevo + 2Gy 0h	0,69 ± 0,08	0,23	0,00 - 6,89	463,06 ± 18,55	398,52	109,39 - 1725,17
sevo + 2Gy 2h	0,83 ± 0,08	0,36	0,00 - 6,13	482,24 ± 16,15	410,94	175,69 - 1612,50
sevo + 2Gy 6h	0,44 ± 0,04	0,25	0,00 - 3,85	575,13 ± 12,54	565,28	276,91 - 1569,27
sevo + 2Gy 24h	1,69 ± 0,15	0,62	0,00 - 7,74	986,34 ± 49,73	639,93	266,32 - 3373,44

sevo – sevofluran, SV – srednja vrijednost, SG – standardna greška, med – medijan, min – minimum, max – maksimum

Tablica 8. Statističke značajnosti razlika između tretmana za vrijednosti parametara dužine repa i inteziteta repa kometa izmjerene na stanicama jetre [post hoc Scheffeov test, ($p<0,05$)]; statističke značajnosti za dužinu repa kometa prikazane su ružičastom bojom, a za intenzitet repa plavom bojom.

Intenzitet repa kometa	JETRA	Dužina repa kometa				
	grupa	kontrola	sevo + 2Gy 0h	sevo + 2Gy 2h	sevo + 2Gy 6h	sevo + 2Gy 24h
	kontrola		0,01965	0,00006	0,000000	0,000000
	sevo + 2Gy 0h	0,000000		n.z.	n.z.	0,000000
	sevo + 2Gy 2h	0,000000	n.z.		n.z.	0,000000
	sevo + 2Gy 6h	0,000001	n.z.	0,006729		0,000000
	sevo + 2Gy 24h	0,000000	0,02947	n.z.	0,000005	

n.z. – nema značajnosti, sevo – sevofluran

Tablica 9. Statističke značajnosti razlika između tretmana za vrijednosti parametara repnog momenta i ukupne površine kometa izmjerene na stanicama jetre [post hoc Scheffeov test, ($p<0,05$)]; statističke značajnosti za repni moment prikazane su ružičastom bojom, a za ukupnu površinu kometa plavom bojom.

Ukupna površina kometa	JETRA	Repni moment kometa				
	grupa	kontrola	sevo + 2Gy 0h	sevo + 2Gy 2h	sevo + 2Gy 6h	sevo + 2Gy 24h
	kontrola		0,000002	0,000000	0,008392	0,000000
	sevo + 2Gy 0h	0,000016		n.z.	n.z.	0,000000
	sevo + 2Gy 2h	0,010422	n.z.		0,014394	0,000007
	sevo + 2Gy 6h	n.z.	0,000000	0,000061		0,000000
	sevo + 2Gy 24h	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	

n.z. – nema značajnosti, sevo – sevofluran

3.4. OŠTEĆENJA DNA U STANICAMA MOZGA NAKON IZLAGANJA SEVOFLURANU (2,4 vol%) I IONIZIRAJUĆEM ZRAČENJU (2 Gy)

Na stanicama mozga analizirana su oštećenja DNA nakon kombiniranog izlaganja sevofluranu (2,4 vol%) i ionizirajućem zračenju. Parametri dužina i intenzitet repa, repni moment te ukupna površina kometa opisani su numerički pomoću četiri parametra deskriptivne statistike za sve ispitivane skupine. Vrijednosti svih parametara bile su najviše u stanicama uzorkovanim 24 sata nakon tretmana navedenim genotoksičnim agensima (Tablica 10). Sve skupine tretirane ionizirajućim zračenjem i sevofluranom pokazuju statistički značajno veća oštećenja DNA u odnosu na kontrolnu skupinu u svim navedenim parametrima kometa (Tablica 11 i 12). Statistički značajne razlike u promatranim parametrima između tretiranih skupina prikazane su u Tablicama 11 i 12.

Tablica 10. Rezultati komet testa na stanicama mozga u Swiss albino miševa nakon izlaganja sevofluranu i ionizirajućem zračenju u dozi od 2 Gy.

GRUPA	DUŽINA REPA (µm)			INTEZITET REPA (%)		
	SV ± SG	Med	Min-Max	SV ± SG	Med	Min-Max
kontrola	22,16 ± 0,63	22,08	7,92 - 36,67	8,96 ± 0,71	5,42	0,00 - 38,61
sevo + 2Gy 0h	26,82 ± 0,65	26,25	8,33 - 47,92	14,75 ± 0,89	12,23	0,01 - 39,99
sevo + 2Gy 2h	28,33 ±0,62	28,75	9,17 - 49,17	16,28 ± 0,79	15,73	0,03 - 49,13
sevo + 2Gy 6h	26,88 ± 0,58	27,29	10,00 - 46,25	14,24 ±0,79	11,54	0,05 - 40,00
sevo + 2Gy 24h	31,44 ±0,56	31,67	9,58 - 47,92	21,76 ± 0,85	22,94	0,11 - 39,97
GRUPA	REPNI MOMENT			UKUPNA POVRŠINA		
	SV ± SG	Med	Min-Max	SV ± SG	Med	Min-Max
kontrola	0,93 ± 0,08	0,59	0,00 - 4,62	646,07 ± 13,00	622,40	263,72-1434,72
sevo + 2Gy 0h	1,82 ± 0,13	1,23	0,00 - 7,17	813,91 ± 27,10	740,19	213,72 - 1780,73
sevo + 2Gy 2h	2,00 ± 0,11	1,82	0,00 - 7,14	903,45 ± 25,33	859,46	254,86 - 2032,99
sevo + 2Gy 6h	1,87 ± 0,12	1,4	0,00 - 7,00	967,45 ± 28,73	934,98	270,66 - 2614,41
sevo + 2Gy 24h	3,21 ± 0,14	3,18	0,00 - 7,23	1244,34 ± 37,09	1174,13	280,56 - 2460,59

sevo – sevofluran, SV – srednja vrijednost, SG – standardna greška, med – medijan, min – minimum, max – maksimum

Tablica 11. Statističke značajnosti razlika između tretmana za vrijednosti parametara dužine repa i inteziteta repa kometa izmjerene na stanicama mozga [post hoc Scheffeov test, ($p<0,05$)]; statističke značajnosti za dužinu repa kometa prikazane su ružičastom bojom, a za intenzitet repa plavom bojom.

Intenzitet repa kometa	MOZAK	Dužina repa kometa				
	grupa	kontrola	sevo + 2Gy 0h	sevo + 2Gy 2h	sevo + 2Gy 6h	sevo + 2Gy 24h
	kontrola		0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
	sevo + 2Gy 0h	0,000003		n.z.	n.z.	0,000021
	sevo + 2Gy 2h	0,000000	n.z.		n.z.	0,017635
	sevo + 2Gy 6h	0,000000	n.z.	n.z.		0,000151
	sevo + 2Gy 24h	0,000000	0,000000	0,021224	0,000016	

n.z. – nema značajnosti, sevo – sevofluran

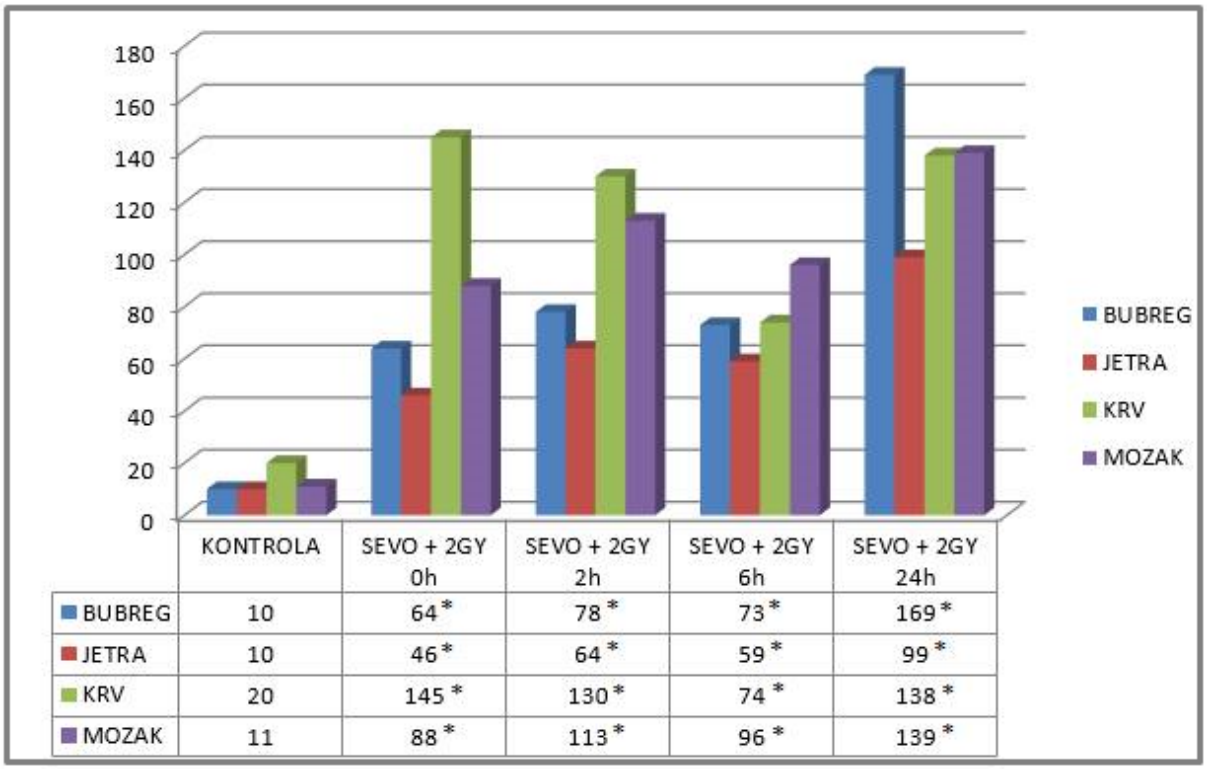
Tablica 12. Statističke značajnosti razlika između tretmana za vrijednosti parametara repnog momenta i ukupne površine kometa izmjerene na leukocitima periferne krvi [post hoc Scheffeov test, ($p<0,05$)]; statističke značajnosti za repni moment kometa prikazane su ružičastom bojom, a za ukupnu površinu kometa plavom bojom.

Ukupna površina kometa	MOZAK	Repni moment kometa				
	grupa	kontrola	sevo + 2Gy 0h	sevo + 2Gy 2h	sevo + 2Gy 6h	sevo + 2Gy 24h
	kontrola		0,000002	0,000000	0,000000	0,000000
	sevo + 2Gy 0h	0,000014		n.z.	n.z.	0,000000
	sevo + 2Gy 2h	0,000000	n.z.		n.z.	0,000001
	sevo + 2Gy 6h	0,000000	0,041457	n.z.		0,000000
	sevo + 2Gy 24h	0,000000	0,000000	0,000000	0,000001	

n.z. – nema značajnosti, sevo – sevofluran

3.5. ANALIZA BROJA STANICA S DUGIM REPOVIMA U KRVI I TKIVU BUBREGA, JETRE I MOZGA

Na Slici 9 prikazani su usporedni rezultati broja LTN-ova za stanice krvi, bubrega, jetre i mozga tretiranih skupina, u periodima neposredno nakon (0h) te 2, 6 i 24 sata nakon izlaganja sevofluranu i ionizirajućem zračenju (2 Gy), te broj LTN-ova za stanice kontrolne skupine. Broj stanica s dugim repovima značajno je veći u svim tretiranim skupinama u usporedbi s kontrolnom skupinom što je sukladno rezultatima dužine repa kometa. Najviše stanica s dugim repovima kod svakog pojedinog organa bilo je 24 sata nakon izlaganja genotoksičnim agensima dok je u krvi najviše LTN-ova bilo neposredno nakon izlaganja (Slika 9).



	KONTROLA	SEVO + 2GY 0h	SEVO + 2GY 2h	SEVO + 2GY 6h	SEVO + 2GY 24h
BUBREG	10	64 *	78 *	73 *	169 *
JETRA	10	46 *	64 *	59 *	99 *
KRV	20	145 *	130 *	74 *	138 *
MOZAK	11	88 *	113 *	96 *	139 *

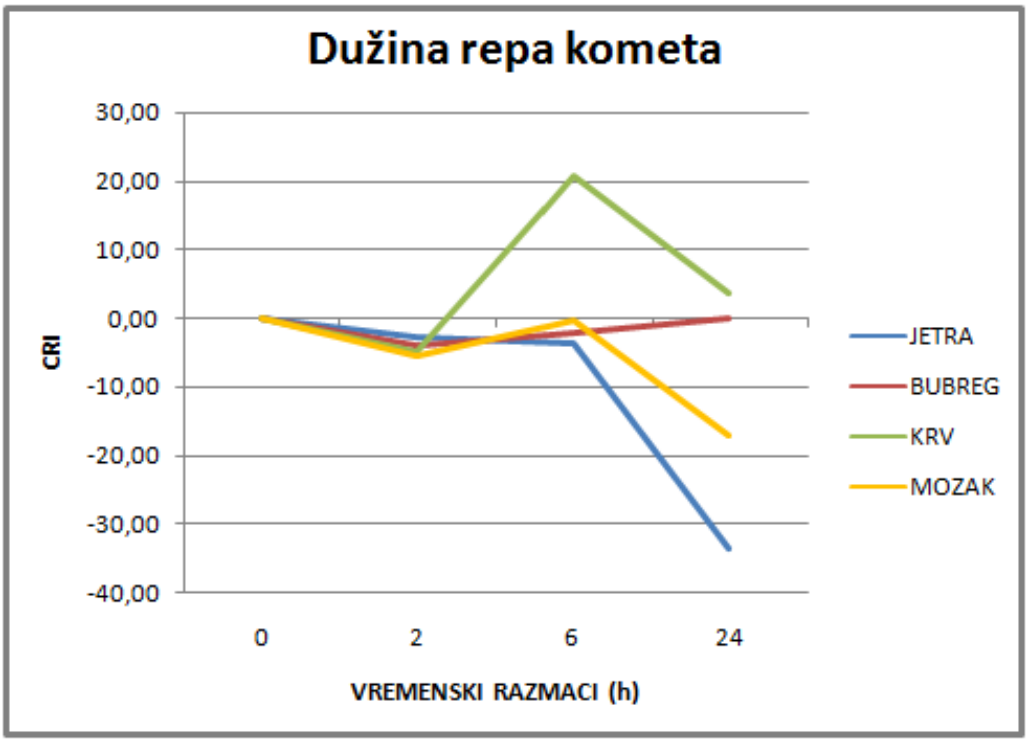
Slika 9. Broj stanica s dugim repovima iz krvi i tkiva različitih organa (bubrega, jetre, mozga) svih skupina.

* Statistički značajno različit ($p<0,05$, post hoc Scheffeov test) u odnosu na kontrolnu skupinu.

3.6. DINAMIKA POPRAVKA PRIMARNIH OŠTEĆENJA U STANICAMA KRVI, BUBREGA, JETRE I MOZGA

Stanični indeks popravka (CRI) korišten je u svrhu utvrđivanja popravka DNA u stanicama krvi, bubrega, jetre i mozga neposredno nakon (0 h), te 2, 6 i 24 sata nakon tretmana ionizirajućim zračenjem (2 Gy) i anestetikom sevofluranom. Negativne CRI vrijednosti označavaju postotak povećanja oštećenja u odnosu na početne vrijednosti, koja su nastala nakon izlaganja genostoksičnim agensima, odnosno pokazuju koliki se postotak oštećenja od neposrednog izlaganja nije popravio. Podaci o CRI određeni iz parametara kometa (dužina repa – TL i intezitet repa – TI) stanica krvi, bubrega, jetre i mozga miša, nakon kombiniranog izlaganja ionizirajućem zračenju (2 Gy) i anestetiku sevofluranu, prikazani su na Slikama 10 i 11.

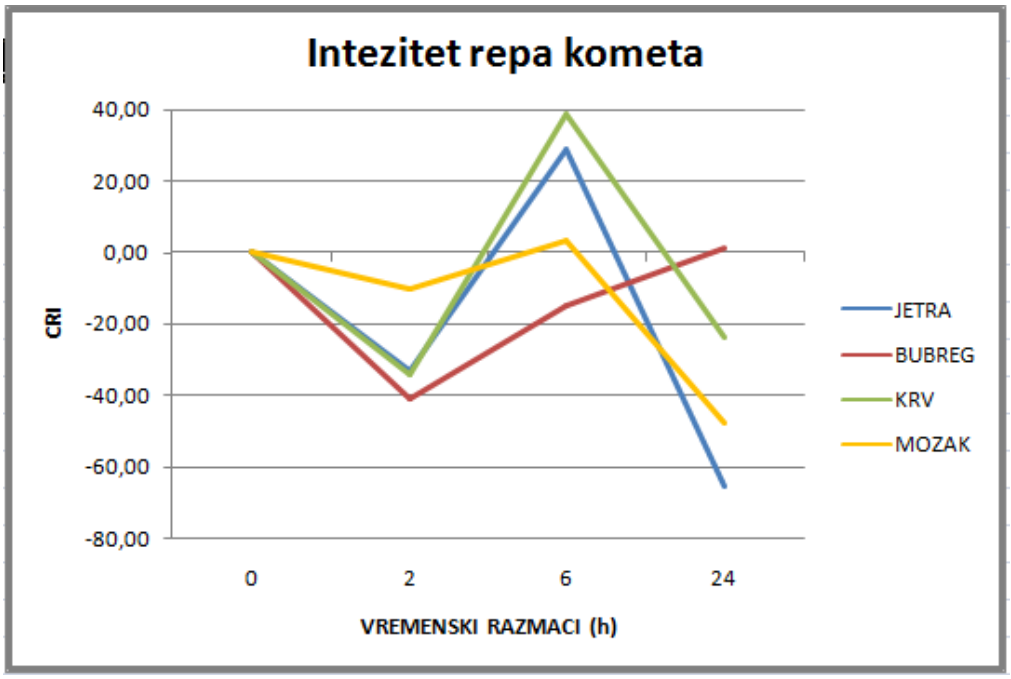
Parametar dužina repa kometa (TL) pokazuje najviši postotak popravka (~20%) u leukocitima periferne krvi 6 sati nakon izlaganja sevofluranu i zračenju (2 Gy), dok u stanicama bubrega, jetre i mozga u istom periodu pokazuje negativne vrijednosti, odnosno nizak postotak oštećenja. U periodu 24 sata nakon izlaganja genotoksičnim agensima, parametar TL pokazuje da je najviše nepopravljenih oštećenja u stanicaman jetre (33,71%), a potom mozga (17,23%), dok su oštećenja u stanicama bubrega jednaka onima neposredno nakon izlaganja. Stanice krvi, 24 sata nakon izlaganja agensima, pokazuju nizak postotak popravka (3,85%) (Slika 10).



Slika 10. Stanični indeks popravka (CRI) za parametar dužina repa kometa stanica krvi, bubrega, jetre određen u periodima neposredno nakon te 2, 6 i 24 sata nakon izlaganja ionizirajućem zračenju (2 Gy) i sevofluranu (2,4 vol%).

Parametar intezitet repa kometa (TI), 2 sata nakon izlaganja sevofluranu i zračenju, pokazuje najviši postotak nepopravljenog oštećenja (41,19%) u stanicama bubrega, a najniži (10,37%) u stanicama mozga. Šest sati nakon izlaganja navedenim agensima, parametar TI ukazuje na aktivnost procesa popravka u navedenim stanicama, a najveća je u leukocitima periferne krvi (38,67%), a zatim u stanicama jetre (28,73%). Najveći postotak nepopravljenog oštećenja 24 sata nakon izlaganja agensima, prema parametru TI, bio je u stanicama jetre

(65,41%) i mozga (47,53%), dok je u stanicama bubrega u istom periodu oštećenje približno onome neposredno nakon izlaganja (Slika 11).



Slika 11. Stanični indeks popravka (CRI) za intenzitet repa kometa stanica krvi, bubrega, jetre i mozga određen neposredno nakon te 2, 6 i 24 sata nakon izlaganja ionizirajućem zračenju (2 Gy) i sevofluranu (2,4 vol%).

4. RASPRAVA

Izloženost fizikalnim i kemijskim agensima izaziva oštećenja staničnih struktura i makromolekula koja mogu dovesti do različitih patoloških promjena, narušene funkcije organizma te razvoja različitih bolesti, uključujući i onih zloćudnih (npr. karcinoma). Područje od velikog interesa za znanstvena istraživanja predstavlja ionizirajuće zračenje, čija svakodnevna upotreba u medicinske svrhe kao i slučajna izloženost, nameće pitanje o njegovoj genotoksičnosti (Desouky, 2015). Jedan od često korištenih, novijih inhalacijskih anestetika čija svojstva upotpunjavaju kriterije idealnog anestetika je sevofluran (Migliari i sur., 2009; Patel i Goa, 1996). Anestetički lijekovi koji izazivaju manje oksidativnog stresa bolji su izbor, posebno u postoperativnih ili kliničkih pacijenata koji su već pod povećanim oksidativnim stresom (Tsuchiya i sur., 2001; Eger, 2005). Iz tog razloga, istraživanje kombiniranog učinka ionizirajućeg zračenja i pojedinih anestetika je važno da bi se razvile bolje strategije za zaštitu izložene populacije od genotoksičnosti istih.

U ovom istraživanju proučavano je kombinirano djelovanje ionizirajućeg zračenja i inhalacijskog anestetika sevoflurana na stanice i makromolekule. Posebna pažnja posvećena je istraživanju oštećenja DNA kao i procesima njenog popravka.

Gledajući sva četiri parametra kometa (dužina repa, TL; intezitet repa, TI; repni moment, TM; ukupna površina kometa, TA), najveće oštećenje leukocita periferne krvi u našem istraživanju bilo je 2 sata nakon izlaganja zračenju i sevofluranu isto kao i kod stanica bubrega. Najmanja oštećenja u svim tretiranim skupinama bila su 6 sati nakon izlaganja agensima. Ovakvi rezultati ukazuju nam na aktivnost procesa popravka.

Rezultati našeg istraživanja za stanice jetre pokazali su statistički značajno veća oštećenja kod svih skupina u usporedbi s kontrolom. Oštećenje je bilo najveće 24 sata nakon izlaganja ionizirajućem zračenju i sevofluranu, ali stupanj oštećenja ne pokazuje linearan odnos s vremenom.

Jetra je primarno mjesto metaboliziranja toksičnih tvari i igra ključnu ulogu u njihovoj detoksifikaciji. Funkcija jetre nakon inhalacijske anestezije ovisi o protoku krvi kroz jetru tijekom anestezije, povećanoj koncentraciji unutarstaničnog kalcija i biotransformaciji anestetika. Također ovisi i o drugim agensima koji se koriste perioperativno (Baker i Van Dyke, 1994). Zizek i sur. (2010) izvještavaju o smrtonosnom subakutnom propadanju jetre s

masivnim nekrozama hepatocita pri opetovanoj anesteziji sevofluranom. Soubhia i sur. (2011) su procjenjivali aktivnost transaminaze, nakon izlaganja sevofluranu, bilježeći neznatno povećane vrijednosti za aktivnost transaminaze i nisu uočili nikakve morfološke promjene na parenhimu jetre pod svjetlosnim mikroskopom.

Promatrajući ista četiri parametra kometa (TL, TI, TM, TA) kod stanica bubrega, također se pokazalo da su oštećenja bila statistički značajno veća u svim skupinama u odnosu na kontrolu. No u ovom slučaju, vrijednosti parametara su bile najveće 2 sata nakon izlaganja genotoksičnim agensima nakon čega počinju opadati, ali ni 24 sata nakon izlaganja još uvijek ne dosežu vrijednosti kontrole. Ovi rezultati ukazuju na jači toksični učinak kombiniranog djelovanja ionizirajućeg zračenja i sevoflurana na stanice jetre i bubrega u usporedbi s rezultatima istraživanja koja su proučavala njihov pojedinačni učinak.

Funkcija bubrega nakon inhalacijske anestezije ovisi o sustavnoj hemodinamici, protoku i distribuciji krvi kroz bubreg i tubularnoj osjetjivosti na fluoride (Fish, 1994). Elena i sur. (2003) su proučavali fiziologiju i histologiju jetre, bubrega i slezene nakon opetovane anestezije sevofluranom. Rezultati su pokazali da tri dana nakon posljednjeg izlaganja sevofluranu, makroskopska i mikroskopska ispitivanja jetre i bubrega nisu bila različita među kontrolnom i anesteziranom skupinom, dosljedno niskoj stopi biotransformacije sevoflurana (Kharasch i sur., 1995a). U skladu s tim, nije bilo razlike u funkciji jetre niti bubrega nakon anestezije. Što se tiče ionizirajućeg zračenja, neka istraživanja pokazala su da čak i niske doze gama zračenja (0,03 Gy) imaju oksidativni učinak na jetru i bubrege (Hawas, 2013). Izlaganje 0,03 Gy vodi povećanju oksidativne razine u jetri i bubrezima predstavljenu kao povećanje MDA (malondialdehida) što se događa i pri visokim dozama od 5 i 6,5 Gy (Hawas i Abdel Hamid, 2010; Shaban i Hawas, 2008).

Mnoge studije su pokazale povećanje broja apoptotskih stanica u mozgu glodavaca koji je u razvoju, nakon izlaganja anesteziji, i posljedične dugoročne promjene ponašanja (Nikizad i sur., 2007; Yon i sur., 2005; Jevtovic-Todorovic i sur., 2003). Također, isto je utvrđeno i na mozgu animalnih primata (Zou i sur., 2011; Brambrink i sur., 2010) što su direktni dokazi za anestezijom uzrokovanu neurotoksičnost u novorođenčadi i djece. Makaryus i sur. (2015) su dokazali da je sazrijevanje mozga otežano zbog anestezije sevofluranom u novorođenim glodavcima.

Naše istraživanje na stanicama mozga pokazalo je statistički značajno veće oštećenje u svim testiranim skupinama u odnosu na kontrolu u sva četiri promatrana parametra (TL, TI, TM, TA) kometa. Kao i na stanicama jetre, oštećenje je bilo najveće 24 sata nakon izlaganja genotoksičnim agensima, ali nema linearnog porasta oštećenja kroz vrijeme. Stanice uzorkovane 6 sati nakon izlaganja agensima pokazuju blagi pad oštećenja u odnosu na stanice uzorkovane 2 sata nakon izlaganja što nam ukazuje na djelovanje mehanizama popravka. Sukladno tome, mjerenja stanica s dugim repovima, za sva tkiva su pokazala da je 6 sati nakon izlaganja bilo manje LTN-ova nego neposredno nakon i 2 sata nakon izlaganja.

Rezultati istraživanja na ljudima također pokazuju genotoksični potencijal zračenja i anestetika. Tako je dokazan statistički značajno veći broj kromosomskih aberacija i mikronukleusa u stanicama periferne krvi osoblja u operacijskim salama (Rozgaj i sur., 1999). Nasuprot, Syfter i sur. (2004) proveli su istraživanje na limfocitima periferne krvi osoblja u operacijskim salama koji rade sa sevofluranom i zaključili da sevofluran ne dovodi do oštećenja DNA limfocita periferne krvi osoblja u operacijskim salama. Alleva i sur. (2003) su proučavali DNA oštećenja, enzimski popravak DNA i apoptozu na limfocitima bolesnika nakon anestezije sevofluranom. Ustanovili su da je oštećenje DNA najjače prvi poslijeoperacijski dan, popravak DNA događa se nakon 24 sata, a kod stanica kod kojih ne uslijedi popravak pokreće se proces apoptoze. Braz i sur., (2011) su pomoću komet testa istražili genotoksični učinak izoflurana i sevoflurana te intravenozno danog propofola na zdravim pacijentima koji prolaze kroz minimalno invazivnu operaciju. Njihovi rezultati su pokazali da opća anestezija navedenim anesteticima ne izaziva lomove DNA niti alkalno-labilna mjesta u ljudskim perifernim limfocitima *in vivo*, odnosno da je genotoksični rizik tih anestetika nizak ili ga uopće nema.

Ovim smo istraživanjem dokazali genotoksični učinak ionizirajućeg zračenja i inhalacijskog anestetika sevoflurana. Rezultati su pokazali različite razine oštećenja i popravka kod različitih vrsta tkiva i krvi, pri čemu je najugroženiji organ jetra. S obzirom da ni nakon 24 sata od izlaganja njihovom štetnom djelovanju ne dolazi do popravka DNA koji bi se spustio na kontrolne vrijednosti, možemo zaključiti da ionizirajuće zračenje i anestetik sevofluran imaju sinergistički, štetni učinak na sve tretirane stanice miševa. Zbog česte primjene oba agensa u medicinske svrhe, vidljiva je potreba za daljnjim istraživanjima mehanizma, područja i razmjera njihovog djelovanja.

5. ZAKLJUČAK

1. Kombinirano izlaganje ionizirajućem zračenju u dozi od 2 Gy i anestetiku sevofluranu (2,4 vol %) ima genotoksični učinak.

2. Sve skupine tretirane ionizirajućim zračenjem (2 Gy) i anestetikom sevofluranom (2,4 vol %) pokazale su na stanicama jetre, bubrega i mozga statistički značajno veća oštećenja u odnosu na kontrolnu skupinu, izmjerena pomoću tri parametra komet testa (dužina repa – TL; intenzitet repa – TI; repni moment – TM).

3. Na leukocitima periferne krvi najveća oštećenja, izmjerena parametrima komet testa, bila su 2 sata nakon kombiniranog izlaganja ionizirajućem zračenju (2 Gy) i anestetiku sevofluranu (2,4 vol %).

4. Najveći genotoksični učinak na stanicama jetre izmjeren parametrima komet testa, bio je 24 sata nakon izlaganja genotoksičnim agensima.

5. U stanicama bubrega, najveći genotoksični učinak bio je 2 sata nakon izlaganja ionizirajućem zračenju (2 Gy) i sevofluranu (2,4 vol %).

6. Najveće oštećenje na stanicama mozga, nastupilo je 24 sata nakon izlaganja genotoksičnim agensima za sva četiri parametra komet testa.

7. Stanice krvi i tkiva različitih organa pokazuju različitu osjetljivost na izlaganje ionizirajućem zračenju i sevofluranu. Prema parametru dužina repa kometa, najmanju osjetljivost na tretman genotoksičnim agensima imaju leukociti periferne krvi, a najosjetljivije su stanice jetre.

6. POPIS LITERATURE

Alleva, R., Tomasetti, M., Solenghi, M. D., Stagni, F., Gamberini, F., Bassi, A., Arnaudeau, C., Lundin, C., Helleday, T. (2001): DNA double-strand breaks associated with replication forks are predominantly repaired by homologous recombination involving an exchange mechanism in mammalian cells. Journal of Molecular Biology **307**: 1235-1245.

Amaeze, N. H., Schnell, S., Sozeri, O., Otitoloju, A. A., Egonmwan, R. I., Arlt, V. M., Bury, N. R. (2015): Cytotoxic and genotoxic responses of the RTgill-W1 fish cells in combination with the yeast oestrogen screen to determine the sediment quality of Lagos lagoon. Niger. Mutagenesis **30**(1): 117-127.

Asaithamby, A., Uematsu, N., Chatterjee, A. Story, M. D., Burma, S., Chen, D. J. (2008): Repair of HZE particle- induced DNA double-strand breaks in normal human fibroblasts. Radiation Research **169**: 437-446

Azzam, E. I., de Toledo, S. M., Little, J. B. (2003): Oxidative metabolism, gap junctions and the ionizing radiation-induced bystander effect. Oncogene **22:** 7050-7057.

Baden, J. R., Rice, S. (2000): Metabolism and toxicity of inhaled anaesthetics. In: Miller, R. D. (ed.) Anesthesia, peto izd. Churchill Livingstone, Philadelphia, 147-173.

Bamatraf, M. M. M., O'Neill, P., Rao, B. S. M. (1998): Redox dependence of the rate of interaction of hydroxyl radical adducts of DNA nucleobases with oxidants: consequences for DNA strand breakage. Journal of the American Chemical Society **120**: 11852-11857.

Baker, M., Van Dyke, R. (1994): Hepatotoxicity of halogenated anaesthetics. In: Anesthetic Toxicity (Rice, S., Fish, K., eds). New York: Raven Press Ltd, pp. 73-88.

Bashore, T. M. (2004): Radiation safety in the cardiac catheterization laboratory. American Heart Journal **147**: 375-378.

Boya, L. J. (2003): The Thermal Radiation Formula of Planck (1900). Revista Academia de Ciencias, Zaragoza **58**: 91-114.

Brambrink, A. M., Evers, A. S., Avidan, M. S., Farber, N. B., Smith, D. J., Zhang, X., Dissen, G. A., Creeley, C. E., Olney, J. W. (2010): Isoflurane induced neuroapoptosis in the neonatal rhesus macaque brain. Anesthesiology **112**: 834-841.

Braz, M. G., Braz, L. G., Barbosa, B. S., Giacobino, J., Orosz, J. E. B., Salvadori, D. M. F., Braz, J. R. C. (2011): DNA damage in patients who underwent minimally invasive surgery under inhalation or intravenous anesthesia. Mutation Research **726**: 251-254.

Brosnan, R. J., Thiesen, R. (2012): "Increased NMDA receptor inhibition at an increased Sevoflurane MAC". BMC Anesthesiology **12**(1): 9.

Brozović, G. (2007): Genotoksični i citotoksični učinak inhalacijskih anestetika i cisplatine na zdrave i stanice Ehrlich ascites tumora u Swiss albino miševa. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Campagna, J. A., Miller, K. W., Forman, S. A. (2003): Mechanisms of actions of inhaled anesthetics. The New England Journal of Medicine **348**: 2110-2124.

Cooper, G. M., Hausman, R. E. (2004): The cell: a molecular approach (3rd ed). Palgrave-Macmillans Global Academic Publishing, p. 713.

Datta, K., Purkayastha, S., Newmann, R. D., Pastwa, E., Winters T. A. (2011): Base damage immediately upstream from double-strand break ends is a more severe impediment to nonhomologous end joining than blocked 30-termini. Radiation Research **175**: 97-112.

Desouky, O., Ding, N., Zhou, G. (2015): Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. Journal of Radiation Research and Applied Sciences **8**: 247-254.

Dobbs, T. A., Palmer, P., Maniou, Z., Lomax, M. E., O'Neill, P. (2008): Interplay of two major repair pathways in the processing of complex double-strand DNA breaks. DNA Repair **7**: 1372-1383.

Eccles, L. J., O'Neill, P., Lomax, M. E. (2011): Delayed repair of radiation induced clustered DNA damage: friend or foe? Mutation Research **711**: 134-141.

Eger, I. E. (2005): The pharmacology of inhaled anesthetics. In: Seminars in Anesthesia, Perioperative Medicine and Pain. Journal of Critical Care **24**: 89-100.

El-Benhawy, S. A., Sadek, N. A., Behery, A. K., Issa, N. M., Ali, O. K. (2015): Chromosomal aberrations and oxidative DNA adduct 8-hydroxy-2-deoxyguanosine as biomarkers of radiotoxicity in radiation workers. Journal of Radiation Research and Applied Science **xxx**: 1-10.

Elena, G., Amerio, N., Ferrero, P., Bay, M. L., Valenti, J., Colucci, D. (2003): Effects of repetitive sevoflurane anaesthesia on immune response, select biochemical parameters and organ histology in mice. Laboratory Animals **37**: 193-203.

Endacott, M., (1997): Enciklopedija alternativne medicine. Veble commerce.

Fish, K. (1994): Nephrotoxicity of volatile anaesthetic agents. In: Rice, S., Fish, K., (eds). Anesthetic Toxicity. New York, Raven Press Ltd, pp. 89-106.

Frink, E. J. Jr., Ghantous, H., Malan, T. R. Jr., Morgan, S., Fernando, J., Gandolfi, A. J., Brown, B. R. Jr. (1992): Plasma inorganic fluoride with sevoflurane anesthesia: Correlation with indices of hepatic and renal function. Anesthesia and analgesia **74**: 231-235.

Frink, E. J. Jr., Malan, T. R. Jr., Isner, J., Brown, E. A., Morgan, S., Brown, B. R. Jr. (1994): Renal concentrating function with prolonged sevoflurane or enflurane anesthesia in volunteers. Anesthesiology **80**: 1019-1025.

Forchhammer, L., Ersson, C., Loft, S., Moller, L., Godschalk, R. W., van Schooten, F. J., Jones, G. D., Higgins, J. A., Cooke, M., Mistry, V., Karbaschi, M., Collins, A. R., Azqueta, A., Phillips, D. H., Sozeri, O., Routledge, M. N., Nelson-Smith, K., Riso, P., Porrini, M., Matullo, G., Allione, A., Stępnik, M., Komorowska, M., Teixeira, J. P., Costa, S., Corcuera, L. A., López de Cerain, A., Laffon, B., Valdiglesias, V., Møller, P.

(2012): Inter-laboratory variation in DNA damage using a standard cometassay protocol. Mutagenesis **27** (6): 665-672.

Furusawa, Y. (2014): Heavy-ion radiobiology. In: Tsujii, H., Kamada, T., Shirai, T., Noda, K., Tsuji, H., Karasawa, K., (eds). Carbon-ion radiotherapy: Principles, practices, and treatment planning. Japan. Springer.

Grah, J. J. (2013): Uloga radioterapije u liječenju tumora dječje dobi. Paediatria Croatica **57** (Supl 1): 203-209.

Groth, P., Orta, M. L., Elvers, I., Majumder, M. M., Lagerqvist, A., Helleday, T. (2012): Homologous recombination repairs secondary replication induced DNA double-strand breaks after ionizing radiation. Nucleic Acids Research **40**: 6585-6594.

Hair, J. M., Terzoudi, G. I., Hatzi, V. I., Lehockey, K. A., Srivastava, D., Wang, W., Pantelias, G. E., Georgakilas, A. G. (2010): BRCA1 role in the mitigation of radiotoxicity and chromosomal instability through repair of clustered DNA lesions. Chemico-Biological Interactions **188**: 350-358.

Hall, E. J., Giaccia, A. J. (2006): Radiobiology for the radiologist (6th ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Hall, E. J., Giaccia, A. J. (2011). Radiobiology for the radiologist (7th ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Hall, S., Rudrawar, S., Zunk, M., Bernaitis, N., Arora, D., McDermott, C., Anoopkumar-Dukie, S. (2016): Protection against Radiotherapy-Induced Toxicity. Antioxidants **5**: 22.

Hanai, R., Yazu, M., Heida, K. (1998): On the experimental distinction between ssbs and dsbs in circular DNA. International Journal of Radiation Biology **73**: 475-479.

Hang, L. H., Shao, D. H., Wang, H., Yang, J. P. (2010): "Involvement of 5-hydroxytryptamine type 3 receptors in sevoflurane-induced hypnotic and analgesic effects in mice" (PDF). Pharmacological Reports **62** (4): 621-626.

Harper, J. V., Anderson, J. A., O'Neillm, P. (2010): Radiation induced DNA DSBs: contribution from stalled replication forks? DNA Repair (Amst) **9**: 907-913.

Hawas, A. M., Abdel Hamid, F. F. (2010): Effects of Ficus carica L. leaves extract on rats exposed to g-radiation. Egyptian Journal of Radiation Sciences and Applications **23** (2): 333.

Hemmings, H. C., Hopkins, P. M. (2006): Foundations of anesthesia: basic sciences for clinical practice. Philadelphia: Mosby Elsevier.

Hawas, A. M. (2013): Effect of low dose gamma rays on certain essential metals and oxidative stress in different rat organs. Journal of radiation research and applied sciences **6**: 38-44.

Holaday, D. A., Smith, F. R. (1981): Clinical characterics and biotransformation of sevoflurane in healthy human volunters. Anesthesiology **54**: 100-106.

Holbert, K. E. (2008): Radiation effects and damage. http://holbert.faculty.asu.edu/eee560/RadiationEffectsDamage.pdf pristupljeno 6.9.2016.

Huw Reed, S., Waters, R. (2005): DNA Repair. Encyclopedia of life sciences. John Wiley & Sons, Ltd.

ICRP. International Commission on Radiological Protection (1977): Recommendations of the ICRP Publication 26. Oxford: Pergamon Press.

ICRP. International Commission on Radiological Protection (1990): ICRP 1990 recommendations of the ICRP. Ann ICRP. Publication 60. Amsterdam: Elsevier.

ICRP. International Commission on Radiological Protection (2007): The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. Ann ICRP. Publication 103. Amsterdam: Elsevier.

ICRP. International Commission on Radiological Protection (2008): Radiological Protection in Medicine. Ann ICRP. Publication 105. Amsterdam: Elsevier.

Jackson, S. P., Bartek, J. (2009): The DNA-damage response in human biology and disease. Nature **461**: 1071-1078.

Jakob, B., Splinter, J., Conrad, S., Voss, K. O., Zink, D., Durante, M., Löbrich, M., Taucher-Scholz, G. (2011): DNA double-strand breaks in heterochromatin elicit fast repair protein recruitment, histone H2AX phosphorylation and relocation to euchromatin. Nucleic Acids Research **39**: 6489-6499.

Jenner, T. J., deLara, C. M., O'Neill, P., Stevens, D. L. (1993): Induction and rejoining of DNA double-strand breaks in V79-4 mammalian cells following gamma- and alpha-irradiation. International Journal of Radiation Biology **64**: 265-273.

Jevtovic-Todorovic, V., Hartman, R. E., Izumi, Y., Benshoff, N. D., Dikranian, K., Zorumski, C. F., Olney, J. W., Wozniak, D. F. (2003): Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. Journal of Neuroscience **23**: 876-882.

Jukić, M., Carev, M., Karanović, N., Lojpur, M. (2015): Anestezija i intenzivna medicina za studente. http://neuron.mefst.hr/docs/katedre/anesteziologija/Skripta%20anesteziologija%20i%20intenziva.pdf pristupljeno 24.7.2016.

Karabiyik, L., Sardas, S., Polat, U., Kocabas, N. A., Karakaya, A. E. (2001): Comparison of genotoxicity of sevoflurane and isoflurane in human lymphocytes studied in vivo using the comet assay. Mutation Research **492**: 99-107.

Karbownik, M., Reiter, R. J. (2000): Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. Experimental Biology and Medicine **225** (1): 9-22.

Kharasch, E. D. (1995): Biotransformation of Sevoflurane. Anesthesia and Analgesia **81** (6 Suppl): S 27-38.

Kharasch, E., Karol, M., Lanni, C., Sawchuk, R. (1995a): Clinical sevoflurane metabolism and disposition. Sevoflurane and metabolites pharmacokinetics. Anesthesiology **82**: 1369-1378.

Kharasch, E. D. (1996): Metabolism and toxicity of the new anesthetic agents. Acta Anaesthesiol*gica* Belgica **47**(1): 7-14.

Katzung, B. G., Masters, S. B., Trevor, A. J. (2012): Basic & clinical pharmacology (12th edition). New York: McGraw-Hill Companies. pp. 429-438.

Kim, I. H., Mupparapu, M. (2009): Dental radiographic guidelines: a review. Quintessence International **40**: 389-398.

Kobayashi, Y., Ochiai, R., Takeda, J., Sekiguchi, H., Fukushima, K. (1992): Serum and urinary inorganic fluoride concentrations after prolonged inhalation of sevoflurane in humans. Anesthesia and Analgesia **74**: 753-757.

Koturbash, I., Kutanzi, K., Hendrickson, K., Rodriguez-Juarez, R., Kogosov, D., Kovalchuk, O. (2008): Radiation-induced bystander effects in vivo are sex specific. Mutation Research **642**(1-2): 28-36.

Liao, W., McNutt, M. A., Zhu, W. G. (2009): The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. Methods **48**: 46-53.

Lieber, M. R. (2010): The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. Annual Review of Biochemistry **79**: 181-211.

Little, J. B. (2006): Cellular radiation effects and the bystander response. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **597**: 113-118.

Lomax, M. E., Folkes, L. K., O'Neill, P. (2013): Biological Consequences of Radiation-induced DNA Damage: Relevance to Radiotherapy. Clinical Oncology **25**: 578-585.

Lorimore, S. A., Coates, P. J., Scobie, G. E., Milne, G., Wright, E. G. (2001): Inflammatory-type responses after exposure to ionizing radiation in vivo: a mechanism for radiation-induced bystander effects? Oncogene **20**: 7085-7095.

Ludlow, J. B., Davies-Ludlow, L. E., White, S. C. (2008): Patient risk related to common dental radiographic examinations: the impact of 2007 International Commission on Radiological Protection recommendations regarding dose calculation. Journal of the American Dental Association **139**: 1237-1243.

Lyng, F. M., Maguire, P., McClean, B., Seymour, C., Mothersill, C. (2006): Radiation Research **165**: 400.

Makaryus, R., Enikolopov, G., Feng, T., Benveniste, H., Lee, H., Park, J. H., Nedergaard, M., Jacob, Z. (2015): Brain Maturation in Neonatal Rodents Is Impeded by Sevoflurane. Anesthesia and Anesthesiology **123**(3): 557-568.

Martı´nez, A., Coleman, M., Romero-Talamas, A. C., Frı´as, S. (2010): An assessment of immediate DNA damage to occupationally exposed workers to low dose ionizing radiation by using the comet assay. Revista de Investigación Clínica **62**: 23-30.

McFadyen, J. G., Pelly, N., Orr, R. J. (2011): Sedation and anesthesia for the pediatric patient undergoing radiation therapy. Current Opinion in Anesthesiology **24**: 433-438.

Merrifield, M., Kovalchuk, O. (2013): Epigenetics in radiation biology: a new research frontier. Frontiers in Genetics **4**: 1-5.

Migliari, M., Bellani, G., Rona, R., Isgrò, S., Vergnano, B., Mauri, T., Patroniti, N., Pesenti, A., Foti, G. (2009): Short-term evaluation of sedation with sevoflurane administered by the anesthetic conserving device in critically ill patients. Intensive Care Medicine **35**: 1240-1246.

Mohora, M., Greabu, M., Totan, A., Mitrea, N., Battino, M. (2009): Redox-sensitive signaling factors and antioxidants. Farmacia Vol. **57**: 4.

Nagasawa, H., Little, J. B. (1992): Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles. Cancer Research **52**: 6394-6396.

Nair, G. G., Nair, C. K. K. (2010): Protection of cellular DNA and membrane from γ-radiation-induced damages and enhancement in DNA repair by sesamol. Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals **25**(6): 629-635.

Nair, G. G., Nair, C. K. K. (2013): Radioprotective Effects of Gallic Acid in Mice. BioMed Research International Vol 2013: 953079.

Nathanson, M. H., Fredman. B., Smith, I., White, P. F. (1995): Sevoflurane versus desflurane for outpatient anesthesia: a comparison of maintenance and recovery profiles. Anesthesia and Analgesia **81**: 1186-1190.

Nijhuis, E. H., Poot, A. A., Feijen, J., Vermes, I. (2006): International Journal of Hyperthermia **22**: 687.

Nikizad, H., Yon, J. H., Carter, L. B., Jevtovic-Todorovic, V. (2007): Early exposure to general anesthesia causes significant neuronal deletion in the developing rat brain. Annals of the New York Academy of Sciences. **1122**: 69-82.

Nikjoo, H., Uehara, S., Wilson, W. E., Hoshi, M., Goodhead, D. T. (1998): Track structure in radiation biology: theory and applications. International Journal of Radiation Biology **73**: 355-364.

Nikjoo, H., O'Neill, P., Terrissol, M., Goodhead, D. T. (1999): Quantitative modelling of DNA damage using Monte Carlo track structure method. Radiation and Environmental Biophysics **38**: 31-38.

Nikjoo, H., O'Neill, P., Wilson, W. E., Goodhead, D. T. (2001): Computational approach for determining the spectrum of DNA damage induced by ionizing radiation. Radiation Research **156**: 577-583.

Olive, P. L., Durand, R. E. (2005): "Heterogeneity in DNA damage using the comet assay." Cytometry A **66**(1): 1-8.

Okano, T., Sur, J. (2010): Radiation dose and protection in dentistry Japanese Dental Science, Review **46**: 112-121.

Oršolić, N., Benković, V., Horvat-Knežević, A., Bašić, I. (2008): Scientific base for using propolis and its polyphenolic/flavonoid compounds as an adjunct to radiation therapy. Scientific Evidence of the Use of Propolis in Ethnomedicine: 251-310.

Oremuš, K. (2016): Koje vrste anestezije postoje i koliko su opasne? http://ordinacija.vecernji.hr/zdravlje/ohr-savjetnik/koje-vrste-anestezije-postoje-i-koliko-su-opasne/ pristupljeno 24.7.2016.

Ostling, O., Johanson, K. J. (1984): Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochemical and Biophysical Research Communications **30;123**(1): 291-298.

Patel, S. S., Goa, K. L. (1996): Sevoflurane. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and its clinical use in general anaesthesia. Drugs **51**: 658-700.

Pouget, J. P., Frelon, S., Ravanat, L. L., Testard, I., Odin, F., Cadet, J. (2002): Formation of modified DNA bases in cells exposed either to gamma radiation or to high-LET particles. Radiation Research **157**: 589-595.

PWGSC. Minister of Public Works and Government Services Canada (2012). Canadian Nuclear Safety Commission (CNSC). 978-1-100-21572-3.

Riballo, E., Kuhne, M., Rief, N., Doherty, A., Smith, G. C., Recio, M. J., Reis, C., Dahm, K., Fricke, A., Krempler, A., Parker, A. R., Jackson, S. P., Gennery, A., Jeggo, P. A., Löbrich, M. (2004): A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. Molecular Cell **16**: 715-724.

Rozgaj, R., Kasuba, V., Sentija, K., Prlic, I. (1999): Radiation induced chromosomal aberrations and hematological alterations in hospital workers. Occupational Medicine **49** (6): 353-360.

Saha, G. B. (2013): Radiation biology in physics and radiobiology of nuclear medicine. Springer Science + Business Media, New York.

Schofield, P. A. (2014): The assessment and management of perioperative pain in older adults. Anaesthesia **69**: 54-60.

Schüttler, J., Schwilden, H., (2008): Modern Anesthetics. Springer Science & Business Media p. 32.

Shaban, E. A., Hawas, A. M. (2008): Pentoxifylline as a radioprotector against certain biological and metal disorders of whole body gamma irradiation in rats. The Egyptian Journalof Hospital Medicine **30**: 133.

Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L. (1988): A simple technique for quantitation of low levels of dna damage in individual cells. Experimental Cell Research **175** (1): 184-191.

Smith, I., Ding, Y., White, P. F. (1992): Comparison of induction, maintenance, and recovery characteristics of sevoflurane-N2O and propofol-sevoflurane-N2O with propofol-isoflurane-N2O anesthesia. Analgesia **74**: 253-259.

Smith, I., Monk T. G., White, P. F., Ding, Y. (1994): Propofol infusion during regional anesthesia: sedative, amnestic, and anxiolytic properties. Anesthesia and Analgesia **79**: 313-319.

Sokolov, M. V., Dickey, J. S., Bonner, W. M., Sedelnikova, O. A. (2007): Gamma-H2AX in bystander cells: not just a radiation-triggered event, a cellular response to stress mediated by intercellular communication. Cell Cycle **6**: 2210-2212.

Soubhia, A. F., Lauz, S., Montero, E. F., Menezes, A., Bicca Mespaque' L., Facin, E. (2011): Effects of the inhalational anesthetics halothane and sevoflurane on an experimental model of hepatic injury. Brazilian Journal of Anesthesiology **61**: 591-603.

Strum, D., Eger, E. I. (1987): Partition coeficients for sevoflurane in human blood, saline, and olive oil. Anesthesia and Analgesia **66**: 654-656.

Syfter, K., Szulc, R., Mikstacki, A., Stachecki, I., Rydzanicz, M., Jaloszynski, P. (2004): Genotoxicity of inhalation anaesthetics: DNA lesions generated by sevoflurane *in vitro* and *in vivo*. Journal of Applied Genetics **45**: 369-374.

Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C., Sasaki, Y. F. (2000): Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environmental and Molecular Mutagenesis **35** (3): 206-221.

Tsuchiya, M., Asada, A., Maeda, K., Ueda, Y., Sato, E. F., Shindo, M., Inoue, M. (2001): Propofol versus midazolam regarding their antioxidant activities. The American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine **163**: 26-31.

Van Dort, C. J. (2008): Regulation of Arousal by Adenosine A(1) and A(2A) Receptors in the Prefrontal Cortex of C57BL/6J Mouse. ProQuest. p. 120.

Van Gent, D. C., Hoeijmakers, J. H., Kanaar, R. (2001): Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. Nature Reviews Genetics **2**: 196-206.

Vane, J. R., Mitchell, J. A., Appleteon I., Tomlinson, A., Bishop-Bailey, D., Croxtall, J., Willoughby, D. A. (1994): Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. Proceedings of the National Academy of Sciences USA **91**: 2046-2050.

Waldren, C. A. (2004): Classical radiation biology dogma, bystander effects and paradigm shift. Human & Experimental Toxicology **23**: 95-100.

Waskell, L. (1994): Metabolism of the volatile anesthetics. In: Rice, S. A, Fish, K. J, (eds). Anesthetic toxicity. New York: Raven Press p. 49.

Weber, U., Kraft, G. (2009): Comparison of carbon ions versus protons. Cancer Journal **15**: 325-332.

Wright, E. G. (1998): Radiation-induced genomic instability in haemopoietic cells. International Journal of Radiation Biology **74**: 681-687.

Yakovlev, V. A. (2015): Role of nitric oxide in the radiation-induced bystander effect. Redox Biology **6**: 396-400.

Yon, J. H., Daniel-Johnson, J., Carter, L. B., Jevtovic-Todorovic, V. (2005): Anesthesia induces neuronal cell death in the developing rat brain *via* the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. Neuroscience **135**: 815-827.

Zizek, D., Ribnikar, M., Zizek, B., Ferlan-Marolt, V. (2010): Fatal subacute liver failure after repeated administration of sevoflurane anaesthesia. European Journal of Gastroenterology and Hepatology **22**: 112-115.

Zou, X., Liu, F., Zhang, X., Patterson, T. A., Callicott, R., Liu, S., Hanig, J. P., Paule, M. G., Slikker, W. Jr., Wang, C. (2011): Inhalation anesthetic induced neuronal damage in the developing rhesus monkey. Neurotoxicology and Teratology **33**: 592-597.

web stranice:

http://www.amsbio.com/comet-assays.aspx; pristupljeno 5.9.2016.

http://www.bioquicknews.com/node/2696; pristupljeno 5.9.2016.

http://www.nioh.ac.za/?page=genotoxicity_assessment_unit&id=98; pristupljeno 6.9.2016.

https://matrixworldhr.com/2012/05/03/dnk-prirodni-svjetlosni-internet-i-bioenergetsko-polje-ljudi/; pristupljeno 18.7.2016.