

# NEUROIMUNOMODULACIJSKE I OKSIDACIJSKE PROMJENE U MOZGU ŠTAKORA NAKON ZDRUŽENOG IZLAGANJA ANESTETICIMA I TEŠKIM METALIMA

---

Lesar, Nikola

Doctoral thesis / Doktorski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:322236>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-02**



Repository / Repozitorij:

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





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Nikola Lesar

**NEUROIMUNOMODULACIJSKE I  
OKSIDACIJSKE PROMJENE U  
MOZGU ŠTAKORA NAKON  
IZLAGANJA ANESTETICIMA I  
TEŠKIM METALIMA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



UNIVERSITY OF ZAGREB  
FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Nikola Lesar

**NEUROIMMUNOMODULATORY AND  
OXIDATIVE CHANGES IN RAT BRAIN  
AFTER EXPOSURE TO ANESTHETICS  
AND HEAVY METALS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2024.

Ovaj je doktorski rad izrađen u *Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu*, pod vodstvom *prof. dr. sc. Nade Oršolić*, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad je dijelom financiran iz projekta "Učinak aluminij klorida na neuroupalu, oksidacijski stres i raspodjelu toksičnih mikroelemenata u mozgu štakora" Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu (voditelj: *prof. dr. sc. Nada Oršolić*, 20284121).

Dio rada financiran je u sklopu projekta "Hiperfosforilacija, agregacija i transsinaptički prijenos tau proteina u Alzheimerovoj bolesti: analiza likvora i ispitivanje potencijalnih neuroprotektivnih spojeva" (IP-2014-09-9730) te izrađen u *Laboratoriju za razvojnu neuropatologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga u Zagrebu*, uz stručnu pomoć voditelja projekta *prof. dr. sc. Gorana Šimića* i kolegice *Lee Langer Horvat, mag. biol. mol.*

## **INFORMACIJE O MENTORU: prof. dr. sc. Nada Oršolić, profesor u trajnom zvanju**

Prof. dr. sc. Nada Oršolić rođena je 1960. godine u Tolisi (Orašje), BiH gdje je završila osnovnu školu i gimnaziju. Diplomirala je 1984. na smjeru Biologija s ekologijom te 1985. na profesorskom smjeru Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Na istom je fakultetu magistrirala 1991. (smjer Molekularna biologija) i doktorirala 1999. s radom „Protutumorski učinci pčelinjeg otrova i propolisa” (voditelj prof. dr. sc. Ivan Bašić). Boravila na postdoktorskom usavršavanju u MD Anderson Cancer Center (Department of Leukemia), Division of Cancer Medicine, Houston, Texas (2001.- 2002.). Zaposlena u Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu od 1987. do danas (08. ožujka 2016. izbor u trajno zvanje redoviti profesor).

**Nastavna djelatnost (nositelj kolegija) –Prediplomski studij:** Animalna fiziologija, Laboratorijske životinje u biološkim istraživanjima; **Inegrirani prediplomski i diplomski sveučilišni studij Biologija i kemija:** Biologija tumora, Imunologija; **Diplomski studij:** Imunologija i imunogenetika, Komparativna imunologija, Imunologija tumora i metastaza, Opća onkologija, Molekularna Onkologija, Metode u imunologiji, Fiziologija oksidativnog stresa u ljudi i životinja, Fiziološki mehanizmi toksina; **Postdiplomski studij:** Kemoprevencija i bioterapija tumora, Mutageni i antimutageni, Animalni modeli glodavaca u eksperimentalnoj onkologiji.

**Mentorstvo:** voditelj završnih radova – 68; voditelj diplomskih radova – 241; voditelj radova za nagradu Rektora – 7; voditelj magistarskih radova – 6; voditelj specijalističkog rada – 1; voditelj doktorskih radova – 25.

**Znanstveni projekti:** nositelj, voditelj i suradnik na brojnim međunarodnim (3 projekta) i nacionalnim (17 projekata) projektima.

**Znanstvena aktivnost:** – radovi 224 (20 preglednih radova u različitim znanstvenim knjigama, CC – 105, SCI – 28, druge međunarodne znanstvene baze – 10, domaće znanstvene baze – 8, Znanstveni radovi recenzirani i objavljeni u zborniku radova s međunarodnog znanstvenog skupa -19, znanstveni popularizacijski radovi – 12, stručni radovi – 8, i članci u popularizaciji struke – 14, kongresni sažetak domaći – 121 i internacionalna – 154. Editor je knjige: Scientific evidence of the use of propolis in ethnomedicine” (Editors: Oršolić N. and Bašić I). Ethnopharmacology- Review Book, Research Signpost, India ISBN:978-81-7895-357-1 te autor ili ko-autor 4 skripte.

**Članstvo u znanstvenim organizacijama i tijelima:** Hrvatskog imunološkog društva; Hrvatskog fiziološkog društva; Hrvatskog društva za znanost o laboratorijskim životinjama; Hrvatskog biološkog društva. **Član uredničkog tima za časopise:** Journal of ApiProduct and ApiMedical Science; Bioinfo Publications, Advances in Bioscience and Clinical Medicine; Molecular and Experimental Biology in Medicine te **Gost urednik časopisa Molecules** za izdanje "*Bee Products: Recent Progress in Health Benefits Studies*" i "*Bee Products as Natural Antioxidants in Disease and Health*", te časopisa *International Journal of Molecular Sciences* za izdanje "*Efficacy of Flavonoids in Chronic Diseases*" i „*Targeting Oxidative Stress in Disease*“

**INFORMACIJE O SUMENTORU: nasl. izv. prof. dr. sc. Gordana Brozović, prim. dr. med., Klinika za tumore, KBC Sestre milosrdnice, Zagreb**

Izv. prof. dr. sc. Gordana Brozović rođena je 1960. godine u Slavanskom Brodu gdje je završila osnovnu školu i gimnaziju. Diplomirala je 1985. na Studiju medicine u Osijeku, Medicinskog fakulteta u Zagrebu. Na medicinskom fakultetu u Zagrebu doktorirala je 2007. godine s radom „Genotoksični i citotoksični učinak inhalacijskih anestetika i cisplatine na zdrave i stanice Ehrlich ascites tumora u Swiss albino miševa” (voditeljica prof. dr. sc. Nada Oršolić). Od 1995. godine zaposlena kao specijalist anesteziologije, reanimatologije i intenzivnog liječenja u Općoj bolnici “Dr. Josip Benčević” u Slavanskom Brodu te bolnicama KB “Sveti Duh” i Klinici za tumore u Zagrebu. Od 2001. godine postaje subspecijalista intenzivne medicine te je trenutno zaposlena kao pročelnica Zavoda za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje Klinike za tumore, KBC “Sestre milosrdnice” u Zagrebu. Od 2009. predaje na dodiplomskoj i poslijediplomskoj nastavi Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Osijeku i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

**Nastavna djelatnost (nositelj kolegija):**

**Postdiplomski studij:** Voditeljica predmeta: Anestezija i intenzivno liječenje u trudnoći i porodu.

**Mentorstvo:** voditelj doktorskih radova – 2; suvoditelj završnih radova – 7.

**Znanstveni projekti:** suradnik na projektu – 3.

**Znanstvena aktivnost:** 31 radova (CC - 12, SCI - 12, druge baze - 17).

**Članstvo u znanstvenim organizacijama i tijelima:** Upravni odbor Hrvatskog društva za regionalnu anesteziju i analgeziju, Upravni odbor Hrvatskog društva za intenzivnu medicinu, Hrvatsko društvo za anesteziologiju i intenzivno liječenje, Hrvatsko društvo za liječenje boli European Society of Anesthesiologists, European Society of Intensive Care Medicine ESICM, Hrvatski liječnički zbor, Hrvatska liječnička komora (zastupnik u Skupštini HLK).

*Ovaj rad je posveta mojim roditeljima kao rezultat uloženog truda u odgoj i edukaciju na čemu su s pravom inzistirali od najranije dobi.*

*„Obrazovanje je najmoćnije oružje koje možemo koristiti da promijenimo svijet.“*

*(Nelson Mandela)*

## **ZAHVALA**

*Hvala, neizmjereno hvala, mojoj mentorici prof. dr. sc. Nadi Oršolić na svemu. Zahvaljujem na odabiru teme i usmjeravanju tijekom istraživanja kao i pisanja doktorskog rada. Hvala na strpljenju, razumijevanju i pomoći u trenucima kada sam se zapitao: Ima li sve ovo smisla? Hvala na mentorstvu, u pravom smislu te riječi, i potvrdi njenog rada i pristupa poslu kao nečeg izuzetnog zbog čega ju smatram svojim profesionalnim uzorom. Proteklo osmogodišnje razdoblje provedeno u suradnji sa profesoricom, znanstvenicima i osobljem Zavoda za animalnu fiziologiju koji su sudjelovali u izradi rada, za mene je bilo, ne samo korak u znanstvenoj karijeri, nego i životno iskustvo kroz koje sam odrastao i sazrio, te se nadam da ću tamo stečene vrijednosti i znanja kroz svoju karijeru uspješno prenositi drugima.*

*Veliko hvala prof. Gordani Brozović jer je u meni prepoznala interes i dala mi priliku i prvi, najveći poticaj kojim mi je otvorila svijet znanosti na čemu ću joj zauvijek biti zahvalan.*

*Jednako veliko hvala Dyani Odeh, kolegici i prijateljici, koja je uz mene od prvog dana izrade doktorata, i koja je pokazala neizmjereno strpljenje i volju za edukacijom vodeći me kroz pokuse i laboratorijske analize iako znam da je većinu vremena bila zauzeta svojim obavezama.*

*Tijekom izrade doktorata veliku pomoć pružila mi je i Marina Kukolj, kolegica koja je uvijek imala dobar savjet i pružala pomoć kada bi imao problema u izradi te je sve radila uz osmijeh i dobru volju.*

*Također, zahvaljujem i prof. dr. sc. Goranu Šimiću i Lei Langer Horvat s HIIM-a u Zagrebu na financiranju i pomoći pri izradi dijela istraživanja.*

*Hvala gđi Ankici Ajduković koja je svojom pomoći tehnički održala ostvarenje velikog dijela istraživanja.*

*Veliko hvala mojoj supruzi Ani Lesar koja me gurala i bila moja velika podrška i oslonac u trenucima kada sam pomislio odustati.*

*I na kraju, hvala mojim roditeljima bez čije pomoći i podrške ovaj rad ne bi bio realiziran.*



**NEUROIMUNOMODULACIJSKE I OKSIDACIJSKE PROMJENE U  
MOZGU ŠTAKORA NAKON ZDRUŽENOG IZLAGANJA  
ANESTETICIMA I TEŠKIM METALIMA**

NIKOLA LESAR

Zavod za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u  
Zagrebu

Cilj rada je bio istražiti učinak aluminij klorida ili željezo dekstrana uz prisutnost inhalacijskih anestetika (IA, sevoflurana i izoflurana) na nakupljanje metala u stanicama mozga, narušavanje esencijalnih elemenata te njihovu ulogu u promjeni redoks homeostaze, upale, aktivacije makrofaga i glija stanica, razine hepcidina, feritina i aktivnosti metaloproteinaza te nastanak posljedičnih strukturnih, funkcionalnih promjena koje vode razvoju neurodegenerativne bolesti. Rezultati ukazuju da subakutna, a posebice kronična primjena IA uz prekomjerni unos metala narušava stanični metabolizam, vodi poremećaju esencijalnih i nakupljanju visokotoksičnih i neesencijalnih metala, povećanju OS, upale, makrofagne polarizacije, imunosne supresije te manjih histopatoloških promjena u mozgu kroz nakupljanje amiloida. Izofluran u kombinaciji s metalima izaziva najveće promjene u mozgu kroz izrazito nakupljanje visokotoksičnih metala. Podaci ukazuju na poveznicu između visoke razine hepcidina, upale, polarizacije makrofaga prema M1 fenotipu, povećanja AChE, smanjenja BDNF i neurodegenerativnih oštećenja. Razina hepcidina usko je povezana s makrofagnom polarizacijom, OS, upalom i reorganizacijom oštećenog tkiva, dok su feritin i arginin te protuupalni citokini i BDNF zaštitne komponente mozga u prisutnosti metala i/ili IA. Nadalje, uvjeti mikrookoliša utječu na plastičnost makrofaga i odnos između fenotipova M1/M2 makrofaga; željezo regulira funkciju makrofaga kroz više putova, utječući na njihovu polarizaciju, enzimsku aktivnost i ukupnu ulogu u upali i imunosnom odgovoru. Metali tijekom kronične primjene potiskuju imunosni odgovor kroz mehanizam povezan s oksidacijskim stresom.

Rad sadrži: 301 stranicu, 88 slika, 19 tablica, 417 literaturnih navoda, jezik izvornika hrvatski

**Ključne riječi:** inhalacijski anestetici, sevofluran, izofluran, željezo dekstran, aluminijev klorid, Alzheimerova bolest, oksidacijski stres, neuropala

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

**Sumentor:** izv. prof. dr. sc. Gordana Brozović

**Ocjenjivači:**

prof. dr. sc. Domagoj Đikić

izv. prof. dr. sc. Romana Gračan

dr. sc. Snježana Ramić, znan. suradnica

**Zamjena:**

prof. dr. sc. Lidija Šver

**NEUROIMMUNOMODULATORY AND OXIDATIVE CHANGES IN THE RATS  
BRAIN AFTER COMBINED EXPOSURE TO ANESTHETICS AND HEAVY  
METALS**

NIKOLA LESAR

Department of Animal physiology, Department of Biology, Faculty of Science, Rooseveltov  
trg 6, Zagreb

The aim of the work was to investigate the effect of aluminum chloride or iron dextran in the presence of inhalation anesthetics (IA, sevoflurane and isoflurane) on the accumulation of metals in brain cells, disruption of essential elements and their role in changing redox homeostasis, inflammation, activation of macrophages and glial cells, hepcidin level, ferritin and metalloproteinase activities and the resulting structural and functional changes that lead to the development of neurodegenerative diseases. The results indicate that subacute and especially chronic use of IA with excessive metal intake disrupts cellular metabolism, leads to disruption of essential and accumulation of highly toxic and non-essential metals, increased OS, inflammation, macrophage polarization, immune suppression and minor histopathological changes in the brain through amyloid accumulation. Isoflurane in combination with metals causes the greatest changes in the brain through the extreme accumulation of highly toxic metals. The data indicate a link between high hepcidin levels, inflammation, polarization of macrophages towards the M1 phenotype, increased AChE, decreased BDNF and neurodegenerative damage. The level of hepcidin is closely related to macrophage polarization, OS, inflammation and reorganization of damaged tissue, while ferritin and arginine and anti-inflammatory cytokines and BDNF are protective components of the brain in the presence of metals and/or IA. Furthermore, microenvironmental conditions affect macrophage plasticity and the relationship between M1/M2 macrophage phenotypes; iron regulates the function of macrophages through multiple pathways, affecting their polarization, enzymatic activity and overall role in inflammation and immune response. During chronic administration, metals suppress the immune response through a mechanism related to oxidative stress.

PhD thesis contains: 301 pages, 88 figures, 19 tables, 417 references, original in Croatian

**Key words:** inhalation anesthetics, sevoflurane, isoflurane, iron dextran, aluminum chloride, Alzheimer's disease, oxidative stress, neuroinflammation

**Supervisor:** Full Prof. Nada Oršolić, PhD

**Co-supervisor:** Assoc. Prof. Gordana Brozović, PhD

**Reviewers:**

Full Prof. Domagoj Đikić, PhD

Assoc. Prof. Romana Gračan, PhD

Snježana Ramić, PhD

**In lieu of:**

Prof. Lidija Šver, PhD

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. Početna hipoteza rada.....	5
1.2. Glavni ciljevi rada.....	5
<b>2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>6</b>
2.1. Inhalacijski anestetici .....	7
2.1.1. Sevofluran.....	9
2.1.2. Izofluran .....	10
2.2. Izloženost teškim metalima .....	12
2.2.1. Homeostaza teških metala u ljudskom organizmu.....	13
2.2.2. Željezo – esencijalni teški metal .....	14
2.2.3. Aluminij – neesencijalni teški metal.....	19
2.2.4. Neurotoksičnost teških metala.....	23
2.3. Alzheimerova bolest (AD) .....	26
2.3.1. Patogeneza Alzheimerove bolesti.....	27
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>35</b>
3.1. Materijali .....	36
3.1.1. Pokusne životinje .....	36
3.1.2. Ispitne komponente i kemijski spojevi.....	36
3.2. Metode.....	37
3.2.1. Eksperimentalni dizajn .....	37
3.2.2. Uzorkovanje.....	38
3.2.3. Metode za utvrđivanje patofizioloških promjena nakon apliciranih teških metala i inhalacijskih anestetika .....	39
3.2.4. Analiza prooksidativne/antioksidativne učinkovitosti .....	45
3.2.5. Analiza neuroupalnih promjena u tkivu mozga i serumu.....	48
3.2.6. Neurohistopatološke promjene u tkivu mozga.....	54
3.3. Statistička obrada podataka .....	57
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>58</b>
4.1. Patofiziološke promjene štakora nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze .....	59
4.1.1. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na promjenu mase životinja i relativnu težinu mozga .....	59

4.1.2. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na biokemijske odrednice štakora .....	61
4.1.3. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na hematološke odrednice štakora.....	66
4.1.4. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na ukupni broj leukocita i diferencijalnu analizu krvi .....	69
4.1.5. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na osmotsku otpornost eritrocita .....	71
4.2. Promjene koncentracije esencijalnih, neesencijalnih i visokotoksičnih metala u tkivu mozga nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze .....	72
4.2.1. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na koncentraciju esencijalnih metala u tkivu mozga.....	73
4.2.2. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na koncentraciju visokotoksičnih i neesencijalnih metala u tkivu mozga.....	75
4.3. Oksido-redukcijske promjene u tkivu mozga nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze.....	77
4.3.1. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na razinu lipidne peroksidacije (malondialdehid, MDA) u tkivu mozga .....	77
4.3.2. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na ukupnu razinu glutationa (GSH) u tkivu mozga.....	79
4.3.3. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na aktivnost antioksidacijskih enzima (CAT i SOD) u tkivu mozga .....	81
4.4. Neuroupalne promjene u tkivu mozga nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze.....	83
4.4.1. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na makrofagnu aktivnost i polarizaciju u tkivu mozga i serumu .....	83
4.4.2. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na razinu MMP2 i MMP9 u tkivu mozga .....	88
4.4.3. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na razinu hepcidina u serumu i feritina u tkivu mozga i serumu .....	90
4.4.4. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na razinu upalnih citokina u serumu .....	94
4.5. Neurohistopatološke promjene u tkivu mozga nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze.....	98
4.5.1. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na aktivnost acetilkolinesteraze (AChE) u tkivu mozga.....	98
4.5.2. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na koncentraciju moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF) u mozgu.....	100

4.5.3. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na neurohistopatološke promjene u mozgu.....	101
4.6. Patofiziološke promjene štakora nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze.....	102
4.6.1. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na promjenu mase životinja i relativnu težinu mozga.....	102
4.6.2. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na biokemijske odrednice štakora.....	104
4.6.3. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na hematološke odrednice štakora.....	109
4.6.4. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na ukupni broj leukocita i diferencijalnu analizu krvi.....	112
4.6.5. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na osmotsku otpornost eritrocita.....	114
4.7. Promjene koncentracije esencijalnih, neesencijalnih i visokotoksičnih metala u tkivu mozga nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze .....	115
4.7.1. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na koncentraciju esencijalnih metala u tkivu mozga.....	115
4.7.2. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na koncentraciju visokotoksičnih i neesencijalnih metala u tkivu mozga.....	117
4.8. Oksido-redukcijske promjene u tkivu mozga nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze.....	119
4.8.1. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na razinu lipidne peroksidacije (malondialdehid, MDA) u tkivu mozga .....	119
4.8.2. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na ukupnu razinu glutationa (GSH) u tkivu mozga.....	121
4.8.3. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na aktivnost antioksidacijskih enzima (CAT i SOD) u tkivu mozga .....	123
4.9. Neuroupalne promjene u tkivu mozga nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze .....	125
4.9.1. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na makrofagnu aktivnost i polarizaciju u tkivu mozga.....	125
4.9.2. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na razinu MMP2 i MMP9 u tkivu mozga .....	130
4.9.3. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na razinu hepcidina i feritina u tkivu mozga.....	132
4.9.4. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na razinu upalnih citokina u serumu.....	135

4.10. Neurohistopatološke promjene u tkivu mozga nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze.....	140
4.10.1. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na aktivnost acetilkolinesteraze (AChE) u tkivu mozga .....	140
4.10.2. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF) u mozgu .....	142
4.10.3. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na neurohistopatološke promjene u mozgu .....	144
4.11. Patofiziološke promjene štakora nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana.....	147
4.11.1. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na promjenu mase životinja i relativnu težinu mozga.....	147
4.11.2. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na biokemijske odrednice štakora.....	149
4.11.3. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na hematološke odrednice štakora .....	154
4.11.4. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na ukupni broj leukocita i diferencijalnu analizu krvi .....	157
4.11.5. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na osmotsku otpornost eritrocita.....	159
4.12. Promjene koncentracije esencijalnih i teških metala u tkivu mozga nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana .....	160
4.12.1. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na koncentraciju esencijalnih metala u tkivu mozga .....	160
4.12.2. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na koncentraciju visokotoksičnih i nesencijalnih metala u tkivu mozga .....	162
4.13. Oksido-redukcijske promjene u tkivu mozga nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana.....	164
4.13.1. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na razinu lipidne peroksidacije (malondialdehid, MDA) u tkivu mozga .....	164
4.13.2. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na ukupnu razinu glutaciona (GSH) u tkivu mozga.....	166
4.13.3. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na aktivnost antioksidacijskih enzima (CAT i SOD) u tkivu mozga.....	167
4.14. Neuropalne promjene u tkivu mozga nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana .....	169
4.14.1. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na makrofagnu aktivnost i polarizaciju u tkivu mozga i serumu .....	169
4.14.2. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na razinu MMP2 i MMP9 u tkivu mozga .....	174

4.14.3. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na razinu hepcidina u serumu i feritina u tkivu mozga i serumu .....	177
4.14.4. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na razinu upalnih citokina u serumu.....	180
4.15. Neurohistopatološke promjene u tkivu mozga nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana.....	184
4.15.1. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na aktivnost acetilkolinesteraze (AChE) u tkivu mozga.....	184
4.15.2. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF) u mozgu .....	186
4.15.3. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na neurohistopatološke promjene u mozgu .....	187
4.16. Patofiziološke promjene štakora nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana .....	188
4.16.1. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na promjenu mase životinja i relativnu težinu mozga .....	188
4.16.2. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na biokemijske odrednice štakora.....	189
4.16.3. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na hematološke odrednice štakora .....	195
4.16.4. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na ukupni broj leukocita i diferencijalnu analizu krvi .....	198
4.16.5. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na osmotsku otpornost eritrocita .....	200
4.17. Promjene koncentracije esencijalnih, neesencijalnih i visokotoksičnih metala u tkivu mozga nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana.....	201
4.17.1. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na koncentraciju esencijalnih metala u tkivu mozga .....	201
4.17.2. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na koncentraciju visokotoksičnih i neesencijalnih metala u tkivu mozga .....	203
4.18. Oksido-redukcijske promjene u tkivu mozga nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana.....	205
4.18.1. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na razinu lipidne peroksidacije (malondialdehid, MDA) u tkivu mozga .....	205
4.18.2. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na ukupnu razinu glutationa (GSH) u tkivu mozga.....	207
4.18.3. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na aktivnost antioksidacijskih enzima (CAT i SOD) u tkivu mozga.....	208
4.19. Neuropeptidne promjene u tkivu mozga nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana .....	211

4.19.1. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na makrofagnu aktivnost i polarizaciju u tkivu mozga i serumu.....	211
4.19.2. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na razinu MMP2 i MMP9 u tkivu mozga .....	216
4.19.3. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na razinu hepcidina i feritina u tkivu mozga.....	218
4.19.4. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na razinu upalnih citokina u serumu.....	221
4.20. Neurohistopatološke promjene u tkivu mozga nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana.....	225
4.20.1. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na aktivnost acetilkolinesteraze (AChE) u tkivu mozga .....	225
4.20.2. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF) u mozgu .....	227
4.20.3. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na neurohistopatološke promjene u mozgu .....	228
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>231</b>
5.1. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na organizam štakora.....	232
5.2. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na organizam štakora.....	241
5.3. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na organizam štakora.....	244
5.4. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na organizam štakora.....	250
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>257</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>263</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>300</b>



# **1. UVOD**

Alzheimerova bolest (engl. *Alzheimer's disease*, AD) je neurodegenerativna bolest karakterizirana postepenim i progresivnim odumiranjem stanica središnjeg živčanog sustava što uzrokuje disfunkciju i propadanje živčanog sustava pri čemu dolazi do kognitivne disfunkcije i promjena u ponašanju (1). Prvi simptomi bolesti javljaju se nakon četvrtog ili petog desetljeća života zbog njihove spore progresije (2). U današnje vrijeme, obzirom na produljenje životnog vijeka, sve veći broj ljudi obolijeva od neurodegenerativnih bolesti, pa u razvijenom svijetu u određenom vremenu oboli do 2% stanovništva (3). Alzheimerova bolest jedna je od najčešćih neurodegenerativnih bolesti kod koje dolazi do propadanja sinapsi i neurona kortikalnih i limbičkih struktura mozga uključujući hipokampus i amigdalnu (4). Postoji više hipoteza patogeneze Alzheimerove bolesti, poput (a) hipoteze o presenilinu, (b) hipoteze o disregulaciji  $Ca^{2+}$  i (c) hipoteze o lizosomu (5). Ipak, najčešća hipoteza je ona koja govori o progresivnoj akumulaciji peptida amiloida- $\beta$  i Tau proteina u stanicama živčanog sustava koji većinom nastaju cijepanjem iz amiloidnog prekursorskog proteina (engl. *amyloid precursor protein*, APP) (6). Uz karakterističnu akumulaciju amiloidnog peptida  $\beta$  i Tau proteina, ostale značajke bolesti su: (a) nekontrolirani oksidativni stres (engl. *oxidative stress*, OS), (b) pojačana proupalna signalizacija, (c) promjene u urođenom imunom signaliziranju, (d) smanjenje sinaptičke signalizacije, (e) atrofija moždanih stanica, (f) progresivna promjena genske ekspresije, (g) progresivna demencija i gubitak kognitivnih funkcija (7).

Nedavno je prepoznata uloga inhalacijskih anestetika u nastanku neurodegenerativnih promjena koje možemo povezati sa AD te njihov utjecaj na moguće ubrzavanje kliničke progresije ovog neurodegenerativnog poremećaja (8). Inhalacijski anestetici svakodnevno se koriste u operacijskim salama za indukciju ili održavanje anestezije, pri čemu vrijeme njihovog izlaganja pacijentu ovisi o složenosti samog operacijskog zahvata (9). Po svojem sastavu su hlapljivi eteri (tekućine) koje u tijelo ulaze udisanjem te potom difuzijom kroz alveo-kapilarnu membranu ulaze u krvotok preko kojeg dolaze u ciljni organ – mozak (10). Inhalacijski anestetici, čak i u niskim koncentracijama, mogu izazvati kratkotrajnu amneziju, odnosno postoperativnu kognitivnu disfunkciju (engl. *Postoperative cognitive dysfunction*, POCD) što je najvjerojatnije posredovano oštećenjem funkcije hipokampusa koji je uključen u pohranjivanje kratkotrajne memorije. Inhalacijski anestetici također umjereno djeluju na ekscitacijske neurotransmitere ionskih kanala, kao što su ionotropski kanali N-metil-D-asparaginske kiseline (NMDA) i neurotransmitore inhibicijskih kanala, kao što je G-aminomaslačna kiselina (GABA) koji se oboje nalaze u hipokampusu (11, 12). Točan proces patogeneze POCD-a je složen i čini se da dijeli određene patološke čimbenike s AD, uključujući

taloženje A $\beta$  amiloida, pojavu astrocitnih gliozna i Tau fosforilaciju (13). Pokazalo se da najčešće korišteni inhalacijski anestetici, poput sevoflurana i isoflurana, osim pozitivnih učinaka u izazivanju besvijesnog stanja i analgezije imaju i negativne učinke pa tako svojim patogenetskim mehanizmima induciraju aktivaciju kaspaze i staničnu apoptozu, povećavaju aktivnost beta-sekretaze (engl.  *$\beta$ -secretase enzyme*, BACE) te utječu na procesiranje amiloidnog prekursorskog proteina (APP) čime povećavaju sintezu i nakupljanje peptida amiloida- $\beta$  (14). Također, inhalacijski anestetici osim protuupalnog (15) imaju i proupalni učinak koji nastaje povećanjem ekspresije citokina, uključujući faktor nekroze tumora- $\alpha$  (engl. *Tumor necrosis factor- $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ) (16), dok ranije spomenutu apoptozu i akumulaciju peptida amiloida- $\beta$  mogu uzrokovati povećanjem razine kalcija u citosolu (17). Nadalje, jedan od neželjenih učinaka inhalacijskih anestetika je stimulacija proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *Reactive oxygen species*, ROS) i oksidacijskog stresa (OS) te indukcija oštećenja mitohondrija. Izofluran povećava stvaranje ROS-a, uzrokujući oštećenje mitohondrija povećanjem mitohondrijske propusnosti, smanjenjem potencijala mitohondrijske membrane i smanjenjem razine adenozin trifosfata (18). Korištenjem inhalacijskih anestetika potiče se oksidativni stres pri čemu dolazi do nakupljanja upalnih stanica posebno makrofaga koji kao izvor citokina utječu na regulaciju lokalne i sustavne upale, stanične proliferacije, metabolizma, kemotaksije i popravka tkiva (19).

Oksidativni stres, karakterističan pri nastajanju AD, osim zbog korištenja inhalacijskih anestetika, može biti uzrokovan prisustvom povećane količine teških metala u mozgu. Naime teški metali, poput željeza i aluminija, uzrokuju oksidativni stres u tkivu mozga narušavajući ravnotežu oksidansa i antioksidansa te ometaju normalnu funkciju mitohondrija i brojnih enzima (20). Nenamjerni prekomjerni unos teških metala u ljudski organizam, koji su neophodni za funkcioniranje u normalnim okvirima, zbog okolišnih zagađenja i prekomjerne industrijalizacije u posljednjih pola stoljeća ugrožava zdravlje ljudi i životinja što dovodi do patofizioloških bolesti povezanih s poremećajem homeostaze cijelog organizma (21). Aluminij je metal koji nije podložan redoks promjenama i koji do stanica živčanog sustava dolazi preko krvi pomoću transferina ili monokarboksilata gdje prolazi kroz krvno-moždanu barijeru. Metali poput aluminija mogu ubrzati i potencirati nastanak neuralnih oštećenja te se smatraju jednim od čimbenika koji pridonose oksidativnom stresu i stvaranju ROS-a (22). Oksidativni stres i povećanu proizvodnju ROS-a, osim aluminija, uzrokuje i željezo koje u mozgu nalazimo u proteinima poput citokroma, feritina, akonitaza, u mitohondrijima, citokromu P450, tirozinu, triptofan hidroksilazi koja katalizira početak sinteze dopamina i serotonina (23). Kod oštećenja

moždanog tkiva dolazi do oslobađanja željeza koje sudjeluje u reakcijama nastanka visoko reaktivnog hidroksilnog radikala ( $\cdot\text{OH}$ ) iz vodikovog peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), lipidne peroksidacije i autooksidacije neurotransmitera pri čemu nastaju epileptična izbijanja, deplecija dopamina i smrt neuralnih stanica šta je dokazano injiciranjem željeznih soli direktno u mozak. Oslobodeno željezo u mozgu dugo perzistira jer cerebrospinalni likvor koji okružuje mozak ima slabu tendenciju vezanja željeza (24). Tkivo mozga je posebice osjetljivo na ROS zbog smanjene razine antioksidansa, većeg udjela polinezasićenih masnih kiselina (engl. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA) u staničnoj membrani neurona, visoke metaboličke aktivnosti i visoke razine željeza (25). Do neuroupalnih procesa dovodi povećana razina ROS-a koja potiče transkripciju proupalnih gena i otpuštanje citokina, poput interleukina-1 i interleukina-6, tumor nekroznog faktora- $\alpha$  i kemokina pri čemu dolazi do gubitka neurona i autoimune osjetljivosti (26). Upalna reakcija aktivira mikroglija stanice i astrocite, što dovodi do stvaranja dodatnih količina ROS-a te je to glavni uzrok nastanka kroničnog oksidacijskog stresa pri čemu upala i oksidacijski stres zajedno dovode do stvaranja peptida amiloida- $\beta$  (27). Temeljem navedenog, povećane količine teških metala i produljeno izlaganje inhalacijskim anestetima u konačnici dovode do neurotoksičnosti, koja dovodi do genomske nestabilnosti i stanične smrti neurona te je uzrokovana na više načina: (a) inhibicijom popravničkih enzima DNA; (b) povećanjem proizvodnje ROS-a, najvažniji ROS elementi koji djeluju u neurodegeneraciji su superoksidni anionski radikal ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) i visoko reaktivni hidroksilni radikal ( $\cdot\text{OH}$ ); (c) smanjenjem aktivnosti antioksidacijskih enzima; (d) mijenjajući NF- $\kappa\text{B}$  (engl. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), p53 i JNK (engl. *c-Jun N-terminal kinase*) put; (e) vezanjem na DNA (28).

Višestruka uloga teških metala i djelovanje inhalacijskih anestetika može pružiti noviji pristup u liječenju neurodegenerativnih bolesti povezanih s oksidacijskim stresom. Međutim, još uvijek nije u potpunosti istražen njihov utjecaj na razvoj AD što je zadaća ovoga rada.

## 1.1. Početna hipoteza rada

Nazočnost teških metala i dugotrajno izlaganje inhalacijskim anestheticima vodi ubrzanom razvoju strukturnih i funkcionalnih neurodegenerativnih promjena i razvoju Alzheimerove bolesti kroz povećanje OS, upale te narušavanje makrofagne polarizacije i hepcidin-feroportin osi.

## 1.2. Glavni ciljevi rada

Cilj rada je istražiti moguću povezanost nazočnosti teških metala i inhalacijskih anestetika u nastanku AD. Cilj rada jest istražiti prooksidativnu, upalnu i neurotoksičnu ulogu teških metala u organizmu te spoznati da li OS i upala prouzročena nazočnošću teških metala u prisustvu inhalacijskih anestetika vode do narušavanja neurona i neurodegeneracije te posljedično razvoja AD. Točnije, spoznati važnost povezanosti inhalacijskih anestetika korištenih u svakodnevnom liječenju i teških metala prisutnih u organizmu sa razvojem neurodegenerativnih promjena.

### **Specifični ciljevi rada jesu:**

1. Istražiti razinu oksidacijskog stresa i upale kratkotrajnom i dugotrajnom primjenom inhalacijskih anestetika samih i/ili združenih sa aluminij kloridom i/ili željezo dekstranom
2. Spoznati mogu li različiti anestetici mijenjati metabolizam stanica s obzirom na prijelazne metale kao inicijatore nastanka ROS-a i upale.
3. Istražiti poveznicu između razine OS i upale s nakupljanjem Al i Fe u moždanim stanicama.
4. Istražiti promjene u regulaciji hepcidina, feritina s neuroedemom, aktivacijom gljiva stanica i neurodegenerativnim značajkama mozga, posebice akumulacijom peptida amiloida- $\beta$  i Tau proteina te promjenama u razini acetilkolinesteraze (AChE) i moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF-a) u tkivu mozga.
5. Istražiti polarizaciju makrofaga kao heterogenu staničnu populaciju, njihovu prilagodbu i reagiranje na različite podražaje nastale narušenom homeostazom metala, hepcidin-feroportin osi, neuroupalom i povećanom propusnošću moždane barijere.

## **2. LITERATURNI PREGLED**

## 2.1. Inhalacijski anestetici

Anesteziologija je grana kliničke medicine koja proučava i istražuje postupke kojima se izaziva anestezija (*an*=bez, *aisthesis*=osjet grč.). Anestezija je naziv za stanje neosjetljivosti, ali i za postupak izazivanja neosjetljivosti. Opća anestezija je stanje izazvano reverzibilnom depresijom živčanih stanica te uključuje gubitak svijesti, svih bolnih osjeta, gašenja obrambenih refleksa, često i relaksaciju skeletnih mišića. Nabrojani učinci mogu se izazvati jednim anestetikom, ali se najčešće izazivaju kombinacijom više različitih vrsta anestetika: hipnotikom, analgetikom i relaksansom (29, 30). Opći anestetici mogu se primjenjivati inhalacijski, pa tako u krv ulaze na način da ih pacijent udiše preko pluća, ili intravenski gdje se u krv apliciraju direktno preko vene. Inhalacijski anestetici su najčešće primjenjivani lijekovi u općoj anesteziji (31). Osim za održavanje pacijenta u besvjesnom stanju, koriste se i tijekom uvoda u opću anesteziju, ponajviše tijekom anesteziranja pacijenata dječje dobi. Dodavanje određene inspiracijske koncentracije inhalacijskog anestetika udahnutom kisiku ubrzo rezultira besvjesnim stanjem i amnezijom. Anestezija se postiže izjednačavanjem parcijalnih tlakova inhalacijskog anestetika u alveolama, krvi i mozgu. Slabo se metaboliziraju i većinom se eliminiraju gotovo nepromijenjeni preko pluća (32, 33). Inhalacijski anestetici danas se često primjenjuju zbog jednostavnosti svoje uporabe i doziranja te brze eliminacije iz organizma što dovodi do brzog buđenja iz anestezije. Put primjene preko pluća njihova je najveća prednost jer je u svakom trenutku moguće direktno odrediti koncentraciju anestetika u organizmu, odnosno koliko operativni zahvat to zahtjeva, produbiti ili smanjiti stupanj anestezije (34). Udahnuti inhalacijski anestetik jednom ušavši u krvotok najbrže dolazi do najprokrvljenijih organa sa najvećim protokom krvi. U organima difundira u tkivo prema gradijentu parcijalnih tlakova. Obzirom na visoki protok krvi i tkivnu topljivost, središnji živčani sustav mjesto je gdje inhalacijski anestetik vrlo brzo difundira iz krvi u stanice. Dubina anestezije određuje se vrijednošću minimalne alveolarne koncentracije (MAK-a) koja određuje alveolarnu koncentraciju inhalacijskog anestetika pri jednoj atmosferi, a koja sprječava motorički odgovor na kirurški podražaj u 50% bolesnika. Od inhalacijskih anestetika samo su dušikov oksidul i ksenon pravi plinovi, dok su ostali inhalacijski anestetici poput najčešće primjenjivanih isoflurana, sevofluran i desflurana, pare hlapljivih tekućina (35). Najčešće korišteni inhalacijski anestetici su sevofluran i isofluran (po sastavu halogenirani eteri) koji uz besvjesno stanje imaju i analgetski učinak. Oni su pare hlapljivih tekućina, neionizirani, male molekulske mase i liposolubilni pri čemu brzo difundiraju u tkiva i uzrokuju brz uvod u anesteziju i brzo buđenje

(36, 37). Precizan mehanizam djelovanja inhalacijskih anestetika do danas nije u potpunosti razjašnjen. Međutim, vjeruje se da svoje učinke ostvaruju modulacijom aktivnosti neurotransmitera u središnjem živčanom sustavu. Ključni mehanizmi uključuju: (a) povećavanje inhibitorne aktivnosti postsinaptičkog kanala  $\alpha$ -podjedinice  $\gamma$ -aminomaslačne kiseline (GABA) i receptora glicina u moždanom tkivu što smanjuje neuronski i sinaptički prijenos te se vjeruje da inhalacijski anestetici djelujući na GABAnergičke receptore produljuju protok kloridnih iona posredovanu GABAom što dovodi do hiperpolariziranja stanične membrane i inhibiranja postsinaptičke neuronske ekscitabilnosti; (b) inhibicija aktivnosti N-metil-D-aspartat (NMDA) receptora, koji su uključeni u ekscitatornu neurotransmisiju pri čemu sevofluran utječe na postsinaptički neuron, dok izofluran na presinaptički neuron snižavajući količinu oslobođenog glutamata; (c) modulaciju ionskih kanala: uključujući kalijeve i kalcijeve kanale, utječući na potencijal neuronske membrane i otpuštanje neurotransmitera pri čemu su kanali prisutni pre- i postsinaptički u središnjem živčanom sustavu sisavaca, a njihove dvije glavne karakteristike su neovisnost o naponu s odsutnom kinetikom aktivacije i deaktivacije. Zaključno, inhalacijski anestetici svojom aktivnošću hiperpolariziraju plazmu membrane što dovodi do smanjenog stvaranja akcijskog potencijala u neuronima te svojim kombiniranim učinkom smanjuju neuronski i sinaptički prijenos (38, 39, 40). Također, inhalacijski anestetici učinak postižu djelujući u sinapsama inhibirajući ekscitatornu aktivnost presinaptičkih kanala djelovanjem na neuronske nikotinske, serotonergičke i glutamergičke receptore. Također, promjena funkcije centralnog živčanog sustava (uključujući stvaranje memorije) i blokada kontrakcije mišića može se postići djelovanjem na nikotinski acetilkolin receptor i vezanjem na  $\alpha 4\beta 2$  i  $\alpha 3\beta 4$  podjedinice receptora acetilkolina (41). Nadalje, osim za N-metil-D-aspartat (NMDA) receptore i ionske kanale, otkriveni su i drugi ciljni proteini za inhalacijske anestetike uključujući muskarinske acetilkolin receptore, opioidne receptore,  $\alpha 2$ -adrenergičke receptore i 5-hidroksitriptofan (HT)2A receptore (15, 42). Poseban učinak inhalacijskih anestetika postiže dušikov oksidul ( $N_2O$ ), tzv. rajski plin ili plin smješakavac. On je bezbojan plin slatkastog mirisa koji djeluje opojno i razmjerno je inertan plin na sobnoj temperaturi (43). Njegovi učinci na organske sustave su raznoliki pri čemu u respiratornom sustavu povećava frekvenciju disanja i smanjuje volumen udisaja s minimalnom promjenom minutne ventilacije i parcijalnog tlaka ugljičnog dioksida, također deprimira respiracijski odgovor na hipoksiju te povećava protok i volumen krvi u mozgu što povećava intrakranijalni tlak, a time ujedno povećava i metaboličke potrebe za kisikom (44). Specifično djelovanje postiže interakcijom s drugim inhalacijskim anestheticima, poput sevoflurana i isoflurana, pri čemu se pojačava njihov učinak i smanjuje MAK, što je ujedno dokaz mogućeg združenog djelovanja dva različita inhalacijska anestetika



istovremeno kako bi uz manje koncentracije svakog pojedinog inhalacijskog anestetika postigli brži i bolji učinak te manje štetili organizmu tijekom opće anestezije (45). Inhalacijski anestetici slabo se metaboliziraju i najvećim dijelom se eliminiraju iz organizma putem pluća u gotovo nepromijenjenom obliku. Manji dio inhalacijskog anestetika eliminira se biotransformacijom u jetri posredovanom enzimom CYP2E1 iz obitelji citokroma i izlučuje putem bubrega, istraživanja su pokazala da se 2% sevoflurana i manje od 1% izoflurana metabolizira pomoću citokromske skupine enzima (46, 47).

### **2.1.1. Sevofluran**

Sevofluran je potpuno fluorinirani metil-izopropilni eter jedva osjetljivog slatkastog mirisa koji ne iritira dišne puteve te je ujedno i snažni bronhodilatator. On je male molekularne mase, neioniziran i liposolubiln. Njegov visoki tlak pare omogućuje jednostavno isparavanje, što ga čini pogodnim za inhalacijsku anesteziju. Obzirom na navedena svojstva može se koristiti kao alternativa intravenskim anestheticima tijekom uvoda u anesteziju (36, 37). Prema jakosti je dvostruko slabiji od izoflurana, koji za razliku od sevoflurana ima visok stupanj nadražljivosti za dišne puteve pa se rijetko koristi u indukcijskoj fazi anestezije. Koeficijent topljivosti u krvi mu je niži od izoflurana i iznosi 0,65, pa se prema tome i lakše eliminira iz mozga (34, 48). Sevofluran se kao i ostali inhalacijski anestetici većinom iz organizma eliminira putem pluća u gotovo nepromijenjenom obliku, jedan manji dio se metabolizira. Za razliku od drugih inhalacijskih anestetika ne metabolizira se do trifluoracetata nego do acil-halida. Metabolizam sevoflurana rezultira stvaranjem veće razine fluoridnih iona u serumu od ostalih inhalacijskih anestetika. Unatoč tim podacima, klinički znakovi nefrotoksičnosti pojavljuju se vrlo rijetko, čak ni kada se sevofluran primjenjuje tijekom duljeg razdoblja. Sevofluran se u prisutnosti apsorbera za ugljikov dioksid razgrađuje i stvara vinil-halid nazvan „spojem A“ koji je, ovisno o dozi, nefrotoksičan kod štakora (49). U posljednje vrijeme, obzirom na moguće negativne učinke sevoflurana i napredak u načinu korištenja, doveo je do razvoja strategija za optimizaciju uporabe sevoflurana. To uključuje: (a) anesteziju s niskim protokom: moderni aparati za mehaničku ventilaciju opremljeni su mehanizmima koji podržavaju korištenje anestezije s niskim protokom te smanjuju potrošnju sevoflurana i minimiziraju utjecaj na okoliš uz održavanje sigurnosti pacijenata; (b) potpuna intravenozna anestezija (TIVA) koristi intravenske lijekove umjesto inhalacijskih sredstava poput sevoflurana potencijalno smanjujući rizik od nuspojava povezanih s inhalacijskim anestheticima; (c) farmakokinetički modeli i računalno potpomognuti sustavi isporuke pomažu anesteziolozima da prilagode davanje

sevoflurana individualnim potrebama pacijenata, optimizirajući dubinu anestezije i minimizirajući nuspojave (50, 51). Nadalje, smatra se da sevofluran ima antioksidativna i protuupalna svojstva u plućnom i srčanom tkivu, ali ne i moždanom. Istraživanja su pokazala da u starijih bolesnika sevofluran može izazvati postoperativni delirij (POD), koji može dovesti do POCD-a. Postoperativni delirij karakteriziran je agitacijom ili akutnim poremećajem pažnje u bolesnika koji nisu prethodno imali kognitivne poremećaje (52). Također, istraživanja na pedijatrijskim pacijentima pokazuju ili neutralne ili negativne učinke na postoperativnu kogniciju, ove se promjene češće javljaju kod djece mlađe od četiri godine. Postoperativni delirij kod djece nakon anestezije sevofluranom se ne prevodi u dulje negativne promjene ponašanja (53). Nadalje, postoje značajna oštećenja prostornog pamćenja kod odraslih štakora ako su kao mladunci bili izloženi anesteziji sevofluranom. Posebna ranjivost ističe se kod mozga mladih štakora, ona ovisi o intervalu između dva izlaganja sevofluranu, što je kraći interval između dva izlaganja, veća je razina oštećenja mozga (54, 55).

### **2.1.2. Izofluran**

Izofluran (1-kloro-2,2,2-trifluoroetil difluorometil eter) je hlapljivi inhalacijski anestetik, koji je desetljećima igrao ključnu ulogu u modernoj medicini. Izofluran nije zapaljiv i ima visok tlak pare, što omogućuje brzu pretvorbu iz tekućine u paru za inhalacijsku anesteziju. Svakodnevno se koristi većinom za održavanje opće anestezije tijekom kirurških zahvata i medicinskih intervencija. Ne koristi se tijekom indukcije za anesteziju, za razliku od sevoflurana, jer njegov oštar miris ograničava njegovu upotrebu na takav način (56). Međutim, zbog svojeg slabijeg djelovanja na promjenu intrakranijalnog tlaka i brzinu moždanog protoka pogodan je za neurokiruršku anesteziju, kao i za operacije jetrenih bolesnika zbog očuvanja postojećeg protoka krvi kroz portalnu venu (57). Njegovi mehanizmi djelovanja, slično kao i kod djelovanja sevoflurana, uključuju modulaciju aktivnosti neurotransmitera u središnjem živčanom sustavu, što ga čini vrlo učinkovitim anestetikom. Smatra se da izofluran, kao i sevofluran ima antioksidativna i protuupalna svojstva u plućnom i srčanom tkivu, ali ne i moždanom. Međutim, još nije dokazana veza između kliničke izloženosti izofluranu i smanjenja kognitivnih sposobnosti kod ljudi dok je kod miševa dokazano uzrokovanje smanjenja kognitivne sposobnosti (58). Postoje *in vitro* dokazi da izofluran djeluje na povećano stvaranje peptida amiloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) u stanicama izvan moždanog tkiva. Istraživanja navode da izofluran povećava aktivnost beta-sekretaze (BACE), enzima koji cijepanjem amiloid prekursor proteina (engl. *amyloid precursor protein*, APP) sudjeluje u nastanku peptida amiloid- $\beta$ , i

izaziva A $\beta$  ovisnu apoptozu živčanih stanica prekomjernom ekspresijom APP-a (59, 60). Nadalje, postoji razlika u pojavi oksidacije, upale i oštećenja DNA, odnosno oštećenja moždanog tkiva, s obzirom na vrstu zahvata i duljinu trajanja anestezije inhalacijskim anestheticima (61, 62). Također, iako ima citogenetičko i antiproliferativno djelovanje na zdrave i tumorske stanice, ima sposobnost uzrokovanja velikih oštećenja DNA na perifernim leukocitima te potencijal genotoksičnih učinaka na stanicama jetre i mozga (63). Isto tako, citotoksičnost izoflurana ovisna je o dozi, pri niskim dozama ima neuroprotektivni učinak, dok pri visokim dozama dolazi do neurotoksičnosti (64). Njegov neuroprotektivni učinak može se iskoristiti koristeći ga tijekom prekondicioniranja (engl. *preconditioning*) pri čemu se primjenom manjih koncentracija inhalacijskog anestetika, prije ili prilikom same ishemije, smanjuje moždani metabolizam i stabilizira peri-ishemijski regionalni cerebralni protok krvi te se na taj način povećava razina kisika i dostupne energije u mozgu (65). Osim neuroprotektivnog učinka, postoji i kardioprotektivni učinak gdje se djelovanjem inhalacijskih anestetika srce štiti od ishemijsko-reperfuzijskih oštećenja (66). Izofluran rijetko dovodi do hepatitisa i oštećenja funkcije bubrega zbog prisutnosti anorganskih florida, dok se metabolizmom sevoflurana stvaraju heksafluoroizopropanol (HFIP) i anorganski floriidi koji ne izazivaju oštećenja stanica jetre i bubrega (67, 68), ali njihova povišena koncentracija može dovesti do depresije centralnog živčanog sustava u miševa *in vivo* te prouzročiti citotoksičnost stanica jetre *in vitro* (69, 70). Štetnost inhalacijskih anestetika i učestalo izlaganje izofluranu može dovesti do remećenja lanca elektrona i prekomjerne produkcije reaktivnih kisikovih vrsta deregulacijom podjedinica NMDA receptora i prekomjernim nakupljanjem kalcija (71, 72).

## 2.2. Izloženost teškim metalima

Teški metali su skupina prirodnih elemenata koji imaju posebna svojstva, uključujući visoku atomsku težinu i gustoću (često veću od  $5 \text{ g/cm}^3$ ). Dok su neki teški metali ključni elementi u tragovima za ljudsko zdravlje, poput željeza, bakra i cinka, drugi, uključujući olovo, živu, kadmij i arsen, otrovni su za žive organizme, uključujući ljude te nemaju učinak u funkcioniranju organizma (73). Homeostaza teških metala u ljudskom tijelu visoko je reguliran proces koji uključuje kontrolu unosa, raspodjelu, skladištenja i eliminacije teških metala kako bi se njihove koncentracije održale unutar sigurnih granica. Ova homeostatska regulacija je kritična jer su teški metali, kao što su bakar, željezo i cink, bitni mikronutrijenti u niskim koncentracijama, ali mogu biti toksični kada su prisutni u većim koncentracijama (74). Prisutnost teških metala postao je globalni problem zbog svoje raširene prisutnosti u okolišu i potencijala nanašanja štete ekosustavima i ljudskom zdravlju (73, 75). Industrijski procesi, većinom zemalja u razvoju, značajni su izvori onečišćenja teškim metalima. Rudarstvo, taljenje, proizvodnja i uporaba teških metala u raznim proizvodima pridonose onečišćenju okoliša (76). Nadalje, u poljoprivredi se koriste gnojiva koja sadrže teške metale, pesticide i vodu za navodnjavanje što može dovesti do kontaminacije tla i usjeva teškim metalima. Također, nepravilno zbrinjavanje elektroničkog otpada, baterija i drugih potrošačkih proizvoda koji sadrže teške metale može rezultirati onečišćenjem tla i vode (77). Isto tako, procesi izgaranja, poput onih u elektranama i motorima vozila, oslobađaju teške metale u zrak, koji se potom mogu taložiti u tlo i vodu. U posljednje vrijeme sve veća urbanizirana područja često imaju višu razinu onečišćenja teškim metalima zbog emisija iz vozila, industrijskih aktivnosti i upotrebe građevinskih materijala na bazi teških metala (73, 78).

### 2.2.1. Homeostaza teških metala u ljudskom organizmu

Primarni izvor esencijalnih teških metala u ljudskom organizmu je prehrana. Namirnice poput mesa, plodova mora, žitarica i povrća sadrže različite teške metale u tragovima. Ti se metali apsorbiraju kroz gastrointestinalni sustav. Specijalizirani prijenosni proteini i receptori reguliraju apsorpciju esencijalnih teških metala. Na primjer, prijenosnik dvovalentnih metala 1 (DMT1) odgovoran je za apsorpciju željeza i drugih dvovalentnih metala u crijevima te je brzina apsorpcije željeza iz duodenuma većim dijelom regulirana ekspresijom ovog prijenosnika koja se povećava tijekom nedostatka željeza i smanjuje preopterećenjem željeza (79). Nadalje, postoji kompeticija za apsorpciju između različitih teških metala. Visoke koncentracije jednog metala mogu spriječiti apsorpciju drugog, primjerice višak željeza u prehrani može smanjiti apsorpciju bakra i cinka (80). Homeostaza teških metala u ljudskom tijelu je visoko reguliran proces koji uključuje pažljivu kontrolu unosa, raspodjele, skladištenja i eliminacije teških metala. Ova je regulacija ključna za održavanje ravnoteže između esencijalnih mikronutrijenata i potencijalno toksičnih elemenata. Nadalje, genetski, okolišni, prehrambeni i dobni čimbenici igraju ulogu u određivanju homeostaze teških metala. Regulacija teških metala u organizmu odvija se putem mehanizama povratne sprege. Kada su razine određenog metala preniske, mehanizmi apsorpcije i prijenosa se reguliraju kako bi se povećao unos. Nasuprot tome, kada su razine previsoke, regulatorni mehanizmi smanjuju unos i povećavaju skladištenje (81, 82). Također postoji i hormonska kontrola pri čemu hormoni igraju ulogu u homeostazi teških metala. Na primjer, hepcidin je hormon koji regulira razinu željeza kontrolirajući otpuštanje željeza iz skladišnih mjesta i njegovu apsorpciju u crijevima (83). Eliminacija se najčešće odvija putem bubrega i žuči. Bubrezi igraju ključnu ulogu u uklanjanju viška teških metala iz tijela. Teški metali se filtriraju u glomerulima i mogu se izlučiti urinom. Neki teški metali, poput kadmija i olova, posebno se izlučuju ovim putem. Bakar se, na primjer, izlučuje u žuč i eliminira kroz izmet. Ovo je važan mehanizam za eliminaciju bakra. Individualne genetske varijacije mogu utjecati na homeostazu teških metala (84). Mutacije ili genetski polimorfizmi u genima koji kodiraju prijenosnike metala ili regulatorne proteine mogu dovesti do stanja preopterećenja ili nedostatka metala. Na primjer, Wilsonova bolest je genetski poremećaj koji rezultira oštećenim prijenosom bakra i dovodi do nakupljanja bakra u jetri i drugim tkivima (85). Homeostaza teških metala može varirati s godinama. Djeca i dojenčad su osjetljiviji na toksičnost teškim metalima jer njihovi regulacijski mehanizmi nisu u potpunosti razvijeni i skloni su oralnom istraživanju okoline, što potencijalno dovodi do povećane izloženosti (86). Isto tako, ukupni prehrambeni status pojedinca može utjecati na homeostazu

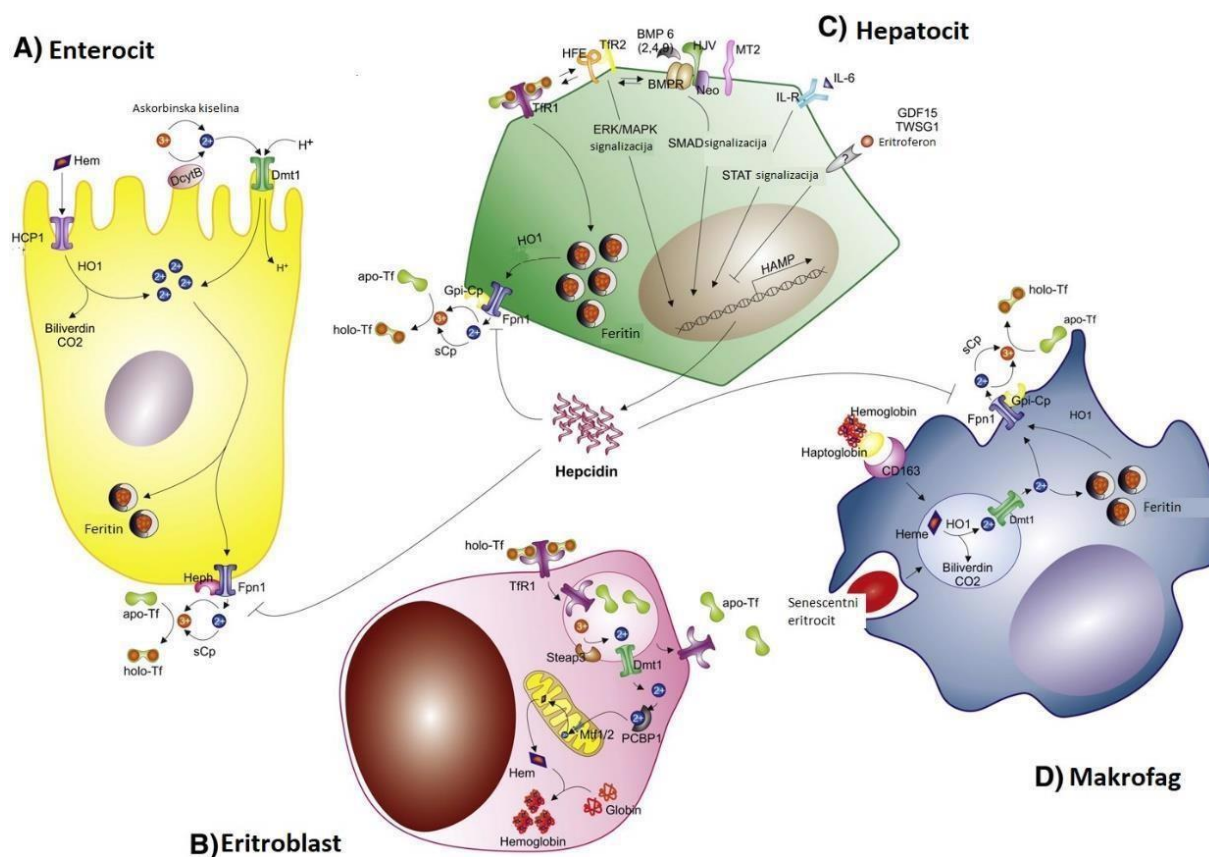
teških metala. Odgovarajući unos esencijalnih hranjivih tvari poput vitamina i minerala neophodan je za pravilan rad prijenosnika metala i regulatornih proteina. Određena medicinska stanja, poput hemokromatoze (pretjerana apsorpcija željeza) ili talasemije (preopterećenje željezom), mogu poremetiti homeostazu teških metala i dovesti do njihove neravnoteže u organizmu (87, 88, 89).

### **2.2.2. Željezo – esencijalni teški metal**

Željezo je temeljni element koji ima ključnu ulogu u okolišu i ljudskom tijelu. Njegova prisutnost i dinamika bitni su za održavanje života i osiguravanje ispravnog funkcioniranja različitih bioloških procesa. U okolišu željezo postoji u različitim oblicima i služi kao esencijalni mikronutrijent za brojne organizme. To je jedan od najzastupljenijih elemenata na Zemlji, prisutan u stijenama, tlu i vodenim tijelima. Njegova prisutnost sastavni je dio biogeokemijskog kruženja hranjivih tvari, pridonoseći regulaciji redoks reakcija i održavanju ekološke ravnoteže u vodenim sustavima (90). Željezo je ključna komponenta u procesu fotosinteze vodenih biljaka i algi, olakšavajući proizvodnju kisika i održavajući produktivnost ekosustava. Međutim, prekomjerna količina željeza u okolišu može dovesti do štetnih posljedica, poput poticanja štetnog cvjetanja algi i degradacije kvalitete vode, što u konačnici utječe na zdravlje vodenih organizama i cjelokupnog ekosustava (91, 92). Zadovoljavajuća zaliha željeza u organizmu iznosi 4-5 g (što predstavlja približno 38 odnosno 50 mg željeza/kg tjelesne težine za odrasle žene i muškarce). Željezo u organizmu je raspoređeno na način da je otprilike 2,5 g željeza prisutno u hemoglobinu za prijenos kisika, a još 2 g pohranjeno je u obliku feritina, uglavnom u koštanoj srži, jetri i slezeni (93). U koštanoj srži željezo se koristi za stvaranje hemoglobina. U jetri, željezo služi kao glavna rezerva željeza, a retikuloendotelne stanice u slezeni recikliraju željezo iz starih crvenih krvnih stanica. Konačno, relativno mala količina željeza (otprilike 400 mg) prisutna je u staničnim proteinima kao što su mioglobin i citokromi, a još manje (otprilike 3-4 mg) je u cirkulaciji vezano za transferin (94, 95). U ljudskom tijelu, željezo služi kao bitna komponenta proteina i enzima te kao ključan element za razvoj sisavaca i mikroorganizama ima važnu ulogu u vitalnim fiziološkim funkcijama. Hemoglobin, protein prisutan u crvenim krvnim stanicama, omogućuje prijenos kisika iz pluća do različitih tkiva i organa te se u njegovom sastavnom dijelu, hemu, nalazi 65% željeza (96). U sastavu mioglobina, koji se nalazi u mišićnim stanicama, nalazi se 10% željeza, te se u njemu skladišti kisik olakšavajući njegovo oslobađanje tijekom razdoblja povećane potražnje (97, 98). Željezo je također ključna komponenta enzima uključenih u stanično disanje, sintezu DNA i

druge bitne metaboličke procese poput sinteze steroida, metaboliziranja lijekova, proizvodnje ATP-a i prijenosa elektrona (99, 100, 101, 102). U CŽS-u djeluje kao kofaktor u sintezi neurotransmitera dopamina i serotonina te ga stanice poput oligodendrocita koriste za mijelogenezu i održavanje mijelina (98). Nadalje, željezo doprinosi pravilnom funkcioniranju imunskog sustava, igrajući vitalnu ulogu u razvoju i odgovoru imunskih stanica (103). Međutim, neravnoteža u razini željeza može dovesti do nepovoljnih zdravstvenih ishoda, poput anemije zbog nedostatka željeza ili nakupljanja željeza u različitim tkivima i organima, što dovodi do oksidacijskog stresa i oštećenja organa (104). Apsorpcija i regulacija željeza u ljudskom tijelu su strogo kontrolirani procesi, prvenstveno vođeni međudjelovanjem različitih regulatornih proteina i čimbenika. Željezo iz hrane apsorbira se u tankom crijevu, a na njegovu apsorpciju utječu zalihe željeza u tijelu, prisutnost drugih sastojaka u prehrani i fiziološki zahtjevi pojedinca. Homeostaza željeza održava se ravnotežom između apsorpcije, iskorištavanja i skladištenja, prvenstveno reguliranom peptidnim hormonom hepcidinom (Slika 1). Disregulacija homeostaze željeza može dovesti do razvoja poremećaja povezanih sa željezom, naglašavajući važnost održavanja uravnoteženog unosa željeza i praćenja razine željeza kako bi se spriječili štetni učinci na zdravlje (105). Do povećane apsorpcije željeza dolazi u stanjima poput anemije, hipoksije i neučinkovite eritropoeze te u prisutnosti nasljednih ili stečenih poremećaja kao što su talasemija i hemokromatoza (100). U kontekstu ljudskog zdravlja, i nedostatak i preopterećenje željezom mogu imati teške posljedice. Anemija uzrokovana nedostatkom željeza, prevladavajući globalni zdravstveni problem, karakterizirana je umorom, slabošću i oslabljenom kognitivnom funkcijom (106). Nedostatak željeza može značajno utjecati na kvalitetu života i produktivnost pogođenih pojedinaca, osobito u ranjivoj populaciji kao što su trudnice i mala djeca. Suprotno tome, preopterećenje željezom može biti posljedica raznih čimbenika, uključujući: (a) nasljedne, poput hemokromatoze uglavnom uzrokovane mutacijama u genu HFE i (b) stečene ili sekundarne, poput pretjerane nadoknade željeza ili čestih transfuzija krvi gdje zbog eritrocita unesenih transfuzijom i njihovog kraćeg životnog vijeka od endogenih eritrocita dolazi do eritrofagocitoze i otpuštanja željeza koje ponovno ulazi u plazmu, nadmašuje kapacitet prijenosa željeza transferinom te cirkulira kao slobodno željezo. Preopterećenje željezom može dovesti do nakupljanja željeza u tkivima i organima, uzrokujući oksidacijski stres, oštećenje stanica i disfunkciju organa, čime doprinosi razvoju stanja kao što su ciroza jetre, dijabetes i kardiovaskularne bolesti (100, 107). U ljudskom organizmu višak željeza se taloži u različitim organskim sustavima pa se tako u posttransfuzijskoj hemosiderozu inicijalno taloži u retikulodotelnom (RE) sustavu, u afričkoj hemokromatozi željezo se nalazi u retikuloendotelnim stanicama kao i u hepatocitima i,

konačno, u nasljednoj hemokromatozi željezo je pretežno pohranjeno u hepatocitima. Istraživanje na štakorskom modelu pokazalo je da se željezo u najvećoj koncentraciji taloži u jetri te manjim dijelom u retikuloendotelnom sustavu, dok u mozgu nije zabilježeno nakupljanje (108).



**Slika 1.** Regulacija metabolizma željeza (preuzeto i prilagođeno prema 101).

Održavanje homeostaze željeza je složen proces koji obuhvaća regulaciju (A) željeza u enterocitima duodenuma, (B) korištenje u eritroblastima, (C) skladištenje u hepatocitima i (D) recikliranje u makrofazima u slezeni. Nakon što se reducira uz askorbinsku kiselinu i duodenalni citokrom b (engl. *duodenal cytochrome b*, DCYTB) na apikalnoj membrani enterocita, željezo se apsorbira uz dvovalentni metalni transporter 1 (engl. *divalent metal transporter 1*, DMT1) i prenosi se do bazolateralne membrane gdje izlazi iz stanica uz pomoć feroportina u cirkulaciju gdje se veže na transferin (holo-Tf). Eritrociti, stanice koje zahtijevaju najveću količinu željeza, vežu holo-Tf uz receptor transferina TfR1. Nakon endocitoze, željezo se koristi u mitohondrijima u sintezi hema, koji će biti ugrađen u hemoglobin. Ukoliko organizam apsorbira više željeza nego što je potrebno, skladišti se u feritinu, najviše u hepatocitima. Najveći izvor željeza su makrofazi koji fagocitiraju zastarjele eritrocite i otpuštaju željezo iz hema uz hem oksigenazu 1 (engl. *hem oxygenase 1*, HO-1). Ove procese regulira hepcidin, koji se veže na feroportin te potiče njegovu internalizaciju i degradaciju. Na taj način sprječava apsorpciju željeza i otpuštanje željeza skladištenog u hepatocitima i recikliranog u makrofazima.



### 2.2.2.1. Uloga hepcidina i feritina u homeostazi željeza

Hepcidin je peptidni hormon koji se prvenstveno sintetizira u jetri te uz feritin ima ulogu ključnog regulatora u kontroli homeostaze željeza. Interakcijom s feritinom, unutarstaničnim proteinom za skladištenje željeza koji skladišti višak željeza nakon što su ispunjene sve stanične potrebe i oslobađa ga u slučaju akutne potrebe, hepcidin igra ključnu ulogu u regulaciji apsorpcije, recikliranja i skladištenja željeza, osiguravajući da razine željeza ostanu unutar optimalnog raspona za fiziološke funkcije (109, 110). Osim u jetri, hepcidin se sintetizira u bubregu, srcu i plućima eksprimiranjem iz gena HAMP koji se nalazi na dugom kraku kromosoma 19 te nastaje prelaskom iz pre-pro-peptidnog oblika u biološki aktivni oblik hormona pomoću enzima furina (101, 111, 112). Svoje djelovanje na molekularnoj razini postiže vezanjem za funkcionalni receptor feroportin čime uzrokuje njegovu internalizaciju, ubikvitinaciju i razgradnju u lizosomima (113). Feroportin je proteinski prijenosnik koji posreduje u prijenosu željeza iz stanica te se nalazi u tkivima koja prenose željezo u plazmu: bazolateralnoj membrani duodenalnih enterocita, membrani makrofaga RES-a, hepatocita i stanicama placente. Njegovim uklanjanjem dolazi do zadržavanja željeza u stanici i smanjenog izlaska željeza iz makrofaga RES-a, hepatocita i enterocita u krvotok čime dolazi do smanjenja dostupnosti željeza u organizmu (114). Povišena razina željeza u organizmu stimulira ekspresiju gena za hepcidin, stvarajući negativnu povratnu spregu koja smanjuje apsorpciju i recikliranje željeza, čime se sprječava preopterećenje željezom. Također, ekspresiju hepcidina potiču povećana saturacija transferina i prisustvo upale. Osim svoje uloge u regulaciji apsorpcije željeza, hepcidin ima ključnu ulogu u recikliranju željeza kontrolirajući otpuštanje željeza iz makrofaga. Povišene razine hepcidina smanjuju ekspresiju feroportina na makrofagima, što dovodi do smanjenog otpuštanja željeza iz retikuloendotelnog sustava. Posljedično, ovo ograničenje dostupnosti željeza otežava eritropoezu i pridonosi razvoju anemije. Nasuprot tome, smanjene razine hepcidina pojačavaju otpuštanje željeza iz makrofaga, podržavajući eritropoetsku aktivnost i povećavajući dostupnost željeza za sintezu hemoglobina (115, 116). Nadalje, tijekom stanja povećane eritropoetske potražnje ili hipoksije, ekspresija hepcidina je potisnuta, što omogućuje pojačanu apsorpciju i oslobađanje željeza kako bi se olakšala povećana dostupnost željeza za eritropoezu. Tijekom upalnog stanja uzrokovanog infekcijom, zloćudnim bolestima ili autoimunim bolestima, upalni signali uključeni u upalni odgovor tipa II, kao što su interleukin-6 (IL-6) i interferon- $\alpha$ , aktiviraju put Janus kinaze (JAK)/pretvornika signala i aktivatora transkripcije (STAT) te dovode do povećane ekspresije hepcidina, pridonoseći razvoju anemije (105, 117, 118, 119, 120, 121). Poremećenom regulacijom

sinteze hepcidina dolazi do poremećaja metabolizma željeza. Kod osoba koje imaju nasljednu hemokromatozu, uslijed neodgovarajućeg ili neučinkovitog uklanjanja feroportina s površine stanične membrane posredovanog hepcidinom, apsorpcija željeza se nastavlja unatoč povećanoj količini željeza u organizmu (122, 123). Istraživanja su pokazala da još nekoliko molekula smanjuje ekspresiju hepcidina u jetri: epidermalni čimbenik rasta, čimbenik rasta hepatocita, TNF- $\alpha$ , estrogen i testosteron, iako njihova točna uloga u održavanju homeostaze željeza još uvijek nije razjašnjena (124). Istraživanje Kweon i sur. (125) je pokazalo da mjerenje razine hepcidina u serumu i profila željeza u bolesnika s ranim manifestacijama kognitivnog funkcionalnog gubitka može pomoći u dijagnozi AD i procjeni ozbiljnosti bolesti kada se kombinira s drugim dijagnostičkim parametrima. Nadalje, postoji veza između citokina (IL-6) i željezom (Fe) inducirane proizvodnje hepcidina uz APP-posredovanim smanjenjem bakra (Cu) u AD mozgu. Stanice jetre i neuroni proizvode željezni regulatorni peptid hepcidin koji može prijeći krvno-moždanu barijeru (BBB). U neuronima, feroportin lokaliziran na plazma membrani izvozi fero željezo ( $Fe^{2+}$ ) koje se izvan stanice oksidira pomoću amiloid prekursor proteina (APP) koji surađuje s feroportinom i koji ima aktivnost feroksidaze (126) te prenosi fero željezo ( $Fe^{3+}$ ) u transferin. Vezanje hepcidina za feroportin uzrokuje njegovu internalizaciju i lizosomsku razgradnju, sprječavajući izlazak željeza (127, 128). Na taj način razina željeza u pojedinačnim neuronima može se povećati tijekom starenja, inicirajući APP-mRNA translaciju APP-a koji reagira na željezo (129). APP putuje do plazma membrane i cijepa se sekretazama formirajući kratke peptide, od kojih peptid amiloid  $\beta$  može formirati plakove koji sadrže metalne ione (130, 132, 132).  $A\beta$ -plak koji napada mikroglija stanicu oslobađa različite citokine uključujući IL-6 i ROS, koji zajedno s ROS-om redoks-aktivnih metala povezanih s  $A\beta$ -plakom (ioni Fe) vodi oštećenju neurona. Osim hepcidina, važnu ulogu u homeostazi željeza u organizmu ima i feritin. On je u organizmu sveprisutni unutarstanični protein neophodan za skladištenje željeza. Kod ljudi feritin postoji u dva oblika: teški lanac feritina (FTH) i laki lanac feritina (FTL) te oba djeluju usklađeno (133). Ima ključnu ulogu u regulaciji razine slobodnog željeza, što je jedna od njegovih uloga u kojoj se sprječava stvaranje štetnih reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) kroz Fentonovu reakciju (134). Pojedina istraživanja su pokazala korelaciju između promijenjenih razina feritina i progresije AD gdje dolazi do abnormalnog nakupljanja feritina u mozgu bolesnika s AD-om, što ukazuje na potencijalnu vezu između disregulacije feritina i neurodegenerativnih procesa karakterističnih za bolest. Nadalje, povećane razine željeza uočene u mozgu bolesnika s AD-om povezane su s oksidacijskim stresom i neuroupalom uključenom u patogenezu AD-a. Međusobna povezanost feritina i AD patologije je višestruka. Disregulacija metabolizma željeza može dovesti do

stvaranja prekomjerne količine ROS-a, pridonoseći oksidacijskom stresu i oštećenju neurona. Nakupljanje željeza u mozgu može pospješiti agregaciju  $\beta$  amiloida i tau proteina, čije je nakupljanje odgovorno za stvaranje senilnih plakova i neurofibrilarnih čvorova, karakteristične patologije AD. Dodatno, neuroupala posredovana željezom može pogoršati neurodegeneraciju i dalje produžiti napredovanje AD. Istraživanje Ayton i sur. (135) pokazalo je povišenu razinu feritina u cerebrospinalnoj tekućini bolesnika s AD-om, što ukazuje na disregulaciju željeza u središnjem živčanom sustavu. Nadalje, posljednja istraživanja ukazuju da uz apoptozu u AD postoji i ferroptozoz kao novootkriveni oblik regulirane nekroze ovisan o peroksidaciji željeza i lipida gdje su tkiva bogata željezom poput mozga posebno sklona oštećenju ferroptozom. Jedna od patoloških posljedica stanične smrti je sterilna upala, koja dodatno narušava funkciju organa. Područje ferroptoze brzo napreduje i moglo bi pružiti ključne uvide za budući razvoj lijekova s potencijalom modificiranja bolesti kod AD (135, 136, 137).

### **2.2.3. Aluminij – neesencijalni teški metal**

Aluminij (Al) jedan je od najzastupljenijih metala na Zemlji i široko je rasprostranjen u okolišu, zbog čega je neizbježna izloženost ljudskom organizmu. Prisutan je u svakodnevnim namirnicama i artiklima kao što su hrana, voda, lijekovi, kozmetička sredstva i proizvodi široke potrošnje. Ne smatra se posebice bitnim elementom za ljudsko zdravlje i nema fiziološku ulogu u metaboličkim procesima, ali može biti otrovan za ljude i životinje kada postoji veliko opterećenje tijela metalom nakon prirodne ili neprirodne izloženosti (138, 149). Po svojstvima je srebrnobijeli, meki, savitljivi i nemagnetski metal niskog redoks potencijala koji ima mogućnost spajanja s kisikom, fluorom, silicijem, sumporom i drugim elementima (139, 140). Izloženost ljudi aluminiju prvenstveno se događa iz više izvora. Putem hrane i vode: aluminij se prirodno može naći u određenoj hrani, posebno u onoj koja raste u kiselom tlu, pri neutralnom pH precipitira zbog hidrolize i stvara aluminijev (III) hidroksid, dok mu je u lužnatim ili kiselim uvjetima topljivost povećana (141). Osim toga, može dospjeti u hranu iz posuđa za kuhanje, pribora i ambalaže koji sadrže aluminij. Voda za piće također može sadržavati tragove aluminija, osobito u regijama gdje se za obradu vode koriste koagulansi na bazi aluminija. Putem lijekova i cjepiva: farmaceutski proizvodi i cjepiva sadrže aluminij kao pomoćno sredstvo za jačanje imunskog odgovora tijela. Profesionalna izloženost: pojedinci koji rade u industrijama koje uključuju rudarenje, preradu i proizvodnju aluminija mogu biti izloženi višim razinama aluminija putem udisanja ili doticaja s kožom. Potrošački proizvodi: aluminij se naširoko koristi u raznim potrošačkim proizvodima kao što su kozmetika, antiperspiranti i

prehrambeni aditivi, koji mogu pridonijeti izloženosti ljudi. Također zbog svoje složene kemijske značajke, aluminij je metal otporan na koroziju te ima malu težinu i gustoću, visoku električnu i toplinsku vodljivost i visoku savitljivost te je vrlo pogodan za korištenje za industrijske potrebe (142, 143). Razumijevanje načina na koji se aluminij apsorbira, raspodjeljuje i metabolizira u ljudskom tijelu ključno je za razumijevanje njegovih učinaka i potencijalne toksičnosti. Primarni put kojim aluminij ulazi u organizam je gastrointestinalni sustav. Na brzinu apsorpcije utječu različiti čimbenici, uključujući kemijski oblik aluminijske soli i zdravstveno stanje pojedinca. Kiseli uvjeti u želucu mogu povećati apsorpciju aluminijske soli, dok je prehrambeni sastojci poput citrata i fosfata mogu smanjiti. Aluminij se potom može naći po cijelom tijelu, uz značajno nakupljanje u kostima, mozgu i plućnom tkivu. Iako krvno-moždana barijera može ograničiti ulazak aluminijske soli u mozak, osobe s oštećenom funkcijom moždanog tkiva mogu pokazivati povećano nakupljanje aluminijske soli u mozgu što se pokazalo nakon otkrića povećanih razina Al u moždanom tkivu pacijenata s encefalopatijom, koji su bili izloženi nakupljanju Al putem dijalize (144). Iako nema poznatu biološku funkciju u tijelu, ljudski organizam je stalno i neizbježno izložen aluminiju. Ukupno tjelesno opterećenje Al u zdravih ljudi je približno 30-50 mg/kg tjelesne težine, a normalne razine Al u serumu su približno 1-3 µg/L (145). Srednja razina Al u serumu u 44 neizložene osobe koje nisu koristile antacide iznosila je 1,6 µg/L (146), a Chen i sur. (147) izvijestili su da su vrijednosti u pacijenata na hemodijalizi deseterostruko veće od vrijednosti u neizloženih osoba. Metabolizam aluminijske soli uključuje vezanje aluminijske soli na različite molekule unutar tijela, tvoreći komplekse koji se primarno izlučuju putem bubrega. Međutim, osobe s oštećenom funkcijom bubrega mogu imati kompromitirano izlučivanje aluminijske soli, što dovodi do njegovog nakupljanja u tijelu (148). Aluminij ima veliki toksični potencijal kojim inducira brojne štetne učinke u organizmu pa tako potiče oksidacijski stres, imunosne promjene, genotoksičnost, proupalni učinak, denaturaciju ili transformaciju peptida, enzimatsku disfunkciju, metabolički poremećaj, amiloidogenezu, poremećaj membrane, dishomeostazu željeza, apoptozu, nekrozu i displaziju. Patološka stanja povezana s Al toksikozom su deskvamativna intersticijska pneumonija, plućna alveolarna proteinoza, granulomi, granulomatoza i fibroza, toksični miokarditis, tromboza i ishemijski moždani udar, granulomatozni enteritis, Crohnova bolest, upalne bolesti crijeva, anemija, AD, demencija, skleroza, autizam, makrofagni miofasciitis, osteomalacija, oligospermija i neplodnost, hepatorenalna bolest, rak dojke i ciste, pankreatitis, pankreasna nekroza i dijabetes melitus (149). Najtoksičniji spojevi aluminijske soli su Al klorid, Al hidroksid (aluminij trihidrat), Al nitrat, Al fosfat, Al sulfat (alum), Al kalij (potashalum), Al amonij sulfat (amonij alum) i Al silikat. Ti se spojevi svakodnevno koriste u rafiniranju sirove nafte i krekiranju nafte,

proizvodnji posuđa i folija za kuhanje, pergamenta papira, tiskarske boje, stakla, keramike, vatrometa, eksploziva, fotografskih svjetiljki, električnih izolatora, cementa, boja i lakova, fumiganata i pesticida, maziva, deterdženata, kozmetike, lijekova, cjepiva, kao i u obradi i pročišćavanju vode, obradi otpadnih voda i krzna, štavljenju kože, vodonepropusnosti odjeće i betona, industrijskoj filtraciji, hemodijalizi, mjerenju izloženosti zračenju, sredstvima protiv korozije te bojila (150, 151, 152, 153, 154). Nakon izloženosti aluminiju i njegovom ulasku u organizam oko 90% aluminija u krvi prenosi se vezano za transferin, protein koji prenosi i drugi teški metal - željezo, dok se ostatak Al veže za albumin i citrat u krvi (147, 155, 156). Stanični unos Al u tkivima je relativno spor i pretpostavlja se da je posredovan endocitozom i unutarstaničnim prijenosom Al vezanog na transferin (156, 157). Otprilike polovica ukupnog tjelesnog Al nalazi se u kosturu, a razine u ljudskom koštanom tkivu kreću se od 5 do 10 mg/kg (158). U štakora je nakupljanje Al nakon oralnog izlaganja bilo veće u slezeni, jetri, kostima i bubrezima nego u mozgu, mišićima, srcu ili plućima (159). Štoviše, pokazalo se da Al brzo ulazi u mozak, izvanstaničnu tekućinu i cerebrospinalnu tekućinu, s manjim koncentracijama u tim organima nego u krvi (145, 160). Status željeza je u negativnoj korelaciji s nakupljanjem Al u tkivima, a pokusi na životinjama pokazali su da nedostatak kalcija i magnezija može pridonijeti nakupljanju Al u mozgu i kostima (161). Al ion u krvotoku eliminira se prvenstveno putem bubrega (oko 95%) u urin, vjerojatno kao Al citrat (145, 157, 162). Akumulaciju Al u tkivu smanjuju citrati i fluoridi kroz bubrežno izlučivanje kada je kapacitet vezanja transferin-Al u krvi prekoračen (158). Aluminij ima hematotoksični učinak na eritroidne progenitorske stanice i eritrocite te je bio povezan sa sporim rastom i povećanom razgradnjom proteina membranskog pojasa 3 (163). Genotoksični učinak aluminija nakon *ip* injiciranja miševa smanjuje mitotski indeks i omjer P/N (polikromatski/normokromatski eritrocita) sugerirajući da Al ima mitodepresivni učinak u stanicama koštane srži (164). Anemija uzrokovana toksičnošću Al nije povezana s odgovarajućom regenerativnom aktivnošću koštane srži i retikulocitozom (165, 166). Čini se da su dodatni uzroci anemije višestruki i uključuju neispravnu proizvodnju hemoglobina zbog inhibicije enzima sinteze hema, promijenjenu strukturu i krhkost membrane eritrocita, skraćenje životnog vijeka crvenih krvnih stanica zbog eriptotičkih i onkotskih ozljeda i neadekvatnog unosa željeza (167-179). Nakon izlaganja aluminiju zabilježena su značajna smanjenja hemoglobina, hematokrita i osmotske fragilnosti eritrocita (180-183). U štakora tretiranih aluminijem, zabilježena je hemska dishomeostaza s dokazima smanjene aktivnosti dehidrataze aminolevulinske kiseline i povećane aktivnosti hem oksigenaze u jetri štakora povezane s aktivacijom JNK puta, što ukazuje na povećanje razgradnje hema (184). Istraživanjem koje su proveli Vittori i sur. (185) nisu pronašli značajne promjene u razinama

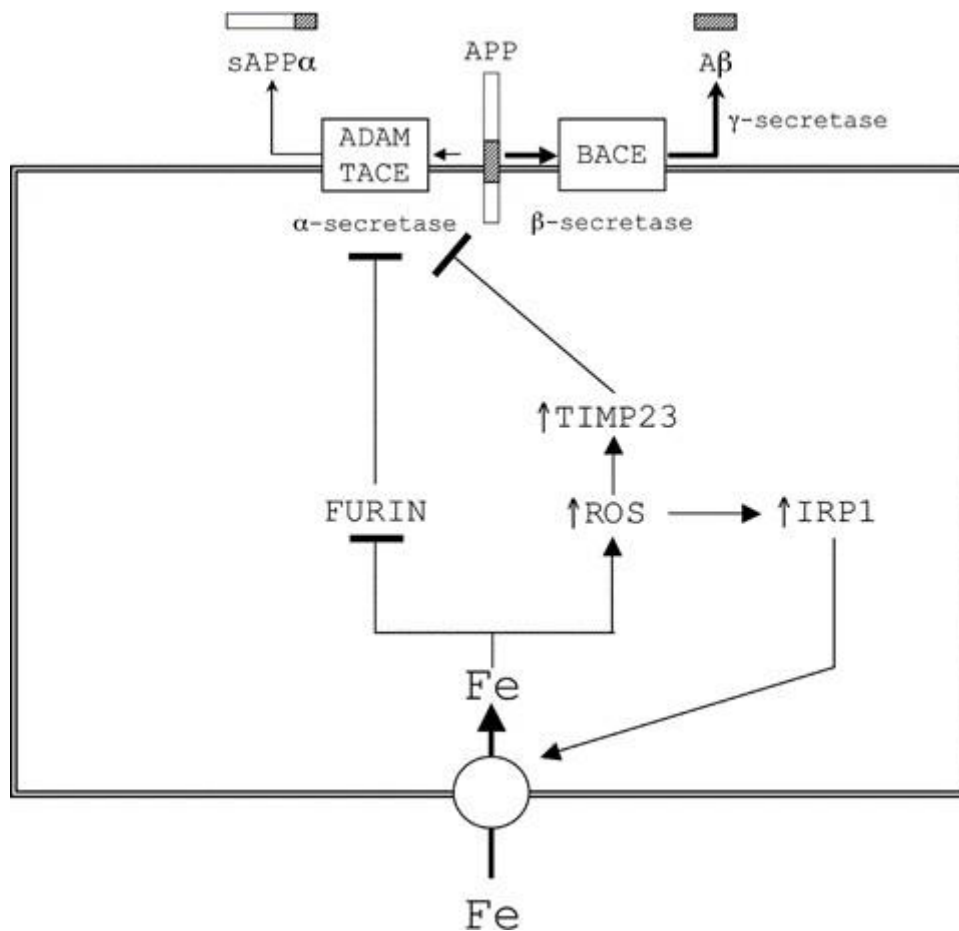
željeza u plazmi ili ukupnom kapacitetu vezanja željeza kod štakora koji su bili izloženi 230 mg Al/kg/dan u obliku Al citrata u vodi za piće tijekom 8 mjeseci; međutim, izvijestili su o oslabljenom unosu željeza i smanjenoj ugradnji željeza u hem u koštanoj srži (163). Kronična izloženost aluminiju štakorima, poremetila je homeostazu željeza. Možemo sažeti da se hematološki učinak toksikoze sastoji od anemije zbog patologije eritrocita i eritroida sa supresijom eritropoeze. Osim hematotoksičnih učinaka, unosom aluminija javljaju se i druge toksikoze. Toksikozе uzrokovane kroničnim unosom aluminija obilježene su oštećenim staničnim strukturama molekularnim mehanizmima koji uzrokuju degenerativne promjene (taloženjem lipida i amiloida), staničnu smrt apoptozom ili nekrozom i displaziju zbog genetski uvjetovanih abnormalnosti rasta stanica. Također, dolazi do propadanja stanica u živčanom tkivu, jetri i bubrezima. Apoptoza je povezana s oštećenjem imunskih stanica, eritroidnih stanica, eritrocita, osteoblasta i germinativnih stanica. Uočena je nekroza otočića gušterače, jetre, bubrega, neurona i mišića. Displazija uzrokovana kromosomskim aberacijama bila je povezana s razvojnim defektima, teratogenezom i abnormalnostima rasta fetusa i epitelnih stanica dojke. Mutageneza, stanična proliferacija i poremećena mitozna u Al toksikozi su sive zone koje zahtijevaju pojašnjenje zbog uočene suprotnosti. Sustavni učinci uzrokovani Al toksikozom su raznoliki i višestruki, ali se komorbiditeti multisustavne toksikoze rijetko bilježe u epidemiološkim skupinama. Toksično djelovanje i uključivanje višestrukih organskih sustava zapaženo je kod pojedinca i često kod eksperimentalnih životinjskih modela ali nema valjanost u opažanjima u populaciji ljudi ili životinja. Moguće djelovanje Al u patogenezi dijabetesa (lat. *dijabetes melitus*) i istodobnost neuroloških poremećaja povezanih s AD i drugim demencijama upućuju na zajedničku staničnu osnovu patogeneze i metaboličkih i kognitivnih poremećaja, koji mogu proizlaziti iz toksičnog djelovanja aluminija (186). Al- inducirani oksidacijski stres s metaboličkim defektima koji ga prate može biti srž toksikoze, do te mjere da upotreba antioksidansa čini temeljnu osnovu za terapijske intervencije. Kenodeoksikolna kiselina poboljšala je osjetljivost na inzulin kako bi se ublažio neurotoksični učinak Al (187). Budući da se nova istraživanja staničnih mehanizama u toksikozi nastavljaju dalje razjašnjavati kroz *in vitro* i *in vivo* istraživanja metalnog otrovnog sredstva, nove terapije protiv toksikoze također bi se trebale usredotočiti na ublažavanje poznatih aberacija u signalnim putovima, sintetskim i sekretornim funkcijama, staničnoj energetici i cjelovitosti membrane.

#### 2.2.4. Neurotoksičnost teških metala

Teški metali, poput aluminija i željeza, svojim neurotoksičnim djelovanjem predstavljaju značajnu prijetnju ljudskom zdravlju. Njihova sposobnost da uzrokuju poremećaj u neurotransmisiji, izazovu oksidacijski stres i potaknu neuroupalu može dovesti do širokog spektra neuroloških i neurorazvojnih poremećaja, uključujući i neurodegenerativne bolesti poput AD (188, 189). Neurotoksičnost teških metala potaknuta je na više načina. Najznačajni uzrok je oksidacijski stres; teški metali stvaraju reaktivne kisikove vrste i ometaju ravnotežu antioksidansa u tijelu pri čemu dolazi do oštećenja stanica. Bez održavanja redoks ravnoteže dolazi do kroničnog upalnog stanja pri čemu dolazi do oštećenja zahvaćenih stanica i okolnog tkiva zbog aktivacije signalnih putova, proizvodnje upalnih citokina, promijenjene ekspresije gena i drugih staničnih modifikacija (190). Jedan od bitnijih ROS elemenata je superoksidni anionski radikal ( $O_2^{\bullet-}$ ), koji se može dismutirati u vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) i visoko reaktivni hidroksilni radikal ( $OH^{\bullet}$ ) u prisutnosti određenih prijelaznih iona metala. Nadalje, ROS izaziva izravno oštećenje stanica, što dalje pokreće kaskadu radikalnih reakcija koje pospješuju sekundarno stvaranje ROS-a (191). Također, daljnje stvaranje slobodnih radikala uzrokuje lipidnu peroksidaciju, oštećenje DNA, oksidaciju sulfhidrilnih skupina proteina, depleciju i modifikaciju proteina i narušavanje homeostaze kalcija (74, 191, 192). Teški metali poput kobalta (Co), berilija (Be), nikla (Ni), željeza (Fe), bakra (Cu) i cinka (Zn) vode oksidacijskom stresu preko: (a) Fentonske reakcije u kojoj reakcijom metala i  $H_2O_2$  nastaju  $OH^{\bullet}$  radikal i oksidirani metalni ion ( $metal^{n+} + H_2O_2 \rightarrow metal^{n+1} + OH^{\bullet} + OH^-$ ) (46, 105) i (b) Haber-Weissove reakcije u kojoj je oksidirani metalni ion reduciran  $O_2^-$  i kao takav reagira sa  $H_2O_2$  pri čemu nastaju  $OH^{\bullet}$  radikali (193). Nadalje, neuroupalni učinak teških metala očituje se u aktivaciji mikroglia stanica i astrocita. Teški metali mogu pojačati ekspresiju proupalnih medijatora kao što su interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), TNF- $\alpha$  i interleukin-6 (IL-6). Navedeni medijatori pridonose neuroupali potičući novačenje imunskih stanica i aktivaciju stanica središnjeg živčanog sustava (194, 195). Također, teški metali mogu narušiti funkciju mitohondrija dovodeći do pojačane potrošnje energije i oštećenja stanica. Teški metali mogu uzrokovati oštećenje mitohondrijske DNA, koja je podložnija oksidacijskom oštećenju od nuklearne DNA. To može oslabiti sintezu proteina mitohondrija i dodatno ugroziti funkciju mitohondrija. Istraživanja su pokazala da metalni ioni stupaju u interakciju sa staničnim komponentama kao što su DNA i nuklearni proteini, uzrokujući oštećenje DNA i konformacijske promjene koje mogu dovesti do modulacije staničnog ciklusa i karcinogeneze (73, 196). Nadalje, neurotoksičnost teških metala povezuje se sa AD. Zbog svoga pozitivnog naboja  $Al^{+3}$  ima

tendenciju vezanja za metal vezujuće aminokiseline poput histidina, arginina, tirozina ili za fosforilirane aminokiseline povezujući ih međusobno čime se potiče agregacija i akumulacija jako fosforiliranih citoskeletnih proteina kao što su neurofilamenti i proteini vezani za mikrotubule (MAPs). Takva kronična izloženost Al povećava rizik od AD za otprilike 70% (197). Mehanizam nastanka promjena povezanih s AD su konformacijske promjene A $\beta$ 40 te njegova polimerizacija i akumulacija koju uzrokuje Al<sup>+3</sup> koji istovremeno inhibira njihovo razaranje. Mijenjajući homeostazu Ca<sup>2+</sup> i respiraciju mitohondrija, A $\beta$  vezan za Al dokazuje toksičniji učinak od običnih, nevezanih A $\beta$ . Također, aluminij može potaknuti nastanak konformacijskih promjena djelujući i na ostale proteine važne za nastanak AD poput APP, tau i PHF-tau (engl. *paired helical filaments-tau*) (198). Konačno, aluminij uzrokuje apoptozu neurona i glia stanica narušavajući sintezu neurotransmitera te inhibirajući Ca<sup>2+</sup> voltažne kanale i neurotransmitterske receptore pri čemu onemogućuje sinaptički prijenos rezultirajući smanjenjem kognitivnih funkcija (197). Kod ljudi, nakupljanje aluminija u mozgu i dlakama na tjemenu povezano je s neurodegenerativnim bolestima kao što su encefalopatija povezana s dijalizom, AD, Parkinsonova bolest (demencija), amiotropna lateralna skleroza, multipla skleroza i autizam (198-204). Subkronična izloženost aluminiju bila je povezana sa smanjenim brojem neuralnih matičnih stanica i otežanom staničnom proliferacijom i diferencijacijom neuroblasta u mozgu miševa (205). Transgeni miševi s prekomjerno izraženim ljudskim amiloid prekursor proteinom imali su povećane razine izoprostana u mozgu i više stvaranja i taloženja peptida amiloid- $\beta$  kada je Al dodan u njihovu prehranu, ali su učinci Al bili poništeni dodatnim prehranbenim vitaminom E (206), sugerirajući da bi Al mogao doprinijeti neurodegeneraciji pojačavanjem taloženja amiloida i pogoršanjem lezija oksidacijskim događajima (207-210). Nadalje, osim aluminija, svoj neurotoksični potencijal sa sposobnošću izazivanja promjena povezanih sa AD ima željezo. Najznačajniji način izazivanja takvih promjena je oksidacijski stres i stvaranje ROS-a (210). Također, postoje i drugi mehanizmi izazivanja neurodegenerativnih promjena. Istraživanja pokazuju da povećana akumulacija željeza potiče smanjivanje proizvodnje enzima furina. Furin, prokonvertaza i glavni procesni enzim sekretornog puta čija je proteolitička aktivnost potrebna za mnoge stanične procese, modulira procesiranje  $\alpha$ - i  $\beta$ -sekretaza (Slika 2). Kod AD, uloga furina u proizvodnji sAPP $\alpha$  dokazana je i *in vitro* (211) i *in vivo* (212). Furin pojačava aktivnost  $\alpha$ -sekretaze putem cijepanja ADAM10 i TACE/ADAM17, dvije metaloproteaze koje pokazuju aktivnost  $\alpha$ -sekretaze. Uloga furina u regulaciji proizvodnje sAPPa pojačana je dokazima da je razina mRNA furina značajno smanjena u mozgovima pacijenata s AD-om i Tg2576 transgenih miševa (212-214).



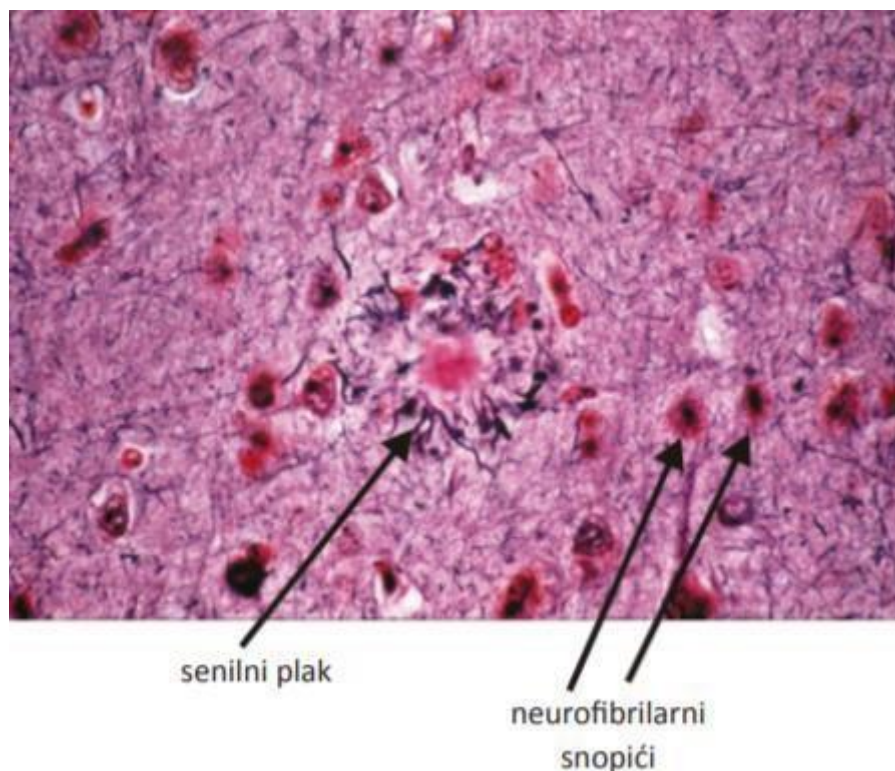


**Slika 2.** Shematski prikaz mehanizama koji dovode do „up“ regulacije peptida amiloid-β posredovanih željezom (preuzeto i prilagođeno prema 213).

Početna akumulacija željeza smanjuje furin, oštećujući procesiranje ADAM10 i TACE, dvije α-sekretaze uključene u proizvodnju sAPP-a. Budući da su aktivnosti α- i β-sekretaza čvrsto uravnotežene, zbog neposredne blizine njihovih konsenzusnih mjesta cijepanja, smanjenje aktivnosti α-sekretaze povećava proizvodnju Aβ, putem β- i γ-sekretaza. Akumulacija željeza u stanici povećava proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), što pojačava TIMP2, inhibitor α-sekretaze, i prebacuje citoplazmatsku akonitazu na IRP1, dajući pogrešan signal o nedostatku željeza i stimulirajući stanice da povećaju unos željeza. Učinci posredovani ROS-om stvaraju začarani krug, koji pojačava smanjenje aktivnosti α-sekretaze i povećava proizvodnju peptida amiloid-β (Aβ).

## 2.3. Alzheimerova bolest (AD)

Bolest je prvi opisao dr. Alois Alzheimer koji je 1906. proveo biopsiju mozga pacijentice sa simptomima demencije, dezorijentacije i naglog pogoršanja pamćenja primjetivši promijenjen cerebralni korteks i dotad nepoznate histopatološke pojave u mozgu (Slika 3), danas definirane kao senilne plakove (SP) i neurofibrilarne snopiće (engl. *neurofibrillary tangles*, NFTs) (215, 216). AD je trenutno u svijetu primarni uzrok demencije čije simptome od 2015. ima oko 46,8 milijuna ljudi diljem svijeta (217). Očekuje se da će se ovaj broj eksponencijalno povećati i dosegnuti 131,5 milijuna do 2050. ako ne bude intervencija (218,219). Obzirom da je AD više bolest starije dobi, a zabilježeno je da žene imaju duži životni vijek u usporedbi s muškarcima, žene čine oko dvije trećine starije populacije pogođene AD-om (220). AD ima izravan ekonomski teret u cijelom svijetu, a istraživanja pokazuju da su pokušaj liječenja i ostale intervencije vezane za AD-om koštale 818 milijardi dolara u 2016. (221). AD karakteriziraju gubitak pamćenja, promjene raspoloženja, problemi s pažnjom i orijentacijom te poteškoće u obavljanju svakodnevnih aktivnosti. Glavno patološko obilježje AD su agregacija izvanstaničnih amiloidnih plakova koje tvore A $\beta$  te hiperfosforilacija tau proteina pri čemu unutarstanično nastaje nakupljanje neurofibrilarnih snopića (engl. *neurofibrillary tangles*, NFT) (222). Ove promjene su u konačnici popraćene ozbiljnim oštećenjima i gubitkom neurona u regijama mozga koje su zaslužne za pamćenjem i učenje (223). AD je na staničnoj razini karakterizirana mitohondrijskom disfunkcijom, oksidacijskim stresom (224), neravnotežom metala, upalom i apoptozom (225, 226). Prema novijim prijedlozima, razvoj AD može se definirati u tri kliničke faze: (a) preasimptomatska (ili pretklinička) AD, koja može trajati nekoliko godina ili desetljeća dok prekomjerna proizvodnja i nakupljanje A $\beta$  u mozgu ne dosegne kritičnu razinu koja pokreće amiloidnu kaskadu; (b) faza AD prije demencije (kompatibilna s definicijom progresivnog, amnestičkog blagog kognitivnog oštećenja), u kojoj je prisutna patologija u ranom stadiju, u rasponu od blage neuronske distrofije do ranog stadija Braakove patologije te može trajati nekoliko godina prema individualnoj otpornosti i rezervi mozga; (c) klinički definirana faza demencije AD, u kojoj je kognitivno i funkcionalno oštećenje dovoljno ozbiljno da pređe prag demencije. U ovoj fazi postoji značajno nakupljanje neuritskih plakova i neurofibrilarnih snopića u zahvaćenim područjima mozga, što je povezano s veličinom globalnog oštećenja (227).



**Slika 3.** Prikaz patoloških lezija karakterističnih za Alzheimerovu bolest, hematoksilin-eozin (HE) bojilo, povećanje 40x (preuzeto i prilagođeno prema 310).

### 2.3.1. Patogeneza Alzheimerove bolesti

Patogeneza AD samo je djelomično poznata i kompleksna te su značajni naponi uloženi u pronalaženje lijeka ili prevencije do sada bili neuspješni. Do travnja 2019. godine bilo je registrirano 2094 kliničkih pokusa za AD, od kojih je samo nekolicina još u tijeku (svi drugi su se pokazali neuspješnima). Smatra se da u tijeku AD, abnormalna akumulacija peptida amiloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) i tau proteina u mozgu započinju najmanje 10-20 godina prije početka klinički simptoma, što ukazuje da bi intervencije dizajnirane za sprječavanje nastanka tih patoloških promjena vjerojatno bile učinkovitije od pokušaja njihovog liječenja kad su već nastale (228). Osim teorije akumulacije peptida amiloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) i tau proteina postoje i teorija oksidativnog stresa, mitohondrijske kaskade, kolinergička hipoteza i hipoteza neuroupale (229).

### 2.3.1.1. Tau hipoteza

Tau hipoteza govori u prilog hiperfosforilacije tau proteina što dovodi do pretvorbe normalnog tau u upareni spiralni filament (PHF-tau) i NFT snopić (230-236). Tek nedavno je skrenut fokus istraživanja s peptida amiloid- $\beta$  na tau protein zbog činjenice da su razna izvješća pokazala da su tau proteini među njima ključni elementi sadržani u NFT-ovima. Tau protein, član proteina povezanog s mikrotubulama, je također funkcionalni monomerni protein stanične membrane, smješten unutar citosola neurona i vrlo ključan u stabilizaciji tubulina (237). Osim toga, poznato je da tau kontrolira rast aksona i ima ulogu u njegovoj provodljivosti, čime se poboljšava normalna funkcija neurona (238). Kod ljudi se, u ne-neuronskim stanicama, tau protein nalazi samo u tragovima (239). Tau prolazi kroz posttranslacijske promjene, posebno hiperfosforilaciju, proces koji djeluje kao značajan čimbenik u utjecaju na stabilnost mikrotubula, čime dovodi do nakupljanja tau proteina u AD (238). Hiperfosforilacija tau proteina se događa putem konformacijskih promjena, koje su praćene transformacijom tau monomera u tau oligomer, što dovodi do uparenih spiralnih filamenata i NFT snopića (240-244). Postoje istraživanja koja tvrde da NFT nije upleten u izazivanje neurotoksičnosti koja dovodi do početka neurodegeneracije (245), iako je hiperfosforilirani tau koji raspadom formira oligomer (toksični oblik tau) upleten u oštećenje neurona (246). Tau, protein povezan s mikrotubulama, ima ulogu u stabilizaciji mikrotubula utječući na stabilnost tubulina bitnog za normalno funkcioniranje neurona (247, 248). Položaj tau gena, povezanog s mikrotubulama proteina tau (MAPT), esencijalan je i nalazi se na 100 kb dugog kraka ljudskog kromosoma 17 na lokusu 17q21 i ima 16 egzona (249). Tau protein pripada skupini proteina pridruženih mikrotubulima (engl. *microtubule-associated proteins*, MAPs) koji ima imaju dva zajednička obilježja: otporni su na obradu visokim temperaturama i kiselinom (ne gube funkciju). U mozgu postoji 6 izoformi tau proteina koje su sve kodirane jednim genom na kromosomu 17 i potom nastale alternativnim izrezivanjem njihove pre-mRNA. Te izoforme razlikuju se u tome da li sadrže 3 (3R) ili 4 (4R) mikrotubul vezna mjesta od 31-32 aminokiseline na karboksilnom kraju te da li sadrže jedan (1N), dva (2N) ili ni jedan (0N) umetak od 29 aminokiselina na amino kraju (250). U zdravom mozgu tau je prisutan u topljivom obliku, dok ga u osoba oboljelih od AD nalazimo u netopljivom obliku, obliku oligomera i fibrila. U mozgu oboljeloga od AD nalazi se normalni citosolni tau u jednakoj količini kao i kod zdravog mozga, ali je povećana ukupna količina tau zbog povećane količine hiperfosforiliranog tau proteina. Abnormalno fosforilirani tau je 3 do 4 puta više fosforiliran od normalnog zbog čega tvori uparene helikalne filamente i gubi sposobnost stabiliziranja aksonalnih mikrotubula. Istraživanja su pokazala da nema značajnih

promjena u ekspresiji tau proteina kod oboljelih od AD, već se smatra da ga u stanicama ima više jer se ne razgrađuje u mjeri u kojoj bi trebao. Hiperfosforilirani tau je rezistentan na kalcijem aktivirane proteaze, kalpain i ubikvitinski proteosomski put razgradnje. Kod oboljelih od AD nisu pronađene mutacije u genu za tau (251). Hiperfosforilirani tau dovodi do smanjenja količine normalnog tau proteina kao i do smanjenja druga dva važna mikrotubulima pridružena proteina MAP1 A/B i MAP2. U somatsko-dendritičkom dijelu neurona tau je povezan s hrapavim endoplazmatskim retikulumom i Golgijevim aparatom. Njegova abnormalna hiperfosforilacija i akumulacija u somatsko-dendritičkom dijelu stanice vjerojatno je odgovorna za primjećene morfološke promjene hrapavog endoplazmatskog retikuluma i Golgija te abnormalnu N-glikozilaciju tau proteina koja je zamjećena kod AD. Istraživanja na staničnoj kulturi neurona i na transgeničnim miševima su pokazala da takav tau potiče fragmentaciju Golgija. Smatra se i da kronično nakupljanje nepravilno smotanog, hiperfosforiranog tau proteina može dovesti do neurodegeneracije i zbog dugotrajnog stresa koji nastaje u endoplazmatskom retikulumu (251). Istraživanja su pokazala da postoji poveznica između senilnih plakova i NFT-a. Naime  $A\beta$  snopići potiču fosforilaciju tau proteina te dolazi do gubitka sposobnosti mikrotubularnog vezanja i somatsko-dendritične akumulacije (252).

### **2.3.1.2. Hipoteza amiloidne kaskade**

Iako je točna etiologija AD i dalje nepoznanica, hipoteza o amiloidnoj kaskadi široko je prihvaćena i najbolje je proučena od svih hipoteza (230). Na mikroskopskoj razini glavna histopatološka obilježja AD je izvanstanično nakupljanje peptida amiloid- $\beta$  ( $A\beta$ ), najprije u obliku difuznih depozita, a zatim i amiloidnih plakova (253). Nakon otkrića  $A\beta$  kao glavnog strukturnog proteina amiloidnih plakova nastala je hipoteza amiloidne kaskade. Prema toj hipotezi glavni patološki proces koji dalje pokreće sve druge patološke promjene, koje u konačnici rezultiraju neurodegeneracijom, je neravnoteža između proizvodnje i uklanjanja  $A\beta$  u mozgu (254).  $A\beta$  je protein koji nastaje cijepanjem većeg glikoproteina, amiloid prekursor proteina (engl. *amyloid precursor protein*, APP). Ovisno o mjestu cijepanja i enzimima koji ga posreduju mogu nastati produkti različite duljine. Ukoliko se APP pocijepa  $\beta$ -sekretazom i zatim  $\gamma$ -sekretazom, nastaje  $A\beta$ . Ako pak APP najprije pocijepa  $\alpha$ -sekretaza nastaje drugi produkt koji ne sudjeluje u formiranju plakova (255). Pokazalo se da  $A\beta$  protein ima različite izoforme, uglavnom u rasponu od 39 do 43 aminokiseline (256, 257). Dvije izoforme APP, APP751 i APP770, sastoje se od 56 aminokiselina u svojoj ektodomeni. Nadalje, istraživanja su pokazala da su dvije glavne izoforme  $A\beta$ 1-40 ( $A\beta$ 40) i  $A\beta$ 1-42 ( $A\beta$ 42) (257). Visoke

koncentracije netopivih A $\beta$ 42 oligomera uključene su u sinaptička oštećenja tijekom rane faze AD (258). U plakovima se najčešće može naći A $\beta$  sastavljen od 42 aminokiseline koji ima veću sklonost agregacije u nakupine. Hipotezu potkrepljuju istraživanja mutacije gena APP, gena za presenilin, PSEN1 i PSEN2, povezanih s nastankom nasljednog tipa AD. Mutacije u genu APP dovode do prekomjerne produkcije A $\beta$  pa s time i njegovog nakupljanja (256), a mutacije u genima PSEN1 i PSEN2 do nastajanja A $\beta$ 42. Točan mehanizam pokretanja daljnjih patoloških procesa je i dalje ne razjašnjen, poznato je da prisustvo plakova narušava homeostazu kalcija, povećavajući njegovu unutarstaničnu koncentraciju. Amiloidni plakovi imaju jezgru sačinjenu od fibrila amiloida koju okružuju distrofični neuriti, reaktivne mikroglia stanice i astrociti. Oprečno tome, difuzne nakupine amiloida nisu združene s distrofičnim neuritima i mikroglia stanicama, a smatra se da su one početni stadij nastajanja plakova (257). Nadalje, peptid A $\beta$  je derivat amiloid prekursor proteina (APP) intrinzičnog tipa I glikoproteina (259) koji ima široku ektodomenu. Položaj kromosoma za APP nalazi se na 21q21.2. Postoji 18 egzona u APP genu koji prelazi 170 kb, stvarajući 10 izoformi diskretno se spajajući. Ove izoforme imaju između 563 i 770 aminokiselina. APP sadrži 695 aminokiselina i jedna je od izoformi za koju je ranije objavljeno da se nalazi u neuronima središnjeg živčanog sustava (260). Izrezivanje APP uglavnom se odvija kroz  $\alpha$ - i  $\beta$ -put. U  $\alpha$ -putu (ne-amiloidni put)  $\alpha$ -sekretaza (skupina metaloproteinaznih enzima ADAM10) reže APP kod lizina 16 i nastaje topljivi oblik (engl. *soluble APP*, sAPP) N-terminalni  $\alpha$ -APP ulomak (261, 262). Nastali C-terminalni dio APP-a (engl. *C-terminal fragment*, CTF) veličine 83 aminokiseline reže  $\gamma$ -sekretaza na N kraju i nastaje peptid p3. Do povećanog lučenja  $\alpha$ -APP-a mogu dovesti i protein kinaza C-neovisni putevi kao što su kolesterolom, ApoE i stresom aktivirani putevi (255). U  $\beta$ -putu (amiloidni put)  $\beta$ -sekretaza (BACE/Asp2) reže APP na N-terminalni topljivi APP ulomak ( $\beta$ -APP) koji se otpušta i  $\beta$ CTF (engl.  *$\beta$ -C-terminal fragment of APP*) ulomak veličine 99 aminokiselina koji ostaje vezan za membranu.  $\beta$ CTF tada reže  $\gamma$ -sekretaza i nastaje A $\beta$ . Isprva se mislilo da je  $\beta$ -put abnormalni način izrezivanja APP-a, ali je kasnije dokazano da je prisutan i u zdravih ljudi (252).

### **2.3.1.3. Hipoteza mitohondrijske kaskade**

Teorija mitohondrijskih kaskada prvi put je predložena 2004. U njoj se tvrdi da je abnormalnost mitohondrija glavni razlog za A $\beta$  nakupljanje, stvaranje NFT-a i propadanje sinapsi u AD (231). Pretpostavlja se da su fiziološki mehanizmi AD i mozga koji stari slični. Temelji se na činjenici da je mitohondrijska disfunkcija kod AD sistemske etiologije te da sama nije dovoljna da direktno uzrokuje propadanje neurona (230). Istraživanja su pokazala da abnormalnost mitohondrija u mozgu osobe sa AD potiče stvaranje amiloidoa i tau fosforilaciju te je otkrivena mitohondrijska disfunkcija u mnogim AD tkivima, koja uključuju fibroblaste, trombocite, mitohondrije i mozak (204). U proces patološkog mehanizma uključena su tri neispravna mitohondrijska enzima: kompleks  $\alpha$ -ketoglutarat dehidrogenaze, piruvat dehidrogenaza i citokrom oksidaza (263). Istraživanja mozga oboljelog od AD otkrila su normalnu koncentraciju citokrom oksidaze ali s promijenjenom strukturom samog enzima (264). Pretpostavlja se da oksidacijski stres i abnormalno djelovanje proteaze pojačavaju disfunkciju mitohondrija (265). Štoviše, istraživanja koja uključuju citoplazmatske hibride (cibride) otkrila su da je mitohondrijska DNA (mtDNA) djelomično odgovorna za smanjenu citokrom oksidazu u AD (236).

### **2.3.1.4. Kolinergička hipoteza**

Najstarija među uzročnim teorijama AD je kolinergička hipoteza (266). Ova hipoteza navodi da je smanjenje neurotransmitera acetilkolina, u neuronima, odgovorno za etiologiju AD. Kolinergička hipoteza, postavljena prije 30 godina, sugerira da su za kognitivni pad zaslužni abnormalni neuroni bazalnih ganglija koji sadrže acetilkolin (267). Nadalje, acetilkolin (ACh) je neurotransmiter koji koriste kolinergički neuroni i ključan je za fiziološke procese poput učenja, pamćenja, reakcije na stres, budnosti i spavanja, kao i za prijenos osjetnih signala (268-272). Oštećenje kolinergičkih neurona smatra se važnom patološkom promjenom koja odgovara kognitivnom oštećenju vidljivom u AD što je razlog zašto je ova hipoteza prvotno testirana uporabom inhibitora kolinesteraze koji se koriste za AD liječenje. Tako je, kao rezultat istraživanja, bilo primjetno da je takrin, jedan od inhibitora kolinesteraze (osim donepezila, galantamina, rivastigmina i memantina), bio najraniji lijek protiv AD koji je ambulantno korišten, ali ipak je zbog utvđenih nuspojava povučen iz uporabe 2012. godine (273, 274). Iako je blokada kolinesteraze, prema dosadašnjem iskustvu, usmjerena palijativnom liječenju, trenutno je jedini klinički dostupan lijek koji pruža nadu pacijentima ublažavajući simptome

bolesti. Nadalje, 4 od 5 odobrenih lijekova protiv AD dostupnih na današnjem tržištu razvijeni su na temelju kolinergičke hipoteze (230). Unatoč tim činjenicama kolinergička hipoteza nije široko prihvaćena, uglavnom zbog neučinkovitosti lijeka predloženog za liječenje nedostatka acetilkolina.

### **2.3.1.5. Hipoteza oksidacijskog stresa**

Vjeruje se da je prisutnost oksidacijskog stresa kritična u patogenezi AD (275). Obzirom da mozak troši više energije i vrši više funkcija nego bilo koji drugi organ tijekom mitohondrijskog disanja, izrazito se povećava vjerojatnost izloženosti reaktivnim kisikovim vrstama (ROS) (276). Nadalje, AD je usko povezana s oksidacijskim stresom, kao i sa nitracijom i oksidacijom proteina, porastom peroksidacije lipida i glikoksidacije. Štoviše, postoje istraživanja u kojima se navodi da oksidacijski stres može uzrokovati agregaciju A $\beta$ , specifičnu za AD (277-281). ROS se održava u dinamičkoj ravnoteži staničnim procesima koji stvaraju ROS i antioksidacijskom obranom. Oksidacijski stres se odnosi na oštećenja koja nastaju kada ROS nadvlada antioksidacijske obrambene sustave. Ovaj fenomen je posljedica poremećene homeostaze, gdje dolazi do prekomjerne proizvodnje ROSa ili smanjenja antioksidacijskih obrambenih sustava (282). Mozak je posebno osjetljiv na oksidacijski stres zbog povećane proizvodnje ROS-a, skromnih mogućnosti antioksidativne obrane i ograničenog kapaciteta za regeneraciju (283). Dokazi o oksidacijskom stresu kod AD očituju se kroz visoke razine oksidiranih proteina, uznapredovalih krajnjih produkata glikacije, krajnjih produkata lipidne peroksidacije, stvaranja toksičnih spojeva, kao što su peroksidi, alkoholi, aldehidi, slobodni karbonili, ketoni i oksidativne modifikacije u DNA jezgre i mitohondrija (284-290). Važan aspekt antioksidacijskog obrambenog sustava je ekvivalent glutationa niske molekulske težine koji je odgovoran za endogeni redoks potencijal u stanici pri čemu doniranjem elektrona ROS-u smanjuje njihovu učinkovitost (291). U životinjskim modelima koncentracija unutarstaničnog glutationa (GSH) opada s godinama u različitim životinjskim modelima (292, 293). Smanjenje GSH dovodi do situacije u kojoj stopa proizvodnje ROS-a premašuje antioksidacijsku sposobnost, stvarajući situaciju koja pogoduje oksidacijskom stresu (294). Nadalje, A $\beta$  inducira lipoperoksidaciju membrana i produkte peroksidacije lipida (295). Lipide modificira ROS i postoji snažna korelacija između lipidnih peroksida, antioksidacijskih enzima, amiloidnih plakova i NFT-ova u mozgu AD (296). Nekoliko produkata razgradnje oksidacijskog stresa, uključujući 4-hidroksi-2,3-nonenal (HNE), akrolein, malondialdehid i F2-izoprostani primijećeni su u AD mozgovima što rezultira mnoštvom učinaka, uključujući

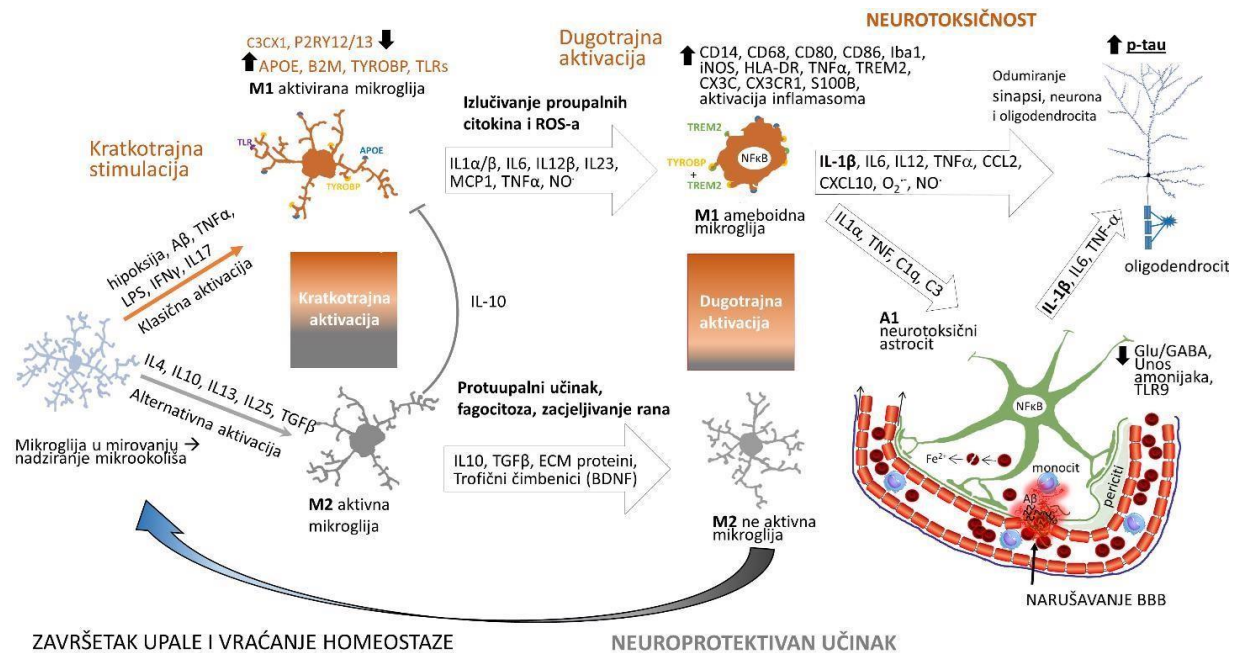


inhibiciju neurona prijenosnika glukoze i glutamata, inhibiciju Na-K ATP-aza, aktivaciju kinaza i disregulaciju unutarstanične signalizacije kalcija, što u konačnici inducira apoptotski kaskadni mehanizam (297, 298). Nadalje, baze DNA osjetljive su na oštećenja uzrokovana oksidacijskim stresom koja uključuju hidroksilaciju, karbonilaciju proteina i nitraciju. (299, 300). Uočeno je u AD da ROS u mozgu inducira priljev kalcija putem glutamatnih receptora i pokreće ekscitotoksični odgovor koji dovodi do stanične smrti. ROS nastaje kada kisik reagira s nereguliranim redoks-aktivnim metalima. Također, pronađene su povećane razine prekida DNA lanaca za koje se smatralo da su dio apoptoze, ali sada je široko prihvaćeno da je oksidacijsko oštećenje odgovorno za lomljenje lanaca DNA, a to je u skladu s povećanim slobodnim karbonilima u jezgrama neurona i glije u AD (301, 302, 303). Lezije koje postoje u mozgu pacijenata s AD obično su povezane s napadima slobodnih radikala, a pokazalo se da Al ima katalitičku aktivnost za proizvodnju slobodnih radikala te je nekoliko istraživanja pokazalo da oksidacijski stres izazvan aluminijom modificira peroksidaciju lipida i aktivnost antioksidacijskih enzima (304, 305). Konačno, oksidacijski stres usko je povezan sa nastankom neuroinflammacije kao uzročnikom neurodegeneracije povezane s AD (306).

### **2.3.1.6. Hipoteza neuroinflammacije**

Sve više dokaza sugerira da patogeneza AD nije ograničena samo na neuronski odjeljak, već uključuje jake interakcije s imunskim mehanizmima u mozgu. Agregirani proteini vežu se za receptore na mikrogliji i astrogliji i pokreću urođeni imunski odgovor karakteriziran oslobađanjem upalnih medijatora, koji pridonose progresiji i težini bolesti (Slika 4). Analiza cjelokupnog genoma sugerira da nekoliko gena koji povećavaju rizik od sporadične AD kodiraju čimbenike koji reguliraju glijalni klirens pogrešno savijenih i agregiranih proteina i upalnu reakciju (310). Vanjski čimbenici, uključujući sustavnu upalu i pretilost, vjerojatno imaju sposobnost ometanja imunskih procesa u mozgu i daljnjeg pospješivanja napredovanja bolesti. Modulacija čimbenika rizika i djelovanje na imunski mehanizme moglo bi dovesti do budućih terapijskih ili preventivnih pristupa za AD (307). Agregacija proteina i oštećenja neurona rezultiraju aktivacijom mikroglija stanica povezanih s bolešću (eng. *disease-associated microglia*, DAM) putem molekularnih uzoraka povezanih s oštećenjem (eng. *damage-associated molecular patterns*, DAMP). DAM potiču nastanak i održavanje upale i stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta. Međutim, molekularni mehanizmi koji povezuju DAM-aktivaciju i OS nisu dobro definirani; stoga usmjeravanje ovih stanica na kliničku dobrobit još uvijek nije moguće. U mikroglija stanicama, ROS nastaju prvenstveno NADPH oksidazom 2 (NOX2) te

je aktivacija NOX2 u DAM povezana s DAM signalizacijom, upalom i taloženjem amiloidnog plaka, posebno u cerebrovaskularnim strukturama. Ekspresiju antioksidacijskih proteina u mikroglia stanicama, kao što je NADPH dehidrogenaza 1 (NQO1), potiče transkripcijski čimbenik Nrf2, koji djeluje na kontrolu upale i ograničava OS (308). Snažna aktivacija izoformi NOX kao odgovor na akutnu ozljedu neurona i kroničnu upalu s oksidacijskim oštećenjem dobro je dokumentirana u tkivu nakon smrti i modelima neurodegeneracije (309).



**Slika 4.** Shematski prikaz upalnog odgovora te međuovisnosti aktivacije mikroglije i neurodegenerativnih promjena u Alzheimerovoj bolesti (preuzeto i prilagođeno prema 311).

## **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

## 3.1. Materijali

### 3.1.1. Pokusne životinje

U istraživanju su korištena oba spola visokosrodnih štakora Y59 stara 3 mjeseca uzgojena na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. Istraživanje je provedeno na ukupno 170 Y59 štakora podijeljenih u 8 skupina sa po 20 životinja obzirom na obradu zajedno sa kontrolnom skupinom od 10 životinja. Životinje su držane u standardnim uvjetima (dnevni ritam od 12 sati dana i 12 sati mraka temperatura 24 °C (±2) uz kontroliranu vlažnost zraka 60%). Štakori su hranjeni standardnom hranom za laboratorijske životinje (Standard Diet GLP, 4RF21, Mucedola, Settimo Milanese MI, Italija), uz dostupnost hrane i vode *ad libitum*. Istraživanje je provedeno sukladno etičkim načelima važećima u Republici Hrvatskoj Zakon o zaštiti životinja (NN135/06 i NN37/13) i Pravilnik o zaštiti životinja koje se koriste u pokusima ili u druge znanstvene svrhe (NN55/13), a provodi se u skladu s Uputama za njegu i korištenje laboratorijskih životinja (Guide for the Care and Use of Laboratory animals, DHHS (NIH) Publ # 86-23. Pokuse je odobrilo Etičko povjerenstvo Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu (broj odobrenja: 251-58-10617-17-22).

### 3.1.2. Ispitne komponente i kemijski spojevi

Korišteni su inhalacijski anestetici Sevofluran ( $C_4H_3F_7O$ ;  $M_r = 200,005$  g/mol) i Izofluran ( $C_3H_2ClF_5O$ ;  $M_r = 184,49$  g/mol) proizvođača Baxter, Deerfield, Illinois, SAD. Željezo dekstran ( $FeH_2O_4S$ ;  $M_r = 153,92$  g/mol; ~ 100 mg/mL) proizvođača Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, SAD i Aluminijev klorid heksahidrat ( $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ ,  $M_r = 241,45$  g/mol, čistoće  $\geq 95\%$ ) proizvođača Gram-mol d.o.o, Zagreb, Hrvatska. Nadalje, korišteni su teški metali u obliku kemijskih spojeva željezo dekstran ( $FeH_2O_4S$ ;  $M_r = 153,92$  g/mol; ~ 100 mg/mL) proizvođača Santa Cruz Biotechnology, SAD i aluminijev klorid heksahidrat ( $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ ;  $M_r = 241,45$  g/mol; čistoće  $\geq 95\%$ ) proizvođača Gram-mol d.o.o., Hrvatska sa D (+) – galaktozom za mikrobiologiju ( $C_6H_{12}O_6$ ;  $M_r = 180,16$  g/mol) proizvođača Merck, Njemačka. Otopina D-galaktoze pripremljena je u koncentraciji od 120 mM otapanjem

432,48 mg D-galaktoze u 10 mL komercijalno dostupnog fosfatnog pufera (PBS) proizvođača Lonza, Švicarska. Također, u eksperimentalnoj obradi životinja korištena je fiziološka otopina odnosno 0,9% natrijev klorid proizvođača B. Braun Adria d. o. o.

### **3.1.2.1. Priprema otopine željezo dekstrana**

Otopina željezo dekstrana pripremljena je otapanjem  $\text{FeH}_2\text{O}_4\text{S}$  u subkroničnoj dozi od 50 mg/kg životinje u pročišćenoj vodi (*aqua pro*), proizvođača B. Braun Adria d. o. o., Hrvatska.

### **3.1.2.2. Priprema otopine aluminijevog klorida heksahidrata**

Otopina aluminijevog klorida heksahidrata pripremljena je otapanjem  $\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  u subkroničnoj dozi od 50 mg/kg životinje u destiliranoj vodi. U tako pripremljenu otopinu aluminijeva klorida heksahidrata dodana je prethodno opisana otopina D-galaktoze. Otopine su pomiješane u jednakom volumenu (1:1) te je pH podešen na 7,4 (pH metar: Lab 850, Schott instruments, Njemačka) sa 1 M NaOH (Gram-mol d.o.o., Hrvatska).

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Eksperimentalni dizajn**

Ukupno 170 štakora, oba spola visokosrodnog soja Y59 starosti 3 mjeseca, podijeljeno je u 9 ispitnih skupina jednake veličine i ovisno o masi ( $\pm 10$  g) smješteno u kaveze (šest životinja po kavezu). Životinje su držane u kavezima od nehrđajućeg čelika, pod istim kontroliranim uvjetima. Štakorima je, ovisno o skupini, tijekom 7 ili 28 dana, svaki drugi dan, *ip* injicirano ili putem inhalacijske anestezije aplicirano kako slijedi: 1. zdrava, kontrolna skupina s 0,5 mL fiziološke otopine; 2. Sevofluran (2,4%); 3. Izofluran (1,3%); 4. Željezo dekstran (50 mg/kg) 5. Aluminijev klorid i D-galaktoza (50 mg/kg); 6. Željezo dekstran (50 mg/kg) i Sevofluran (2,4%); 7. Aluminij klorid (50 mg/kg) i D-galaktoza i Sevofluran (2,4%); 8. Željezo dekstran (50 mg/kg) i Izofluran (1,3%); 9. Aluminijev klorid (50 mg/kg) i D-galaktoza i Izofluran (1,3%).

Patofiziološke promjene izazvane su intraperitonealnim (*ip*) injiciranjem otopine aluminijevog klorida, u subkroničnoj dozi od 50 mg/kg štakora otopljenog u 120 mM D-

galaktoze i/ili otopinom željezo dekstrana u subkroničnoj dozi od 50 mg/kg štakora, te anesteziranjem štakora sevofluranom (2,4%) i izofluranom (1,3%) tijekom 7 dana i/ili 28 dana. Nakon 2h od injiciranja aluminijevog klorida + D-galaktoze ili Fe-dekstrana životinja su bile izložene inhalacijskim anestheticima: sevofluranu ili izofluranu tijekom 2 h. Izlaganjem dijela životinja pojedinih skupina 28. danu obrade, konačna ili ukupna doza bila je 600 mg/kg aluminij klorida ili željezo dektrana. Istraživanje je provedeno prema etičkim načelima važećima u Republici Hrvatskoj (Zakon o zaštiti životinja, NN 102/2017) i prema vodiču za držanje i korištenje laboratorijskih životinja (Guide for the Care and Use of Laboratory animals, DHHS (NIH) Publ # 86-23. Svi štakori, 24 sata nakon posljednjeg injiciranja, anestezirani su primjenom smjese ketamina (Narketan®10, Vetoquinol AG, Belp Bern, Švicarska) u dozi od 75 mg/kg s ksilazinom (Xylapana® Vetoquinol Biowet Sp., Gorzow, R Poljska) u dozi od 10 mg/kg. Nakon uzorkovanja krvi, svi štakori žrtvovani su iskrvarenjem i izolirani su organi i uzorci od interesa (mozak).

### **3.2.2. Uzorkovanje**

Tijekom izolacije i skladištenja uzoraka (serum i mozak) provedene su mjere za sprječavanje kontaminacije između obrađenih skupina (kontaminacija uzoraka željezo dekstrana, aluminijevog klorida, sevoflurana i izoflurana).

#### **3.2.2.1. Uzorkovanje krvi**

Krv je uzorkovana iz abdominalne aorte (*a. abdominalis*) sukladno smjernicama Instituta za standarde u kliničkom laboratoriju (engl. *Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI; H3A6 Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture*, 2007) i Svjetske zdravstvene organizacije (*WHO guidelines on drawing blood: best practices in phlebotomy*, 2010). Sukladno potrebama za pojedinu analizu krv je prikupljena u epruvete s aktivatorom zgrušavanja-silikon (serum) za biokemijsku, hematološku i spektrofotometrijsku analizu.

### 3.2.3. Metode za utvrđivanje patofizioloških promjena nakon apliciranih teških metala i inhalacijskih anestetika

#### 3.2.3.1. Praćenje promjene tjelesne mase pokusnih životinja

Životinje su vagane na digitalnoj vagi (Kern KB 2000-2N; d = 0,01-2000 g): (a) prvi dan eksperimenta, (b) svakih sedam dana tijekom trajanja eksperimenta i (c) na dan žrtvovanja. Prvi dan eksperimenta životinje su izvagane i na temelju tjelesne mase ( $\pm 10$  g) razvrstane u kaveze. Na temelju srednje tjelesne mase životinja po kavezu za pojedinu skupinu određena je količina pojedinačnih pripravaka, koji su primjenjivani intarperitonealno (*ip*) svaki drugi dan tijekom 7 ili 28 dana. Procjena patofizioloških promjena na nivou cijelog organizma praćena je vaganjem životinja tijekom eksperimenta i praćenjem masenih promjena. Pokazatelj promjene je gubitak tjelesne mase tijekom perioda eksperimenta. Gubitak tjelesne mase za svaku pojedinu pokusnu životinju izračunat je prema slijedećoj formuli [1]:

$$\% \text{ gubitka mase} = \frac{\text{masa prvog dana} - \text{masa tijekom ispitivanja}}{\text{masa prvog dana}} \times 100 \text{ [1].}$$

#### 3.2.3.2. Relativna težina mozga

Nakon žrtvovanja izoliran je mozak, kao ciljni organ istraživanja, te je izvagan na digitalnoj vagi Analytical balance ABS 220-4, d = 0,01-220 g, proizvođača Kern & Sohn GmbH, Njemačka. Dobivene vrijednosti mase mozga i mase životinja korištene su za izračun relativne težine organa. Relativna težina organa izračunata je prema sljedećoj formuli [2]:

$$\text{Relativni indeks mozga (g/100 g)} = \frac{\text{masa mozga}}{\text{masa tijela životinje prije žrtvovanja}} \times 100 \text{ [2].}$$

#### 3.2.3.3. Analiza biokemijskih parametara krvi

Za potrebe biokemijske analize krv je bila prikupljena u Vacutainer epruvete bez antikoagulansa. Za procjenu biokemijskih parametara, serum je bio korišten za daljnju analizu. Za analizu je korišten VetScan® kit (engl. *Comprehensive Diagnostic Profile reagent rotor*) proizvođača Abaxis, UK te su biokemijski parametri analizirani na VetScan® VS2 uređaju (Abaxis, UK). Iz 100  $\mu$ L seruma svakog uzorka, određeni su slijedeći biokemijski parametri: albumin (ALB), alkalna fosfataza (ALP), alanin aminotransferaza (ALT), amilaza (AMY), ukupni proteini (TP), globulin (GLOB), ukupni bilirubin (engl. *total bilirubin*, TBIL), dušik uree u krvi (engl. *blood urea nitrogen*, BUN), fosfor (PHOS), kreatinin CRE), glukoza, natrij i kalij.

#### **3.2.3.4. Analiza hematoloških parametara krvi**

Uzorci krvi za hematološku analizu su prikupljeni u Vacutainer epruvete s dodatkom antikoagulansa (EDTA) te pohranjeni na temperaturi od 4 °C tijekom 2 sata do određivanja hematoloških parametara. Od hematoloških parametara određivan je ukupni broj eritrocita (Erc), broj leukocita (Lkc), broj trombocita (Trc), diferencijalna krvna slika (DKS), hematokrit (Hct), hemoglobin (Hb), prosječan volumen eritrocita (MCV), prosječan sadržaj hemoglobina u eritrocitima (MCH), prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitima (MCHC) i raspodjela eritrocita po veličini (RDW). Hematološki parametri određivani su preporučenim analitičkim metodama na elektronskom brojaču Horiba ABX169 (Micros, Francuska).

#### **3.2.3.5. Osmotska otpornost eritrocita**

Metoda osmotske otpornosti eritrocita je dobar pokazatelj stupnja oštećenja stanične membrane eritrocita, sinteze enzima ili poremećaja u strukturi hemoglobina te metaboličkih poremećaja unutar eritrocita. Metoda se zasniva na različitim osmotskim otpornostima pojedinih eritrocita i činjenici kako broj stanica koje su u hemolizi ovise o hipotoničnosti izvanstaničnog medija, stoga je koncentracija oslobođenog hemoglobina u svakoj testnoj otopini pokazatelj stupnja osmotske hemolize. Pripremljena je serija epruveta s 0,9 mL 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1% i 0,0% otopine natrijeva klorida. Uzorak krvi promiješan je staklenim štapićem kako bi se dobila homogena suspenzija stanica. Pritom je ispipetirano po 0,01 mL uzorka krvi u priređene epruvete nakon čega je slijedila inkubacija u trajanju 30 minuta. Epruvete se zatim centrifugiraju (Centrifuga 5702, Eppendorf, Njemačka) 10 min na 2200 okretaja/min pri 4 °C. Nadtalog je potom izmjeren spektrofotometrijski (Libra S22, Biochrom, UK) na 540 nm, pri čemu je prva epruveta (0,9% NaCl) korištena kao slijepa proba.



### **3.2.3.6. Analiza esencijalnih i toksičnih elemenata metodom masene spektrometrije induktivno spregnute plazme (ICP-MS)**

#### *3.2.3.6.1. Uzorkovanje uzoraka za ICP-MS*

Uzorci tkiva mozga izolirani su i do analize pohranjeni u polipropilenskim epruветama sa čepom na -80 °C za analizu ICP-MS. Prilikom izolacije i pohrane uzoraka provedene su mjere za sprečavanje kontaminacije između obrađenih skupina (kontaminacija uzoraka metalima).

#### *3.2.3.6.2. Certificirani referentni materijali (CRM)*

U određivanju esencijalnih i toksičnih elemenata metodom ICP-MS, korišteni su sljedeći certificirani referentni materijali:

- DORM-4, *fish protein*, certificirani referentni materijal za metale u tragovima, NRC Nacionalni institut za standarde mjerenja (engl. *Institute for National Measurement Standards*, Ottawa, Kanada)
- DOLT-4, *dogfish liver protein*, certificirani referentni materijal za metale u tragovima, NRC Nacionalni institut za standarde mjerenja (engl. *Institute for National Measurement Standards*, Ottawa, Kanada)
- Arsen, 1000 µg/mL arsena u 2% (v/v) HNO<sub>3</sub>, Inorganic Ventures, Christiansburg, SAD
- Kadmij, 1000 µg/mL kadmija u 3% (v/v) HNO<sub>3</sub>, Inorganic Ventures, Christiansburg, SAD
- Olovo, 1000 µg/mL olova u 0,5% (v/v) HNO<sub>3</sub>, Inorganic Ventures, Christiansburg, SAD
- Živa, 1000 µg/mL žive u 5% (v/v) HNO<sub>3</sub>, Inorganic Ventures, Christiansburg, SAD
- Selen, 1000 µg/mL standard selena za ICP, Perkin Elmer, SAD

#### *3.2.3.6.3. Priprema laboratorijskog posuđa za analizu esencijalnih i toksičnih elemenata*

Laboratorijsko posuđe korišteno u analizi esencijalnih i toksičnih elemenata oprano je detergentom (Kemex, Kemika, Hrvatska), isprano vodovodnom i destiliranom vodom. Za mikrovalnu razgradnju, teflonske posudice su isprane 3%-tnom nitratnom kiselinom (HNO<sub>3</sub>, ultračista, Carlo Erba reagents, Rodano, Italia), dva puta deioniziranom vodom, acetonom, te dva puta deioniziranom vodom i osušene na visokotlačnom mikrovalnom uređaju Multiwave 3000 (Anton Paar, Austrija).

#### 3.2.3.6.4. Priprema uzoraka za analizu esencijalnih i toksičnih elemenata

Odvagano je 0,5 g homogeniziranih uzorka tkiva mozga u teflonske posudice uz dodatak 3 mL vodikovog peroksida (Carlo Erba reagents, Rodano, Italia) i 2,5 mL nitratne kiseline ( $\text{HNO}_3$ , 65%, čistoće *s.p.*, Merck, Njemačka). Mikrovalna digestija provedena je na rotor MW pećnici (Multiwave 3000, Anton Paar, Graz, Austrija) koja ima 16 posuda u kojoj je izvršena mikrovalna razgradnja uzoraka. Mikrovalna razgradnja provedena je u tri koraka: prvi korak snage 500 W 2,5 minute te zadržavanje od 1,5 minute, drugi korak na 1000 W 20 minuta i zadržavanje 15 minuta te treći korak 1200 W 30 minuta i zadržavanje 25 minuta. Kontrola mikrovalnog spaljivanja izvršena je slijepom probom, CRM-om (certificiranim referentnim materijalom) te kontrolom ponovljivosti. Raspored uzoraka u rotoru je:

- Slijepa proba reagensa
- CRM
- CRM (duplikat)
- 4-16 uzorci

Nakon razaranja i hlađenja, uzorci se kvantitativno prenose u odmjerne tikvice od 50 mL za sve matrice uz ispiranje sadržaja ultračistom vodom dobivenom primjenom sustava Milli-Q Millipore (Merck, Millipore Corporation, Njemačka) kako bi gubitci analita bili što manji. Koncentracije određenih metala izražene su u  $\mu\text{g}/\text{kg}$  suhe mase. Uzorci su analizirani u serijama koje su uključivale negativan uzorak, standarde za kalibracijsku krivulju i tri uzorka s dodanim metalima. Određene su granice određivanja metala (LOD) izračunom koji odgovara tri puta standardnim devijacijama deset slijepih uzoraka ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ): As 10, Cd 1, Hg 1, Pb 1.

#### 3.2.3.6.5. Analiza esencijalnih i toksičnih elemenata metodom masene spektrometrije induktivno spregnute plazme (ICP-MS)

Masena spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) je tehnika u kojoj se induktivno spregnuta plazma koristi kao ionizacijski izvor, a za detekciju nastalih iona koristi se maseni spektrometar. Plazma razvija temperature od 6000–10000 K što omogućuje determinaciju oko 75 elemenata iz periodnog sustava. Plinove koje ICP koristi su argon, dušik i komprimirani zrak. Argon služi za formiranje plazme i čišćenje sistema od nečistoća prilikom pokretanja aparata, dušik služi za čišćenje optičkih dijelova uređaja, a komprimirani zrak uklanja rep plazme i tako štiti optičke dijelove od uništenja. Prilikom uvođenja uzoraka u plazmu, oni prolaze faze desolvacije,

isparavanja, atomizacije i ionizacije prije nego uđu u maseni spektrometar. No da bi se uzorak uveo u plazmu prvo se mora raspršiti u ciklonskoj komori za raspršivanje pomoću raspršivača, u ovom slučaju Meinhard. Nastali ioni se ekstrahiraju u sučelje masenog spektrometra kroz prvi i drugi konus sastavljeni od nikla. Nakon toga ioni se fokusiraju pomoću niza ionskih leća u maseni analizator. Pozitivno nabijeni ioni se razdvajaju na temelju njihovih omjera masa/naboj, a detektiraju se upotrebom multiplikatora elektrona (312).

#### *Kalibracija instrumenta*

Prije svakog mjerenja koncentracije esencijalnih i toksičnih elemenata u uzorcima potrebno je izvršiti kalibraciju. Smjese standardnih otopina elemenata za izradu kalibracijskih krivulja priređuju se iz monoelementnih standardnih otopina u 5% (v/v) dušičnoj kiselini. Kalibraciju vrši instrument u pet točaka. Točke kalibracije su: 1 µg/L, 5 µg/L, 10 µg/L, 15 µg/L i 20 µg/L. Svaka točka očitava se u tri replike iz kojih se uzima srednja vrijednost mjerenja. Minimalni broj točaka na kalibracijskom pravcu je četiri, a koeficijent korelacije  $\geq 0,995$ . U slučaju da se uzorci ostavljaju preko noći ili bez konstantnog nadzora svakih 20 uzoraka vrši se reslope (provjera nagiba kalibracijskog pravca) kalibracijske krivulje s koncentracijom standardne otopine od 10 µg/L.

#### *Mjerenje*

Koncentracije esencijalnih i toksičnih elemenata mjerene su metodom masene spektrometrije induktivno spregnute plazme na uređaju s masenim detektorom ICP-MS model Agilent 7900 (Agilent, SAD). Razgrađene otopine se slažu u automatski uzorkivač instrumenta u za to odgovarajuće polipropilenske epruvete od 15 mL, te se analiziraju. Redoslijed očitavanja uzoraka iz odabranog SIF-a: slijepa proba reagensa → CRM → CRM (duplikat) → uzorci → CRM → CRM (duplikat).

#### *Izračun rezultata*

Koncentracija esencijalnih i toksičnih elemenata izračunata je pomoću formule [3]:

$$C = \frac{(c \times V)}{m} [3]$$

gdje je:

C – koncentracija esencijalnih i toksičnih elemenata u uzorku izraženih u ng/g

c – koncentracija esencijalnih i toksičnih elemenata u 20 µL izraženih u µg/L

V – volumen uzorka izražen u mL

m – masa uzorka izražena u g.

**Tablica 1.** Uvjeti rada i parametri mjerenja za ICP-MS

<b>Spektrofotometar:</b>	<b>Agilent Technology 7900</b>	
Način unosa uzorka:	PeriPump	
Tip raspršivača:	MicroMist	
Sučelje:	Pt-konovi	
RF snaga:	1550 W	
<b>Brzina protoka Ar (L/min)</b>		
Plazma:	15	
Sporedni protok:	0,9	
Raspršivač:	0,1 rps	
Brzina protoka He:	0,03 mL/min	
Model ionskih leća:	x-leće	
Voltaža leća:	10,7 V	
Omega bias:	-90 V	
Omega leća:	10,2 V	
Akvizijski način rada:	Spectrum	
Uzorak pika:	1 point	
Replike:	3	
Integriranje/repliki:	100	
Brzina unosa uzorka:	0,3 rps	
<b>Način rada</b>	<b>Bez plina</b>	<b>He</b>
Plazma mod	Opća namjena	Opća namjena
Vrijeme stabilizacije (sec)	0	5
Vrijeme integracije/masi(sec)	0,1	0,5
<b>Izotopi:</b>		
Bez plina:	Pb <sup>208</sup>	
He mode:	As <sup>75</sup> , Cd <sup>111</sup>	
Interni standardi:	Bi, In	

### 3.2.4. Analiza prooksidativne/antioksidativne učinkovitosti

#### 3.2.4.1. Mjerenje količine lipidne peroksidacije

Količina lipidne peroksidacije određena je modificiranom metodom koju su opisali Jayakumar i sur. (313). U metodi se mjeri koncentracija malondialdehida (MDA), jednog od glavnih produkata lipidne peroksidacije. Za određivanje koncentracije malondialdehida (MDA) korištena je metoda derivatizacije MDA s 2-tiobarbituratnom kiselinom (TBA) kako bi se formirao crveni fluorescentni kompleks MDA-(TBA)<sub>2</sub> čija se koncentracija mjeri spektrofotometrijski (Libra S22, Biochrom, UK). na valnoj duljini od 532 nm. Ukupna koncentracija MDA izračunata je korištenjem koeficijenta ekstinkcije za MDA ( $\epsilon = 1,56 \times 10^5/\text{M cm}$ ) prema sljedećoj formuli [4] te izražena kao nmol MDA/mg proteina.

$$c(\text{MDA}) = \frac{A_{uzorka} \times V_{reakcijske\ smjese\ (mL)}}{s \times V_{uzorka\ (mL)} \times c_{proteina\ u\ uzorku\ (mg/ml)}} \times \text{razrjeđenje} [4]$$

#### 3.2.4.2. Mjerenje koncentracije ukupnog glutationa (GSH)

Koncentracija ukupnog glutationa određena je prema modificiranoj metodi koju je opisao Tietze (314). Ukupni glutation određen je na način da je 20  $\mu\text{L}$  uzorka, 40  $\mu\text{L}$  0,035 M HCl i 40  $\mu\text{L}$  10 mM 5–5'-ditiobis-2-nitrobenzojeve kiseline (DTNB, Ellmanov reagens) dodano u svaku jažicu mikropločice. Apsorbancija je izmjerena na 412 nm (čitač mikropločica Model 550, Bio-Rad, SAD). Metoda se temelji na reakciji tiolnog reagensa 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoične kiseline (DTNB, Ellmanov reagens) s GSH pri čemu se stvara kromofor 5-tionitrobenzoična kiselina (TNB) koja apsorbira pri valnoj duljini 405-414 nm. Osim TNB, stvara se i GS-TNB koji se reducira pomoću GSH reduktaze i NADPH pri čemu se otpušta druga molekula TNB i reciklira GSH. Brzina nastanak TNB proporcionalna je reciklirajućoj reakciji koja je proporcionalna koncentraciji glutationa u uzorku. Pri ovoj metodi sav oksidirani GSH (disulfid GSSG) prisutan u reakcijskoj smjesi ili nastao iz miješanog disulfida GSH s GS-TNB brzo se reducira do GSH. Konačan rezultat koji se dobije odgovara ukupnoj koncentraciji reduciranog i oksidiranog GSH u uzorku. Koncentracija ukupnog GSH izračunata je prema formuli [5] te izražena je kao  $\mu\text{M}/\text{mL}$  proteina:

$$c(\text{GSH}) = \frac{\Delta A_{uzorka} \times V_{reakcijske\ smjese\ (mL)}}{\epsilon \times V_{uzorka\ (mL)} \times c_{proteina\ (\frac{mg}{mL})}} \times \text{razrjeđenje} [5].$$

### 3.2.4.3. Mjerenje enzimatske aktivnosti katalaze

Aktivnost katalaze određena je Aebi spektrofotometrijskom metodom (315). Aktivnost katalaze određena je smanjenjem količine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a aktivnost katalaze mjerena je spektrofotometrijski (UV-160, Shimadzu, Japan) na valnoj duljini od 240 nm tijekom jedne minute i izračunata pomoću koeficijenta ekstinkcije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\epsilon = 39,4 \text{ m/M cm}$ ). U reakcijsku smjesu u kivetu ukupnog volumena 1 mL dodano je 980  $\mu\text{L}$  10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a ostatak do ukupnog volumena od 1 mL bio je uzorak odgovarajućeg razrijeđenja. Aktivnost katalaze izražena je preko ekstinkcijskog koeficijenta H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\epsilon = 39,4 \text{ mM/cm}$ ) prema formuli [6]:

$$\text{Aktivnost CAT} = \frac{A_{\text{uzorka}}}{\epsilon (H_2O_2) \times l} \times \text{razrjeđenje} [6],$$

gdje je  $l$  jednak putu koji zraka svjetla prođe kroz kivetu i iznosi 1 cm. Rezultat je izražen kao U/mg proteina što odgovara  $\mu\text{mol}$  razgrađenog H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> po minuti po miligramu proteina.

### 3.2.4.4. Mjerenje enzimatske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

Aktivnost SOD određena je prema metodi po Flohé i Ötting (316). Metoda je posredna i temelji se na inhibiciji redukcije citokroma c u sustavu ksantin/ksantin oksidaza. U ovoj metodi korištene su dvije slijepa probe. Prva slijepa proba sastojala se samo od otopine A (Tablica 2) te je apsorbancija u spektrofotometru mjerena na 550 nm (UV-160, Shimadzu, Japan) tijekom 3 min. Druga slijepa proba služila je za namještanje aktivnosti ksantin oksidaze. U kivetu je dodano redom: 25  $\mu\text{L}$  dH<sub>2</sub>O, 1,45 mL otopine A i 15-30  $\mu\text{L}$  ksantin oksidaze (0,8 U/mL). Odmah nakon dodavanja enzima i brzog miješanja mjerena je promjena apsorbancije, odnosno aktivnost enzima ksantin oksidaze tijekom 3 min na 550 nm. Aktivnost ksantin oksidaze mora biti oko 0,025 U/min. U ovom slučaju volumen XOD koji je odgovarao bio je 25  $\mu\text{L}$ . Nakon što se postigla optimalna aktivnost SOD, analizirani su uzorci. U svaku reakcijsku smjesu umjesto dH<sub>2</sub>O dodano je 25  $\mu\text{L}$  uzorka te odgovarajući volumen ksantin oksidaze i odmah nakon toga mjerena je apsorbancija u spektrofotometru. Enzimatska aktivnost mjerena je kao postotak inhibicije aktivnosti ksantin oksidaze koja se računa prema formuli [7]:

$$\% \text{ inhibicije} = 100 - (\Delta A_{\text{uzorka}} / \Delta A_{\text{slijepa proba}}) \times 100 [7].$$

Iz % inhibicije izračunata je aktivnost SOD te izražena kao U/mL uzorka prema formuli [8]:

$$\text{Aktivnost SOD} = 10^{((\% \text{ inhibicije} + 12,757) / 30,932)} [8].$$

**Tablica 2.** Priprema otopina za određivanje aktivnosti SOD\*

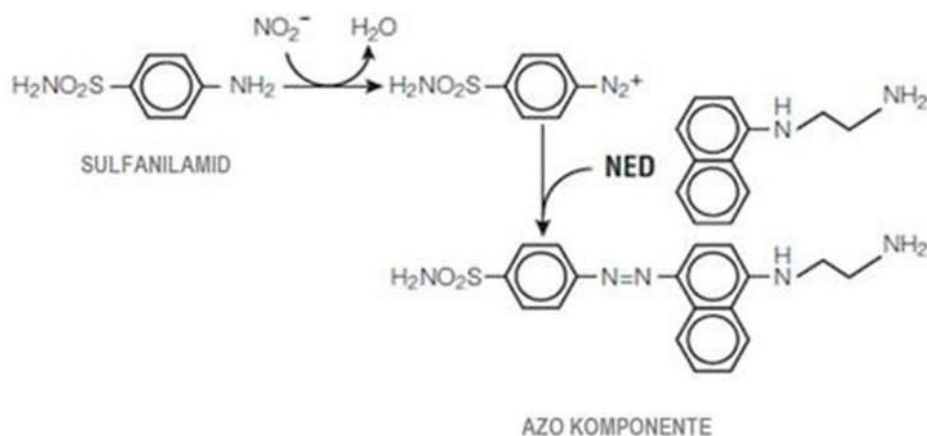
50 mM PBS	Pomiješati 17 mL (1,56 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ u 50 mL $\text{dH}_2\text{O}$ ) i 183 mL (5,678 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ u 200 mL $\text{dH}_2\text{O}$ ), namjestiti pH=7,8 te nadopuniti do 800 mL
50 mM PBS s 0,1 mM EDTA	3,72 mg EDTA u 100 mL 50 mM PBS
Reakcijska otopina A	190 mL 0,05 mM citokroma C (29 mg citokroma C u 50 mM PBS s 0,1 mM EDTA do 190 mL) i 19 mL 1 mM ksantina (3 mg ksantina u 19,74 mL 1 mM NaOH teško se otapa, lagano zagrijavati)
Reakcijska otopina B XOD (aktivnost 0,8 U/mL)	40 $\mu\text{L}$ ksantin oksidaze i 960 $\mu\text{L}$ $\text{dH}_2\text{O}$

\*Korištene su kemikalije proizvođača Sigma-Aldrich, Njemačka: Citokrom c iz goveđeg srca,  $M_r = 12,327$  g/mol; Ksantin oksidaza iz kravljeg mlijeka , 50 U (1,05 U/mg proteina).

### 3.2.5. Analiza neuorupalnih promjena u tkivu mozga i serumu

#### 3.2.5.1. Mjerenje dušikovog oksida indirektnom metodom prema Griess-u

Ova analiza se temelji na reakciji diazotacije koju je prvi opisao Griess (317). Određivanjem aktivnosti NO mjerimo makrofagnu aktivnost i polarizaciju u tkivu mozga i serumu. Brojne stanice sisavaca sintetiziraju dušikov oksid oksidacijom L-arginina pomoću enzima dušik oksid sintetaze. U uvjetima *in vitro* dušikov oksid se brzo metabolizira u stabilne produkte, nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) ili nitrata ( $\text{NO}_3^-$ ), ovisno oksidira li se molekularnim kisikom ili superoksidnim anionom, i kao takav se izlučuje izvan stanice u hranjivu podlogu (318). Sinteza dušikovog oksida može se indirektno odrediti spektrofotometrijski Griessovom metodom (Slika 5), mjereći nitrite inirate akumulirane u tekućoj hranjivoj podlozi u kojoj rastu stanice. U ovom istraživanju korišten je kit *Griess reagent system* proizvođača Promega (SAD), koji za analizu  $\text{NO}_2^-$  koristi 1% sulfanilamid pripremljen u 5% fosfatnoj kiselini i 0,1% N-1-naftiletilediamin dihidroklorid (NED). U mikrotitarsku ploču dodano je 50  $\mu\text{L}$  uzorka u triplicatu, potom 50  $\mu\text{L}$  sulfanilamid otopine i uslijedila je inkubacija 10 minuta na sobnoj temperaturi (zaštićeno od svjetla). Nakon prve inkubacije dodano je 50  $\mu\text{L}$  NED te je inkubirano 10 minuta na sobnoj temperaturi (zaštićeno od svjetla). Nakon druge inkubacije (ružičasto obojenje uzorka) je očitana apsorbancija na 540 nm na uređaju Labsystems iEMS Reader MF (Labsystem, Finska). Kao standard upotrebljen je 0,1 M natrijev nitrit u koncentracijama 0-100  $\mu\text{M}$ . Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji nitrita određen je nagib pravca. Preko nagiba pravca izračunata je koncentracija  $\text{NO}_2^-$  u uzorcima. Koncentracija  $\text{NO}_2^-$  izražena je kao  $\mu\text{M}/\mu\text{L}$ .



**Slika 5.** Kemijska reakcija nastala mjerenjem  $\text{NO}_2^-$  koristeći Griess reagens sustav (preuzeto i prilagođeno prema 318).



### 3.2.5.2. Određivanje aktivnosti arginaze

Arginaza (engl. *L-arginine amidinohydrolase*, *L-arginin amidinohidrolaza*) je enzim koji sudjeluje u posljednoj reakciji metaboličkog ciklusa ureje, gdje katalizira pretvorbu aminokiseline L-arginina u L-ornitin i ureju ( $L\text{-arginin} + H_2O \rightarrow L\text{-ornitin} + \text{ureja}$ ). Određivanjem aktivnosti arginaze, kao i kod NO, mjerimo makrofagnu aktivnost i polarizaciju u tkivu mozga i serumu. Postoje dvije izoforme ovog enzima, jetrena arginaza-1 (citoplazmatski protein) i arginaza-2 (mitohondrijski protein) prisutna u bubrezima, mozgu, prostati, tankom crijevu i mliječnim žlijezdama (319). Zanimljivo je da se inducibilna dušik oksid sintaza (iNOS) i arginaza natječu za zajednički supstrat, aminokiselinu L-arginin (320). M1-makrofagi potiču iNOS da katabolizira L-arginin u NO (citostatični i citolitički učinak) i citrulin, dok su M2 makrofagi karakteristični po visokoj ekspresiji arginaze-1 (Arg-1), citosolnog enzima koji katalizira alternativni metabolički put L-arginina u ornitin i poliamine, koji su prekursori u sintezi kolagena i stanične proliferacije (321, 322). Prema tome, povećana regulacija Arg uglavnom je prisutna u M2 makrofagima koji luče protuupalne citokine (npr. IL-10), dok je iNOS više prisutna u M1 makrofagima koji luče proupalne citokine (npr. IL-1 $\beta$ , IL-6) i imaju pojačano antimikrobno djelovanje. Kako bi provjerili razinu arginaze-1 u pokusnim životinjama koristili smo *Arginase activity assay kit* MAK112 (Sigma- Aldrich, Njemačka). Prema uputama proizvođača u A1 i A2 jažicu dodano je 50  $\mu$ L 1 mM standardne radne otopine uree, u B1 i B2 jažicu 50  $\mu$ L vode, a u preostale jažice po 40  $\mu$ L seruma u duplikatu. Stupci 2, 4, 6, 8, 10 i 12 su slijepe probe. Potom je u sve jažice (Slika 6) izuzev onih za slijepu probu dodano 10  $\mu$ L 5x koncentriranog supstratnog pufera, pločica je zamotana u aluminijsku foliju i uzorci su inkubirani 2 h.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
B	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
C	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
D	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
E	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
F	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
G	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
H	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

A1 : standard ureje 50  $\mu$ L + supstrat  
B1 : voda 50  $\mu$ L + supstrat  
C1: uzorak 40  $\mu$ L + supstrat  
A2: standard ureje 50  $\mu$ L  
B2: voda 50  $\mu$ L  
C2: uzorak 40  $\mu$ L

Copyright © 2009 Edita Aksamitiene

**Slika 6.** Konstrukcija mikrotitarske pločice kod određivanja aktivnosti arginaze

Nakon inkubacije dodano je 200  $\mu\text{L}$  reagensa uree u svaku jažicu kako bi se zaustavila reakcija, a zatim 10  $\mu\text{L}$  5x supstratnog pufera u jažice za slijepu probu (stupci 2, 4, 6, 8, 10 i 12). Uslijedila je inkubacija od 1 h na sobnoj temperaturi. Apsorbancija je očitana na 430 nm (Labsystems iEMS Reader MF, Labssystem, Finska). Aktivnost arginaze je izračunata prema formuli [9]:

$$\text{Aktivnost arginaze} = \left( \frac{A_{\text{uzorka}} - A_{\text{prazne jažice}}}{A_{\text{standarda}} - A_{\text{vode}}} \right) \times \left( \frac{1 \text{ mM} \times 50 \times 10^3}{V \times T} \right) \text{ [9]}$$

gdje je T vrijeme reakcije u minutama, V volumen uzorka dodan u jažice, 1 mM koncentracija standarda ureje, 50 reakcijski volumen, a  $10^3$  konverzijski čimbenik mM u  $\mu\text{M}$ . Jedna jedinica arginaze je količina enzima dovoljna za pretvorbu 1  $\mu\text{mola}$  L- arginina u ornitin i ureu u minuti, pri 37 °C i pH 9,5.

### 3.2.5.3. Mjerenje razine metaloproteinaza MMP-2 i MMP-9

Poznato je da matrične metaloproteinaze MMP-2 i MMP-9 razgrađuju A $\beta$  amiloide, te je njihova ekspresija povećana u moždanom tkivu oboljelih od AD, posebno u astrocitima koji okružuju amiloidni plak što dovodi do pretpostavke da imaju zaštitničku ulogu u razvoju AD (323). Nadalje, matrične metaloproteinaze (MMP), osim protektivne imaju i važnu ulogu kao upalne komponente u patogenezi AD pa tako proagregacijski utjecaj na stvaranje tau oligomera u strateškim regijama mozga može biti potencijalna neurotoksična nuspojava MMP-9 (324).

Koncentracije matriksne metaloproteinaze 2 (MMP-2) i 9 (MMP-9) određene su korištenjem *MMP-2 Rat ELISA Kit* i *MMP-9 Rat ELISA Kit* proizvođača Chongqing Biospes Co., Ltd, Biospes, Kina prema uputama proizvođača u serumu razjedenom 10x s puferom iz kita za razrjeđivanje uzoraka. Kit za određivanje matriksnih metaloproteinaza temelji se na sendvič ELISA metodi gdje su na mikrotitarsku pločicu prethodno nanosena poliklonalna protutijela specifična za štakorsku MMP-2 i MMP-9. Kao standard za određivanje MMP-2 korištena je standardna otopina početne koncentracije 40000 pg/mL koja je otopljena s puferom za razrjeđivanje uzorka i iz koje je napravljeno šest serijskih razrjeđenja u rasponu koncentracija od 0 pg/mL do 20 000 pg/mL. Za određivanje MMP-9 korištena je standardna otopina MMP-9 početne koncentracije 10 000 pg/mL otopljene s puferom za razrjeđivanje uzorka iz koje je potom napravljeno šest serijskih razrjeđenja u rasponu koncentracija od 0 pg/mL do 5000 pg/mL. Za provedbu metode u mikrotitarsku pločicu dodano je 100  $\mu\text{L}$  standarda u odgovarajuće jažice i razrjeđenog seruma te je provedena inkubacija u trajanju od

90 minuta pri 37 °C kako bi se omogućilo vezanje MMP-2 ili MMP-9 za imobilizirano protutijelo. Po isteku inkubacije uklonjen je sadržaj svake jažice i dodao je 100 µL biotinom obilježeno poliklonalno protutijelo te je ponovno provedena inkubacija pri 37 °C tijekom 60 minuta. Nakon toga jažice su tri puta ispirane s puferom za ispiranje iz kita i zatim je u svaku jažicu dodano 100 µL avidin-biotin-peroksidaza kompleks (ABC) te je inkubirano pri 37 °C tijekom 30 minuta. Po završetku inkubacije, ponovno su jažice isprane 5 puta s puferom za ispiranje kako bi se uklonili nevezani konjugati te je u svaku jažicu dodano 100 µL 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) supstrata kako bi reakcija bila vidljiva stvaranjem plavo obojenog produkta uz inkubaciju provedenu u mraku pri 37 °C tijekom 20 minuta. Kako bi reakcija bila zaustavljena, dodano je 100 µL otopine *Stop* u svaku jažicu i kako bi nastalo žuto obojenje. Intenzitet nastalog žutog obojenja proporcionalan je koncentraciji štakorske MMP-2 ili MMP-9, a vrijednosti apsorbancije očitane su pri 450 nm na uređaju Ao Absorbance Microplate Reader (Azure Biosystems, SAD). Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji standardne otopine MMP-2 ili MMP-9, određena je jednadžba pravca, a koncentracije MMP-2 ili MMP-9 u serumu izražene su u ng/mL. Uzorci su rađeni u duplikatu te je kod konačnog izračuna koncentracije uzet u obzir faktor razrijeđenja.

#### **3.2.5.4. Mjerenje razine hepcidina u serumu**

Hepcidin je peptidni hormon i glavni je regulator metabolizma željeza u organizmu. Sinteza i izlučivanje hepcidina u štakora povećana je u kod povišenih koncentracija željeza u serumu i upalnim stanjima (325). Razina hepcidina u serumu štakora mjerena je korištenjem ELISA kita za hepcidin (engl. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Hepcidin*) proizvođača Cloud-Clone Corp., SAD prema uputama proizvođača. Mjerenje razine hepcidina temelji se na kompetitivnoj ELISA metodi, te su na mikrotitarsku pločicu prethodno nanosena monoklonalna protutijela specifična za hepcidin. Uzorci seruma razrijeđeni su dva puta s PBS-om. Kao standard za određivanje hepcidina korištena je standardna otopina početne koncentracije 100 ng/mL otopljene s 0,5 mL puferom za razrijeđivanje standarda (engl. *Standard Diluent*). Potom su napravljena četiri serijska razrijeđenja koncentracija 33,33 ng/mL, 11,11 ng/mL, 3,70 ng/mL, 1,23 ng/mL i slijepa proba 0 ng/mL te je dodano 50 µL standarda u odgovarajuće jažice mikrotitarske pločice, slijepe probe i razrijeđenog seruma. Odmah po dodatku standarda, slijepe probe i uzoraka seruma dodano je 50 µL prethodno razrijeđenoga 100x *Detection Reagent A s Assay Diluent A* te je provedena inkubacija u trajanju od 60 minuta pri 37 °C. Nakon inkubacije nevezani

konjugat je ispran tri puta s puferom za ispiranje i dodano je 100  $\mu\text{L}$  *Detection Reagent B* (avidin konjugiran s hrenovom peroksidazom, HRP) razrijeđenoga 100x s *Assay Diluent B* te je provedena inkubacija od 30 minuta pri 37 °C. Količina vezanog HRP konjugata je obrnuto proporcionalna koncentraciji hepcidina u uzorku. Po isteku inkubacije jažice su ponovno isprane puferom za ispiranje pet puta te je dodano 90  $\mu\text{L}$  supstrata nakon čega je uslijedila inkubacija u mraku u trajanju od 20 minuta pri 37 °C. Nakon dodavanja otopine supstrata, intenzitet obojenja je obrnuto proporcionalan koncentraciji hepcidina u uzorku. Kako bi reakcija bila zaustavljena dodano je 50  $\mu\text{L}$  otopine *Stop* u svaku jažicu, a vrijednosti apsorbancije očitane su pri 450 nm (Ao Absorbance Microplate Reader, Azure Biosystems, SAD). Uzorci su rađeni u duplikatu te je kod konačnog izračuna koncentracije uzet u obzir faktor razrijeđenja. Iz standardne krivulje ovisnosti logaritamske koncentracije hepcidina o apsorbanciji određena je jednadžba pravca, a koncentracije hepcidina u serumu izražene su u ng/mL.

### **3.2.5.5. Mjerenje razine feritina u tkivu mozga i serumu**

Feritin je protein koji služi za skladištenje željeza i čini ga dostupnim organizmu. Njegova se koncentracija, u serumu i mozgu, povećava tijekom upalne reakcije. Feritin se sastoji od 24 podjedinice H i L lanaca, koji su funkcionalno različiti (326). Korištenjem sendvič ELISA kita za feritin (engl. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Ferritin*) proizvođača Cloud-Clone Corp., SAD izmjerena je razina feritina u serumu štakora prema uputama proizvođača. Za određivanje razine feritina korištena je standardna otopina početne koncentracije 200 ng/mL otopljene s 1 mL puferom za razrijeđivanje standarda (engl. *Standard Diluent*). Zatim je iz početne standardne otopine napravljeno šest serijskih razrijeđenja koncentracija 100 ng/mL, 50 ng/mL, 25 ng/mL, 12,5 ng/mL, 6,25 ng/mL, 3,12 ng/mL i slijepa proba 0 ng/mL. U mikrotitarsku pločicu u kojoj su prethodno nanosena monoklonalna protutijela specifična za feritin, dodano je 100  $\mu\text{L}$  standarda u odgovarajuće jažice mikrotitarske pločice, slijepa proba i uzoraka seruma razrijeđenih dva puta s PBS-om. Potom je pločica inkubirana sat vremena pri 37 °C i po isteku inkubacije sadržaj jažica je uklonjen te je dodano 100  $\mu\text{L}$  *Detection Reagent A* prethodno razrijeđenoga 100x s *Assay Diluent A* nakon čega je uslijedila ponovna inkubacija od sat vremena pri 37 °C. Po završetku inkubacije pločica je isprana tri puta s puferom za ispiranje i dodano je 100  $\mu\text{L}$  *Detection Reagent B* razrijeđenoga 100x s *Assay Diluent B* te je provedena inkubacija od 30 minuta pri 37 °C. Zatim su jažice ponovno isprane pet puta puferom za ispiranje te je dodano 90  $\mu\text{L}$  TMB supstrata nakon čega je uslijedila inkubacija u mraku u trajanju od 20 minuta pri 37 °C

i razvitak plavog obojenja. Kako bi reakcija bila zaustavljena dodano je 50  $\mu$ L otopine *Stop* u svaku jažicu, a vrijednosti apsorbancije očitane su pri 450 nm (Ao Absorbance Microplate Reader, Azure Biosystems, SAD). Kod konačnog izračuna koncentracije uzet je u obzir faktor razrijeđenja, a svaki uzorak je rađen u duplikatu. Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji standardne otopine feritina određena je jednadžba pravca, a koncentracije feritina u serumu izražene su u ng/mL.

### 3.2.5.6. Mjerenje razine proupalnih citokina

Mjerenjem razine proupalnih citokina učinjena je provjera neuroupale nakon primjene inhalacijskih anestetika i teških metala. Iz tog razloga korišten je *Multi-Analyte ELISArray Kits* (Qiagen, Njemačka) za određivanje štakorskih proupalnih citokina kako bi odredili razinu proupalnih citokina i kemokina u uzorcima seruma eksperimentalnih životinja. Ovim ELISA kitom analizirana je razina 12 citokina i kemokina (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF, RANTES). Prema uputama proizvođača, uzorke seruma je potrebno razrijediti 2 puta s prethodno pripremljenim puferom za razrijeđivanje uzoraka. ELISA kit je korišten prema uputama proizvođača, a mjerenje provedeno na 450 nm s korekcijom na 570 nm na mikrotitarskom čitaču Labsystems iEMS Reader MF (Labsystem, Njemačka). Za svaki citokin, oduzela se očitana vrijednost apsorbancije od apsorbancije negativne kontrole radi dobivanja korigirane vrijednosti apsorbancije. Također, prilikom izračuna uzet je u obzir faktor razrijeđenja uzorka. Svi uzorci rađeni su u duplikatu.

### 3.2.6. Neurohistopatološke promjene u tkivu mozga

#### 3.2.6.1. Određivanje aktivnosti acetilkolinesteraze (AChE)

Acetilkinolin (ACh) nastaje sintezom iz kolina i acetyl-CoA, konačnog produkta glikolitičkog puta. Znanstvena istraživanja pokazuju da pacijenti s AD-om imaju smanjene razine enzima kolina acetyltransferaze i neurotransmitera ACh u usporedbi sa zdravim starijim osobama te su inhibitori acetilkolin esteraze bili prva vrsta lijekova uspješno uvedena za liječenje bolesnika s AD (327). Za određivanje aktivnosti AChE korištena je kolorimetrijska metoda koju su osmislili Ellman i sur. (328). Aktivnost enzima se određuje mjerenjem nastanka tiokolina kao nusprodukta hidrolize acetilkolina (ACh) (Tablica 3). Tiokolin odmah po nastanku reagira s Ellmanovim reagensom, odnosno 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzojevim) anionom te nastaje žuto obojeni anion 5-tio-2nitrobenzojeve kiseline. Reakcija se odvija pri neutralnom ili alkalnom pH. U falkon epruvetu stavljena je desna polovica mozga i homogenizacijski pufer u omjeru 1:5 w/v te je sonificirano ultrazvučnim homogenizatorom Bandelin Sonoplus HD2070 (Bandelin, Njemačka) upotrebom sonde MS73 (Bandelin, Njemačka). Dobiveni homogenati su centrifugirani (ultracentrifuga Mikro 200R, Hettich, Njemačka) pri 9000 rpm/30min/+4 °C, a potom je izdvojen nadtalog. Nakon toga je u kivetu dodano 1,4 mL fosfatnog pufera, 25 µL DTNB-a, 40 µL dobivenog nadtaloga i 35 µL acetiltiokolin jodida. Uslijedilo je mjerenje apsorbancije na 412 nm tijekom 30 sekundi (UV-160, Shimatzu, Japan). Iz izmjerene apsorbancije uz pomoć formule navedene u gore citiranom radu izračunata je aktivnost AChE koja je izražena kao R (mol/L/min/g tkiva).

**Tablica 3.** Otopine za određivanje aktivnosti acetilkolinesteraze

Otopina A	3,45 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O + dH <sub>2</sub> O do 125 mL
Otopina B	7,1 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (bezvodni) + dH <sub>2</sub> O do 250 mL
0,1 M fosfatni pufer pH = 7,2 (homogenizacijski pufer)	84 mL otopine A + 216 mL otopine B + 300 mL dH <sub>2</sub> O; provjeriti pH, po potrebi namjestiti pomoću 2 M NaOH ili HCl
1,6 mM DTNB	0,0317 g DTNB + 50 mL fosfatnog pufera

### **3.2.6.2. Određivanje koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika (engl. *brain-derived neurotrophic factor*, BDNF)**

BDNF je ključni neurotrofin važan za sinaptičku aktivnost i plastičnost te rast i razvoj funkcije neurona. Istraživanja s bolesnicima oboljelim od AD daju rezultate o sniženoj razini BDNF-a u serumu u usporedbi s kontrolnim skupinama (329). BDNF je član obitelji neurotrofina i igra važnu ulogu u neuronskom preživljavanju, diferencijaciji i sinaptičkoj plastičnosti posebno u regijama mozga osjetljivim na degeneraciju u AD (neuroni hipokampusa, kortikalni i kolinergički neuroni) (330). Za određivanje BDNF-a korišten je komercijalni štakorski BDNF ELISA kit proizvođača Thermo Fisher Scientific (SAD), koji radi na metodi direktne sendvič ELISE. Testiranje je provedeno prema uputama proizvođača. Uzorci i standard (0-3000 pg/mL) prije dodavanja u jažice (100 µL) su razrijeđeni otapalom C. Nakon inkubacije od 2,5 sata na sobnoj temperaturi (engl. *room temperature*, RT) u mraku, isprani su puferom za ispiranje. Potom su dodana biotinirana protutjela (100 µL), inkubacija 1 h/RT/mrak. Nakon ispiranja puferom dodan je streptavidin konjugiran s HRP-om (engl. *horseradish peroxidase*), inkubacija 45 min/RT/mrak. Nakon ispiranja puferom dodano je 100 µL TMB supstrata (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin), inkubacija 30 min/RT/mrak. Reakcija između HRP enzima i TMB supstrata dala je plavo obojenje, a dodatkom *Stop* otopine (50 µL) u reakcijsku smjesu boja se promijenila u žutu. Mjerenje apsorbancije učinjeno je spektrofotometrom na 450 nm (Microplate reader Model 550, Bio-Rad, SAD). Koncentraciju BDNF-a u uzorcima određena je preko jednadžbe pravca i poznate koncentracije standarda.

### **3.2.6.3. Neuropatološka histološka analiza**

#### **3.2.6.3.1. Histologija i imunohistokemija**

Nakon fiksacije u 4% puferiranom formalaldehidu i uklapanja u parafin, učinjeni su serijski prerezi debljine 7-10 µm te osnovno bojanje hemalon-eozinom (HE) u Laboratoriju za patologiju Klinike za tumore u Zagrebu. Imunohistokemija je napravljena u Laboratoriju za razvojnu neuropatologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga (HIIM) u Zagrebu.

### 3.2.6.3.2. Imunohistokemija

Kako bi vizualizirali neuropatološke (ne)promjene sagitalni prerezi mozga podvrgnuti su označavanju imunohistokemijskim biljezima: purified (azide free) anti- $\beta$ -amyloid, 17-24 (Clone: 4G8) (BioLegend, San Diego, CA); anti-phospho-PHF-tau pSer202/Thr205 (AT8) (Thermo Fisher Scientificu, SAD); anti-tau pSer396/404 (PHF1) i Tau-001 (MC1) (dar prof. Šimića, HIIM, Hrvatski institut za istraživanje mozga, Zagreb, Hrvatska).

Prije početka imunohistokemijskog bojenja preparati tkiva mozga su deparafinizirani serijom ispiranja ksilolom i rehidrirani etanolom u nizu padajućih koncentracija (apsolutni etanol, 96%-tni etanol, 70%-tni etanol). Nakon deparafinizacije i rehidracije preparati su isprani PBS-om (engl. *phosphate buffered saline*, pH = 7,4) a otvaranje epitopa antigena koje prepoznaje protutijelo (engl. *antigen retrieval*) izvršeno je kuhanjem u citratnom puferu (pH = 6,0). Endogene peroksidaze inaktivirane su predobradom metanolom s 0,3%-tnim vodikovim peroksidom (AT8, PHF1, MC1) te 70%-otnom mravljom kiselinom (4G8). Nakon daljnjeg ispiranja PBS-om uslijedilo je blokiranje nespecifičnog vezanja protutijela. Blokiranje je postupak kojim se sprječava pojava lažno pozitivnog obojenja zbog nespecifičnog vezanja protutijela. Za blokiranje se koriste serumi životinja ili otopine proteina koji tvore tanak sloj na površini tkiva i time sprječavaju nespecifično vezanje protutijela. Preparati se prije nakapavanja otopine za blokiranje okruže tankim slojem hidrofobne tekućine (*PAP pen*, Sigma Aldrich, Nemačka) koja predstavlja barijeru za istjecanje nakapane otopine. Otopina za blokiranje uvjetovana je primarnim protutijelom proizvedenim u serumu zeca ili miša: (a) 5%-tni NGS u 0,5%-tnom Triton/PBS za AT8 (miš); (b) 5%-tni BSA (engl. *bovine serum albumin*) u 0,5%-tnom Triton/PBS za 4G8, PHF1 i MC1 (miš). Blokiranje je provedeno kroz 60 minuta.

Primarna protutijela razrijeđena su u odgovarajućoj otopini za blokiranje, kako je navedeno gore, u omjerima 4G8 1:2000, AT8 1:500, MC1 1:20 i PHF1 1:1500. Nakon uklanjanja otopine za blokiranje, rezovi su prekriveni razrijeđenim protutijelima i inkubirani preko noći na 4 °C nakon čega je uslijedilo ispiranje PBS-om. Za kontrolu bojanja za svaki od navedenih biljega uzet je dodatni tkivni uzorak koji nije obrađen primarnim protutijelom, takozvana negativna kontrola, odnosno kontrola specifičnosti vezanja primarnog protutijela.

Sekundarna protutijela razrijeđena su u dvostruko razrijeđenoj otopini za blokiranje. Sekundarno protutijelo *anti-mouse* Vectastain® ABC kit, kataloški broj PK-4002 (VECTOR LABORATORIES, SAD) korišteno za primarna protutijela 4G8, AT8, PHF1 i MC1



razrijeđeno je u omjeru 1:200. Tako razrijeđena sekundarna protutijela nakapana su na sve rezove uključujući i negativnu kontrolu. Inkubacija preparata provedena je u vlažnoj komori kroz 60 min nakon čega je uslijedilo ispiranje PBS-om.

Tercijarno protutijelo (A i B komponenta *anti-mouse* Vectastain® ABC kit) također se priprema u dvostruko razrijeđenim otopinama za blokiranje u omjeru 1:200 kao i sekundarno. Preparati su inkubirani u vlažnoj komori 60 min nakon čega je uslijedilo ispiranje PBS-om.

Vizualizacija je provedena otopinom koja sadrži diaminobenzidin (3,3'-diaminobenzidin, DAB) (SIGMAFAST™ DAB *with Metal Enhancer Tablet Set*, kataloški broj D 0426), a pripremljena je prema uputama proizvođača (Sigma-Aldrich, Njemačka). Preparati su nakapani otopinom za vizualizaciju i inkubirani na sobnoj temperaturi kroz 10 min koliko je trajalo razvijanje. Uslijedilo je ispiranje u PBS-u i zatim u destiliranoj vodi. Nakon sušenja u mraku stakalca su prebačena u kadicu s HistoClear-om (Thermo Fisher Scientific, SAD). Rezovi su prekriveni kapljicom Histomounta (Poly-Mount®, kataloški broj 08381-120; Polysciences, SAD) i pokrovnim stakalcem. Mikroskopske snimke preparata napravljene su na mikroskopu Zeiss AxioStar plus, digitalnom kamerom Zeiss AxioCam 105 color uz pomoć programa Zen 2.3 (blue edition).

### **3.3. Statistička obrada podataka**

Svi rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška (SV  $\pm$  SP). Pomoću STATISTICA 14 programa (StatSoft, Tulsa, OK, USA) provedena je statistička analiza. Korištenjem Kruskal-Wallis neparametrijskog testa podatci su analizirani, a na razini  $p < 0,05$  određena je statistička točnost. Daljnja analiza razlika između skupina napravljena je višestrukom komparacijom srednjih vrijednosti svih skupina.

## **4. REZULTATI**

## **4.1. Patofiziološke promjene štakora nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijskoga klorida + D-galaktoze**

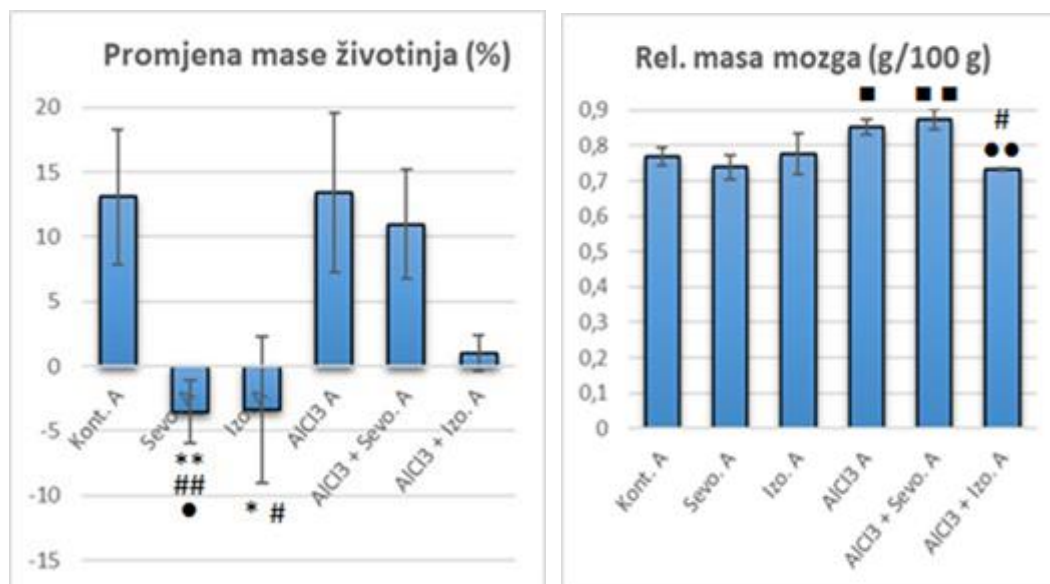
Poznato je da inhalacijski anestetici izazivaju akutnu ili kroničnu toksičnost putem nekoliko mehanizama: (a) unutarstaničnog nakupljanja metabolita, (b) stvaranja haptena koji mogu voditi do preosjetljivosti ili imunosne reakcije i (c) stvaranja reaktivnih metabolita koji mogu biti kovalentno vezani na stanične makromolekule i stvarati slobodne radikale. Povećana osjetljivost mozga na djelovanje oksidativnog stresa (OS) povezana je sa izrazitom metaboličkom aktivnošću mozga, proizvodnjom ROS-a, prisutnošću velikog broja mitohondrija i potrošnje kisika te smanjene enzimske antioksidativne aktivnosti. Osim izravnog djelovanja anestetika na centralni živčani sustav, prisutnost i prekomjerni unos metala, posebice toksičnih metala, može dodatno povećati oštećenje mozga i narušiti cjelokupnu homeostazu organizma vodeći nizu patofizioloških bolesti. Prisutnost teških metala, poput željeza i aluminijskoga klorida, uzrokuje oksidacijski stres u tkivu mozga narušavajući ravnotežu oksidansa i antioksidansa te ometanje normalne funkcije mitohondrija i brojnih enzima. Nastala oštećenja i njihove posljedice vidljive su na svim tkivima i organima kao i jedinki u cjelosti. Dio rezultata patofizioloških promjena nastalih nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijskoga klorida + D-galaktoze pokazan je u nizu kako slijedi:

### **4.1.1. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijskoga klorida + D-galaktoze na promjenu mase životinja i relativnu težinu mozga**

Rezultati promjene tjelesnih masa životinja tretiranih inhalacijskim anestheticima,  $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. i njihovim kombinacijama tijekom 7 dana prikazani su na Slici 7a na kojoj zapažamo da je došlo do statistički značajnog gubitka tjelesne mase u skupinama izloženim inhalacijskim anestheticima. U skupinama izloženim sevofluranu i izofluranu taj gubitak mase je statistički značajan u odnosu na skupinu obrađenu  $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,05$ ) te kontrolnu skupinu ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,05$ ), dok je kod skupine izložene sevofluranu značajan i u odnosu na skupinu obrađenu  $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. + Sevo. ( $p < 0,05$ ).

Na Slici 7b prikazani su rezultati promjene relativne težine mozga životinja tretiranih subakutnim dozama inhalacijskih anestetika,  $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. i njihovim kombinacijama te se

zapaža da je došlo do statistički značajnog povećanja relativne mase mozga kod skupina  $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. ( $p < 0,05$ ) i  $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. + Sevo. ( $p < 0,01$ ) u odnosu na sevofluran skupinu. Također vidljivo je smanjenje relativne težine mozga kod skupine obrađene  $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. + Izo. u odnosu na  $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. ( $p < 0,05$ ) i  $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. + Sevo. ( $p < 0,01$ ).



a)

b)

**Slika 7.** Promjena tjelesne mase (a) i relativne mase mozga štakora (b) nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihovih kombinacija.

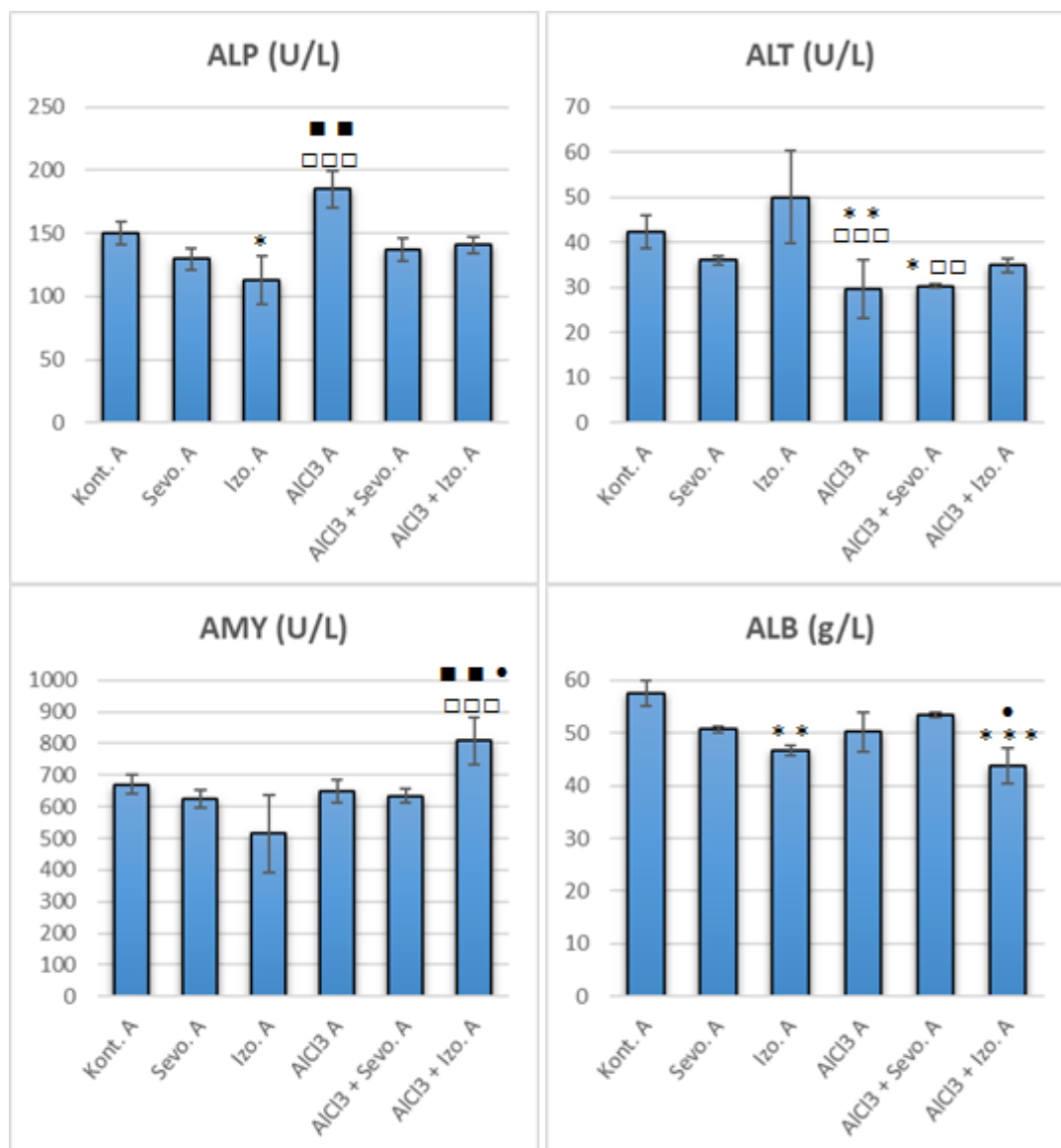
Štakori ( $N = 10$ ) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $\text{SV} \pm \text{SP}$ . \*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ); # Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu  $\text{AlCl}_3$  + D-gal. ( $\# p < 0,05$ ;  $\#\# p < 0,01$ ); ■ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu ( $\blacksquare p < 0,05$ ;  $\blacksquare\blacksquare p < 0,01$ ); \* Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu  $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. + Sevo. ( $*p < 0,01$ ;  $**p < 0,01$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran,  $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza,  $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran,  $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

#### **4.1.2. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na biokemijske odrednice štakora**

Analizom biokemijskih odrednica vidljive su promjene u enzimima i proteinima (Slika 8) te metabolitima i supstratima (Slika 9), kao pokazatelji razine oštećenja tkiva i organa, posebice, jetre i bubrega. Najveće promjene u biokemijskim parametrima vidljive u skupinama obrađenim izofluranom (Izo.) i aluminijevim kloridom + D-galaktozom + izofluranom ( $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. + Izo.). U skupini izloženoj izofluranu vidljive su statistički značajno smanjene koncentracije ALP-a, ALB-a, TP-a te GLOB-a (vidi Sliku 8). U skupini obrađenoj  $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. koncentracija ALP-a je statistički značajno povećana u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu ili izofluranu ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ), dok je koncentracija ALT-a smanjena u odnosu na kontrolnu skupinu i skupinu izloženu izofluranu ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ). U skupini obrađenoj  $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. + Sevo. vidljivo je značajno smanjenje koncentracije ALT-a u odnosu na kontrolnu skupinu i skupinu izloženu izofluranu ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ). Nadalje, u skupini obrađenoj  $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. + Izo. vidljivo je značajno povećanje koncentracije amilaze, a smanjenje koncentracije ALB-a i TP-a (vidi Sliku 8).

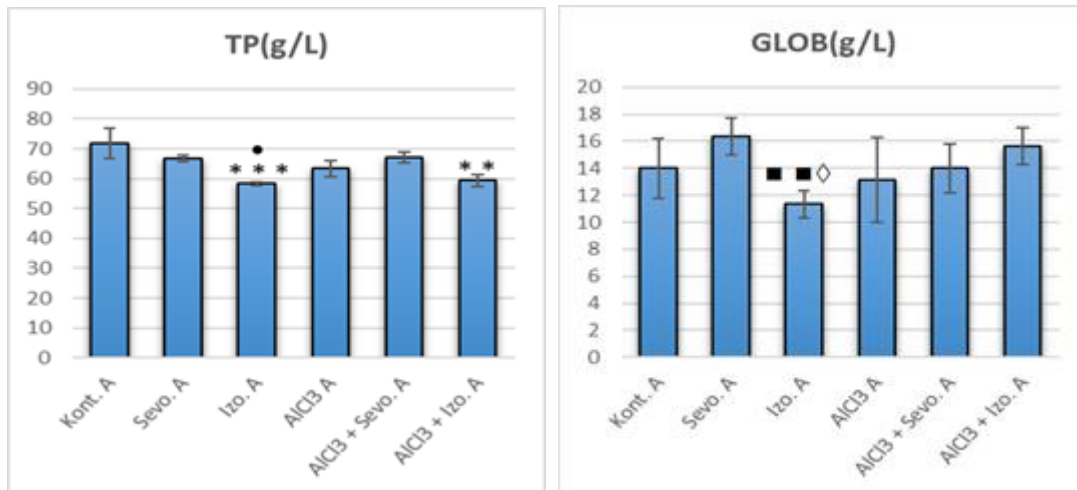
Iz rezultata Slike 9 u kojoj su prikazane promjene u metabolitima i supstratima vidljiva je povećana koncentracija GLU, PHOS, te  $\text{K}^+$  u skupini izloženoj izofluranu. U skupini obrađenoj  $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. koncentracija BUN-a i fosfora je statistički značajno povećana, dok je u skupini obrađenoj  $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. + Sevo. koncentracija kalcija i natrija značajno povećana (vidi Sliku 9). U skupini obrađenoj  $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. + Izo. vidljiva je značajno smanjena koncentracija kreatinina i kalija, dok je koncentracija natrija povećana.



**Slika 8.** Koncentracija enzima i proteina iz krvi štakora nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihovih kombinacija.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP. \*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ );<sup>■</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (\*\* $p < 0,01$ );<sup>□□</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu (□□ $p < 0,01$ ; □□□ $p < 0,001$ );<sup>\*</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. (\* $p < 0,05$ ).

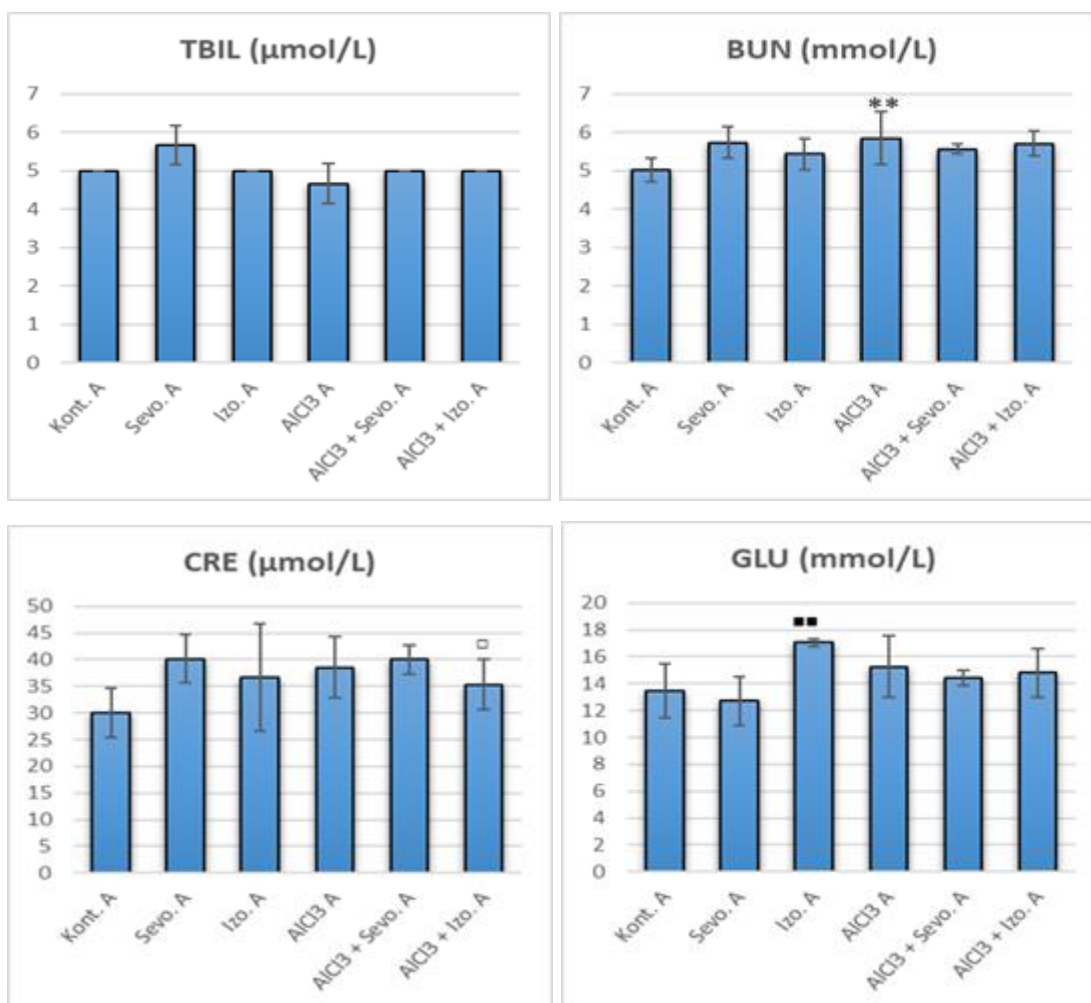
Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, ALP – alkalna fosfataza, ALT – alanin aminotransferaza, AMY – amilaza, ALB – albumin, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal.+ Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.



**Nastavak Slike 8.**

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ); ■ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (■ $p < 0,01$ ); \* Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. (\* $p < 0,05$ ); ◇ Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. (◇ $p < 0,05$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, TP – ukupni protein, GLOB – globulin, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal.+ Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.



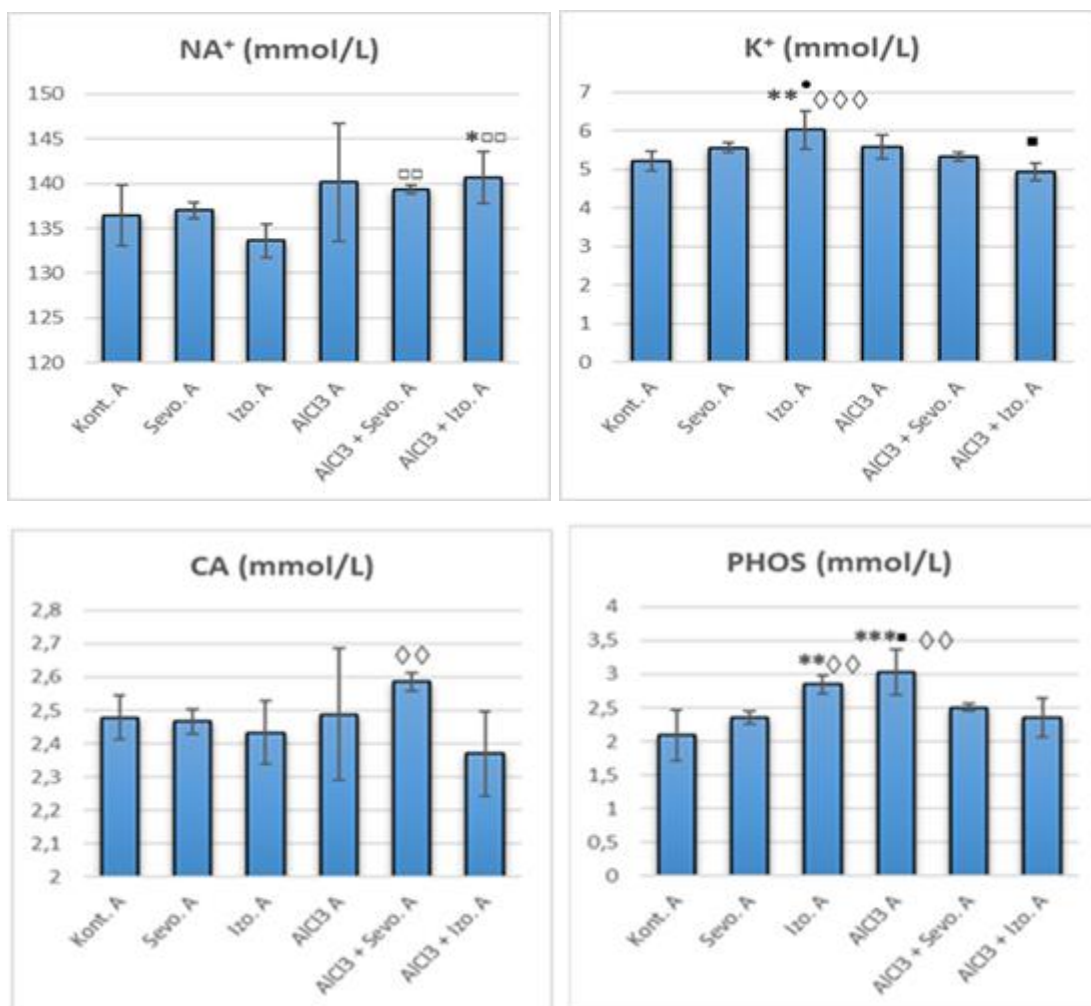
**Slika 9.** Koncentracija metabolita i supstrata iz krvi štakora nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihovih kombinacija.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\*\* $p < 0,01$ );<sup>■</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (<sup>■</sup> $p < 0,01$ );<sup>□</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu (<sup>□</sup> $p < 0,05$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, TBIL – ukupni bilirubin, BUN – dušik uree u krvi, CRE – kreatinin, GLU – glukoza u krvi, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.





### Nastavak Slike 9.

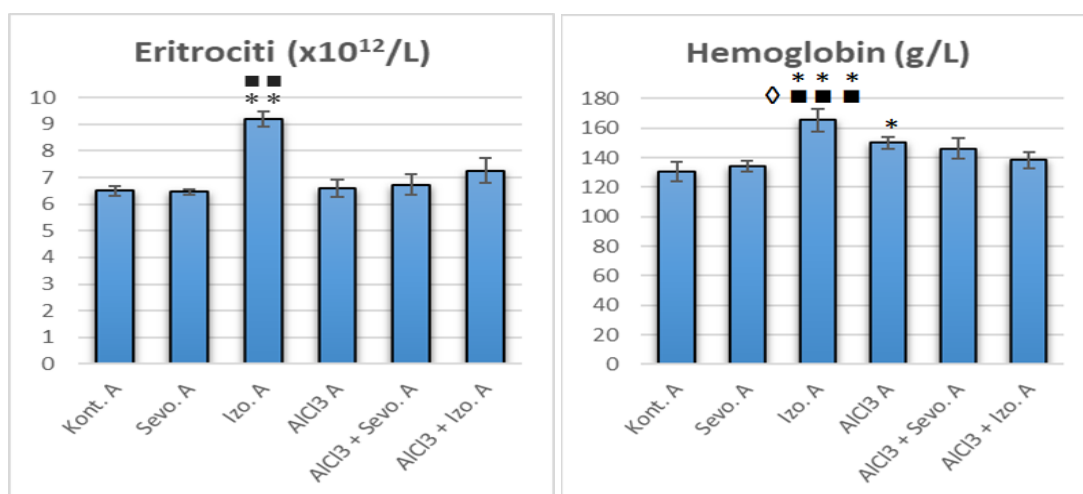
\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ); ■Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (■ $p < 0,05$ ); □Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu(□ $p < 0,01$ ); \*Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. (\* $p < 0,05$ ); ◇Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. (◇◇ $p < 0,01$ ; ◇◇◇ $p < 0,001$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, PHOS – fosfor, Ca<sup>2+</sup> – kalcij, Na<sup>+</sup> – natrij, K<sup>+</sup> – kalij, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D- galaktoza i izofluran.

### 4.1.3. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na hematološke odrednice štakora

Iz hematoloških parametara krvi štakora (Slika 10), vidljivo je značajno povećanje ukupnog broja eritrocita u skupini izloženoj izofluranu u odnosu na skupine obrađene sevofluranom ( $p < 0,01$ ) i kontrolnu skupinu ( $p < 0,01$ ), kao i nazočnost polikromazije (pojavnost nezrelih eritrocita). Ove promjene prati i razina hemoglobina, hematokrita te hematološki indeksi, uključujući MCH, MCHC i RDW (postotak raspodjele eritrocita po veličini).

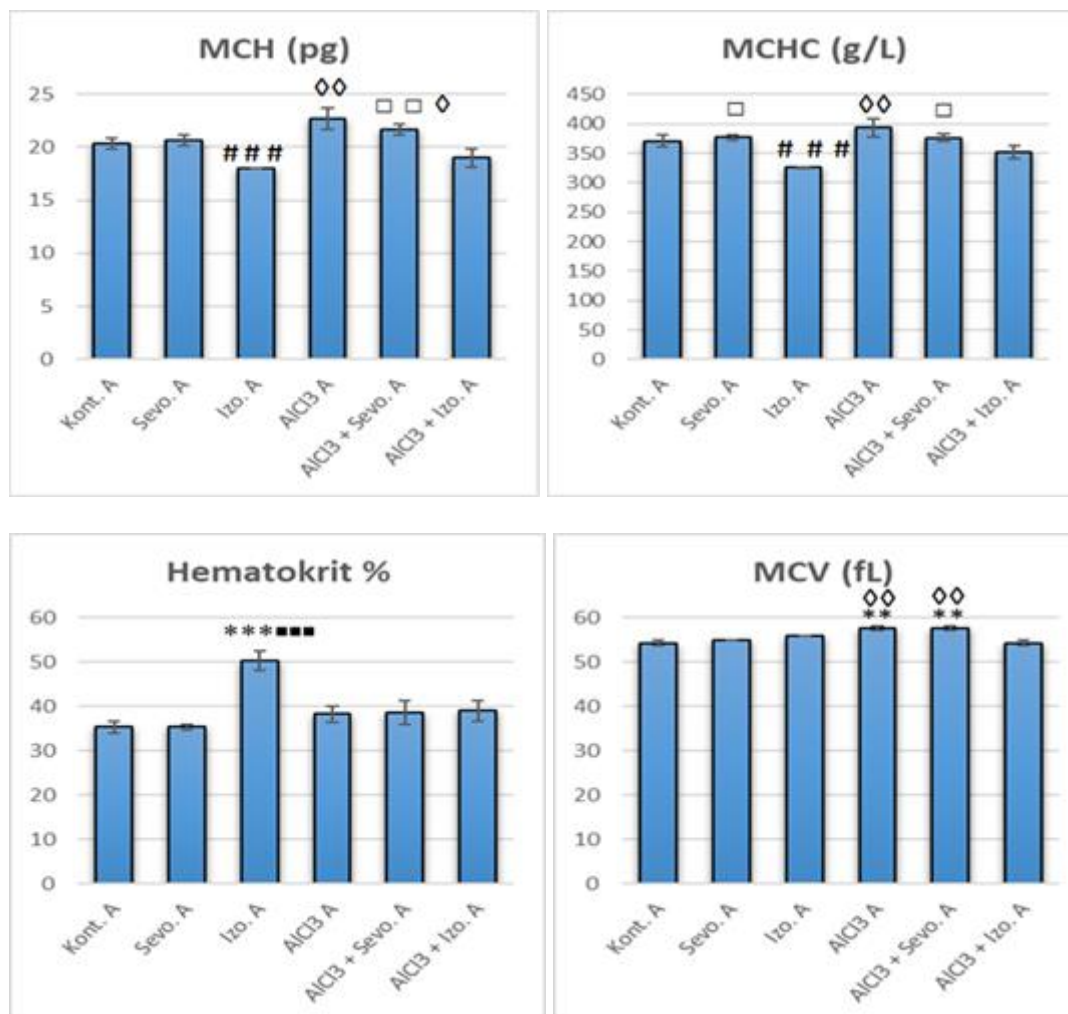
U skupini obrađenoj  $AlCl_3$  + D-gal. vrijednosti hemoglobina, MCV-a, MCH-a i MCHC- a su značajno povećane (vidi Sliku 10). Nadalje, u skupini obrađenoj  $AlCl_3$  + D.-gal. + Sevo. vrijednosti MCV-a, MCH-a i MCHC-a su također statistički značajno povećane. U skupini obrađenoj  $AlCl_3$  + D-gal. + Izo. postotak raspodjele eritrocita po veličini je statistički značajno smanjen u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu ( $p < 0,05$ ) i kontrolnu skupinu ( $p < 0,05$ ).



**Slika 10.** Hematološke odrednice štakora nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihovih kombinacija.

Štakori ( $N = 10$ ) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SP$ . \*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu ( $*p < 0,05$ ;  $***p < 0,001$ ); ■ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu ( $*p < 0,05$ ); □ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu ( $^{\square}p < 0,05$ ;  $^{\square\square}p < 0,01$ ;  $^{\square\square\square}p < 0,001$ ); # Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu  $AlCl_3$  + D.-gal. ( $^{\#}p < 0,05$ ).

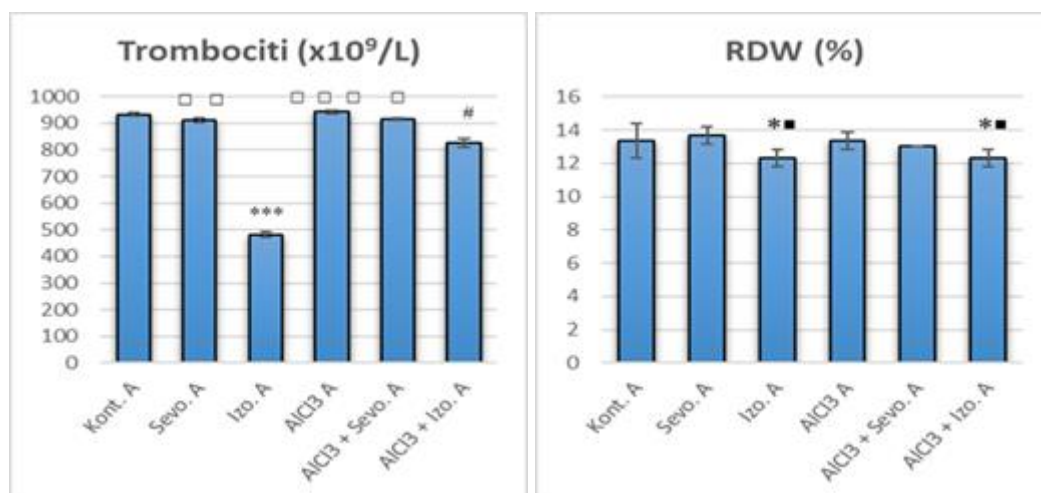
Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran,  $AlCl_3$  + D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza,  $AlCl_3$  + D.-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran,  $AlCl_3$  + D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.



### Nastavak Slike 10.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ); ■Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (■■■ $p < 0,001$ ); □Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu (□ $p < 0,05$ ; □□ $p < 0,01$ ); #Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D-gal. (### $p < 0,001$ ); ◇ Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Izo. (◇ $p < 0,05$ ; ◇◇ $p < 0,01$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, MCV – volumen eritrocita, MCH – sadržaj hemoglobina u eritrocitima, MCHC – koncentracija hemoglobina u eritrocitima, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.



### Nastavak Slike 10.

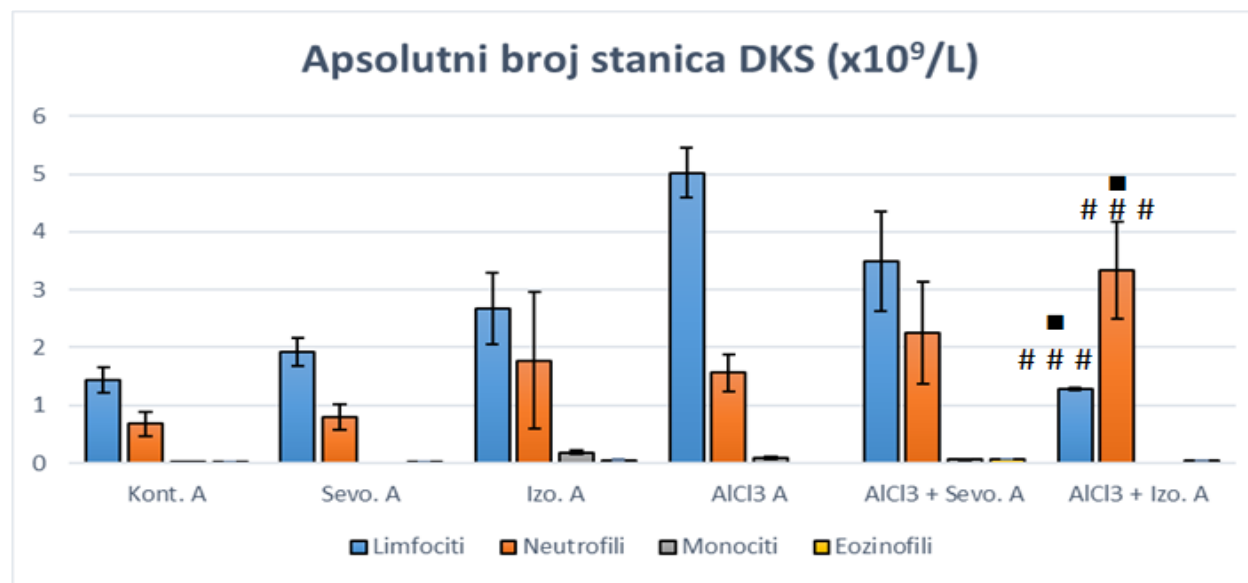
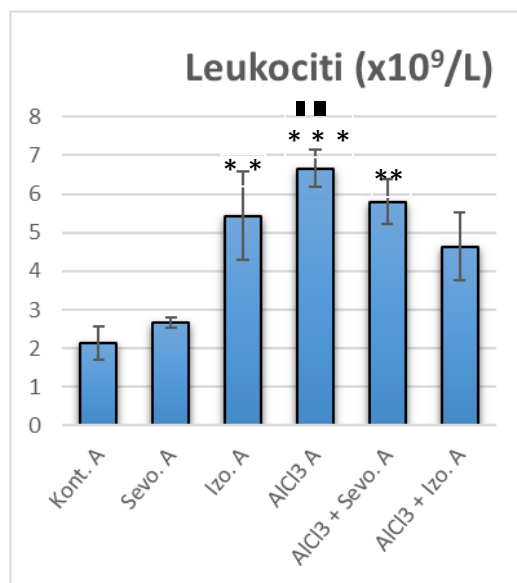
\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ); ■Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (■ $p < 0,05$ ); □Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu (□ $p < 0,05$ ; □□ $p < 0,01$ ; □□□ $p < 0,001$ ); #Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. (■ $p < 0,05$ ).

Kratice: ip – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, RDW – raspodjela eritrocita po veličini, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

#### **4.1.4. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na ukupni broj leukocita i diferencijalnu analizu krvi**

Ukupan broj leukocita (Slika 11a) je statistički značajno povećan u skupinama obrađenim izofluranom, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal., te AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ;  $p < 0,01$ ), dok je u skupini obrađenoj AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. broj leukocita statistički značajno povećan i u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu ( $p < 0,01$ ).

Rezultati analize diferencijalne krvne slike (Slika 11b) ukazuju na upalne promjene kroz povećanje postotka neutrofila, a smanjenje postotka limfocita u skupini obrađenoj AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Izo. u odnosu na skupine obrađene sevofluranom ( $p < 0,05$ ) i AlCl<sub>3</sub> + D-gal. ( $p < 0,001$ ). Nema razlike u postotku monocita i eozinofila između obrađenih skupina.



a)

b)

**Slika 11.** Ukupni broj leukocita (a) i analiza diferencijalne krvne slike štakora (b) nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihovih kombinacija.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ); ■Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (■ $p < 0,05$ ; ■■ $p < 0,01$ ); #Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. (### $p < 0,001$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

#### 4.1.5. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na osmotsku otpornost eritrocita

Osmotska otpornost eritrocita pokazatelj je promjena na eritrocitima, posebice oksidacijskih oštećenja te nazočnosti toksičnih metabolita koji mogu narušiti osmotsku cjelovitost eritrocita.

Rezultati u Tablici 4 pokazuju najveće promjene u % hemolize pri 0,5%-noj koncentraciji NaCl. Najveći postotak hemolize vidljiv je u skupini obrađenoj s AlCl<sub>3</sub> + D-gal. (29,59%), potom u skupini Izo. (23,28%) te u skupini AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. (12,91%).

**Tablica 4.** Osmotska otpornost eritrocita štakora nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihovih kombinacija.

NaCl (%)	0	0,3	0,4	0,5	0,6	0,9
Skupine <sup>a</sup>	Postotak hemolize					
Kont.	100,00	92,02	86,90	3,51	0,00	0,00
Sevo. A	100,00	94,65	86,43	7,27	0,00	0,00
Izo. A	100,00	80,10	78,57	23,28	0,89	0,00
AlCl <sub>3</sub> + D-gal. A	100,00	92,50	90,99	29,59	3,30	0,12
AlCl <sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. A	100,00	85,62	84,52	12,91	0,00	0,00
AlCl <sub>3</sub> + D-gal. + Izo. A	100,00	73,88	70,18	6,95	0,00	0,00

<sup>a</sup>Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao % hemolize eritrocita prema formuli: Hemoliza (%) = (A/B)\*100 gdje je A – hemoliza uzorka uzorak, B - potpuna hemoliza.

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

## **4.2. Promjene koncentracije esencijalnih, neesencijalnih i visokotoksičnih metala u tkivu mozga nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze**

Industrijske aktivnosti prošlog stoljeća uzrokovale su znatno povećanje izloženosti ljudi teškim metalima. Živa, olovo, krom, kadmij i arsen najčešći su teški metali koji uzrokuju trovanja ljudi. Nakon izlaganja putem vode, zraka i hrane može doći do akutnog ili kroničnog trovanja. Bioakumulacija ovih teških metala dovodi do niza toksičnih učinaka na različita tjelesna tkiva i organe. Teški metali ometaju stanične događaje uključujući rast, proliferaciju, diferencijaciju, procese popravljivanja oštećenja i apoptozu. Metali induciraju toksičnost uključujući stvaranje ROS-a, slabljenje antioksidativne obrane, inaktivaciju enzima i oksidativni stres. S druge strane, neki od njih imaju selektivno vezanje na specifične makromolekule te mogu ometati pojedine funkcije stanica.

Nadalje, biološki redoks-aktivni prijenosni metali, kao ioni Fe, Zn, Cu u visokim koncentracijama se također akumuliraju u mozgu vodeći patogenezi razvoja neurodegenerativnih bolesti kroz produkciju ROS-a.

Aluminij je metal koji nije podložan redoks promjenama i koji do stanica živčanog sustava dolazi preko krvi pomoću transferina ili monokarboksilata gdje prolazi kroz krvno-moždanu barijeru. Metali poput aluminija mogu ubrzati i potencirati nastanak neuralnih oštećenja. Aluminij se smatra jednim od čimbenika koji pridonose oksidativnom stresu i stvaranju ROS-a. Neurotoksičnost, koja dovodi do genomske nestabilnosti i stanične smrti neurona, uzrokovana je na više načina: (a) inhibicijom popravničkih enzima DNA; (b) povećanjem proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta, posebice superoksidnog aniona ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) i visoko reaktivnog hidroksilnog radikala ( $HO^{\bullet}$ ); (c) smanjenjem aktivnosti antioksidacijskih enzima; (d) promjenama aktivnosti NF- $\kappa$ B, p53 i JNK puta; (e) vezanjem na DNA.



#### **4.2.1. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na koncentraciju esencijalnih metala u tkivu mozga**

Analiza promjena u koncentraciji esencijalnih metala prikazana je u Tablici 5. Iz Tablice 5 vidljivo je da nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze dolazi do promjena u koncentraciji esencijalnih metala jedino u skupini  $\text{AlCl}_3$  + D-gal. + Izo. Statistički značajne promjene u odnosu na kontrolu vidljive su u koncentraciji Fe u odnosu na skupinu  $\text{AlCl}_3$  + D-gal. + Izo. ( $p < 0,01$ ) i  $\text{AlCl}_3$  + D-gal. ( $p < 0,05$ ), Zn u skupini  $\text{AlCl}_3$  + D-gal. + Izo. ( $p < 0,01$ ) te Mo u skupini izloženoj izofluranu ( $p < 0,05$ ). Razina Mn i Se je statistički značajno veća u skupini  $\text{AlCl}_3$  + D-gal. + Izo u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,05$ ). Zapažena je i statistički značajno smanjena razina Mo u skupini  $\text{AlCl}_3$  + D-gal. + Izo u odnosu na skupinu  $\text{AlCl}_3$  + D-gal ( $p < 0,05$ ) i Izo. ( $p < 0,05$ ). U ostalim pokusnim skupinama nije došlo do promjena u koncentraciji esencijalnih metala.

**Tablica 5.** Koncentracija esencijalnih metala nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihovih kombinacija.

Skupine <sup>a</sup>	Esencijalni metali (mg/kg)							
	(X ± SP)							
	Fe	Zn	Mn	Se	Cu	Co	Cr	Mo
Kont.	14,90 ± 0,92	8,72 ± 0,90	0,43 ± 0,04	0,14 ± 0,01	2,75 ± 0,35	0,004 ± 0,001	0,015 ± 0,000	0,030 ± 0,002
Sevo. A	21,40 ± 0,99	13,24 ± 0,47	0,39 ± 0,01	0,14 ± 0,00	2,77 ± 0,06	0,003 ± 0,000	0,011 ± 0,001	0,042 ± 0,002
Izo. A	27,58 ± 1,35	13,66 ± 0,23	0,77 ± 0,03	0,16 ± 0,00	2,93 ± 0,09	0,004 ± 0,000	0,063 ± 0,008	0,061 ± 0,004*
AlCl <sub>3</sub> + D-gal. A	35,37 ± 2,47*	13,64 ± 0,93	0,76 ± 0,05	0,24 ± 0,03	3,76 ± 1, 06	0,006 ± 0,001	0,071 ± 0,001	0,058 ± 0,008
AlCl <sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. A	19,18 ± 0,74	14,49 ± 0,65	0,39 ± 0,01	0,14 ± 0,00	27,48 ± 0,07	0,003 ± 0,000	0,013 ± 0,000	0,038 ± 0,001
AlCl <sub>3</sub> + D-gal. + Izo. A	137,61 ± 6,62**	67,21 ± 3,40**	2,48 ± 0,4 <sup>■</sup>	0,74 ± 0,04 <sup>■</sup>	1,48 ± 0,05	0,002 ± 0,000	0,040 ± 0,000	0,022 ± 0,003 <sup>□#</sup>

<sup>a</sup>Stakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao X ± SP.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01); <sup>■</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (<sup>■</sup>*p* < 0,05); <sup>□</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu (<sup>□</sup>*p* < 0,05); <sup>#</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D-gal. (<sup>#</sup>*p* < 0,05).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, X – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. –aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

#### **4.2.2. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na koncentraciju visokotoksičnih i neesencijalnih metala u tkivu mozga**

Zanimljivo je da primjena Al samog i/ili združenog s inhalacijskim anesticima znatno povećava razinu Al u mozgu (Tablica 6) u odnosu na kontrolnu skupinu; statistički značajne promjene su vidljive su u skupini Izo. ( $800,54 \pm 88,10$  vs  $288,19 \pm 24,86$ ;  $p < 0,01$ ) i  $\text{AlCl}_3$  + D-gal. + Sevo. ( $725,64 \pm 52,60$  vs  $288,19 \pm 24,86$ ;  $p < 0,05$ ).

Nadalje, u skupini  $\text{AlCl}_3$  + D-gal. + Izo. vidljivo je značajno povećanje As i Cd u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,01$  i  $p < 0,05$ ). Subakutana primjena sevoflurana statistički značajno povećava koncentraciju Ni kao neesencijalnog metala u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,01$ ) dok je primjena izoflurana statistički značajno povećala koncentraciju Ba u odnosu na skupinu izloženu  $\text{AlCl}_3$  + D-gal. + Sevo. ( $p < 0,05$ ).

**Tablica 6.** Koncentracija visokotoksičnih i neesencijalnih metala nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihovih kombinacija.

Skupine <sup>a</sup>	Visokotoksični metali (µg/kg)				Neesencijalni metali (µg/kg)	
	(X ± SP)				(X ± SP)	
	As (µg/kg)	Pb (µg/kg)	Cd (µg/kg)	Al (µg/kg)	Ba (µg/kg)	Ni (µg/kg)
Kont.	62,73 ± 3,39	0,67 ± 0,27	0,07 ± 0,02	288,19 ± 24,86	10,90 ± 0,64	6,31 ± 0,92
Sevo. A	93,50 ± 9,34	1,73 ± 1,01	0,14 ± 0,06	506,47 ± 64,29	9,97 ± 1,72	60,54 ± 3,31**
Izo. A	92,02 ± 11,13	8,21 ± 2,12	0,28 ± 0,10	800,54 ± 88,10**	21,89 ± 3,76•	49,23 ± 7,20
AlCl <sub>3</sub> + D-gal. A	16,12 ± 9,31	5,87 ± 2,19	0,84 ± 0,50	418,60 ± 45,07	20,50 ± 0,75	50,99 ± 1,63
AlCl <sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. A	14,81 ± 8,55	0,80 ± 0,03	0,39 ± 0,21	725,64 ± 52,60*	6,06 ± 1,56	23,47 ± 0,17
AlCl <sub>3</sub> + D-gal. + Izo. A	77,23 ± 44,59**	6,19 ± 0,42	3,48 ± 0,76*	552,26 ± 60,12	85,25 ± 1,88	25,48 ± 0,96

<sup>a</sup>Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao X ± SP.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ); •Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. (• $p < 0,05$ ).

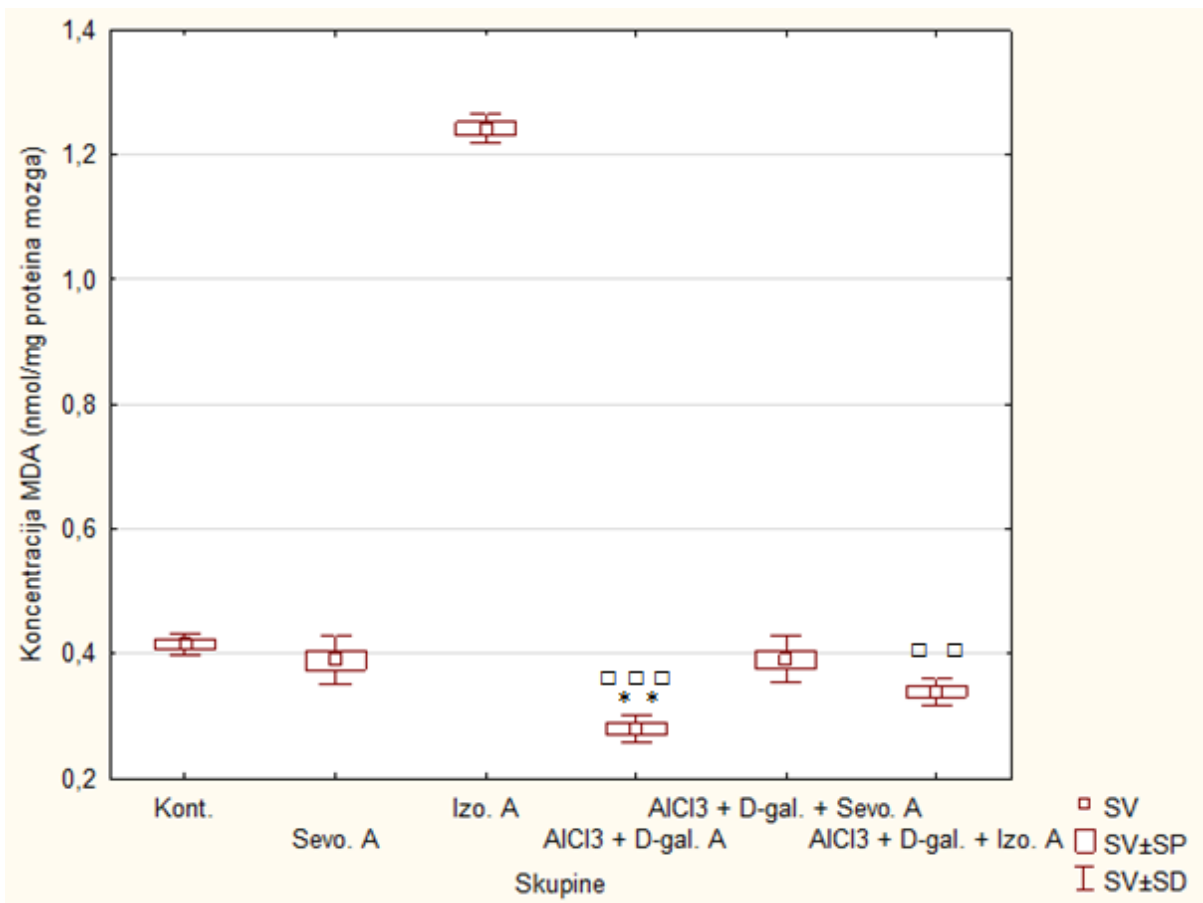
Kratice: *ip* – intraperitonealno, X – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

### **4.3. Oksido-redukcijske promjene u tkivu mozga nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijskoga klorida + D-galaktoze**

Povećana osjetljivost mozga na djelovanje oksidativnog stresa (OS) povezana je sa izrazitom metaboličkom aktivnošću mozga, proizvodnjom ROS-a, prisutnošću velikog broja mitohondrija i potrošnje kisika te smanjene enzimske antioksidacijske aktivnosti mozga. Iako je aluminij (Al) slab redoks mineral, može izazvati oksidacijska oštećenja kroz više mehanizama uključujući vezanje na negativno nabijene moždane fosfolipide, koji sadrže višestruko nezasićene masne kiseline podložne ROS-u kao što su  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^{\bullet}$  i  $OH^-$ . Aluminij također može stimulirati peroksidaciju lipida koju pokreće željezo u Fenton reakciji, što uzrokuje proizvodnju ROS-a i stvaranje  $Fe^{3+}$ . Superoksid ( $O_2^{\bullet-}$ ) neutralizira  $Al^{3+}$  kako bi nastao kompleks  $Al-O_2^{\bullet-}$ , što povećava oksidativni kapacitet  $O_2^{\bullet-}$ . Temeljem navedenog važno je istražiti razinu OS i upale kratkotrajnom i dugotrajnom primjenom inhalacijskih anestetika samih i/ili združenih sa metalima koji vode povećanju ROS-a kao što je aluminij klorid i/ili željezo dekstran mjerenjem ključnih biljega oksidacijskog stresa u moždanom tkivu poput razine MDA i GSH te CAT i SOD aktivnosti.

#### **4.3.1. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijskoga klorida + D-galaktoze na razinu lipidne peroksidacije (malondialdehid, MDA) u tkivu mozga**

Oštećenje lipida utvrđeno je mjerenjem količine malondialdehida (MDA). Analizom koncentracije MDA u homogenatu tkiva mozga (Slika 12) zapažena je statistički značajno snižena vrijednost kod skupine  $AlCl_3 + D.-gal.$  u odnosu na izofluran skupinu ( $p = 0,00001$ ) i kontrolnu skupinu ( $p = 0,06$ ). Također vidljiva je statistički snižena vrijednost kod skupine  $AlCl_3 + D.-gal. + Izo.$  u odnosu na izofluran skupinu ( $p = 0,002$ ).



**Slika 12.** Koncentracija MDA nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihovih kombinacija.

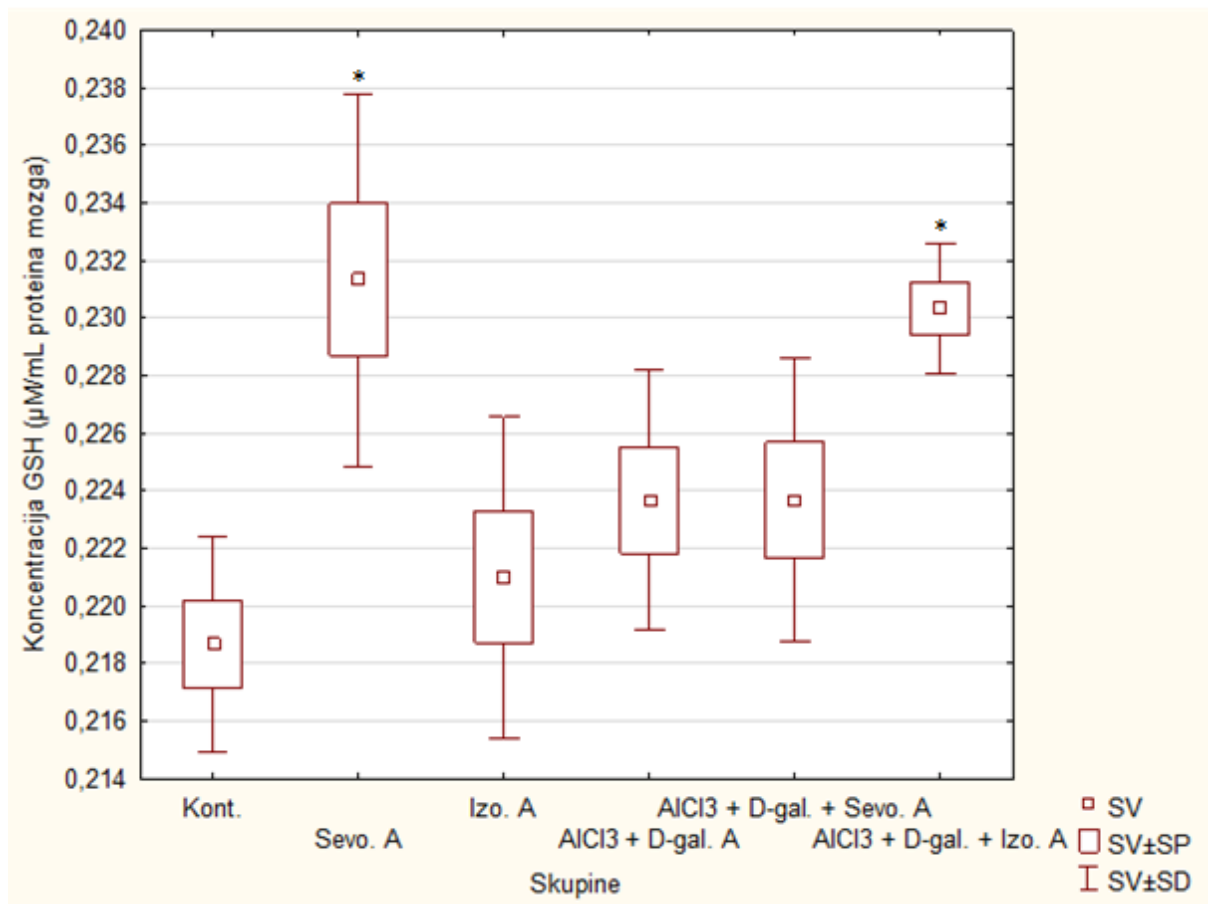
Štakori (N = 10) su obrađeni ip aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon ip injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\*\* $p < 0,01$ ); □Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu (□□ $p < 0,01$ ; □□□ $p < 0,001$ ).

Kratice: ip – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub>+ D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub>+ D.-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub>+ D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

#### **4.3.2. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijska klorida + D-galaktoze na ukupnu razinu glutaciona (GSH) u tkivu mozga**

Analizom rezultata koncentracije ukupnog glutaciona (GSH) u uzorku homogenata tkiva mozga (Slika 13) vidljiva je statistički značajno viša koncentracija kod skupine Sevo. u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p = 0,01$ ) te skupinu  $\text{AlCl}_3$  + D-gal. + Izo. u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p = 0,02$ ).



**Slika 13.** Koncentracija GSH nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihovih kombinacija.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

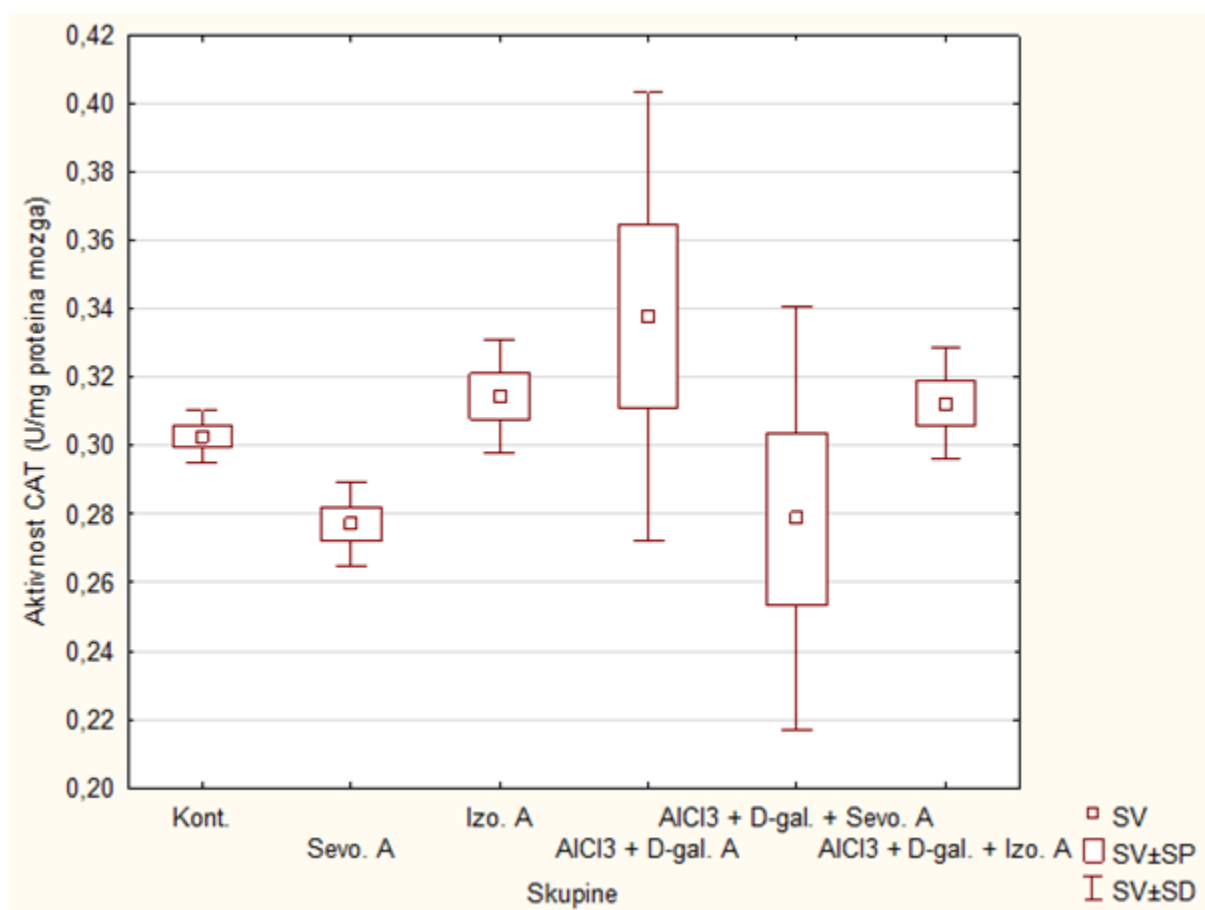
\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\* $p < 0,05$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.



### 4.3.3. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na aktivnost antioksidacijskih enzima (CAT i SOD) u tkivu mozga

Analizom rezultata mjerenja enzimske aktivnosti CAT (Slika 14) nije utvrđena statistički značajna promjena antioksidacijske aktivnosti katalaze kod tretiranih skupina.

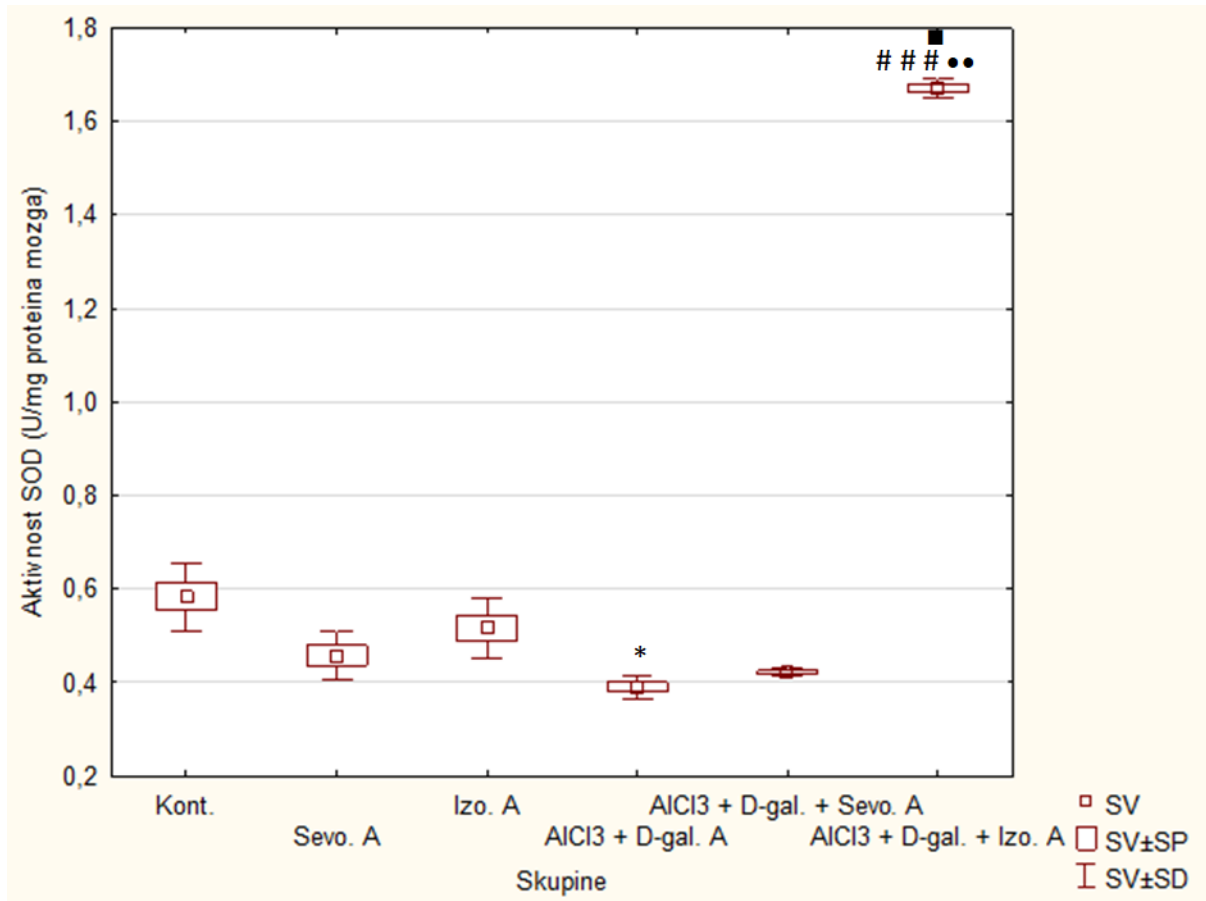


**Slika 14.** Koncentracija CAT nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihovih kombinacija.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AICl<sub>3</sub> + D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AICl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AICl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

Analizom rezultata enzimske aktivnosti SOD (Slika 15) uočava se statistički značajno povišena aktivnost kod skupine  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.} + \text{Izo.}$  u odnosu na skupine  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.}$  ( $p = 0,00003$ ),  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.} + \text{Sevo.}$  ( $p = 0,002$ ) i statistički značajno povećana vrijednost u odnosu na skupinu Sevo. ( $p = 0,04$ ). Također zapaža se statistički značajno snižena aktivnost kod skupine  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.}$  u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p = 0,01$ ).



**Slika 15.** Koncentracija SOD nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihovih kombinacija.

Štakori ( $N = 10$ ) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $\text{SV} \pm \text{SP}$ .

▪Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (▪ $p < 0,05$ ); \*Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.} + \text{Sevo.}$  (\* $p < 0,01$ ); \*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\* $p < 0,05$ ); #Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.}$  (## $p < 0,001$ ).

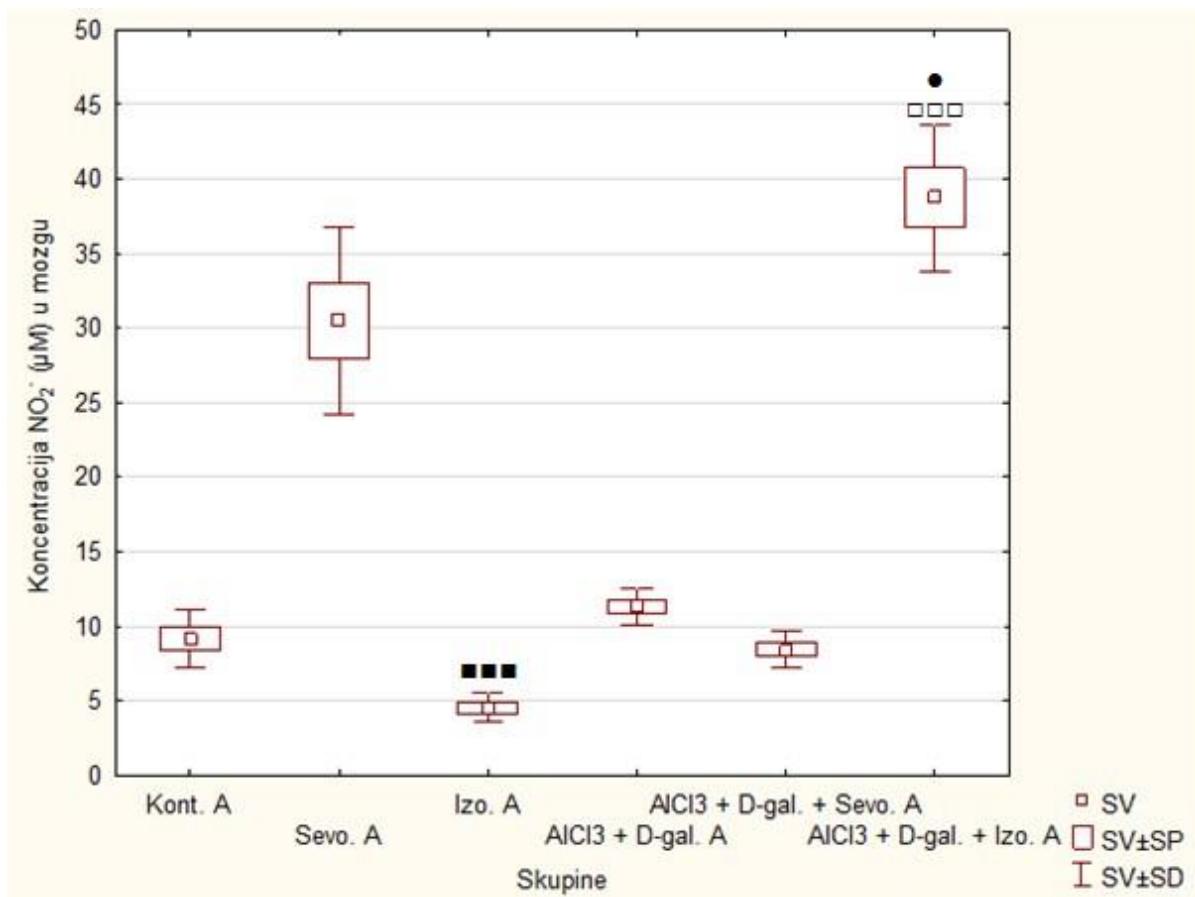
Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran,  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.}$  – aluminijev klorid + D-galaktoza,  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.} + \text{Sevo.}$  – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran,  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.} + \text{Izo.}$  – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

## **4.4. Neuroupalne promjene u tkivu mozga nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijskoga klorida + D-galaktoze**

Neuropala je povezana s toksičnošću aluminija (Al). Al remeti homeostazu željeza što dovodi do disfunkcije bitnih biokemijskih procesa ovisnih o ovom redoks-aktivnom ionu. Al negativno utječe na apsorpciju željeza putem crijeva, otežava njegov transport u serumu, te istiskuje željezo vezanjem na transferin. Al igra važnu ulogu u imunosnom odgovoru budući da je okidač upalne kaskade. Povećani oksidacijski stres posljedično izaziva neuropalu i makrofagnu polarizaciju gdje je hepcidin ključni regulator narušavanja homeostaze željeza i njegove funkcije. Hepcidin također djeluje na ekspresiju feroportina u makrofagima djelujući na makrofagnu polarizaciju prema fenotipu M1 te promjene u sintezi NO, arginaze, metaloproteazne aktivnosti te razinu proupalnih (Th1) citokina.

### **4.4.1. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijskoga klorida + D-galaktoze na makrofagnu aktivnost i polarizaciju u tkivu mozga i serumu**

Rezultati aktivnosti dušikovog oksida (NO) u moždanom tkivu štakora obrađenih subakutnom primjenom inhalacijskih anestetika i aluminijskoga klorida + D-galaktoze, te njihovom kombinacijom prikazani su na Slici 16. Analizom rezultata mjerenja enzimske aktivnosti NO (Slika 16) utvrđena je statistički značajno snižena aktivnost kod skupine Izo. u odnosu na sevofluran skupinu ( $p = 0,0004$ ). Također utvrđena je statistički značajna povišena aktivnost kod skupine  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.} + \text{Izo.}$  u odnosu na izofluran skupinu ( $p = 0,00003$ ) i  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.} + \text{Sevo.}$  skupinu ( $p = 0,01$ ).

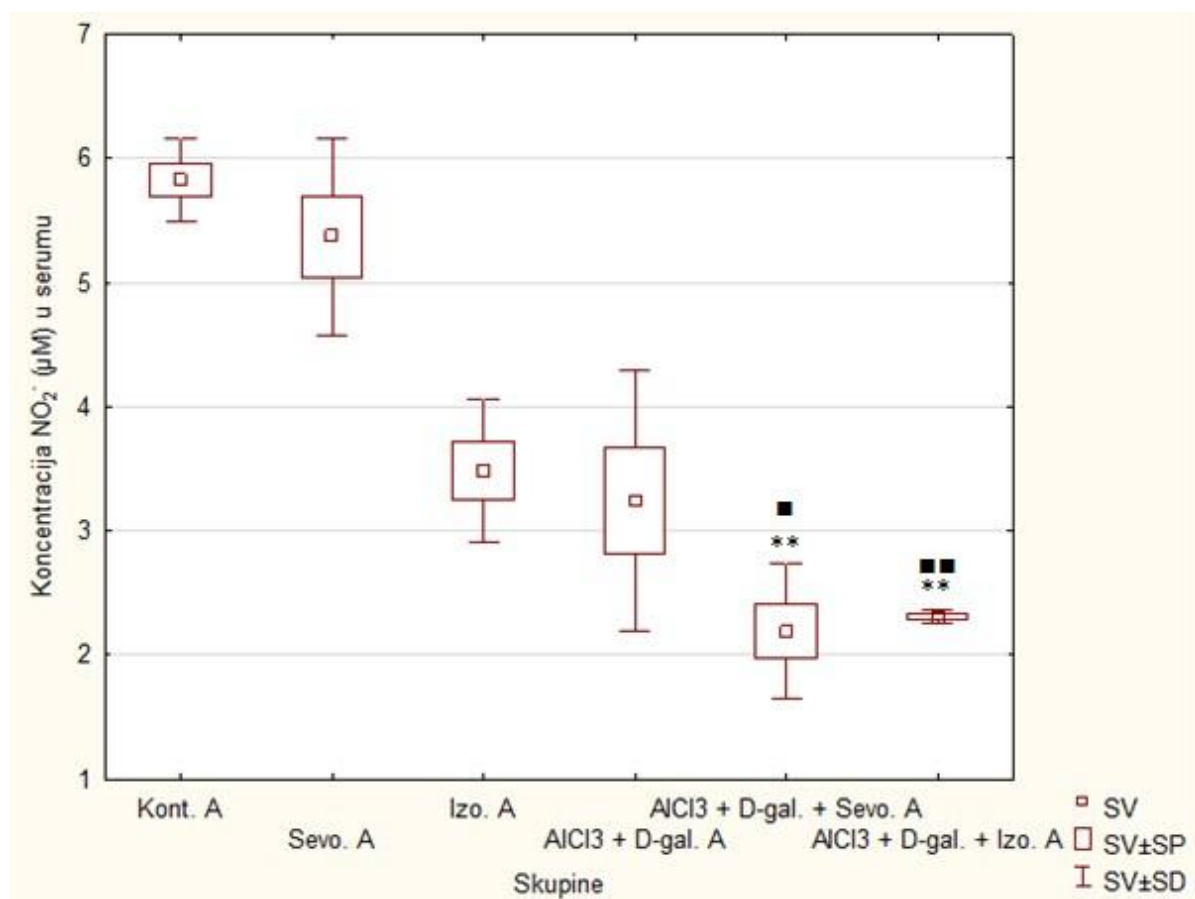


**Slika 16.** Aktivnost NO u mozgu nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihovih kombinacija.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP. ■ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (\*\*\* $p < 0,001$ ); □ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu (□□ $p < 0,001$ ); \* Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. ( $p < 0,05$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

Analizom rezultata koncentracije NO u serumu (Slika 17) uočava se statistički značajno snižena koncentracija kod skupina AlCl<sub>3</sub> + D.-gal + Sevo. u odnosu na kontrolnu ( $p = 0,002$ ) i sevofluran skupinu ( $p = 0,01$ ). Nadalje, zapažena je statistički značajno snižena koncentracija kod skupine AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. također u odnosu na kontrolnu ( $p = 0,001$ ) i sevofluran skupinu ( $p = 0,004$ ).



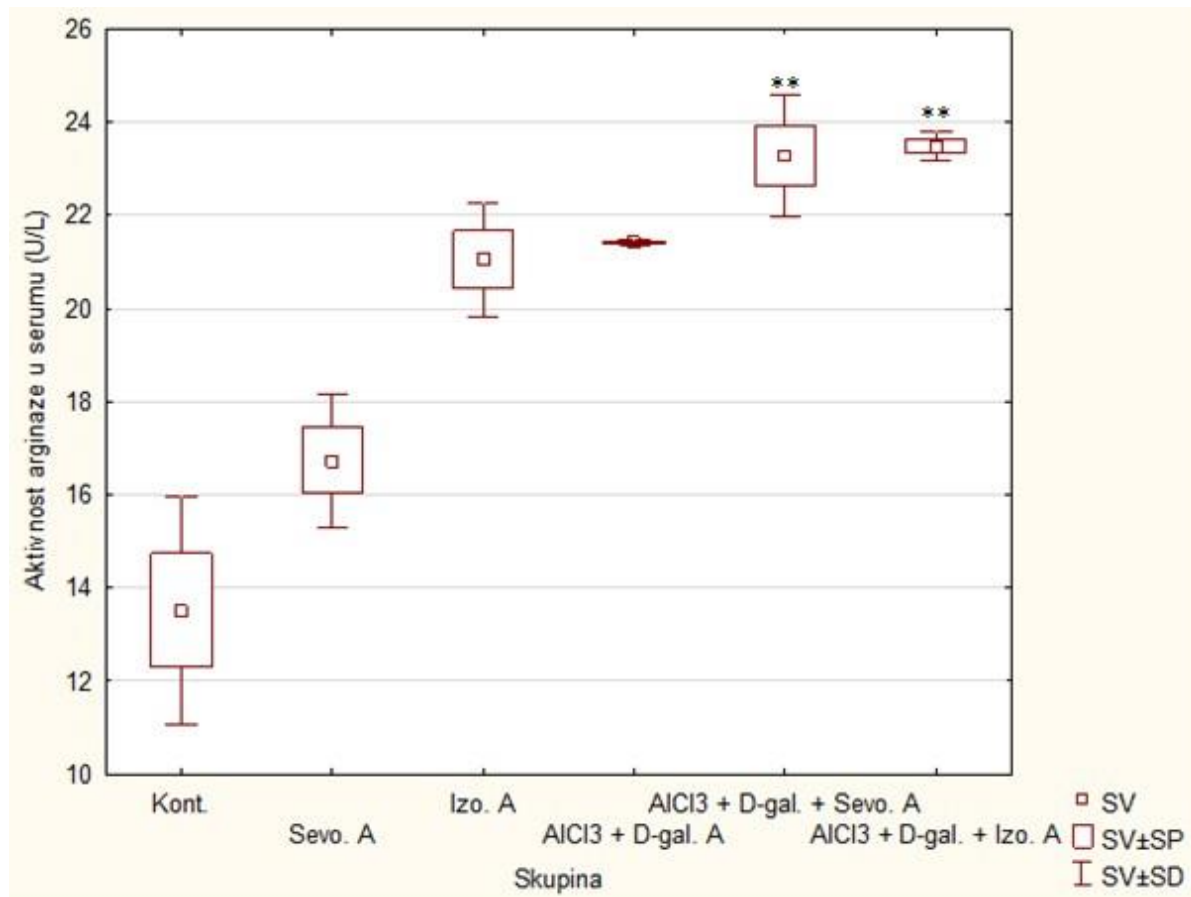
**Slika 17.** Koncentracija NO u serumu nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\*\* $p < 0,01$ ); ■Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (■ $p < 0,05$ ; ■■ $p < 0,01$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

Analizom rezultata aktivnosti arginaze u serumu (Slika 18) uočava se statistički značajno povišena aktivnost kod skupina  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal} + \text{Sevo.}$  i  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.} + \text{Izo.}$  u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p = 0,0069$ ).



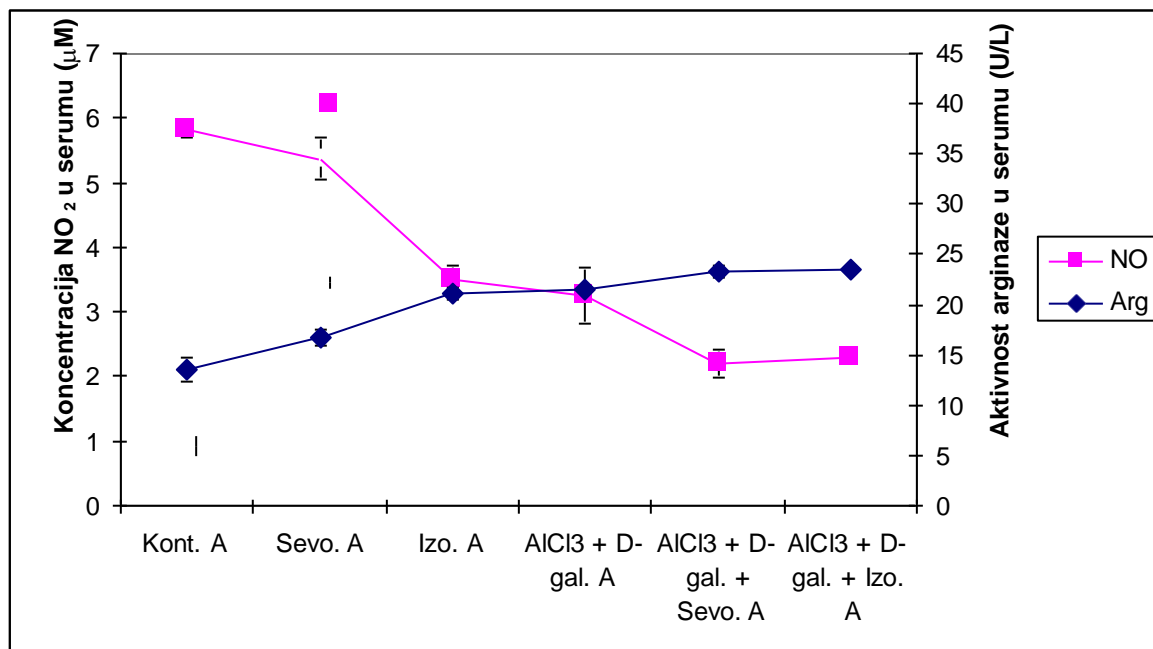
**Slika 18.** Aktivnost arginaze u serumu nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

Štakori ( $N = 10$ ) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $\text{SV} \pm \text{SP}$ .

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\*\* $p < 0,01$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran,  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.}$  – aluminijev klorid + D-galaktoza,  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.} + \text{Sevo.}$  – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran,  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.} + \text{Izo.}$  – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

Praćenjem odnosa između razine NO i aktivnosti arginaze vidljivo je da razina NO pada a aktivnost arginaze raste (Slika 19) tijekom subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminija što jasno ukazuje na promjene u polarizaciji makrofaga. Najveće promjene su vidljive u kombinaciji aluminija s inhalacijskim anestheticima.



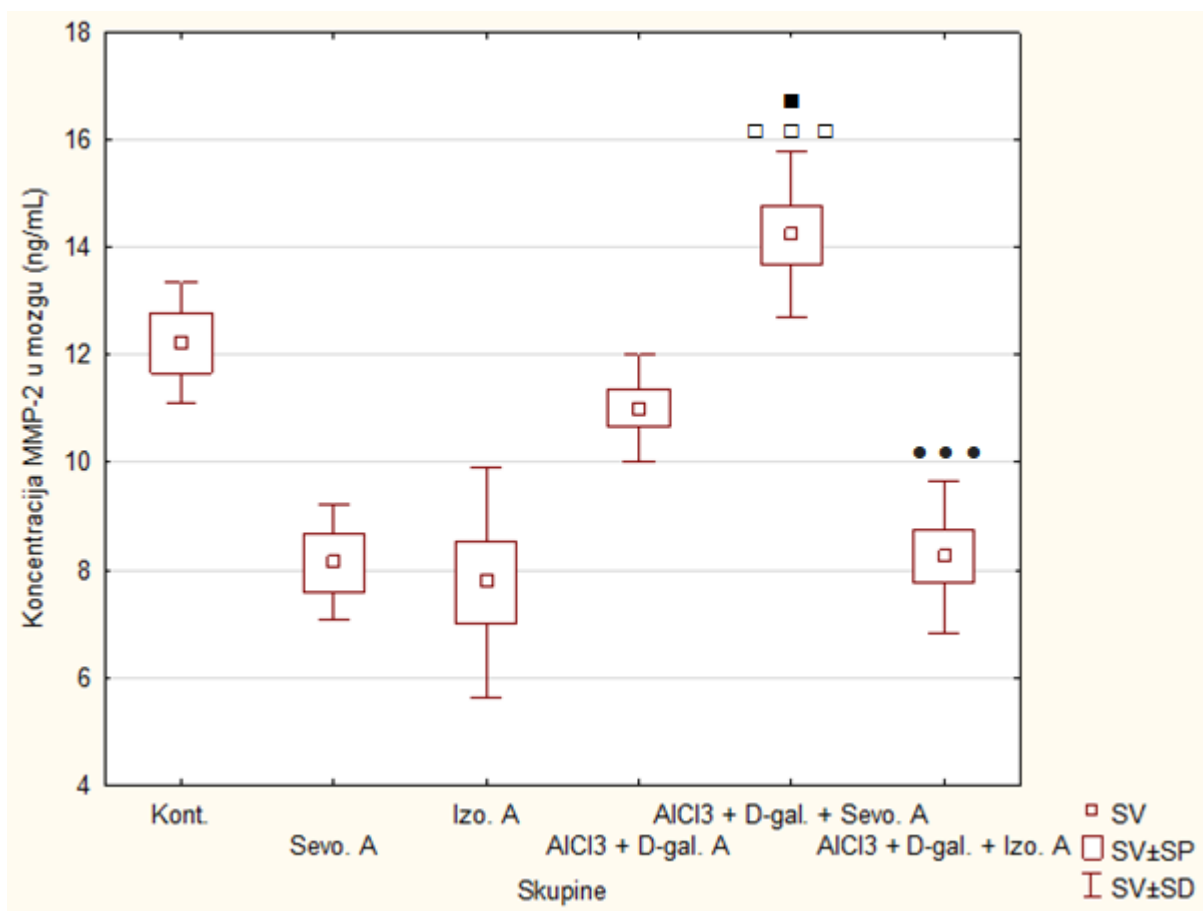
**Slika 19.** Odnos između aktivnost arginaze i koncentracije NO u serumu nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

#### 4.4.2. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na razinu MMP2 i MMP9 u tkivu mozga

Analizom rezultata mjerenja koncentracije MMP-2 u tkivu mozga štakora (Slika 20) zapažena je statistički značajno viša koncentracija kod skupine  $\text{AlCl}_3$  + D-gal. + Sevo. u odnosu na Izo. skupinu ( $p = 0,0001$ ) i Sevo. skupinu ( $p = 0,005$ ). Također, vidljiva je statistički značajno niža koncentracija kod skupine  $\text{AlCl}_3$  + D-gal. + Izo. u odnosu na  $\text{AlCl}_3$  + D-gal. + Sevo. skupinu ( $p = 0,0006$ ).



**Slika 20.** Koncentracija MMP-2 nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

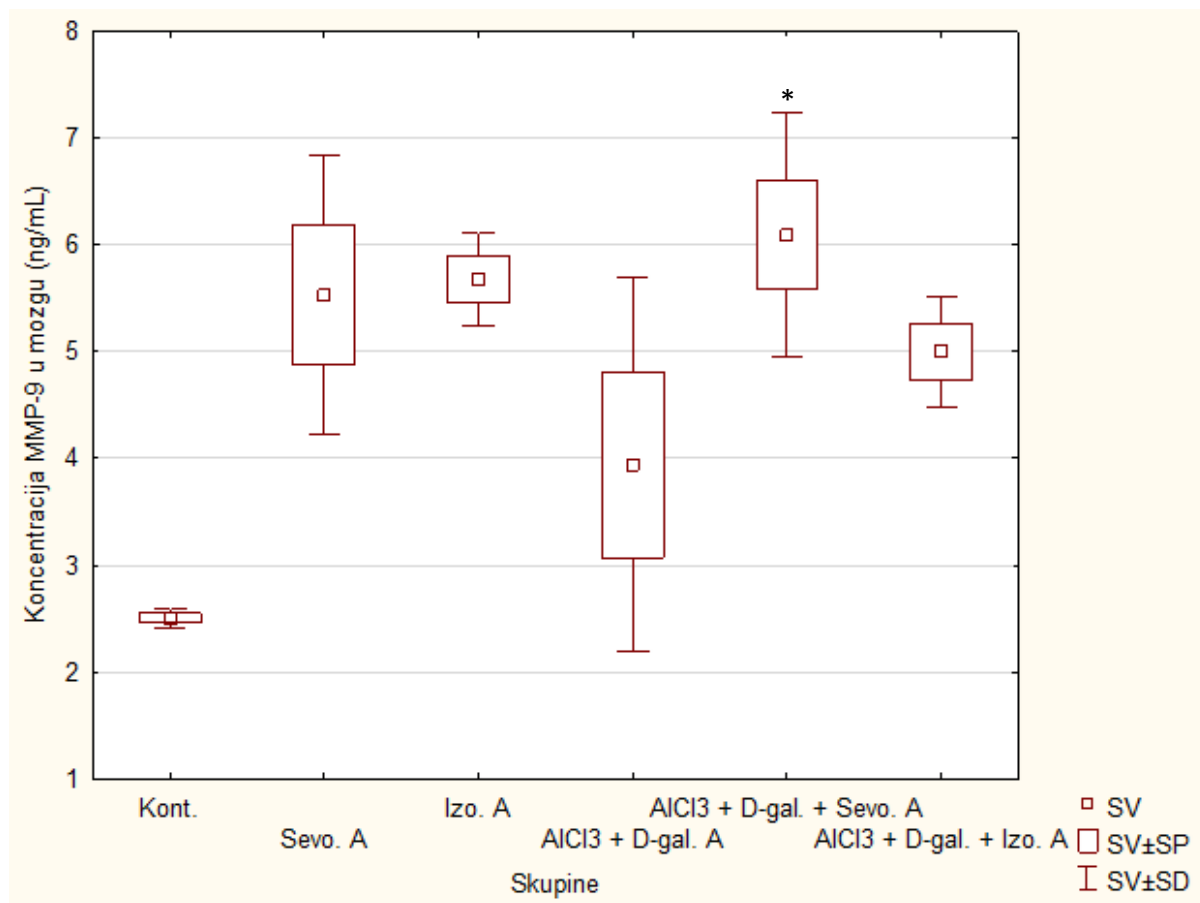
Štakori ( $N = 10$ ) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $\text{SV} \pm \text{SP}$ .

□ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu ( $^{□□□}p < 0,001$ ); ■ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu ( $^{\blacksquare}p < 0,05$ ); ● Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu  $\text{AlCl}_3$  + D-gal. + Sevo. ( $^{***}p < 0,001$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran,  $\text{AlCl}_3$  + D-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza,  $\text{AlCl}_3$  + D-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran,  $\text{AlCl}_3$  + D-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran, MMP-2 – metaloproteinaza-2.



Analizom rezultata mjerenja koncentracije MMP-9 u tkivu mozga štakora (Slika 21) uočena je statistički značajno viša koncentracija kod skupine. AlCl<sub>3</sub> + D-gal.+ Sevo. u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p = 0,02$ ).



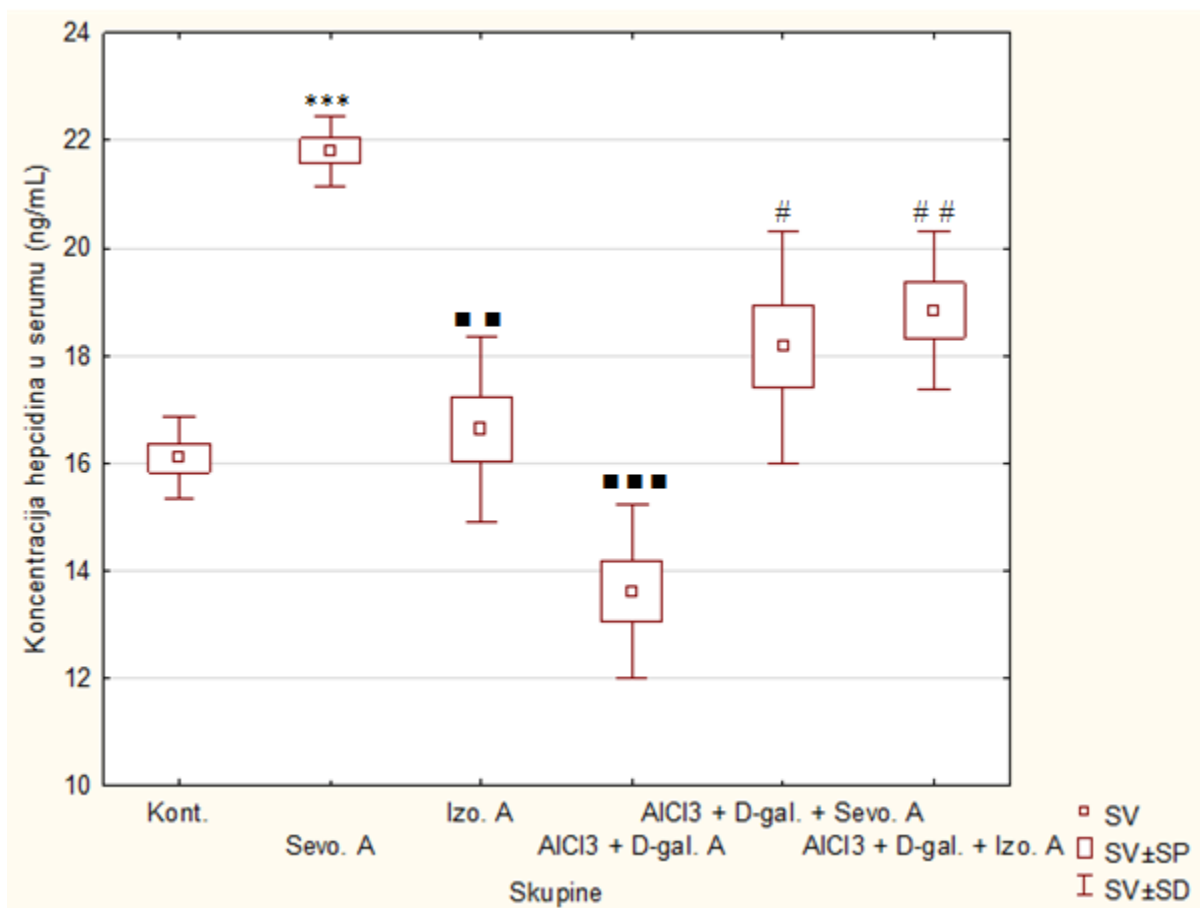
**Slika 21.** Koncentracija MMP-9 nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP. \*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu ( $*p < 0,05$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. – željezo aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran, MMP-9 – metaloproteinaza-9.

#### **4.4.3. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na razinu hepcidina u serumu i feritina u tkivu mozga i serumu**

Analizirajući rezultate mjerenja koncentracije hepcidina u serumu (Slika 22) utvrđena je statistički značajna povišena koncentracija kod skupine Sevo. u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p = 0,0008$ ). Prateći daljnje rezultate uočena je snižena koncentracija kod izoflurana u odnosu na Sevo. skupinu ( $p = 0,01$ ). Nadalje, vidljiva je statistički značajno smanjena koncentracija kod skupine  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.}$  u odnosu na Sevo. skupinu ( $p = 0,000001$ ). Također utvrđena je statistički značajno povišena koncentracija kod skupine  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.} + \text{Izo.}$  u odnosu na  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.}$  skupinu ( $p = 0,004$ ) i  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.} + \text{Sevo.}$  skupinu u odnosu na  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.}$  skupinu ( $p = 0,02$ ).

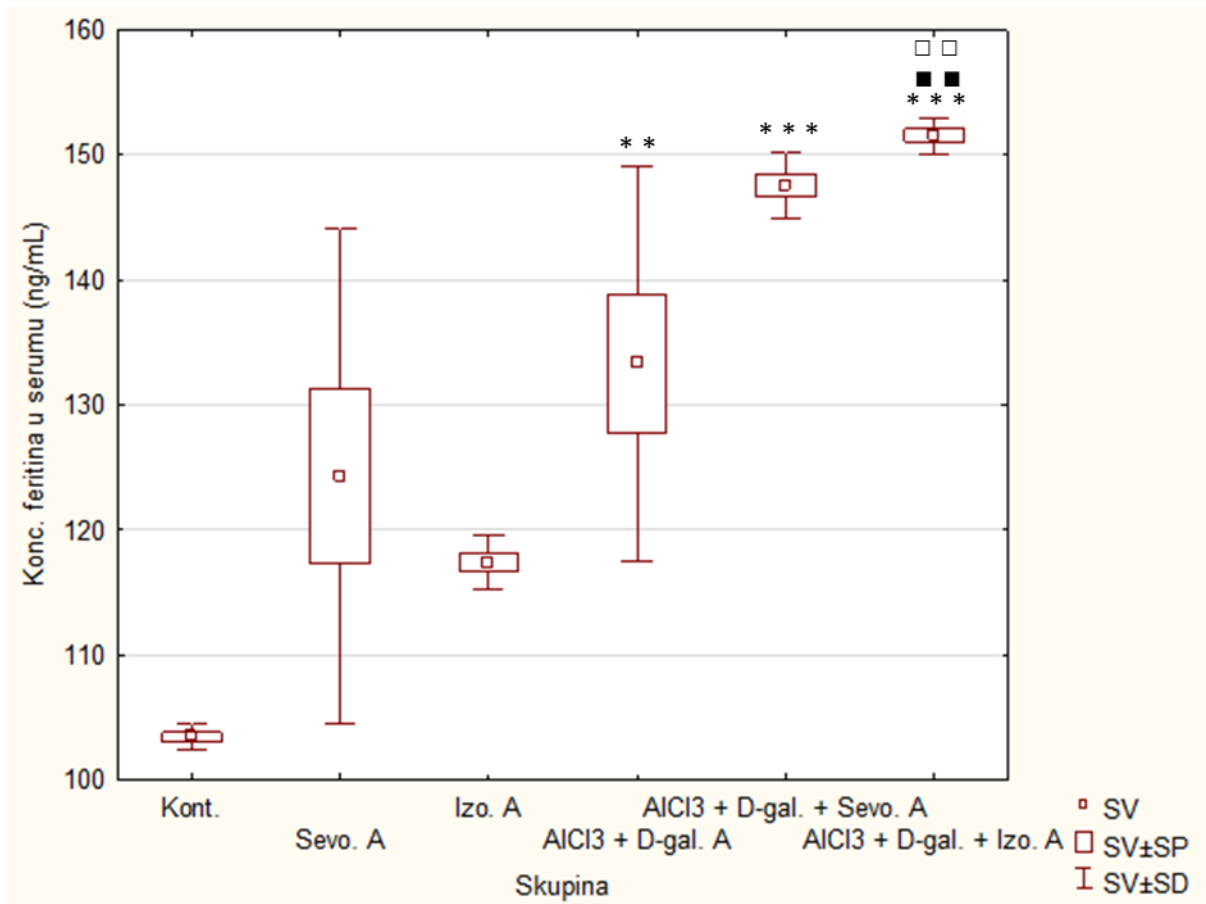


**Slika 22.** Koncentracija hepcidina u serumu nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP. \*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ); ■Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (■ $p < 0,01$ ; ■■ $p < 0,001$ ); #Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D-gal. (# $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

Analizom rezultata mjerenja koncentracije feritina u serumu nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije (Slika 23) vidljiva je statistički značajno povišena koncentracija kod skupine  $\text{AlCl}_3$  + D-gal. + Izo. u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,001$ ), sevofluran skupinu ( $p < 0,01$ ) i izofluran skupinu ( $p < 0,01$ ). Također zapažena je statistički značajno snižena koncentracija kod kontrolne skupine u odnosu na skupine  $\text{AlCl}_3$  + D-gal. + Sevo. ( $p < 0,001$ ) i  $\text{AlCl}_3$  + D-gal. ( $p < 0,01$ ).



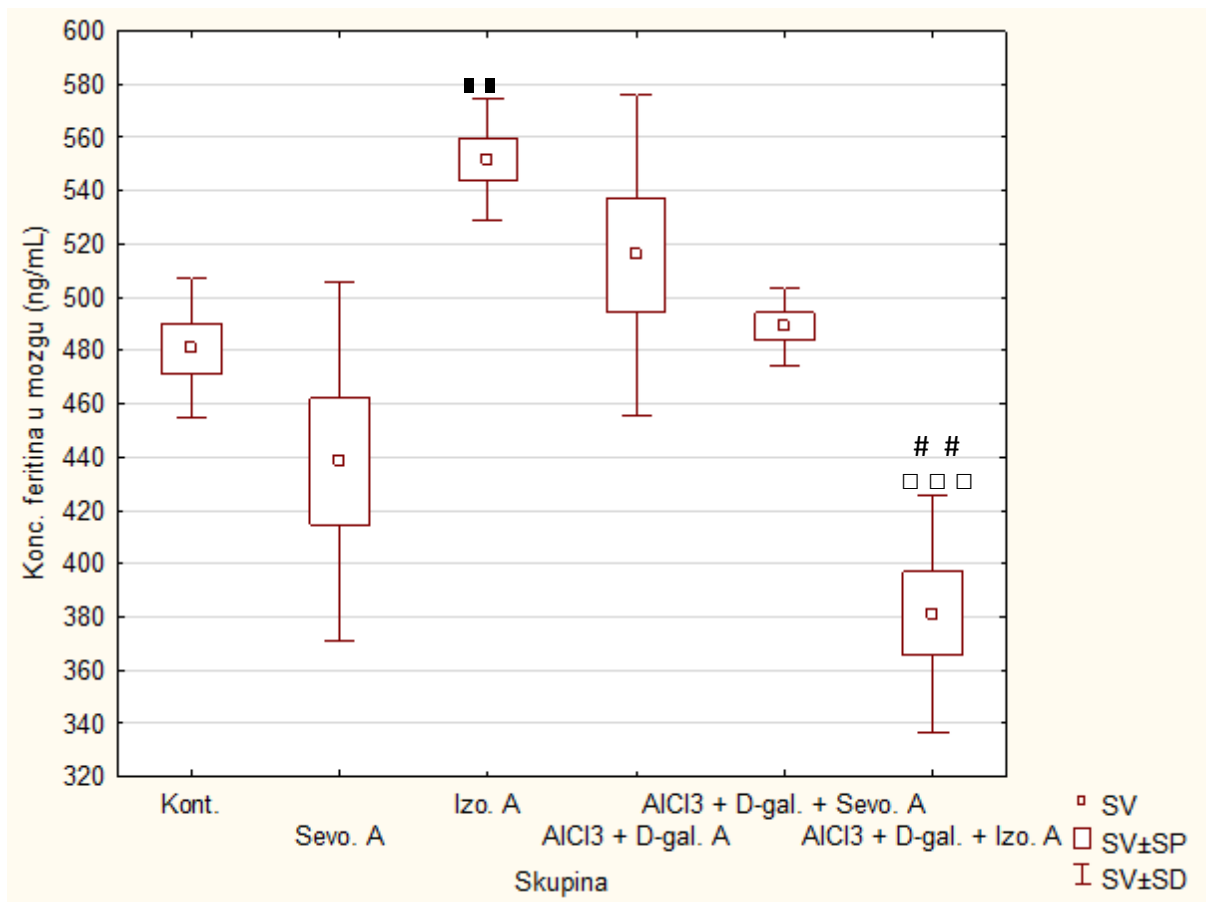
**Slika 23.** Koncentracija feritina u serumu nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $\text{SV} \pm \text{SP}$ .

■ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (■  $p < 0,01$ ); □ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu (□  $p < 0,01$ ); \* Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran,  $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza,  $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran,  $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

Analizom rezultata mjerenja koncentracije feritina u tkivu mozga (Slika 24) vidljiva je statistički značajno povišena koncentracija kod skupine Izo. u odnosu na Sevo. skupinu ( $p = 0,01$ ). Nadalje, utvrđena je statistički značajno snižena koncentracija kod skupine  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.} + \text{Izo.}$  u odnosu na izofluran skupinu ( $p = 0,000009$ ) i  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.}$  skupinu ( $p = 0,006$ ).



**Slika 24.** Koncentracija feritina u mozgu nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

Štakori ( $N = 10$ ) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $\text{SV} \pm \text{SP}$ . ■■ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu ( $p < 0,01$ ); □□ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu ( $p < 0,001$ ); ## Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.}$  ( $p < 0,01$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran,  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.}$  – aluminijev klorid + D-galaktoza,  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.} + \text{Sevo.}$  – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran,  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.} + \text{Izo.}$  – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

#### **4.4.4. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na razinu upalnih citokina u serumu**

Brojna istraživanja pokazuju da oksidacijski stres i proupalni citokini igraju važnu ulogu u neurodegenerativnim bolestima. Aktivirane mikroglija stanice mogu imati potencijalno štetnu ulogu izazivanjem ekspresije proupalnih citokina kao što su interleukin IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF- $\alpha$  koji utječu na okolno moždano tkivo. Nova istraživanja pokazala su da pojačana regulacija proupalnih citokina igra višestruku ulogu u neurodegeneraciji i neuroprotekciji. Razumijevanje signalnih putova proupalnih citokina koji su uključeni u regulaciju AD ključno je za razvoj novog pristupa u terapiji neuroupale. Točnije, interakcija između proupalnih citokina i neurotrofina je važna za održavanje homeostaze centralnog živčanog sustava te poremećaj ove ravnoteže vodi smrti moždanih stanica.

Iz Tablice 7 vidljive su najveće promjene razine proupalnih citokina (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF) u skupinama AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. i posebice AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Izo. u odnosu na kontrolu. Zbog uspostavljanja ravnože javlja se i pojačani odgovor protuupalnih citokina (IL-4, IL-10, IL-13) u istim skupinama (vidi Tablicu 7). Nadalje razina RANTES kemokina je najviše povećana kod sevoflurana i izoflurana što ukazuje na rani proces upale gdje zajedno s citokinima sudjeluju kao posrednici u aktivaciji stanica nespecifične imunosti i njihovoj poveznici s aktivacijom stanica specifične imunosti, posebice u aktivaciji limfocita T, eozinofila i bazofila te novačenju leukocita na mjesto upale.

**Tablica 7.** Razina proupalnih citokina nakon subkutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijska klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

CITOKINI	Skupina <sup>a</sup>	X	SP	*P	■P	#P
IL-1 $\alpha$ (pg/mL)	Kont.	0,147	0,015			
	Sevo. A	0,073	0,009			
	Izo. A	0,105	0,010			
	AlCl <sub>3</sub> + D-gal. A	0,067	0,001			
	AlCl <sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. A	0,440	0,036		0,018896 <sup>■</sup>	
	AlCl <sub>3</sub> + D-gal. + Izo. A	0,403	0,014		0,037295 <sup>■</sup>	
IL-1 $\beta$ (pg/mL)	Kont.	0,084	0,004			
	Sevo. A	0,259	0,021			
	Izo. A	0,313	0,031			
	AlCl <sub>3</sub> + D-gal. A	0,244	0,002			
	AlCl <sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. A	0,463	0,039	0,004773 <sup>**</sup>		
	AlCl <sub>3</sub> + D-gal. + Izo. A	0,478	0,010	0,004773 <sup>**</sup>		
IL-2 (pg/mL)	Kont.	0,105	0,023			
	Sevo. A	0,306	0,051			
	Izo. A	0,289	0,022			
	AlCl <sub>3</sub> + D-gal. A	0,425	0,060			
	AlCl <sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. A	0,337	0,019			
	AlCl <sub>3</sub> + D-gal. + Izo. A	0,617	0,071	0,002170 <sup>**</sup>		
IL-4 (pg/mL)	Kont.	0,036	0,003			
	Sevo. A	0,056	0,013			
	Izo. A	0,048	0,002			
	AlCl <sub>3</sub> + D-gal. A	0,010	0,001			
	AlCl <sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. A	0,162	0,013			0,020614 <sup>#</sup>
	AlCl <sub>3</sub> + D-gal. + Izo. A	0,364	0,058	0,029028 <sup>*</sup>		0,000950 <sup>###</sup>

**Tablica 7. nastavak**

<b>CITOKINI</b>	<b>Skupina<sup>a</sup></b>	<b>X</b>	<b>SP</b>	<b>*P</b>	<b>■P</b>
<b>IL-6</b> (pg/mL)	<b>Kont.</b>	0,069	0,011		
	<b>Sevo. A</b>	0,221	0,046		
	<b>Izo. A</b>	0,344	0,034	0,034326*	
	<b>AlCl<sub>3</sub> + D-gal. A</b>	0,149	0,014		
	<b>AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. A</b>	0,277	0,011		
	<b>AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Izo. A</b>	0,460	0,052	0,001772**	
<b>IL-10</b> (pg/mL)	<b>Kont.</b>	0,113	0,002		
	<b>Sevo. A</b>	0,185	0,014		
	<b>Izo. A</b>	0,366	0,023		
	<b>AlCl<sub>3</sub> + D-gal. A</b>	0,201	0,014		
	<b>AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. A</b>	0,410	0,009	0,029028*	
	<b>AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Izo. A</b>	0,543	0,020	0,000950***	0,034326■
<b>IL-12</b> (pg/mL)	<b>Kont.</b>	0,047	0,003		
	<b>Sevo. A</b>	0,061	0,009		
	<b>Izo. A</b>	0,050	0,002		
	<b>AlCl<sub>3</sub> + D-gal. A</b>	0,074	0,018		
	<b>AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. A</b>	0,407	0,043		
	<b>AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Izo. A</b>	0,434	0,025	0,040497*	
<b>IL-13</b> (pg/mL)	<b>Kont.</b>	0,041	0,001		
	<b>Sevo. A</b>	0,126	0,010		
	<b>Izo. A</b>	0,120	0,010		
	<b>AlCl<sub>3</sub> + D-gal. A</b>	0,122	0,006		
	<b>AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. A</b>	0,468	0,008	0,008409**	
	<b>AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Izo. A</b>	0,534	0,052	0,002653**	



Tablica 7. nastavak

CITOKINI	Skupina <sup>a</sup>	X	SP	*P	■P
IFN- $\gamma$ (pg/mL)	Kont.	0,107	0,007		
	Sevo. A	0,358	0,013		
	Izo. A	0,354	0,007		
	AlCl <sub>3</sub> + D-gal. A	0,508	0,026		
	AlCl <sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. A	0,702	0,007	0,007663**	
	AlCl <sub>3</sub> + D-gal. + Izo. A	0,708	0,022	0,002930**	
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	Kont.	0,079	0,004		
	Sevo. A	0,220	0,017		
	Izo. A	0,268	0,008		
	AlCl <sub>3</sub> + D-gal. A	0,212	0,012		
	AlCl <sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. A	0,710	0,010	0,020614*	
	AlCl <sub>3</sub> + D-gal. + Izo. A	0,835	0,016	0,000950***	
GM-CSF (pg/mL)	Kont.	0,037	0,004		
	Sevo. A	0,039	0,001		
	Izo. A	0,052	0,003		
	AlCl <sub>3</sub> + D-gal. A	0,088	0,005		
	AlCl <sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. A	0,421	0,021	0,047666*	
	AlCl <sub>3</sub> + D-gal. + Izo. A	0,607	0,010	0,002653**	0,010108 <sup>■</sup>
RANTES (pg/mL)	Kont.	1,718	0,073		
	Sevo. A	7,796	0,174	0,001772**	
	Izo. A	7,1095	0,304	0,029028*	
	AlCl <sub>3</sub> + D-gal. A	6,112	0,273		
	AlCl <sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. A	6,146	0,286		
	AlCl <sub>3</sub> + D-gal. + Izo. A	5,117	0,433		

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV  $\pm$  SP.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ); # Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. (#  $p < 0,05$ ; ###  $p < 0,001$ ); ■Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (■ $p < 0,05$ ).

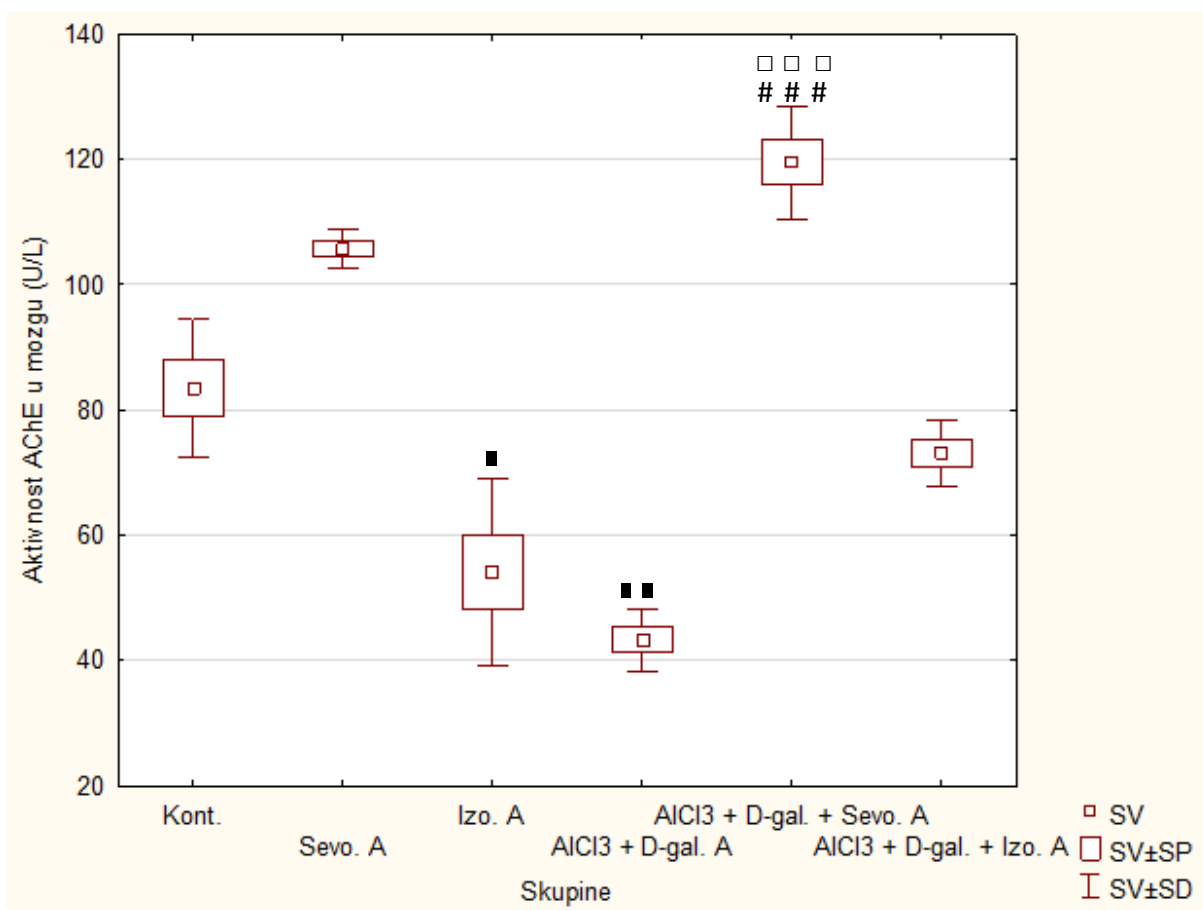
Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

## **4.5. Neurohistopatološke promjene u tkivu mozga nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijska klorida + D-galaktoze**

AD karakterizira nakupljanje unutarstaničnih neurofibrilarnih čvorova (NFT) i izvanstaničnih amiloidnih beta ( $A\beta$ ) plakova (230).  $A\beta$  plakovi aktiviraju mikroglija stanice, vodeći povećanju oksidativnog stresa i lokalnog upalnog odgovora te na taj način doprinose neurotoksičnosti. Smrt živčanih stanica dovodi do manjka acetilkolina (ACh), neurotransmitera uključenog u pamćenje. Aktivni kisik uzrokuje izravno oštećenje neurona povećanjem unutarstaničnog  $Ca^{2+}$  i upalom. Proizvodnja citokina kao rezultat upalnih odgovora inhibira moždani neurotrofni faktor (BDNF). Neurohistopatološke promjene u tkivu mozga nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijska klorida + D-galaktoze su bile daljnji slijed našeg istraživanja.

### **4.5.1. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijska klorida + D-galaktoze na aktivnost acetilkolinesteraze (AChE) u tkivu mozga**

Analizom rezultata aktivnosti AChE (Slika 25) vidljiva je snižena aktivnost kod skupina Izo. ( $p = 0,01$ ) i  $AlCl_3 + D$ .-gal. ( $p = 0,002$ ) u odnosu na sevofluran skupinu. Također zapažena je statistički značajno povišena aktivnost kod skupine  $AlCl_3 + D$ .-gal.+ Sevo. u odnosu na izofluran ( $p = 0,0007$ ) i  $AlCl_3 + D$ .-gal. skupinu ( $p = 0,0001$ ).



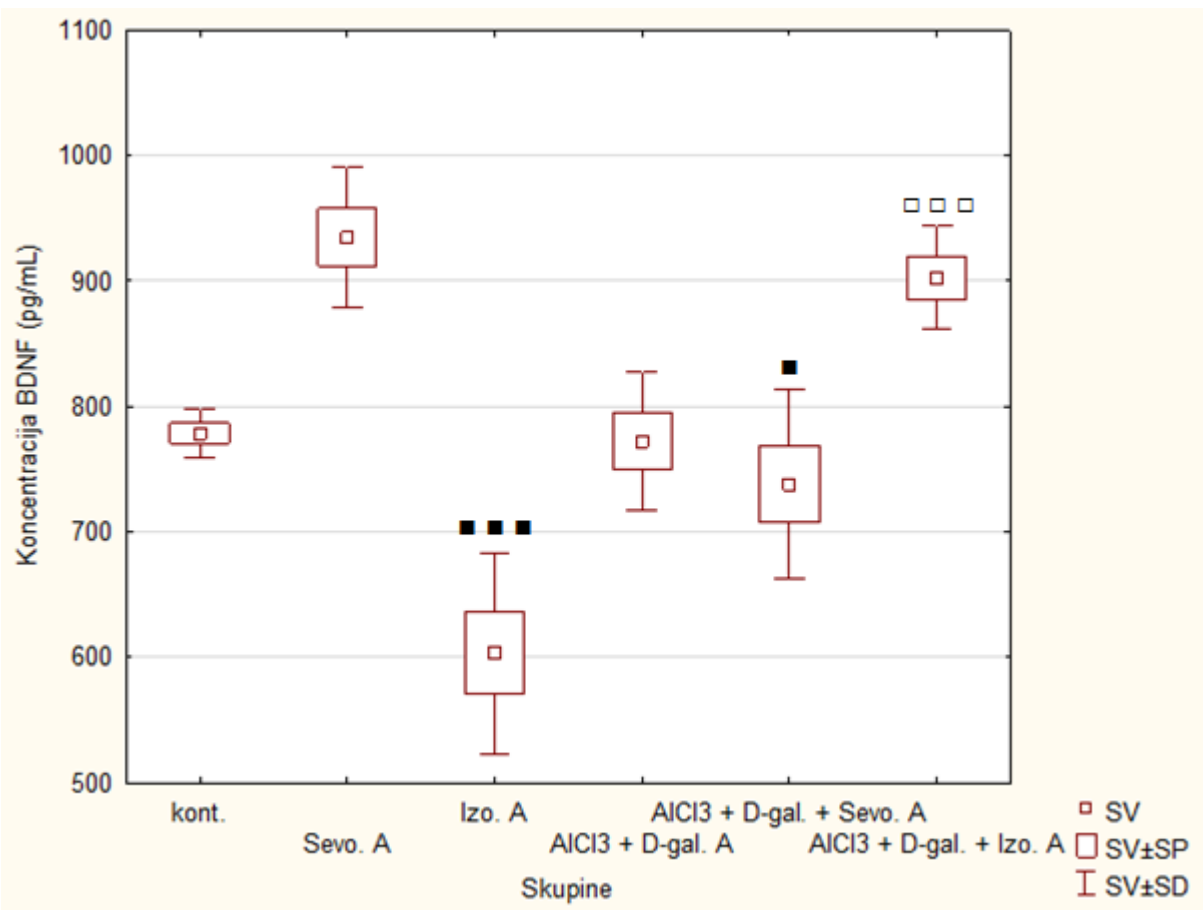
**Slika 25.** Aktivnost AChE nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP. \*Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ); #Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D-gal. (###  $p < 0,001$ ); □Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu (□□□  $p < 0,001$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

#### **4.5.2. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na koncentraciju moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF) u mozgu**

Analizom rezultata koncentracije BDNF-a u uzorku homogenata tkiva mozga (Slika 26) uočena je statistički značajno manja koncentracija kod skupine Izo. u odnosu na sevofluran skupinu ( $p = 0,00006$ ). Prateći daljnje rezultate zapažena je statistički značajno povišena koncentracija kod skupine  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.} + \text{Izo.}$  u odnosu na izofluran skupinu ( $p = 0,0007$ ). Također, zabilježena je statistički značajno manja koncentracija za skupinu  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.} + \text{Sevo.}$  u odnosu na sevofluran skupinu ( $p = 0,02$ ).



**Slika 26.** Koncentracija BDNF-a nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP. \*Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ); □Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu (□□□ $p < 0,001$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

### 4.5.3. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na neurohistopatološke promjene u mozgu

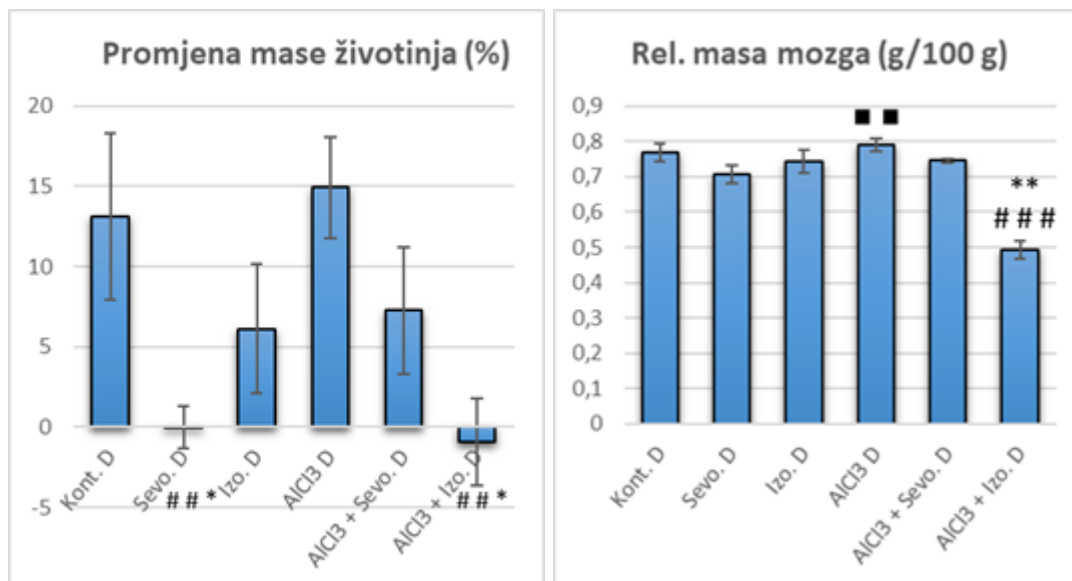
Analizom histoloških preparata nakon imunohistokemijskog označavanja biljezima 4G8, AT8, PHF1 i MC1 nisu uočene neurodegenerativne promjene, odnosno nije dokazana prisutnost pozitivnog signala kod skupina tretiranih inhalacijskim anestheticima i aluminijevim kloridom + D-galaktozom te njihovom kombinacijom tijekom 7 dana.

## **4.6. Patofiziološke promjene štakora nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijskoga klorida + D-galaktoze**

### **4.6.1. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijskoga klorida + D-galaktoze na promjenu mase životinja i relativnu težinu mozga**

Praćenjem rezultata promjene tjelesnih masa životinja nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika,  $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. i njihovih kombinacija zapažamo statistički značajan gubitak tjelesne mase u skupini izloženoj sevofluranu i skupini obrađenoj  $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. + Izo. u odnosu na skupinu obrađenu  $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. ( $p < 0,01$ ) i kontrolnu skupinu ( $p < 0,05$ ) (Slika 27a).

Na Slici 27b prikazani su rezultati promjene relativne težine mozga životinja tretiranih kroničnim dozama inhalacijskih anestetika,  $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. i njihovim kombinacijama te se zapaža da je došlo do povećanja relativne mase mozga kod skupine  $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. ( $p < 0,05$ ) u odnosu na sevofluran skupinu. Također je vidljivo statistički značajno smanjenje relativne težine mozga kod skupine obrađene  $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. + Izo. u odnosu na  $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. ( $p < 0,001$ ) i kontrolnu skupinu ( $p < 0,01$ ).



a)

b)

**Slika 27.** Promjena tjelesne mase (a) i relativne mase mozga štakora (b) nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ); #Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D-gal. (### $p < 0,01$ ; #### $p < 0,001$ ); ■Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (■■ $p < 0,01$ ).

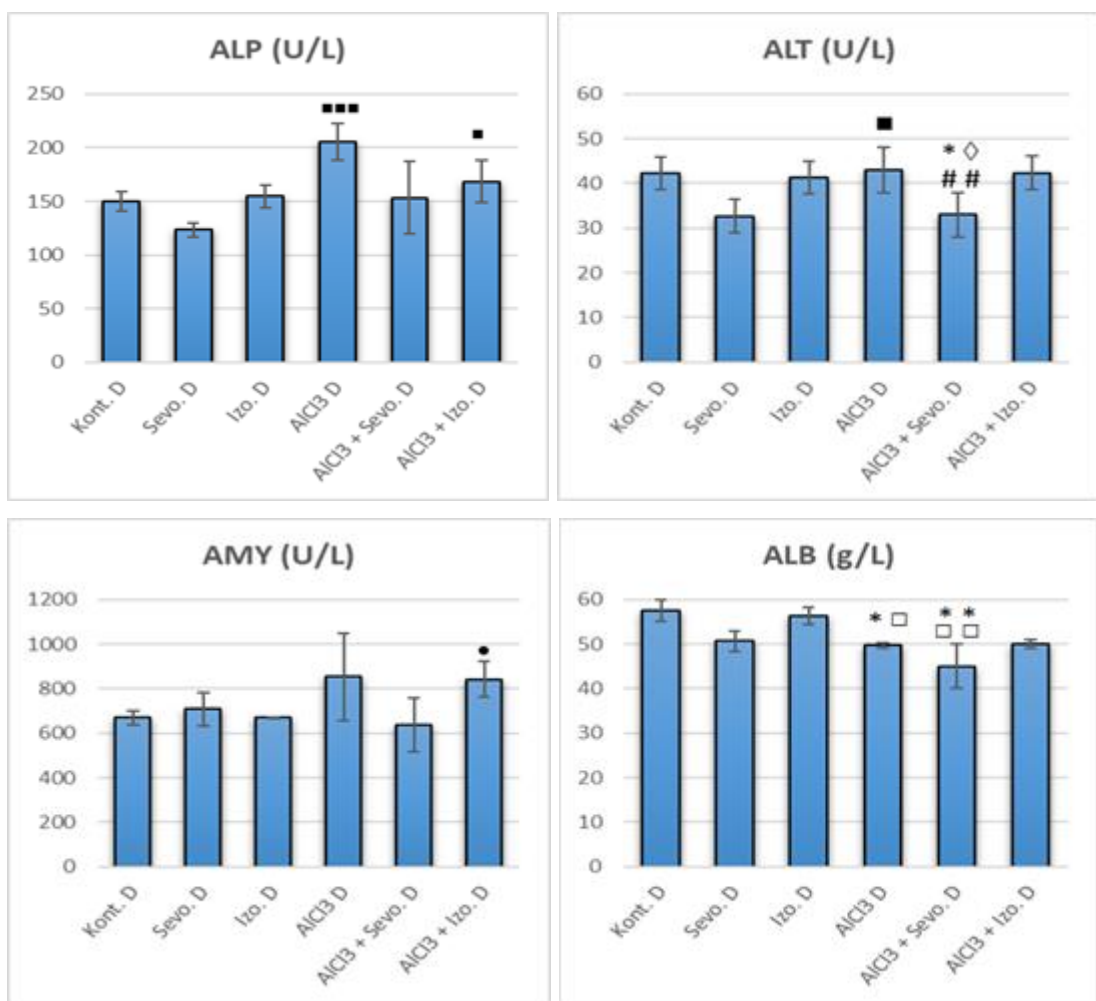
Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

#### **4.6.2. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na biokemijske odrednice štakora**

Rezultati promjena enzima i proteina prikazani su na Slici 28, a rezultati promjena metabolita i supstrata na Slici 29. Najznačajnije promjene u biokemijskim parametrima vidljive su u skupinama obrađenim  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.}$ ,  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.} + \text{Sevo.}$ ,  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.} + \text{Izo.}$  te izofluranom. U skupini izloženoj izofluranu koncentracija ukupnih proteina je statistički značajno povećana u odnosu na skupine obrađene  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.} + \text{Sevo.}$  ( $p < 0,001$ ) i  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.}$  ( $p < 0,05$ ). Koncentracije ALP-a i ALT-a su statistički značajno povećane u skupini obrađenoj  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.}$ , a koncentracija ALB-a snižena u skupini obrađenoj  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.}$  (Slika 28). Prateći rezultate u skupini obrađenoj  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.} + \text{Sevo.}$  koncentracije ALT-a, ALB-a i TP-a su statistički značajno snižene. U skupini obrađenoj  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.} + \text{Izo.}$  vidljiv je značajan porast koncentracije ALP-a, amilaze i globulina (vidi Sliku 28).

Na Slici 29 prikazane su promjene metabolita i supstrata te je zapaženo statistički značajno povećanje koncentracije kreatinina u skupini izloženoj sevofluranu, dok je kod skupine izložene izofluranu također vidljivo statistički značajno povećanje glukoze te natrija i kalija. Prateći daljnje rezultate, zapaženo je da su u skupini obrađenoj  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.}$  koncentracije BUN-a, CRE-a i fosfora značajno povećane. Analizirajući rezultate skupine obrađivane  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.} + \text{Sevo.}$  vidljiva je statistički značajno povećana koncentracija fosfora, dok je koncentracija kalcija smanjena. Iz Slike 29 zapaženo je da su u skupini obrađenoj  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.} + \text{Izo.}$  koncentracije natrija, glukoze i kreatinina značajno povećane.

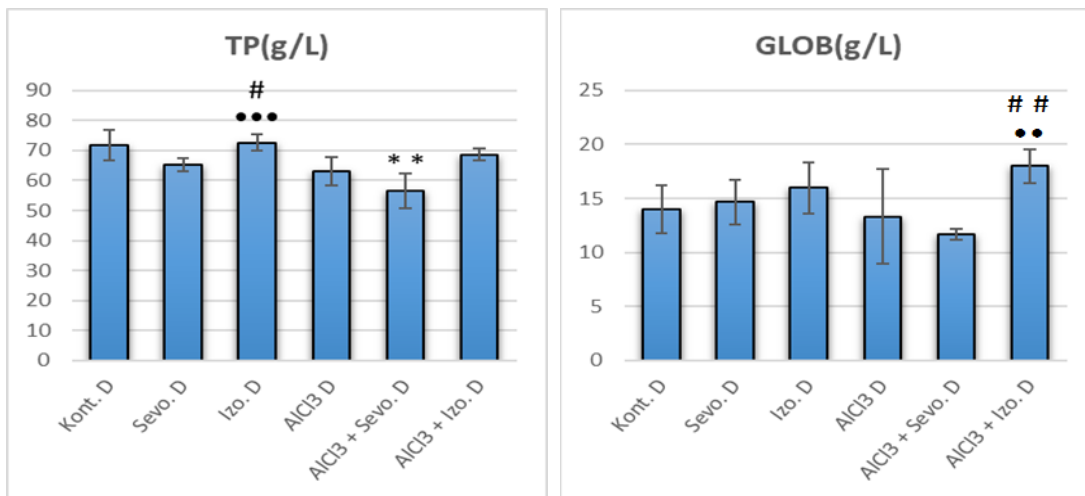




**Slika 28.** Koncentracije enzima i proteina u krvi štakora nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktózom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP. \*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ); ■ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (■ $p < 0,05$ ; ■■ $p < 0,001$ ); □ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu (□ $p < 0,05$ ; □□ $p < 0,01$ ); # Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D-gal. (## $p < 0,01$ ); ° Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. (° $p < 0,05$ ); ° Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Izo. (° $p < 0,05$ ).

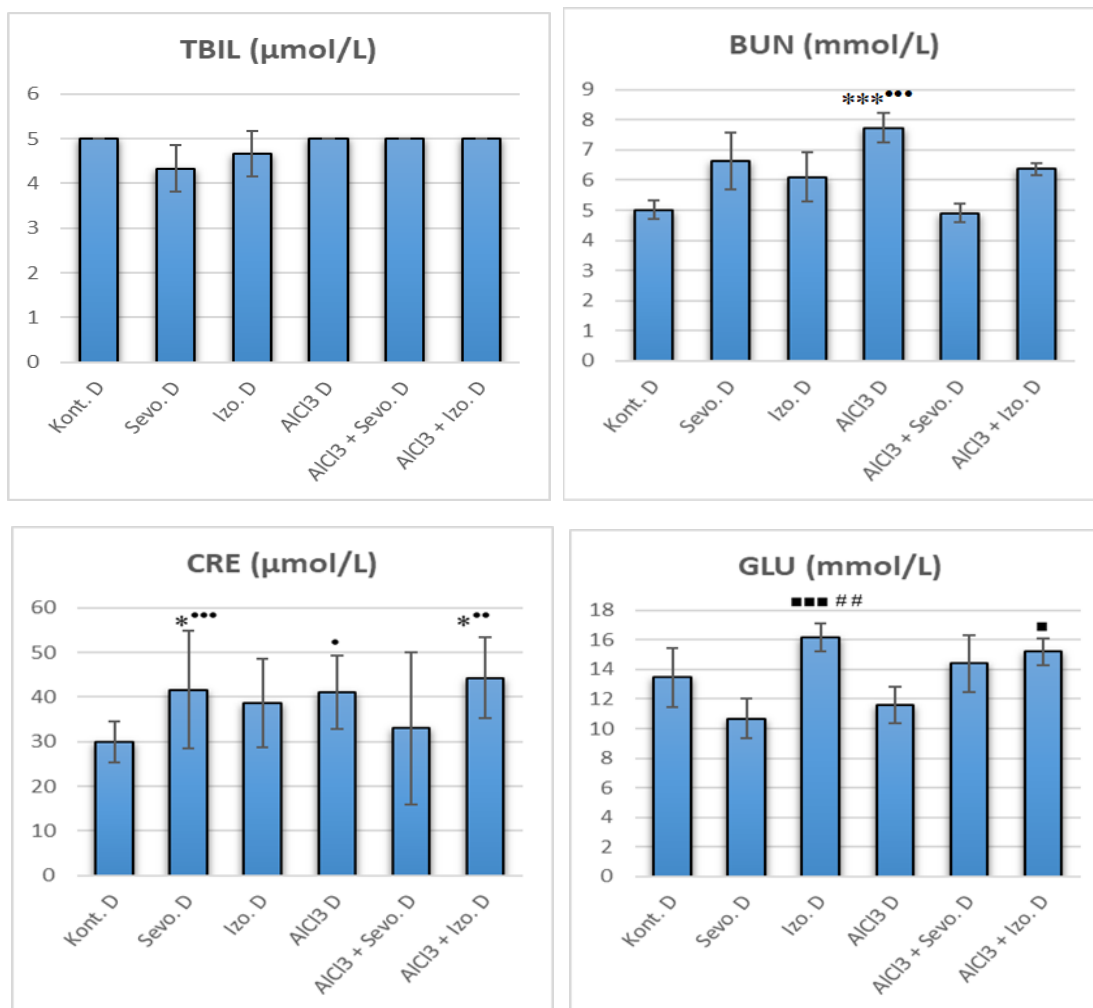
Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, ALP – alkalna fosfataza, ALT – alanin aminotransferaza, AMY – amilaza, ALB – albumin, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.



### Nastavak Slike 28.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\*\* $p < 0,01$ ); <sup>□</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu (<sup>□</sup> $p < 0,05$ ; <sup>□□</sup> $p < 0,01$ ); # Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D-gal. (#  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ); \*Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

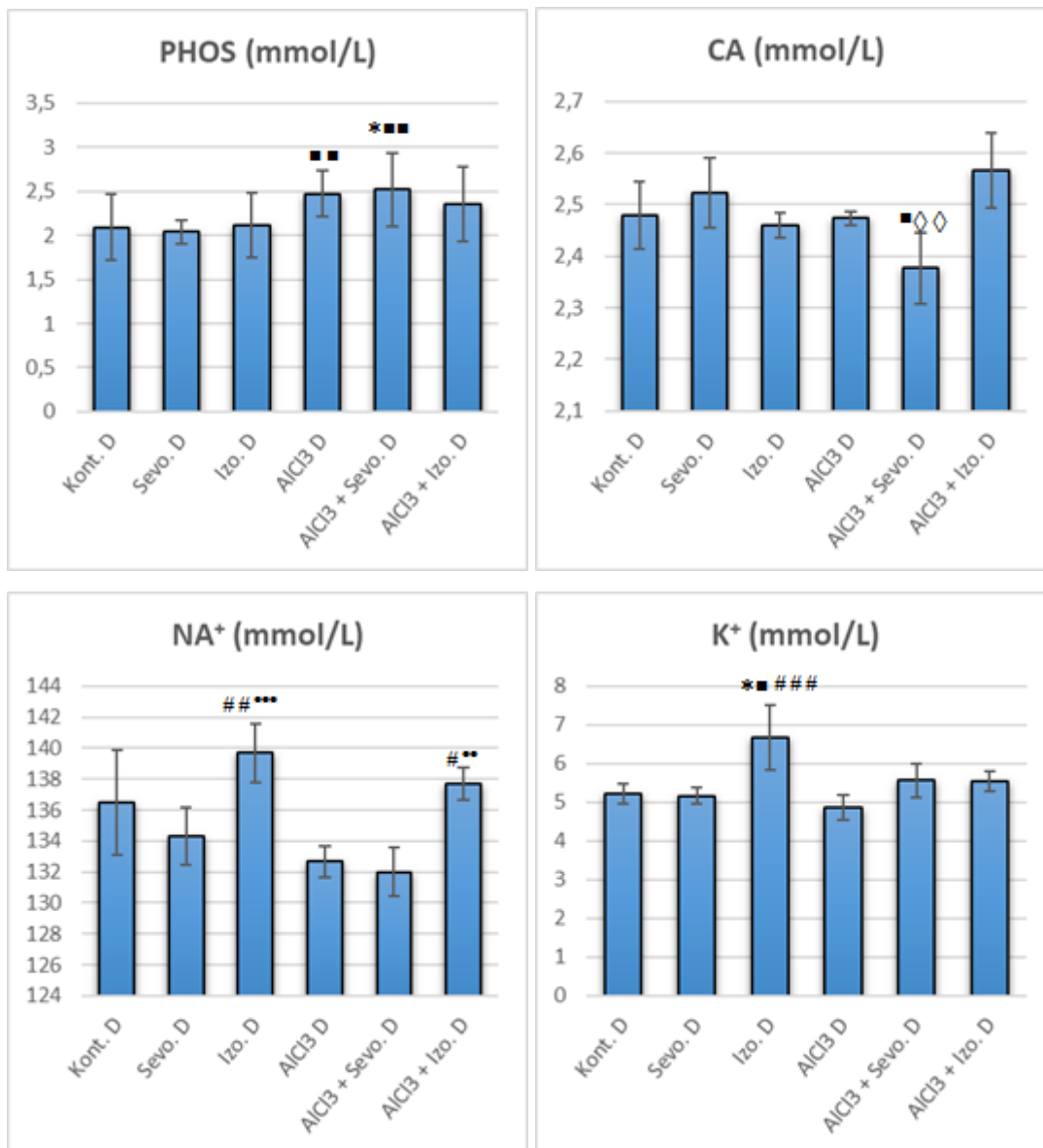
Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, TP – ukupni proteini, GLOB – globulin, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.



**Slika 29.** Koncentracije metabolita i supstrata u krvi štakora nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ); ■Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (■ $p < 0,05$ ; ■■■ $p < 0,001$ ); #Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D-gal. (■■ $p < 0,01$ ); \*Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

Kratice: ip – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, TBIL – ukupni bilirubin, BUN – dušik uree u krvi, CRE – kreatinin, GLU – glukoza u krvi, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.



### Nastavak Slike 29.

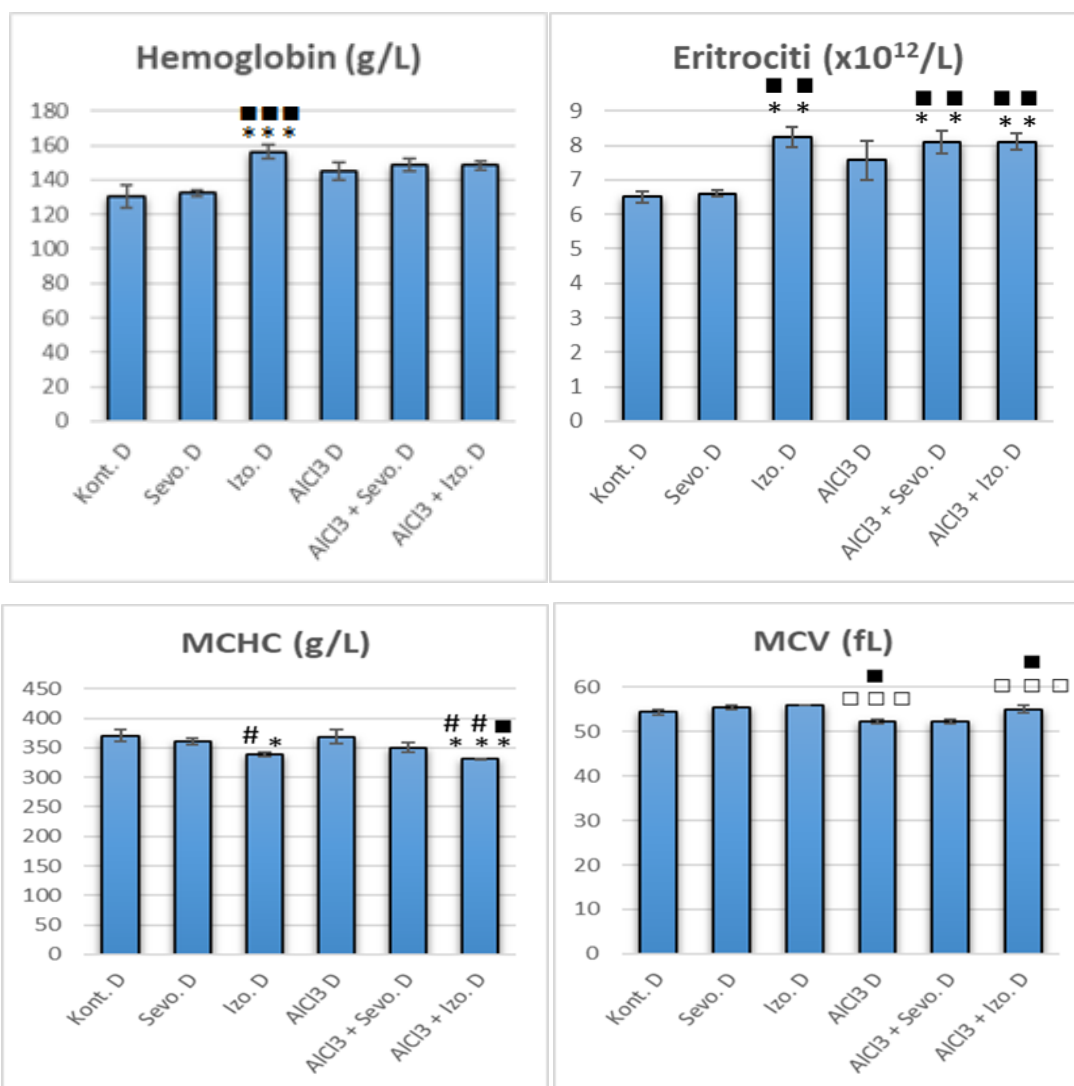
\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\* $p < 0,05$ ); ■Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (■ $p < 0,05$ ; ■■ $p < 0,01$ ); #Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D-gal. (# $p < 0,05$ ; ### $p < 0,01$ ; #### $p < 0,001$ ); \*Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. (\* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,001$ ); ◊Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. (◊ $p < 0,01$ ).

Kratice: ip – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, PHOS – fosfor, Ca<sup>2+</sup> – kalcij, Na<sup>+</sup> – natrij, K<sup>+</sup> – kalij, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

### **4.6.3. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na hematološke odrednice štakora**

Rezultati hematoloških parametara iz krvi štakora prikazani su na Slici 30. Prateći rezultate ukupnog broja eritrocita vidljivo je statistički značajno povećanje u skupinama obrađenim izofluranom ( $p < 0,01$ ),  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.} + \text{Sevo.}$  ( $p < 0,01$ ) i  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.} + \text{Izo.}$  ( $p < 0,01$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu i sevofluran skupinu (Slika 30).

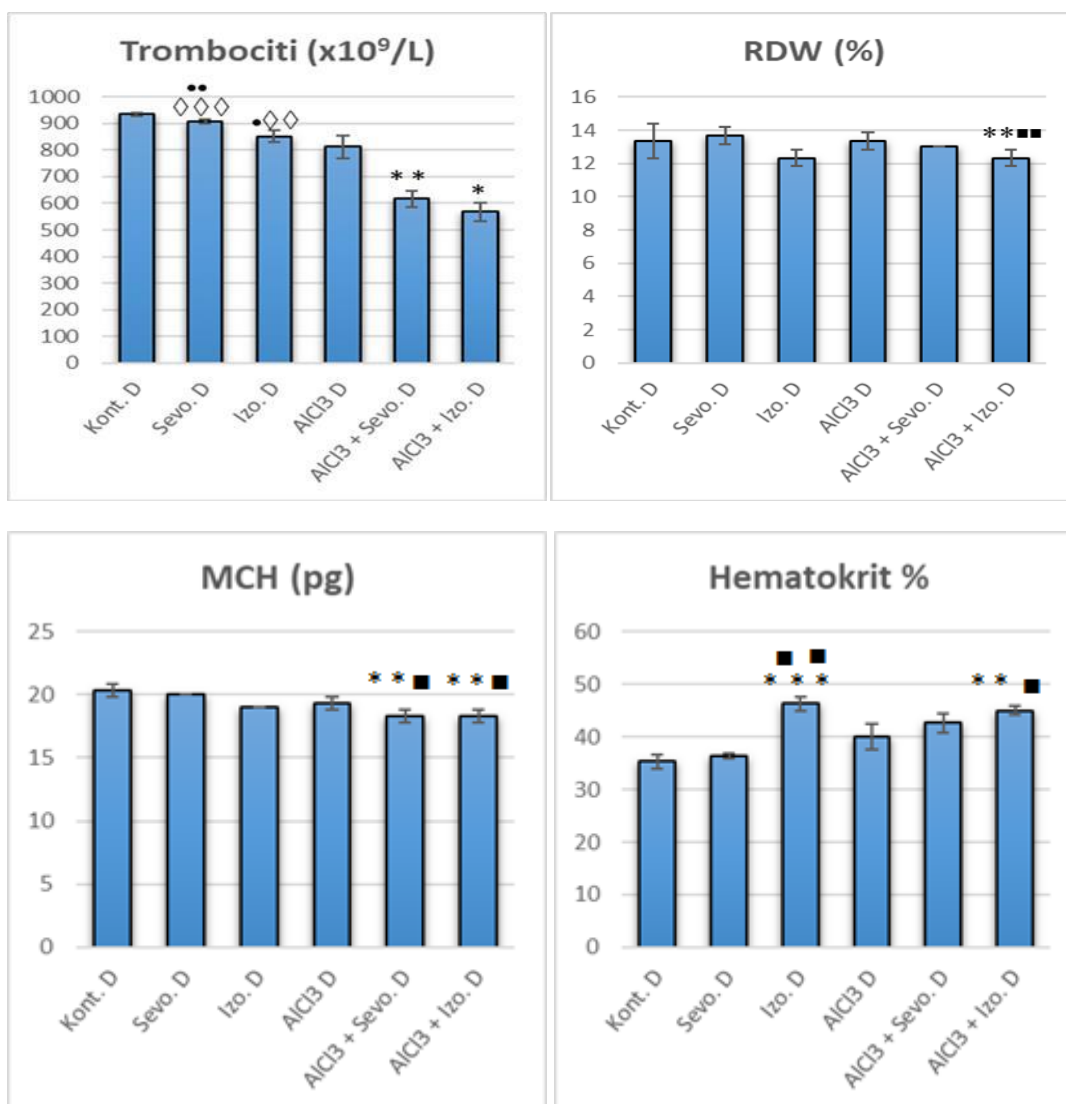
Nadalje, vidljiva je statistički značajno povećana vrijednost hemoglobina ( $p < 0,001$ ) i hematokrita ( $p < 0,001$ ), a smanjena vrijednost MCHC-a ( $p < 0,05$ ) u skupini izloženoj izofluranu u odnosu na kontrolnu skupinu, sevofluran skupinu i  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.}$  skupinu. Prateći daljnje rezultate u skupinama obrađenim  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.}$  i  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.} + \text{Sevo.}$  vrijednost MCV-a je značajno snižena, dok je kod skupine obrađene  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.} + \text{Sevo.}$  i vrijednost MCH-a snižena (vidi Sliku 30). Nadalje, u skupini obrađenoj  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.} + \text{Izo.}$  vrijednosti MCH-a, MCHC-a i RDW-a su značajno snižene, dok je vrijednost hematokrita značajno povećana.



**Slika 30.** Hematološke odrednice nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP. \*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ); <sup>■</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (<sup>■</sup> $p < 0,05$ ; <sup>■</sup> $p < 0,01$ ; <sup>■</sup> $p < 0,001$ ); <sup>□</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu (<sup>□□□</sup> $p < 0,001$ ); <sup>#</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. (<sup>#</sup> $p < 0,05$ ; <sup>##</sup> $p < 0,01$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, MCV – volumen eritrocita, MCH – sadržaj hemoglobina u eritrocitima, MCHC – koncentracija hemoglobina u eritrocitima, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. – željezo aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.



### Nastavak Slike 30.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ); ◼Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (◼ $p < 0,05$ ; ◼◼ $p < 0,01$ ); ◊Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. (◊ $p < 0,01$ ; ◊◊ $p < 0,001$ ); \*Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

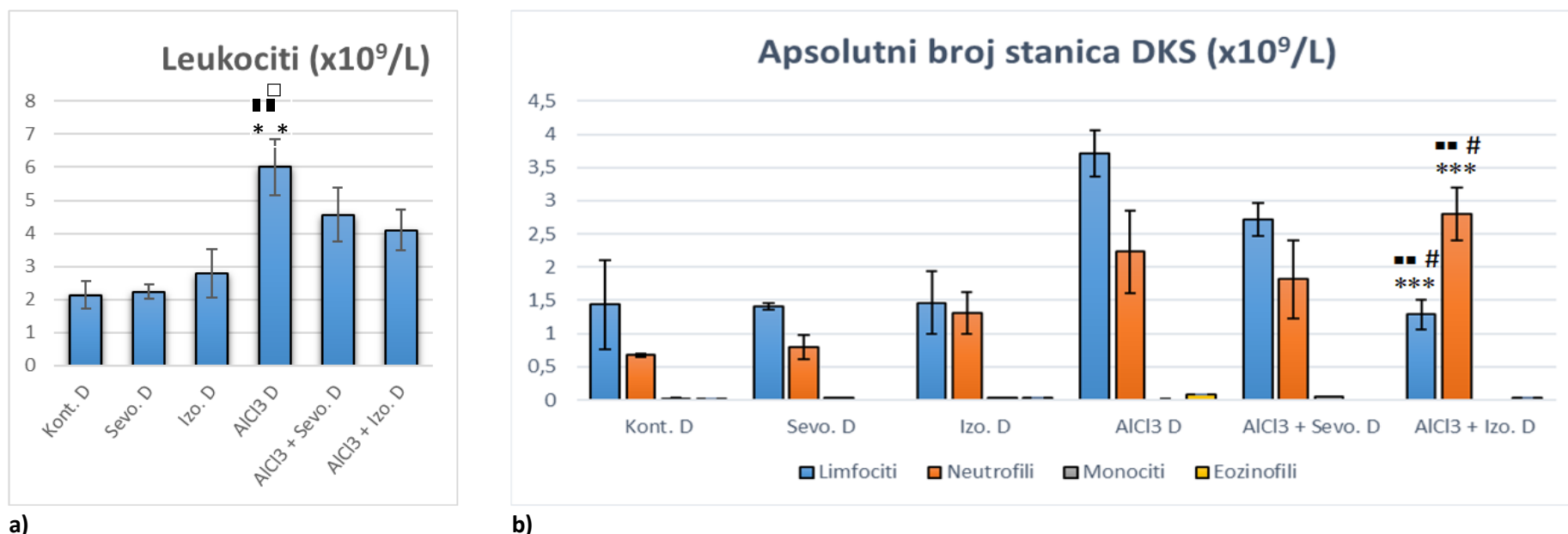
Kratice: ip – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, MCH – sadržaj hemoglobina u eritrocitima, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. – željezo aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

#### **4.6.4. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na ukupni broj leukocita i diferencijalnu analizu krvi**

Na Slici 31a vidljivo je statistički značajno povećanje ukupnog broja leukocita u skupini obrađenoj AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. u odnosu na kontrolnu ( $p < 0,01$ ), sevofluran ( $p < 0,01$ ) i izofluran skupinu ( $p < 0,05$ ).

Prateći upalne promjene vidljivo je izrazito povećanje postotka neutrofila, a smanjenje postotka limfocita u skupinama obrađenim izofluranom i AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,001$ ) (Slika 31b). Nadalje, statistički značajno povećanje postotka neutrofila te smanjenje limfocita u skupini obrađenoj AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. vidljivo je i u odnosu na skupine obrađene sevofluranom ( $p < 0,01$ ) i AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. ( $p < 0,05$ ).





**Slika 31.** Ukupni broj leukocita (a) i analiza diferencijalne krvne slike štakora (b) nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

<sup>a</sup>Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01; \*\*\**p* < 0,001); <sup>■</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (<sup>■</sup>*p* < 0,01);

<sup>#</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. (<sup>#</sup>*p* < 0,05); <sup>□</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (<sup>□</sup>*p* < 0,05).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

#### 4.6.5. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na osmotsku otpornost eritrocita

Kronična primjena inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze povećava osmotsku hemolizu eritrocita (Tablica 8). Početak hemolize vidljiv je pri 0,6% koncentraciji NaCl i kreće se u svih pokusnih skupina od najmanje 0,41% hemolize (Sevo. D) do 1,64% (AlCl<sub>3</sub> + D-gal. D). Hemoliza se znatno povećava pri koncentraciji 0,5% NaCl gdje se vrijednosti pokusnih skupina kreću od 18,45-31,67% u odnosu na kontrolnu 3,51%. Najveće promjene u hemolizi događaju se u području 0,4-0,5% koncentracije NaCl.

**Tablica 8.** Osmotska hemoliza eritrocita nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

NaCl (%)	0	0,3	0,4	0,5	0,6	0,9
Skupine <sup>a</sup>	Postotak hemolize					
Kont.	100	92,02	86,90	3,51	0	0
Sevo. D	100	88,18	86,59	23,27	0,41	0
Izo. D	100	94,66	89,29	29,63	1,13	0
AlCl <sub>3</sub> + D-gal. D	100	89,73	88,54	20,77	1,64	0
AlCl <sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. D	100	96,05	90,98	18,45	1,12	0
AlCl <sub>3</sub> + D-gal. + Izo. D	100	89,43	78,67	31,67	0,64	0

<sup>a</sup>Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao % hemolize eritrocita prema formuli: Hemoliza (%) = (A/B)\*100 gdje je A – hemoliza uzorka, B - potpuna hemoliza.

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

## **4.7. Promjene koncentracije esencijalnih, neesencijalnih i visokotoksičnih metala u tkivu mozga nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijskoga klorida + D-galaktoze**

### **4.7.1. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijskoga klorida + D-galaktoze na koncentraciju esencijalnih metala u tkivu mozga**

Nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijskoga klorida + D-galaktoze (Tablica 9) vidljive su statistički značajne promjene u koncentraciji Cr u skupini  $\text{AlCl}_3$  + D-gal. + Izo. u odnosu na kontrolu ( $p < 0,05$ ) i skupinu izloženu izofluranu ( $p < 0,01$ ). U skupini  $\text{AlCl}_3$  + D-gal. + Sevo. koncentracija Mo je statistički značajno viša u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,01$ ). Koncentracija Fe bila je značajno viša u skupini izloženoj izofluranu ( $p < 0,05$ ) te skupini izloženoj  $\text{AlCl}_3$  + D-gal. ( $p < 0,05$ ) u odnosu na izlaganje životinja sevofluranu.

**Tablica 9.** Koncentracija esencijalnih metala nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijskoga klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

Skupine <sup>a</sup>	Esencijalni metali (mg/kg)							
	(X ± SP)							
	Fe	Zn	Mn	Se	Cu	Co	Cr	Mo
Kont.	14,90 ± 0,92	8,72 ± 0,90	0,431 ± 0,043	0,14 ± 0,01	2,75 ± 0,35	0,004 ± 0,001	0,015 ± 0,000	0,030 ± 0,002
Sevo. D	12,16 ± 0,18	7,78 ± 0,15	0,469 ± 0,012	0,16 ± 0,00	3,34 ± 0,02	0,004 ± 0,001	0,027 ± 0,004	0,040 ± 0,000
Izo. D	22,24 ± 0,21 <sup>■</sup>	13,92 ± 0,26	0,501 ± 0,041	0,14 ± 0,00	2,70 ± 0,06	0,004 ± 0,000	0,005 ± 0,000	0,036 ± 0,001
AlCl <sub>3</sub> + D-gal. D	23,00 ± 0,54 <sup>■</sup>	15,16 ± 0,41	0,421 ± 0,018	0,17 ± 0,01	2,74 ± 0,05	0,007 ± 0,001	0,046 ± 0,000	0,051 ± 0,005
AlCl <sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. D	19,37 ± 0,55	14,81 ± 0,33	0,379 ± 0,019	0,12 ± 0,01	2,52 ± 0,10	0,003 ± 0,000	0,038 ± 0,004	0,076 ± 0,007 <sup>**</sup>
AlCl <sub>3</sub> + D-gal. + Izo. D	12,99 ± 0,18	7,66 ± 0,14	0,431 ± 0,016	0,15 ± 0,01	3,46 ± 0,40	0,004 ± 0,000	0,123 ± 0,015 <sup>□□*</sup>	0,043 ± 0,001

<sup>a</sup>Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijskim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijskoga klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao X ± SP.

<sup>■</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (<sup>■</sup>*p* < 0,05); <sup>\*</sup>Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (<sup>\*</sup>*p* < 0,05; <sup>\*\*</sup>*p* < 0,01); <sup>□□</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu (<sup>□□</sup>*p* < 0,01).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, X – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. – aluminijski klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. – željezo aluminijski klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. – aluminijski klorid + D-galaktoza i izofluran.

#### **4.7.2. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na koncentraciju visokotoksičnih i neesencijalnih metala u tkivu mozga**

Koncentracija visokotoksičnih metala (As, Cd, i Al) je statistički značajno promjenjena u skupini  $\text{AlCl}_3$  + D-gal. + Izo. u odnosu na kontrolu ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,05$  i  $p < 0,01$ ) (Tablica 10). Kod neesencijalnih metala vidljiva je statistički značajna promjena Ba u skupini  $\text{AlCl}_3$  + D-gal. + Izo. u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,05$ ) kao i u skupini  $\text{AlCl}_3$  + D-gal. u odnosu na skupinu izloženu izofluranu ( $p < 0,01$ ).

**Tablica 10.** Koncentracija visokotoksičnih i neesencijalnih metala nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

Skupine <sup>a</sup>	Visokotoksični metali (µg/kg)				Neesencijalni metali (µg/kg)	
	(X ± SP)				(X ± SP)	
	As (µg/kg)	Pb (µg/kg)	Cd (µg/kg)	Al (µg/kg)	Ba (µg/kg)	Ni (µg/kg)
Kont.	62,73 ± 3,39	0,67 ± 0,27	0,07 ± 0,02	288,19 ± 24,86	10,90 ± 0,64	6,31 ± 0,92
Sevo. D	97,84 ± 5,68	1,99 ± 0,85	0,31 ± 0,04	412,59 ± 11,57	7,05 ± 0,59	13,66 ± 2,34
Izo. D	74,58 ± 6,90	1,01 ± 0,44	0,43 ± 0,43	402,18 ± 39,71	9,72 ± 0,38	0,00 ± 0,00
AlCl <sub>3</sub> + D-gal. D	98,19 ± 16,51	0,90 ± 0,51	1,54 ± 1,13	521,14 ± 94,98	15,08 ± 3,04	44,49 ± 1,63 <sup>□□</sup>
AlCl <sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. D	68,04 ± 8,42	0,93 ± 0,20	0,06 ± 0,03	578,11 ± 132,45	9,23 ± 0,97	20,86 ± 0,17
AlCl <sub>3</sub> + D-gal. + Izo. D	533,87 ± 69,73*	34,56 ± 0,58	10,20 ± 0,99*	2172,09 ± 105,04**	3,47 ± 0,55*	9,04 ± 0,96

<sup>a</sup>Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao X ± SP.

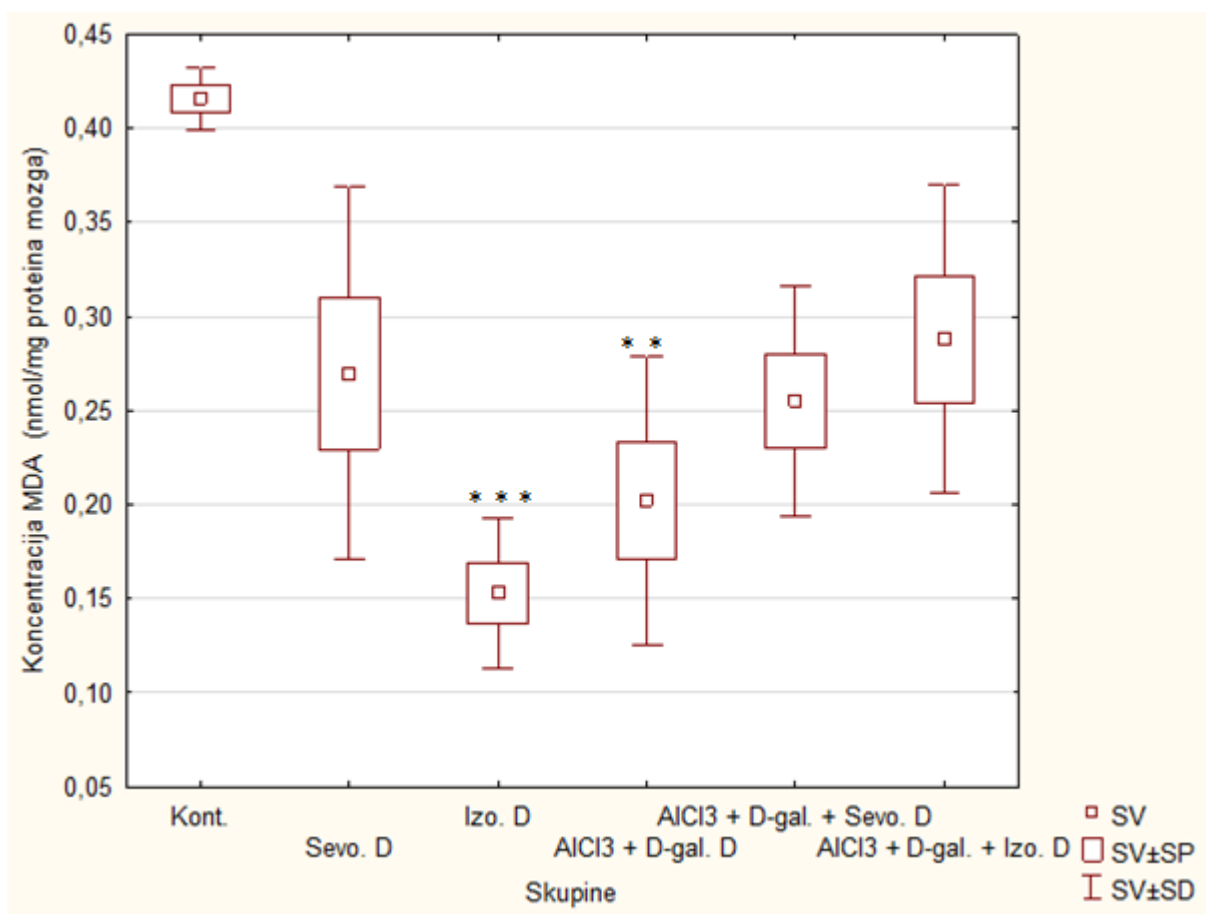
\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01); <sup>□□</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu (<sup>□□</sup>*p* < 0,01).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, X – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. – željezo aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izoflur

## **4.8. Oksido-redukcijske promjene u tkivu mozga nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze**

### **4.8.1. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na razinu lipidne peroksidacije (malondialdehid, MDA) u tkivu mozga**

Oštećenje lipida utvrđeno je mjerenjem količine malondialdehida (MDA). Analizom koncentracije MDA u homogenatu tkiva mozga (Slika 32) zabilježena je statistički značajno smanjena vrijednost kod Izo. skupine ( $p = 0,0001$ ) i  $AlCl_3 + D\text{-gal.}$  ( $p = 0,01$ ) skupine u odnosu na kontrolnu skupinu.



**Slika 32.** Koncentracija MDA nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

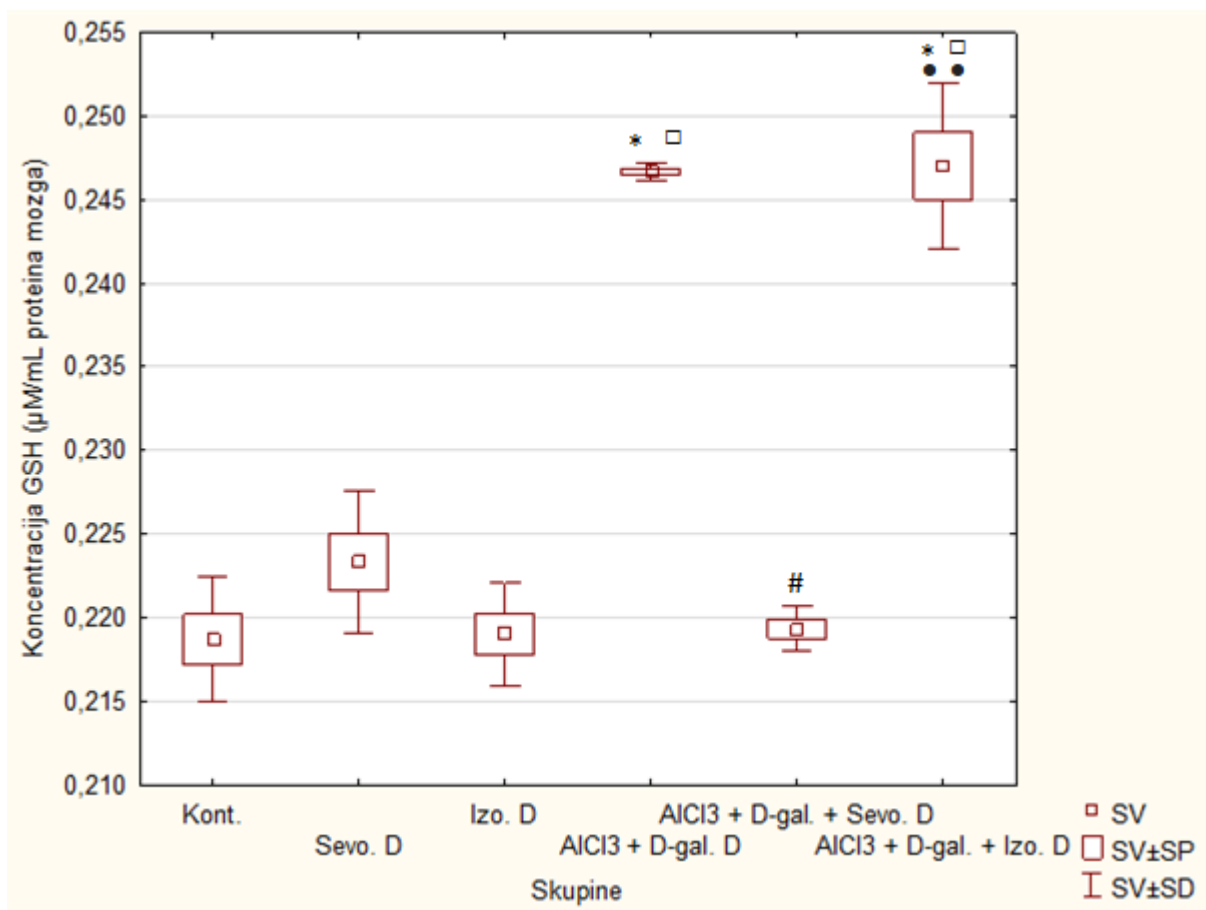
Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP. \*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.



#### **4.8.2. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na ukupnu razinu glutationa (GSH) u tkivu mozga**

Analizom rezultata koncentracije ukupnog glutationa (GSH) u uzorku homogenata tkiva mozga (Slika 33) vidljiva je statistički značajno veća koncentracija kod skupine  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.} + \text{Izo.}$  u odnosu na  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.} + \text{Sevo.}$  ( $p = 0,008$ ), skupinu izofluran ( $p = 0,01$ ) te kontrolnu skupinu ( $p = 0,01$ ). Praćenjem daljnjih rezultata zapažena je statistički značajno veća koncentracija GSH kod skupine  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.}$  u odnosu na izofluran skupinu ( $p = 0,04$ ) i kontrolnu skupinu ( $p = 0,03$ ) te smanjena kod  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.} + \text{Sevo.}$  skupine u odnosu na  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.}$  skupinu ( $p = 0,02$ ).



**Slika 33.** Koncentracija GSH nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

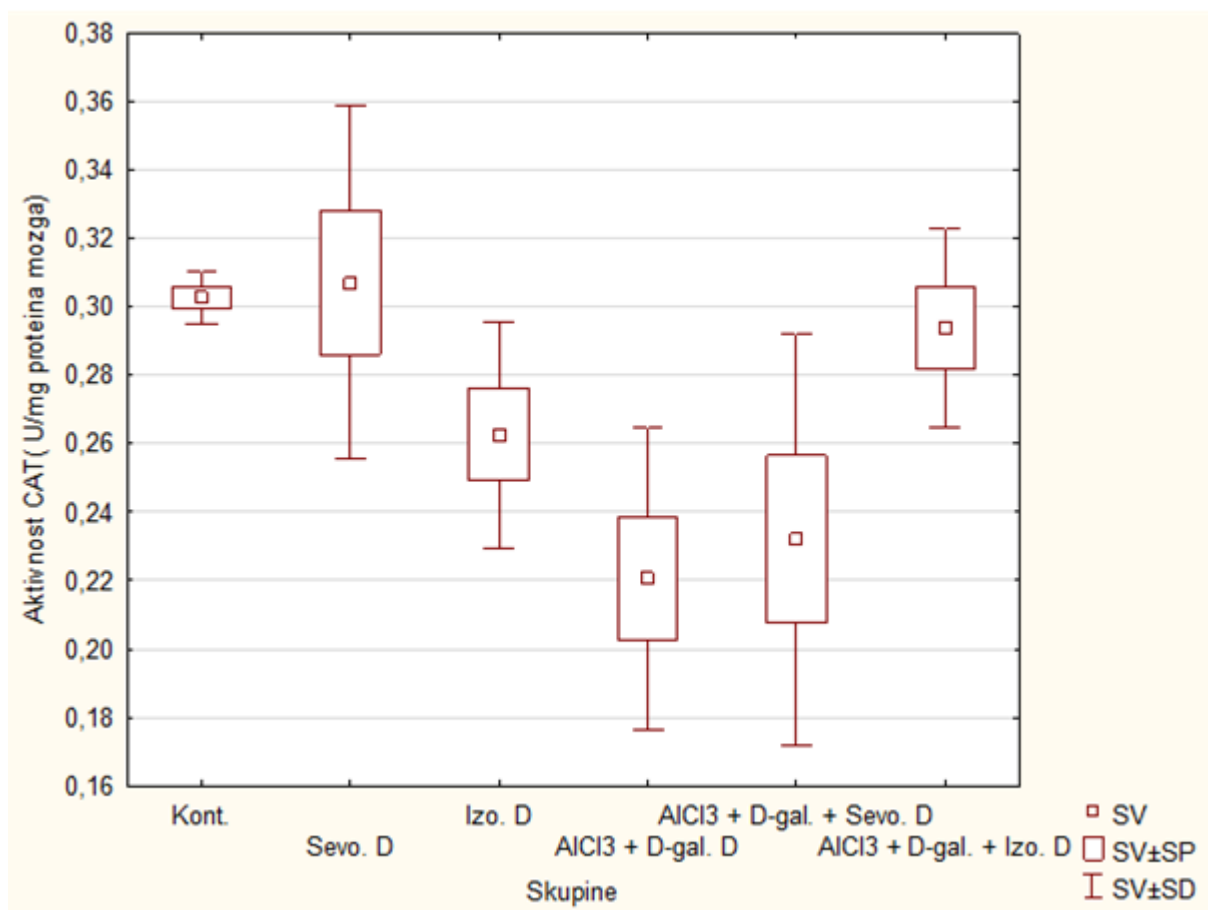
Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP. Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu ( $*p < 0,05$ ); \*Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. ( $**p < 0,01$ ); # Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D-gal. ( $#p < 0,05$ ); □ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu ( $□p < 0,05$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

### 4.8.3. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na aktivnost antioksidacijskih enzima (CAT i SOD) u tkivu mozga

Analizom rezultata mjerenja enzimske aktivnosti CAT (Slika 34) nije utvrđena statistički značajna promjena u antioksidacijskoj aktivnosti katalaze kod tretiranih skupina.

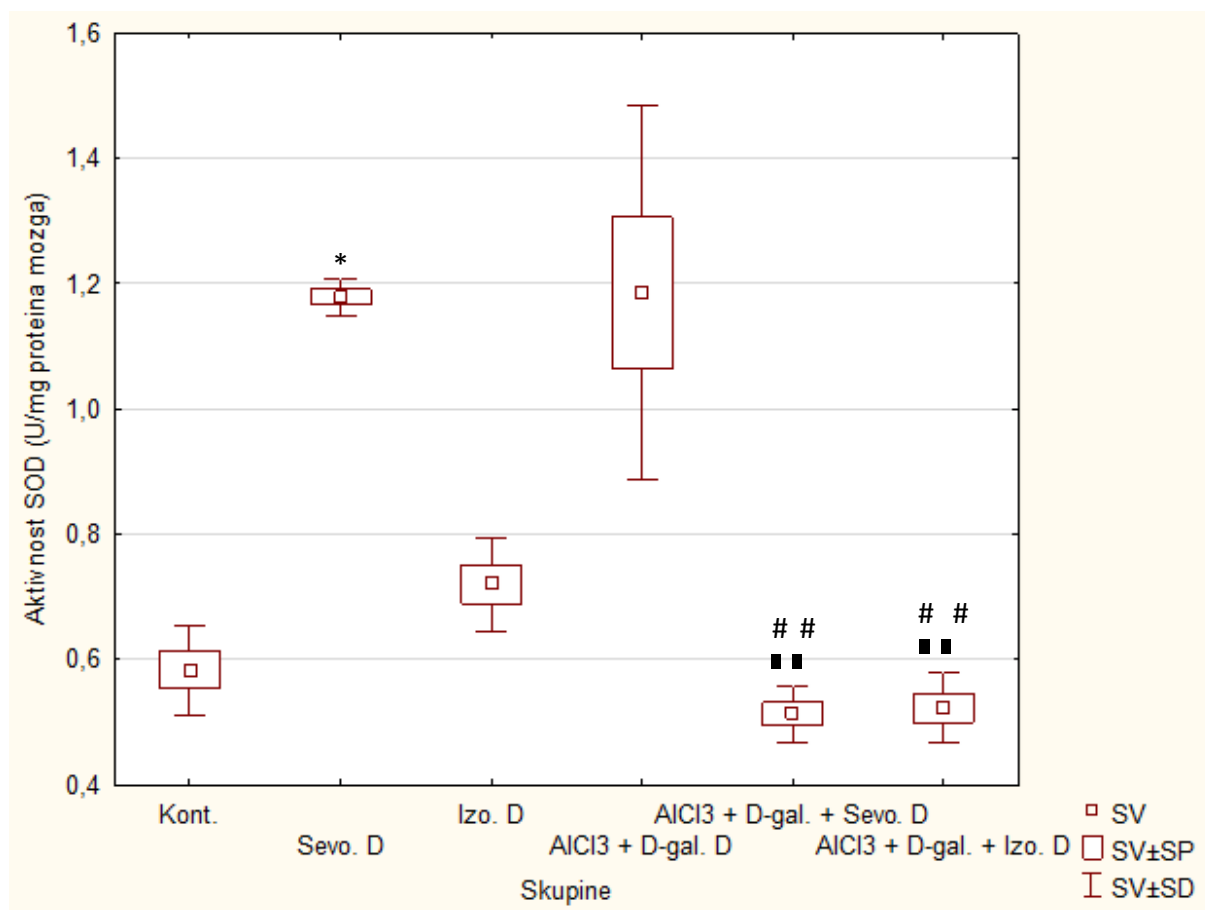


**Slika 34.** Aktivnost CAT nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

Analizom rezultata enzimske aktivnosti SOD (Slika 35) uočava se statistički značajno snižena aktivnost kod skupine  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.} + \text{Sevo.}$  u odnosu na  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal}$  skupinu ( $p = 0,004$ ) i sevofluran skupinu ( $p = 0,001$ ). Dalje prateći rezultate, uočava se statistički značajno snižena aktivnost kod skupine  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.} + \text{Izo.}$  u odnosu na  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal}$  skupinu ( $p = 0,006$ ) i sevofluran skupinu ( $p = 0,001$ ). Naposljetku se primjećuje statistički značajno povišena aktivnost kod skupine Sevo. u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p = 0,04$ ).



**Slika 35.** Aktivnost SOD nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

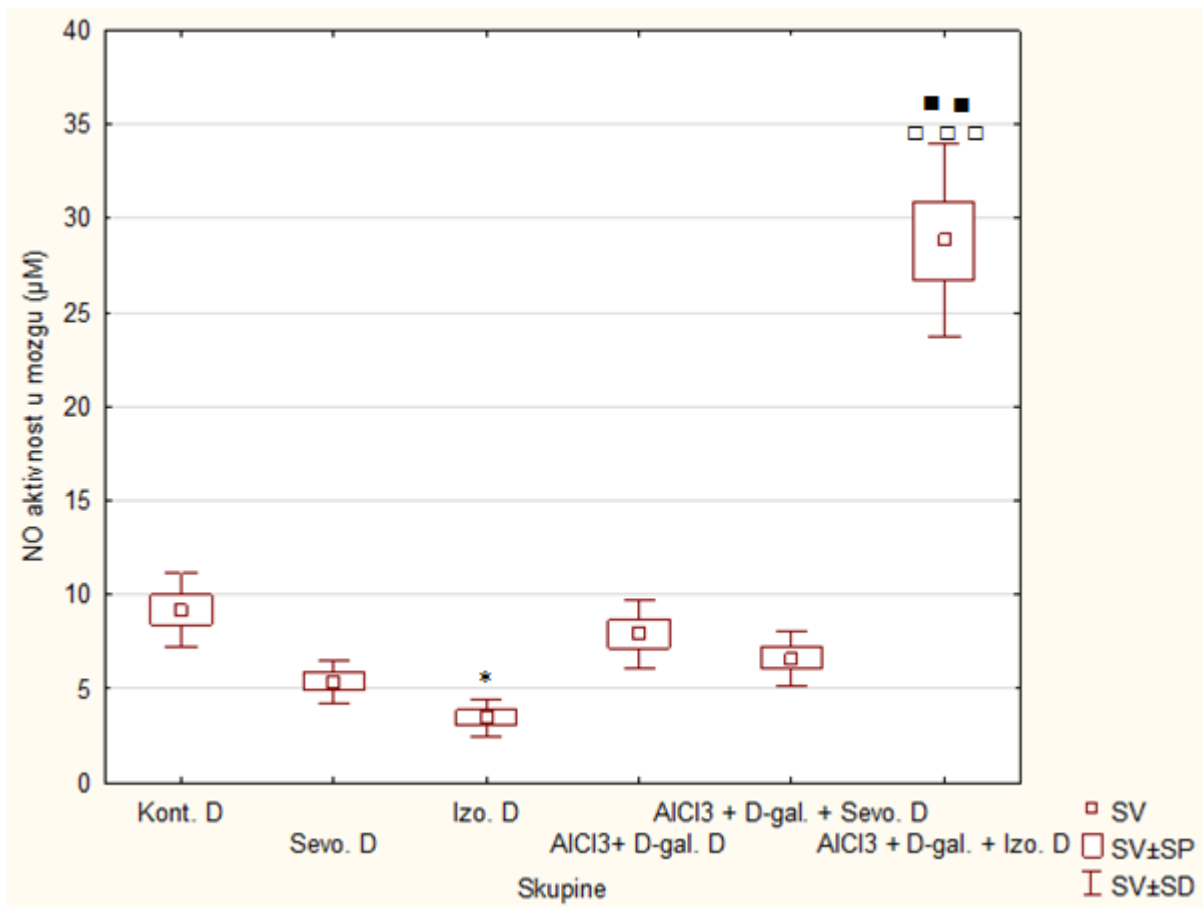
Štakori ( $N = 10$ ) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $\text{SV} \pm \text{SP}$ . \*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu ( $*p < 0,05$ ); #Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu ( $##p < 0,01$ ); #Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.}$  ( $##p < 0,01$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran,  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.}$  – aluminijev klorid + D-galaktoza,  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.} + \text{Sevo.}$  – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran,  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.} + \text{Izo.}$  – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

## **4.9. Neuroupalne promjene u tkivu mozga nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijsva klorida + D-galaktoze**

### **4.9.1. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijsva klorida + D-galaktoze na makrofagnu aktivnost i polarizaciju u tkivu mozga**

Analizom rezultata mjerenja enzimske aktivnosti NO (Slika 36) utvrđena je statistički značajno snižena aktivnost kod skupine Izo. u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p = 0,01$ ). Nadalje, vidljiva je statistički značajno povišena aktivnost kod skupine  $AlCl_3 + D-gal. + Izo.$  u odnosu na izofluran skupinu ( $p = 0,00002$ ) i sevofluran skupinu ( $p = 0,002$ ).



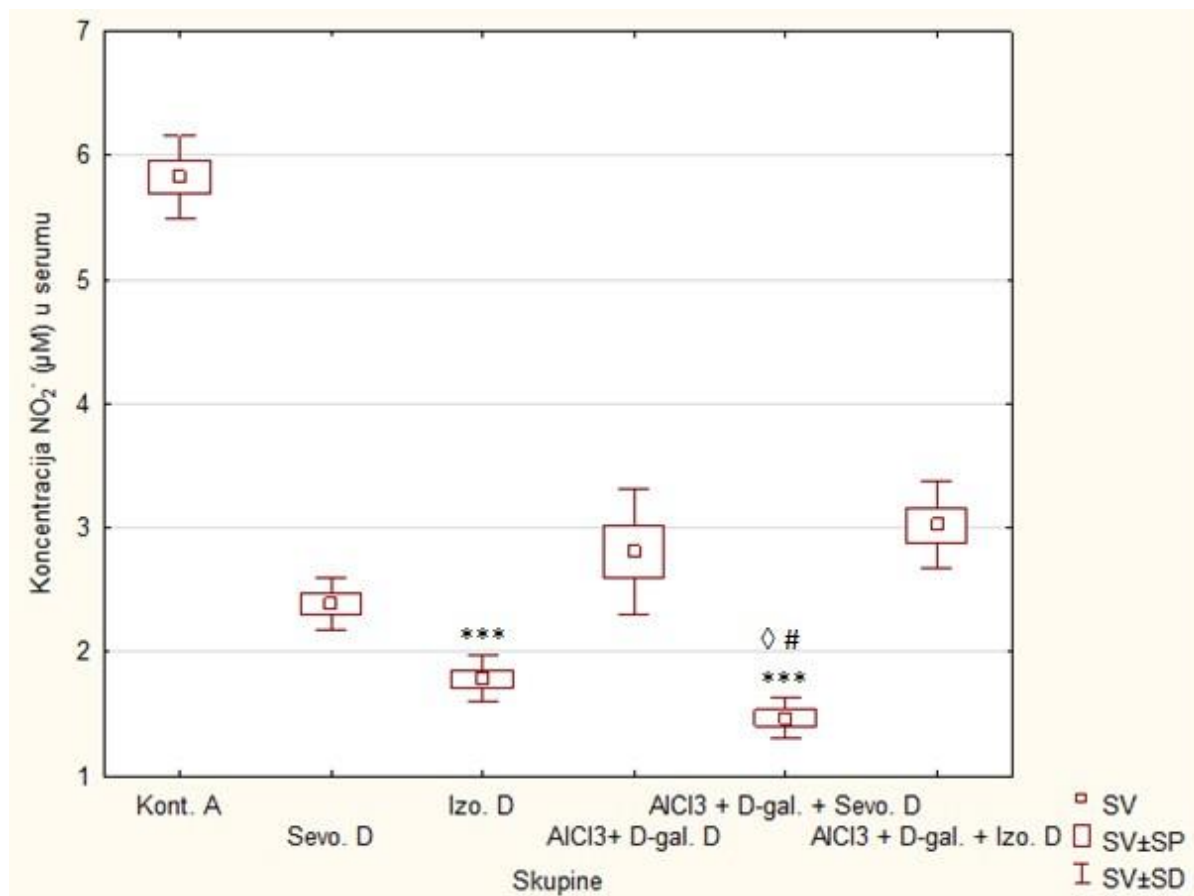
**Slika 36.** Aktivnost NO nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu ( $*p < 0,05$ ); ■Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (■■■ $p < 0,001$ ); □Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu (□ $p < 0,01$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

Analizom rezultata koncentracije NO u serumu (Slika 37) uočava se statistički značajno povišena koncentracija kod kontrolne skupine u odnosu na AlCl<sub>3</sub> + D.-gal + Sevo. skupinu ( $p = 0,00002$ ) i izofluran skupinu ( $p = 0,0007$ ). Nadalje, zapažena je snižena koncentracija kod AlCl<sub>3</sub> + D.-gal + Sevo. skupine u odnosu na AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. skupinu ( $p = 0,04$ ) i AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. skupinu ( $p = 0,006$ ).

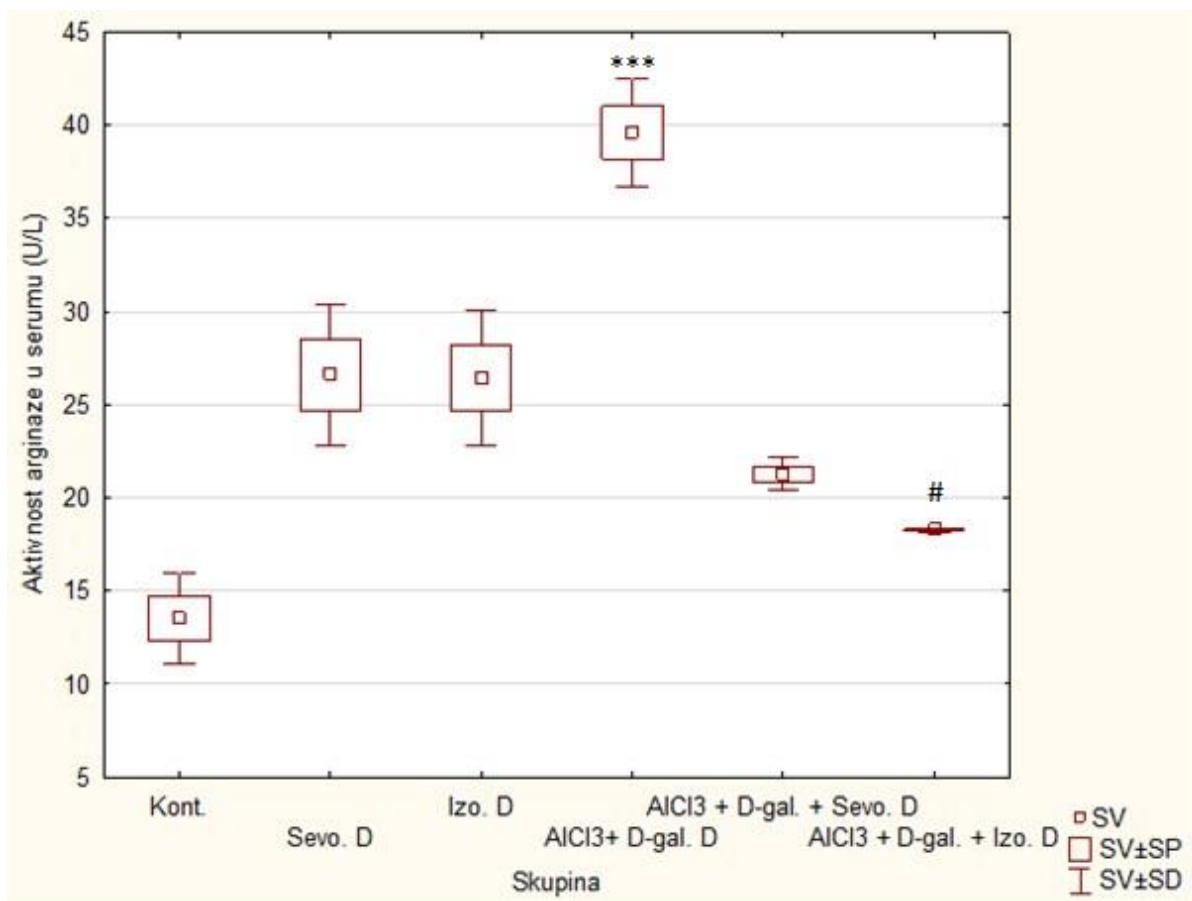


**Slika 37.** Koncentracija NO u serumu nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP. \*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\*\* $p < 0,001$ ); <sup>◊</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. (<sup>◊</sup> $p < 0,05$ ); #Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. (<sup>#</sup> $p < 0,05$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. – željezo aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

Analizom rezultata aktivnosti arginaze u serumu (Slika 38) uočava se statistički značajno povišena aktivnost kod skupine  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal}$  u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p = 0,0009$ ). Također zapažena je statistički značajno povišena aktivnost kod skupine  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.} + \text{Izo.}$  u odnosu na  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal}$  skupinu ( $p = 0,02$ ).



**Slika 38.** Aktivnost arginaze u serumu nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

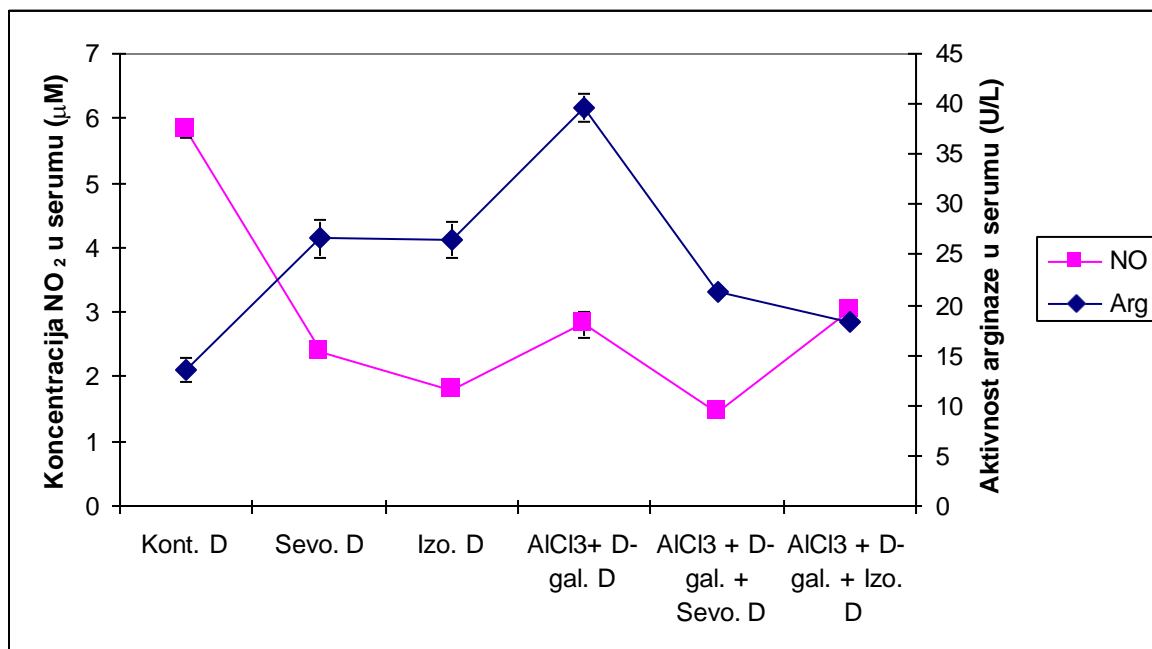
Štakori ( $N = 10$ ) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $\text{SV} \pm \text{SP}$ .

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu ( $***p < 0,001$ ); #Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.}$  ( $^{\#}p < 0,05$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran,  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.}$  – aluminijev klorid + D-galaktoza,  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.} + \text{Sevo.}$  – željezo aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran,  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.} + \text{Izo.}$  – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran



Makrofagna polarizacija u serumu posebice je vidljiva nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze (Slika 39). U skupini  $\text{AlCl}_3$  + D-gal. vidljiva je jasna polarizacija prema M2 fenotipu, moguće kao reakcija na najveća upalna oštećenja i oksidacijski stres te uspostavljanje homeostaze. Aktivnost arginaze je znatno veća u kroničnoj primjeni od subakutne.



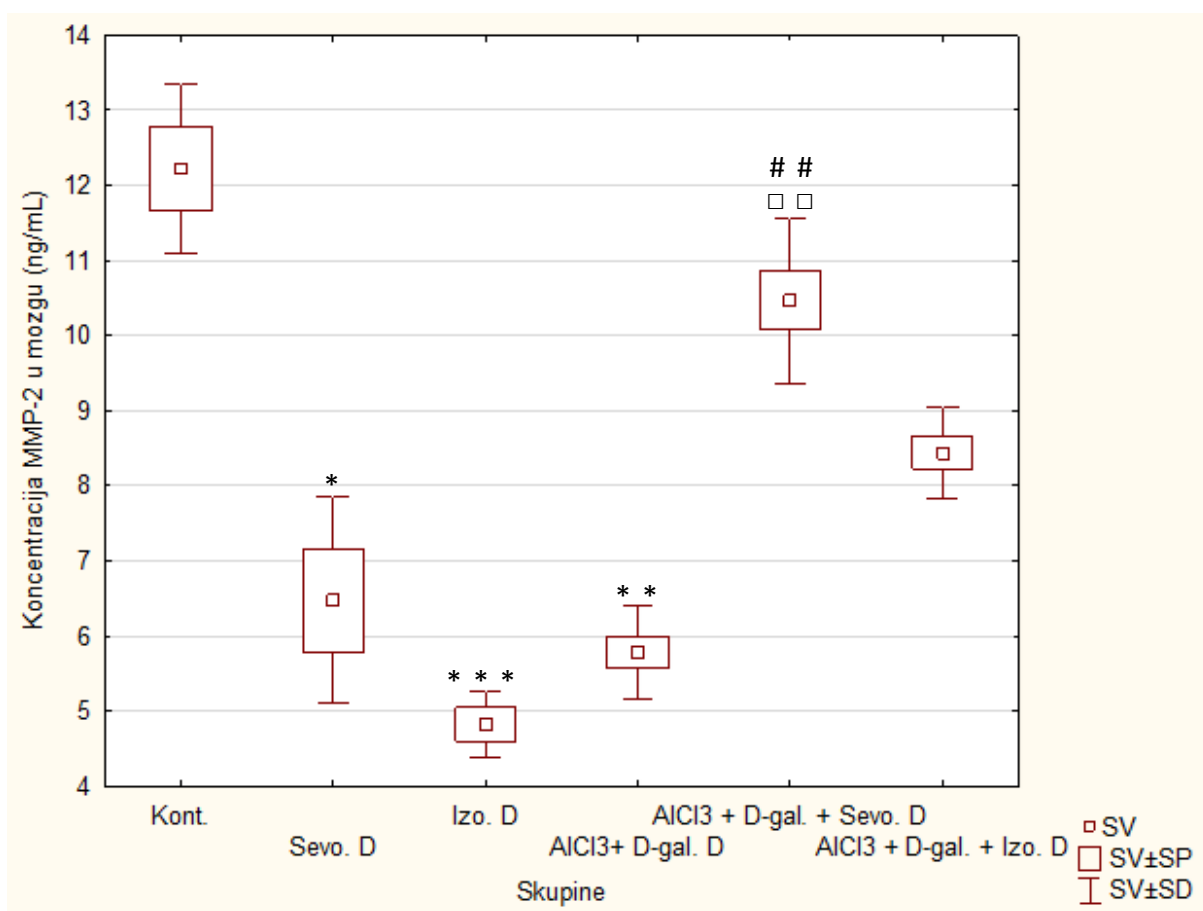
**Slika 39.** Odnos između aktivnosti arginaze i koncentracije NO u serumu nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran,  $\text{AlCl}_3$  + D-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza,  $\text{AlCl}_3$  + D-gal. + Sevo. – željezo aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran,  $\text{AlCl}_3$  + D-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

#### 4.9.2. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na razinu MMP2 i MMP9 u tkivu mozga

Analizom rezultata mjerenja koncentracije MMP-2 u tkivu mozga štakora (Slika 40) zapažena je statistički značajno snižena koncentracija kod skupine Izo. u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p = 0,0008$ ). Prateći dalje vidljiva je niža koncentracija kod skupina Sevo. ( $p = 0,04$ ) i skupine  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.}$  ( $p = 0,002$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu. Naposljetku analizom rezultata zapažena je statistički značajno viša koncentracija kod skupine  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.} + \text{Sevo.}$  u odnosu na  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.}$  skupinu ( $p = 0,004$ ) i izofluran skupinu ( $p = 0,001$ ).

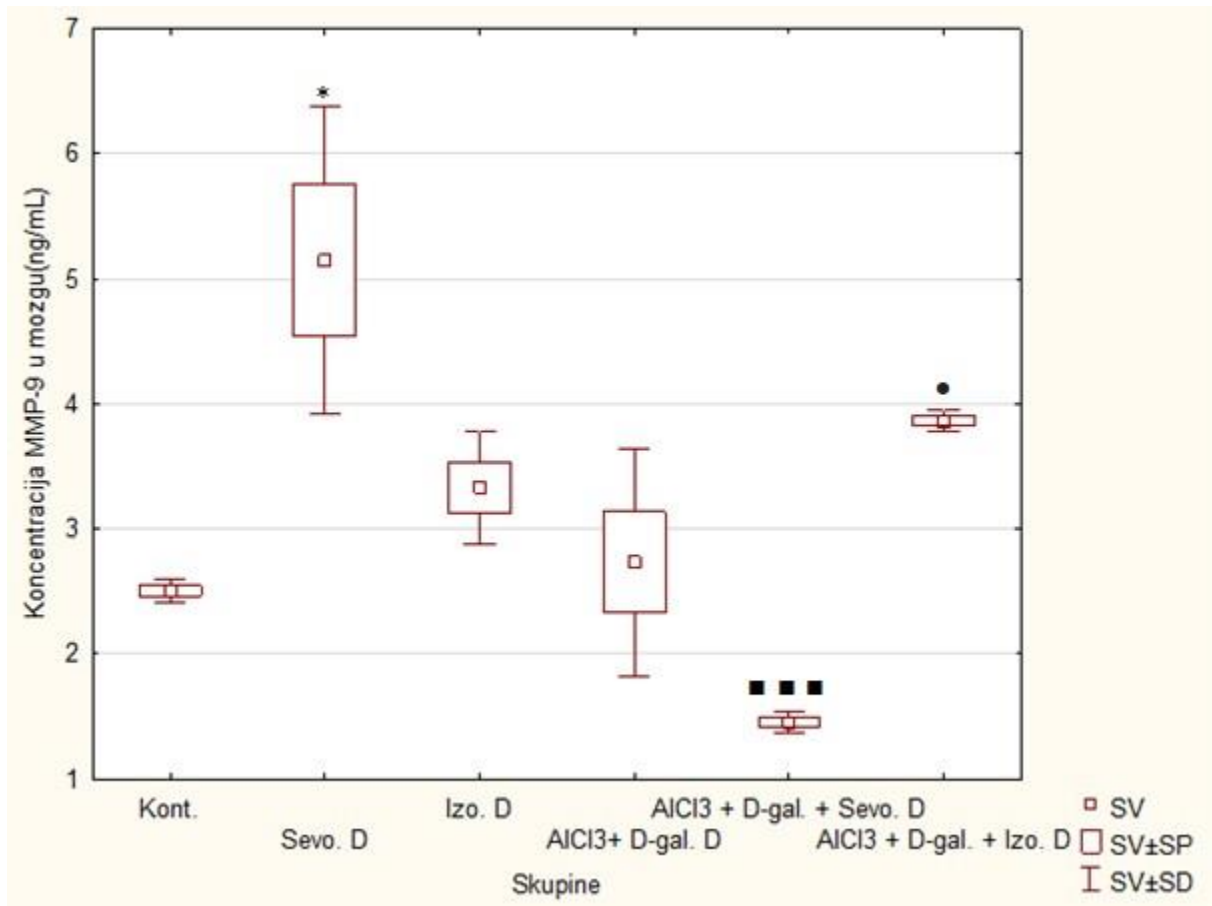


**Slika 40.** Koncentracija MMP-2 nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

Štakori ( $N = 10$ ) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $\text{SV} \pm \text{SP}$ . \*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ );  $\square$ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu ( $\square p < 0,01$ ); #Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.}$  ( $\#\#p < 0,01$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran,  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.}$  – aluminijev klorid + D-galaktoza,  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.} + \text{Sevo.}$  – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran,  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.} + \text{Izo.}$  – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran, MMP-2 – metaloproteinaza-2.

Analizom rezultata mjerenja koncentracije MMP-9 u tkivu mozga štakora (Slika 41) vidljiva je statistički značajno niža koncentracija kod skupine. AlCl<sub>3</sub> + D-gal.+ Sevo. u odnosu na sevofluran skupinu ( $p = 0,0007$ ). Prateći dalje vidljiva je viša koncentracija kod sevofluran skupine u odnosu na kontrolnu skupinu i ( $p = 0,04$ ) i skupine AlCl<sub>3</sub> + D-gal.+ Izo. u odnosu na AlCl<sub>3</sub> + D.-gal.+ Sevo. skupinu ( $p = 0,01$ ).



**Slika 41.** Koncentracija MMP-9 nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

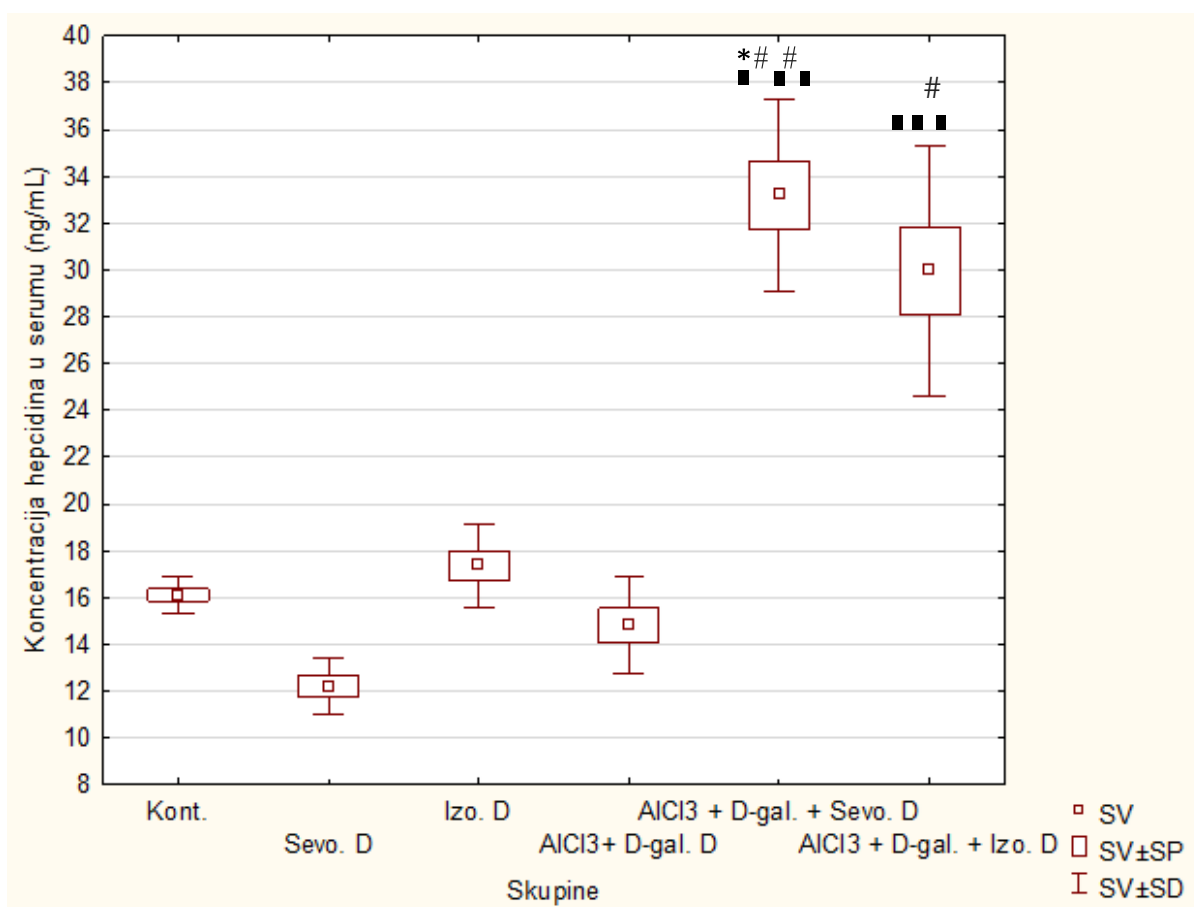
Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu ( $*p < 0,05$ ); ■Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (■■■ $p < 0,001$ ); \*Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo ( $*p < 0,05$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran, MMP-9 – metaloproteinaza-9.

### 4.9.3. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na razinu hepcidina i feritina u tkivu mozga

Analizom rezultata mjerenja koncentracije hepcidina u serumu (Slika 42) utvrđena je statistički značajno povišena koncentracija kod skupine  $\text{AlCl}_3$  + D-gal. + Sevo. u odnosu na sevofluran skupinu ( $p = 0,000002$ ),  $\text{AlCl}_3$  + D-gal. skupinu ( $p = 0,001$ ) i kontrolnu skupinu ( $p = 0,01$ ). Također, praćenjem daljnjih rezultata vidljiva je statistički značajno povišena koncentracija kod skupine  $\text{AlCl}_3$  + D-gal. + Izo. u odnosu na  $\text{AlCl}_3$  + D-gal. skupinu ( $p = 0,01$ ) i sevofluran skupinu ( $p = 0,00003$ ).

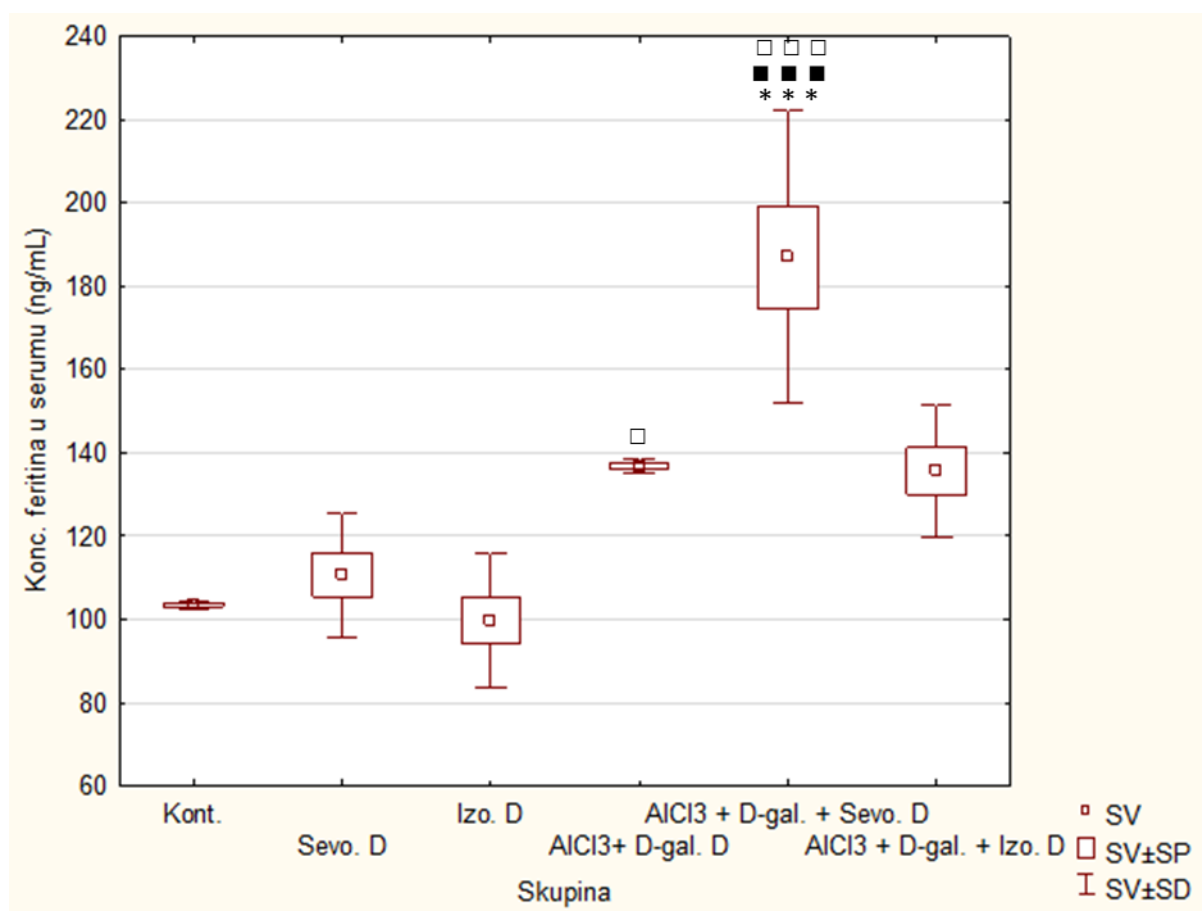


**Slika 42.** Koncentracija hepcidina nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

Štakori ( $N = 10$ ) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $\text{SV} \pm \text{SP}$ . \*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu ( $*p < 0,05$ ); #Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu ( $##p < 0,001$ ); #Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu  $\text{AlCl}_3$  + D-gal. ( $#p < 0,05$ ;  $##p < 0,01$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran,  $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza,  $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran,  $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

Analizirajući rezultate mjerenja koncentracije feritina u serumu nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije (Slika 43) zapažena je statistički značajno povišena koncentracija kod skupine AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,001$ ), sevofluran skupinu ( $p < 0,001$ ) i izofluran skupinu ( $p < 0,001$ ). Također vidljiva je statistički značajno snižena koncentracija kod skupine AlCl<sub>3</sub> + D-gal. u odnosu na izofluran skupinu ( $p < 0,05$ ).



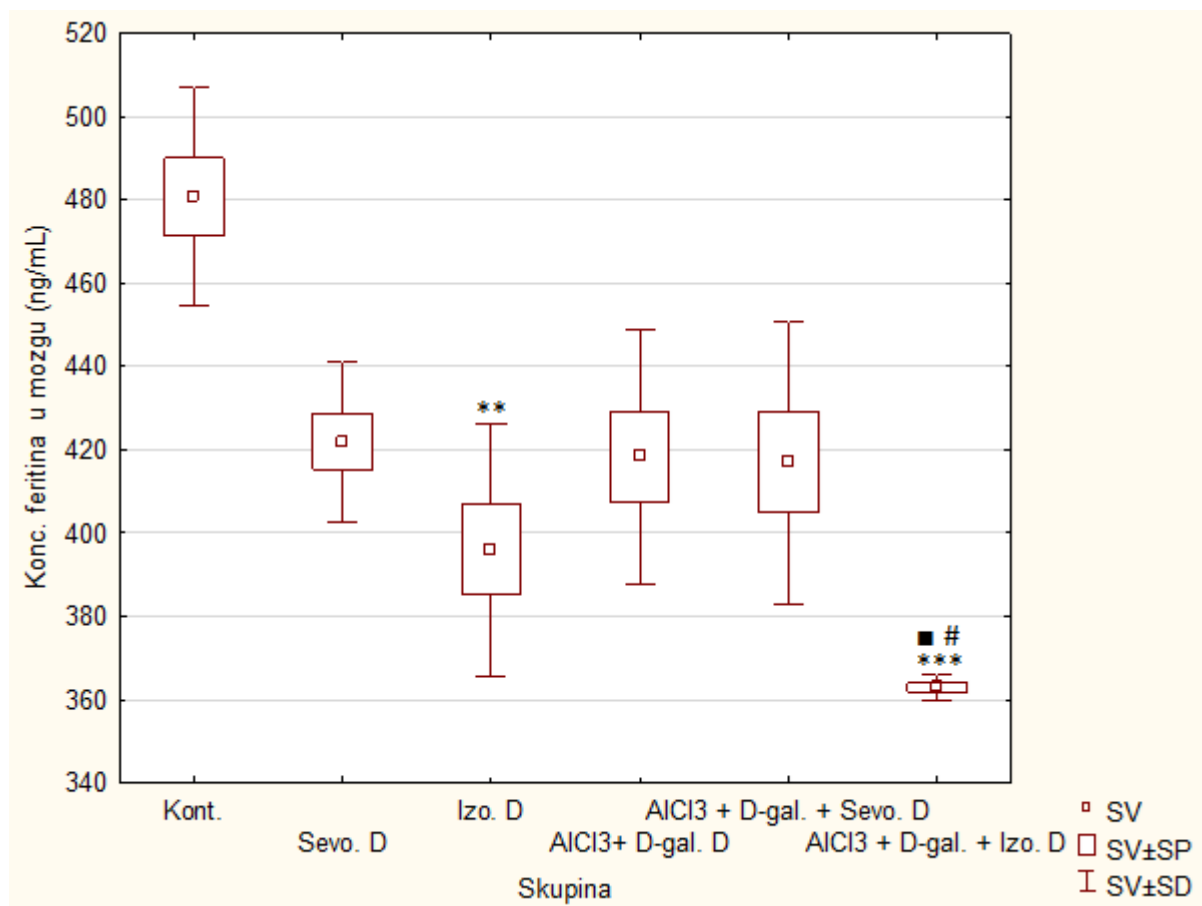
**Slika 43.** Koncentracija feritina u serumu nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

<sup>a</sup>Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

<sup>□</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu (<sup>□</sup> $p < 0,05$ ; <sup>□□</sup> $p < 0,001$ ); <sup>■</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (<sup>■</sup> $p < 0,001$ ); \*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (<sup>\*\*\*</sup> $p < 0,001$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

Analizom rezultata mjerenja koncentracije feritina u tkivu mozga (Slika 44) zapažena je statistički značajno snižena koncentracija kod skupine  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.} + \text{Izo.}$  u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p = 0,000001$ ),  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.}$  skupinu ( $p = 0,04$ ) i Sevo. skupinu ( $p = 0,03$ ). Također vidljiva je statistički značajno smanjena koncentracija feritina kod skupine tretirane izofluranom u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p = 0,005$ ).



**Slika 44.** Koncentracija feritina nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $\text{SV} \pm \text{SP}$ . \*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ); #Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.}$  (# $p < 0,05$ ); ■Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (■ $p < 0,05$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran,  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.}$  – aluminijev klorid + D-galaktoza,  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.} + \text{Sevo.}$  – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran,  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.} + \text{Izo.}$  – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

#### **4.9.4. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na razinu upalnih citokina u serumu**

Zanimljivo je da tijekom kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze dolazi do adaptacijskih mehanizama u kombinaciji aluminija i inhalacijskih anestetika dok su značajne promjene u razini proupalnih i protuupalnih citokina vidljive kod primjene inhalacijskih anestetika sevoflurana ili izoflurana (vidi Tablicu 11). Prema dobivenim rezultatima dugotrajna primjena anestetika može dovesti do narušavanja imunskog odgovora, posebice primjena sevoflurana gdje su vidljive veće promjene IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-10, IL-13, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i RANTES u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 11).

**Tablica 11.** Razina proupalnih citokina nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

CITOKINI	Skupina <sup>a</sup>	X	SP	*P	<sup>■</sup> P	<sup>□</sup> P
<b>IL-1<math>\alpha</math></b> (pg/mL)	<b>Kont.</b>	0,147	0,015			
	<b>Sevo. D</b>	0,308	0,027	0,012122*		
	<b>Izo. D</b>	0,231	0,022			
	<b>AlCl3 + D-gal. D</b>	0,207	0,022			
	<b>AlCl3 + D-gal. + Sevo. D</b>	0,223	0,013			
	<b>AlCl3 + D-gal. + Izo. D</b>	0,289	0,019	0,024491*		
<b>IL-1<math>\beta</math></b> (pg/mL)	<b>Kont.</b>	0,084	0,004			
	<b>Sevo. D</b>	0,333	0,017	0,024491*		
	<b>Izo. D</b>	0,380	0,019	0,00144 <sup>3**</sup>		
	<b>AlCl3 + D-gal. D</b>	0,119	0,005			0,029028 <sup>□</sup>
	<b>AlCl3 + D-gal. + Sevo. D</b>	0,188	0,016			
	<b>AlCl3 + D-gal. + Izo. D</b>	0,277	0,030			
<b>IL-2</b> (pg/mL)	<b>Kont.</b>	0,105	0,023			
	<b>Sevo. D</b>	0,446	0,027	0,005778*		
	<b>Izo. D</b>	0,322	0,032			
	<b>AlCl3 + D-gal. D</b>	0,092	0,011		0,003934 <sup>■</sup>	
	<b>AlCl3 + D-gal. + Sevo. D</b>	0,262	0,020			
	<b>AlCl3 + D-gal. + Izo. D</b>	0,221	0,018			
<b>IL-4</b> (pg/mL)	<b>Kont.</b>	0,036	0,003			
	<b>Sevo. D</b>	0,094	0,009			
	<b>Izo. D</b>	0,110	0,011			
	<b>AlCl3 + D-gal. D</b>	0,031	0,002			
	<b>AlCl3 + D-gal. + Sevo. D</b>	0,057	0,016			
	<b>AlCl3 + D-gal. + Izo. D</b>	0,035	0,009			



**Tablica 11. nastavak**

CITOKINI	Skupina <sup>a</sup>	X	SP	*P	▪P	□P
IL-6 (pg/mL)	Kont.	0,069	0,011			
	Sevo. D	0,278	0,017	0,017311*		
	Izo. D	0,156	0,021			
	AlCl3 + D-gal. D	0,048	0,004		0,00265 <sup>▪▪</sup>	
	AlCl3 + D-gal. + Sevo. D	0,181	0,027			
	AlCl3 + D-gal. + Izo. D	0,206	0,026			
IL-10 (pg/mL)	Kont.	0,113	0,002			
	Sevo. D	0,631	0,080	0,002170**		
	Izo. D	0,286	0,045			
	AlCl3 + D-gal. D	0,121	0,004		0,01010 <sup>▪</sup>	
	AlCl3 + D-gal. + Sevo. D	0,211	0,019			
	AlCl3 + D-gal. + Izo. D	0,197	0,003			
IL-12 (pg/mL)	Kont.	0,047	0,003			
	Sevo. D	0,140	0,023			
	Izo. D	0,263	0,011	0,018896*		
	AlCl3 + D-gal. D	0,035	0,010			0,00697 <sup>□□</sup>
	AlCl3 + D-gal. + Sevo. D	0,066	0,016			
	AlCl3 + D-gal. + Izo. D	0,072	0,007			
IL-13 (pg/mL)	Kont.	0,041	0,001			
	Sevo. D	0,411	0,053	0,001443**		
	Izo. D	0,250	0,036	0,01450*		
	AlCl3 + D-gal. D	0,054	0,002		0,029028 <sup>▪</sup>	
	AlCl3 + D-gal. + Sevo. D	0,093	0,009			
	AlCl3 + D-gal. + Izo. D	0,135	0,014			

**Tablica 11. nastavak**

<b>CITOKINI</b>	<b>Skupina<sup>a</sup></b>	<b>X</b>	<b>SP</b>	<b>*P</b>	<b>°P</b>	<b>□P</b>
<b>IFN-γ</b> <b>(pg/mL)</b>	<b>Kont.</b>	0,107	0,007			
	<b>Sevo. D</b>	1,116	0,147	0,002930**		
	<b>Izo. D</b>	0,753	0,079	0,043948*		
	<b>AlCl<sub>3</sub> + D-gal. D</b>	0,117	0,003		0,011072 <sup>■</sup>	
	<b>AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. D</b>	0,448	0,080			
	<b>AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Izo. D</b>	0,526	0,017			
<b>TNF-α</b> <b>(pg/mL)</b>	<b>Kont.</b>	0,079	0,004			
	<b>Sevo. D</b>	0,519	0,049	0,007663**		
	<b>Izo. D</b>	0,386	0,067			
	<b>AlCl<sub>3</sub> + D-gal. D</b>	0,081	0,003		0,013263 <sup>■</sup>	
	<b>AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. D</b>	0,217	0,052			
	<b>AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Izo. D</b>	0,204	0,028			
<b>GM-CSF</b> <b>(pg/mL)</b>	<b>Kont.</b>	0,037	0,004			
	<b>Sevo. D</b>	0,071	0,016			
	<b>Izo. D</b>	0,165	0,036			
	<b>AlCl<sub>3</sub> + D-gal. D</b>	0,038	0,009			
	<b>AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. D</b>	0,036	0,003			0,02902 <sup>□</sup>
	<b>AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Izo. D</b>	0,054	0,002			
<b>RANTES</b> <b>(pg/mL)</b>	<b>Kont.</b>	1,718	0,073			
	<b>Sevo. D</b>	6,709	0,389	0,006979**		
	<b>Izo. D</b>	4,903	0,466			
	<b>AlCl<sub>3</sub> + D-gal. D</b>	2,085	0,066			
	<b>AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. D</b>	2,159	0,098			
	<b>AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Izo. D</b>	1,740	0,097		0,012122 <sup>■</sup>	

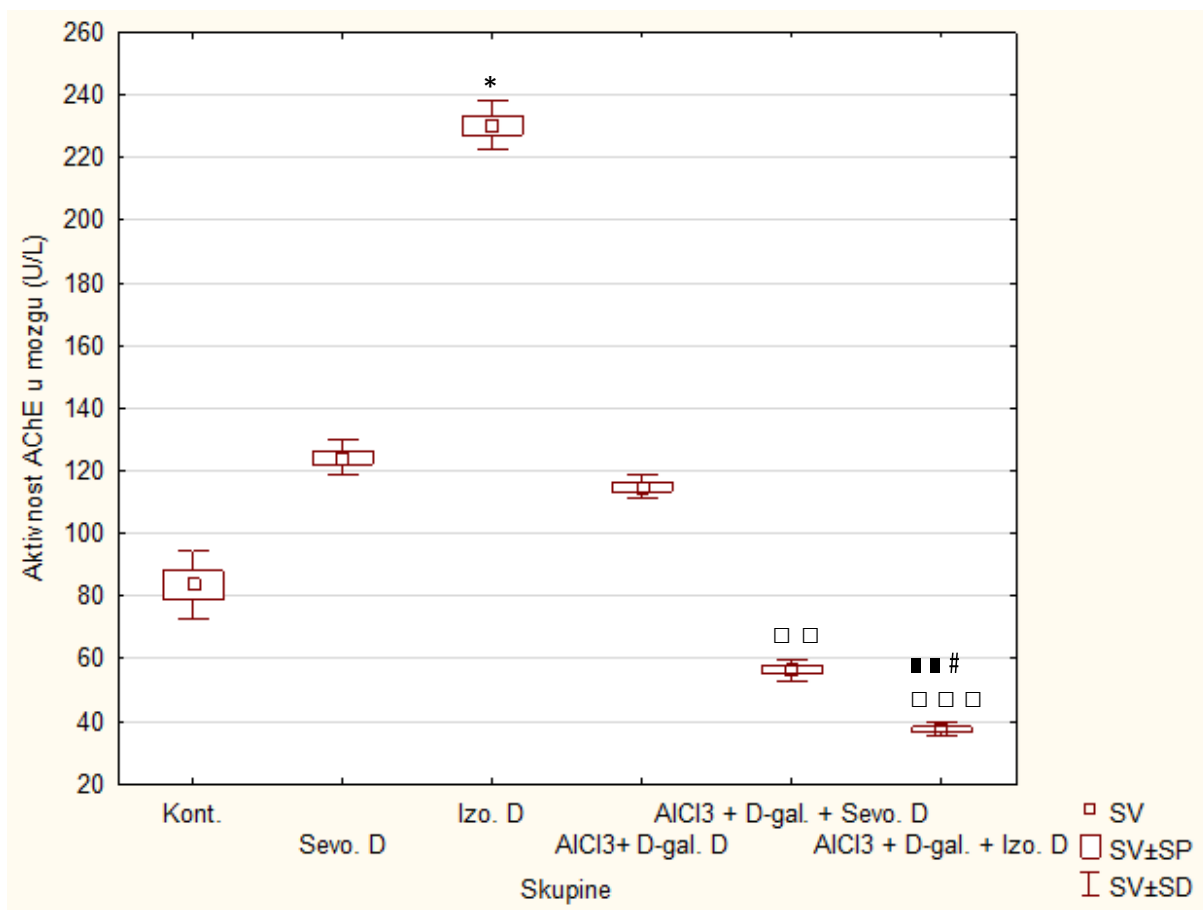
Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP. \*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ); <sup>□</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu (<sup>□</sup> $p < 0,05$ ; <sup>□□</sup> $p < 0,01$ ); <sup>■</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (<sup>■</sup> $p < 0,05$ ; <sup>■■</sup> $p < 0,01$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

## **4.10. Neurohistopatološke promjene u tkivu mozga nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijsva klorida + D-galaktoze**

### **4.10.1. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijsva klorida + D-galaktoze na aktivnost acetilkolinesteraze (AChE) u tkivu mozga**

Analizom rezultata aktivnosti AChE (Slika 45) vidljiva je statistički značajno povišena aktivnost u odnosu na kontrolnu skupinu kod skupine Izo. ( $p = 0,04$ ). Prateći daljne rezultate zapažena je statistički značajno snižena aktivnost kod  $AlCl_3 + D-gal.$  + Izo. skupine u odnosu na izofluran ( $p = 0,00001$ ), sevofluran ( $p = 0,001$ ) i  $AlCl_3 + D-gal.$  ( $p = 0,03$ ). Naposljetku, vidljiva je statistički značajno snižena aktivnost kod skupine  $AlCl_3 + D-gal.$  + Sevo. u odnosu na izofluran ( $p = 0,001$ ).



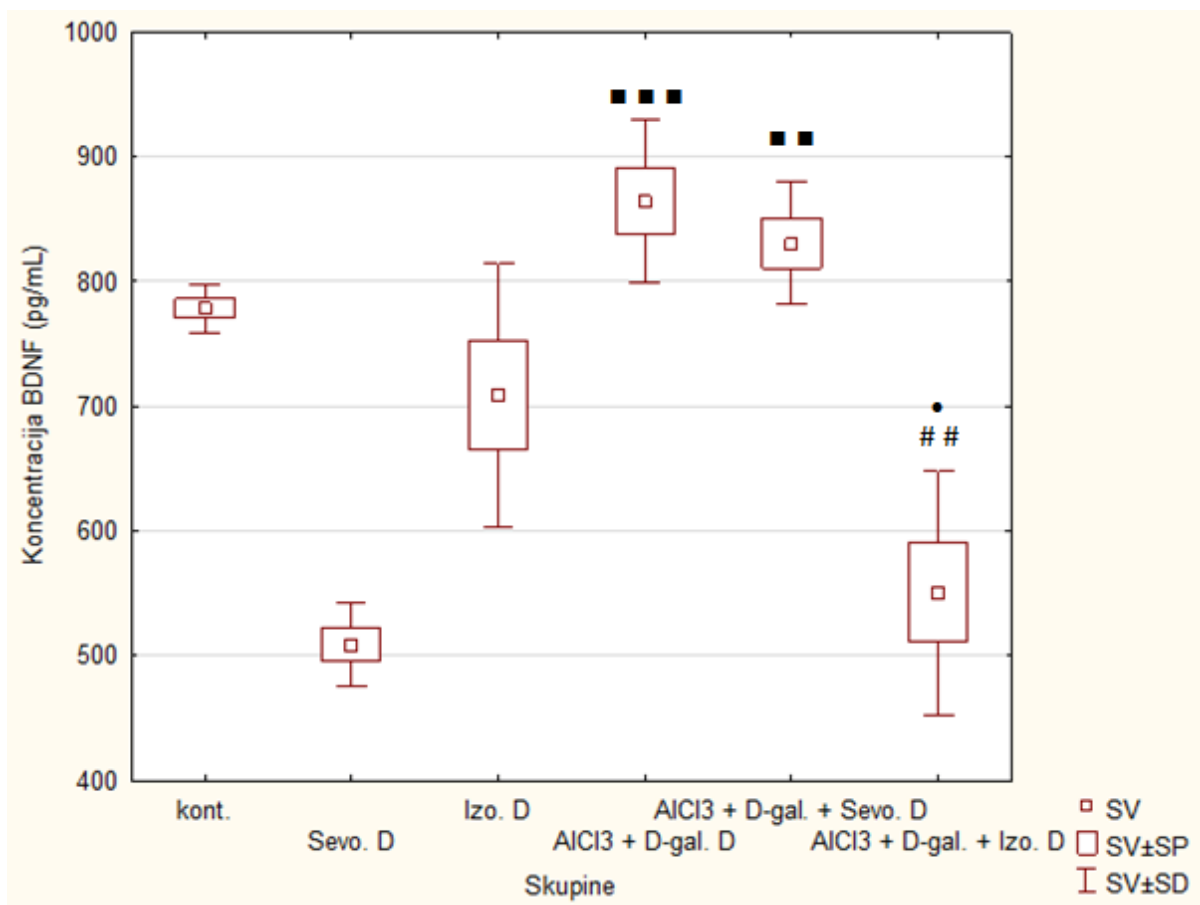
**Slika 45.** Aktivnost AChE nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP. □ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu (□□  $p < 0,01$ ; □□□  $p < 0,001$ ); ■ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (■ ■  $p < 0,01$ ); \* Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu ( $*p < 0,05$ ); # Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D-gal. ( $#p < 0,05$ )

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

#### **4.10.2. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijskoga klorida + D-galaktoze na koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF) u mozgu**

Analizom rezultata koncentracije BDNF-a u uzorku homogenata tkiva mozga (Slika 46) zapažena je statistički značajno viša koncentracija kod skupine AlCl<sub>3</sub> + D-gal. u odnosu na sevofluran skupinu ( $p = 0,0007$ ). Također, vidljiva je viša koncentracija za skupinu AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. u odnosu na sevofluran skupinu ( $p = 0,002$ ). Naposljetku, statistički značajno je manja koncentracija BDNF-a kod skupine AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Izo. u odnosu na AlCl<sub>3</sub> + D-gal. skupinu ( $p = 0,006$ ) i AlCl<sub>3</sub> + D-gal. + Sevo. skupinu ( $p = 0,02$ ).



**Slika 46.** Koncentracija BDNF-a nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

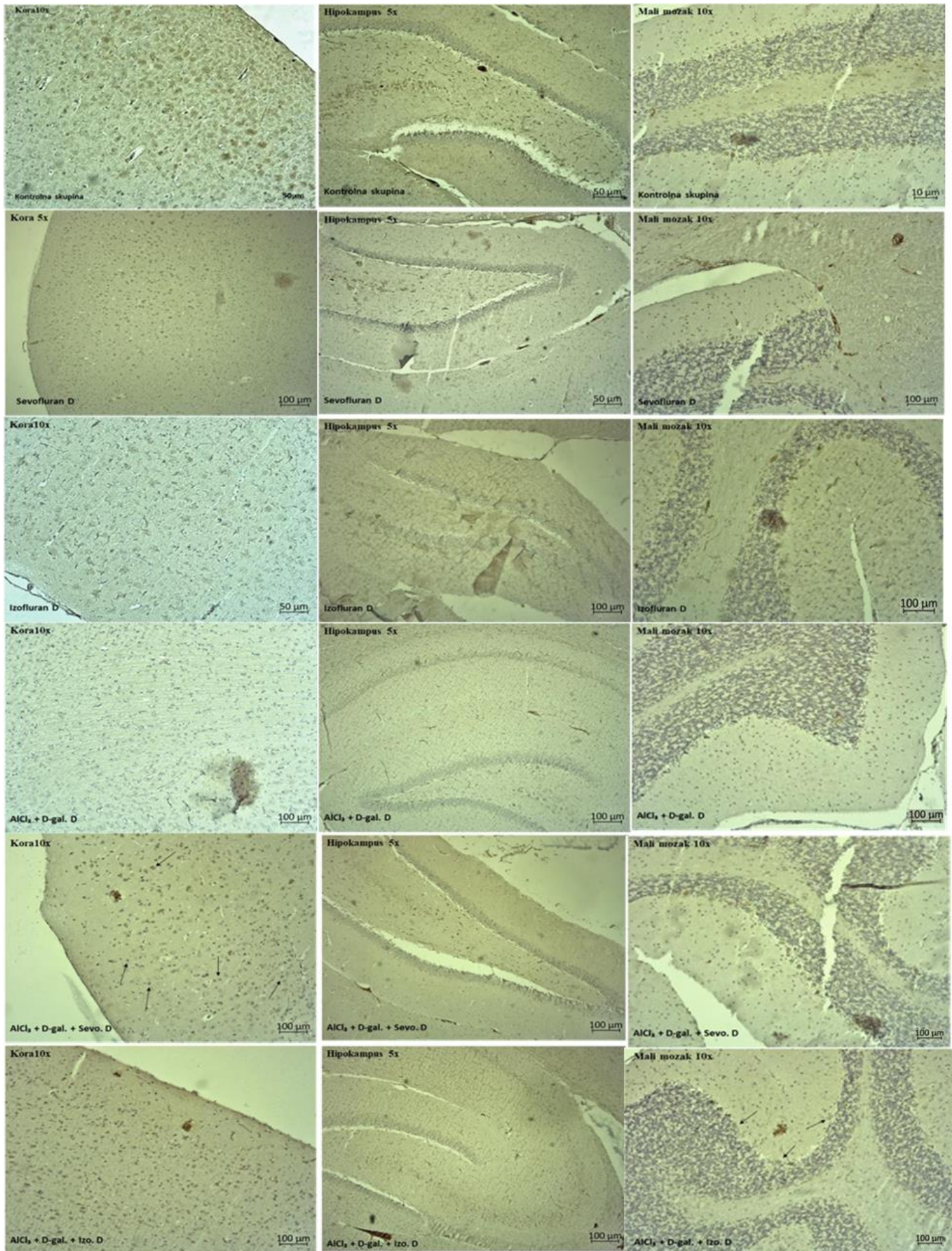
■ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ); # Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. (## $p < 0,01$ ); \* Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. (\* $p < 0,05$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

### **4.10.3. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na neurohistopatološke promjene u mozgu**

Analizom histoloških preparata nakon imunohistokemijskog označavanja biljezima 4G8, AT8, PHF1 i MC1 (Slika 47), neurodegenerativne promjene, odnosno prisutnost pozitivnog signala, zabilježene su samo kod biljega 4G8, ostalo je bilo negativno. Imunohistokemijskim bojanjem analizirana je izraženost biljega anti amiloid beta ( $A\beta$ ), klon 4G8. Protutijelo se veže na aminokiselinske ostatke 17-24  $A\beta$ -peptida prepoznavajući epitop koji leži unutar aminokiselina 18-22  $A\beta$ . 4G8 amiloidno protutijelo prepoznaje pogrešno obrađene izoforme i prekursorske oblike  $A\beta$  peptida.





**Slika 47.** Izraženost biljega 4G8 u području kore, hipokampusa i malog mozga nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* aluminijevim kloridom + D-galaktozom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja aluminijeva klorida + D-galaktoze svaki drugi dan tijekom 28 dana. Prikazani su reprezentativni prerezi kontrole i tretiranih skupina vizualizirani imunohistokemijskim bojanjem. Pozitivan signal označen je crnom strelicom. Stanice su promatrane pod svjetlosnim mikroskopom Axiostar plus (Zeiss, Njemačka) i slikane kamerom Zeiss Axiocam 105 color uz pomoć programa Zen 2.3 (blue edition). Mjerilo na stvarnom povećanju objektiva 5x ili 10x (kora) je 50 µm ili 100 µm, na povećanju 5x (hipokampus) je 50 µm ili 100 µm te na povećanju 10x (mali mozak) je 10 µm ili 100 µm.

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. – aluminijev klorid + D-galaktoza, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i sevofluran, AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo. – aluminijev klorid + D-galaktoza i izofluran.

Imunohistokemijskim bojanjem analizirana je izraženost biljega 4G8 (Slika 47) u području kore velikog mozga (lat. *cortex*), hipokampalne formacije (lat. *hippocampus*) i maloga mozga (lat. *cerebellum*) te su promjene na slikama označene strelicama. Prosječna izraženost biljega je veća u području kore velikoga mozga u odnosu na mali mozak. U hipokampalnoj regiji pozitivan signal nije zabilježen. U kori velikog mozga kod skupine tretirane aluminijevim kloridom + D-galaktozom + Sevofluranom na više mjesta zabilježena je akutna proizvodnja amiloida čije nakupljanje je vidljivo u citoplazmi stanica, no nije zabilježeno prisustvo beta amiloidnih plakova. Nadalje, u malom mozgu skupine tretirane aluminijevim kloridom + D-galaktozom + Izofluranom zabilježena je prisutnost amiloida, čije nakupljanje je vidljivo u presjecima krvnih žila. Također nije zabilježeno prisustvo beta amiloidnih plakova.

## **4.11. Patofiziološke promjene štakora nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana**

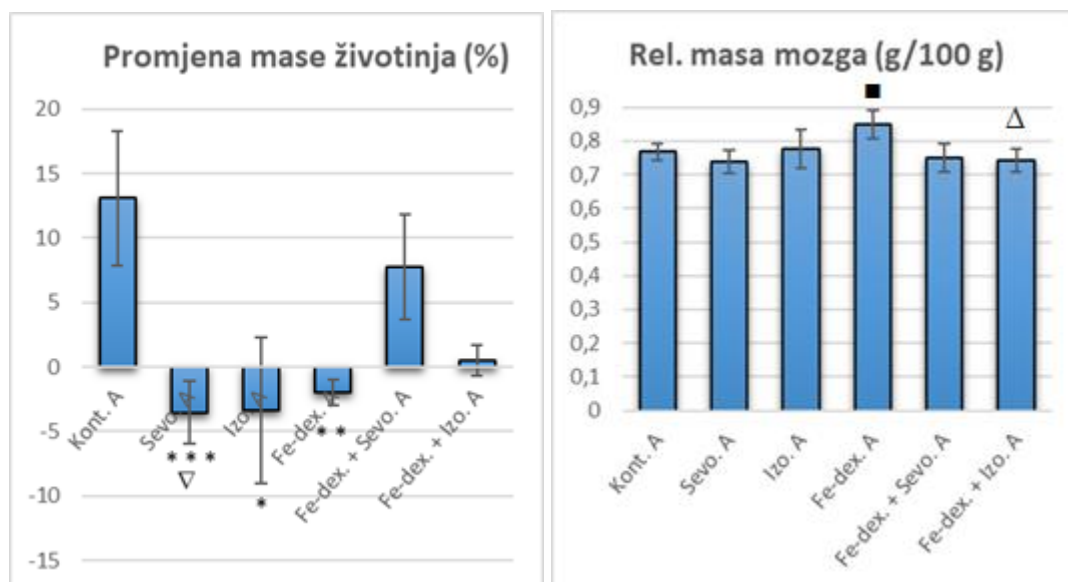
Povećanu proizvodnju ROS-a, osim aluminijska, uzrokuje i željezo. Željezo je esencijalni metal, a u mozgu je prisutno u visokoj razini vezano sa proteinima poput citokroma, feritina, akonitaze, u mitohondrijima, citokromu P450, tirozinu i triptofan hidroksilazi koja katalizira početak sinteze dopamina i serotonina. Međutim prekomjerna razina željeza kao i oslobađanja željeza tijekom oštećenja moždanog tkiva vodi nastanku Fentonove reakcije te povećanju razine OH• radikala 10 do 1000 puta u prisutnosti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ovi procesi povećavaju razinu lipidne peroksidacije i autooksidacije neurotransmitera pri čemu nastaju epileptična izbijanja, deplecija dopamina i smrt neuralnih stanica. Oslobođeno željezo u mozgu ostaje dugo zbog slabog vezanja željeza u cerebrospinalnom likvoru koji okružuje mozak. Temeljem navedenog, visoka razina slobodnog željeza vodi neuroupali, aktivaciji mikroglia stanice i astrocita te stvaranju dodatnih količina ROS-a, kao glavnog uzročnika nastanka kroničnog oksidacijskog stresa. Upala i oksidativni stres zajedno dovode do stvaranja Aβ amiloida koji dodatno mogu biti povećani dugotrajnim izlaganjem inhalacijskim anestheticima. Njihov združeni učinak može voditi ubrzanom razvoju strukturnih i funkcionalnih neurodegenerativnih promjena i razvoja AD kroz povećanje OS-a, upale te narušavanju makrofagne polarizacije i hepcidin-feroportin osi.

### **4.11.1. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na promjenu mase životinja i relativnu težinu mozga**

Tijekom subakutne primjene inhalacijskih anestetika i Fe-dex. došlo je do statistički značajnog gubitka tjelesne mase životinja u skupinama izloženim inhalacijskim anestheticima i Fe-dex. u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 48a). Nadalje, kod sevofluran skupine dolazi do statistički značajnog gubitka tjelesne mase u odnosu na skupinu obrađenu Fe-dex. + Sevo. ( $p < 0,05$ ).

Na Slici 48b također su prikazani rezultati promjene relativne težine mozga životinja tretiranih subakutnim dozama inhalacijskih anestetika, željezo dekstrana i njihovim

kombinacijama te se zapaža da je došlo do statistički značajnog povećanja relativne mase mozga kod skupine Fe-dex. ( $p < 0,05$ ) u odnosu na sevofluran skupinu. Također vidljivo je statistički značajno smanjenje relativne težine mozga kod skupine obrađene Fe-dex. + Izo. u odnosu na Fe-dex. skupinu ( $p < 0,05$ ) i kontrolnu skupinu ( $p < 0,01$ ).



a)

b)

**Slika 48.** Promjena tjelesne mase (a) i relativne mase mozga štakora (b) nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestheticima 2 sata nakon *ip* injiciranja Fe-dex. svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SP$ .

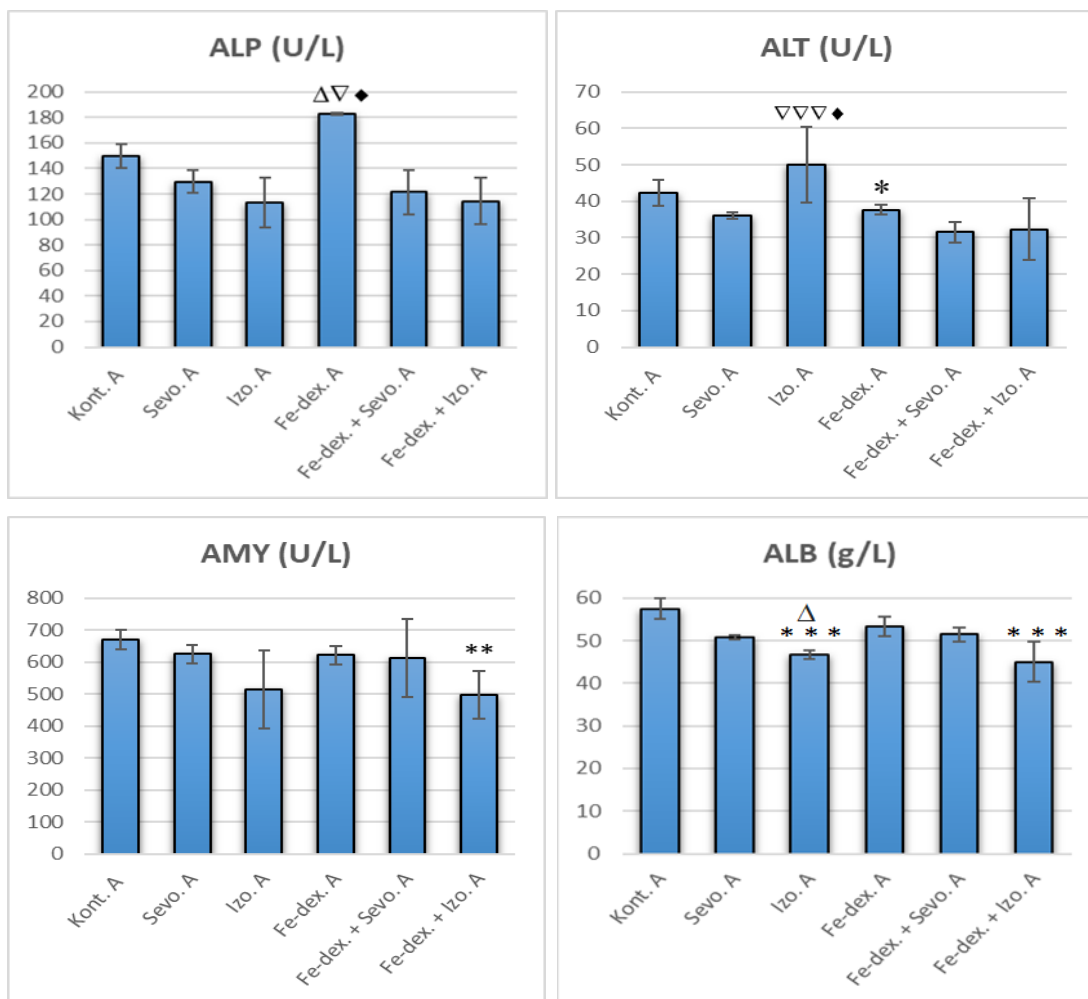
\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ ); ■Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu ( $^{\blacksquare}p < 0,05$ );  $\nabla$ Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu Fe-dex. + Sevo. ( $^{\nabla}p < 0,05$ );  $\Delta$ Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu željezo dekstranom ( $^{\Delta}p < 0,05$ ).

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

#### **4.11.2. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na biokemijske odrednice štakora**

Rezultati promjene enzima i proteina prikazani su na Slici 49, a metabolita i supstrata na Slici 50. Prema dobivenim rezultatima najizraženije promjene u biokemijskim parametrima vidljive su u skupini izloženoj izofluranu (Izo.), tako da su u odnosu na izofluran koncentracije GLOB-a, TP-a te ALB-a statistički značajno smanjene dok je koncentracija ALT-a značajno povećana (Slika 49). U skupini obrađenoj Fe-dex. + Izo. koncentracija amilaze ( $p < 0,01$ ) i albumina ( $p < 0,001$ ) je statistički značajno smanjena u odnosu na kontrolnu skupinu. Nadalje, u skupini obrađenoj Fe-dex. povećana je koncentracija ALP-a u odnosu na skupine izoflurana, Fe-dex. + Sevo. i Fe-dex. + Izo., dok je u skupini obrađenoj Fe-dex. + Sevo. koncentracija ALT-a smanjena u odnosu na kontrolnu skupinu (vidi Sliku 49).

Slika 50 prikazuje promjene u metabolitima i supstratima te njeni rezultati ukazuju na povećanu koncentraciju kreatinina u skupini izloženoj sevofluranu u odnosu na Fe-dex. + Izo. i Fe-dex. skupine. Nadalje, u skupini izloženoj izofluranu značajno je povećana koncentracija GLU, PHOS, CRE te  $K^+$  (vidi Sliku 50). Također vidljivo je da je koncentracija natrija značajno povećana u skupini obrađenoj Fe-dex. + Izo., dok je koncentracija glukoze povećana u skupini obrađenoj Fe-dex.

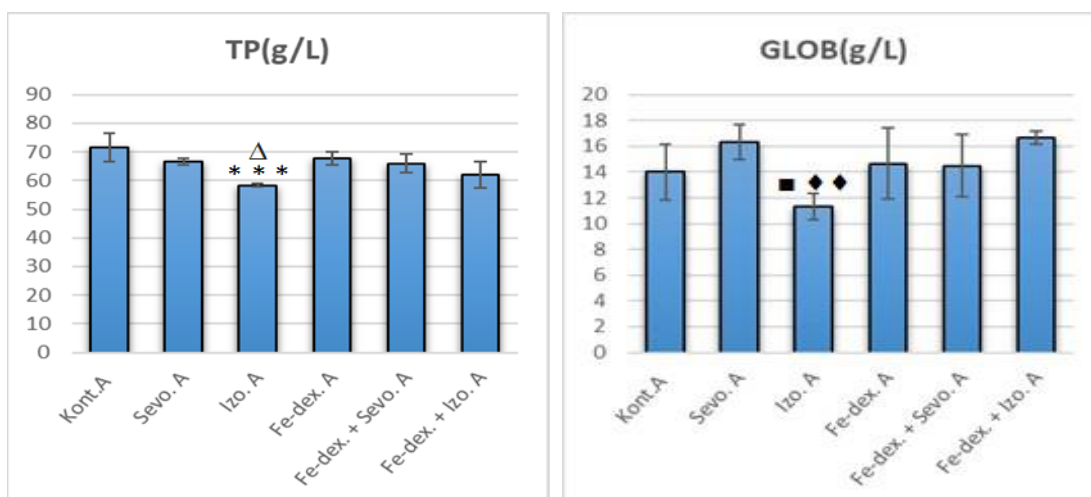


**Slika 49.** Koncentracije enzima i proteina u krvi štakora nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestheticima 2 sata nakon *ip* injiciranja Fe-dex. svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ );  $\nabla$ Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu Fe- dex. + Sevo. ( $\nabla p < 0,05$ ;  $\nabla\nabla\nabla p < 0,001$ );  $\blacklozenge$ Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu Fe-dex. + Izo. ( $\blacklozenge p < 0,05$ );  $\Delta$ Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu željezo dekstranom ( $\Delta p < 0,05$ ).

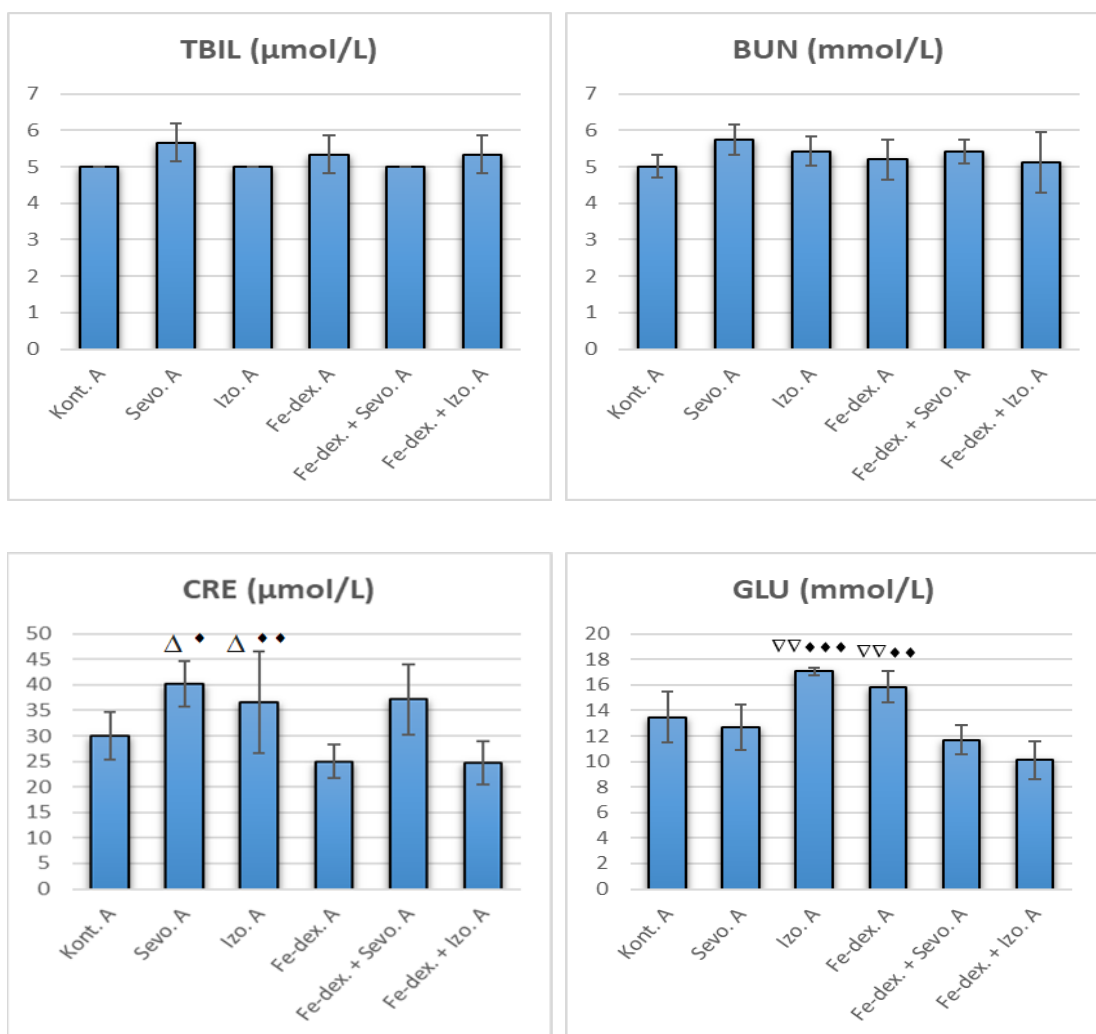
Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, ALP – alkalna fosfataza, ALT – alanin aminotransferaza, AMY – amilaza, ALB – albumin, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, Fe-dex. – željezo dekstran, Fe-dex. + Sevo. – željezo dekstran i sevofluran, Fe-dex. + Izo. – željezo dekstran i izofluran.



**Nastavak Slike 49.** Koncentracije enzima i proteina u krvi štakora nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\*\* $p < 0,001$ ); ■Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu ( $p < 0,05$ ); ♦Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu Fe-dex. + Izo. (♦ $p < 0,01$ ); <sup>Δ</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu željezo dekstranom (<sup>Δ</sup> $p < 0,05$ ).

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



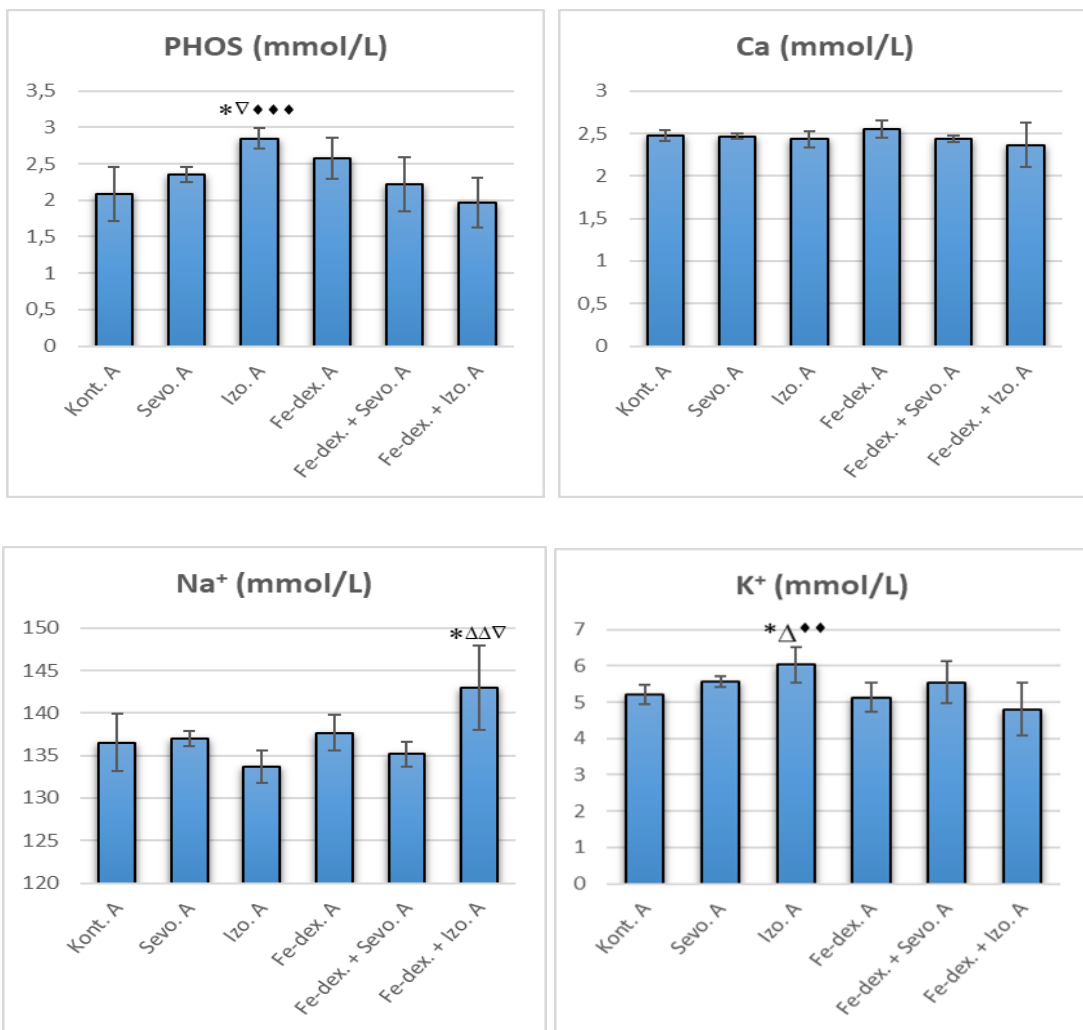
**Slika 50.** Koncentracije metabolita i supstrata u krvi štakora nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anesticima 2 sata nakon *ip* injiciranja Fe-dex. svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV  $\pm$  SP.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu ( $*p < 0,05$ ); <sup>Δ</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu željezo dekstranu ( $^{\Delta}p < 0,05$ ); <sup>▽</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu Fe-dex. + Sevo. ( $^{\nabla\nabla}p < 0,01$ ); <sup>♦</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu Fe-dex. + Izo. ( $^{\diamond}p < 0,05$ ;  $^{\diamond\diamond}p < 0,01$ ;  $^{\diamond\diamond\diamond}p < 0,001$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, TBIL – ukupni bilirubin, BUN – dušik uree u krvi, CRE – kreatinin, GLU – glukoza u krvi, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, Fe-dex. – željezo dekstran, Fe-dex. + Sevo. – željezo dekstran i sevofluran, Fe-dex. + Izo. – željezo dekstran i izofluran.





### Nastavak Slike 50.

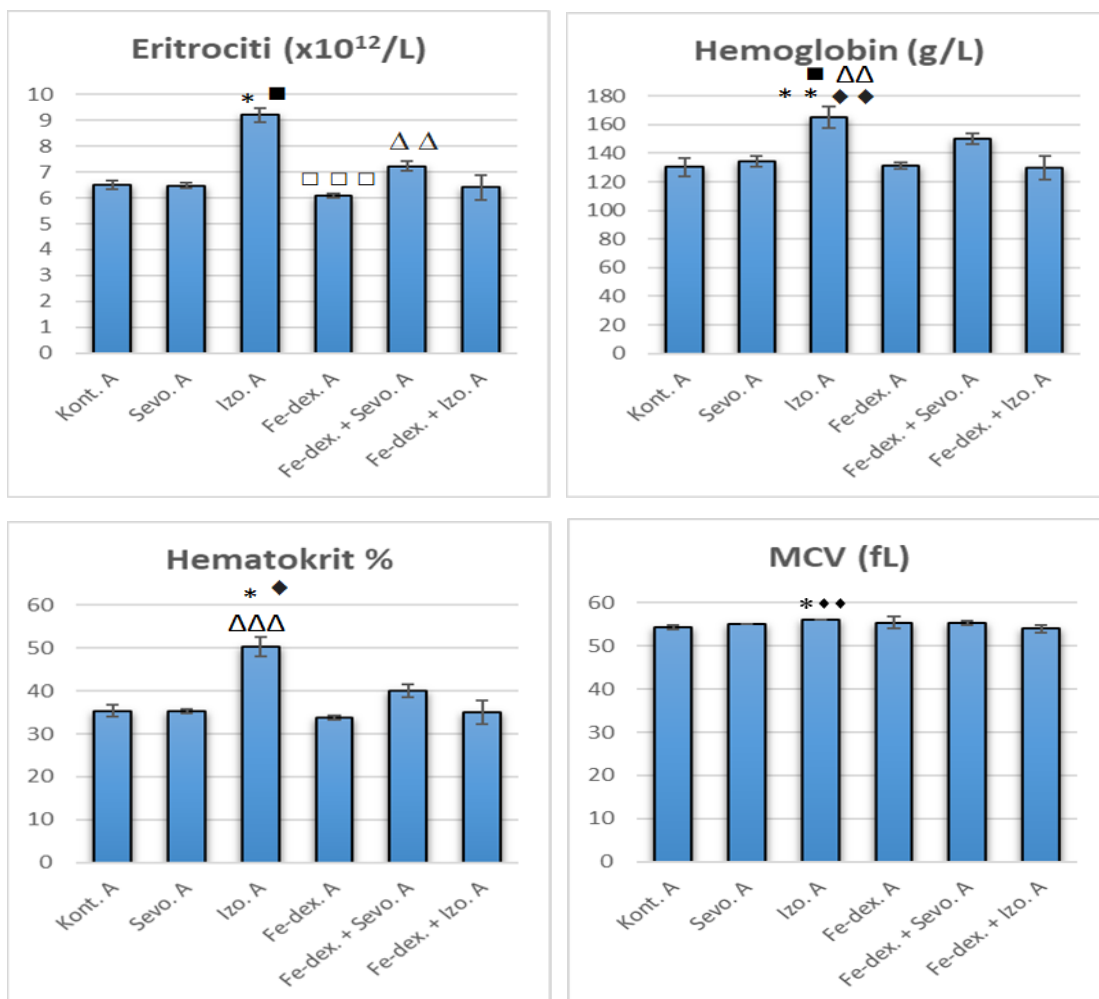
\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu ( $*p < 0,05$ ); <sup>Δ</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu željezo dekstranu ( $^{\Delta}p < 0,05$ ;  $^{\Delta\Delta}p < 0,01$ ); <sup>∇</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu Fe-dex. + Sevo. ( $^{\nabla}p < 0,05$ ); <sup>♦</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu Fe-dex. + Izo. ( $^{\diamond\diamond}p < 0,01$ ;  $^{\diamond\diamond\diamond}p < 0,001$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, PHOS – fosfor, Ca<sup>2+</sup> – kalcij, Na<sup>+</sup> – natrij, K<sup>+</sup> – kalij, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, Fe-dex. – željezo dekstran, Fe-dex. + Sevo. – željezo dekstran i sevofluran, Fe-dex. + Izo. – željezo dekstran i izofluran.

### **4.11.3. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na hematološke odrednice štakora**

Na Slici 51 prikazane su hematološke odrednice iz krvi štakora nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i Fe-dex. Vidljivo je statistički značajno sniženje ukupnog broja eritrocita u skupinama obrađenim Fe-dex. ( $p < 0,001$ ) u odnosu na skupinu obrađenu izofluranom. Nadalje, zapaženo je povećanje ukupnog broja eritrocita kod skupine Fe-dex. + Sevo. u odnosu Fe-dex., dok je kod skupine izložene izofluranu broj eritrocita povećan i u odnosu na skupinu obrađenu sevofluranom i na kontrolnu skupinu.

Rezultati Slike 51 pokazuju da je u skupini izloženoj izofluranu vrijednost hemoglobina, hematokrita i MCV-a statistički značajno povećana, dok je vrijednost MCH-a, MCHC-a i RDW-a značajno snižena. U skupini obrađenoj Fe-dex. + Sevo. statistički značajno je povećana koncentracija hematokrita u odnosu na skupinu obrađenu Fe-dex. ( $p < 0,001$ ).

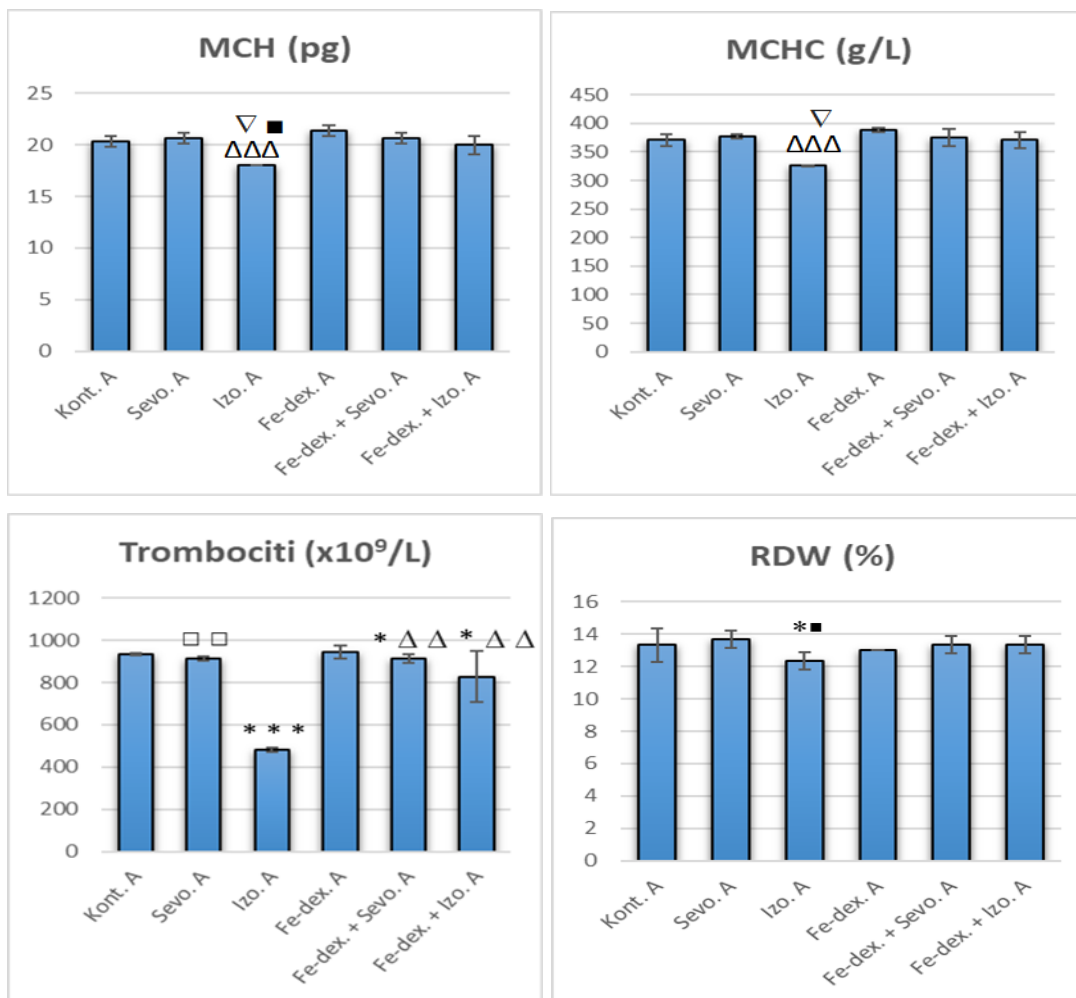


**Slika 51.** Hematološke odrednice krvi štakora nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana, te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestetikima 2 sata nakon *ip* injiciranja Fe-dex. svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ); ■Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (■ $p < 0,05$ ); □Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu (□□ $p < 0,001$ ); ♦Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu Fe-dex. + Izo. (♦ $p < 0,05$ ; ♦♦ $p < 0,01$ ).

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



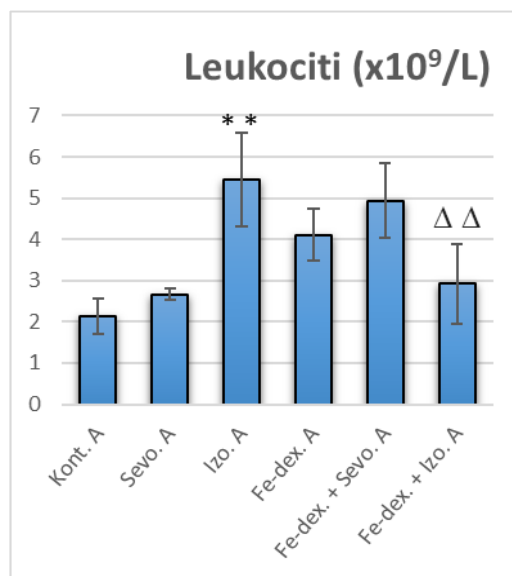
### Nastavak Slike 51.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ); ■Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (■ $p < 0,05$ ); □Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu (□ $p < 0,01$ ; □□ $p < 0,001$ ); ^Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu željezo dekstranom (^ $p < 0,01$ ; ^^ $p < 0,001$ ); ∇Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu Fe-dex. + Sevo. (∇ $p < 0,05$ ).

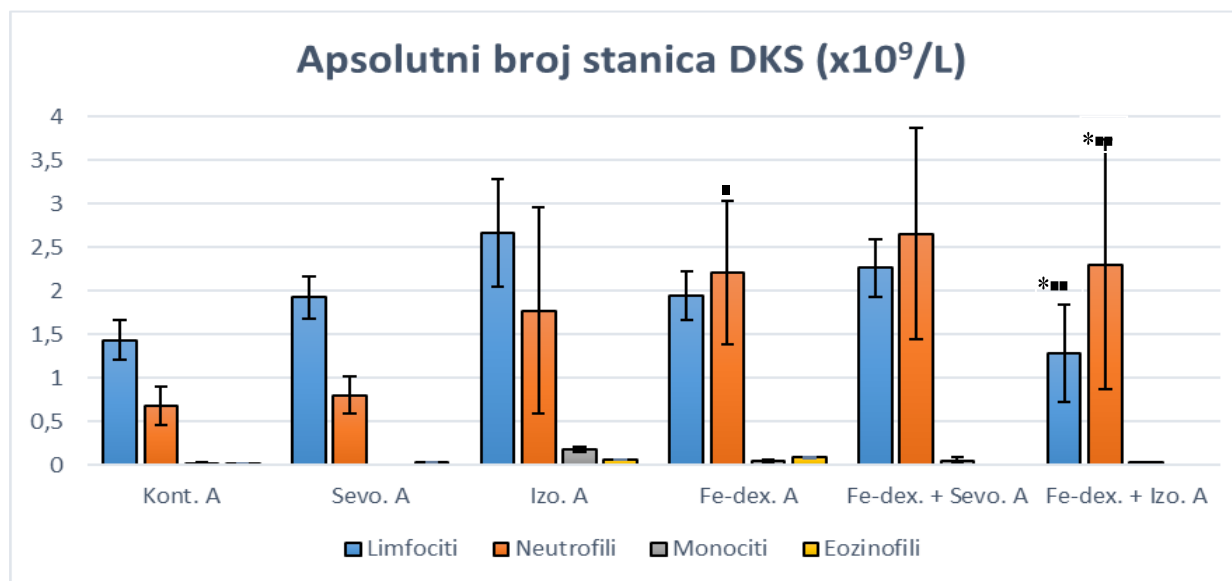
Kratice: *ip* – intraperitonealno, *SV* – srednja vrijednost, *SP* – standardna pogreška, *MCH* – sadržaj hemoglobina u eritrocitima, *MCHC* – koncentracija hemoglobina u eritrocitima, *RDW* – raspodjela eritrocita po veličini, *Kont.* – kontrola, *Sevo.* – sevofluran, *Izo.* – izofluran, *Fe-dex.* – željezo dekstran, *Fe-dex. + Sevo.* – željezo dekstran i sevofluran, *Fe-dex. + Izo.* – željezo dekstran i izofluran.

#### **4.11.4. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na ukupni broj leukocita i diferencijalnu analizu krvi**

Prateći daljnje rezultate, na Slici 52a zapažen je značajno povećan broj leukocita kod skupine tretirane sevofluranom u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je broj leukocita statistički značajno snižen kod skupine tretirane s Fe-dex. + Izo. ( $p < 0,01$ ) u odnosu na Fe-dex. skupinu ( $p < 0,01$ ). Rezultati diferencijalne krvne slike (Slika 52b) ukazuju na upalne promjene kroz smanjenje postotka limfocita, a statistički značajno povećanje postotka neutrofila u skupini obrađenoj Fe-dex. + Izo. u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu ( $p < 0,01$ ) i kontrolnu skupinu ( $p < 0,05$ ). Nadalje, u skupini obrađenoj Fe-dex. zapažen je statistički značajno povećan postotak neutrofila u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu ( $p < 0,05$ ).



a)



b)

**Slika 52.** Ukupni broj leukocita (a) i analiza diferencijalne krvne slike štakora (b) nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestheticima 2 sata nakon *ip* injiciranja Fe-dex. svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ); <sup>■</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (<sup>■</sup> $p < 0,05$ ; <sup>■</sup> $p < 0,01$ ); <sup>△</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu željezo dekstranom (<sup>△△</sup> $p < 0,01$ ).

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

#### 4.11.5. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na osmotsku otpornost eritrocita

Tablica 12 pokazuje promjene u hemolizi eritrocita nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana. Početak hemolize je vidljiv pri 0,6% koncentraciji NaCl gdje su najveće promjene zapažene kod primjene Fe-dex., postotak hemolize bio je 6,31%. Daljnja hemoliza se znatno povećava pri 0,5% koncentraciji NaCl te je znatno veća kod izlaganja izofluranu te primjeni Fe-dex. samog ili združenog s inhalacijskim anesticima. Hemoliza se kretala od 16,6% (Fe-dex) do 29,66% u skupini Fe-dex. + Sevo.. Hemoliza je bila znatno manja u kontrolnoj skupini (3,51%) i skupini izloženoj Sevo. (7,27%) pri 0,5% koncentraciji NaCl.

**Tablica 12.** Osmotska hemoliza eritrocita nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

NaCl (%)	0	0,3	0,4	0,5	0,6	0,9
Skupine <sup>a</sup>	Postotak hemolize					
Kont. A	100,00	92,02	86,89	3,51	0	0
Sevo. A	100,00	94,65	86,43	7,27	0	0
Izo. A	100,00	80,10	78,57	23,28	0,89	0
Fe-dex. A	100,00	92,14	85,84	16,06	6,31	0
Fe-dex. + Sevo. A	100,00	84,63	82,67	29,66	1,21	0
Fe-dex. + Izo. A	100,00	72,62	67,34	22,80	1,44	0

<sup>a</sup>Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anesticima 2 sata nakon *ip* injiciranja Fe-dex. svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao % hemolize eritrocita prema formuli: Hemoliza (%) = (A/B)\*100 gdje je A – hemoliza uzorka, B - potpuna hemoliza.

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

## **4.12. Promjene koncentracije esencijalnih i teških metala u tkivu mozga nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana**

### **4.12.1. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na koncentraciju esencijalnih metala u tkivu mozga**

Nakon primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana vidljive promjene u koncentraciji esencijalnih metala u tkivu mozga pokazane su u Tablici 13. U odnosu na kontrolnu skupinu došlo je do statistički značajnog povećanja koncentracije Fe u skupini izloženoj Fe-dex. ( $p < 0,05$ ) i Fe-dex. + Izo. ( $p < 0,05$ ). Koncentracija Zn povećana je u skupini Fe-dex. + Sevo. i Fe-dex. + Izo. u odnosu na kontrolu ( $p < 0,05$  i  $p < 0,01$ ). Koncentracija Cr je povećana u skupini Fe-dex. u odnosu na kontrolu ( $p < 0,05$ ) i sevofluran ( $p < 0,05$ ). U odnosu na sevofluran došlo je do promjena Mn u skupini izloženoj izofluranu ( $p < 0,01$ ) te Se u skupini Fe-dex. + Izo. ( $p < 0,05$ ).



**Tablica 13.** Koncentracija esencijalnih metala nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana, te njihove kombinacije.

Skupine <sup>a</sup>	Esencijalni metali (mg/kg)							
	(X ± SP)							
	Fe	Zn	Mn	Se	Cu	Co	Cr	Mo
Kont.	14,90 ± 0,92	8,72 ± 0,90	0,43 ± 0,04	0,14 ± 0,01	2,75 ± 0,35	0,004 ± 0,001	0,015 ± 0,000	0,030 ± 0,002
Sevo. A	21,40 ± 0,99	13,24 ± 0,47	0,39 ± 0,01	0,14 ± 0,00	2,77 ± 0,06	0,003 ± 0,000	0,011 ± 0,001	0,042 ± 0,002
Izo. A	27,58 ± 1,35	13,66 ± 0,23	0,77 ± 0,03 <sup>■</sup>	0,16 ± 0,00	2,93 ± 0,09	0,004 ± 0,000	0,063 ± 0,008	0,061 ± 0,004 <sup>**</sup>
Fe-dex. A	26,49 ± 2,92 <sup>*</sup>	13,83 ± 0,44	0,47 ± 0,03	0,17 ± 0,00	3,24 ± 0,10	0,004 ± 0,000	0,112 ± 0,019 <sup>■*</sup>	0,046 ± 0,002
Fe-dex. + Sevo. A	26,61 ± 0,33	15,32 ± 0,64 <sup>*</sup>	0,52 ± 0,01	0,18 ± 0,00	3,30 ± 0,04	0,004 ± 0,000	0,050 ± 0,011	0,043 ± 0,001
Fe-dex. + Izo. A	28,65 ± 0,82 <sup>*</sup>	15,91 ± 0,65 <sup>**</sup>	0,47 ± 0,00	0,24 ± 0,02 <sup>■</sup>	3,20 ± 0,08	0,004 ± 0,000	0,034 ± 0,000	0,045 ± 0,000

<sup>a</sup>Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao X ± SP.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01); <sup>■</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (<sup>■</sup>*p* < 0,05; <sup>■</sup>*p* < 0,01).

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

#### **4.12.2. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na koncentraciju visokotoksičnih i nesencijalnih metala u tkivu mozga**

U Tablici 14 vidljiva je koncentracija Pb je značajno povećana u skupini Fe-dex. + Sevo. u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,01$ ) i u odnosu na sevofluran skupinu ( $p < 0,05$ ). U odnosu na kontrolnu skupinu značajno je povećana i koncentracija Al u skupini Fe-dex. ( $p < 0,01$ ) i Fe-dex. + Sevo. ( $p < 0,05$ ). Od neesencijalnih metala promjenjena je razina Ni u skupini Sevo. ( $p < 0,01$ ) i Ba u skupini Fe-dex. ( $p < 0,05$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu. Koncentracija Ba u skupini Fe-dex. je veća u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu ( $p < 0,05$ ).

**Tablica 14.** Koncentracija visokotoksičnih i neesencijalnih metala nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

Skupine <sup>a</sup>	Visokotoksični metali (µg/kg) (X ± SP)				Neesencijalni metali (µg/kg) (X ± SP)	
	As ( µg/kg )	Pb ( µg/kg )	Cd (µg/kg )	Al (µg/kg )	Ba µg/kg	Ni µg/kg
Kont.	62,73 ± 3,39	0,67 ± 0,27	0,07 ± 0,02	288,19 ± 24,86	10,90 ± 0,64	6,31 ± 0,92
Sevo. A	93,50 ± 9,34	1,73 ± 1,01	0,14 ± 0,06	506,47 ± 64,29	9,97 ± 1,72	60,54 ± 3,31**
Izo. A	92,02 ± 11,13	8,21 ± 2,12	0,28 ± 0,10	800,54 ± 88,10	21,89 ± 3,76	49,23 ± 7,20
Fe-dex. A	62,76 ± 14,12	23,70 ± 1,56	0,51 ± 0,16	1556,39 ± 108,58**	49,22 ± 2,10 <sup>■</sup> *	17,58 ± 2,30
Fe-dex. + Sevo. A	89,59 ± 8,74	36,30 ± 0,74 <sup>■</sup> **	1,18 ± 0,38	1366,99 ± 234,05*	26,90 ± 0,97	15,07 ± 0,20
Fe-dex. + Izo. A	76,90 ± 8,58	24,20 ± 1,41	1,71 ± 0,46*	1186,42 ± 88,70	27,69 ± 5,61	10,61 ± 1,62

<sup>a</sup>Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestheticima 2 sata nakon *ip* injiciranja Fe-dex. svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

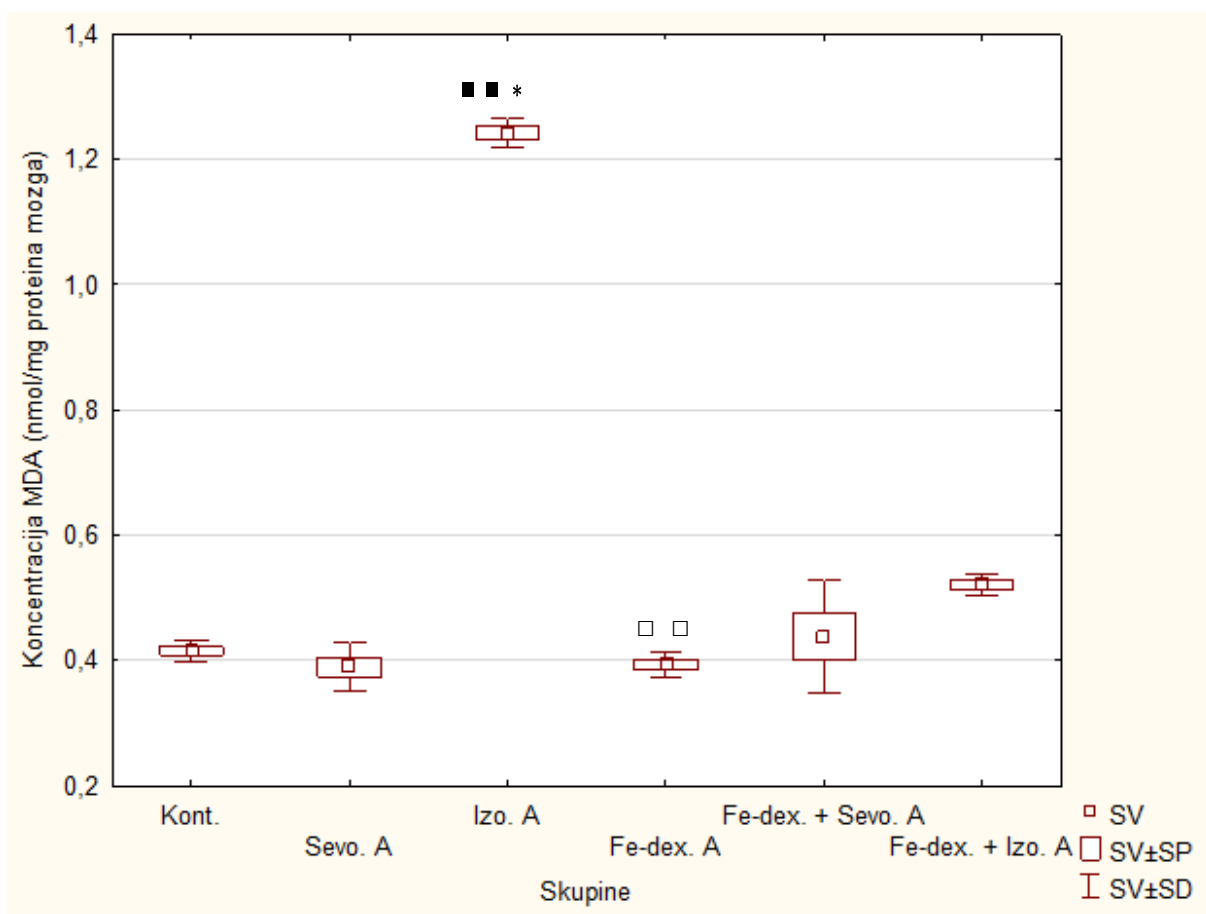
\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ); <sup>■</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (<sup>■</sup> $p < 0,05$ ).

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

## **4.13. Oksido-redukcijske promjene u tkivu mozga nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana**

### **4.13.1. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na razinu lipidne peroksidacije (malondialdehid, MDA) u tkivu mozga**

Oštećenje lipida utvrđeno je mjerenjem količine malondialdehida (MDA). Analizom koncentracije MDA u homogenatu tkiva mozga (Slika 53) zapažena je statistički značajno povišena vrijednost kod skupine Izo. u odnosu na sevofluran skupinu ( $p = 0,001$ ) i kontrolnu skupinu ( $p = 0,03$ ). Također vidljiva je statistički snižena vrijednost kod skupine Fe-dex. u odnosu na izofluran skupinu ( $p = 0,001$ ).



**Slika 53.** Koncentracija MDA nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

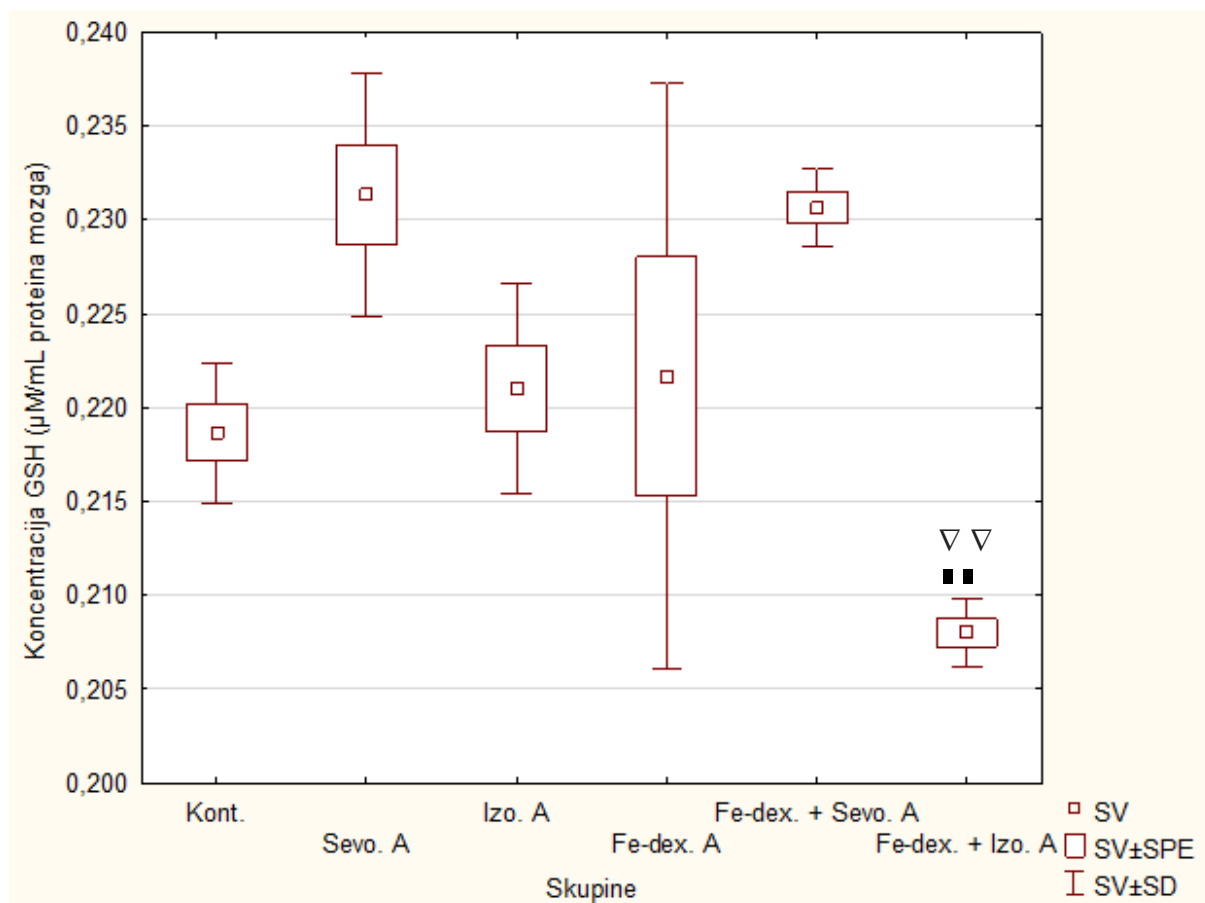
Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestheticima 2 sata nakon *ip* injiciranja Fe-dex. svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu ( $*p < 0,05$ ); □ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu ( $□p < 0,01$ ); ■ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu ( $■p < 0,01$ ).

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

### 4.13.2. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na ukupnu razinu glutationa (GSH) u tkivu mozga

Analizom rezultata koncentracije ukupnog glutationa (GSH) u uzorku homogenata tkiva mozga (Slika 54) vidljiva je statistički značajno manja koncentracija kod skupine Fe-dex. + Izo. u odnosu na skupinu sevofluran ( $p = 0,001$ ) te skupinu Fe-dex. + Sevo. ( $p = 0,003$ ).



**Slika 54.** Koncentracija GSH nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

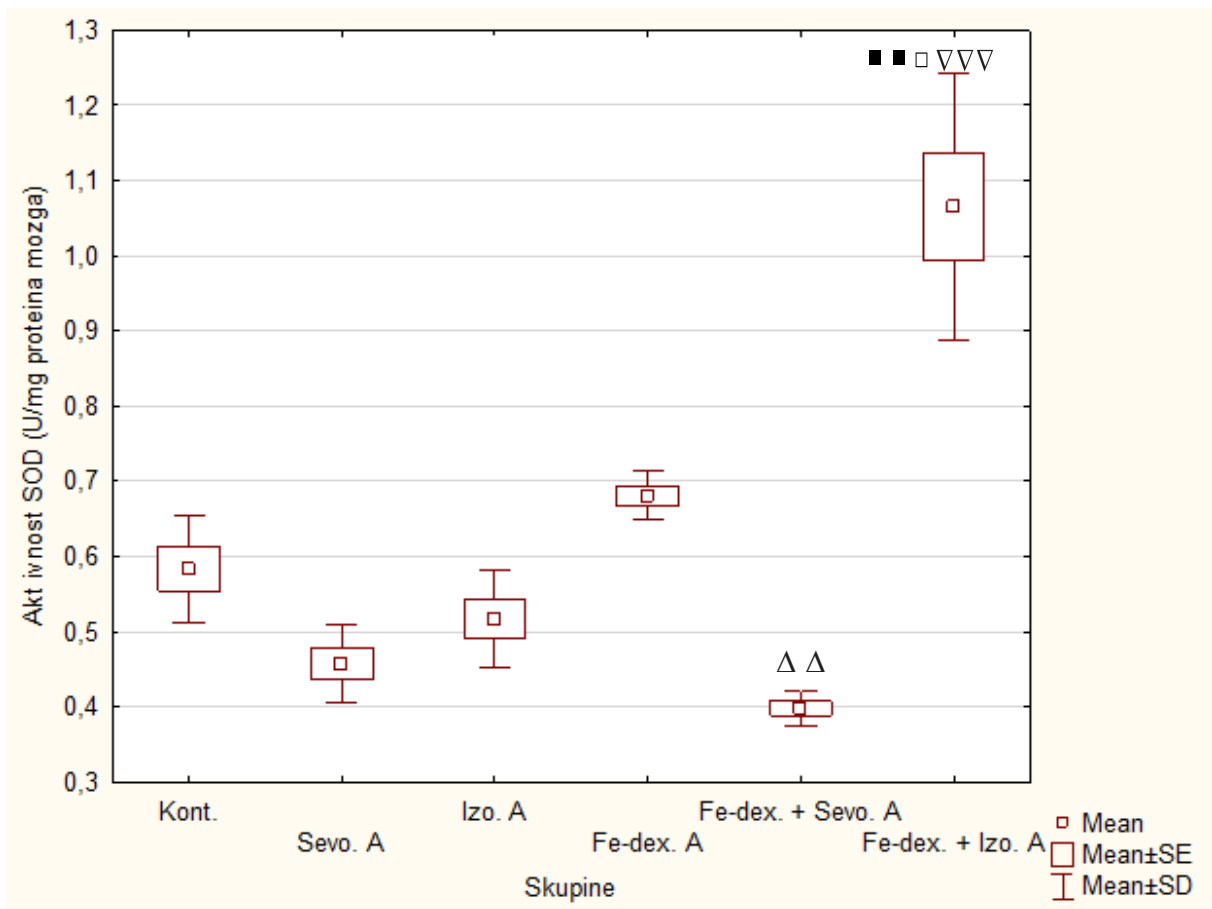
\*Štakori ( $N = 10$ ) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestetikima 2 sata nakon *ip* injiciranja Fe-dex. svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SP$ .

∇ Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu Fe-dex. + Sevo. ( $\nabla\nabla p < 0,01$ ); \*Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (\*\* $p < 0,01$ ).

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

### 4.13.3. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na aktivnost antioksidacijskih enzima (CAT i SOD) u tkivu mozga

Analizom rezultata enzimske aktivnosti SOD (Slika 55) uočava se statistički značajno povišena aktivnost kod skupine Fe-dex. + Izo. u odnosu na skupine Fe-dex. + Sevo. ( $p = 0,0002$ ), sevofluran ( $p = 0,004$ ) i izofluran ( $p = 0,04$ ). Također zapažena je statistički snižena aktivnost kod skupine Fe-dex. + Sevo. u odnosu na skupinu Fe-dex. ( $p = 0,002$ ).



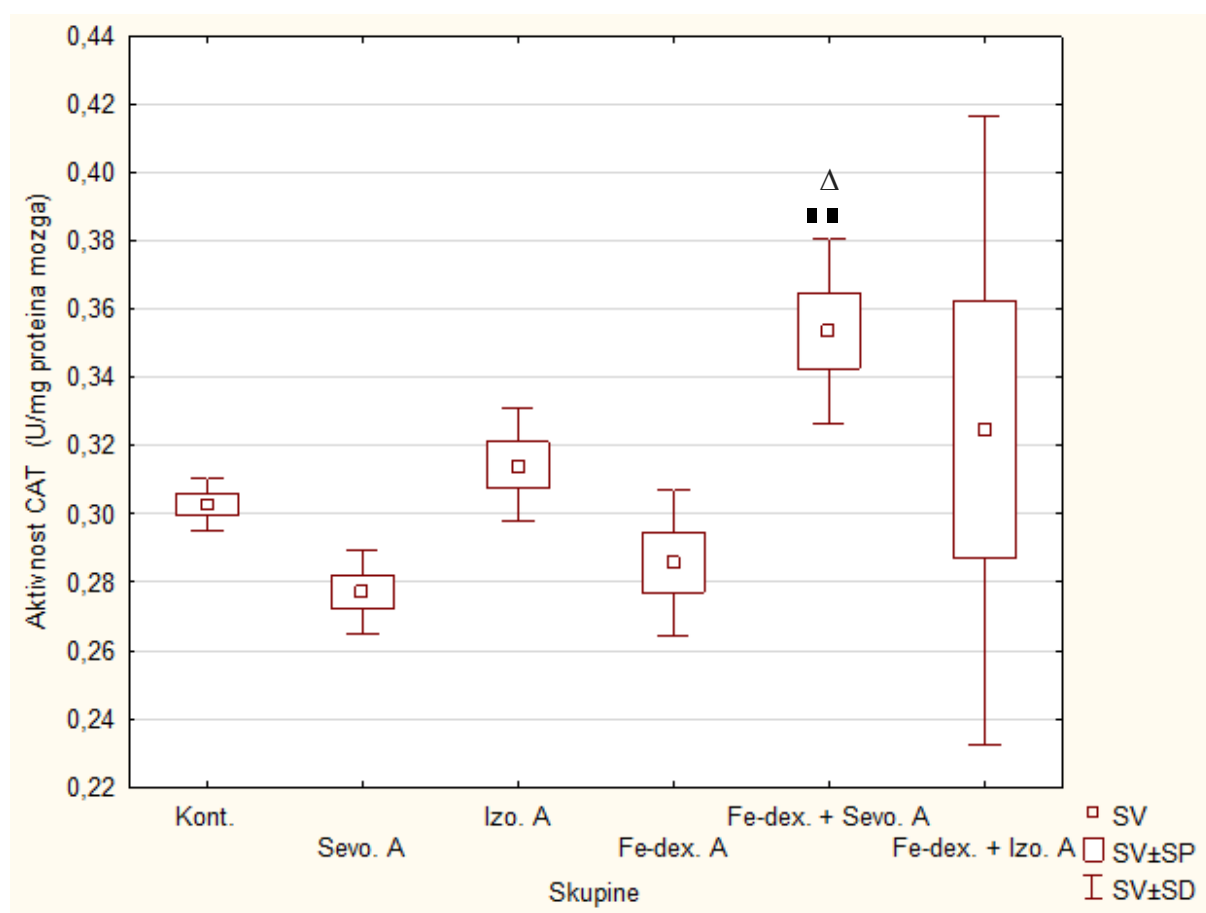
**Slika 55.** Aktivnost SOD nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestetikima 2 sata nakon *ip* injiciranja Fe-dex. svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SP$ .

▪ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (▪▪  $p < 0,01$ ); <sup>∇</sup> Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu Fe-dex. + Sevo. (<sup>∇∇∇</sup>  $p < 0,001$ ); <sup>□</sup> Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu (<sup>□</sup>  $p < 0,05$ ); <sup>Δ</sup> Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu željezo dekstranom (<sup>ΔΔ</sup>  $p < 0,01$ ).

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

Analizom rezultata mjerenja enzimske aktivnosti CAT (Slika 56) utvrđena je statistički značajna povišena antioksidacijska aktivnost katalaze kod skupine Fe-dex. + Sevo. u odnosu na skupinu Fe-dex. ( $p = 0,02$ ) i sevofluran ( $p = 0,004$ ).



**Slika 56.** Aktivnost CAT nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

Štakori ( $N = 10$ ) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom. Zivotinje su izložene inhalacijskim anestheticima 2 sata nakon *ip* injiciranja Fe-dex. svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SP$ .

<sup>^</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu željezo dekstranom ( $^{\wedge}p < 0,05$ ); <sup>■</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu ( $^{\blacksquare}p < 0,01$ ).

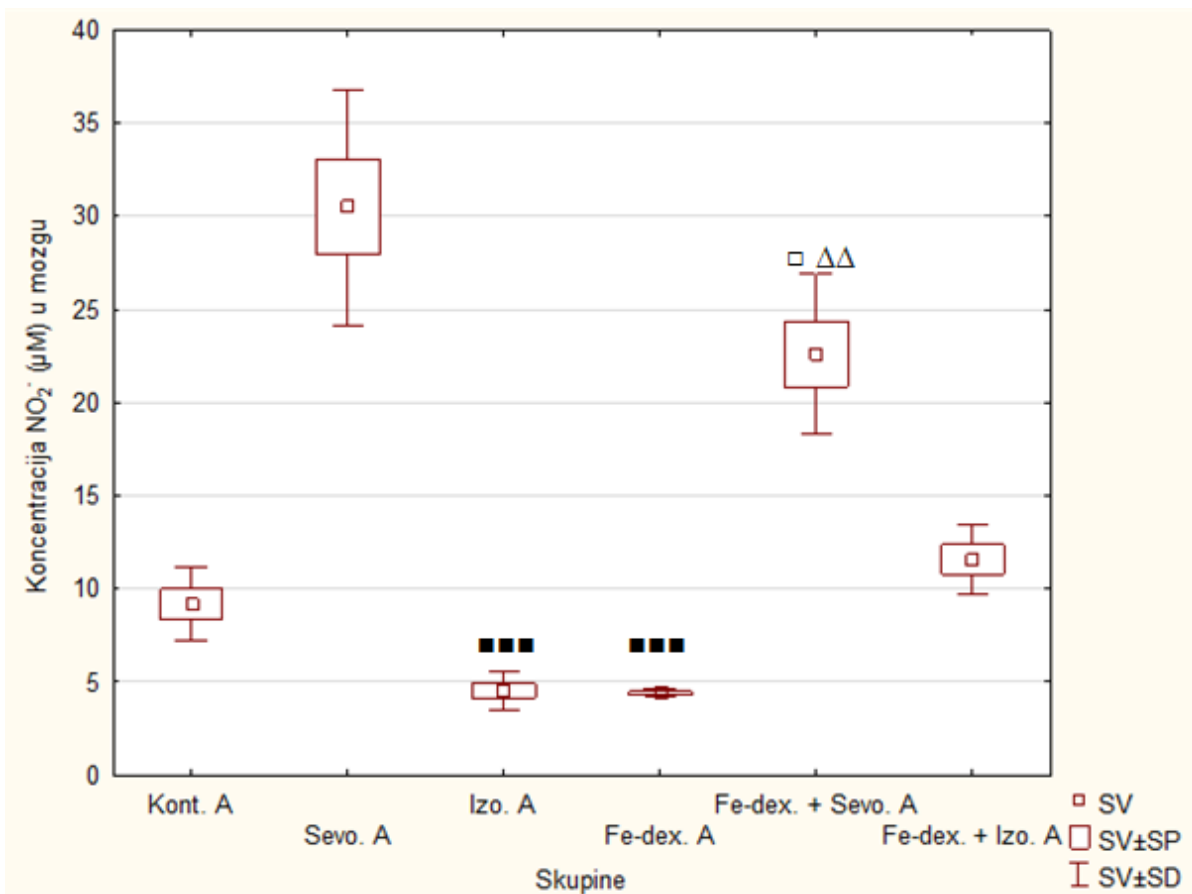
Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, Fe-dex. – željezo dekstran, Fe-dex. + Sevo. – željezo dekstran i sevofluran, Fe-dex. + Izo. – željezo dekstran i izofluran.



## **4.14. Neuropalne promjene u tkivu mozga nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana**

### **4.14.1. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na makrofagnu aktivnost i polarizaciju u tkivu mozga i serumu**

Analizom rezultata mjerenja enzimske aktivnosti NO u mozgu (Slika 57) utvrđena je statistički značajno povišena aktivnost kod sevofluran skupine u odnosu na izofluran skupinu ( $p = 0,0004$ ) i Fe-dex. skupinu ( $p = 0,0001$ ). Nadalje, zapažena je povišena aktivnost kod skupine Fe-dex. + Sevo. u odnosu na izofluran skupinu ( $p = 0,01$ ) i Fe-dex. skupinu ( $p = 0,002$ ).



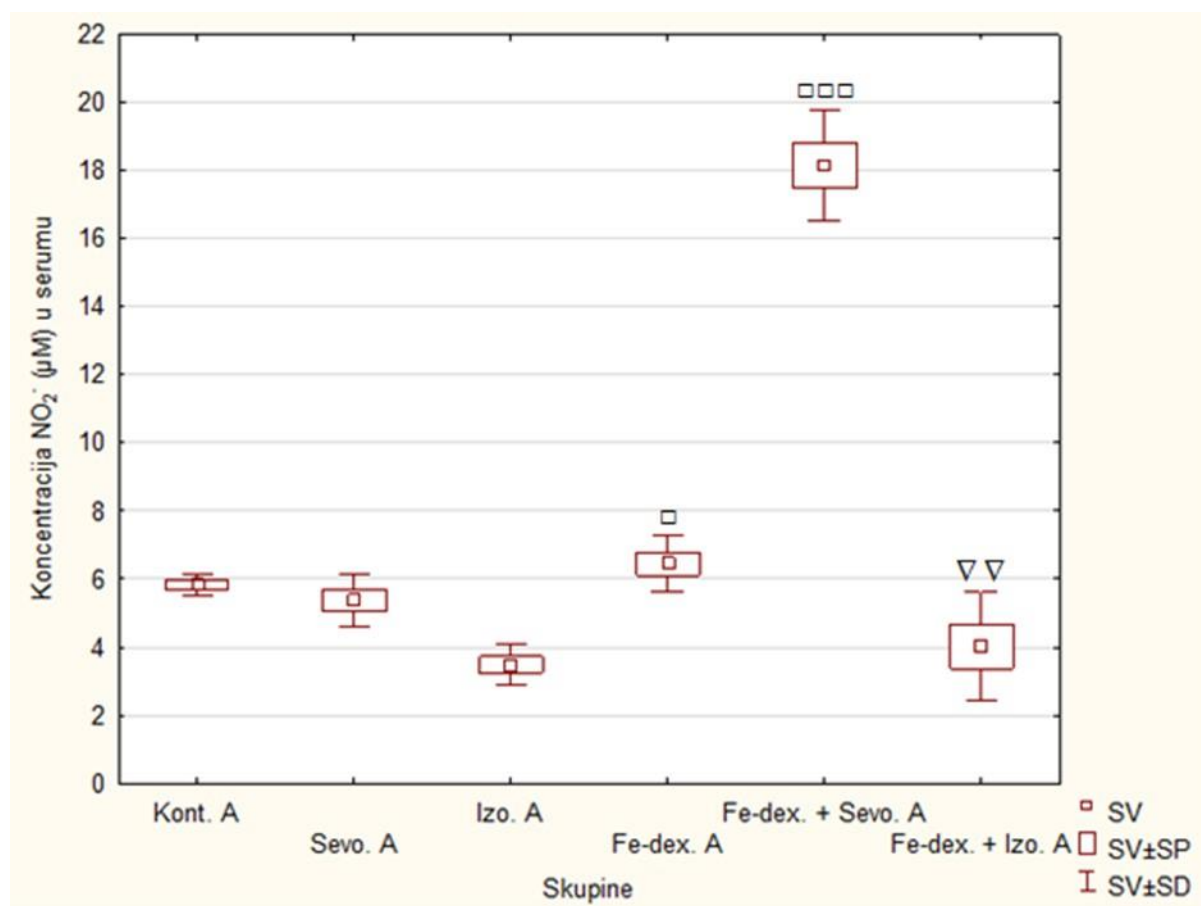
**Slika 57.** Aktivnost NO nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestheticima 2 sata nakon *ip* injiciranja Fe-dex. svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

□ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu (<sup>□</sup>*p* < 0,05); <sup>△</sup> Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu željezo dekstranom (<sup>△</sup>*p* < 0,01); <sup>■</sup> Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (<sup>■</sup>*p* < 0,001).

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

Analizom rezultata koncentracije NO u serumu (Slika 58) vidljiva je statistički povećana aktivnost kod skupina Fe-dex. + Sevo. ( $p = 0,00006$ ) i Fe-dex. ( $p = 0,03$ ) u odnosu na izofluran skupinu. Također, zapažena je snižena aktivnost skupine Fe-dex. + Izo. u odnosu na Fe-dex. + Sevo. skupinu ( $p = 0,0018$ ).



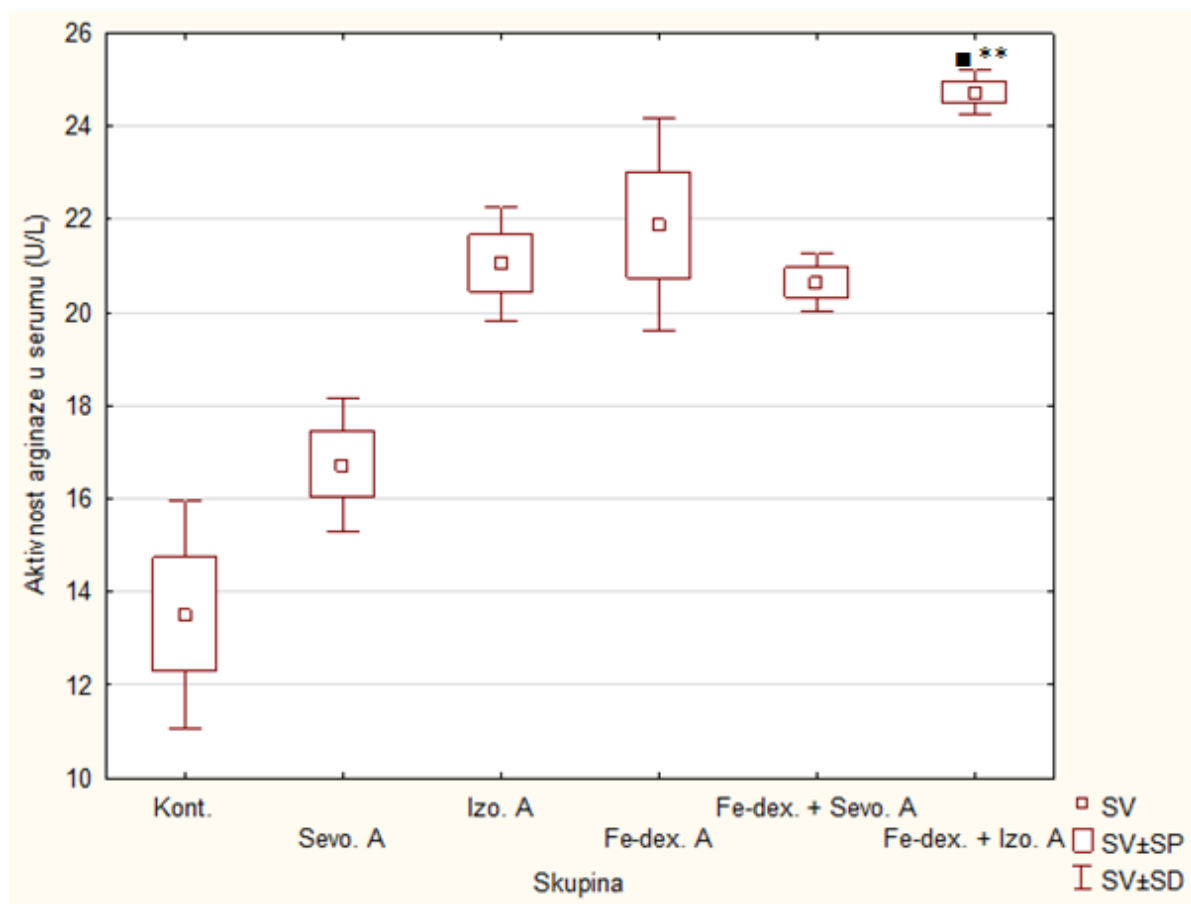
**Slika 58.** Koncentracija NO u serumu nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

Štakori ( $N = 10$ ) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestheticima 2 sata nakon *ip* injiciranja Fe-dex. svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SP$ .

<sup>∇</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu Fe-dex. + Sevo. ( $^{∇∇}p < 0,01$ ); <sup>□</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu ( $^{□}p < 0,05$ ;  $^{□□□}p < 0,001$ ).

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

Analizom rezultata aktivnosti arginaze u serumu (Slika 59) vidljiva je statistički povećana aktivnost kod skupina Fe-dex. + Izo. u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p = 0,0014$ ) i sevofluran skupinu ( $p = 0,014503$ ).



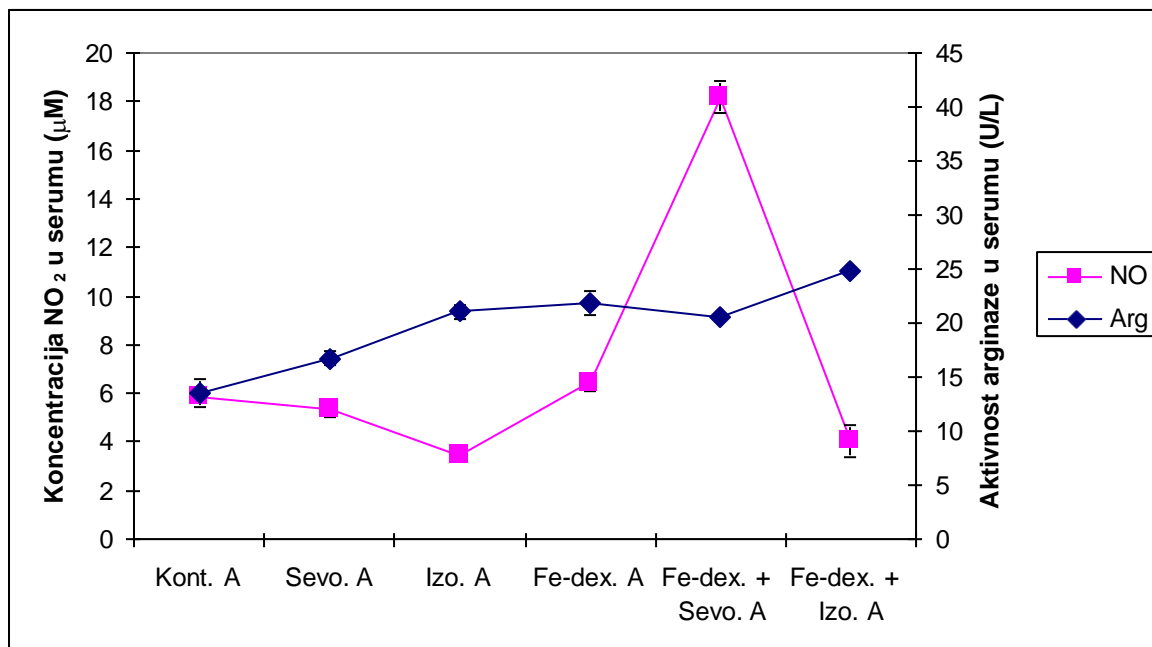
**Slika 59.** Aktivnost arginaze u serumu nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

Štakori ( $N = 10$ ) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestheticima 2 sata nakon *ip* injiciranja Fe-dex. svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SP$ .

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\*\* $p < 0,01$ ); ■Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (■ $p < 0,05$ ).

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

Nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana vidljiv je porast arginaze u svim skupinama, ali najveći porast arginaze je zapažen u skupini Fe-dex. + Izo. (M2 fenotip makrofaga), dok je u skupini Fe-dex. + Sevo. vidljiva prisutnost M1 makrofagne polarizacije (Slika 60).



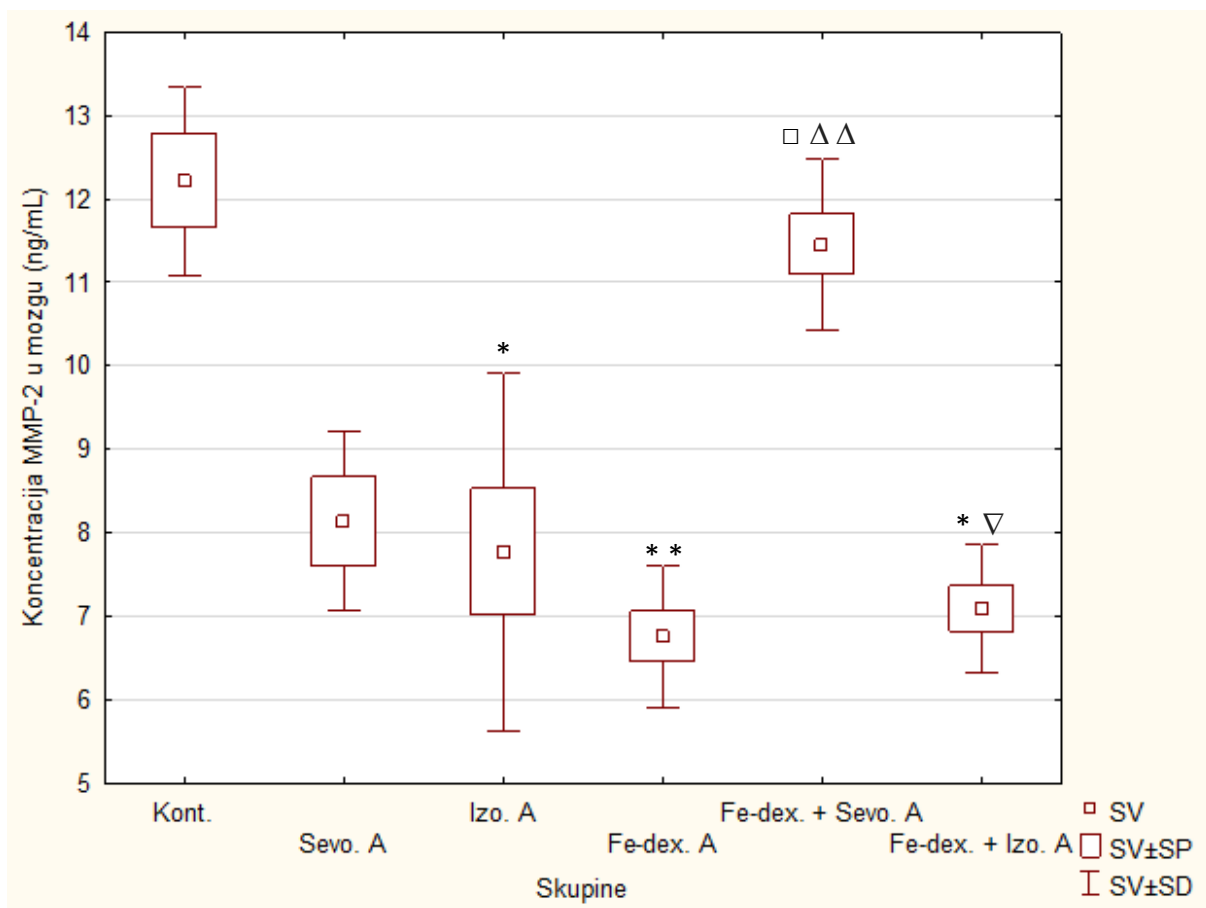
**Slika 60.** Odnos između aktivnost arginaze i koncentracije NO u serumu nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestheticima 2 sata nakon *ip* injiciranja Fe-dex. svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

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

#### **4.14.2. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na razinu MMP2 i MMP9 u tkivu mozga**

Analizom rezultata mjerenja koncentracije MMP-2 u tkivu mozga štakora (Slika 61) zapažena je statistički značajno snižena koncentracija kod skupine Fe-dex. u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p = 0,009$ ). Nadalje, vidljiva je statistički značajno niža koncentracija kod skupine Izo. u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p = 0,04$ ). Iz daljnjih rezultata vidljiva je statistički značajno viša koncentracija kod skupine Fe-dex. + Sevo. u odnosu na Fe-dex. skupinu ( $p = 0,003$ ) i izofluran skupinu ( $p = 0,02$ ). Također, zapažena je statistički značajno niža koncentracija kod skupine Fe-dex. + Izo. u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p = 0,02$ ) i Fe-dex. + Sevo. skupinu ( $p = 0,01$ ).



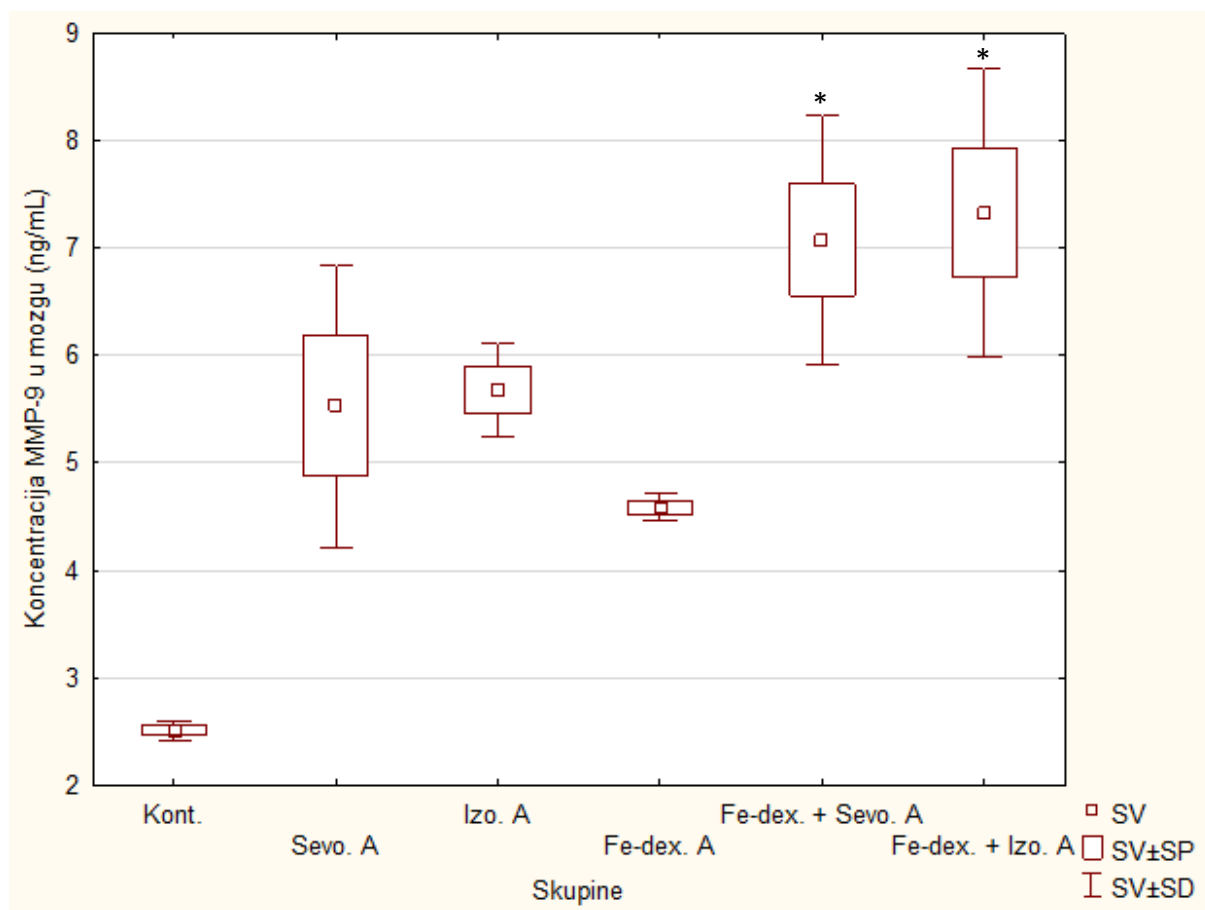
**Slika 61.** Koncentracija MMP-2 nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestheticima 2 sata nakon *ip* injiciranja Fe-dex. svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ );  $\nabla$ Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu Fe-dex. + Sevo. ( $\nabla p < 0,05$ );  $\square$ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu ( $\square p < 0,05$ );  $\Delta$ Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu željezo dekstranom ( $\Delta p < 0,01$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, Fe-dex. – željezo dekstran, Fe-dex. + Sevo. – željezo dekstran i sevofluran, Fe-dex. + Izo. – željezo dekstran i izofluran, MMP-2 – metaloproteinaza-2.

Analizom rezultata mjerenja koncentracije MMP-9 u tkivu mozga štakora (Slika 62) zapažena je statistički značajno viša koncentracija kod skupine Fe-dex. + Sevo. ( $p = 0,02$ ) i Fe-dex. + Izo. ( $p = 0,002$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p = 0,02$ ).



**Slika 62.** Koncentracija MMP-9 nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

Štakori ( $N = 10$ ) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestheticima 2 sata nakon *ip* injiciranja Fe-dex. svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SP$ .

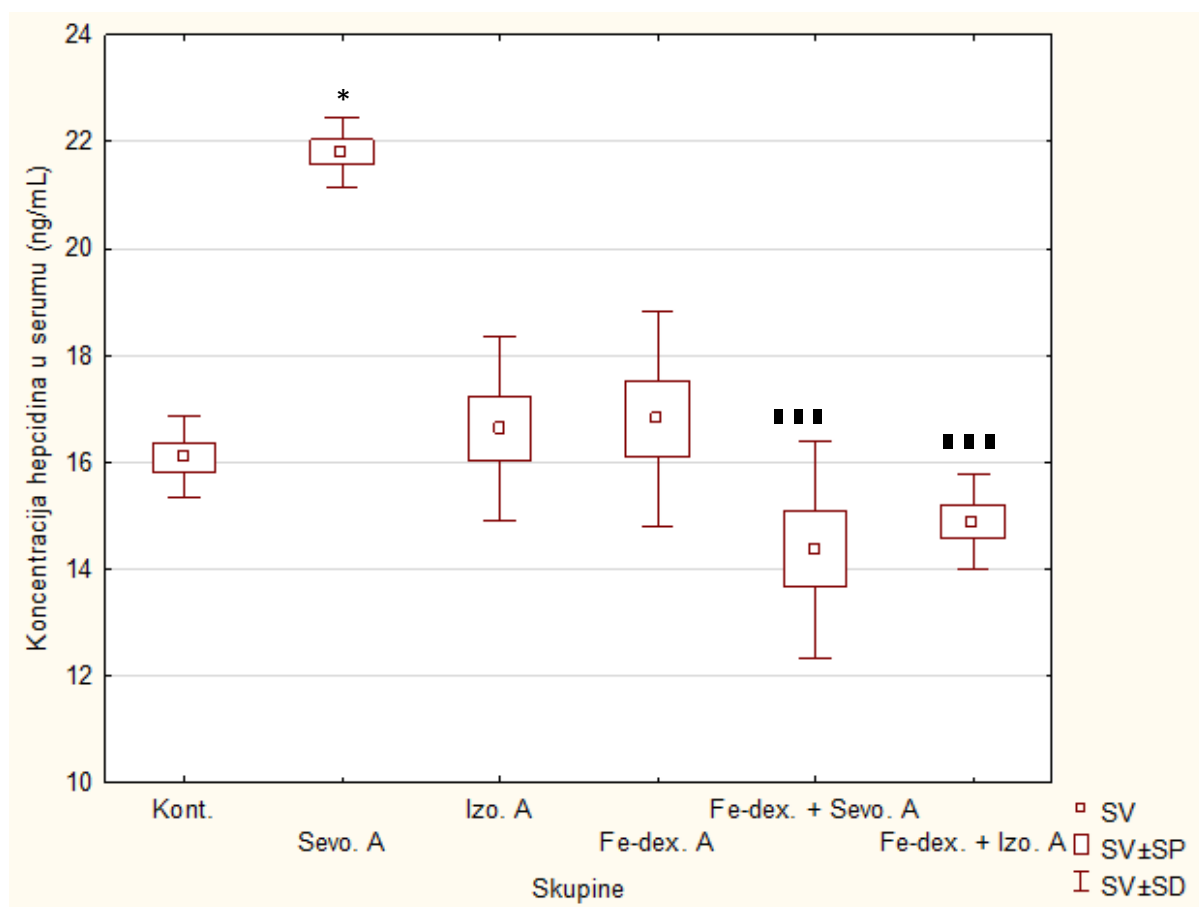
\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu ( $*p < 0,05$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, Fe-dex. – željezo dekstran, Fe-dex. + Sevo. – željezo dekstran i sevofluran, Fe-dex. + Izo. – željezo dekstran i izofluran, MMP-9 – metaloproteinaza-9.



### 4.14.3. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na razinu hepcidina u serumu i feritina u tkivu mozga i serumu

Analizom rezultata mjerenja koncentracije hepcidina u serumu (Slika 63) utvrđena je statistički izrazito snižena koncentracija kod skupine Fe-dex. + Sevo. ( $p = 0,0001$ ) i Fe-dex. + Izo. ( $p = 0,00009$ ) u odnosu na sevofluran skupinu. Također, vidljiva je povišena koncentracija kod skupine Sevo. u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p = 0,04$ ).



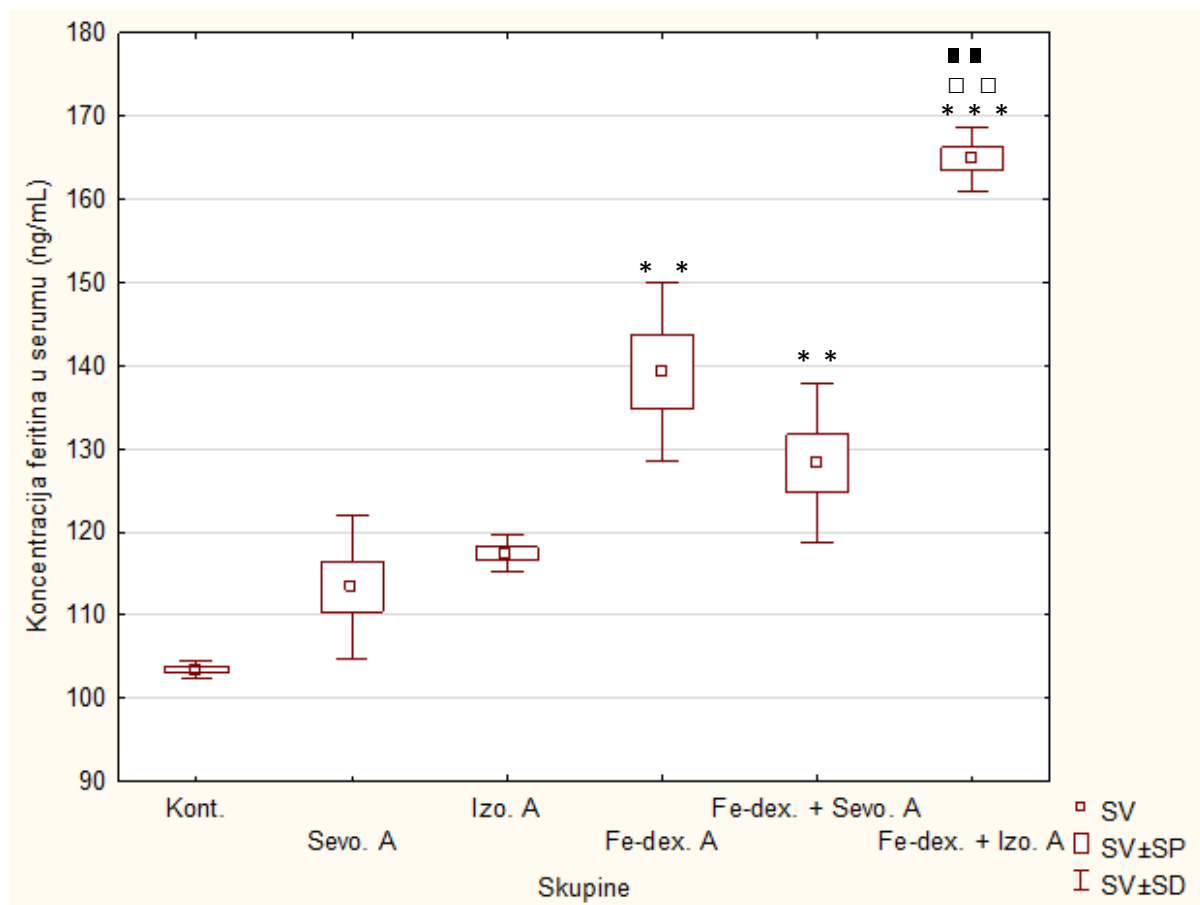
**Slika 63.** Koncentracija hepcidina nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

Štakori ( $N = 10$ ) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestheticima 2 sata nakon *ip* injiciranja Fe-dex. svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SP$ .

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu ( $*p < 0,05$ ); ■Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (■■■ $p < 0,001$ ).

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

Analizom rezultata mjerenja koncentracije feritina u serumu (Slika 64) utvrđena je statistički značajno povišena koncentracija kod skupina Fe-dex. ( $p = 0,001$ ) i Fe-dex. + Sevo. ( $p = 0,006$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu. Nadalje, vidljiva je statistički značajno povišena koncentracija kod skupine Fe-dex. + Izo. u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p = 0,0000001$ ), sevofluran skupinu ( $p = 0,002$ ) i izofluran skupinu ( $p = 0,005$ ).



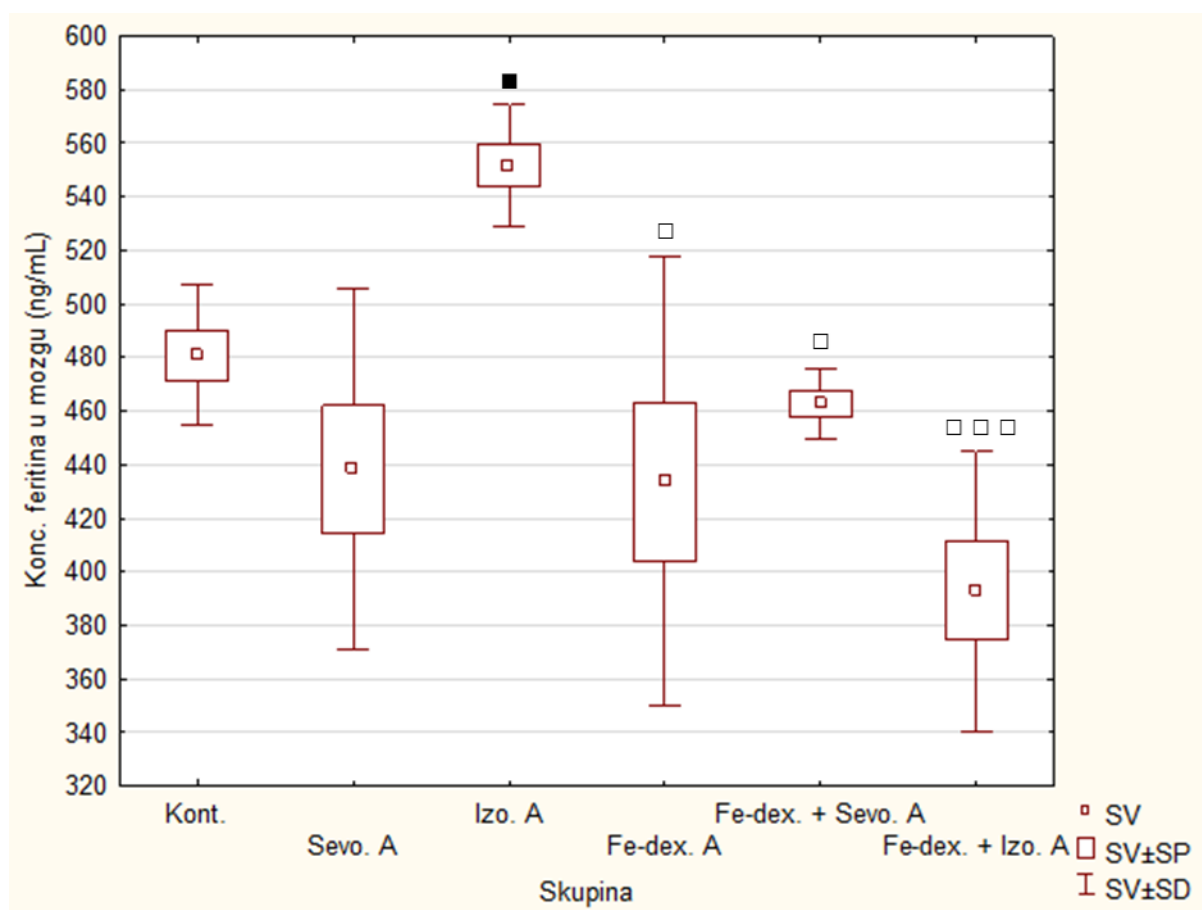
**Slika 64.** Koncentracija feritina nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

Štakori ( $N = 10$ ) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestheticima 2 sata nakon *ip* injiciranja Fe-dex. svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SP$ .

■ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu ( $■ p < 0,01$ ); □ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu ( $□ p < 0,01$ ); \* Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu ( $** p < 0,01$ ;  $*** p < 0,001$ ).

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

Analizom rezultata mjerenja koncentracije feritina u tkivu mozga (Slika 65) vidljiva je povišena koncentracija kod izofluran skupine ( $p = 0,05$ ) u odnosu na sevofluran skupinu. Nadalje, vidljiva je statistički značajno snižena koncentracija kod skupina Fe-dex. + Izo. ( $p < 0,001$ ), Fe-dex. + Sevo. ( $p < 0,05$ ) i Fe-dex. ( $p < 0,05$ ) u odnosu na izofluran skupinu.



**Slika 65.** Koncentracija feritina u mozgu nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

Štakori ( $N = 10$ ) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestheticima 2 sata nakon *ip* injiciranja Fe-dex. svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SP$ . M

▪ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu ( $^{\bullet}p < 0,05$ ); ◻ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu ( $^{\square}p < 0,05$ ; ◻◻◻  $p < 0,001$ ).

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

#### **4.14.4. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na razinu upalnih citokina u serumu**

Metabolizam željeza i imunitet usko su međusobno povezani. Ovo je posljedica, s jedne strane, različitih regulatornih učinaka metala na proliferaciju imunskih stanica i na učinkovitost staničnih imunskih efektorskih puteva. S druge strane, citokini koji potječu iz T stanica i monocita reguliraju staničnu homeostazu željeza utječući na ekspresiju proteina uključenih u unos i skladištenje metala. Proupalni citokini kao što je TNF- $\alpha$ , interleukin-1 (IL-1) ili interleukin-6 (IL-6) izravno stimuliraju transkripciju i translaciju glavnog proteina za skladištenje željeza feritina te interferiraju s akutnom fazom upale. Štoviše, citokini utječu na posttranskripcijsku kontrolu homeostaze željeza modulacijom afiniteta vezanja željeza preko regulacijskih proteina (IRP-1 i IRP-2) na željezo odgovorne elemente (IRE, engl. *iron responsive elements*). Aktivaciju IRP vezanja na IRE kontrolira unutarstaničnu dostupnost željeza, s visokim afinitetom vezanja IRP-a kada su unutarstanične koncentracije željeza niske, što rezultira stabilizacijom TfR (trasferin receptor) mRNA dok je translacija feritina smanjena.

U kroničnim upalnim stanjima citokini induciraju preusmjerenje prometa željeza, što dovodi do hipoferemije i retencije metala unutar retikuloendotelnog sustava. Međutim, regulacijski putovi u pozadini ovih poremećaja homeostaze željeza slabo su poznati.

Prema dobivenim rezultatima (Tablica 15) najveće promjene su vidljive u razini proupalnih/protuupalnih citokina u skupini Fe-dex. + Izo. u odnosu na kontrolnu skupinu a potom znatno manje u skupini Fe-dex. + Sevo.. Protuupalni citokini održavaju kontraravnotežu razini proupalnih citokina (vidi Tablica 15).

**Tablica 15.** Razina proupalnih citokina nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

CITOKINI	Skupina <sup>a</sup>	X	SP	*P	<sup>Δ</sup> P	<sup>■</sup> P
<b>IL-1α</b> (pg/mL)	<b>Kont.</b>	0,147	0,015			
	<b>Sevo. A</b>	0,073	0,009			
	<b>Izo. A</b>	0,105	0,010			
	<b>Fe-dex. A</b>	0,097	0,009			
	<b>Fe-dex. + Sevo. A</b>	0,090	0,002			
	<b>Fe-dex. + Izo. A</b>	0,358	0,009			0,00525 <sup>■</sup>
<b>IL-1β</b> (pg/mL)	<b>Kont.</b>	0,084	0,004			
	<b>Sevo. A</b>	0,259	0,021			
	<b>Izo. A</b>	0,313	0,031			
	<b>Fe-dex. A</b>	0,343	0,027			
	<b>Fe-dex. + Sevo. A</b>	0,271	0,013			
	<b>Fe-dex. + Izo. A</b>	0,437	0,037	0,002170 <sup>**</sup>		
<b>IL-2</b> (pg/mL)	<b>Kont.</b>	0,105	0,023			
	<b>Sevo. A</b>	0,306	0,051			
	<b>Izo. A</b>	0,289	0,022			
	<b>Fe-dex. A</b>	0,261	0,017			
	<b>Fe-dex. + Sevo. A</b>	0,302	0,027			
	<b>Fe-dex. + Izo. A</b>	0,539	0,016	0,010108 <sup>*</sup>		
<b>IL-4</b> (pg/mL)	<b>Kont.</b>	0,036	0,003			
	<b>Sevo. A</b>	0,056	0,013			
	<b>Izo. A</b>	0,048	0,002			
	<b>Fe-dex. A</b>	0,057	0,008			
	<b>Fe-dex. + Sevo. A</b>	0,032	0,011			
	<b>Fe-dex. + Izo. A</b>	0,267	0,034	0,006979 <sup>**</sup>		
<b>IL-6</b> (pg/mL)	<b>Kont.</b>	0,069	0,011			
	<b>Sevo. A</b>	0,221	0,046			
	<b>Izo. A</b>	0,344	0,034	0,017311 <sup>*</sup>		
	<b>Fe-dex. A</b>	0,325	0,030	0,029028 <sup>*</sup>		
	<b>Fe-dex. + Sevo. A</b>	0,179	0,005			
	<b>Fe-dex. + Izo. A</b>	0,308	0,026			

**Tablica 15. nastavak**

<b>CITOKINI</b>	<b>Skupina<sup>a</sup></b>	<b>X</b>	<b>SP</b>	<b>*P</b>	<b><sup>Δ</sup>P</b>	<b><sup>■</sup>P</b>
<b>IL-10</b> (pg/mL)	<b>Kont.</b>	0,113	0,002			
	<b>Sevo. A</b>	0,185	0,014			
	<b>Izo. A</b>	0,366	0,023	0,020614*		
	<b>Fe-dex. A</b>	0,252	0,043			
	<b>Fe-dex. + Sevo. A</b>	0,221	0,005			
	<b>Fe-dex. + Izo. A</b>	0,476	0,054	0,001772**		
<b>IL-12</b> (pg/mL)	<b>Kont.</b>	0,047	0,003			
	<b>Sevo. A</b>	0,061	0,009			
	<b>Izo. A</b>	0,050	0,002			
	<b>Fe-dex. A</b>	0,044	0,003			
	<b>Fe-dex. + Sevo. A</b>	0,076	0,008			
	<b>Fe-dex. + Izo. A</b>	0,260	0,028	0,040497*	0,008409 <sup>ΔΔ</sup>	
<b>IL-13</b> (pg/mL)	<b>Kont.</b>	0,041	0,001			
	<b>Sevo. A</b>	0,126	0,010			
	<b>Izo. A</b>	0,120	0,010			
	<b>Fe-dex. A</b>	0,105	0,002			
	<b>Fe-dex. + Sevo. A</b>	0,152	0,011	0,040497*		
	<b>Fe-dex. + Izo. A</b>	0,328	0,027	0,000950***	0,02902 <sup>Δ</sup>	
<b>IFN-γ</b> (pg/mL)	<b>Kont.</b>	0,107	0,007			
	<b>Sevo. A</b>	0,358	0,013			
	<b>Izo. A</b>	0,354	0,007			
	<b>Fe-dex. A</b>	0,288	0,033			
	<b>Fe-dex. + Sevo. A</b>	0,498	0,009	0,020614*		
	<b>Fe-dex. + Izo. A</b>	0,686	0,017	0,000950***	0,04049 <sup>Δ</sup>	
<b>TNF-α</b> (pg/mL)	<b>Kont.</b>	0,079	0,004			
	<b>Sevo. A</b>	0,220	0,017			
	<b>Izo. A</b>	0,268	0,008			
	<b>Fe-dex. A</b>	0,223	0,006			
	<b>Fe-dex. + Sevo. A</b>	0,273	0,017			
	<b>Fe-dex. + Izo. A</b>	0,732	0,008	0,000950***		

**Tablica 15. nastavak**

CITOKINI	Skupina <sup>a</sup>	X	SP	*P	<sup>Δ</sup> P	<sup>■</sup> P
GM-CSF (pg/mL)	Kont.	0,037	0,004			
	Sevo. A	0,039	0,001			
	Izo. A	0,052	0,003			
	Fe-dex. A	0,036	0,001			
	Fe-dex. + Sevo. A	0,067	0,016			
	Fe-dex. + Izo. A	0,423	0,025	0,008409**	0,01731 <sup>Δ</sup>	
RANTES (pg/mL)	Kont.	1,718	0,073			
	Sevo. A	7,796	0,174	0,008409**		
	Izo. A	7,110	0,304			
	Fe-dex. A	6,202	0,107			
	Fe-dex. + Sevo. A	7,799	0,022	0,004773**		
	Fe-dex. + Izo. A	6,290	0,119			

<sup>a</sup>Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestetikima 2 sata nakon *ip* injiciranja Fe-dex. svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ); <sup>Δ</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu željezo dekstranom (<sup>Δ</sup> $p < 0,05$ ; <sup>ΔΔ</sup> $p < 0,01$ ); <sup>■</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (<sup>■</sup> $p < 0,01$ ).

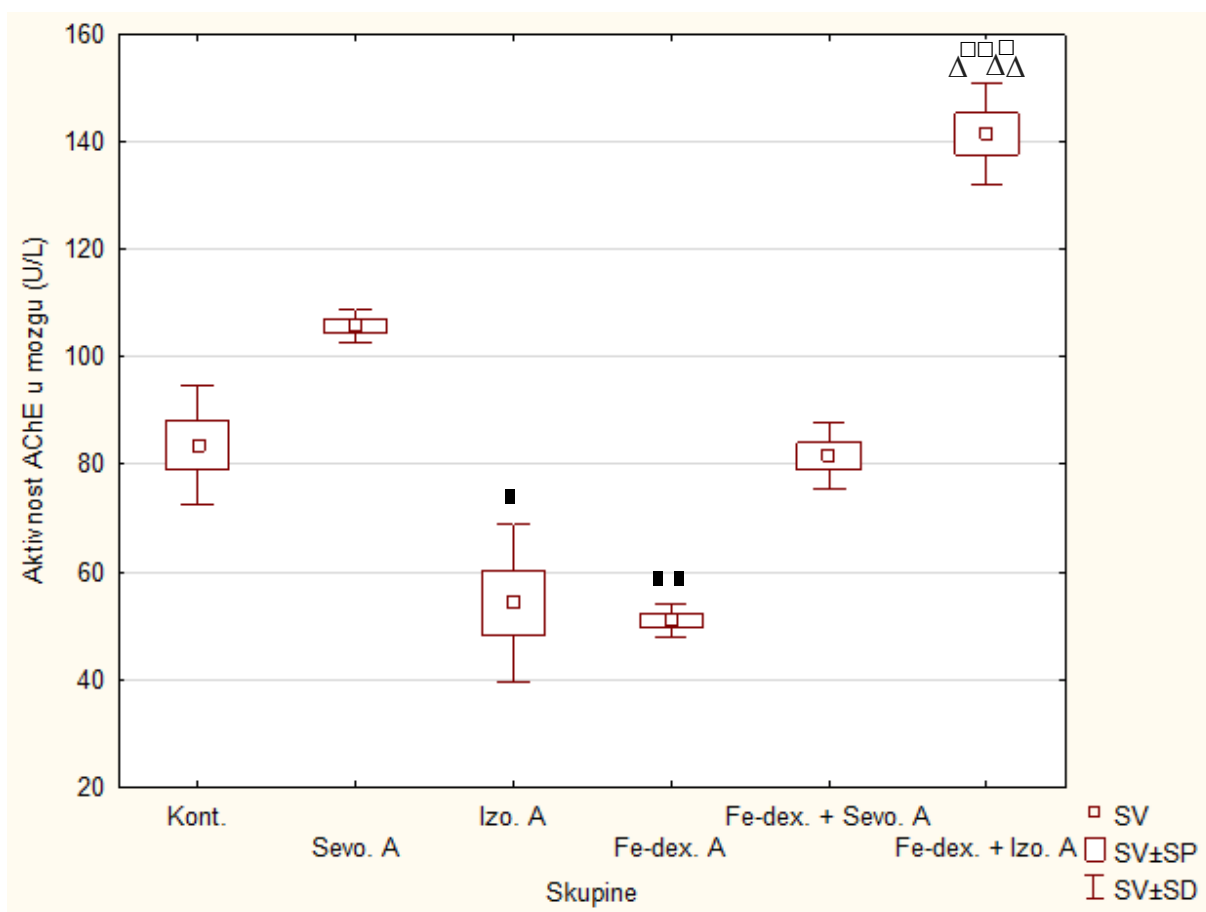
Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, Fe-dex. – željezo dekstran, Fe-dex. + Sevo. – željezo dekstran i sevofluran, Fe-dex. + Izo. – željezo dekstran i izofluran.

## **4.15. Neurohistopatološke promjene u tkivu mozga nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana**

### **4.15.1. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na aktivnost acetilkolinesteraze (AChE) u tkivu mozga**

Analizom rezultata aktivnosti AChE (Slika 66) vidljiva je statistički značajno snižena aktivnost kod skupina Izo. ( $p = 0,01$ ) i Fe-dex. ( $p = 0,006$ ) u odnosu na Sevo. skupinu. Također zapažena je izražena statistička značajnost kod skupine Fe-dex. + Izo. u odnosu na izofluran ( $p = 0,0001$ ) i Fe-dex. skupinu ( $p = 0,0001$ ).





**Slika 66.** Aktivnost AChE nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

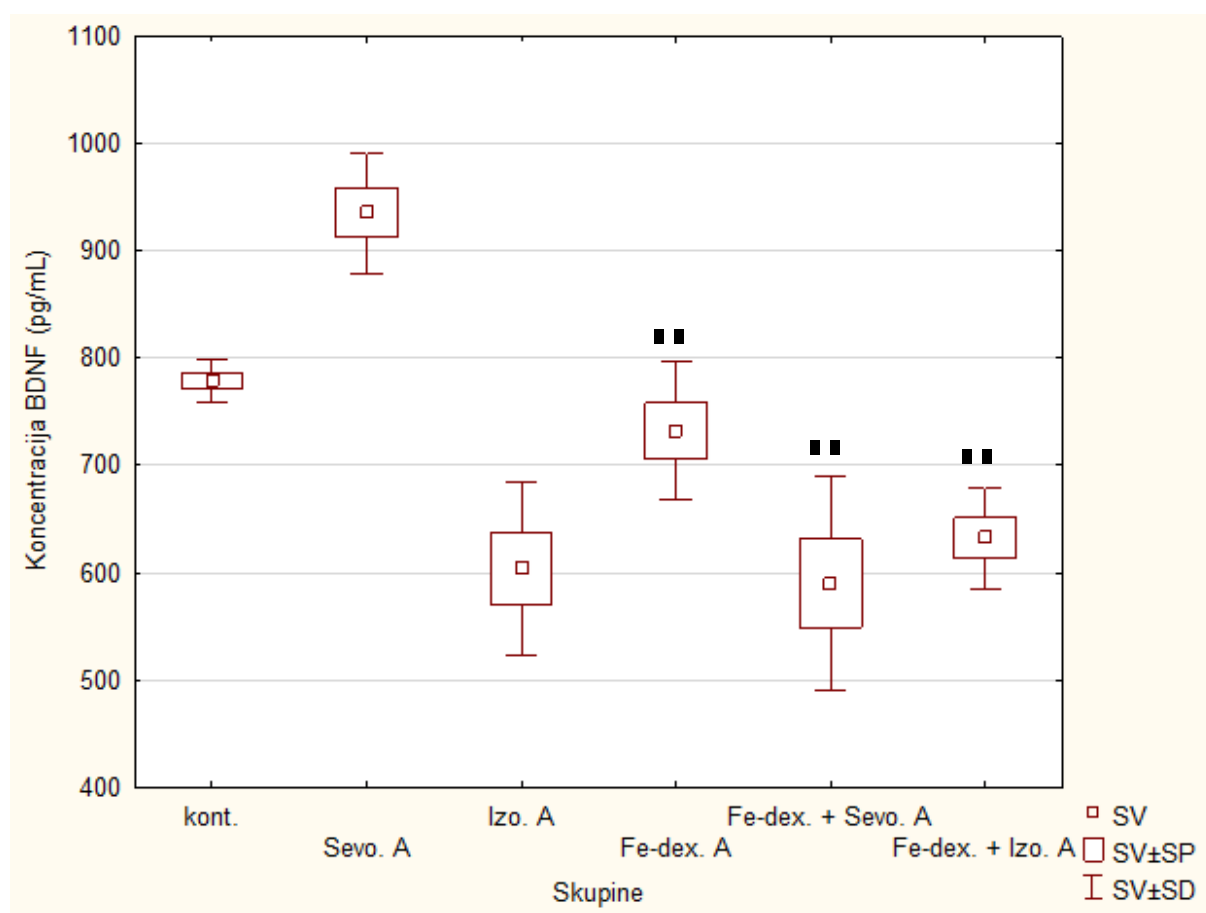
Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestheticima 2 sata nakon *ip* injiciranja Fe-dex. svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

□ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu (□□□ $p < 0,001$ ); ■ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (■ $p < 0,05$ , ■■ $p < 0,01$ ); △ Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu željezo dekstranom (△△△ $p < 0,001$ ).

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

#### 4.15.2. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF) u mozgu

Analizom rezultata koncentracije BDNF-a u uzorku homogenata tkiva mozga (Slika 67) vidljiva je statistički značajno manja koncentracija kod sevofluran u odnosu na Fe-dex. skupinu ( $p = 0,001$ ), skupinu Fe-dex. + Sevo. ( $p = 0,001$ ) te skupinu Fe-dex. + Izo. ( $p = 0,002$ ).



**Slika 67.** Koncentracija BDNF-a nakon subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestetikima 2 sata nakon *ip* injiciranja Fe-dex. svaki drugi dan tijekom 7 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

■ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (■  $p < 0,01$ ).

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

#### **4.15.3. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na neurohistopatološke promjene u mozgu**

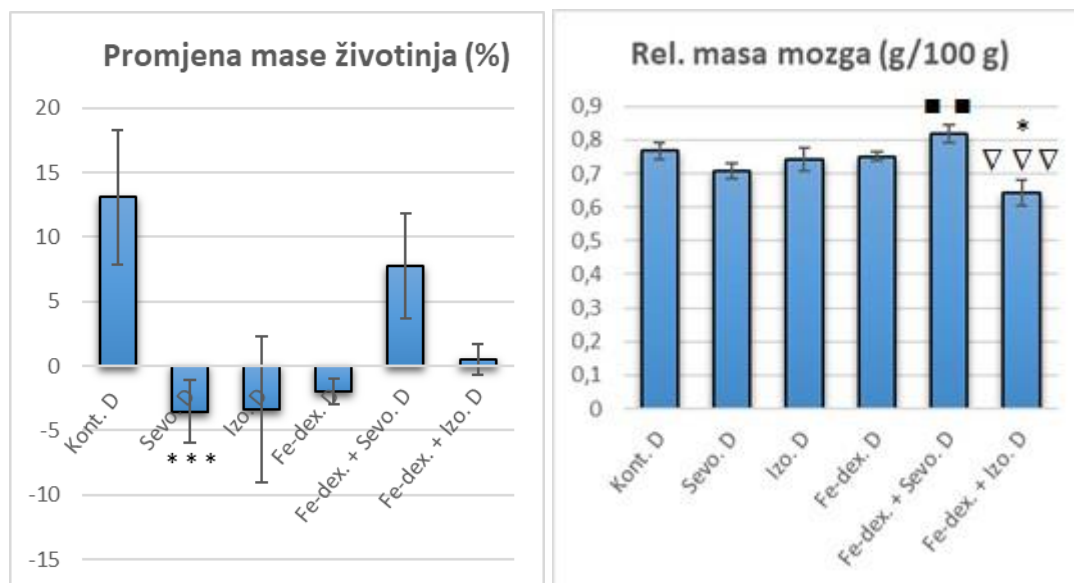
Analizom histoloških preparata nakon imunohistokemijskog označavanja biljezima 4G8, AT8, PHF1 i MC1 nisu uočene neurodegenerativne promjene, odnosno nije dokazana prisutnost pozitivnog signala kod skupina tretiranih inhalacijskim anestheticima i željezo dekstranom te njihovom kombinacijom tijekom 7 dana.

## **4.16. Patofiziološke promjene štakora nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana**

### **4.16.1. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na promjenu mase životinja i relativnu težinu mozga**

Kroničnom obradom životinja inhalacijskim anestheticima i željezo dekstranom zapažen je statistički značajan gubitak tjelesne mase životinja u skupinama obrađenim sevofluranom ( $p < 0,001$ ) i Fe-dex. + Izo. ( $p < 0,05$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 68a).

Na Slici 68b prikazani su rezultati promjene relativne težine mozga životinja tretiranih kroničnim dozama inhalacijskih anestetika, željezo dekstrana i njihovim kombinacijama te se zapaža statistički značajno povećanje relativne mase mozga kod skupine Fe-dex. + Sevo. ( $p < 0,01$ ) u odnosu na sevofluran skupinu. Također vidljivo je statistički značajno smanjenje relativne težine mozga kod skupine obrađene Fe-dex. + Izo. u odnosu na Fe-dex. + Sevo. skupinu ( $p < 0,001$ ) i kontrolnu skupinu ( $p < 0,05$ ).



a)

b)

**Slika 68.** Promjena tjelesne mase (a) i relativne mase mozga štakora (b) nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

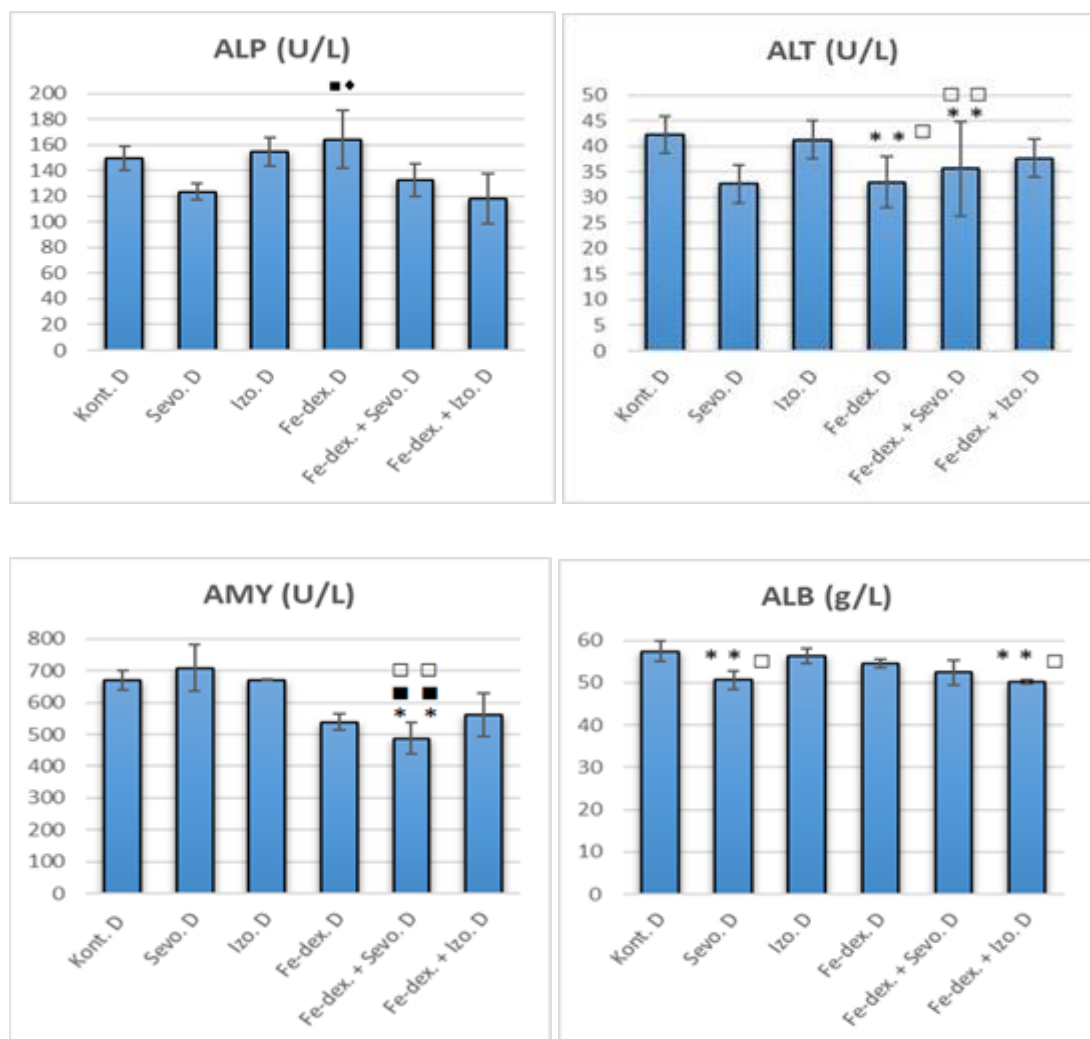
\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ); ■Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (■ $p < 0,01$ ); ▽Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu Fe-dex. + Sevo. (▽▽ $p < 0,001$ ).

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

#### **4.16.2. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na biokemijske odrednice štakora**

Na Slikama 69 i 70 su prikazani rezultati promjena u enzimima i proteinima te metabolitima i supstratima. Za razliku od subakutne primjene, tijekom kronične primjene inhalacijskih anestetika i Fe-dex. nije došlo do velikih značajnih promjena u biokemijskim pokazateljima. Na Slici 69 vidljiva je smanjena koncentracija ALB u odnosu na kontrolnu skupinu, također zapažena je smanjena koncentracija ALB i TP u skupinama obrađenim sevofluranom i Fe-dex. + Izo. u odnosu na skupinu izloženu izofluranu. U skupini obrađenoj Fe-dex. + Sevo. koncentracija ALT-a i AMY je snižena, a koncentracija GLOB povećana. U skupini obrađenoj Fe-dex. koncentracija ALP-a je značajno povećana, dok je koncentracija ALT-a značajno snižena (Slika 69).

Rezultati na Slici 70 bilježe statistički značajno povećanu koncentraciju CRE u skupini izloženoj sevofluranu. Također vidljive su povećane koncentracije CRE, GLU, Na<sup>+</sup> i K<sup>+</sup> u skupini izloženoj izofluranu. Nadalje, u Fe-dex. + Sevo. skupini koncentracija BUN-a je statistički značajno snižena u odnosu na skupine izložene sevofluranu ( $p < 0,05$ ) i izofluranu ( $p < 0,05$ ). Iz daljnjih rezultata u skupini obrađenoj Fe-dex. + Izo. (Slika 70) vidljiva je povećana koncentracija GLU, PHOS i K<sup>+</sup>.

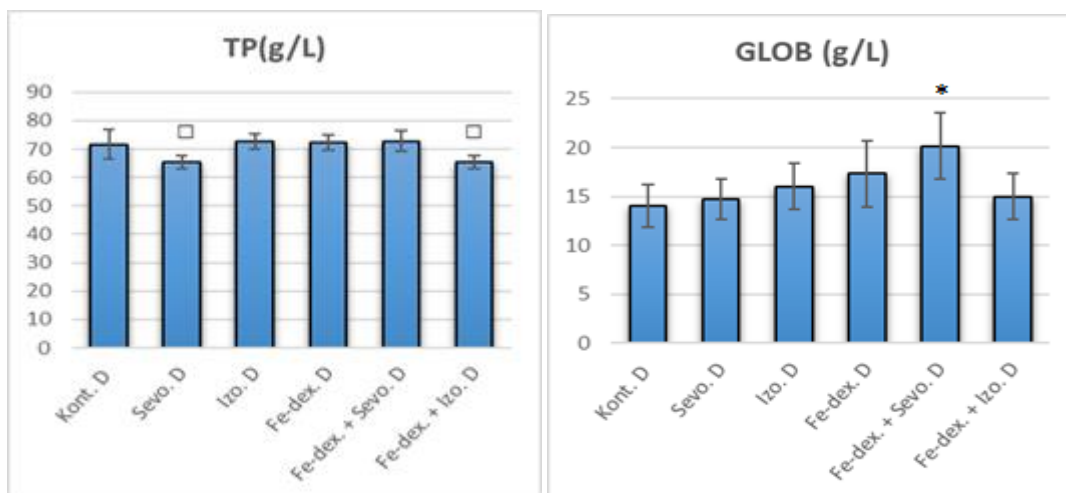


**Slika 69.** Koncentracije enzima i proteina u krvi štakora nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestetikima 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\*\* $p < 0,01$ ); ■Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (▪ $p < 0,05$ ; ▪▪ $p < 0,01$ ); □Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu (◻ $p < 0,05$ ; ◻◻ $p < 0,01$ ); ♦Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu Fe-dex. + Izo. (♦ $p < 0,05$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, ALP – alkalna fosfataza, ALT – alanin aminotransferaza, AMY – amilaza, ALB – albumin, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, Fe-dex. – željezo dekstran, Fe-dex. + Sevo. – željezo dekstran i sevofluran, Fe-dex. + Izo. – željezo dekstran i izofluran.

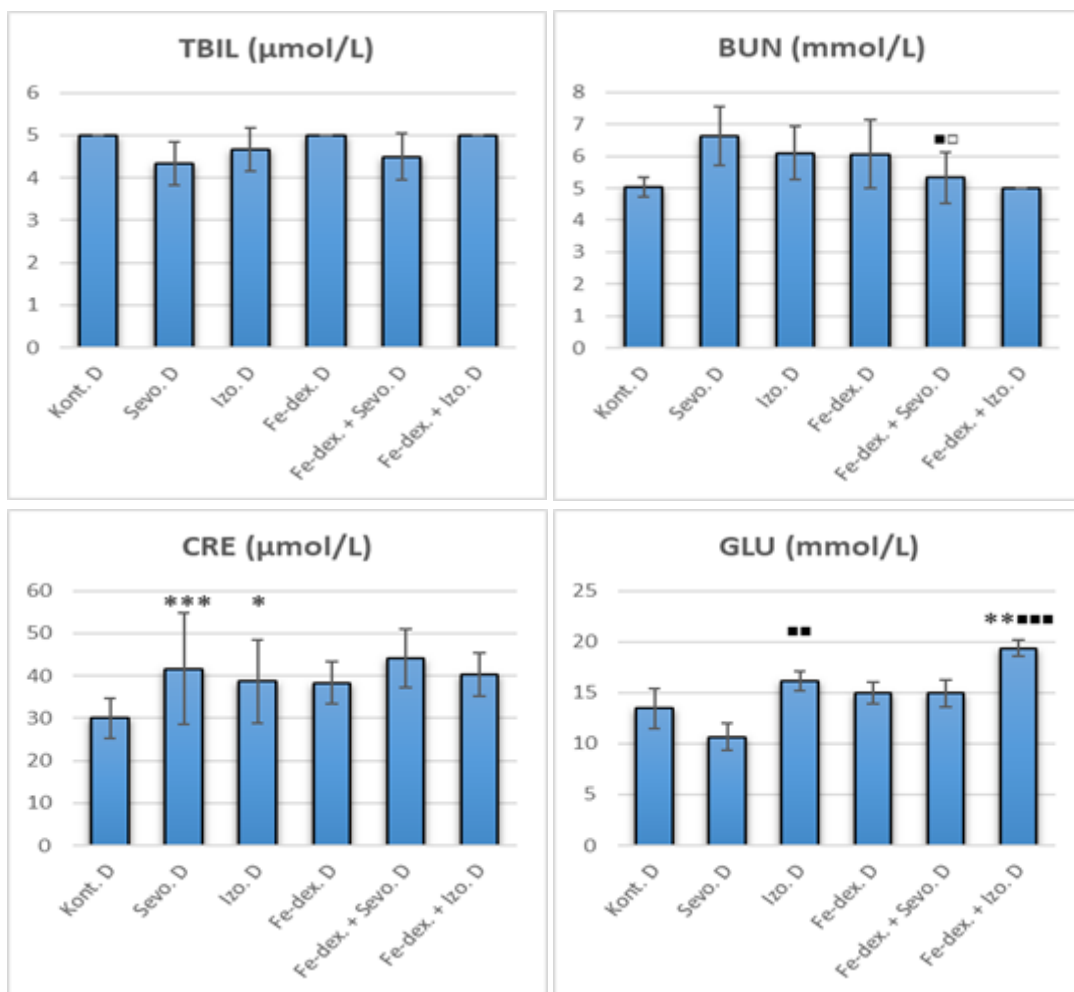


**Nastavak Slike 69.**

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu ( $*p < 0,05$ ); □Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu ( $□p < 0,05$ ).

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



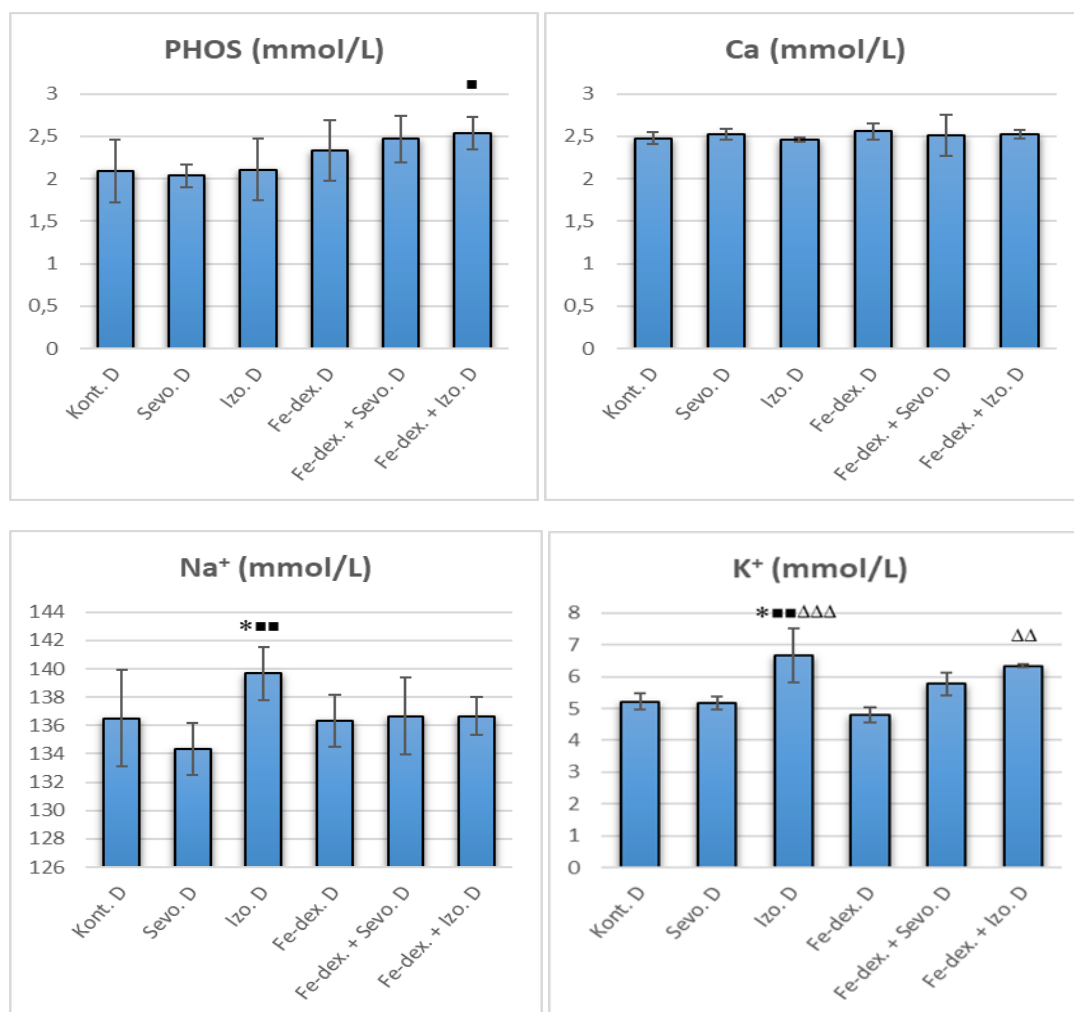


**Slika 70.** Koncentracije metabolita i supstrata u krvi štakora nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestheticima 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ); ■Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (■ $p < 0,05$ ; ■■ $p < 0,01$ ; ■■■ $p < 0,001$ ); □Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu (□ $p < 0,05$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, TBIL – ukupni bilirubin, BUN – dušik uree u krvi, CRE – kreatinin, GLU – glukoza u krvi, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, Fe-dex. – željezo dekstran, Fe-dex. + Sevo. – željezo dekstran i sevofluran, Fe-dex. + Izo. – željezo dekstran i izofluran.



**Natavak Slike 70.**

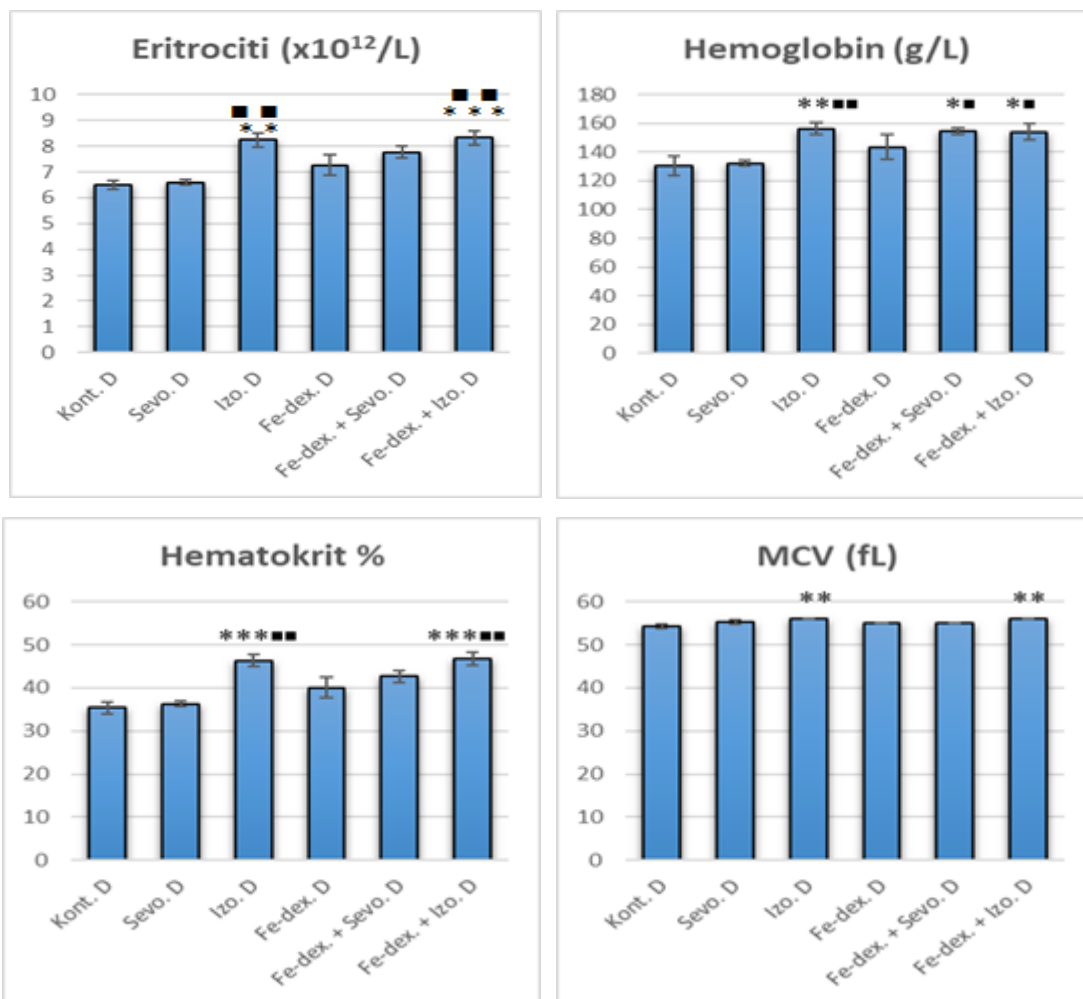
\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\* $p < 0,05$ ); ■Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (■ $p < 0,05$ ; ■■ $p < 0,01$ ); ^Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu željezo dekstranom (^ $p < 0,01$ ; ^^^ $p < 0,001$ ).

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

### **4.16.3. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na hematološke odrednice štakora**

Rezultati hematoloških odrednica iz krvi štakora nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i Fe-dex. prikazani su na Slici 71. Statistički značajno je povećan ukupan broj eritrocita u skupinama obrađenim izofluranom ( $p < 0,01$  odnosno  $p < 0,001$ ) i Fe-dex. + Izo. ( $p < 0,01$  odnosno  $p < 0,001$ ) u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu i kontrolnu skupinu.

U skupini izloženoj izofluranu vidljiva je povećana vrijednost hemoglobina, hematokrita i MCV-a, te smanjena vrijednost MCHC-a. Postotak RDW-a je statistički značajno smanjen u skupini obrađenoj Fe-dex. u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu ( $p < 0,05$ ) i kontrolnu skupinu ( $p < 0,05$ ). Vrijednost hemoglobina je povećana u skupini obrađenoj Fe-dex. + Sevo. u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu ( $p < 0,05$ ) i kontrolnu skupinu ( $p < 0,05$ ). U skupini obrađenoj Fe-dex. + Izo. svi ostali hematološki parametri su značajno promijenjeni (vidi Sliku 71).

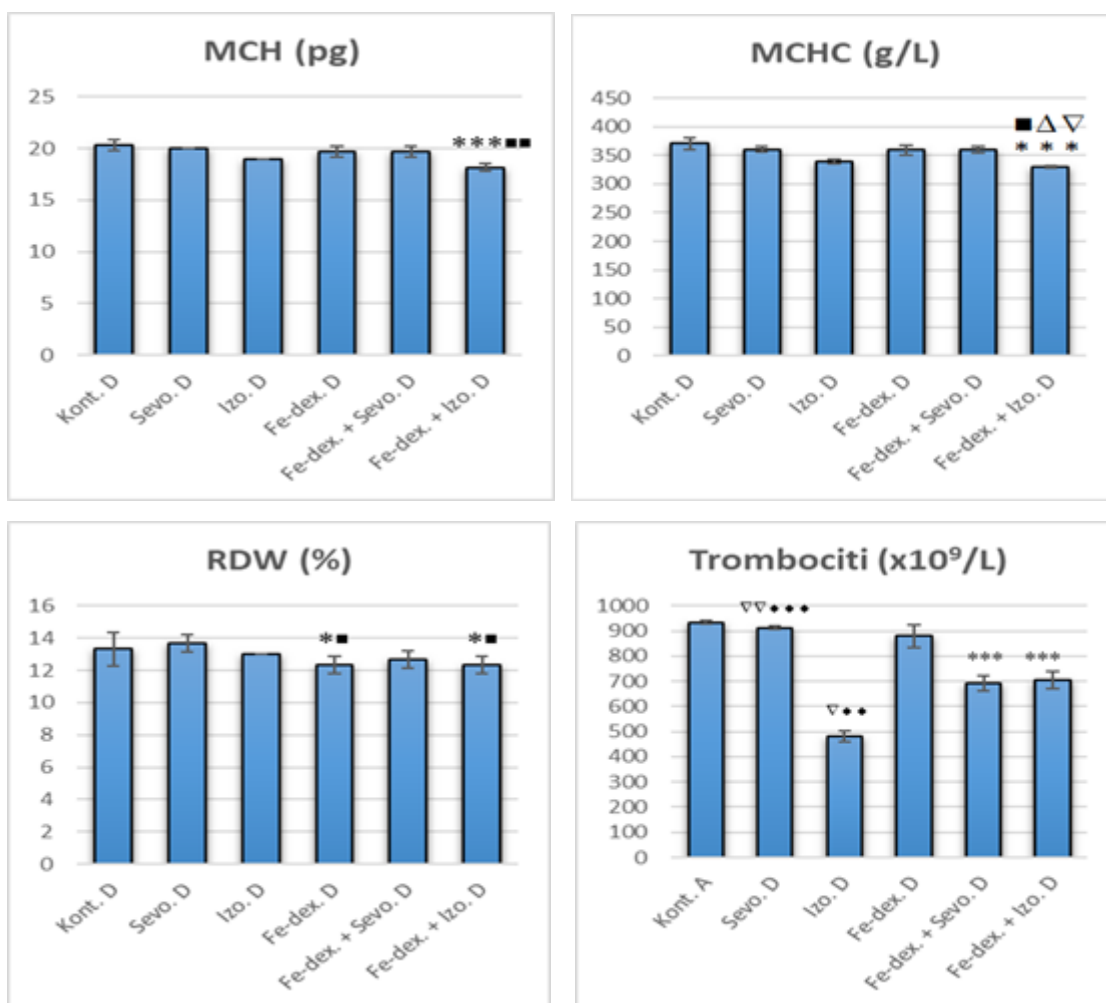


**Slika 71.** Hematološke odrednice štakora nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestheticima 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ); ■Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (■ $p < 0,05$ ; ■ $p < 0,01$ ).

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



### Nastavak Slike 71.

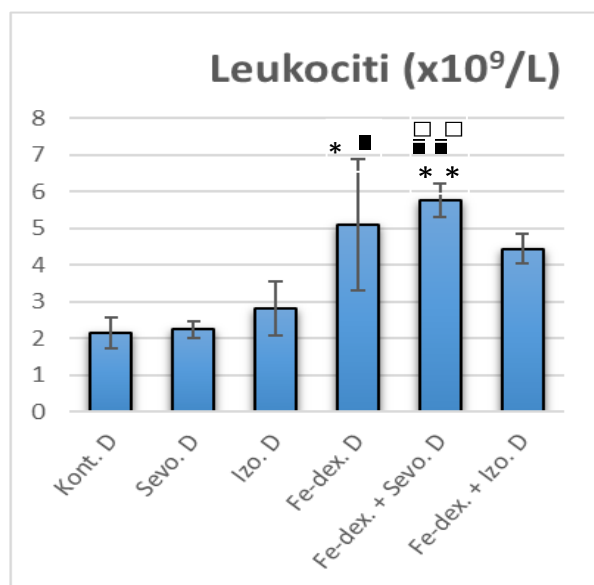
\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ); ■ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (■ $p < 0,05$ ; ■■ $p < 0,01$ ); ∇ Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu Fe-dex. + Sevo. (∇ $p < 0,05$ ; ∇∇ $p < 0,01$ ); △ Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu željezo dekstranom (△ $p < 0,05$ ).

Kratice: ip – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, MCH – sadržaj hemoglobina u eritrocitima, MCHC – koncentracija hemoglobina u eritrocitima, RDW – raspodjela eritrocita po veličini, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, Fe-dex. – željezo dekstran, Fe-dex. + Sevo. – željezo dekstran i sevofluran, Fe-dex. + Izo. – željezo dekstran i izofluran.

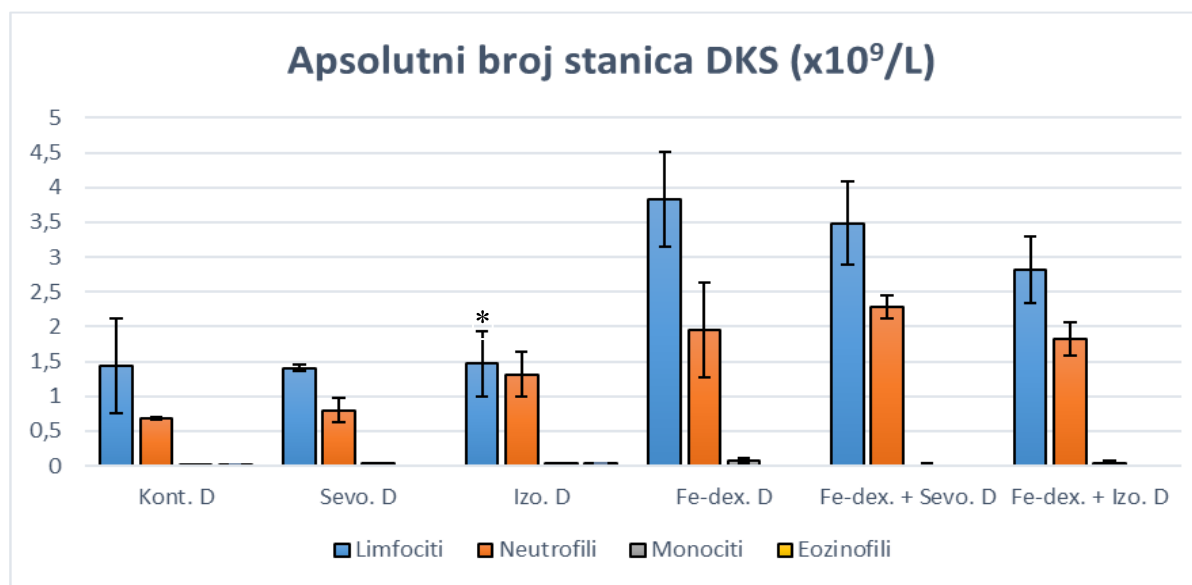
#### **4.16.4. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na ukupni broj leukocita i diferencijalnu analizu krvi**

Ukupan broj leukocita je značajno povećan u skupinama obrađenim Fe-dex. i Fe-dex. + Sevo. u odnosu na skupine obrađene izofluranom i sevofluranom te kontrolnu skupinu (Slika 72a).

Rezultati diferencijalne krvne slike ukazuju na statistički značajno smanjenje postotka limfocita u skupini izloženoj izofluranu u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,05$ ). Postotak neutrofila, monocita i eozinofila nije značajno promijenjen niti u jednoj obrađenoj skupini (Slika 72b).



a)



b)

**Slika 72.** Ukupan broj leukocita (a) i analiza diferencijalne krvne slike štakora (b) nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestheticima 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ); ■Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (■ $p < 0,05$ ; ■■ $p < 0,01$ ); □Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu (□ $p < 0,01$ ).

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

#### 4.16.5. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na osmotsku otpornost eritrocita

Iz Tablice 16 vidljivo je da Fe-dex. izaziva znatno veću hemolizu u odnosu na druge skupine. Hemoliza je prisutna i u izotoničnoj otopini NaCl (1,21%) te se povećava pri 0,6% koncentraciji NaCl na 2,39%, pri 0,5% NaCl na 31,30% te na 0,4% i 0,3% NaCl je 93,91% i 94,32%. Zanimljivo je da kod kronične primjene i sevofluran i izofluran imaju visoku hemolizu (23,7% te 29,63%), dok njihove kombinacije imaju za oko 4% nižu vrijednost hemolize.

**Tablica 16.** Osmotska hemoliza eritrocita nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze te njihove kombinacije.

NaCl (%)	0	0,3	0,4	0,5	0,6	0,9
<b>Skupine<sup>a</sup></b>	<b>Postotak hemolize</b>					
Kont. D	100	92,02	86,90	3,51	0	0
Sevo. D	100	88,18	86,59	23,27	0,41	0
Izo. D	100	94,66	89,29	29,63	1,13	0
Fe-dex. D	100	94,32	92,91	31,30	2,39	1,21
Fe-dex. + Sevo. D	100	88,22	87,29	19,36	0,78	0
Fe-dex. + Izo. D	100	91,16	89,56	27,52	1,25	0

<sup>a</sup>Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestetikima 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao % hemolize eritrocita prema formuli: Hemoliza (%) = (A/B)\*100 gdje je A – hemoliza uzorka, B - potpuna hemoliza.

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



## **4.17. Promjene koncentracije esencijalnih, neesencijalnih i visokotoksičnih metala u tkivu mozga nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana**

### **4.17.1. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na koncentraciju esencijalnih metala u tkivu mozga**

Značajne promjene esencijalnih metala nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana prikazane su u Tablici 17 i vidljive su u koncentraciji Fe, Zn, Cu, Cr i Mo jedino u skupini Fe-dex. + Izo. u odnosu na kontrolnu skupinu (Cu,  $p < 0,05$ ; Fe, Zn, Cr,  $p < 0,01$  i Mo,  $p < 0,001$ ). U istoj skupini vidljive su promjene koncentracije Fe i Zn u odnosu na sevofluran (obje,  $p < 0,01$ ) i koncentracije Mo u odnosu na skupinu izloženu izofluranu ( $p < 0,01$ ).

**Tablica 17.** Koncentracija esencijalnih metala nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

Skupine <sup>a</sup>	Esencijalni metali (mg/kg)							
	(X ± SP)							
	Fe	Zn	Mn	Se	Cu	Co	Cr	Mo
Kont.	14,90 ± 0,92	8,72 ± 0,90	0,431 ± 0,043	0,14 ± 0,01	2,75 ± 0,35	0,004 ± 0,001	0,015 ± 0,000	0,030 ± 0,002
Sevo. D	12,16 ± 0,18	7,78 ± 0,15	0,469 ± 0,012	0,16 ± 0,00	3,34 ± 0,02	0,004 ± 0,001	0,027 ± 0,004	0,040 ± 0,000
Izo. D	22,24 ± 0,21	13,92 ± 0,26	0,501 ± 0,041	0,14 ± 0,00	2,70 ± 0,06	0,004 ± 0,000	0,005 ± 0,000	0,036 ± 0,001
Fe-dex. D	24,23 ± 2,19	13,81 ± 0,17	0,453 ± 0,019	0,16 ± 0,00	2,94 ± 1,12	0,004 ± 0,001	0,045 ± 0,003	0,042 ± 0,002
Fe-dex. + Sevo. D	33,14 ± 0,40	13,59 ± 0,50	0,469 ± 0,009	0,13 ± 0,00	3,78 ± 0,04	0,005 ± 0,000	0,072 ± 0,004	0,045 ± 0,000
Fe-dex. + Izo. D	45,11 ± 1,89 <sup>■***</sup>	27,34 ± 3,52 <sup>■***</sup>	0,852 ± 0,014	0,23 ± 0,00 <sup>∇</sup>	4,76 ± 0,20 <sup>□*</sup>	0,009 ± 0,000 <sup>□</sup>	0,182 ± 0,006 <sup>□□**</sup>	0,067 ± 0,001 <sup>□***</sup>

<sup>a</sup>Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao X ± SP.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01; \*\*\**p* < 0,001); <sup>□</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu (<sup>□</sup>*p* < 0,05; <sup>□□</sup>*p* < 0,01);

<sup>∇</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu Fe-dex. + Sevo. (<sup>∇</sup>*p* < 0,05); <sup>■</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (<sup>■</sup>*p* < 0,05; <sup>■■</sup>*p* < 0,01).

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

#### **4.17.2. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na koncentraciju visokotoksičnih i neesencijalnih metala u tkivu mozga**

Tablica 18 pokazuje promjene u koncentraciji visokotoksičnih i neesencijalnih metala u tkivu mozga nakon izlaganja štakora te kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana. U skupini Fe-dex. + Izo. vidljivo je statistički značajno povećanje koncentracija Al i As u odnosu na kontrolu ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ). Promjena koncentracije Al vidljiva je i u skupini Fe-dex. + Sevo. u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,01$ ). U istoj skupini (Fe-dex. + Sevo.) vidljiva je promjena u koncentraciji Pb u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,05$ ). Od neesencijalnih metala koncentracija Ba je promjenjena u skupini Fe-dex. + Sevo. i Fe-dex. + Izo. u odnosu na sam sevofluran (u obje  $p < 0,05$ ) dok je u istim skupinama koncentracija Ni značajno promjenjena u odnosu na izofluran (u obje  $p < 0,05$ ).

**Tablica 18.** Koncentracija visokotoksičnih i neesencijalnih metala nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

Skupine <sup>a</sup>	Visokotoksični metali (µg/kg) (X ± SP)				Neesencijalni metali (µg/kg) (X ± SP)	
	As (µg/kg)	Pb (µg/kg)	Cd (µg/kg)	Al (µg/kg)	Ba (µg/kg)	Ni (µg/kg)
Kont.	62,73 ± 3,39	0,67 ± 0,27	0,07 ± 0,02	288,19 ± 24,86	10,90 ± 0,64	6,31 ± 0,92
Sevo. D	97,84 ± 5,68	1,99 ± 0,85	0,31 ± 0,04	412,59 ± 11,57	7,05 ± 0,59	13,66 ± 2,34
Izo. D	74,58 ± 6,90	1,01 ± 0,44	0,43 ± 0,43	402,18 ± 39,71	9,72 ± 0,38	0 ± 0,00
Fe-dex. D	84,03 ± 10,82	0,73 ± 0,73	0,03 ± 0,02	526,23 ± 42,30	14,36 ± 2,25	12,71 ± 0,84
Fe-dex. + Sevo. D	103,42 ± 16,53	75,19 ± 12,30*	0,53 ± 0,15	2936,83 ± 160,34**	51,25 ± 6,99 <sup>■</sup>	31,15 ± 2,99 <sup>□</sup>
Fe-dex. + Izo. D	226,46 ± 12,22***	30,59 ± 0,16	24,08 ± 13,02	1370,96 ± 48,50**	37,21 ± 0,71 <sup>■</sup>	35,16 ± 3,23 <sup>□</sup>

<sup>a</sup>Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2 h 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom gdje su inhalacijski anestetici dani 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao X ± SP.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01; \*\*\**p* < 0,001); <sup>■</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (<sup>■</sup>*p* < 0,05);

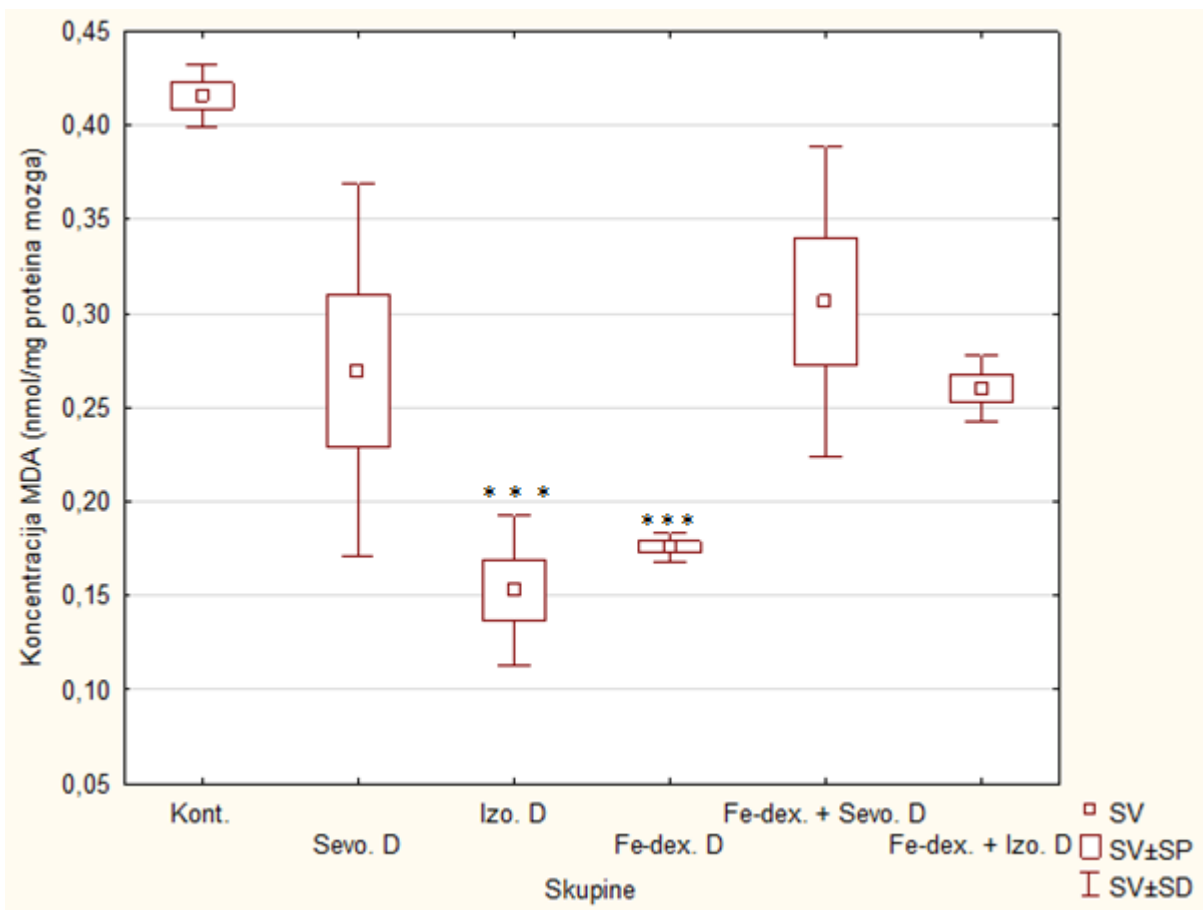
<sup>□</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu (<sup>□</sup>*p* < 0,05).

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

## **4.18. Oksido-redukcijske promjene u tkivu mozga nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana**

### **4.18.1. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na razinu lipidne peroksidacije (malondialdehid, MDA) u tkivu mozga**

Oštećenje lipida utvrđeno je mjerenjem količine malondialdehida (MDA). Analizom koncentracije MDA u homogenatu tkiva mozga (Slika 73) zapažena je statistički značajno snižena vrijednost kod skupine Izo. u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p = 0,0001$ ) i skupine Fe-dex. u odnosu kontrolnu skupinu ( $p = 0,0004$ ).



**Slika 73.** Koncentracija MDA nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

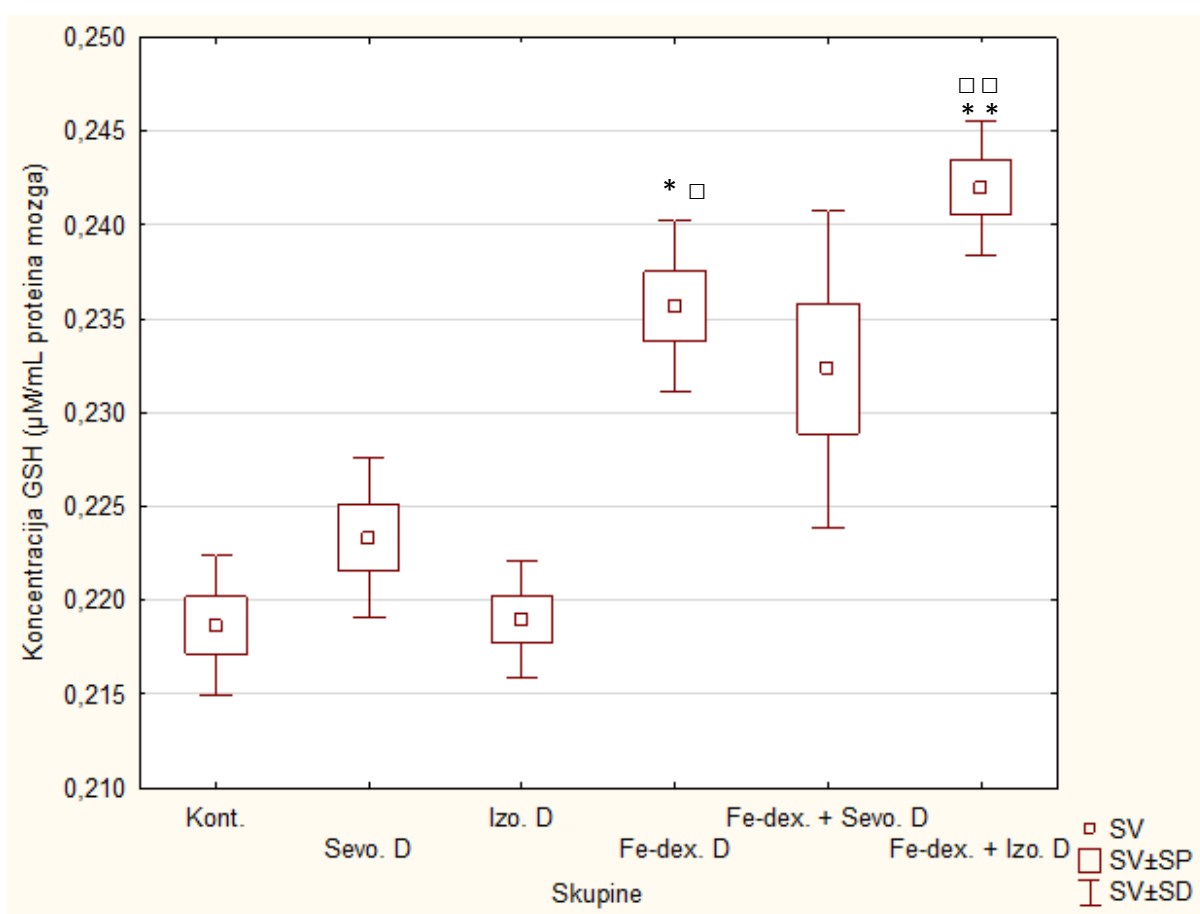
Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestheticima 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

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

#### 4.18.2. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na ukupnu razinu glutationa (GSH) u tkivu mozga

Analizom rezultata koncentracije ukupnog glutationa (GSH) u uzorku homogenata tkiva mozga (Slika 74) vidljiva je statistički značajno viša koncentracija kod skupine Fe-dex. + Izo. u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,01$ ) te izofluran skupinu ( $p < 0,01$ ). Također zapažena je statistički značajno veća koncentracija kod skupine Fe-dex. u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p = 0,03$ ) te izofluran skupinu ( $p = 0,04$ ).



**Slika 74.** Koncentracija GSH nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestheticima 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

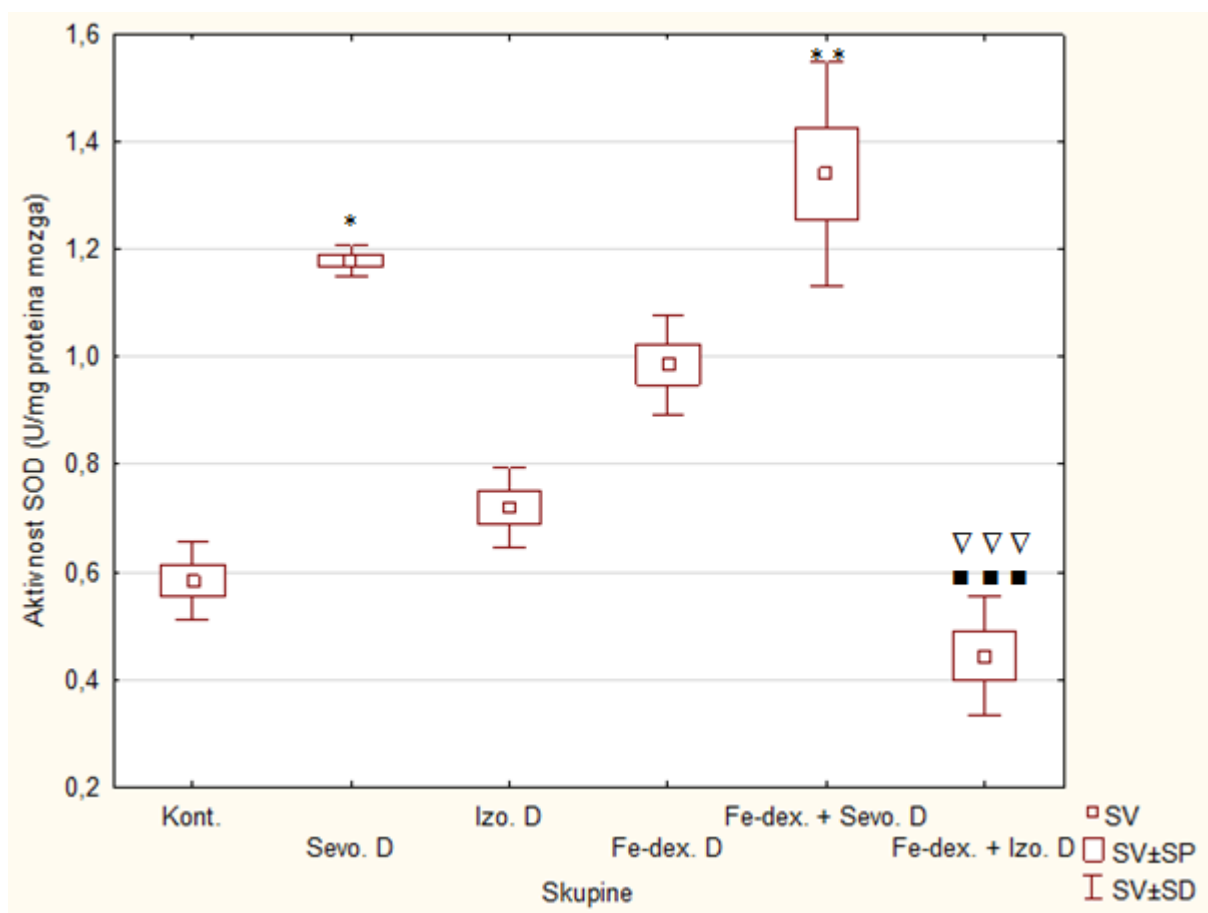
\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ); □Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu (□ $p < 0,05$ ; □□ $p < 0,01$ ).

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

### **4.18.3. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na aktivnost antioksidacijskih enzima (CAT i SOD) u tkivu mozga**

Analizom rezultata enzimske aktivnosti SOD (Slika 75) vidljiva je statistički značajno snižena aktivnost kod skupine Fe-dex. + Izo. u odnosu na skupine Fe-dex. + Sevo. ( $p = 0,0001$ ) i sevofluran ( $p = 0,0004$ ). Također, uočava se statistički povišena aktivnost kod skupine Fe-dex. + Sevo. u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p = 0,004$ ) i skupine Sevo. u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p = 0,01$ ).





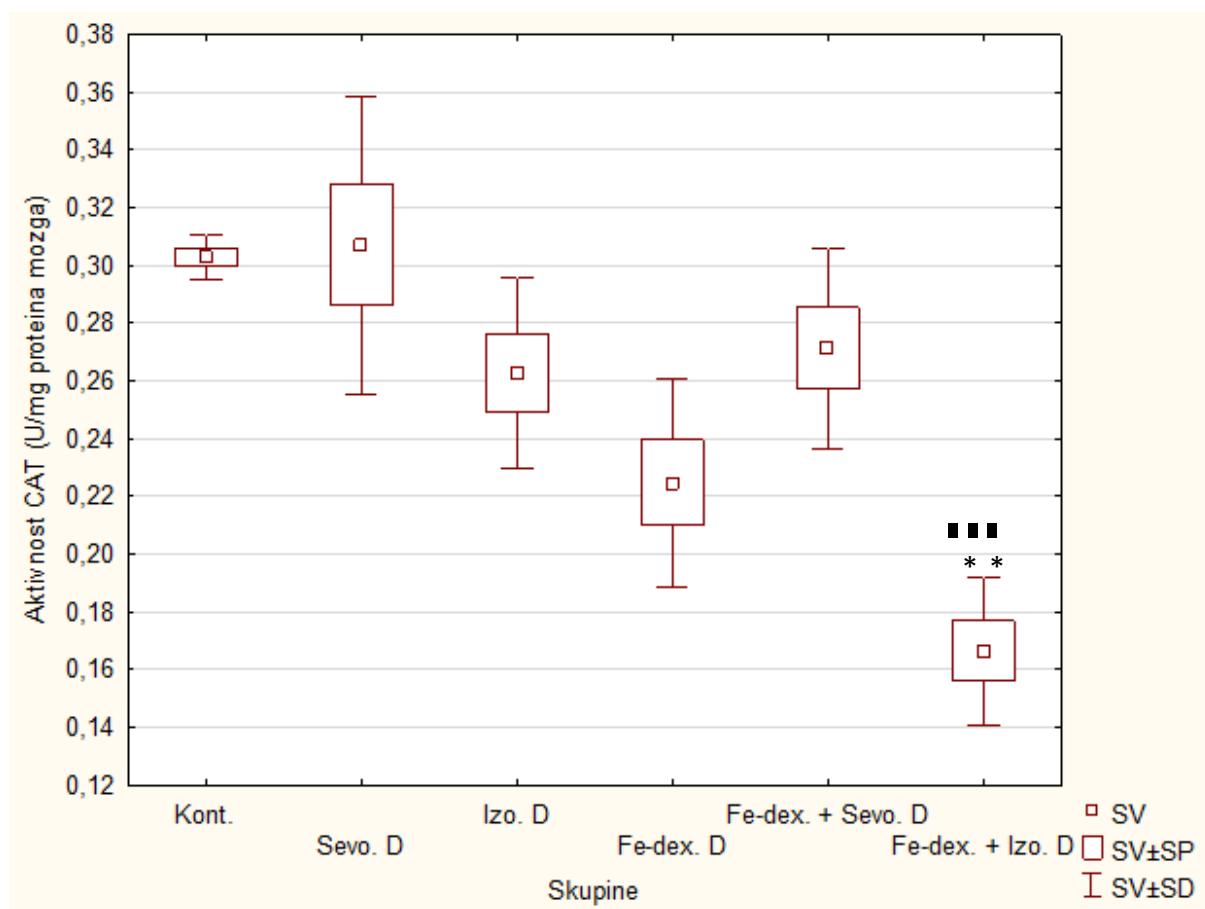
**Slika 75.** Aktivnost SOD nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestheticima 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ); ■Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu ( $***p < 0,001$ ); ▽Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu Fe-dex. + Sevo. ( $▽▽▽p < 0,001$ ).

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

Analizom rezultata mjerenja enzimske aktivnosti CAT (Slika 76) utvrđena je statistički značajno snižena antioksidacijska aktivnost katalaze kod skupine Fe-dex. + Izo. u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p = 0,001$ ) i sevofluran skupinu ( $p = 0,0007$ ).



**Slika 76.** Aktivnost CAT nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

Štakori ( $N = 10$ ) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestheticima 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SP$ .

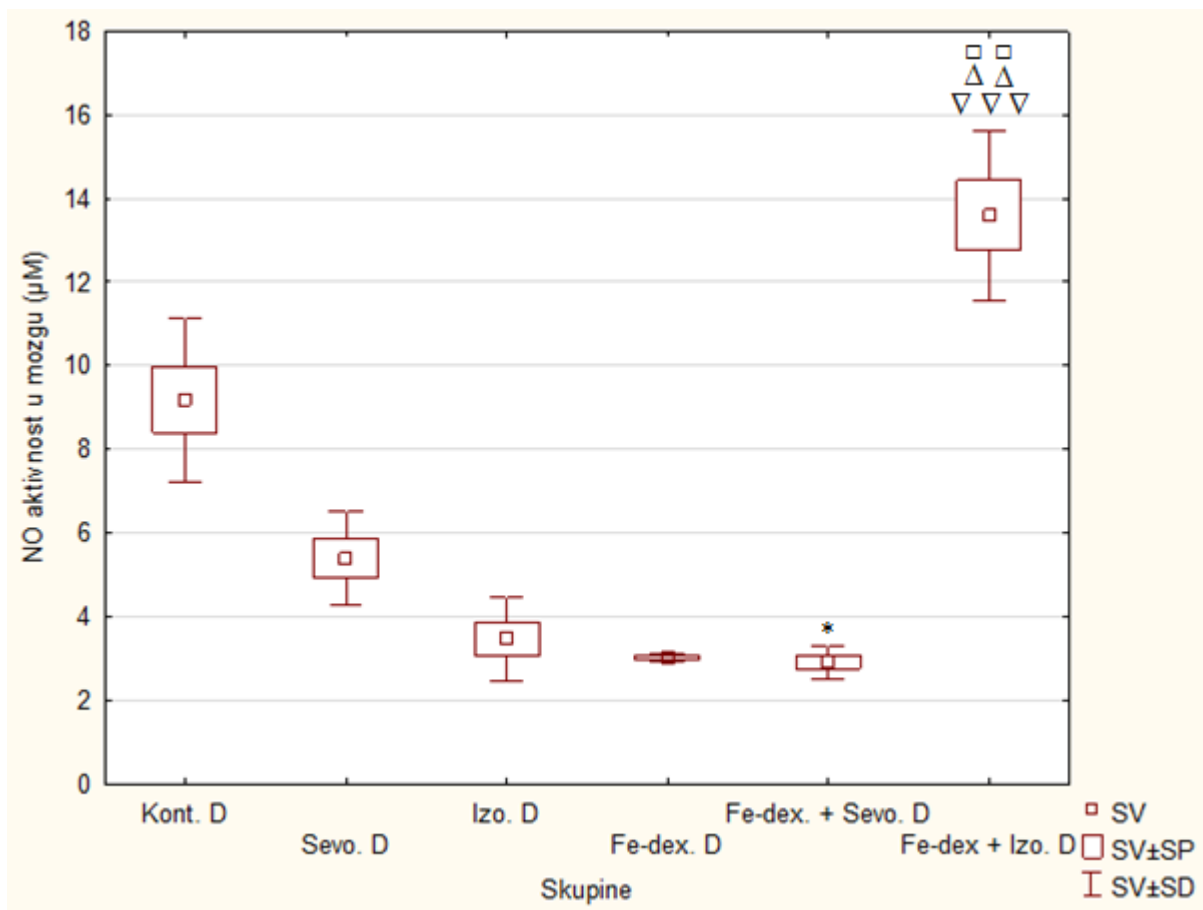
\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\*\* $p < 0,01$ ); ■Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (■■ $p < 0,001$ ).

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

## **4.19. Neuropalne promjene u tkivu mozga nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana**

### **4.19.1. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na makrofagnu aktivnost i polarizaciju u tkivu mozga i serumu**

Analizom rezultata mjerenja enzimske aktivnosti NO u mozgu (Slika 77) zapažena je statistički značajno povišena aktivnost kod skupine Fe-dex. + Izo. u odnosu na Fe-dex. + Sevo. skupinu ( $p = 0,0003$ ), izofluran skupinu ( $p = 0,003$ ) i Fe-dex. skupinu ( $p = 0,001$ ). Također utvrđena je statistički značajno snižena aktivnost kod skupine Fe-dex. + Sevo. u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p = 0,01$ ).



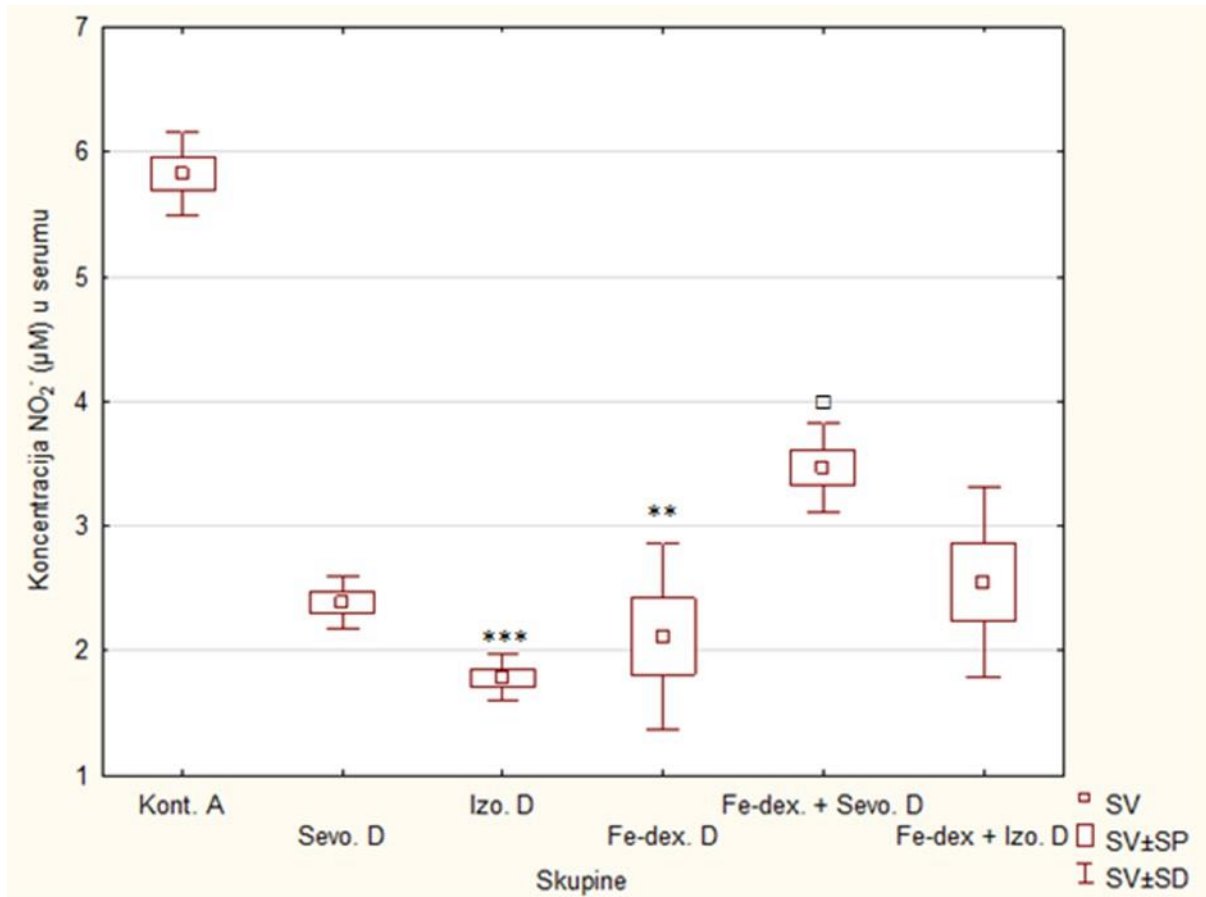
**Slika 77.** Aktivnost NO u mozgu nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestheticima 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\* $p < 0,05$ ); <sup>□</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu (<sup>□□</sup> $p < 0,01$ ); <sup>△</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu željezo dekstranom (<sup>△△</sup> $p < 0,01$ ); <sup>▽</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu Fe-dex. + Sevo. (<sup>▽▽▽</sup> $p < 0,001$ ).

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

Analizom rezultata koncentracije NO u serumu (Slika 78) vidljiva je statistički značajno povećana aktivnost kod kontrolne skupine u odnosu na skupine Fe-dex. ( $p = 0,0001$ ) i izofluran ( $p = 0,004$ ). Također, zapažena je povišena koncentracija kod skupine Fe-dex. + Sevo. u odnosu na izofluran skupinu ( $p = 0,015$ ).



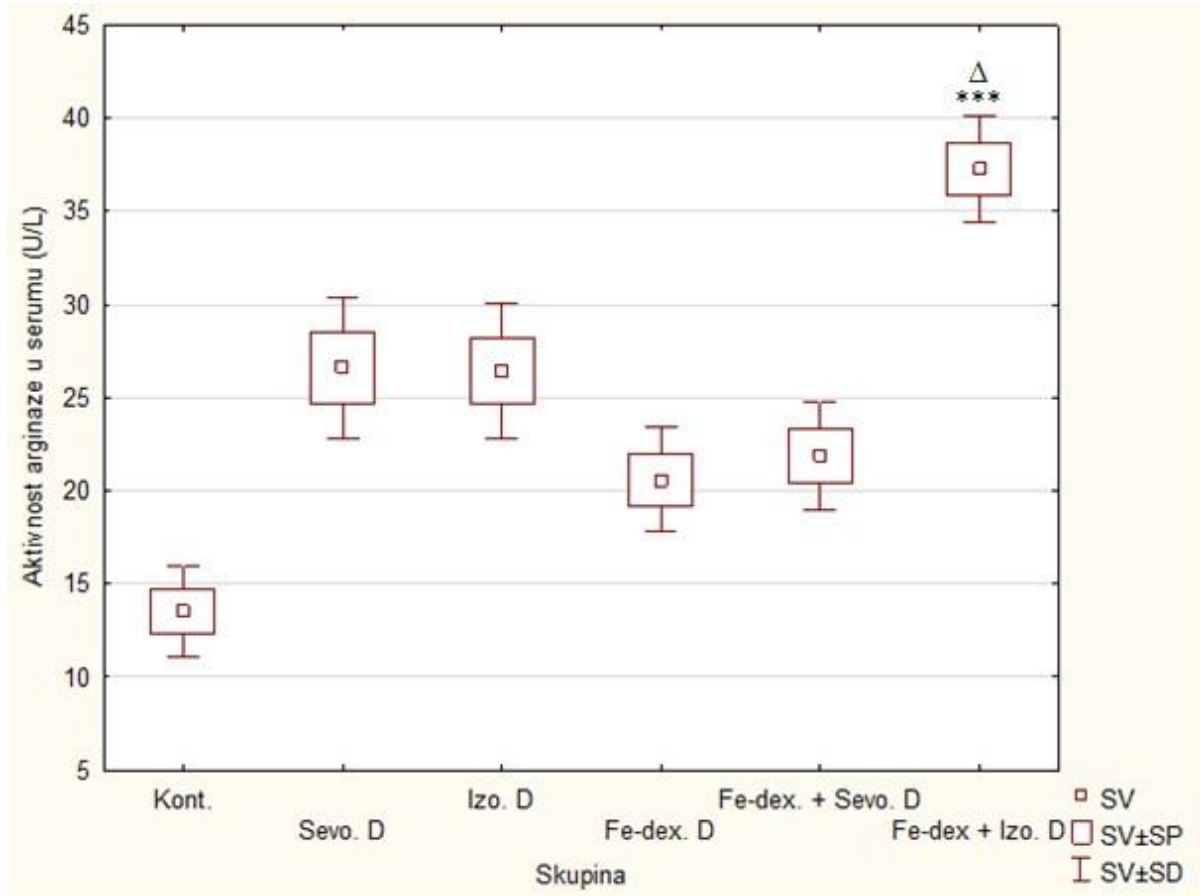
**Slika 81.** Koncentracija NO u serumu nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestheticima 2 sata nakon *ip* injiciranja Fe-dex. svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

□ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu ( $^{\square}p < 0,05$ ); \*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ );

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

Analizom rezultata aktivnosti arginaze u serumu (Slika 79) vidljiva je statistički značajno povećana aktivnost kod skupina Fe-dex. + Izo. u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p = 0,0009$ ) i Fe-dex. skupinu ( $p = 0,04$ ).



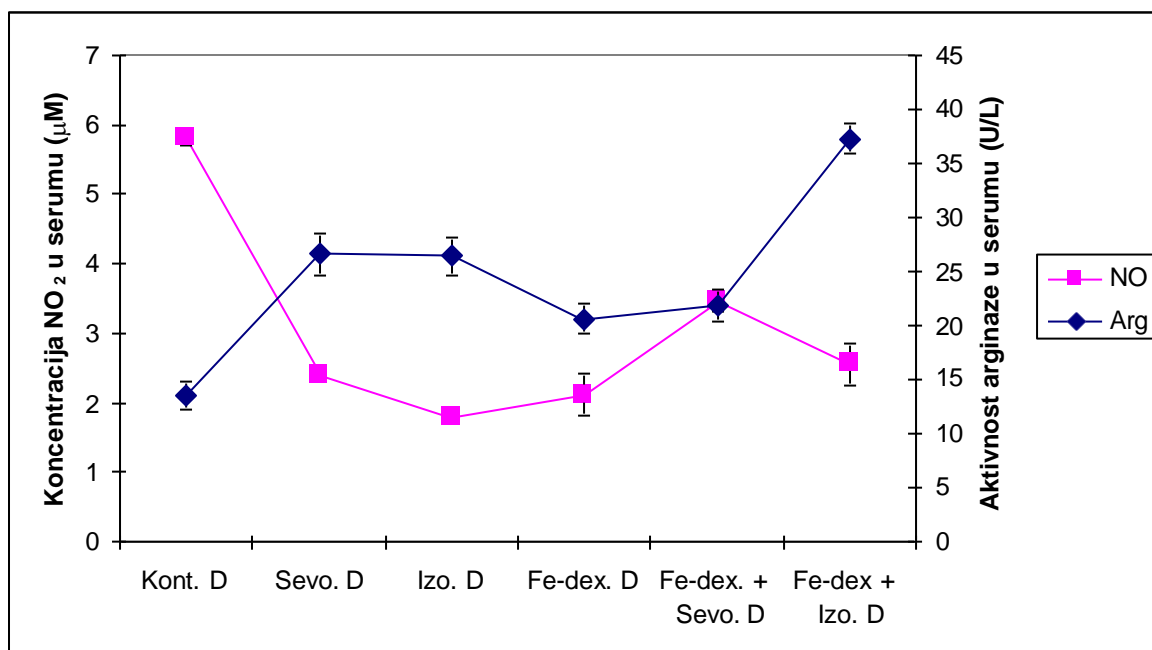
**Slika 79.** Aktivnost arginaze u serumu nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestheticima 2 sata nakon *ip* injiciranja Fe-dex. svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\*\* $p < 0,001$ ); <sup>Δ</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu željezo dekstranom (<sup>Δ</sup> $p < 0,05$ ).

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

Tijekom kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana vidljiv je znatan porast u arginaznoj aktivnosti i uspostavljanje adaptacijskih procesa dok je razina arginaze ponovno najveća u skupini Fe-dex. + Izo. što ukazuje na najveća oštećenja izazvana oksidacijskim stresom i snažan odgovor M2 makrofaga u uspostavljanju regeneracije oštećenih tkiva (Slika 80).



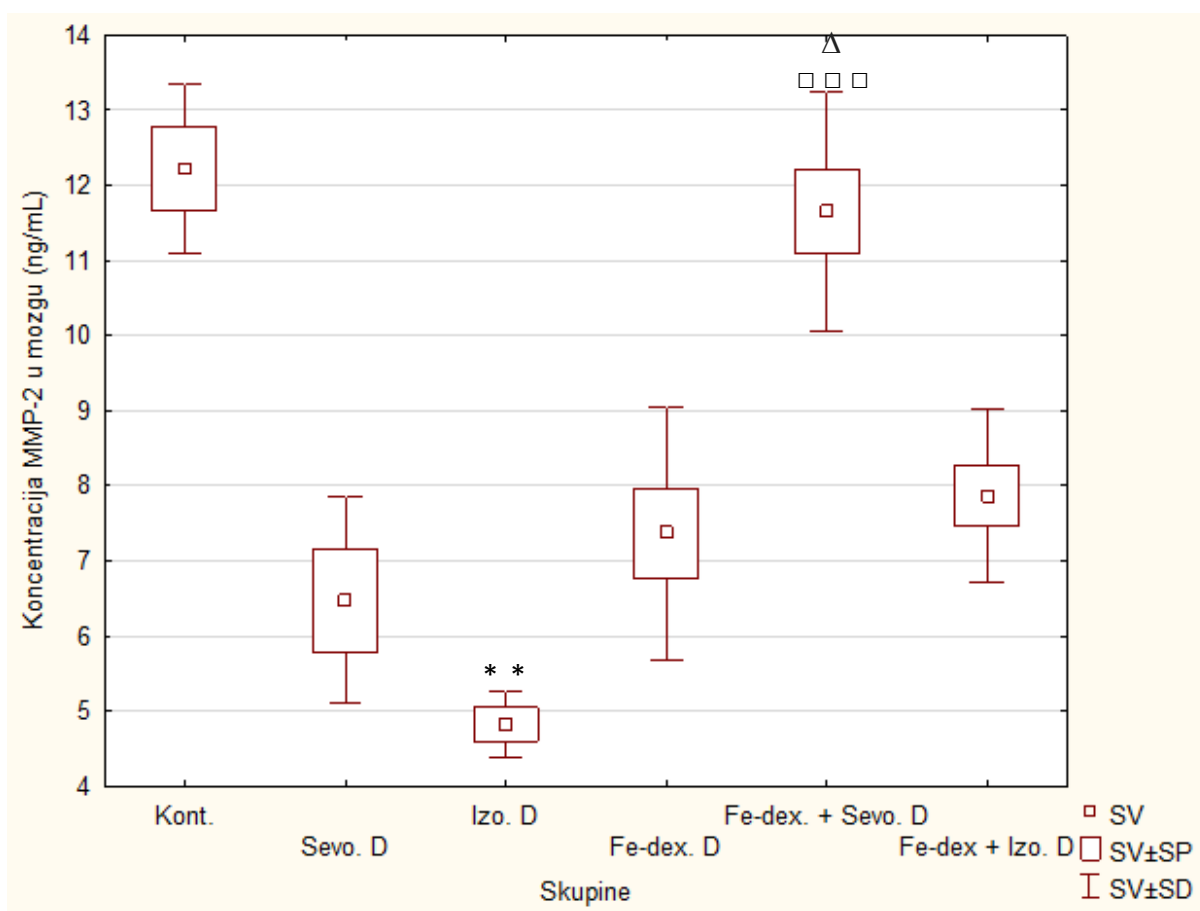
**Slika 80.** Odnos između aktivnosti arginaze i koncentracije NO u serumu nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestheticima 2 sata nakon *ip* injiciranja Fe-dex. svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

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

#### 4.19.2. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na razinu MMP2 i MMP9 u tkivu mozga

Analizom rezultata mjerenja koncentracije MMP-2 u tkivu mozga štakora (Slika 81) zapažena je statistički značajno viša koncentracija kod skupine Fe-dex. + Sevo. u odnosu na izofluran skupinu ( $p = 0,0004$ ) i Fe-dex. skupinu ( $p = 0,03$ ). Praćenjem daljnjih rezultata vidljiva je niža koncentracija kod skupine Izo. u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p = 0,001$ ).



**Slika 81.** Koncentracija MMP-2 nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

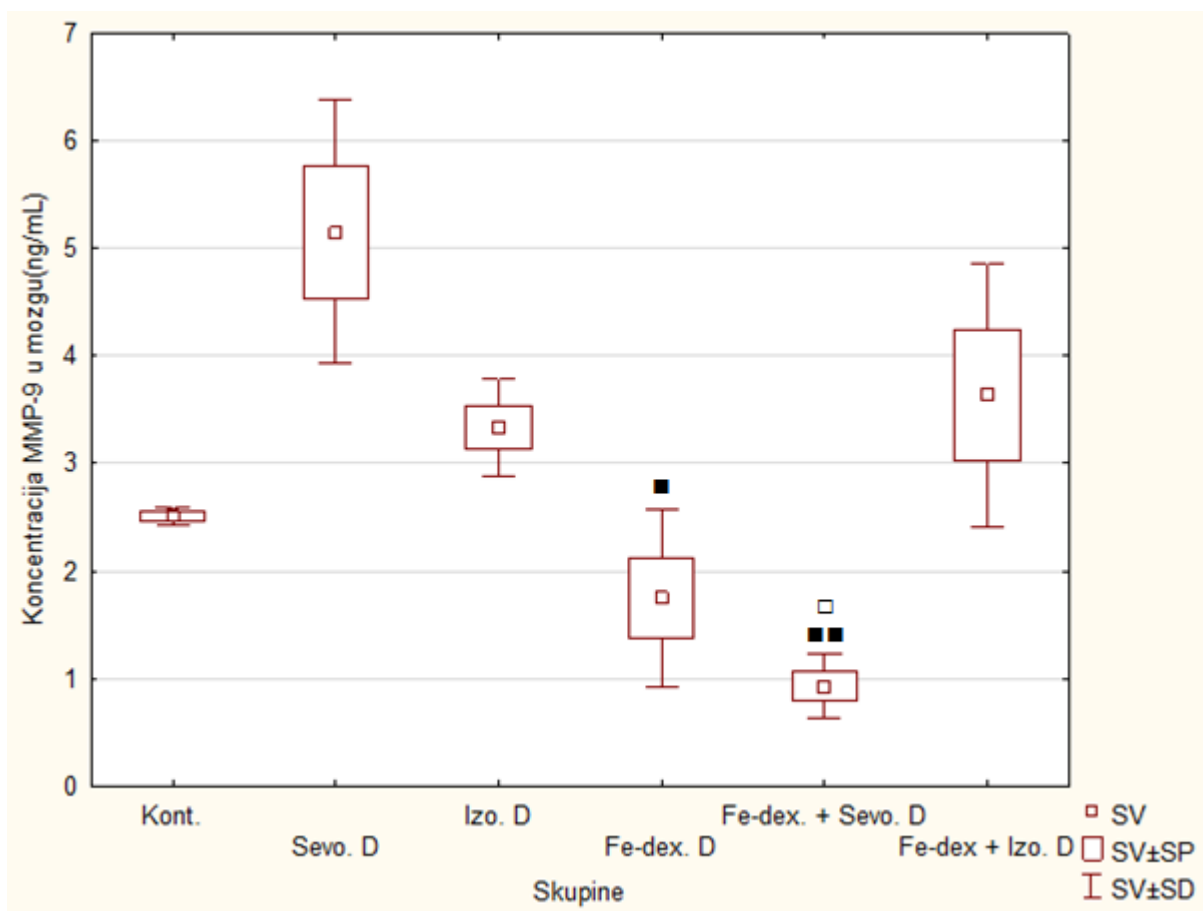
Štakori ( $N = 10$ ) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestetikima 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV  $\pm$  SP.

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\*\* $p < 0,01$ );  $\square$ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu ( $\square\square\square p < 0,001$ );  $\Delta$ Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu željezo dekstranom ( $\Delta p < 0,05$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, Fe-dex. – željezo dekstran, Fe-dex. + Sevo. – željezo dekstran i sevofluran, Fe-dex. + Izo. – željezo dekstran i izofluran, MMP-2 – metaloproteinaza-2.



Analizom rezultata mjerenja koncentracije MMP-9 u tkivu mozga štakora (Slika 82) zapažena je statistički značajno snižena koncentracija kod skupine Fe-dex. + Sevo. ( $p = 0,001$ ) i Fe-dex. ( $p = 0,04$ ) u odnosu na sevofluran skupinu. Također, vidljiva je snižena koncentracija kod skupine Fe-dex. + Sevo. ( $p = 0,03$ ) u odnosu na izofluran skupinu.



**Slika 82.** Koncentracija MMP-9 nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

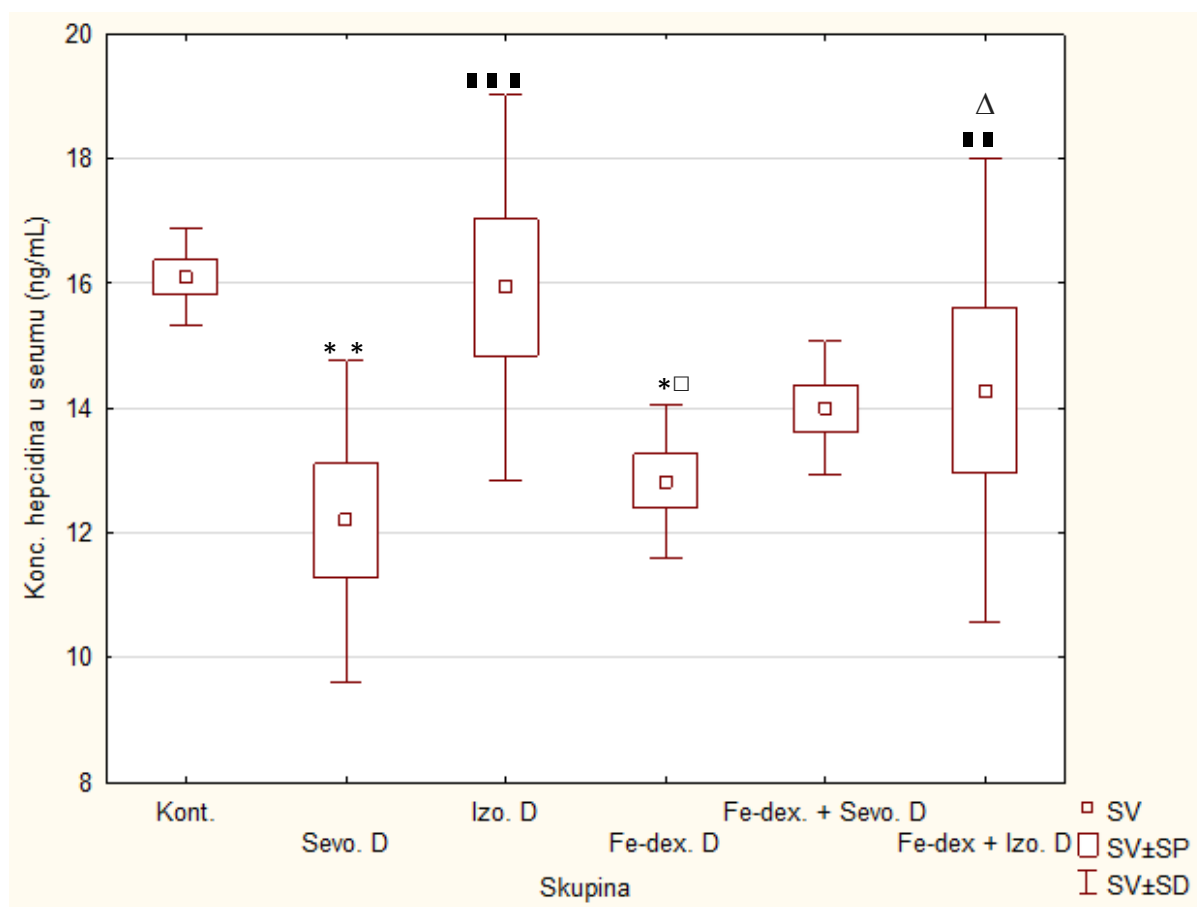
Štakori ( $N = 10$ ) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestheticima 2 sata nakon *ip* injiciranja Fe-dex. svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SP$ .

□ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu ( $^{\square}p < 0,05$ ); ■ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (■  $p < 0,05$ ; ■■  $p < 0,01$ ).

Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, Fe-dex. – željezo dekstran, Fe-dex. + Sevo. – željezo dekstran i sevofluran, Fe-dex. + Izo. – željezo dekstran i izofluran, MMP-9 – metaloproteinaza-9.

### 4.19.3. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na razinu hepcidina i feritina u tkivu mozga

Analizom rezultata mjerenja koncentracije hepcidina u serumu (Slika 83) vidljiva je statistički značajno povišena koncentracija kod skupine Izo. u odnosu na Sevo. skupinu ( $p = 0,00006$ ). Također zapažena je statistički značajno snižena koncentracija Sevo. skupine u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p = 0,002$ ). Kod Fe-dex. skupine bilježe se statistički značajno niže vrijednosti u odnosu na izofluran skupinu ( $p = 0,001$ ) i kontrolnu skupinu ( $p = 0,03$ ). Također vidljiva je statistički značajno povišena koncentracija kod skupine Fe-dex. + Izo. u odnosu na izofluran skupinu ( $p = 0,001$ ) i Fe-dex. skupinu ( $p = 0,01$ ).



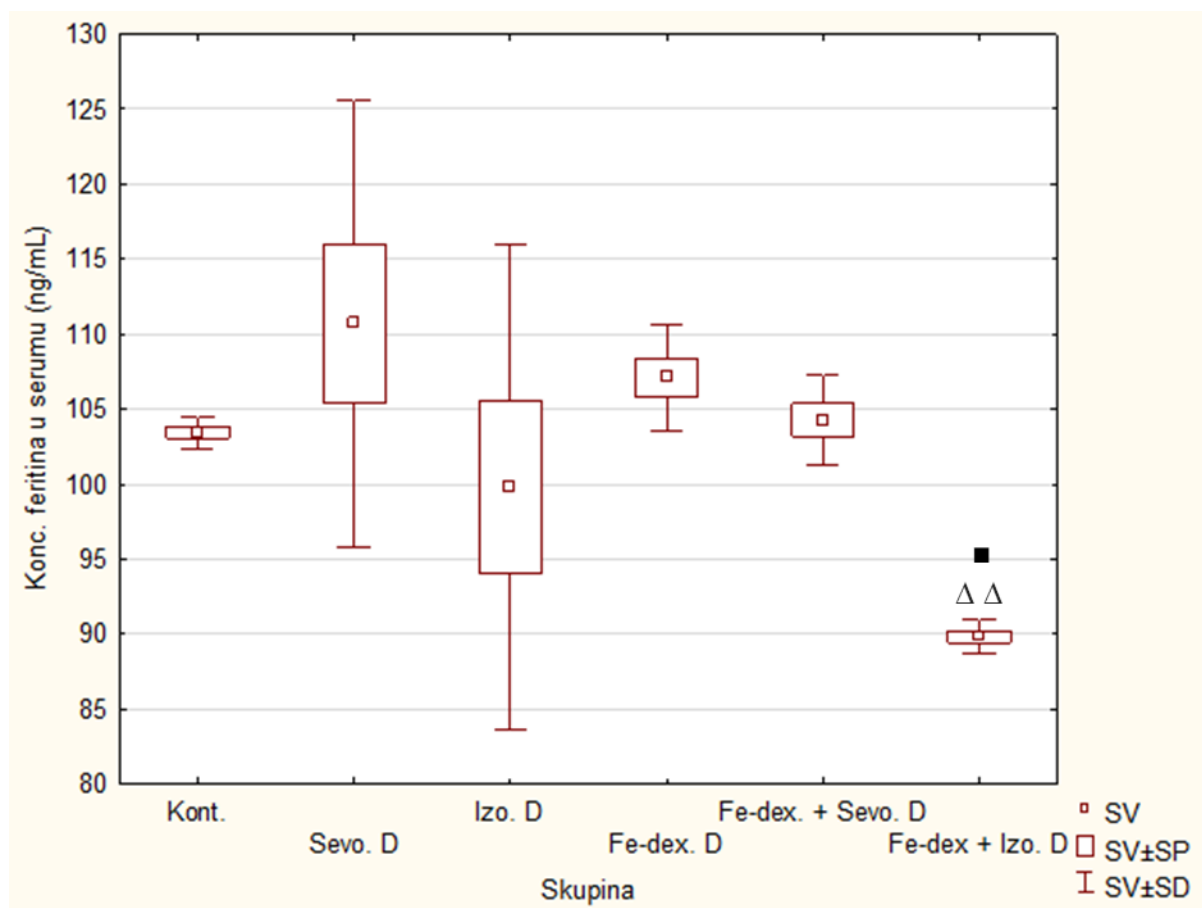
**Slika 83.** Koncentracija hepcidina u serumu nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestetikima 2 sata nakon *ip* injiciranja Fe-dex. svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

▪ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ); \* Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ); ◻ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu (◻ $p < 0,05$ ); ^ Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu željezo dekstranom (^ $p < 0,05$ ).

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

Analizom rezultata mjerenja koncentracije feritina u serumu (Slika 84) vidljiva je statistički značajno snižena koncentracija kod Fe-dex. + Izo. skupine u odnosu na skupine Fe-dex. ( $p < 0,01$ ) i Sevo. ( $p < 0,05$ ).



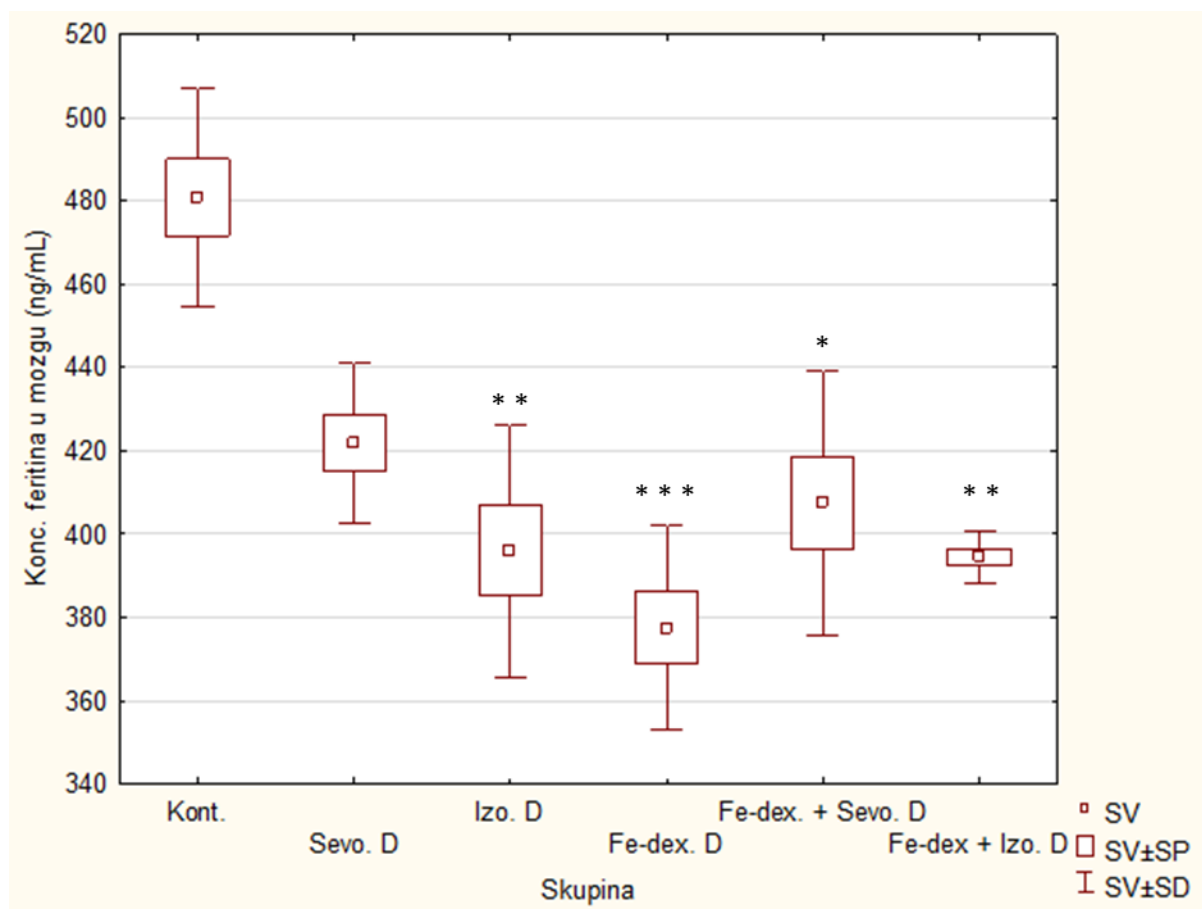
**Slika 84.** Koncentracija feritina u serumu nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anesticima 2 sata nakon *ip* injiciranja Fe-dex. svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

■ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu ( $p < 0,05$ ); <sup>Δ</sup> Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu željezo dekstranom ( $p < 0,01$ ).

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

Analizom rezultata mjerenja koncentracije feritina u tkivu mozga (Slika 85) zabilježena je statistički značajno povišena koncentracija kod kontrolne skupine u odnosu na skupine Fe-dex. ( $p = 0,00003$ ), Fe-dex. + Izo. ( $p = 0,002$ ), Fe-dex. + Sevo. ( $p = 0,02$ ) i izofluran ( $p = 0,003$ ).



**Slika 85.** Koncentracija feritina u mozgu nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

Štakori ( $N = 10$ ) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestheticima 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SP$ .

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ ).

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

#### **4.19.4. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na razinu upalnih citokina u serumu**

Tijekom kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana ponovno su vidljive najveće promjene u koncentraciji citokina u skupini izloženoj sevofluranu u odnosu na kontrolu dok kombinacija željeza s inhalacijskim anestheticima nema značajnih promjena u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 19). Dobiveni podaci ukazuju na uspostavljanje ravnoteže između ključni citokina IL-12/IL-10 pokazatelja odnosa M1/M2. Zapažena je povećana razina slijedećih citokina u skupini izloženoj sevofluranu: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-10, IL-13, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i RANTES u odnosu na kontrolnu skupinu.

**Tablica 19.** Razina prouplanih citokina nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

CITOKINI	Skupina <sup>D</sup>	X	SP	*P	▪P	□P	▽P
IL-1α (pg/mL)	Kont.	0,147	0,015				
	Sevo. D	0,308	0,027	0,031575*			
	Izo. D	0,231	0,022				
	Fe-dex. D	0,078	0,029		0,00265 <sup>▪▪</sup>		
	Fe-dex. + Sevo. D	0,189	0,010				
	Fe-dex. + Izo. D	0,233	0,013				
IL-1β (pg/mL)	Kont.	0,084	0,004				
	Sevo. D	0,333	0,017				
	Izo. D	0,380	0,019	0,006979 <sup>**</sup>			
	Fe-dex. D	0,080	0,013			0,00697 <sup>□□</sup>	
	Fe-dex. + Sevo. D	0,159	0,007				
	Fe-dex. + Izo. D	0,183	0,010				
IL-2 (pg/mL)	Kont.	0,105	0,023				
	Sevo. D	0,446	0,027	0,017311*			
	Izo. D	0,322	0,032				
	Fe-dex. D	0,142	0,049				
	Fe-dex. + Sevo. D	0,094	0,006		0,014503 <sup>▪</sup>		
	Fe-dex. + Izo. D	0,212	0,020				
IL-4 (pg/mL)	Kont.	0,036	0,003				
	Sevo. D	0,094	0,009				
	Izo. D	0,110	0,011				
	Fe-dex. D	0,214	0,014	0,003234 <sup>**</sup>			
	Fe-dex. + Sevo. D	0,051	0,006				
	Fe-dex. + Izo. D	0,038	0,007				0,017311 <sup>□</sup>

**Tablica 19. nastavak**

CITOKINI	Skupina <sup>D</sup>	X	SP	*P	▪P	▫P	▽P
IL-6 (pg/mL)	Kont.	0,069	0,011				
	Sevo. D	0,278	0,017	0,029028*			
	Izo. D	0,156	0,021				
	Fe-dex. D	0,217	0,046				
	Fe-dex. + Sevo. D	0,081	0,003		0,04049▪		
	Fe-dex. + Izo. D	0,251	0,059				
IL-10 (pg/mL)	Kont.	0,113	0,002				
	Sevo. D	0,631	0,080	0,026671*			
	Izo. D	0,286	0,045				
	Fe-dex. D	0,171	0,074				
	Fe-dex. + Sevo. D	0,106	0,008		0,01107▪		
	Fe-dex. + Izo. D	0,260	0,038				
IL-12 (pg/mL)	Kont.	0,047	0,003				
	Sevo. D	0,140	0,023				
	Izo. D	0,263	0,011	0,018896*			
	Fe-dex. D	0,224	0,015				
	Fe-dex. + Sevo. D	0,033	0,006			0,00240▫	0,026671▽
	Fe-dex. + Izo. D	0,066	0,003				
IL-13 (pg/mL)	Kont.	0,041	0,001				
	Sevo. D	0,411	0,053	0,002170**			
	Izo. D	0,250	0,036				
	Fe-dex. D	0,252	0,045				
	Fe-dex. + Sevo. D	0,065	0,006		0,04394▪		
	Fe-dex. + Izo. D	0,123	0,033				

Tablica 19. nastavak

CITOKINI	Skupina <sup>D</sup>	X	SP	*P	•P	□P
IFN- $\gamma$ (pg/mL)	Kont.	0,107	0,007			
	Sevo. D	1,116	0,147	0,002653**		
	Izo. D	0,753	0,079	0,034326*		
	Fe-dex. D	0,353	0,079			
	Fe-dex. + Sevo. D	0,122	0,009		0,012122**	
	Fe-dex. + Izo. D	0,475	0,036			
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	Kont.	0,079	0,004			
	Sevo. D	0,519	0,049	0,011072*		
	Izo. D	0,386	0,067			
	Fe-dex. D	0,362	0,046			
	Fe-dex. + Sevo. D	0,084	0,007		0,026671**	
	Fe-dex. + Izo. D	0,156	0,028			
GM-CSF (pg/mL)	Kont.	0,037	0,004			
	Sevo. D	0,071	0,016			
	Izo. D	0,165	0,036			
	Fe-dex. D	0,039	0,007			
	Fe-dex. + Sevo. D	0,036	0,003			0,029028 <sup>□</sup>
	Fe-dex. + Izo. D	0,045	0,002			
RANTES	Kont.	1,718	0,073			
	Sevo. D	6,709	0,389	0,014503*		
	Izo. D	4,903	0,466			
	Fe-dex. D	1,585	0,224		0,017311**	
	Fe-dex. + Sevo. D	1,897	0,078			
	Fe-dex. + Izo. D	2,583	0,066			

<sup>a</sup>Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestheticima 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV  $\pm$  SP.

Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (<sup>•</sup>*p* < 0,05; <sup>••</sup>*p* < 0,01); \*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01); <sup>□</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu (<sup>□</sup>*p* < 0,05; <sup>□□</sup>*p* < 0,01); <sup>∇</sup>Statistički značajno u odnosu na skupinu obrađenu Fe-dex. + Sevo. (<sup>∇</sup>*p* < 0,05).

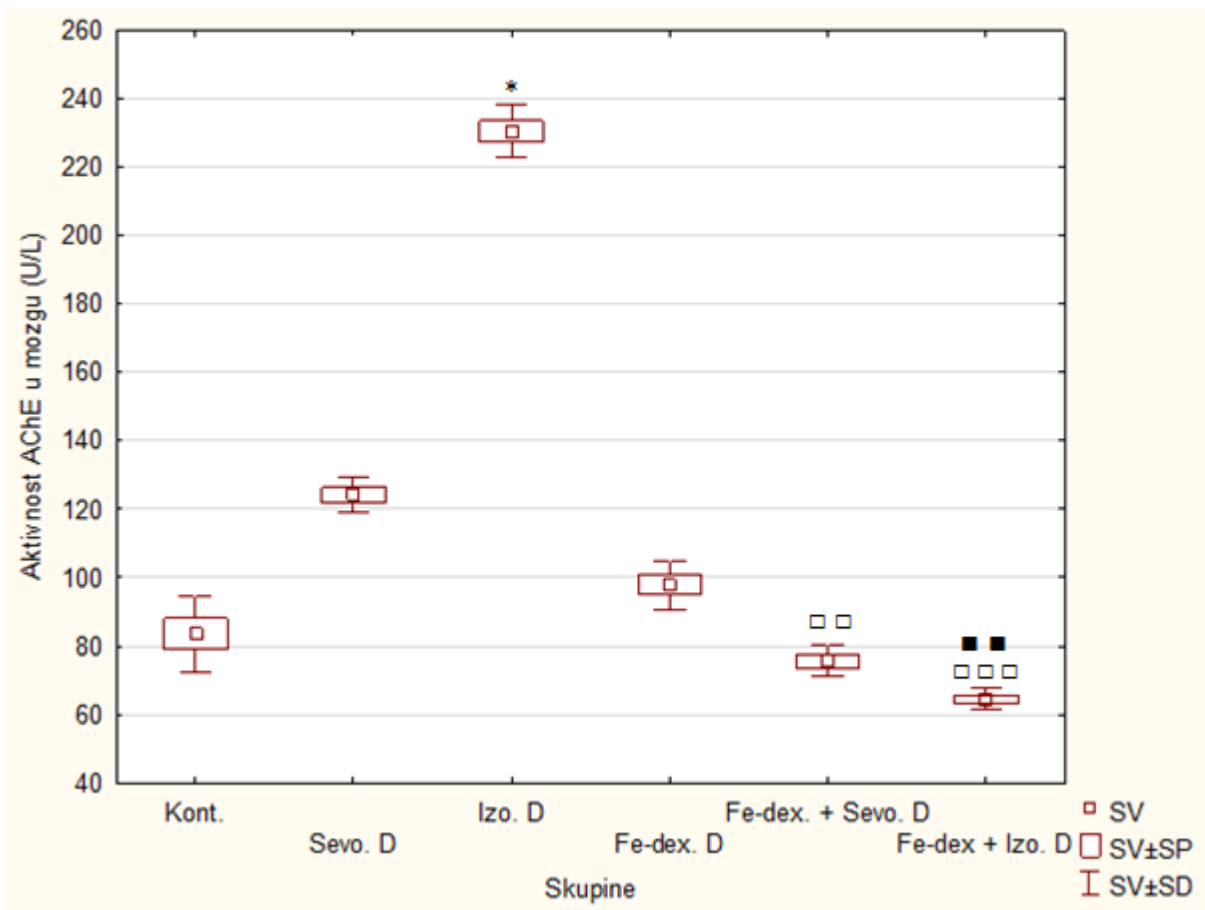
Kratice: *ip* – intraperitonealno, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, Kont. – kontrola, Sevo. – sevofluran, Izo. – izofluran, Fe-dex. – željezo dekstran, Fe-dex. + Sevo. – željezo dekstran i sevofluran, Fe-dex. + Izo. – željezo dekstran i izofluran.



## **4.20. Neurohistopatološke promjene u tkivu mozga nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana**

### **4.20.1. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na aktivnost acetilkolinesteraze (AChE) u tkivu mozga**

Analizom rezultata aktivnosti AChE (Slika 86) vidljiva je statistički značajno povišena aktivnost u odnosu na kontrolnu skupinu kod skupine Izo. ( $p = 0,03$ ). Nadalje, zapažena je statistički značajno snižena aktivnost kod Fe-dex. + Izo. skupine u odnosu na izofluran ( $p = 0,00001$ ) i sevofluran ( $p = 0,001$ ) skupine te kod skupine Fe-dex. + Sevo. u odnosu na izofluran skupinu ( $p = 0,002$ ).



**Slika 86.** Aktivnost AChE nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

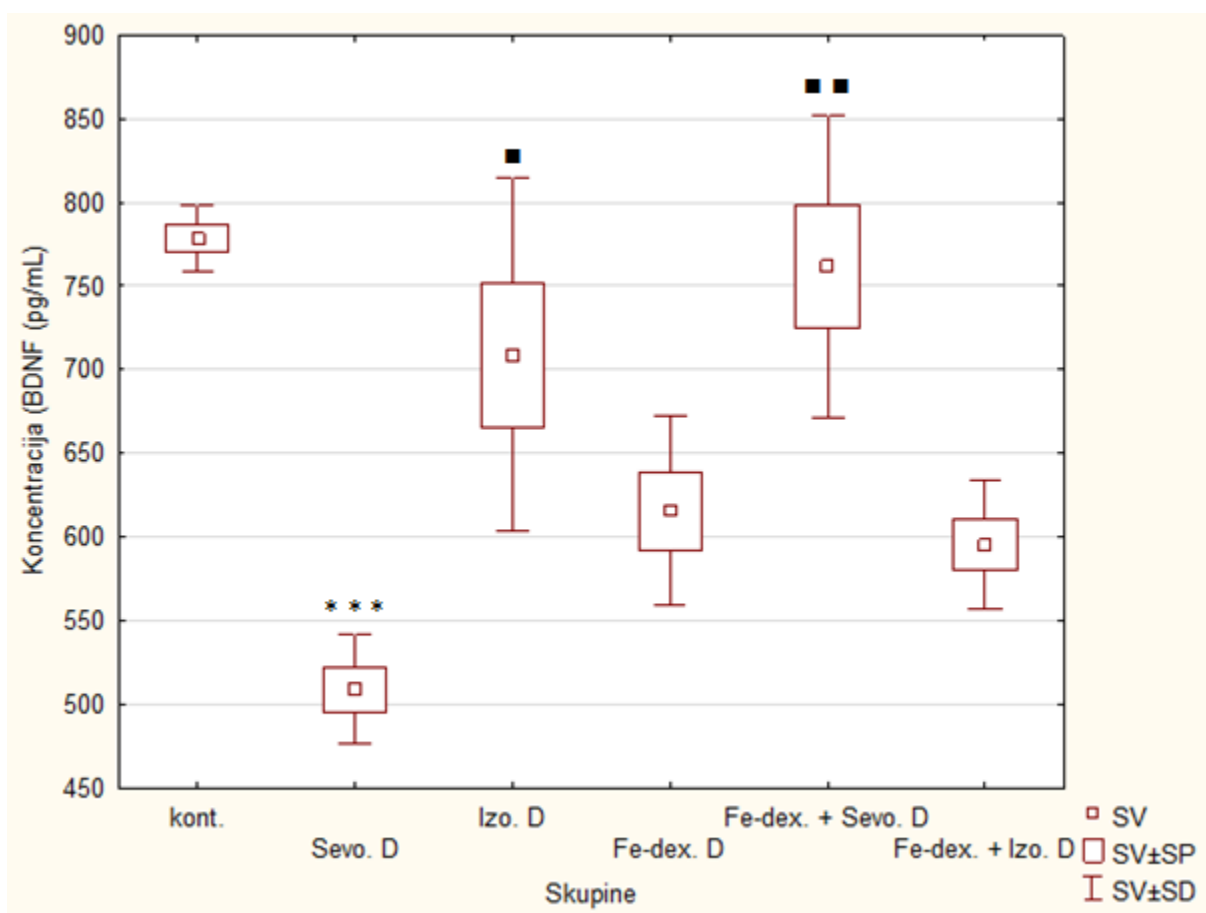
Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu, te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestetikima 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP.

□□ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu izofluranu (□□ $p < 0,01$ ; □□□ $p < 0,001$ ); ■ Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (■ $p < 0,01$ ); \* Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (\* $p < 0,05$ ).

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

#### 4.20.2. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na koncentracije moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF) u mozgu

Analizom rezultata koncentracije BDNF-a u uzorku homogenata tkiva mozga (Slika 87) zapažena je statistički značajno manja koncentracija kod skupine Sevo. u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p = 0,0002$ ). Praćenjem daljnjih rezultata vidljiva je statistički značajno manja koncentracija kod skupina Fe-dex. + Sevo. ( $p = 0,001$ ) i izofluran ( $p = 0,01$ ) u odnosu na sevofluran skupinu.



**Slika 87.** Koncentracija BDNF-a nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

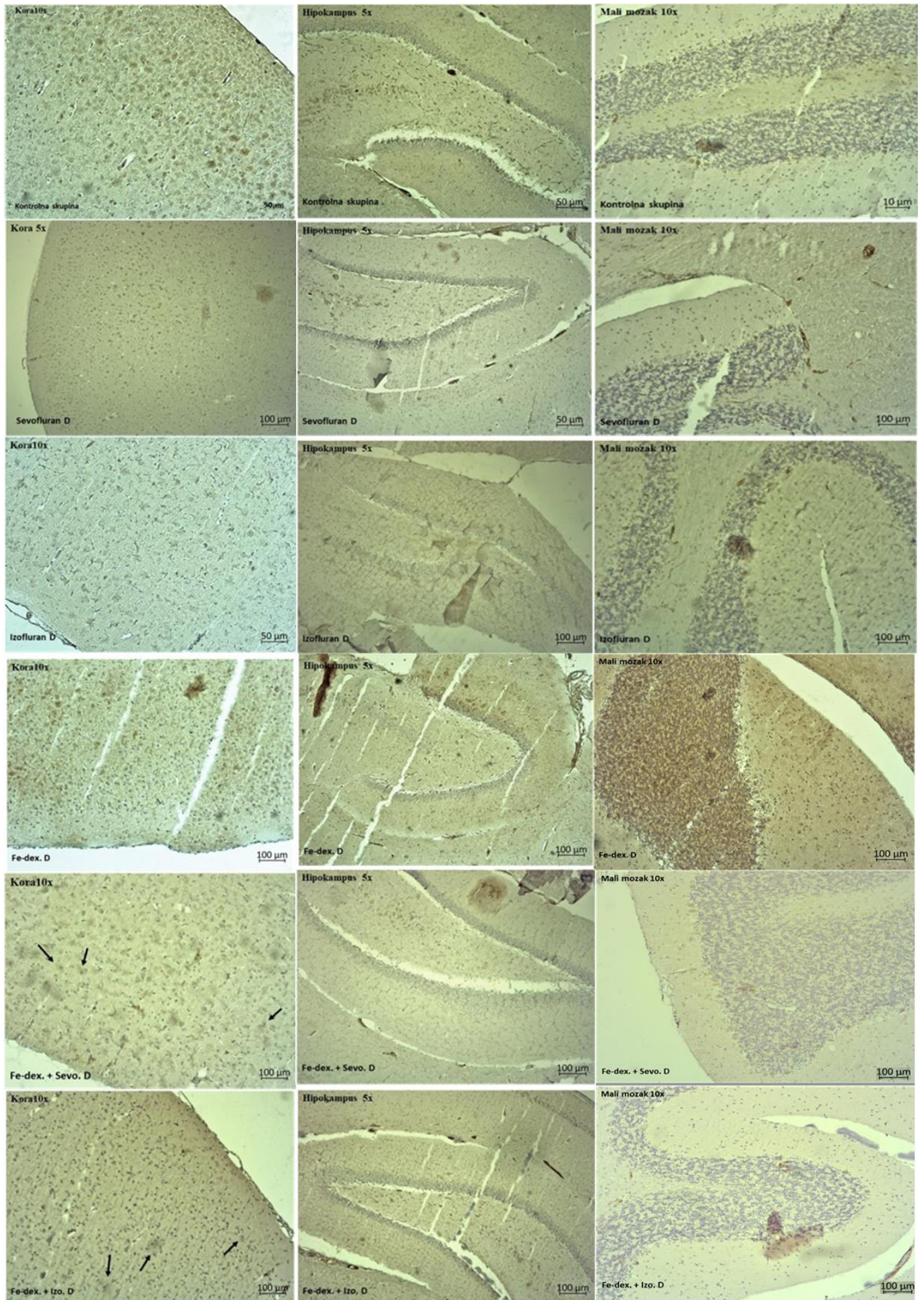
Štakori ( $N = 10$ ) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anestetikima 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SP$ .

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolnu skupinu ( $***p < 0,001$ ); ■Statistički značajno u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu (■  $p < 0,05$ ; ■■  $p < 0,01$ ).

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

### **4.20.3. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na neurohistopatološke promjene u mozgu**

Analizom histoloških preparata nakon imunohistokemijskog označavanja biljezima 4G8, AT8, PHF1 i MC1, neurodegenerativne promjene, odnosno prisutnost pozitivnog signala zabilježena je samo kod biljega 4G8, ostalo je bilo negativno. Imunohistokemijskim bojanjem analizirana je izraženost biljega 4G8 (Slika 88) u području kore velikog mozga (lat. *cortex*), hipokampalne formacije (lat. *hippocampus*) i maloga mozga (lat. *cerebellum*). Izraženost biljega zapažena je u kori velikog mozga kod skupina tretiranih Fe-dex.+ Sevo. i Fe-dex. + Izo. gdje je na više mjesta zabilježena prisutnost amiloida čije nakupljanje je u obliku oblačića. Nije zabilježeno prisustvo beta amiloidnih plakova karakterističnih za AD. U hipokampalnoj regiji i malom mozgu pozitivan signal nije zabilježen.



**Slika 88.** Izraženost biljega 4G8 u području kore, hipokampusa i malog mozga nakon kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana te njihove kombinacije.

Štakori (N = 10) su obrađeni *ip* željezo dekstranom (50 mg/kg), izloženi 2,4% sevofluranu i 1,3% izofluranu te njihovom kombinacijom. Životinje su izložene inhalacijskim anesticima 2 sata nakon *ip* injiciranja željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana. Prikazani su reprezentativni prerezi kontrole i tretiranih skupina vizualizirani imunohistokemijskim bojanjem. Pozitivan signal označen je crnom strelicom. Stanice su promatrane pod svjetlosnim mikroskopom Axiostar plus (Zeiss, Njemačka), i slikane kamerom Zeiss Axiocam 105 color uz pomoć programa Zen 2.3 (blue edition). Mjerilo na stvarnom povećanju objektiva 5x ili 10x (kora) je 50  $\mu$ m ili 100  $\mu$ m, na povećanju 5x (hipokampus) je 50  $\mu$ m ili 100  $\mu$ m te na povećanju 10x (mali mozak) je 10  $\mu$ m ili 100  $\mu$ m.

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

## **5. RASPRAVA**

## 5.1. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i aluminijeva klorida + D-galaktoze na organizam štakora

Dosadašnjim istraživanjima dokazano je da primjena inhalacijskih anestetika i teških metala može izazvati promjene povezane s nastankom Alzheimerove bolesti uz karakterističnu akumulaciju amiloidnog peptida  $\beta$  i Tau proteina i pojavu ostalih značajki bolesti poput: (a) nekontroliranog oksidativnog stresa (engl. *oxidative stress*, OS), (b) pojačane proupalne signalizacije, (c) promjene u urođenom imunom signaliziranju, (d) smanjenja sinaptičke signalizacije, (e) atrofije moždanih stanica, (f) progresivne promjene genske ekspresije, (g) progresivne demencije i gubitka kognitivnih funkcija (7, 13). Također, prekomjernim unosom teških metala dolazi do njihovog akumuliranja u moždanom tkivu pri čemu dolazi do narušavanja moždane, kognitivne funkcije kao i homeostaze svih organskih sustava (20, 21). Cilj ovog rada je istražiti moguću povezanost nazočnosti teških metala i inhalacijskih anestetika u nastanku AD te istražiti prooksidativnu, upalnu i neurotoksičnu ulogu teških metala u organizmu i spoznati da li oksidativni stres i upala prouzročena nazočnošću teških metala u prisustvu inhalacijskih anestetika vode do narušavanja funkcije neurona i neurodegeneracije te posljedično razvoja AD. Koristeći metode za procjenu toksičnosti te analizirajući upalne parametare, oksido-redukcijski status u moždanom tkivu i serumu istražili smo učinke inhalacijskih anestetika i teških metala nakon subakutne i kronične primjene na cjelokupan organizam. Vrijednost ovog istraživanja je izražena u nedostatku ranijih dostatnih literaturnih podataka vezanih za primjenu inhalacijskih anestetika i prisutnosti teških metala kao i njihov mogući neurodegenerativni učinak te ovaj rad predstavlja novi izvorni znanstveni doprinos u odnosu na radove u kojima je obično prikazana izolirana toksičnost samih anestetika ili teških metala bez njihovog združenog djelovanja.

Početni rezultati ovoga rada ukazuju da je do najvećih promjena u masi životinja došlo kod skupina izloženih sevofluranu ( $p < 0,01$ ) i izofluranu ( $p < 0,05$ ) gdje je zabilježen statistički značajan pad mase životinja (Slika 7a). Pad mase životinja posljedica je znatno bržeg metabolizma štakora u odnosu na čovjeka ali i pada metaboličke aktivnosti SŽS-a uslijed djelovanja anestetika kao i posljedica faze buđenja i oporavka te nedostatnog unosa hrane (331). Razlog pada mase štakora može biti smanjeno izlučivanje inzulina i iskorištavanje glukoze tijekom izlaganja hlapljivim anestheticima, zbog glukozom-uzrokovane inhibicije aktivnosti kalijevih kanala osjetljivih na ATP u  $\beta$ -stanicama gušterače. Izofluran uzrokuje respiratornu depresiju ovisnu o dozi kod štakora i miševa, što zauzvrat uzrokuje hiperkapniju, respiratornu



acidozu i laktacidozu (332, 333). Nadalje, literaturni podaci ukazuju na promjene plazmatske razine kortikosterona, glukoze, ukupnih masnih kiselina, mliječne kiseline i kalija tijekom izlaganja životinja izofluranu. Ovi podaci pokazuju da su normalni cirkadijalni ritmovi endokrine fiziologije i metabolizam značajno poremećeni anestezijom izofluranom. Izofluran smanjuje razinu melatonina za 70% što rezultira ometanjem normalne tjelesne homeostaze gotovo svih biokemijskih, neurobihevioralnih i fizioloških događaja. Razina melatonina mijenja regulaciju metaboličkih hormona, uključujući inzulin, leptin, glukozu, kolesterol, trigliceride i kortikosteron (334). Tako povećana koncentracija leptina obično uzrokuje smanjenje apetita kod miševa za čak 3 dana nakon anestezije što zasigurno utječe na metaboličke promjene i težinu životinja. Ranije istraživanje pokazalo je gubitak tjelesne mase miševa anesteziranih izofluranom te se dobiveni rezultati podudaraju s podacima iz navedenog istraživanja (335). Noviji literaturni podatci o masi životinja nakon izlaganja inhalacijskim anestheticima nisu zapaženi. Nasuprot tome, u skupini  $\text{AlCl}_3$  + D-gal nije došlo do pada mase životinja što pripisujemo D-galaktozi; šećeru koji doprinosi bržem dobivanju na masi, ali bez statističke značajnosti u odnosu na kontrolu. Izlaganje životinja  $\text{AlCl}_3$  + D-gal zajedno s sevofluranom i izofluranom ponovno ukazuje da D-galaktoza doprinosi porastu mase dok anestetici doprinose toksičnost i padu težine (Slika 7a).

Među hlapljivim anestheticima, izofluran je inhalacijski anestetik koji se često koristi u istraživanjima na životinjama, poznat po svojoj brznoj indukciji i oporavku te kontroli dubine anestezije. Obično se koristi za zahvate kratkog i srednjeg trajanja kod životinja. Za anesteziju štakora koristi se u koncentraciji od 2,5%–5% s dozom održavanja od 1%–3% (336). Nizak koeficijent topljivosti krv-plin (1,4) omogućava upotrebu manje količine izoflurana, zbog čega su indukcija i oporavak od anestezije brži. MAC izoflurana je 1,17 vol%. Preko 99% inhalirane doze izlučuje se nepromijenjeno izdisanjem. Oksidacijom se metabolizira približno 0,2% izoflurana, najsprije od fluoriranih inhalacijskih anestetika i to uglavnom u jetri putem citokroma P-450 2E1 i 3A. Glavni metaboliti su trifluorooctena kiselina i fluoridni ion, u približnom omjeru 2:1. Njihove koncentracije su takve da ne mogu izazvati organska oštećenja, a izlučuju se urinom. Izofluran ne uzrokuje aritmije, ne mijenja osjetljivost na kateholamine, ali izaziva jaču respiracijsku depresiju od halotana. Izofluran povećava oksidacijski stres nakon ishemijsko-reperfuzijskih stanja, s obzirom da izofluran uzrokuje kongestiju, restrikciju disanja i gušenje.

Hipoksija i toksičnost metabolita izoflurana vode razvoju neuroupale. Smanjena dostupnost dušikovog oksida (NO) u mozgu, značajan je čimbenik koji pridonosi povećanom

oštećenju krvožilja te posljedično oštećenju mozga (Slika 16) što potvrđuje povećana koncentracija feritina kao biljega upale u mozgu (Slika 24). Izofluran značajno povećava razinu lipidne peroksidacije (MDA) i stvaranje ROS-a (Slika 12). Povećani oksidacijski stres i proizvodnja visoko reaktivnih citotoksičnih hidroksilnih radikala ( $\text{HO}\bullet$ ) posredovana je željezom, koje katalizira interakciju superoksida ( $\text{O}_2\bullet^-$ ) i vodikovog peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) putem Fentonove ili Haber-Weissove reakcije. Povećani oksidacijski stres pridonosi neuroupali i povećanom nakupljanju željeza u moždanom tkivu što ukazuje na potencijalnu vezu između disregulacije feritina i neurodegenerativnih procesa karakterističnih za AD. Povećana razina željeza u mozgu bolesnika s AD-om povezana je s oksidacijskim stresom i neuroupalom uključenom u patogenezu AD-a pri čemu nakupljanje željeza u mozgu može pospješiti agregaciju  $\text{A}\beta$  amiloida i tau proteina (137). U prilog neuroupali govore rezultati analize proupalnih citokina gdje bi potencijalnu štetnu ulogu izazivanjem njihove ekspresije mogle imati aktivirane mikroglia stanice. Takva povezanost između mikroglia stanica i proupalnih citokina posebno se odnosi na interleukin  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$  i  $\text{TNF-}\alpha$  koji utječu na okolno moždano tkivo pri čemu imaju najizraženiji neurodegenerativni učinak.

Naši podaci ukazuju da subakutno izlaganje izofluranu povećava nakupljanje Fe, ali i visokotoksični metala, posebice aluminija ( $p < 0,01$ ) te neesencijalnih metala (Tablica 5 i Tablica 6). Povećanje visokotoksičnih metala izofluranom, posljedica je povećavanja toksičnosti i poticanja procesa upale kroz povećanje  $\text{IL-6}$  i RANTES kemokina (Tablica 7). Kemotaktička aktivnost RANTES citokina novači leukocite na mjesto upale nakupljanjem limfocita T, neutrofila, eozinofila i bazofila (337). Povećani broj neutrofila, pokazatelj je upale (Slika 11b). Nadalje, toksičnost i hipoksija utječu na smanjeni metabolizam i enzimsku aktivnost nakon primjene anestetika vodeći narušavanju procesa prijenosa i uklanjanja metala, dok povećani oksidativni stres može potaknuti pojačano oštećenje stanica svih tkiva uključujući mozak. Pojačani zaštitni mehanizmi mozga preko polarizacije makrofaga prema M2 fenotipu te sinteza arginina drže pod kontrolom aktivnost MMP-2 i MMP-9 sprječavajući patohistološke promjene moždanog tkiva i narušavanje AChE i BDNF-a (Slika 25 i Slika 26).

Posljedice hipoksije uzrokovane izofluranom vidljive su i u povećanju broja eritrocita (Slika 10), promijenjenoj morfologiji eritrocita i polikromaziji. Povećani broj eritrocita prati i povećana razina hemoglobina, hematokrita te smanjenje MCH, MCHC i RDW (Slika 10). Takvi hipoksični uvjeti i nedostatak kisika u krvi potiču sintezu eritropoetina ili hemopoetina, glikoproteinskog citokina, uglavnom u bubrezima i jetri kao odgovor na staničnu hipoksiju vodeći pojačanoj proizvodnji crvenih krvnih stanica (eritropoezi) u koštanoj srži. Prisutna

hipoksija smanjuje iskorištavanje ATP-a regulacijom translacije proteina i aktivnosti Na/K-ATPaze. Ovi enzimi ključni su proteini koji reguliraju staničnu zapreminu eritrocita; njihova inhibicija vodi pojačanoj hemolizi eritrocita (Tablica 3). Propadanje crvenih krvnih stanica te pojavnost visokog broja nezrelih eritrocita (povišeni retikulocitni indeks, polikromazija) posljedica su poremećaja aktivnosti Na/K-ATPaze. Hipoksija djelomično smanjuje proizvodnju ATP-a mijenjajući aktivnost transportnog lanca elektrona kroz aktivaciju transkripcijskog faktora i hipoksijom inducirano faktora 1 (engl. *hypoxia-inducible factor 1*, HIF 1) (338). Također je potvrđeno da izofluran može oštetiti enzimski i neenzimski sustav formirajući metalne komplekse temeljene na povećanju koncentracije fluorida (339).

Oštećenja jetre i bubrega praćena biokemijskim pokazateljima, posljedica su nakupljanja metabolita izoflurana, posebice fluoridnog iona i trifluoroacetata nastalog metabolizmom izoflurana u jetri preko jetrenih mikrosomalnih enzima citokrom P-450 2E1 i 3A sustava. Nadalje povećana razina glukoze i promjene elektrolita (Slika 9) u skladu su s podacima (340) koji pokazuju da anestezija prouzrokuje endokrine i metaboličke promjene stvarajući stres koji aktivira lučenje hormona hipotalamusa i hipofize i simpatičkog sustava te pojačava lučenje kataboličkih hormona kao što su kortizol i kateholamin, dok smanjuje oslobađanje anaboličkih hormona poput inzulina i testosterona. Tako produljeno trajanje anestezije izofluranom smanjuje koncentraciju glukagona što posljedično povećava razinu glukoze u krvi (341). Izofluran inhibira izlučivanje inzulina u štakora, ljudi i pasa, istodobno uzrokujući povećanje koncentracije glukoze ili intoleranciju na glukozu mijenjanjem normalnog metabolizma proteina, masnih kiselina i glukoze. Prema drugim autorima anestezija izofluranom uzrokuje oštećenje izlučivanja inzulina smanjenjem aktivnosti kalijevih kanala koji su ovisni o adenozin trifosfatu u  $\beta$  stanicama gušterače (342).

Uvod u anesteziju sa sevofluranom i oporavak su brži od izoflurana, a kontrola dubine anestezije i indukcija su laki. MAC je 2,05 vol %. Metabolizira se oko 5% udahnutog sevoflurana, uglavnom preko 2E1 odjeljka citokroma P-450 u jetri, a manji dio se defluorira u bubregu putem citokroma P-450. Glavni metaboliti sevoflurana, prisutni i u krvi i u urinu, su heksafluoroizopropanol (HFIP) i nefrotoksični anorganski fluorid. Međutim, koncentracija HFIP-a u krvi je mala zbog brze glukuronizacije i izlučivanja urinom. Međutim, pokazano je da povišena koncentracija metabolita HFIP-a može dovesti do depresije središnjeg živčanog sustava u miševa *in vivo*.

Subakutna primjena sevoflurana nije izazvala promjene u lipidnoj peroksidaciji moždanih stanica zahvaljujući povećanoj koncentraciji GSH (Slika 13). Povećana razina GSH

može biti i posljedica zaštite od NO koji može imati protektivne, toksične i regulatorne učinke ovisno o dozi i okolišnim uvjetima. Ulogu NO kao neurotransmitera u mozgu je vrlo važna gdje služi kao povratni glasnik i regulira otpuštanje glutamata dok visoke doze NO mogu biti neurotoksične i uništavati stanice mozga (Huntington-ova i Alzheimer-ova bolest). Čini se da sevofluran ne izaziva velike posljedice na mozak s obzirom na nepromijenjene razine upalnih citokina (Tablica 7), MMP-2, MMP-9 kao i razine feritina u mozgu (Slike 20, 21 i 24). Nadalje, povećana razina BDNF-a, važnog za normalnu funkciju centralnog i perifernog živčanog sustava sprječava odumiranje postojećih neurona te potiče neurogenezu i sinaptogenezu narušenu s povećanjem AChE (Slike 25 i 26).

Kao što je spomenuto, veći dio sevoflurana (5%), za razliku od izoflurana, prolazi metabolizam u jetri (341) putem više enzima iz obitelji CYP (CYP2A6, CYP2B6, CYP3A4, CYP2E1) (343). Biotransformacijom sevoflurana nastaju anorganski fluoridni ioni i heksofluoroizopropanol, no zbog brze glukuronizacije i izlučivanja urinom, toksična djelovanja nisu povezana uz nastale upale nakon zahvata (344). Spoj A, nastao iz fluoridnih iona, potencijalno može izazvati oštećenja bubrega, međutim klinički znakovi nefrotoksičnosti nisu zabilježeni na ljudima, a smatra se kako to ovisi o dozi i vremenu izloženosti anestetiku (341, 345). Naši rezultati (Slika 8) ukazuju da sevofluran uzrokuje manja oštećenja jetre i bubrega u odnosu na izofluran obzirom na enzimsku aktivnost ALT i ALP što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima (47). Bez obzira na prednosti sevoflurana u kliničkoj praksi uključujući vrlo nisku topljivost u krvi i tkivu te ugodan miris, njegovi reaktivni produkti mogu izravno izazvati stvaranje peroksinitrita i povećanje peroksida te dušikova oksida što potvrđuju i naši rezultati (Slika 16 i 17). Poznato je da su reaktivni kisikovi radikali glavni oksidansi koji reagiraju sa DNA, izazivajući različita oštećenja kao što je nastanak oksidiranih baza, abazičnih mjesta i/ili lomova lanca (346). Neki autori također pokazuju da fluorirani anestetici, uključujući sevofluran, mogu izravno dovesti do oštećenja DNA, i to najčešćom modifikacijom alkilacije purina. Dodatno, sevofluran može inducirati staničnu apoptozu (347). Povećana oštećenja DNA nakon izlaganja sevofluranu posljedica su genotoksičnosti, a ne toksičnosti stanica s obzirom na nepromijenjenu vijabilnost stanica (346, 347, 348). Prema tome genotoksičnost sevoflurana može biti izravna i/ili izazvana oksidacijskim metabolizmom. Oštećenje DNA zahvaća najprije krvne stanice, pa zatim tkiva poput jetre, bubrega i mozga (347, 348). Ovi podaci su u skladu s našim podacima gdje visoka razina RANTES kemokina (Tablica 7) i brza dioba stanica hematopoetskog sustava zasigurno povećava osjetljivost stanica krvi u doticaju s anestetikom. Nadalje, sevofluran može različito modulirati proupalnu aktivnost makrofaga gdje je primarni

mehanizam povezan s NF- $\kappa$ B i regulacijom proupalnih gena. Dok sevofluran suprimira ekspresiju proupalnih citokina, on pojačava ekspresiju inducibilne dušik oksid sintaze (iNOS) (Tablica 7, Slika 17). Naši rezultati su u skladu s rezultatima Gerbera i sur. (349) koji pokazuju da izlaganje sevofluranu vodi smanjenju ekspresije proupalnih citokina, dok pojačava bakteriocidnu aktivnost temeljenu na povećanju dušikovog oksida. Prema podacima Gerbera i sur. (349) sevofluran može interferirati s najmanje dva različita puta od kojih je jedan MAPK put u kojem sevofluran utječe na smanjenje ERK fosforilacije. Sažimajući dobivene podatke, sevofluran vodi povećanom oksidacijskom stresu i upali narušavajući periferna tkiva i biokemijske odrednice krvi preko povećane razine RANTES-a (Tablica 6), hepcidina (Slika 22) i NO-a (Slika 17). Biokemijske odrednice oštećenja jetre posljedica su imunoalergijskog odgovora na reaktivne metabolite kovalentno vezane na proteine jetre (350). Klinički podaci nisu pokazali da vinil eter (Komponenta A) ima mutageno ili karcinogeno djelovanje, ali može izazvati nefrotoksičnost u štakora. Osim toga, Eger i sur. (351) su pokazali da je raspadni proizvod vinil eter alkilirajući spoj koji povećava učestalost izmjena sestrinskih kromatida.

S druge strane  $AlCl_3$  + D-gal. ukazuju na povećanu relativnu masu mozga ukazujući na prisutnost neuroupale. Al potiče povećano stvaranje ROS-a i može potaknuti oksidativna oštećenja kroz više mehanizama. Vežanjem Al na negativno nabijene fosfolipide stanica mozga, koji sadrže polinezasićene masne kiseline, olakšava napad ROS-a poput  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  i  $OH^{\cdot}$  na njih. Al potiče lipidnu peroksidaciju uzrokovanu željezom i Fentonovom reakcijom povećava stvaranje ROS-a i  $Fe^{3+}$  (25). Posljedice Al na organizam ovise i o načinu unosa Al. Unos probavnim sustavom uzrokuje povećanje aktivnosti ksantin oksidaze (XO) i glutation peroksidaze (GPX), a potom smanjenje aktivnosti, što dovodi do nakupljanja toksičnih međumedijskih tvari poput vodikova peroksida i hidroksilnih radikala. Injiciranje Al u mozak štakora uzrokuje jači upalni odgovor, potiče povećano stvaranje ROS-a i može potaknuti oksidativna oštećenja kroz više mehanizama. Nadalje, potvrđeno je da D-galaktoza uzrokuje starenje mozga kod eksperimentalnih životinja, posebice njenim unosom kroz duže vrijeme. Starenje mozga karakterizira disfunkcija mitohondrija koju obilježava smanjena aktivnost respiratornog lanca enzima i produkcije ATP-a i povećana proizvodnja slobodnih radikala te mutacije u mDNA. D-galaktozom uzrokovano starenje mozga vodi upali, apoptozi te smanjenju količine BDNF-a. Posljedica navedenih učinaka je smanjenje kognitivnih funkcija (352).

Premda brojni literaturni podaci govore o aluminiju kao neurotoksinu, zanimljivo je da kratkotrajna primjena aluminija ne izaziva znatne promjene unutar moždanih stanica ukazujući na važnost krvnomoždane barijere. Naši podaci ukazuju da subakutna primjena aluminija može

povećati razinu željeza ( $p < 0,05$ ) (Tablica 5), međutim razina MDA je smanjena u odnosu na kontrolu (Slika 12), kao i SOD aktivnost (Slika 15). Povećana razina arginina (Arg) (Slika 18) očito vodi pojačanoj polarizaciji prema M2 fenotipu s obzirom da je razina NO u mozgu i serumu smanjena, ali bez statistički značajne razlike (Slika 16 i 17). Protektivni učinak je vidljiv i kroz nedostatak promjena u razini MMP-2 i MMP-9 (Slika 20 i 21) te povećanju razine feritina u serumu i mozgu (Slika 23 i 24).

Aluminij kao neurotoksin, nije esencijalan element i nije potreban za enzimske reakcije, ipak ukoliko se nađe u organizmu utječe na više od 200 biološki važnih reakcija i ima štetan utjecaj na mozak. Al utječe na sintezu neurotransmitera, sinaptičku transmisiju (inhibiranjem naponom reguliranih  $Ca^{2+}$  kanala i neurotransmiterskih receptora), fosforilaciju i defosforilaciju proteina, razaranje proteina, gensku ekspresiju i upalni odgovor. Naši rezultati subakutne primjene nisu pokazali promjene vezane za AChE (Slika 25) kao niti promjene u razini BDNF (Slika 26) ili razini upalnih citokina (Tablica 7). Sumirajući navedene podatke, jasno je da kratkotrajna primjena aluminijske soli nije dostatna za narušavanje krvnomoždane barijere te narušavanje funkcije mozga. Međutim, treba istaći da visoke doze Al mogu prijeći krvnomoždane barijeru (engl. *blood-brain barrier*, BBB) i nakupljati se u tkivima sisavaca, posebno u različitim regijama mozga te srcu, kostima, jetri i bubrezima (353).

Nadalje, kratkotrajna primjena aluminijske soli izaziva tek neznatne promjene u perifernom tkivu na što ukazuju biokemijski odrednice, posebice povećana razina BUN-a, PHOS-a (Slika 9), te neznatno veća razina ALP-a i smanjena ALT-a (Slika 8). Nadalje, povećani broj leukocita ukazuje da aluminij pridonosi procesu upale gdje je posebno povećan broj limfocita (Slika 11a i 11b). Od hematoloških parametara zapaženo je povećanje hemoglobina, MCV-a, MCH-a i MCHC-a što ukazuje na povećanu toksičnost aluminijske soli na eritrocite te njihovu hemolizu i pojačanu potrebu za sintezom hemoglobina (Slika 10).

Subkutana primjena  $AlCl_3$  + D.-gal. + Sevo. pokazuje prisutnost neuroupale kroz povećanje relativne mase mozga koju prati povećana razina proupalnih citokina uključujući IL-1 $\beta$ , INF- $\gamma$ , GM-CSF (Tablica 7), kao i povećanje MMP-2 i MMP-9 ( $p < 0,05$ ) (Slika 20 i 21) te povećanje AChE (Slika 25). Povećana aktivnost acetilkolinesteraze, enzima koji katalizira razgradnju neurotransmitera acetilkolina na acetyl i kolin, može ukazivati na prisutnost A $\beta$ . Brojna istraživanja ukazuju da A $\beta$  utječe na ekspresiju AChE. Točnije, povećanje AChE oko plakova direktna je posljedica nakupljanja A $\beta$ . AChE može doći u više oblika, u obliku tetramera (u najvećoj mjeri prisutan u zdravom mozgu) i u obliku dimera i monomera. Omjer ovih vrsta je značajno promijenjen u AD, gdje imamo manje tetramera, a više monomera.

Povećana prisutnost AChE monomera u blizini plakova igra ulogu u A $\beta$  fibrilogenezi i modulira amiloidni metabolizam vodeći nizu poremećaja u ponašanju uključujući kolinergičku disregulaciju (354). Acetilkinesteraza je važna u kontroli prijenosa signala acetilkolinom. Acetilkinolin je neurotransmiter važan i u centralnom i u perifernom živčanom sustavu. U mozgu acetilkolin mijenja ekscitabilnost neurona, utječe na sinaptički prijenos akcijskog potencijala, stvara sinaptičku plastičnost i koordinira aktivacijom grupa neurona. Na taj način mijenja stanje neuronske mreže u mozgu kako bi mogli odgovoriti na vanjske i unutarnje podražaje (355). Poremećaj u prijenosu akcijskog potencijala acetilkolinom, na što utječe i koncentracija i aktivnost acetilkolinesteraze, posljedica je problema s učenjem i pamćenjem, poremećajima vidljivim u oboljelih od AD. Zbog svoga pozitivnog naboja Al<sup>3+</sup> se veže s negativno nabijenim molekulama kao što su fosfati, karboksilati, i deprotonirana hidroksilna grupa. Iz tog razloga se veže na fosfatne grupe DNA i RNA utječući na ekspresiju gena važnih za normalnu funkciju mozga. Veže se i za fosfatne grupe ADP-a i ATP-a utječući na metabolizam. Inhibira brojne proteinske kinaze i fosfataze te enzime s Mg<sup>2+</sup> kofaktorom i procese koji uključuju brzu izmjenu Ca<sup>2+</sup>. Al<sup>3+</sup> se veže za metal vezujuće aminokiseline poput histidina, arginina, tirozina ili za fosforilirane aminokiseline te ih međusobno povezuje. Toksičnost povišene koncentracije Al<sup>3+</sup> posljedica je poremećaja u sintezi hemoglobina te perniciozne anemije (makrocitna), što potvrđuje povećanje razine MCV-a, i RDW-a te smanjenje ALT-a (Slika 9).

Zanimljivo je da subakutna primjena AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Sevo. nije izazvala znatne promjene u nakupljanju esencijalnih, visokotoksičnih ili neesencijalnih metala. Osim povećanja proupalnih citokina (IL-1 $\beta$ , INF- $\gamma$ , GM-CSF), ravnoteža u M1/M2 polarizaciji postignuta je povećanjem zaštitnih protuupalnih citokina u serumu kao što je IL-10 i IL-13 (Tablica 7) te povećanjem razine arginina ( $p < 0,01$ ), dok je razina NO značajno smanjena ( $p < 0,01$ ) (Slika 17). Arg 1 se često koristi kao biljeg M2 aktiviranih mikroglia-stanica. Arg 1 u najvećoj mjeri je izražen kod mikroglie, ali mogu ga proizvoditi i druge stanice, primjerice neutrofili. Arg 1+ mikroglia doprinosi razgradnji A $\beta$  plakova za vrijeme IL-1 $\beta$  neuropale. M1 mikroglia slabo fagocitira A $\beta$ ; dolazi do proždiranja (ingestije) A $\beta$ , ali nedovoljne razgradnje. Redukcija plakova je primijećena samo kad su bile prisutne Arg+ stanice. *In vivo* je primijećeno i da povećana razina Arg 1 i smanjena razina iNOS-a dovodi do povećane fagocitoze. Međutim, čini se da upalna i protuupalna svojstva mikroglia stanica nisu strogo ograničena samo na M1 ili M2 polarizirane stanice; umjesto toga, M1 i M2 mikroglia-stanice su samo na ekstremnim krajevima spektra mikroglialnih fenotipa (356), jer većina nedavnih dokaza pokazuje da je mješoviti fenotip M1/M2 realniji (357) na što upućuju i naši podaci (Slika 19).

Najveće promjene u subakutnoj primjeni vidljive su u skupini obrađenoj  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.} + \text{Izo.}$  Ova skupina pokazuje smanjenje relativne mase mozga ( $p < 0,01$ ) što se može objasniti promjenama u metabolizmu i toksičnosti izoflurana i aluminija kao i njihovih metabolita (Slika 7b). Toksičnosti pridonosi znatno nakupljanje Fe u odnosu na kontrolnu skupinu ( $137,61 \pm 6,62$  vs  $14,90 \pm 0,92$ ,  $p < 0,01$ ) (Tablica 5). Ove promjene prati i povećano nakupljanje esencijalnih antioksidacijskih elemenata Zn, Mn, Se, ključnih ko-faktorskih molekula antioksidacijskih enzima (Tablica 4). Ova skupina pokazuje i znatno nakupljanje visokotoksičnih metala As, Pb, Cd i Al te neesencijalnih elemenata kao Ba i Ni (Tablica 6). Čini se da ovi pokazatelji doprinose brzom propadanju moždanih stanica procesom ferroptoze te nemogućnosti opažanja promjena vezanih za lipidnu peroksidaciju i GSH (Slika 13) dok je razina SOD (Slika 15) povećana zbog nakupljanja Zn i Mn ukazujući na promjene u mitohondrijskoj aktivnosti. Podaci ukazuju na disfunkciju mitohondrija koju obilježava smanjena aktivnost respiratornog lanca enzima i produkcije ATP-a i povećana proizvodnja slobodnih radikala te mutacije u mDNA. Također treba istaći da ovu skupinu prati i polarizacija makrofaga i glija stanica što je vidljivo po povećanoj produkciji NO u mozgu (Slika 17) te neuroupali popraćenoj s gubitkom feritina u mozgu (Slika 24), ali povećanom razinom feritina ( $p < 0,001$ ) i hepcidina u serumu (Slike 23 i 22). Na povećanje upalnih odrednica i makrofagu M1 polarizaciju pokazuje i znatno povećana razina proupalnih Th1 citokina uključujući IL-1 $\beta$ , IL2, IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  i GM-CSF (Tablica 7). Mozak se dugi niz godina smatrao imunoprivilegiranim organom i stoga je bio uvriježen stav da imunosne stanice ulaze u mozak gotovo isključivo prilikom teških bolesti kao što su upale ili traume mozga i njegovih ovojnica. Danas znamo da imunosne stanice ne samo nadgledaju i utječu na mozak izvana, nego čak i ulaze u njega. Imunosni nadzor mozga važan je za održanje njegovih fizioloških funkcija, dok se slom imunosnog nadzora povezuje s brojnim neurodegenerativnim i drugim bolestima. S obzirom na važnost mozga, kao kontraučinak nakupljanju citokina u cilju zaštite moždanih stanica, pojavljuje se i povećana koncentracija IL-4, IL-10 i IL-13 te povećanje razine BDNF-a (Tablica 7, Slika 26). Njihova aktivnost očito sprječava povećanje MMP-2 i MMP-9 kao neuroprotektivni učinak na što pokazuje i povećanje Arg u serumu (Slika 18). Povećana oštećenja uvijek prati i M2 polarizacija vezana za reparativne učinke nastalih oštećenja. Tako pojavnost M2 aktiviranih mikroglija stanica induciranih s IL-4 ima niži pH u lizosomima, što im vjerojatno daje veći proteolitički kapacitet (358). Nadalje, najveće promjene u biokemijskim parametrima zapažene su u skupini obrađenoj  $\text{AlCl}_3 + \text{D-gal.} + \text{Izo.}$  gdje je vidljivo povećanje AMY i  $\text{Na}^+$ , te smanjenje ALB, TP, CRE i  $\text{K}^+$  (Slike 8 i 9). Povećana razina AMY ukazuje na oštećenje ili upalu gušterače, dok drugi parametri ukazuju na narušavanje razina elektrolita i promjene u funkciji bubrega i jetre.



Ioni aluminijske djeluju kao kemijski stresor potičući oslobađanje norepinefrina i kortizola čija povećana razina može povećati krvni tlak (149). Također, ova skupina izaziva najveće promjene u DKS (Slika 11b) što ukazuje na upalu, toksičnost i povećanu razinu oksidacijskog stresa, oštećenje bubrega i jetre. Analiza DKS-a pokazuje znatno povećanje neutrofila te smanjenje limfocita ukazujući na povećanu osjetljivost i smrt limfocita tijekom hipoksije.

## **5.2. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i aluminijske klorida + D-galaktoze na organizam štakora**

Aluminij je teški metal koji se u velikim koncentracijama nalazi u zemljinoj kori i široko se koristi u industriji i različitim proizvodima, uključujući posuđe, limenke, foliju kao i kozmetičkim proizvodima. Unatoč njegovoj prisutnosti, aluminij nije esencijalan za život, a prekomjerno izlaganje može dovesti do toksičnosti, predstavljajući rizike za ljudsko zdravlje. Trovanje aluminijem može utjecati na sastavnice krvi, mišićno-koštani sustav, bubrege, jetru te respiratorni i živčani sustav, a opseg trovanja može se dijagnosticirati analizom aluminijskih spojeva u krvi, urinu, kosi, noktima i znoju (143). On se natječe i zamjenjuje esencijalne metale poput željeza, kalcija i magnezija, remeteći funkcije stanica. Aluminij se može vezati za enzime i proteine, mijenjajući njihovu strukturu i funkciju. Može uzrokovati oksidativni stres u tkivu mozga remeteći ravnotežu oksidansa i antioksidansa te ometati normalnu funkciju mitohondrija (359). Aluminij može ubrzati i potencirati nastanak oštećenja živčanog sustava te se smatra jednim od čimbenika koji pridonose oksidativnom stresu i stvaranju ROS-a. Neurotoksičnost, koja dovodi do genomske nestabilnosti i stanične smrti neurona, uzrokovana je na nekoliko načina: (a) inhibicijom enzima za popravak DNA; (b) povećanjem proizvodnje ROS-a; najvažniji ROS elementi koji djeluju u neurodegeneraciji su superoksidni anionski radikal ( $O_2^{\bullet-}$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) i visoko reaktivni hidroksilni radikal ( $OH^{\bullet}$ ); (c) smanjenje aktivnosti antioksidativnih enzima; (d) mijenjanje NF- $\kappa$ B, p53 i JNK putova; (e) vezanjem na DNA (28). Prema literaturnim podacima intraperitonealna injekcija aluminijskih soli u štakora pokazuje visoku razinu stvaranja ROS-a u kortikalnom tkivu (25). Nadalje, u stanicama glijalnog podrijetla aluminij je uzrokovao povećanje stope proizvodnje ROS-a, smanjenje glutationa i aktivnost mitohondrijske dehidrogenaze, dok stanice neuronskog podrijetla nisu reagirale na isti tretman (360).

Toksičnost jest odrednica koja se najbolje iskazuje gubitkom težine, gubitkom apetita, mučninom i usporavanjem rasta. Naši rezultati kronične primjene inhalacijskih anestetika potvrđuju toksičan učinak anestetika i statistički značajan gubitak tjelesne mase u skupini izloženoj sevofluranu i skupini obrađenoj  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.} + \text{Izo.}$  u odnosu na skupinu obrađenu  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.}$  ( $p < 0,01$ ) i kontrolnu skupinu ( $p < 0,05$ ) (Slika 27a). Navedeni razlozi pada mase nakon subaktne primjene dodatno su potvrđeni i u kroničnoj primjeni ukazujući da inhalacijski anestetici izazivaju ozbiljne promjene na metaboličke aktivnosti SŽS-a, cirkadijalni ritam, endokrinu fiziologiju i metabolizam. Prema Orliaguet i suradnicima, vrijednost MAC-a kod odraslih štakora (10-12 tjedana) za sevofluran iznosi 1,97% (1,84-2,10%), a za izofluran 1,12% (1,07-1,18%) (361). Vrijednost MAC-a (2,4%) koja je korištena u našem istraživanju bila je puno veća što je utjecalo na dobivene rezultate. Također, gubitak može biti i zbog smanjenog unosa hrane tijekom anestezije i faze oporavka nakon anestezije (331, 362). Dodatno, stres zbog konstantnog, dugotrajnog, tretiranja životinja svaki drugi dan kroz ukupno 28 dana također je važan čimbenik. Nadalje, obrada štakora s  $\text{AlCl}_3 + \text{D.-gal.}$  vodi porastu mase za što je odgovorna D-galaktoza (Slika 27a).

Inhalacijski anestetici nisu doveli do značajnih promjena u relativnoj masi mozga iako je vidljiv manji pad mase mozga (Slika 27b). Zasiurno, porast visokotoksičnih metala posljedično vodi propadanju stanica mozga potvrđujući da je mozak mjesto nakupljanja visokotoksičnih metala. Zanimljivo je da izofluran vodi blagom porastu Fe dok sevofluran smanjuje razinu (Tablica 9). Zuo i suradnici pokazuju da anestezija sevofluranom tijekom trudnoće kod miševa izaziva kognitivno oštećenje u potomstvu preko nedostatka željeza i inhibicijom mijelogeneze (363). Zanimljivo je da su adaptacijski i regulatorni mehanizmi mozga vrlo snažni s obzirom da nisu zapažene promjene biljega oksidacijskog stresa, razina NO je bila smanjena u mozgu (Slika 36) i serumu (Slika 37) kao i razina hepcidina (Slika 42) i feritina (Slika 43) dok je aktivnost arginaze (Slika 38) znatno povećana. Čini se da pojačana i brza fagocitoza oštećenih stanica usporava razvoj upale, odnosno da je apoptoza mehanizam smrti stanica. Podaci su u skladu s istraživanjem koje pokazuje da sevofluran može reducirati oksidacijski stres ali ne i spriječiti apoptozu stanica (364). Apoptoza kao mehanizam smrti jasno je potvrđena kod postnatalnih miševa gdje je neokorteks najviše pogođeno područje, a slijede ga strijatum i metencefalon kao i umjereno oštećenje hipokampusa. Histološka karakterizacija u kortikalnim rezovima utvrdila je da su postmitotski neuroni najpogođeniji tip stanica, a slijede ih inter- i intrakortikalni gradijenti s maksimalnom apoptozom u površinskim slojevima posterodorzalnog korteksa. Identifikacija neokortikalnih gradijenata u skladu je s mehanizmom

koji ovisi o zrelosti. Gubitak neurona apoptozom nakon izlaganja mozga u razvoju sevofluranu opisan je za sve uobičajeno korištene anestetike, uključujući propofol, druge hlapljive anestetike (izofluran, desfluran), ketamin, benzodiazepine. Nadalje, ova povećana apoptoza povezana je s funkcionalnim abnormalnostima, uključujući dugotrajna kognitivna i bihevioralna oštećenja u modelima glodavaca (365), kao i kod primata koji nisu ljudi sa sličnim nalazima koji su ponovljeni (366). Iako je neuroapoptoza normalan dio razvoja sisavaca, ovi opsežni eksperimentalni podaci podupiru patološku prirodu ovog gubitka stanica. Međutim, ostaje neizvjesno kako se ti rezultati mogu prenijeti na ljude. Podaci iz ispitivanja na ljudima, od kojih je velika većina retrospektivna i predstavljaju brojne zbunjujuće čimbenike povezane s bolesnikovim komorbiditetima, trajanjem i vrstom operacije te okolišnim čimbenicima, su mješoviti, a neki od njih pokazuju neurorazvojne poremećaje u djece izložene općoj anesteziji u djetinjstvu, dok drugi nisu našli povezanost (367). Činjenica da se događaju promjene nakon kroničnog izlaganja sevofluranu kod odraslih štakora potvrđuje povećana aktivnost MMP-9 (Slika 41) u odnosu na kontrolu ( $p < 0,05$ ), povećana razina AChE (Slika 45) i smanjena razina BDNF-a (Slika 46). Sevofluran tijekom kronične primjene pokazuje znatno veću promjenu u razinu citokina u serumu od izoflurana. Sevofluran povećava razinu IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  te RANTES kemokine (Tablica 11). Međutim, povećana je i razina IL-10 i IL-13 koji imaju protuupalni učinak. Sažimajući navedeno, očito se radi o M2b fenotipu makrofagnih stanica koje karakterizira velika količina arginaze, IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF- $\alpha$  te mala količina IL-12. Izofluran pokazuje povećanu razinu IL-1 $\beta$ , IL-12, INF- $\gamma$  te IL-13. Prisutnost ovih citokina ide prema M1 polarizaciji što pokazuje i statistički značajan porast AChE ( $p < 0,05$ ) dok je koncentracija BDNF-a smanjena (Slike 45 i 46). Ovi podaci ukazuju da izofluran izaziva veća oštećenja stanica mozga od sevoflurana. Slične podatke potvrđuje istraživanje Liang i sur. (368) koji pokazuje da inhalacijski anestetici, posebice izofluran, potiču apoptozu stanica i neurodegeneraciju u mozgu u razvoju putem poremećaja unutarstanične homeostaze kalcija, posebice izazivanjem prekomjernog oslobađanja kalcija iz endoplazmatskog retikuluma prekomjernom aktivacijom inozitol 1,4,5-trisfosfatnih receptora (InsP3R). Također, navedeno istraživanje ističe da izofluran, ali ne i sevofluran, značajno povećava neurodegenerativni biomarker S100 $\beta$  u krvi. Liječenje izofluranom značajno je povećalo apoptozu na koju ukazuje aktivacija kaspaze-3 i povišenje polimeraze (ADP-riboza) u različitim regijama mozga. Izloženost sevofluranu imala je tendenciju povećanja apoptoze u područjima hipokampusa i korteksa, ali znatno manje od izoflurana. Ni izofluran, ni sevofluran, nisu značajno promijenili razine proteina gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze, beta-mjesta

amiloidnog beta prekursorskog enzima za cijepanje proteina i regulatornih proteina staničnog ciklusa (CDK4, ciklin D1). Također, izofluran i sevofluran nisu značajno promijenili pamćenje i sposobnost učenja. Tijekom našeg istraživanja nismo zapazili promjene u ponašanju životinja kao niti značajne histopatološke promjene nakon imunohistokemijskog označavanja biljezima AT8, PHF1 i MC1 na mozgu dok su analiziranjem izraženost biljega 4G8 (Slika 47) u području kore velikog mozga (lat. *cortex*) i malog mozga (lat. *cerebellum*) zabilježeni imunohistokemijski signali. Prosječna izraženost biljega je veća u području kore velikoga mozga u odnosu na mali mozak. U kori velikog mozga kod skupine tretirane aluminijskim kloridom + D-galaktozom + sevofluranom na više mjesta zabilježena je akutna proizvodnja amiloida čije nakupljanje je vidljivo u citoplazmi stanica, no nije zabilježeno prisustvo beta amiloidnih plakova. Nadalje, u malom mozgu skupine tretirane aluminijskim kloridom + D-galaktozom + izofluranom zabilježena je prisutnost amiloida, čije nakupljanje je vidljivo u presjecima krvnih žila, kao i u području kore velikog mozga ali nije zabilježeno prisustvo beta amiloidnih plakova. U hipokampalnoj regiji koja je također analizirana, pozitivan signal nije zabilježen.

### **5.3. Učinak subakutne primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na organizam štakora**

Željezo (Fe) nije samo bitan mikronutrijent, već i bio-katalizator ključnih oksidacijsko-redukcijskih reakcija, svojstva koje pogoduje stvaranju staničnih reaktivnih radikala kisika u prisutnosti prekomjerne razine prijelaznog metala. Željezo djeluje kao prooksidans, uključeno je u proizvodnju ROS-a putem Fentonovih i Haber-Weissovih reakcija. Slobodni ili slabo vezani željezni ion [Fe(II)] reagira u Fenton reakciji s vodikovim peroksidom, stvarajući visoko reaktivne hidroksilne ione. Željezni ion [Fe(III)] nastao u ovoj reakciji može dalje reagirati sa superoksidnim anionom u Haber-Weissovoj reakciji koja reciklira željezo u željezni oblik. Toksični učinci slobodnog željeza proizlaze iz ovih biokatalitičkih svojstava; prekomjerna količina raspoloživog metala povećava toksičnost. Nastanak hidroksilnih radikala u Fentonovoj reakciji može uzrokovati oštećenje DNA i inicirati peroksidacija lipida. Osim toga, proces peroksidacije lipida katalizira željezo i rezultira stvaranjem peroksilnih radikala (ROO•) (74). Nadalje, procesom oksidacije dolazi do propadanja biomolekula i gubitka njihovih funkcija (369). Željezo je ključna sastavnica mnogih proteina bitnih za funkciju mozga, uključujući citokrom a, b i c, citokrom oksidazu, feritin, akonitazu, citokrom P450, tirozin te triptofan

hidroksilazu koja katalizira početak sinteze dopamina i serotonina i komplekse željezo-sumpor u mitohondrijskom lancu transporta elektrona. Također je kofaktor za neke enzime uključene u sintezu DNA. U mozgu željezo igra važnu ulogu u proizvodnji mijelina, metabolizmu monoaminskih transmitera i sintezi GABA-a. Kod oštećenja moždanog tkiva dolazi do oslobađanja željeza koje sudjeluje u reakcijama nastanka OH• radikala iz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lipidne peroksidacije i autooksidacije neurotransmitera pri čemu nastaju epileptična izbijanja, deplecija dopamina i smrt neuralnih stanica šta je dokazano injiciranjem željeznih soli direktno u mozak. Oslobođeno željezo u mozgu dugo perzistira jer cerebrospinalni likvor koji okružuje mozak ima slabu sposobnost vezanja željeza (370, 371). Povećani oksidacijski stres posljedično izaziva upalu i makrofagnu polarizaciju gdje je hepcidin ključni regulator narušavanja homeostaze željeza i njegove funkcije. Hepcidin također djeluje na ekspresiju feroportina u makrofagima djelujući na makrofagnu polarizaciju prema fenotipu M1. Tkivo mozga je posebice osjetljivo na ROS zbog smanjene razine antioksidansa, većeg udjela polinezasićenih masnih kiselina u staničnoj membrani neurona, visoke metaboličke aktivnosti i visoke razine željeza. Do neuroupalnih procesa dovodi povećana razina ROS-a koja potiče transkripciju proupalnih gena i otpuštanje citokina, poput interleukina-1 i interleukina-6, TNF- $\alpha$  i kemokina (372). Do gubitka neurona i autoimune osjetljivosti dovodi kronična upala. Upalna reakcija aktivira mikroglia stanice i astrocite, što dovodi do stvaranja dodatnih količina ROS-a te je to glavni uzrok nastanka kroničnog oksidativnog stresa. Disregulacija homeostaze željeza u mozgu ključni je čimbenik za rane neuropatološke događaje u AD, uključujući oksidacijski stres, upalne procese, amiloidno taloženje, tau fosforilaciju i neuronalni regulacijski neuspjeh u staničnom ciklusu te apoptozu (74). S druge strane, akumulacija beta-amiloida s željezom utvrđena je kao izravni izvor oksidacijskog stresa kod AD (371).

Upala i oksidativni stres zajedno dovode do stvaranja A $\beta$  amiloida koji dodatno mogu biti povećani dugotrajnim izlaganjem inhalacijskim anestetima. Njihov združeni učinak može voditi ubrzanom razvoju strukturnih i funkcionalnih neurodegenerativnih promjena i razvoja AD kroz povećanje OS-a, upale te narušavanju makrofagne polarizacije i hepcidin-feroportin osi.

Nedostatnost podataka o utjecaju inhalacijskih anestetika tijekom prekomjerne prisutnosti Fe, ključnog metala u brojnim fiziološkim i patološkim procesima, na promjene koncentracije esencijalnih i teških metala u tkivu mozga, potakla nas je na ovo istraživanje. Temeljem navedenog, cilj jest bio istražiti kako kratkotrajna i dugotrajna primjena inhalacijskih anestetika utječe na nakupljanje željeza u mozgu štakora nakon eksperimentalnog

preopterećenja željezom, kao i njegov utjecaj na koncentraciju esencijalnih i toksičnih metala u tkivu mozga. Dodatni cilj jest bio utvrditi kako preopterećenje željezom u kombinaciji s inhalacijskim anestheticima utječe na oksidacijski stres, upalu, razinu hepcidin-feritina, aktivaciju makrofaga i MMP-aznu aktivnost te neurodegenerativne značajke mozga, posebice akumulaciju amiloidnog peptida  $\beta$  i Tau proteina te na promjene u razini acetilkolinesteraze (AChE) i moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF-a) u tkivu mozga.

Toksičnost inhalacijski anestetika je opisana u poglavljima tijekom subakutne i kronične primjene Al (vidi poglavlja 5.1 i 5.2). Ovdje ćemo istaknuti toksičnost Fe samog i/ili u kombinaciji s inhalacijskim anestheticima. U svim pokusnim skupinama vidljiv je pad mase štakora u odnosu na kontrolnu skupinu, posebice kod primjene Fe-dex. ( $p < 0,01$ ) te u kombinaciji s izofluranom ( $p < 0,05$ ), dok je pad mase u skupni Fe-dex. + Sevo. bez statističke značajnosti (Slika 48a).

Fe-dex. izaziva porast relativne mase mozga ukazujući na prisutnost neuropale i oksidacijskog stresa (Slika 48b). Znatno povećana razina GSH (Slika 54) jest pokazatelj prisutne toksičnosti zbog nakupljanja Fe ( $p < 0,05$ ), Al ( $p < 0,01$ ), Ba ( $p < 0,05$ ) te Pb u mozgu (Tablice 13 i 14). Povećanje visokotoksičnih metala prati i povećanje ključnih antioksidacijskih elemenata (Zn, Cu, Se) te statistički značajan porast Cr (Tablica 13), potrebnih za sintezu antioksidacijskih enzima. Povećanje Cr, vjerojatno je posljedica potrebe mozga za dodatnom energijom zbog pojačane metaboličke aktivnosti. Točnije, krom pomaže u pretvaranju glukoze u energiju smanjujući inzulinsku rezistenciju, koja je prekursor dijabetesa. Neaktivnost, pretilost i inzulinska rezistencija su značajni rizični čimbenici za razvoj i pogoršanje neuropatoloških obilježja AD. Vježbanje smanjuje stvaranje  $\beta$ -amiloida i rizik od AD, poboljšava protok krvi u mozgu, povećava hipokampalni volumen i poboljšava neurogenezu. Međutim, enzimska aktivnost SOD (Slika 55) i CAT (Slika 56) je bila niska.

Nadalje, razina NO u mozgu i serumu je smanjena (Slike 57 i 58) kao i aktivnost MMP-2 i -9 (Slike 61 i 62) dok je aktivnost arginaze (Slika 59) i feritina u serumu (Slika 64) povećana ( $p < 0,01$ ) što ukazuje na zaštitni mehanizam protiv oksidacijskog stresa. Prema ranijem istraživanju serumski feritin je važni upalni biljeg oštećenih stanica usko povezan sa razinom hidroksilnog radikala (OS) i ujedno je pokazatelj upalnih i degenerativnih bolesti (373). Interleukin 6 (IL-6) je jedini povećani citokin u odnosu na kontrolu ( $p < 0,01$ ) nakon izlaganja Fe-dex. (Tablica 14). Međutim IL-6 djeluje i kao proupalni citokin i kao protuupalni miokin. S obzirom na nisku razinu MMP-a kao i visoku razinu arginina (Slike 59-62) te odnos IL-10/IL-12, ključnih citokina u makrofagnoj polarizaciji; jasno je da obrada s Fe-dex. ide prema

polarizaciji u M2 fenotip (odnos između Fe-dex. i kontrole je 5,57 vs 2,40) (Tablica 15). Podaci su u skladu s istraživanjem Agoro i sur. (374) gdje intraperitonealno injiciranje željezo dekstrana u uvjetima upale inducirane lipopolisaharidima (LPS) u miševa može izazvati protuupalni učinak. Navedeni radovi jasno ukazuju da okolišni uvjeti utječu na makrofagnu heterogenost i plastičnost. Ovaj protuupalni učinak posljedično je uzrok i smanjene aktivnosti AChE i BDNF-a (Slike 66 i 67).

Ovi podaci su u skladu s hematopoeetskim i biokemijskim odrednicama gdje nisu zapažene značajne promjene u odnosu na kontrolu osim hemolize eritrocita (% hemolize na 0,5% NaCl, 16,06% vs 3,51%) (Tablica 12).

Fe-dex. + Sevo. skupina ne pokazuje promjenu relativne mase mozga (Slika 48b) ali je nakupljanje Pb ( $p < 0,01$ ) i Al ( $p < 0,05$ ) vidljivo u mozgu kao i povećanje Zn ( $p < 0,05$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablice 13 i 14). Aktivnost GSH i CAT su povećane kao odgovor na izazvanu toksičnost i regulaciju oksidacijskog stresa (Slike 54 i 56). Koncentracija NO je povećana u mozgu i serumu (Slike 57 i 58) kao i aktivnost arginaze u serumu (Slika 59). Zanimljivo je da je koncentracija MMP-9 povećana u mozgu ( $p < 0,05$ ) (Slika 62) dok je razina feritina povećana u serumu (Slika 64), a razina hepcidina nepromijenjena (Slika 63). Povišene razine feritina služe kao zaštitni mehanizam protiv štetnih učinaka slobodnog željeza, pomažući pohraniti i odvojiti višak željeza u netoksičnom obliku (373). Da se radi o pojačanoj upali govori povećana razina IFN- $\gamma$  ( $p < 0,05$ ) i RANTES kemokina ( $p < 0,01$ ) kao i IL-13 ( $p < 0,05$ ) u kontroli regulacije upale (Tablica 15). IFN- $\gamma$  je ključni citokin koji potiče aktivnost makrofaga i njihovu polarizaciju prema M1 fenotipu ali i proces upale kroz ekspresiju MHC I i II molekula na makrofagima kao antigen predočnim stanicama. Skupina obrađena kombinacijom Fe-dex. + Sevo. ne pokazuje očekivano povišene razine proupalnih citokina (Tablica 15), što potvrđuje da u promijenjenim uvjetima prisutnost sevoflurana može potaknuti antiupalni odgovor što je u skladu s ranijim istraživanjem (349). Autori sugeriraju na višestruke puteve regulacije sevoflurana i njegovo protuupalno djelovanje u uvjetima izazvane upale. U uvjetima upale izazvane s bakterijom *Escherichia coli* sevofluran može inhibirati NF- $\kappa$ B, ali preko drugog signalnog puta može aktivirati izravno povećanje NO te pospješiti fagocitozu i baktericidno svojstvo peritonealnih makrofaga (349). Nadalje, snižena razina MMP-2 u kombinaciji Fe-dex. i inhalacijskih anestetika (Slika 61) može se djelomično protumačiti protuupalnim učinkom anestetika, ali i imunosupresivnim učinkom teških metala (375, 376, 377). Sumirajući navedeno, navedeni uvjeti nisu izazvali promjene u aktivnosti AChE i BDNF (Slike 66 i 67), niti histopatološke promjene.

U obradi štakora s Fe-dex. + Sevo. nisu zapažene promjene u biokemijskim odrednicama osim pada ALT u odnosu na kontrolu ( $p < 0,05$ ) (Slika 49) te porasta broja leukocita (Slika 52a) i neznatno povećanje broja eritrocita (Slika 51). Hemoliza eritrocita je bila povećana u odnosu na kontrolu (% hemolize na 0,5% NaCl, 29,66% vs 3,51%) (Tablica 12).

Čini se da razina feritina korelira s promjenama u morfologiji eritrocita, skladištenju željeza i hematološkim promjenama (378). Toksičnost, prisutnost upale i oksidativni stres povezani su s promjenama u morfologiji eritrocita kroz oksidaciju membranskih i citoskeletnih proteina. Oksidativni stres mijenja strukturu i funkciju membrane, što dovodi do povećanja osmotske lomljivosti membrane eritrocita i smanjenja fluidnosti stanice, a osmotska rezistencija eritrocita izvrstan je pokazatelj prisutnosti toksičnih metabolita koji narušavaju osmotsku cjelovitost stanica. Liza eritrocita rezultat je oksidativnog oštećenja membrane eritrocita i smanjene fluidnosti i sposobnosti da se odupru osmotskim promjenama (379).

Fe-dex. + Izo. pokazuje smanjenje relativne mase mozga u odnosu na Fe-dex. ( $p < 0,05$ ) pokazujući da kombinirana primjena Fe s izofluranom povećava toksični učinak na mozak (Slika 48b). Od esencijalnih elemenata vidljiva je akumulacija Fe ( $p < 0,05$ ), Zn ( $p < 0,01$ ), Cu i Se u mozgu u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 13). Od visokotoksičnih metala vidljivo je povećanje Pb, Cd ( $p < 0,05$ ) i Al ( $p=0,085$ ) (Tablica 14). Razina SOD (Slika 55) i CAT (Slika 56) aktivnosti je povećana što je u skladu s povećanjem Zn, Cu, Se i Fe, ključnim ko-faktorima u sintezi antioksidacijskih enzima. Razina NO u mozgu i serumu (Slike 57 i 58) je smanjena dok je razina arginaze značajno povećana ( $p < 0,01$ ) (Slika 59) što ide u prilog povećanja reparacije i popravka tkiva. Na zaštitni mehanizam ukazuje i povećana razina feritina ( $p < 0,001$ ) u serumu (Slika 64) u odnosu na hepcidin (Slika 63). Koncentracija hepcidina obratno je proporcionalna s koncentracijama feritina u serumu životinja. Na pojačanu sintezu hepcidina utječu mnogi čimbenici kao razina željeza u cirkulaciji i tkivu, upala i upalne bolesti, infektivne bolesti, kronično bubrežno zatajenje, karcinomi, dok se smanjena sinteza hepcidina javlja u stanjima sa sniženim razinama željeza u plazmi, anemijama, hipoksiji te kod povećane eritropoetske aktivnosti (380). Najveći utjecaj na ekspresiju hepcidina u upalnim stanjima ima IL-6. Nedostatak gena za IL-6 u miša (delecijom gena za IL-6) sprječava pojačanu ekspresiju hepcidina u izazvanim upalnim stanjima (127). Hepcidin je također, osim IL-6, pod utjecajem IL-1- $\alpha$ , IL-1- $\beta$  te CRP proteina te lipopolisaharida. Dodatni čimbenici koji smanjuju ekspresiju hepcidina u jetri su epidermalni faktor rasta, faktor rasta hepatocita, TNF- $\alpha$  te estrogen i testosteron, no njihova uloga u održavanju homeostaze željeza nije još potpuno razjašnjena (116, 381).



Upala je prisutna u ovoj skupini što potvrđuje statistički značajno povećanje IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF, ali nedostaje povećanje IL-6 (Tablica 15). Nadalje, potvrdili smo i snažan protuupalni učinak kroz povećanje IL-4, IL-10, IL-13 ukazujući na potrebu reparacije tkiva te tako polarizaciju i prisutnost M1 i M2 fenotipa makrofaga (Tablica 15). Na pojačana oštećenja moždanih stanica osim povećane razine proupalnih citokina i M1 makrofagne polarizacije ukazuje i povećanje AChE (Slika 66) i smanjenje BDNF čimbenika (Slika 67).

Oštećenja bubrega i jetre, kao posljedica nedostatka ATP-a i hipoksije te pada mase životinja očituju se i u biokemijskim odrednicama kao smanjena razina ALB ( $p < 0,001$ ), AMY ( $p < 0,01$ ), TP (Slika 49) te narušene koncentracija elektrolita Na<sup>+</sup> i K<sup>+</sup> (Slika 50). Povećana razina GLOB (Slika 49) ukazuje na pojačanu sintezu globulina koji služe kao prijenosnici brojnih molekula nastalih kao posljedica različitih metaboličkih procesa, posebice:  $\alpha 1$  globulina, služe u prijenosu masti, lipida, vitamina A, D, E, K, B12, tiroksina, kortizola, bilirubina;  $\alpha 2$  globulina, sudjeluju u prijenosu lipida, triglicerida, bakra, hemoglobina;  $\beta$  globulina, u prijenosu hema, željeza, vitamina, hormona, kolesterola, glicerida; te  $\gamma$  globulina čija je sinteza najveća, a sudjeluju u nastanku imunokompleksa s oštećenim proteinima i drugim promijenjenim sastavnicama oštećenih stanica (382).

Kombinacija Fe-dex. + Izo. pokazuje najveću razinu oštećenja izazvanu OS, pojačanom razinom upalnih citokina (Tablica 15) što je vidljivo i u pojačanoj hemolizi eritrocita pri 0,5% otopini NaCl (22,80% vs 3,51%) (Tablica 12). Liza eritrocita rezultat je oksidativnog oštećenja membrane eritrocita i smanjene fluidnosti i sposobnosti da se odupru osmotskim promjenama (383). Treba naglasiti da je hem željezo također važna prooksidacijska biomolekula i može pokrenuti događaje stanične signalizacije, budući da ROS generiran njegovom reakcijom može djelovati kao drugi glasnik. Tako je potvrđeno da visoka razina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nastala kao rezultat prooksidativnog učinka hem željeza, pojačava aktivnost protein kinaze C (PKC) i Na, K-ATPaze koje su bitne za staničnu funkciju i volumen eritrocita. U eritrocitima, preopterećenje željezom stimulira aktivnost Na, K-ATPaze zbog moguće interakcije između željeza i enzima ili modifikacijom lipidnog mikrokoliša. Preopterećenje željezom može povećati rizik od infekcije i rezultirati oslabljenim odgovorom stanica imunskog sustava zbog skraćivanja njihovog staničnog života, slabljenja fagocitne aktivnosti ili smrti polimorfonuklearnih leukocita i monocita (383, 384, 385) na što ukazuje smanjeni broj leukocita i narušeni omjer limfocita i neutrofila u DKS analizi (Slika 52b).

## 5.4. Učinak kronične primjene inhalacijskih anestetika i željezo dekstrana na organizam štakora

Poremećaji kod kojih dolazi do preopterećenja organizma željezom su heterogena grupa nasljednih i stečenih stanja. Kronična toksičnost (preopterećenje željezom), poznata i pod nazivom hemokromatoza, nastaje kao posljedica odlaganja viška željeza u srcu, jetri, gušterači, CŽS-u te dovodi do endokrine disfunkcije (94). Hemokromatoza je bolest koju karakterizira povećana apsorpcija željeza u crijevima, preopterećenje željeza u tijelu te visoka plazmatska koncentracija željeza vezanog za transferin. U takvim oboljenjima dolazi do pojave željeza u krvi koje nije vezano za transferin, a ono uzrokuje zatajenje organa i smrt. Nasljedna hemokromatoza ometa normalnu funkciju mitohondrija i brojnih enzima pogoršavajući odgovor tijela na upalu i uzrokujući oksidacijski stres (386). Neurološki poremećaj homeostaze željeza i odlaganje viška željeza u mozgu povezani su s neurodegenerativnim poremećajima, primjerice Parkinsonovom i Alzheimerovom bolesti te Friedrichovom ataksijom (94).

Toksičnost kronične primjene Fe-dex. je vidljiva kroz znatan pad % mase životinja (-1,99%) u odnosu na kontrolu (13,09%), potom slijedi Fe-dex. + Izo. (0,46%) te Fe-dex. + Sevo. (7,79%) (Slika 68a).

Fe-dex. nije izazvao promjene u relativnoj masi mozga (Slika 68b), međutim zapaženo je povećanje relativne mase mozga kod skupine Fe-dex. + Sevo. ( $p < 0,01$ ) u odnosu na sevofluran skupinu kao i značajno smanjenje relativne mase mozga kod skupine obrađene Fe-dex. + Izo. u odnosu na Fe-dex. + Sevo. skupinu ( $p < 0,001$ ) i kontrolnu skupinu ( $p < 0,05$ ) (Slika 68b).

Posebice je zanimljivo da se u skupini Fe-dex. u kroničnoj primjeni vidi neznatno smanjenje nakupljanja Fe u mozgu u odnosu na subkroničnu primjenu (Tablica 17) ali i znatno manje nakupljanje visokotoksičnih metala Pb (32,47x), Cd (2,23x), Al (2,96x) te neesencijalnih metala Ba (3,42x) i Ni (1,38) (Tablica 18). Čini se da se radi o povećanim adaptacijskim i zaštitnim mehanizmima na povećanje iona Fe. Poznato je da je homeostaza željeza na sustavnoj razini regulirana povratnom spregom hepcidin-feroportin te brojnim prijenosnicima koji vežu slobodno željezo u tijelu i reguliraju njegovu apsorpciju, korištenje, skladištenje i recikliranje (387,388). Na staničnoj razini homeostaza je regulirana posttranskripcijskim mehanizmom posredovanim regulatornim proteinima željeza (engl. *iron regulatory proteins*, IRP) i željezo-odgovornim elementima (engl. *iron responsive elements*, IRE) (389). IRP su proteini koji vežući feritinsku i transferinsku mRNA, reguliraju njihovu translaciju, a time i metabolizam

željeza (390). Za sada nije poznat način reguliranog izlučivanja željeza iz tijela putem bubrega, pa je njegova apsorpcija strogo kontrolirana na sustavnoj i staničnoj razini kako bi se osigurala pravilna ravnoteža između optimalne i toksične razine željeza (98). Mobilizacija željeza iz enterocita, makrofaga i hepatocita isključivo je regulirana razinama hormona hepcidina koji djeluje preko transmembranskog proteina ferroportina. Transferin i feritin, prijenosni i skladišni proteini metabolizma željeza smanjenjem katalitičke aktivnosti željeza u redoks reakcijama s jednim elektronom mogu smanjiti izloženost stanica potencijalno štetnim vrstama poput peroksida, superoksida i hidroksilnog radikala te dovoljno čvrsto vežu željezo kako bi spriječili formiranje netopljivih hidrolitičkih produkata, iako reverzibilno omogućavajući dostupnost iona Fe stanicama po potrebi (391). Jedan od adaptacijskih mehanizama jest smanjenje oksidacijske aktivnosti i povećanje ukupnog antioksidacijskog kapaciteta što je primijećeno i kod terapije željezom ljudi tijekom anemije (392). Zanimljivo je da je tijekom kronične primjene Fe-dex. došlo do smanjenja razine MDA ( $p < 0,001$ ), povećanja razine GSH ( $p < 0,05$ ) i povećanja aktivnosti SOD, dok je aktivnost CAT bila snižena (Slike 73-75). Nadalje razina NO je također bila smanjena, u serumu i mozgu (Slike 77 i 78) kao i aktivnost MMP-2 i 9 (Slike 81 i 82) te hepcidina (Slika 83). Feritin je u serumu bio nepromijenjen (Slika 84) dok je u mozgu značajno smanjen ( $p < 0,001$ ) (Slika 85). Nadalje, treba istaknuti da je dio adaptacijskog mehanizma i povećanje IL-4 ( $p < 0,01$ ) u odnosu na kontrolu (Tablica 18) te povećanje arginaze (Slika 79). U skladu s dobivenim podacima aktivnost AChE i BDNF je bila smanjena (Slike 86 i 87). Imunohistokemijskim bojanjem analizirana je izraženost biljega 4G8 (Slika 88) u području kore velikog mozga (lat. *cortex*), hipokampalne formacije (lat. *hippocampus*) i maloga mozga (lat. *cerebellum*). Pozitivan signal zapažen je u kori velikog mozga kod skupina tretiranih Fe-dex.+ Sevo. i Fe-dex. + Izo. gdje je na više mjesta vidljiva prisutnost amiloida čije nakupljanje je u obliku oblačića označeno na Slici 88. U hipokampalnoj regiji i malom mozgu pozitivan signal nije zabilježen niti je zabilježeno prisustvo beta amiloidnih plakova karakterističnih za AD.

Homeostaza željeza usko je povezana s infekcijama i upalnim odgovorima zbog učinaka željeza na proliferaciju i diferencijaciju imunskih stanica, primjerice polarizaciju makrofaga (393). Željezo se u makrofagima veže za feritin, a njegova prisutnost određuje polarizaciju makrofaga regulirajući ekspresiju gena vezanih za metabolizam željeza. Preopterećenje željezom može povećati rizik od infekcije i rezultirati oslabljenim odgovorom stanica imunskog sustava zbog skraćenog životnog vijeka imunskih stanica, smanjene fagocitne aktivnosti ili smrti polimorfonuklearnih leukocita i monocita (383, 384, 385). Takve promjene

rezultiraju promjenama u proizvodnji citokina od strane makrofaga, kao i promjenama u njihovoj funkciji. Moguće je da je smanjena funkcija makrofaga i neutrofila, primarnih proizvođača MMP-2 i MMP-9, zajedno s feritinom, ključnim čimbenikom koji pridonosi manjim promjenama u razinama MMP-a uočenim u našim rezultatima (Slike 81, 82 i 85). Ovi nalazi su u skladu s Otagawa i sur. (394), koji pokazuju da je u modelu akutne i kronične ozljede jetre ekspresija MCP-1, IL-6, TNF- $\alpha$  i MMP-a bila nepromijenjena u štakora u usporedbi s onima na dijeti s nedostatkom željeza. Prema Wang i sur. (395), niske unutarstanične razine željeza u imunskim stanicama, uključujući makrofage, selektivno moduliraju upalni odgovor aktiviran TLR4, što rezultira smanjenom ekspresijom citokina izazvanom LPS-om. Ovo sugerira da mehanizam ovisan o željezu modulira TLR signalni put, a manipulacija homeostazom željeza mogla bi predstavljati novu strategiju za kontrolu upale. Kontroverzno, pokazalo se da nedostatak željeza narušava imunski odgovor posredovan intrahepatičnim limfocitima (396). Upalni proces i nakupljanje neutrofila i makrofaga u oštećenom tkivu ključni su za regeneraciju tkiva nakon oštećenja izazvanih željezom.

Brojni kontroverzni rezultati i mišljenja postoje o načinu učinka željeza na upalni odgovor (374, 397, 398, 399, 400). Dok jedni tvrde da višak željeza suprimira prethodno izazvan upalni odgovor i time djeluje protuupalno, drugi govore da dodatak željeza djeluje proupalno izazivajući i pogoršavajući upalne odgovore u tijelu. Ovi podaci sugeriraju da bi željezo moglo regulirati polarizaciju makrofaga utječući na različite signalne putove na temelju različitih modela. Čini se da je i doza željeza važna kao i mikrookolišni uvjeti. Stoga temeljni mehanizmi pomoću kojih željezo oblikuje polarizaciju makrofaga zaslužuju daljnje istraživanje. Prema istraživanju Agoro i sur. prehrana bogata željezom ili intraperitonealni unos željezo dekstrana smanjuju proupalni odgovor prethodno uzrokovan LPS-om u miševa (374). Obrada miševa željezom povećala je ekspresiju M2 biljega, odnosno aktivnost arginaze (Arg-1) u jetrenim i peritonealnim makrofagima, dok je nedostatak željeza smanjio aktivnost Arg-1 i pomaknuo polarizaciju makrofaga u smjeru M1 fenotipa. Točnije kod upalnih stanja izazvanih LPS-om, prehrana s niskim sadržajem željeza potaknula je proupalni odgovor, dok se dodatkom željeza u prehrani potaknuo protuupalni odgovor tipa 2, a ravnoteža IL-12/IL-10 se smanjila (374). Doista, *in vitro* opterećenje makrofaga željezom smanjilo je bazalni postotak stanica koje ekspimiraju M1 kostimulatorne CD86 i MHC-II molekule. Nadalje, opterećenje makrofaga željezom spriječilo je proupalni odgovor induciran LPS-om kroz smanjenje translokacije NF- $\kappa$ B p65 u jezgru te posljedično smanjenje ekspresija iNOS, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 i TNF- $\alpha$ . Povećanje unutarstaničnog željeza također smanjuje ekspresiju gena hepcidina izazvanu LPS-

om i dokida „down“ regulaciju ferroportina u makrofagima, u skladu s polarizacijom makrofaga. Dakle, željezo modulira upalni ishod odgovora, budući da su povišene razine željeza povećale fenotip M2 i negativno regulirale M1 proupalni LPS-inducirani odgovor. Kod protuupalnog fenotipa M2, negativno reguliran gen za feritin što potvrđuju i naši rezultati (Slike 78, 79, 80 i 85) i pozitivno reguliran gen za ferroportin potiču apsorpciju hema i izlučivanje slobodnog željeza. M2 makrofagi koriste arginin za proizvodnju ornitina i uree putem enzima Arg-1, a biljeg M2 polarizacije je IL-10, IL-4 i IL-13. Put arginaze ograničava dostupnost arginina za sintezu NO, a ornitin potiče sintezu poliamina i prolina važnih za staničnu proliferaciju i popravak tkiva (401). Protuupalno djelovanje željeza potvrđuje istraživanje Pagani i suradnika (397) koji su pokazali da nedostatak željeza u miševa potiče proizvodnju proupalnih citokina TNF- $\alpha$  i IL-6 u makrofagima jetre, slezene i u serumu miševa nakon tretiranja LPS-om. Druga istraživanja otkrila su pojačanu LPS upalu nakon davanja visoke doze (1 g/kg) intraperitonealnog željezo dekstrana (400).

Nadalje u ovoj skupini zapaženo je smanjenje koncentracije ALP, ALT, AMY ali bez statističke značajnosti u odnosu na kontrolu (Slika 69). Broj eritrocita bio je povećan (Slika 71), a posebice je bio povećan broj leukocita ( $p < 0,01$ ) u odnosu na kontrolu što ukazuje na prisutnost upale (Slika 72). Povećana je i hemoliza eritrocita i pri 0,5% NaCl je bila 31,30% u odnosu na kontrolu čiji postotak je 3,51% (Tablica 16). Dobiveni podaci ukazuju na to da je bio prisutan oksidacijski stres i upala koji su izazvali propadanje eritrocita te nedostatak kisika u organizmu. U hipoksiji i anemiji, sniženu koncentraciju kisika u tkivima registrira centar u bubrezima te potiče pojačano lučenje hormona eritropoetina i pokretanje procesa eritropoeze. Eritropoetin se veže za receptore na površini prekursora eritrocita te inducira njihovu proliferaciju i diferencijaciju u zrele eritrocite. Tijekom proizvodnje novih eritrocita i njihovog sazrijevanja potrebno je ugraditi željezo u hem grupu kako bi eritrociti omogućili snabdjevanje organizma kisikom i njegov prijenos do svih tkiva. Za proces eritropoeze potrebno je 20-25 mg željeza od čega većina dolazi iz recikliranja starih eritrocita putem RES makrofaga. Bez željeza sazrijevanje eritrocita je onemogućeno, a može doći do mikrocitne hipokromne anemije. M2 polarizacija makrofaga omogućila je pojačanu fagocitozu propalih eritrocita i nakon oslobađanja hema i recikliranja slobodnog željeza smanjila je razinu oksidacijskog stresa (Slike 78-80).

Na neuropeptidima u skupini Fe-dex. + Sevo. zasigurno utječe povećanje Fe, ali i As, Cd, a posebice povećana koncentracija Pb ( $p < 0,05$ ) i Al ( $p < 0,01$ ) (Tablice 17 i 18). Od neesencijalnih metala povećana je koncentracija Ba i Ni (Tablica 18). Razina MDA je pod

kontrolom povećane razine GSH, a posebice povećane aktivnosti SOD ( $p < 0,01$ ), dok je razina CAT bez promjene u odnosu na kontrolu (Slike 73,74,75 i 76). Razina NO u mozgu je smanjena ( $p < 0,05$ ), kao i u serumu (Slike 77 i 78). Također nije bilo vidljivih promjena u aktivnosti Arg, hepcidina u serumu ili feritina u serumu (Slike 79, 83 i 84) dok je u mozgu razina feritina bila smanjena ( $p < 0,05$ ) (Slika 85). Također nije bilo promjena aktivnosti citokina (Tablica 19) kao niti u razini AChE i BDNF-a (Slike 86 i 87).

Od biokemijskih odrednica zapazili smo smanjenje razine koncentracije ALP, ALT, AMY ( $p < 0,01$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 69). Ove promjene ukazuju na posljedice težih intoksikacija jetre te njenog oštećenja zbog nakupljanja željeza preko makrofaga i retikulo-endotelnog sustava (402) i povećanja razine ROS-a. Zapaženo je povećanje globulina, eritrocita i hemoglobina ( $p < 0,05$ ) (Slika 70) te posebice porast leukocita ( $p < 0,01$ ) (Slika 72a). Hemoliza eritrocita je bila niža u odnosu na samu obradu Fe-dex., ali pojačana u odnosu na kontrolnu skupinu; pri 0,5% NaCl je bila 19,36% (Tablica 16).

Pad relativne mase mozga u skupni Fe-dex. + Izo. posljedica je povećanja razine Fe ( $p < 0,01$ ) što prati nakupljanje esencijalnih metala ključnih u sintezi antioksidacijskih enzima posebice Zn ( $p < 0,01$ ), Mn, Se, Cu ( $p < 0,05$ ), Cr ( $p < 0,01$ ), Mo ( $p < 0,0001$ ) u odnosu na kontrolu (Tablica 17). Poznato je da ioni dvovalentnih metala (poput Fe, Cu, Zn i Al) sudjeluju u Fentonovoj reakciji u kojoj se uslijed reakcije reduciranog dvovalentnog metala s vodikovim peroksidom ( $H_2O_2$ ) stvaraju slobodni radikali kisika (u ovom slučaju hidroksilni radikal,  $\cdot OH$ ) koji svojom visokom reaktivnošću uzrokuju oksidativni stres oštećujući proteine, lipide i nukleinske kiseline, što u konačnici može prouzročiti smrt neurona (403). Nakupljanje metala je zabilježeno u senilnim plakovima i posebice u neurofibrilarnim snopićima. Potvrđena je i interakcija različitih metala i metaloida s A $\beta$  peptidom, tau proteinom i glavnim poznatim predisponirajućim čimbenikom sporadične AD – izooblikom ApoE (404, 405). Pretpostavlja se da je propusnost krvnomoždane barijere ključna za nakupljanje metala u mozgu (406, 407). Točnije, abnormalnosti u strukturi i funkciji krvnih žila u osoba s AD (407, 408), uzrok su pojačanog curenja iona metala iz krvi u mozak te njihove akumulacije i posljedične neurodegeneracije (406, 407).

Osim ovih iona metala zapazili smo znatno povećanje As ( $p < 0,001$ ) i Al ( $p < 0,01$ ) te povećanje Pb, Cd kao i neesencijalnih metala Ba i Ni (Tablica 18). Zanimljivo je da je zbog smrti stanica vjerojatno apoptozom ili autofagijom, razina MDA niska, GSH izrazito visoka ( $p < 0,01$ ), dok je došlo do iscrpljivanja aktivnosti SOD i CAT ( $p < 0,01$ ) (Slike 73,74,75 i 76). Povećanje ROS-a prati i porast NO u mozgu (Slika 77) što može dovesti do nitrozativnog stresa.

Željezo može potaći stvaranje reaktivnih vrsta dušika (RNS) te nitrozativnog stresa.  $O_2^{\bullet-}$  i  $NO^{\bullet}$  se enzimski proizvode u malim količinama u normalnom staničnom metabolizmu, i zajedno s  $H_2O_2$ , koji nastaje dismutacijom  $O_2^{\bullet-}$ , imaju značajnu ulogu u staničnoj signalizaciji i metabolizmu. U stanju upale, prisutnost aktiviranih neutrofila i makrofaga, znatno povećava koncentracije  $NO^{\bullet}$  i  $O_2^{\bullet-}$ , a što može dalje potaknuti nastanak još reaktivnijih vrsta kao na primjer  $ONOO^{\bullet}$ . Prisutnost visoke razine ROS-a i RNS-a slabi antioksidacijski zaštitni kapacitet te vodi biološkom oštećenju lipida, proteina i DNA, odnosno stanju oksidacijskog ili nitrozativnog stresa. Podaci ukazuju na M1/M2 polarizaciju, gdje nastala oštećenja potiču mehanizme reparacije. Pojačani oksidacijski i/ili nitrozativni stres povezan je s procesom starenja, ali i brojnim kroničnim bolestima, uključujući Parkinsonovu bolest, AD, aterosklerozu, zatajenje srca, infarkt miokarda, dijabetes i karcinom. Pojačani oksidacijski stres je uzrok pada aktivnost AChE i BDNF (Slike 86 i 87).

Razina NO u serumu je smanjena, ali razina arginaze povećana ( $p < 0,001$ ) (Slike 78, 79 i 80), razina MMP-2 i 9 su bez promjena (Slike 81 i 82) kao i razina hepcidina (Slika 83) dok je razina feritina u mozgu znatno smanjena ( $p < 0,001$ ) (Slika 85) pokazujući nedostatak sposobnosti vezanja Fe i povećanje razine slobodnog Fe i oksidacijskog stresa. Visoke razine Fe i oksidacijskog stresa vode imunosupresiji i nedostatku citokinskog odgovora. Nedostatak citokinske aktivnosti posljedica je prekida oksidacijsko-redukcijskog sustava i nedostatka antioksidacijske aktivnosti. GSH je nužan za aktivnost i diobu stanica T i B, njegov nedostatak vodi imunosupresiji, nedostatku sinteze citokina i imunosnog odgovora.

U ovoj skupini ponovno zapažamo nisku koncentraciju ALP, ALT, AMY, TP a posebice ALB ( $p < 0,00$ ) (Slika 69). Uzrok navedenom je toksičnost, oksidacijski stres i pothranjenost životinja. Skupina željezo dekstrana + izoflurana pokazuje višu razine glukoze u krvi (Slika 70) odnosno hiperglikemiju kao posljedicu spriječene egzocitoze inzulina iz beta stanica gušterače posljedično nastale štetnim djelovanjem izoflurana (409). Također zapažen je znatan porast eritrocita ( $p < 0,001$ ), hemoglobina ( $p < 0,05$ ), hematokrita ( $p < 0,001$ ), MCV ( $p < 0,00$ ), MCH ( $p < 0,001$ ), MCHC ( $p < 0,001$ ) te smanjenje RDW ( $p < 0,05$ ) u odnosu na kontrolu (Slika 71). Razlog je pojačani oksidacijski stres, hipoksija i pojačano propadanje eritrocita hemolizom u odnosu na kontrolu; pri 0,5% otopini NaCl odnos je 27,52% vs 3,51% (Tablica 16). Glavni modulatori metabolizma željeza i eritropoeze u stanju hipoksije su hipoksijom inducirani faktori (engl. *hypoxia-inducible transcription factors*, HIF), a razine kisika u stanicama reguliraju proizvodnju HIF proteina. Pri normalnim razinama kisika, HIF podjedinice se razgrađuju preko proteosoma. Pri stanju snižene razine kisika, HIF podjedinice pojačavaju

ekspresiju gena za eritropoetin te suprimiraju ekspresiju gena za hepcidin (101,410). Broj leukocita zbog imunosupresije bio je znatno smanjen. Bez obzira na pothranjenost i oslabljeni imunski odgovor tijekom pokusa nije došlo do smrti životinja.

Naši podaci pokazuju da uvjeti okoliša utječu na plastičnost makrofaga i odnos između fenotipova M1/M2 makrofaga. Aktivacija enzima hemoksigenaze (HO-1), koja je pod kontrolom redoks-osjetljivog transkripcijskog faktora Nrf2, usko je povezana s tvarima koje potiču polarizaciju makrofaga prema M2 protuupalnom fenotipu, kao što je IL-10. Iako nismo mjerili razine HO-1, njegova je aktivnost kritična u oksidativnoj razgradnji hema u tri nusproizvoda: biliverdin (koji se naknadno pretvara u antioksidans i protuupalni bilirubin), 'slobodno' željezo i ugljik monoksid (CO) (411). Unatoč tome što je toksičan plin, CO može imati korisne učinke (412, 413, 414). HO-1 pridonosi protuupalnom djelovanju i potiče polarizaciju prema fenotipu M2 (415), dok je željezo neophodno za konstitutivnu razgradnju HIF čimbenika. Nedostatak željeza u makrofagima mogao bi povećati aktivaciju HIF-a (416), ali također spriječiti stvaranje funkcionalnih enzima koji sadrže željezo kao što su lipoksigenaza, prostaglandin H sintaza i mieloperoksidaza, koji su važni u metabolizmu arahidonata. Željezo također utječe na sintezu enzima tirozin hidroksilaze, što ograničava brzinu biosinteze kateholamina. Kateholamini proizvedeni u makrofagima imaju sposobnost pojačavanja upalnih odgovora (417). Stoga se čini da željezo regulira funkciju makrofaga kroz više putova, utječući na njihovu polarizaciju, enzimsku aktivnost i ukupnu ulogu u upali i imunskom odgovoru. Iako je željezo toksično, njegovo ponovno oslobađanje može izazvati oksidacijski stres i utjecati na translokaciju Nrf2 u jezgru gdje aktivira transkripciju antioksidacijskih gena preko antioksidacijskog elementa odgovora (ARE, engl. *Antioxidant Response Element*) na podražaj OS-a. Nrf2 je molekula odgovorna za aktivaciju ARE slijeda te potiče transkripciju mnogih citoprotektivnih gena uključujući HO-1. Osim toga ARE se nalazi u promotorskoj regiji mnogih gena koji kodiraju za antioksidacijske i detoksikacijske enzime te je odgovoran za ekspresiju enzima bitnih za fazu 2 biotransformacije, kao i feritina.



## **6. ZAKLJUČAK**

Temeljem dobivenih rezultata mogu se donijeti sljedeći zaključci:

### **1. Subakutni učinci inhalacijskih anestetika, aluminijska i/ili njihovih kombinacija**

- Subakutna primjena inhalacijskih anestetika (sevoflurana, izoflurana) samih i/ili združenih sa aluminij kloridom vodi metaboličkim promjenama, oksidacijskom stresu i upali
- Izlaganje štakora sevofluranu i izofluranu te kombinaciji  $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. + Izo. vodi znatnom gubitku tjelesne mase štakora
- Nakupljanje esencijalnih, visokotoksičnih i neesencijalnih metala u mozgu vidljivo je u svim eksperimentalnim skupinama, posebice u skupini  $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. + Izo. gdje se ističe znatan porast Fe, Zn, As, Pb, Cd u mozgu
- Prisutnost metala u mozgu pojačava upalu, oštećenje moždanih stanica te njihovu smrt vodeći smanjenju relativne mase mozga
- Hipoksija i toksičnost metabolita izoflurana vode razvoju neuroupale; smanjena dostupnost dušikovog oksida (NO) u mozgu čimbenik je koji pridonosi povećanom oštećenju krvožilja te posljedičnom oštećenju mozga
- Najveći toksični i hipoksični učinak na mozak ima izofluran sam i/ili u prisutnosti aluminijska
- Anestetici u kombinaciji s  $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. izazivaju znatne promjene u citokinskoj aktivnosti; povećanje proupalnih citokina (IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$ , GM-CSF) dok sami anestetici znatno povećavaju razinu RANTES kemokina i IL-6
- Proces upale potvrđuje i povećanje broja leukocita;  $\text{AlCl}_3$  + D.-gal. izaziva najveće povećanje broja leukocita, potom slijedi izlaganje štakora izofluranu te kombinaciji aluminijska sa sevofluranom
- Aluminij potiče znatan porast limfocita dok je znatan porast neutrofila vidljiv u kombinaciji aluminijska s anestheticima
- Porast biokemijskih odrednica ukazuje na oštećenje jetre i bubrega posebice u skupini izloženoj izofluranu te aluminiju i/ili kombinaciji aluminijska s anestheticima

- Hipoksija izazvana izofluranom te toksičnost aluminija u kombinaciji s anestheticima utječe na sve hematološke odrednice; povećana hemoliza eritrocita te pojačana eritropoeza je odgovor na hipoksiju i toksičnost
- Makrofagna polarizacija je usko povezana za razinom željeza, hepcidina, hipoksije i eritropoeze; ovi uvjeti su ključni za M1/M2 polarizaciju
- Povećana produkcija NO i hepcidina te gubitak feritina u mozgu uz prisutnost proupalnih Th1 citokina (IL-1 $\beta$ , IL2, IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  i GM-CSF) pokazuje polarizaciju prema M1 fenotipu u skupini obrađenoj kombinacijom aluminija s izofluranom; sevofluran vodi M1/M2 polarizaciji dok ostale skupine pokazuju najčešće M2 fenotip makrofagne polarizacije
- Zaštitni učinci mozga su vidljivi kroz povećanje arginina ili M2 polarizacije, povećanje feritina i BDNF-a

## **2. Kronični učinci inhalacijskih anestetika, aluminija i/ili njihovih kombinacija**

- Kronična primjena sevoflurana i izoflurana samih ili u kombinaciji s aluminijem utječe na metabolizam životinja i gubitak tjelesne mase štakora, posebice izlaganje sevofluranu te kombinaciji AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo.
- Nakupljanje visokotoksičnih metala (As, Pb, Cd, Al) najveće je u skupini izloženoj AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo., potvrđujući da je mozak glavni cilj visokotoksičnih metala koji u konačnici vode početnom nakupljanju amiloida u kori i žilama malog mozga
- Prisutnost teških metala vodi neuroupali i pojačanoj smrti stanica mozga vodeći smanjenoj relativnoj masi mozga u skupini AlCl<sub>3</sub> + D.-gal. + Izo.
- Sevofluran tijekom kronične primjene pokazuje znatno veću promjenu u razini citokina u serumu od izoflurana
- Sevofluran povećava razinu IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  te RANTES kemokina ali i razinu IL-10 i IL-13 koji imaju protuupalni učinak ukazujući na M2b polarizaciju koju karakterizira visoka razina arginaze te mala količina IL-12
- Izofluran pokazuje povećanu razinu IL-1 $\beta$ , IL-12, INF- $\gamma$  te IL-13 ukazujući na M1 polarizaciju što potvrđuje i porast AChE kao pokazatelja neuroupale

- Izofluran tijekom kronične primjene zbog pojačane hipoksije izaziva znatno veća oštećenja na moždanim i hematopetskim stanicama te biokemijskim odrednicama seruma u odnosu na sevofluran
- Kronična primjena aluminijske soli izaziva neuroupalu; povećanje AChE jest pokazatelj neuroupale dok je pojačani zaštitni odgovor na oksidacijski stres iskazan povećanjem BDNF aktivnosti i aktivnosti arginaze usmjeravajući polarizaciju prema M2 fenotipu
- Aluminij pokazuje povećani broj leukocita, znatan porast limfocita i neutrofila potiskujući imunosnu funkciju i citokinsku produkciju kroz mehanizam povezan s oksidacijskim stresom
- Hiperupalna reakcija je negativno povezana sa sustavnom imunosnom funkcijom; pojačana aktivacija M2 makrofaga vodi kontroli upalne reakcije
- Povećanje biokemijskih odrednica ALP, ALT, BUN, CRE i PHOS i smanjenje razine ALB potvrđuju toksični učinak  $AlCl_3$  + D.-gal. na bubrege i jetru
- Toksičnost aluminijske soli sa izofluranom potvrđuju promjene u biokemijskim (ALP, amilaza, globulini, kreatininu, glukozi i natriju) i hematološkim odrednicama; najveći porast hemolize eritrocita, polikromazija i porast neutrofila je potvrđen DKS analizom

### **3. Subakutni učinci inhalacijskih anestetika, željeza i/ili njihovih kombinacija**

- Toksični učinak željeza i/ili njegove kombinacije s anestheticima potvrđuje pad mase štakora
- Porast Fe, Al, Ba te Pb u mozgu uzrok su neurotoksičnosti i povećanja oksidacijskog stresa
- U skupini obrađenoj s željezom, kontrolu neuroupale podržava niska razina MMP-a, visoka razina arginina te odnos IL-10/IL-12, ključnih citokina u makrofagnoj polarizaciji pokazujući M2 fenotip makrofaga te smanjenje aktivnosti AChE i BDNF-a
- Kombinacija željeza sa sevofluranom pokazuje porast NO, MMP-9, RANTES kemokina te leukocita s značajnim udjelom neutrofila ukazujući na prisutnost upale
- Kombinacija željeza sa izofluranom izaziva najveće promjene; povećanje IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF ukazuje na M1 polarizaciju što potvrđuje i porast AChE s smanjenom koncentracijom BDNF-a. Porast antiupalnih citokina IL-4, IL-10, IL-13 potvrđuje pokretanje procesa reparacije tkiva.

- Povećana hemoliza eritrocita i manje promjene biokemijskih odrednica u svim eksperimentalnim skupinama pokazatelj su toksičnosti i oksidacijskog stresa

#### **4. Kronični učinci inhalacijskih anestetika, željeza i/ili njihovih kombinacija**

- Toksičnost kronične primjene Fe-dex. je vidljiva kroz znatan pad % mase životinja (-1,99%) u odnosu na kontrolu (13,09%), potom slijedi Fe-dex. + Izo. (0,46%) te Fe-dex. + Sevo. (7,79%)
- Kronična primjena željeza vodi povećanju adaptacijskih mehanizama kontrole nakupljanja teških metala; razina željeza i feritina kontrolira makrofagnu polarizaciju prema M2 fenotipu i supresiji MMP i citokinske aktivnosti
- Obrada sa željezom i sevofluranom uzrokuje neuroupalu izazvanu povećanjem koncentracije Pb i Al te Fe, As, Cd
- Teška intoksikacija jetre zbog nakupljanja željeza preko makrofaga, retikulo-endotelnog sustava, uzrokuje smanjenje koncentracije ALP, ALT, AMY u skupini Fe-dex. + Sevo.
- Najveća oštećenja izaziva željezo u kombinaciji s izofluranom; nakupljanje Fe, Cu, Zn i Al vodi Fentonovoj reakciji te nastanku hidroksilnih radikala (HO•), koji svojom visokom reaktivnošću uzrokuju oksidativni stres te u konačnici izazivaju smrt neurona. Oštećenje neurona povećava i prisutnost visokotoksičnih metala (As, Pb, Cd)
- Skupine tretirane Fe-dex. u kombinaciji s anestheticima pokazuju prisutnost amiloida u kori velikog mozga dok prisutnost beta amiloidnih plakova karakterističnih za Alzheimerovu bolest nije zapažena
- Povećanje ROS-a i porast NO u mozgu prati M1/M2 polarizacija u skupini izloženoj željezu u kombinaciji s izofluranom
- Niska koncentracija ALP, ALT, AMY, TP a posebice ALB u skupini Fe-dex. + Izo. pokazatelj je toksičnosti, oksidacijskog stresa i pothranjenosti životinja
- Hipoksija izazvana obradom štakora Fe-dex. + Izo. uzrokuje i pojačanu hemolizu eritrocita te posljedično povećanje eritropeze, hematokrita, hemoglobina i hematoloških indeksa

- Uvjeti okoliša utječu na plastičnost makrofaga i odnos između fenotipova M1/M2 makrofaga; željezo regulira funkciju makrofaga kroz više putova, utječući na njihovu polarizaciju, enzimsku aktivnost i ukupnu ulogu u upali i imunosnom odgovoru
- Razina hepcidina u mozgu regulirana je složenom međureakcijom upale, oksidacijskog stresa, razine slobodnog željeza, anemijom i hipoksijom
- Rezultati ukazuju na višestruku regulaciju i komunikaciju između hepcidina, makrofaga i željeza u prisutnosti anestetika; bolja analiza ROS-ovisnih signalnih puteva i genske ekspresije te mikrokolišnih uvjeta povezanih s plastičnošću makrofaga i promjenom funkcije dati će jasniju sliku mogućih oštećenja mozga, adaptacijskih procesa i mehanizama popravka stanica mozga.

## **7. LITERATURA**

1. Zvěřová M (2019) Clinical aspects of Alzheimer's disease. *Clinical Biochemistry* 72: 3-6.
2. Moya-Alvarado G, Gershoni-Emek N, Perlson E, Bronfman FC (2016) Neurodegeneration and Alzheimer's disease (AD). What Can Proteomics Tell Us About the Alzheimer's Brain? *Molecular & Cellular Proteomics* 15 (2): 409-425.
3. Hardy J, Orr H (2006) The genetics of neurodegenerative diseases. *Journal of Neurochemistry* 97 (6): 1690-1699.
4. Alzheimer's Association (2011) Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 7 (2): 208–244.
5. Kocahan S, Doğan Z (2017) Mechanisms of Alzheimer's Disease Pathogenesis and Prevention: The Brain, Neural Pathology, N-methyl-D-aspartate Receptors, Tau Protein and Other Risk Factors. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience* 15 (1): 1-8.
6. Roda AR, Serra-Mir G, Montoliu-Gaya L, Tiessler L, Villegas S (2022) Amyloid-beta peptide and tau protein crosstalk in Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research* 17 (8): 1666-1674.
7. Hill JM, Clement C, Pogue AI, Bhattacharjee S, Yuhai Z, Lukiw W (2014) Pathogenic microbes, the microbiome, and Alzheimer's disease (AD). *Frontiers in Aging Neuroscience* 16 (6): 127.
8. Planel E, Bretteville A, Liu L, Virag L, Du AL, Yu WH, Dickson DW, Whittington RA, Duff KE (2009) Acceleration and persistence of neurofibrillary pathology in a mouse model of tauopathy following anesthesia. *FASEB Journal* 23 (8): 2595–2604.
9. Brozović G, Oršolić N, Rozgaj R, Knežević F, Horvat KA, Maričić M, Krsnik D, Benković V (2017) Sevoflurane and isoflurane genotoxicity in kidney cells of mice. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 68 (3): 228-234.
10. Stachnik J (2006) Inhaled anesthetic agents. *American Journal of Health-System Pharmacy* 63 (7): 623–634.
11. Terrando N, Eriksson LI, Jae KR, Yang T, Monaco C, Feldmann M, Fagerlund MJ, Charo IF, Akassoglou K, Maze M (2011) Resolving postoperative neuroinflammation and cognitive decline. *Annals of Neurology* 70 (6): 986-995.
12. Xie Z, Dong Y, Maeda U, Moir RD, Xia W, Culley DJ, Crosby G, Tanzi RE (2007) The inhalation anesthetic isoflurane induces a vicious cycle of apoptosis and amyloid  $\beta$ -protein accumulation. *Journal of Neuroscience* 27 (6): 1247-1254.



13. Fodale V, Tripodi VF, Penna O, Famà F, Squadrito F, Mondello E, David A (2017) An update on anesthetics and impact on the brain. *Expert Opinion on Drug Safety* 16 (9): 997-1008.
14. Dong Y, Zhang G, Zhang B, Moir RD, Xia W, Marcantonio ER, Culley DJ, Crosby G, Tanzi RE, Xie Z (2009) The common inhalational anesthetic sevoflurane induces apoptosis and increases beta-amyloid protein levels. *Archives of Neurology* 66 (5): 620–631.
15. Blum FE, Zuo Z (2013) Volatile anesthetics-induced neuroinflammatory and anti-inflammatory responses. *Medical Gas Research* 3 (1): 16.
16. Lu Y, Wu X, Dong Y, Xu Z, Zhang Y, Xie Z (2010) Anesthetic sevoflurane causes neurotoxicity differently in neonatal naïve and Alzheimer disease transgenic mice. *Anesthesiology* 112 (6): 1404–1416
17. Zhang G, Dong Y, Zhang B, Ichinose F, Wu X, Culley DJ, Crosby G, Tanzi RE, Xie Z (2008) Isoflurane-induced caspase-3 activation is dependent on cytosolic calcium and can be attenuated by memantine. *Journal of Neuroscience* 28 (17): 4551–4560.
18. Zhang Y, Xu Z, Wang H, Dong Y, Shi HN, Culley DJ, Crosby G, Marcantonio ER, Tanzi RE, Xie Z (2012) Anesthetics isoflurane and desflurane differently affect mitochondrial function, learning, and memory. *Annals of Neurology* 71 (5): 687–698.
19. Wu L, Zhao H, Wang T, Pac-Soo C, Ma D (2014) Cellular signaling pathways and molecular mechanisms involving inhalational anesthetics-induced organoprotection. *Journal of Anesthesia* 28 (5): 740-758.
20. Johnson S (2001) The multifaceted and widespread pathology of magnesium deficiency. *Medical Hypotheses* 56 (2): 163-170.
21. Jan AT, Azam M, Siddiqui K, Ali A, Choi I, Haq QMR (2015) Heavy metals and human health: mechanistic insight into toxicity and counter defense system of antioxidants. *International Journal of Molecular Sciences* 16 (12): 29592-29630.
22. Klein GL (2005) Aluminum: new recognition of an old problem. *Current Opinion in Pharmacology* 5 (6): 637-640.
23. Prus E, Fibach E (2008) Flow cytometry measurement of the labile iron pool in human hematopoietic cells. *Cytometry Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology* 73 (1): 22-27.
24. Britton RS, Leicester KL, Bacon BR (2002) Iron toxicity and chelation therapy. *International Journal of Hematology* 76 (3): 219-228.

25. Yuan CY, Lee YJ, Hsu SW (2012) Aluminum overload increases oxidative stress in four functional brain areas of neonatal rats. *Journal of Biomedical Science* 19 (1): 1-9.
26. Shabab T, Khanabdali R, Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Mohan G (2017) Neuroinflammation pathways: a general review. *International Journal of Neuroscience* 127 (7): 624-633.
27. Cheignon C, Tomas M, Bonnefont-Rousselot D, Faller P, Hureau C, Collin F (2018) Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biology* 14: 450-464.
28. Bharathi VP, Govindaraju M, Palanisamy AP, Sambamurti K, Rao KS (2008) Molecular toxicity of aluminium in relation to neurodegeneration. *Indian Journal of Medical Research* 128 (4): 545-56.
29. Robinson DH, Toledo AH (2012) Historical development of modern anesthesia. *Journal of Investigative Surgery* 25 (3): 141-149.
30. Sonner JM, Antognini JF, Dutton RC, Flood P, Gray AT, Harris RA, Homanics GE, Kendig J Orser B, Raines DE, Trudell J, Vissel B, Eger EI (2003) Inhaled anesthetics and immobility: mechanisms, mysteries, and minimum alveolar anesthetic concentration. *Anesthesia & Analgesia* 97 (3): 718-740.
31. Campagna JA, Miller KW, Forman SA (2003) Mechanisms of actions of inhaled anesthetics. *New England Journal of Medicine* 348 (21): 2110-2124.
32. Mchaourab AS, Arain SR, Hamill RJ (2001) Should imaging studies be routinely performed prior to epidural steroid injections? *The Journal of the American Society of Anesthesiologists* 95 (6): 1539-1540.
33. Turner MJ, McCulloch TJ, Kennedy RR, Baker AB (2004) Pharmacokinetics of sevoflurane uptake into the brain. *Anaesthesia* 59 (12): 1201-1206.
34. Abraham MH, Acree Jr, WE, Mintz C, Payne S (2008) Effect of anesthetic structure on inhalation anesthesia: implications for the mechanism. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97 (6): 2373-2384.
35. Torri G (2010) Inhalation anesthetics: a review. *Minerva Anestesiologica* 76 (3): 215-228.
36. Kennedy RR, French RA, Vesto G, Hanrahan J, Page J (2019) The effect of fresh gas flow during induction of anaesthesia on sevoflurane usage: a quality improvement study. *Anaesthesia* 74 (7): 875-882.
37. Antkowiak B (2001) How do general anaesthetics work? *Naturwissenschaften* 88: 201-213.

38. Khan KS, Hayes I, Buggy DJ (2014) Pharmacology of anaesthetic agents II: inhalation anaesthetic agents. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain* 14 (3): 106-111.
39. Brosnan RJ, Thiesen R (2012) Increased NMDA receptor inhibition at an increased Sevoflurane MAC. *BMC Anesthesiology* 12: 9.
40. Son Y (2010) Molecular mechanisms of general anesthesia. *Korean Journal of Anesthesiology* 59 (1): 3-8.
41. Hao X, Ou M, Zhang D, Zhao W, Yang Y, Liu J, Yang H, Zhu T, Li Y, Zhou C (2020) The Effects of General Anesthetics on Synaptic Transmission. *Current Neuropharmacology* 18 (10): 936-965.
42. Hara M, Zhou ZY, Hemmings HC Jr. (2016)  $\alpha$ 2-Adrenergic Receptor and Isoflurane Modulation of Presynaptic Ca<sup>2+</sup> Influx and Exocytosis in Hippocampal Neurons. *Anesthesiology* 125 (3): 535-46.
43. Petrić Z, Žuntar I (2014) Dušični oksidul - upotreba, toksičnost, zloupotreba. *Farmaceutski glasnik* 70: 1 – 8.
44. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL (2009) *Goodman & Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics*. New York: McGraw Hill 221-240.
45. Sanders RD, Weimann J, Maze M (2008) Biologic effects of nitrous oxide: a mechanistic and toxicologic review. *Anesthesiology* 109 (4): 707-722.
46. Cohen M, Sadhasivam S, Vinks AA (2012) Pharmacogenetics in perioperative medicine. *Current Opinion in Anaesthesiology* 25 (4): 419–427.
47. Brozović G, Oršolić N, Knežević F, Horvat-Knežević A, Šakić K, Benković V, Vrdoljak DV (2006) Interactions between inhaled anesthetics and cytostatic agents. *Libri Oncologici* 34 (1-3): 23-27.
48. Sakai EM, Connolly LA, Klauck JA (2005) Inhalation anesthesiology and volatile liquid anesthetics: focus on isoflurane, desflurane, and sevoflurane. *The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 25 (12): 1773-1788.
49. Kovacic P, Somanathan R (2011) Mechanism of anesthetic toxicity: metabolism, reactive oxygen species, oxidative stress, and electron transfer. *International Scholarly Research Notices* 2011 (1): 402906.
50. Wigmore TJ, Mohammed K, Jhanji S (2016) Long-term survival for patients undergoing volatile versus IV anesthesia for cancer surgery: a retrospective analysis. *Anesthesiology* 124 (1): 69-79.

51. Struys MM, De Smet T, Glen JIB, Vereecke HE, Absalom AR, Schnider TW (2016) The history of target-controlled infusion. *Anesthesia & Analgesia* 122 (1): 56-69.
52. Acharya NK, Goldwaser EL, Forsberg MM, Godsey GA, Johnson CA, Sarkar A, DeMarshall C, Kosciuk MC, Dash JM, Hale CP, Leonard DM, Denah M, Nagele RG (2015) Sevoflurane and isoflurane induce structural changes in brain vascular endothelial cells and increase blood– brain barrier permeability: possible link to postoperative delirium and cognitive decline. *Brain Research* 1620: 29-41.
53. Keaney A, Diviney D, Harte S, Lyons B (2004) Postoperative behavioral changes following anesthesia with sevoflurane. *Pediatric Anesthesia* 14 (10): 866-870.
54. Jevtovic-Todorovic V, Hartman RE, Izumi Y, Benshoff ND, Dikranian K, Zorumski CF, Olney JW, Wozniak DF (2003) Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *Journal of Neuroscience* 23 (3): 876-882.
55. Shen X, Liu Y, Xu S, Zhao Q, Guo X, Shen R, Wang F (2013) Early life exposure to sevoflurane impairs adulthood spatial memory in the rat. *Neurotoxicology* 39: 45-56.
56. Braz MG, Karahalil B (2015) Genotoxicity of anesthetics evaluated in vivo (animals). *BioMed Research International* 1: 280802.
57. Chen SJ, Yuan XQ, Xue Q, Lu HF, Chen G (2022) Current research progress of isoflurane in cerebral ischemia/reperfusion injury: a narrative review. *Medical Gas Research* 12 (3): 73-76.
58. Guay J (2011) General anaesthesia does not contribute to long-term post-operative cognitive dysfunction in adults: a meta-analysis. *Indian Journal of Anaesthesia* 55 (4): 358.
59. Xie Z, Dong Y, Maeda U, Alfille P, Culley DJ, Crosby G, Tanzi RE (2006) The Common Inhalation Anesthetic Isoflurane Induces Apoptosis and Increases Amyloid beta Protein Levels. *Anesthesiology* 104 (5): 988–994.
60. Kalenka A, Gross B, Maurer MH, Thierse HJ, Feldmann Jr RE (2010) Isoflurane anesthesia elicits protein pattern changes in rat hippocampus. *Journal of Neurosurgical Anesthesiology* 22 (2): 144-154.
61. Eger EI (2004) Characteristics of anesthetic agents used for induction and maintenance of general anesthesia. *American Journal of Health-System Pharmacy* 61 (4): 3-10.
62. Mashour GA (2013) Neurophysiology and intraoperative nociception: new potentials? *Anesthesiology* 118 (2): 239-240.

63. Brozović G, Oršolić N, Knežević F, Horvat Knežević A, Benković V, Šakić K, Borojević N, Đikić D (2011) The in vivo genotoxicity of cisplatin, isoflurane and halothane evaluated by alkaline comet assay in Swiss albino mice. *Journal of Applied Genetics* 52: 355-361.
64. Neag MA, Mitre AO, Catinean A, Mitre CI (2020) An overview on the mechanisms of neuroprotection and neurotoxicity of isoflurane and sevoflurane in experimental studies. *Brain Research Bulletin* 165: 281-289.
65. Kitano H, Kirsch JR, Hurn PD, Murphy SJ (2007) Inhalational anesthetics as neuroprotectants or chemical preconditioning agents in ischemic brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 27 (6): 1108-28.
66. Bienengraeber MW, Weihrauch D, Kersten JR, Pagel PS, Warltier DC (2005) Cardioprotection by volatile anesthetics. *Vascular Pharmacology* 42 (5-6): 243-252.
67. Safari S, Motavaf M, Siamdoust SAS, Alavian SM (2014) Hepatotoxicity of halogenated inhalational anesthetics. *Iranian Red Crescent Medical Journal* 16 (9): 20153.
68. Kharasch ED, Frink Jr, EJ, Artru A, Michalowski P, Rooke GA, Nogami W (2001) Long-duration low-flow sevoflurane and isoflurane effects on postoperative renal and hepatic function. *Anesthesia & Analgesia* 93 (6): 1511-1520.
69. Singhal S, Gray T, Guzman G, Verma A, Anand K (2010) Sevoflurane hepatotoxicity: a case report of sevoflurane hepatic necrosis and review of the literature. *American Journal of Therapeutics* 17 (2): 219-222.
70. Conti A, Iacopino DG, Fodale V, Micalizzi S, Penna O, Santamaria LB (2006) Cerebral haemodynamic changes during propofol–remifentanyl or sevoflurane anaesthesia: transcranial Doppler study under bispectral index monitoring. *British Journal of Anaesthesia* 97 (3): 333-339.
71. Wang C, Zhang X, Liu F, Paule MG, Slikker W Jr (2010) Anesthetic-induced oxidative stress and potential protection. *Scientific World Journal* 10: 1473-82.
72. Sun Y, Cheng B, Dong Y, Li T, Xie Z, Zhang Y (2014) Time-dependent effects of anesthetic isoflurane on reactive oxygen species levels in HEK-293 cells. *Brain Sciences* 4 (2): 311-320.
73. Mudgal V, Madaan N, Mudgal A, Singh RB, Mishra S (2010) Effect of toxic metals on human health. *The Open Nutraceuticals Journal* 3 (1).
74. Jomova K, Valko M (2011) Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 283 (2–3): 65–87.

75. Rai PK, Lee SS, Zhang M, Tsang YF, Kim KH (2019) Heavy metals in food crops: Health risks, fate, mechanisms, and management. *Environment International* 125: 365-385.
76. Neal AP, Guilarte TR (2013) Mechanisms of lead and manganese neurotoxicity. *Toxicology Research (Camb)* 2 (2): 99-114.
77. Jan AT, Azam M, Siddiqui K, Ali A, Choi I, Haq QMR (2015) Heavy Metals and Human Health: Mechanistic Insight into Toxicity and Counter Defense System of Antioxidants. *International Journal of Molecular Sciences* 16 (12): 29592-29630.
78. Balali-Mood M, Naseri K, Tahergorabi Z, Khazdair MR, Sadeghi M (2021) Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic. *Frontiers in Pharmacology* 12: 643972.
79. Yanatori I, Kishi F (2019) DMT1 and iron transport. *Free Radical Biology and Medicine* 133: 55-63.
80. Arredondo M, Martinez R, Nunez MT, Ruz M, Olivares M (2006) Inhibition of iron and copper uptake by iron, copper and zinc. *Biological Research* 39 (1): 95-102.
81. Fu Z, Xi S (2020) The effects of heavy metals on human metabolism. *Toxicology Mechanisms and Methods* 30 (3): 167-176.
82. Joneidi Z, Mortazavi Y, Memari F, Roointan A, Chahardouli B, Rostami S (2019) The impact of genetic variation on metabolism of heavy metals: Genetic predisposition? *Biomedicine & Pharmacotherapy* 113: 108642.
83. Loréal O, Cavey T, Bardou-Jacquet E, Guggenbuhl P, Ropert M, Brissot P (2014) Iron, hepcidin, and the metal connection. *Frontiers in Pharmacology* 5: 128.
84. Magelsir HMI (2016) Heavy metal toxicity-metabolism, absorption, distribution, excretion and mechanism of toxicity for each of the metals. *World News of Natural Sciences* (4): 20-32.
85. Bhargava P, Gupta N, Vats S, Goel R (2017) Health issues and heavy metals. *Austin Journal of Environmental Toxicology* 3 (1): 3018.
86. Cao S, Duan X, Zhao X, Ma J, Dong T, Huang N, Sun C, He B, Wei F (2014) Health risks from the exposure of children to As, Se, Pb and other heavy metals near the largest coking plant in China. *Science of the Total Environment* 472: 1001-1009.
87. Yiannikourides A, Latunde-Dada GO (2019). A short review of iron metabolism and pathophysiology of iron disorders. *Medicines* 6 (3): 85.
88. Pasricha SR, Tye-Din J, Muckenthaler MU, Swinkels DW (2021) Iron deficiency. *The Lancet* 397 (10270): 233-248.

89. El Sayed SM, Abou-Taleb A, Mahmoud HS, Baghdadi H, Maria RA, Ahmed NS, Nabo MMH (2014) Percutaneous excretion of iron and ferritin (through Al-hijamah) as a novel treatment for iron overload in beta-thalassemia major, hemochromatosis and sideroblastic anemia. *Medical Hypotheses* 83 (2): 238-246.
90. Viollier E, Inglett PW, Hunter K, Roychoudhury AN, Van Cappellen P (2000) The ferrozine method revisited: Fe (II)/Fe (III) determination in natural waters. *Applied Geochemistry* 15 (6): 785-790.
91. Tagliabue A, Bowie AR, Boyd PW, Buck KN, Johnson KS, Saito MA (2017) The integral role of iron in ocean biogeochemistry. *Nature* 543 (7643): 51-59.
92. Shaked Y, Lis H (2012) Disassembling iron availability to phytoplankton. *Frontiers in Microbiology* 3: 123.
93. Gropper SS, Smith JL (2013) *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. 6th ed. Wadsworth; Belmont, CA, USA: 481.
94. Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T, Torimoto Y, Kato J (2008) Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *International Journal of Hematology* 88 (1): 7–15.
95. Papanikolaou G, Pantopoulos K (2005) Iron metabolism and toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 202 (2): 199-211.
96. Powers JM, Buchanan GR (2019) Disorders of iron metabolism: new diagnostic and treatment approaches to iron deficiency. *Hematology/Oncology Clinics* 33 (3): 393-408.
97. Wittenberg JB, Wittenberg BA (2003) Myoglobin function reassessed. *Journal of Experimental Biology* 206 (12): 2011-2020.
98. Bani-Ahmad M, Ahmad M, Obeidat M, Barqawi M (2022) The modulation of Plasma Levels of Dopamine, Serotonin, and Brain-derived neurotrophic factor in response to variation in iron availability. *Acta Biomedica* 93 (6): 2022293
99. Lill R, Mühlenhoff U (2008) Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annual Review of Biochemistry* 77: 669-700.
100. Shander A, Berth U, Betta J, Javidroozi M (2012) Iron overload and toxicity: implications for anesthesiologists. *Journal of Clinical Anesthesia* 24 (5): 419-25.
101. Silva B, Faustino P (2015) An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies. *Biochimica et Biophysica Acta* 1852 (7): 1347-59.

102. Somsook E, Hinsin D, Buakhrong P, Teanchai R, Mophan N, Pohmakotr M, Shiowatana J (2005) Interactions between iron (III) and sucrose, dextran, or starch in complexes. *Carbohydrate Polymers* 61 (3): 281-287.
103. Cairo G, Recalcati S, Mantovani A, Locati M (2011) Iron trafficking and metabolism in macrophages: contribution to the polarized phenotype. *Trends in Immunology* 32 (6): 241-247.
104. Gkouvatzos K, Papanikolaou G, Pantopoulos K (2012) Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1820 (3): 188-202.
105. Ganz T, Nemeth E (2012) Hepcidin and iron homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1823 (9): 1434-1443.
106. Kassebaum NJ, Jasrasaria R, Naghavi M, Wulf, SK, Johns N, Lozano R, Regan M, Weatherall D, Chou DP, Eisele TP, Flaxman SR, Pullan RL, Brooker SJ, Murray CJ (2014) A systematic analysis of global anemia burden from 1990 to 2010. *Blood* 123 (5): 615-624.
107. Pietrangelo A (2002) Physiology of iron transport and the hemochromatosis gene. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 282 (3): 403-414.
108. Papanastasiou DA, Vayenas DV, Vassilopoulos A, Repanti M (2000) Concentration of iron and distribution of iron and transferrin after experimental iron overload in rat tissues in vivo: study of the liver, the spleen, the central nervous system and other organs. *Journal of Pathology Research and Practice* 196 (1): 47-54.
109. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, Beaumont C, Kahn A, Vaulont S (2002) The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *The Journal of Clinical Investigation* 110 (7): 1037-1044.
110. Kotla NK, Dutta P, Parimi S, Das NK (2022) The role of ferritin in health and disease: recent advances and understandings. *Metabolites* 12 (7): 609.
111. Kulaksiz H, Gherke DG, Rost A, Janetzko D, Kallinowski T, Bruckner B (2004) Prohepcidin: expression and cell specific localisation in the liver and its regulation in hereditary haemochromatosis, chronic renal insufficiency, and renal anemia. *Gut* 53 (5): 735-43.
112. Valore E, Ganz T (2008) Posttranslational processing of hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormon convertase furin. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 40 (1): 132-38.



113. De Domenico I, McVey WD, Langelier C, Vaughn MB, Nemeth E, Wesley C (2007) The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation. *Molecular Biology of the Cell* 18 (7): 2569-78.
114. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM (2004) Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 306 (5704): 2090-93.
115. Ganz T (2005) Hepcidin—a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 18 (2): 171-182.
116. Meynard D, Babitt JL, Lin HY (2014) The liver: conductor of systemic iron balance. *Blood* 123 (2): 168-76.
117. Nemeth E, Ganz T (2009) The role of hepcidin in iron metabolism. *Acta Haematologica* 122 (2-3): 78-86.
118. Kautz L, Jung G, Valore EV, Rivella S, Nemeth E, Ganz T (2014) Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nature Genetics* 46 (7): 678-684.
119. Lee P, Peng H, Gelbart T, Beutler E (2004) The IL-6 and lipopolysaccharide-induced transcription of hepcidin in HFE, transferrin receptor 2 and beta-2-microglobulin-deficient hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (25): 9263-5.
120. Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichenstein A, Ganz T (2003) Hepcidin, putative mediator of anemia of inflammation, is type II acute-phase protein. *Blood* 101 (7): 2461-3.
121. Kemna EP, Nemeth E, van der Hoeven H, Pickkers S, Swinkels D (2005) Time course analysis of hepcidin, serum iron, and plasma cytokine levels in humans injected with LPS. *Blood* 106 (5): 1864-6.
122. Sangwaiya A, Manglam V, Busbridge M, Thursz M, Arnold J (2011) Blunted increase in serum hepcidin as response to oral iron in HFE-hemochromatosis. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 23 (8): 721-4.
123. Anderson GJ, Frazer DM, McKie AT, Vulpe CD, Smith A (2006) Mechanisms of haem and non-haem iron absorption: Lessons from inherited disorders of iron metabolism. *Biometals* 18 (4): 339-48.
124. Meynard D, Babitt JL, Lin HY (2014) The liver: conductor of systemic iron balance. *Blood* 123: 168-76.

125. Kweon OJ, Youn YC, Lim YK, Lee MK, Kim HR (2019) Clinical utility of serum hepcidin and iron profile measurements in Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences* 403: 85-91.
126. Duce JA, Tsatsanis A, Cater MA (2010) Iron-export ferroxidase activity of  $\beta$ -amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer's disease. *Cell* 142 (6): 857–867.
127. Daher R, Manceau H, Karim Z (2017) Iron metabolism and the role of the iron-regulating hormone hepcidin in health and disease. *La Presse Médicale* 46 (12): 272-278.
128. Wang SM, Fu LJ, Duan XL, Crooks DR, Yu P, Qian ZM, Di XJ, Li J, Rouault TA, Chang YZ (2010) Role of hepcidin in murine brain iron metabolism. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67 (1): 123–133.
129. Rogers JT, Randall JD, Cahill CM, Eder PS, Huang X, Gunshin H, Leiter L, McPhee J, Sarang SS, Utsuki T, Greig NH, Lahiri DK, Tanzi RE, Bush AI, Giordano T, Gullans SR (2002) An iron-responsive element type II in the 52-untranslated region of the Alzheimer's amyloid precursor protein transcript. *Journal of Biological Chemistry* 277 (47): 45518–45528.
130. Willem M, Tahirovic S, Busche MA, Ovsepian SV, Chafai M, Kootar S, Haass C (2015)  $\eta$ -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature* 526 (7573): 443-447.
131. Collingwood JF, Chong RKK, Kasama T, Cervera-Gontard L, Dunin-Borkowski R, Perry G, Pósfai M, Siedlak SL, Simpson ET, Smith MA, Dobson J (2008) Three-dimensional tomographic imaging and characterization of iron compounds within Alzheimer's plaque core material. *Journal of Alzheimer's Disease* 14 (2): 235–245.
132. Khanahmadi M, Farhud DD, Malmir M, Orang S (2016) Some Biochemical Markers in Patients with Alzheimer's Disease. *Iranian Journal of Public Health* 45 (10): 1355.
133. Koorts AM, Viljoen M (2007) Ferritin and ferritin isoforms I: Structure-function relationships, synthesis, degradation and secretion. *Archives of Physiology and Biochemistry* 113 (1): 30–54.
134. Park E, Chung SW (2019) ROS-mediated autophagy increases intracellular iron levels and ferroptosis by ferritin and transferrin receptor regulation. *Cell Death & Disease* 10 (11): 822.

135. Ayton S, Faux NG, Bush A I (2015) Ferritin levels in the cerebrospinal fluid predict Alzheimer's disease outcomes and are regulated by APOE. *Nature Communications* 6 (1): 6760.
136. Tang D, Kroemer G (2020) Ferroptosis. *Current Biology* 30 (21): 1292-1297.
137. Jakaria M, Belaidi AA, Bush AI, Ayton S (2021) Ferroptosis as a mechanism of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* 159 (5): 804-825.
138. Exley C, House E (2011) Aluminium in the human brain. *Monatshefte für Chemie* 142: 357–363.
139. Liang RF, Li WQ, Wang XH, Zhang HF, Wang H, Wang JX, Zhang Y, Wan MT, Pan BL, Niu Q (2012) Aluminium – Maltolate - Induces Impairment of Learning, Memory and Hippocampal Long-term Potentiation in Rats. *Industrial Health* 50 (5): 428-436.
140. Verstraeten SV, Aimo L, Oteiza PI (2008) Aluminium and lead: molecular mechanisms of brain toxicity. *Archives of Toxicology* 82 (11): 789-802.
141. Stahl T, Taschan H, Brunn H (2011) Aluminium content of selected foods and food products. *Environmental Sciences Europe* 23 (37): 1-11.
142. Alasfar RH, Isaifan RJ (2021) Aluminum environmental pollution: the silent killer. *Environmental Science and Pollution Research* 28 (33): 44587-44597.
143. Rahimzadeh MR, Rahimzadeh MR, Kazemi S, Amiri RJ, Pirzadeh M, Moghadamnia AA (2022) Aluminum Poisoning with Emphasis on Its Mechanism and Treatment of Intoxication. *Emergency Medicine International* 1480553.
144. Cannata-Andía JB, Fernández-Martín JL (2002) The clinical impact of aluminium overload in renal failure. *Nephrology Dialysis Transplantation* 17 (2): 9-12.
145. Krewski D, Yokel RA, Nieboer E, Borchelt D, Cohen J, Harry J, Kacew S, Lindsay J, Mahfouz AM, Rondeau V (2007) Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 10 (1): 251–269.
146. Valkonen S, Aitio A (1997) Analysis of aluminum in serum and urine for the biomonitoring of occupational exposure. *Science of the Total Environment* 199 (1-2): 103–110.
147. Chen BB, Zeng Y, Hu B (2010) Study on speciation of aluminum in human serum using zwitterionic bile acid derivative dynamically coated C18 column HPLC separation with UV and on-line ICP-MS detection. *Talanta* 81 (1-2): 180–186.

148. Exley C (2013) Human exposure to aluminium. *Environmental Science: Processes & Impacts* 15 (10): 1807-1816.
149. Igbokwe IO, Igwenagu E, Igbokwe NA (2019) Aluminium toxicosis: a review of toxic actions and effects. *Interdisciplinary Toxicology* 12 (2): 45.
150. Botté A, Zaidi M, Guery J, Fichet D, Leignel V (2022) Aluminium in aquatic environments: abundance and ecotoxicological impacts. *Aquatic Ecology* 56 (3): 751-773.
151. 151. Malakoff D (2000) Aluminum is put on trial as a vaccine booster. *Science* 288 (5479): 1323–1234.
152. Sanajou S, Şahin G, Baydar T (2021) Aluminium in cosmetics and personal care products. *Journal of Applied Toxicology* 41 (11): 1704-1718.
153. Soni MG, White SM, Flamm WG, Burdock GA (2001) Safety evaluation of dietary aluminum. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 33 (1): 66–79.
154. Saiyed SM, Yokel RA (2005). Aluminum content of some foods and food products in the USA, with aluminum food additives. *Food Additives & Contaminants* 22 (3): 234–244.
155. Drüeke TB (2002) Intestinal absorption of aluminium in renal failure. *Nephrology Dialysis Transplantation* 17 (2): 13-16.
156. Hemadi M, Miquel G, Kahn PH, Chahine JME (2003) Aluminum exchange between citrate and human serum transferrin and interaction with transferrin receptor 1. *Biochemistry* 42 (10): 3120–3130.
157. Harris WR, Messori L (2002) A comparative study of aluminum (III), gallium (III), indium (III), and thallium (III) binding to human serum transferrin. *Coordination Chemistry Reviews* 228 (2): 237–262.
158. Peto MV (2010) Aluminium and iron in humans: bioaccumulation, pathology, and removal. *Rejuvenation Research* 13 (5): 589-598.
159. Anon (2008b) Safety of aluminium from dietary intake. *EFSA Journal* 754: 1–34.
160. Bryliński Ł, Kostelecka K, Woliński F, Duda P, Góra J, Granat M, Baj J (2023) Aluminium in the Human Brain: Routes of Penetration, Toxicity, and Resulting Complications. *International Journal of Molecular Sciences* 24 (8): 7228.
161. Anon (2011) On the evaluation of a new study to the bioavailability of aluminium in food. *EFSA Journal* 9: 1–16.

162. Shirley DG, Lote CJ (2005) Renal Handling of Aluminium. *Nephron Physiology* 101 (4): 99–103.
163. Vittori D, Garbossa G, Lafourcade C, Pérez G, Nesse A (2002) Human erythroid cells are affected by aluminium. Alteration of membrane band 3 protein. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes* 1558 (2): 142–150.
164. D'Souza SP, Vijayalaxmi KK, Prashantha N (2014) Assessment of genotoxicity of aluminium acetate in bone marrow, male germ cells and fetal cells of Swiss albino mice. *Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 766: 16–22.
165. Flarend R, Bin T, Elmore D, Hem SL (2001) A preliminary study of the dermal absorption of aluminium from antiperspirants using aluminium-26. *Food and Chemical Toxicology* 39 (2): 163-168.
166. Osman HM, Shayoub ME, Babiker EM, Osman B, Elhassan AM (2012) Effect of ethanolic leaf extract of *Moringa oleifera* on aluminum-induced anemia in white albino rats. *Jordan Journal of Biological Sciences* 5: 255–260.
167. Oztürk B, Ozdemir S (2015) Effects of aluminum chloride on some trace elements and erythrocyte osmotic fragility in rats. *Toxicology and Industrial Health* 31 (12): 1069-1077.
168. Perez G, Garbossa G, Nesse A (2001) Disturbance of cellular iron uptake and utilization by aluminum. *Journal of Inorganic Biochemistry* 87 (1-2): 21–27.
169. Bazzoni GB, Bollini AN, Hernández GN, Contini MC, Rasia ML (2005) In vivo effect of aluminium upon the physical properties of the erythrocyte membrane *Journal of Inorganic Biochemistry* 99 (3): 822–827.
170. Vittori D, Pregi N, Pérez G, Garbossa G, Nesse A (2005) The distinct erythropoietin functions that promote cell survival and proliferation are affected by aluminum exposure through mechanisms involving erythropoietin receptor. *Biochimica et Biophysica Acta* 1743 (1–2): 29–36.
171. Niemoeller OM, Kiedaisch V, Dreischer P, Wieder T, Lang F (2006) Stimulation of eryptosis by aluminum ions. *Toxicology and Applied Pharmacology* 217 (2): 168–175.
172. Hernández G, Bollini A, Huarte M, Bazzoni G, Piehl L, Chiarotto M, Rubin de Celis E, Rasia M (2008) In vitro effect of aluminium upon erythrocyte membrane properties. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 40 (3): 191–205.

173. Sadhana S (2011) S-Allyl-Cysteines reduce amelioration of aluminum induced toxicity in rats. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 7: 74–83.
174. Vota DM, Crisp RL, Nesse AB, Vittori DC (2012) Oxidative stress due to aluminum exposure induces eryptosis which is prevented by erythropoietin. *Journal of Cellular Biochemistry* 113 (5): 1581–1589.
175. Lukyanenko LM, Skarabhatava AS, Slobozhanina EI, Kovaliova SA, Falcioni ML (2013) In vitro effect of AlCl<sub>3</sub> on human erythrocytes: changes in membrane morphology and functionality. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 27 (2): 160–167.
176. Al-Qayim MAJ, Ghali LS, Al-Azwai TS (2014) Comparative effects of propolis and malic acid on hematological parameters of aluminum exposed male rats. *Global Journal of Bio-Science and BioTechnology* 3: 6–11.
177. Afolabi OK, Oyewo EB, Adeleke GE, Badmus JA, Wusu AD (2019) Mitigation of aluminium phosphide-induced hematotoxicity and ovarian oxidative damage in Wistar Rats by Hesperidin. *American Journal of Biochemistry* 9 (1): 7-16.
178. Zhang Q, Cao Z, Sun X, Zuang C, Huang W, Li Y (2016) Aluminum trichloride induces hypertension and disturbs the function of erythrocyte membrane in male rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 171 (1): 116–123.
179. Cheng D, Tang J, Wang X, Zhang X, Wang S (2018) Effect of aluminum (Al) speciation on erythrocytic antioxidant defense process: Correlations between lipid membrane peroxidation and morphological characteristics. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 157: 201–206.
180. Hernandez G, Bollini A, Huarte M, Bazzoni G, Piehl L, Chiarotto M, Rasia M (2008) In vitro effect of aluminium upon erythrocyte membrane properties. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 40 (3): 191-205.
181. Niedworok J, Fijałkowski P (2004) Effect of long-term aluminium chloride intoxication on selected biochemical parameters and oxidative--antioxidative balance in experimental animals. *Polish Journal of Environmental Studies* 13 (1): 41-3.
182. Yousef MI (2004) Aluminium-induced changes in hemato-biochemical parameters, lipid peroxidation and enzyme activities of male rabbits: protective role of ascorbic acid. *Toxicology* 199 (1): 47-57.
183. Farina M, Rotta LN, Soares FA, Jardim F, Jacques R, Souza DO, Rocha JB (2005) Hematological changes in rats chronically exposed to oral aluminum. *Toxicology* 209 (1): 29–37.

184. Lin CY, Hsiao WC, Huang CJ, Kao CF, Hsu GS (2013) Heme oxygenase-1 induction by ROS-JNK pathway plays a role in aluminum-induced anemia. *Journal of Inorganic Chemistry* 128: 221–228.
185. Zhang L, Lin X, Gu Q, Zhu Y, Zhao H, Li Y, Zhang Z (2010) Effects of subchronic aluminum exposure on serum concentrations of iron and iron-associated proteins in rats. *Biological Trace Element Research* 141 (1–3): 246–253.
186. Arnold SE, Arvanitakis Z, Macauley-Rambach SL, Koenig AM, Wang H, Ahima RS, Craft S, Gandy S, Buettner C, Stoeckel LE, Holtzman DM, Nathan DM (2018) Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer's disease: concept and conundrums. *Nature Reviews Neurology* 14 (3): 168–181.
187. Bazzari F, Abdallah DM, El-Abhar HS (2019) Chenodeoxycholic acid ameliorates AlCl<sub>3</sub>-induced Alzheimer's disease neurotoxicity and cognitive deterioration via enhanced insulin signaling in rats. *Molecules* 24 (10): 1992.
188. Ward RJ, Zhang Y, Crichton RR (2001) Aluminium toxicity and iron homeostasis. *Journal of Inorganic Biochemistry* 87 (1-2): 9-14.
189. Lane DJ, Ayton S, Bush AI (2018) Iron and Alzheimer's disease: an update on emerging mechanisms. *Journal of Alzheimer's Disease* 64 (1): 379-395.
190. Fu Z, Xi S (2020) The effects of heavy metals on human metabolism. *Toxicology Mechanisms and Methods* 30 (3): 167-176.
191. Leonard SS, Harris GK, Shi X (2004) Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine* 37 (12): 1921-42.
192. Hsu PC, Guo YL (2002) Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology* 180 (1): 33-44
193. Liochev SI, Fridovich I (2002) The Haber-Weiss cycle—70 years later: an alternative view. *Redox Report* 7 (1): 55-57.
194. Bondy SC (2021) Metal toxicity and neuroinflammation. *Current Opinion in Toxicology* 26: 8-13.
195. Li B, Xia M, Zorec R, Parpura V, Verkhratsky A (2021) Astrocytes in heavy metal neurotoxicity and neurodegeneration. *Brain Research* 1752: 147234.
196. Sun Q, Li Y, Shi L, Hussain R, Mehmood K, Tang Z, Zhang H (2022) Heavy metals induced mitochondrial dysfunction in animals: Molecular mechanism of toxicity. *Toxicology* 469: 153136.

197. Kawahara M, Kato-Negishi M (2011) Link between aluminium and the pathogenesis of Alzheimer's disease: the integration of the aluminium and amyloid cascade hypotheses. *International Journal of Alzheimer's Disease* 2011: 17.
198. Maya S, Prakash T, Madhu KD, Goli D (2016) Multifaceted effects of aluminium in neurodegenerative diseases: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 83: 746-754.
199. Vasudevaraju P, Govindaraju M, Palanisamy AP, Sambamurti K, Rao KSJ (2008) Molecular toxicity of aluminium in relation to neurodegeneration. *Indian Journal of Medical Research* 128 (4): 545-556.
200. Exley C, Clarkson E (2020) Aluminium in human brain tissue from donors without neurodegenerative disease: A comparison with Alzheimer's disease, multiple sclerosis and autism. *Scientific Reports* 10 (1): 7770.
201. Arain MS, Afridi HI, Kazi TG, Talpur FN, Arain MB, Kazi A, Arain SA, Ali J (2015) Correlation of aluminum and manganese concentrations in scalp hair samples of patients having neurological disorders. *Environmental Monitoring and Assessment* 187 (2): 10.
202. Jones K, Linhart C, Haekin C, Exley C (2017) Urinary excretion of aluminium and silicon in secondary progressive multiple sclerosis. *EBioMedicine Journal* 26: 60–67.
203. Mirza A, King A, Troakes C, Exley C (2017) Aluminium in brain tissue in familial Alzheimer's disease. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 40: 30–36.
204. Mold M, Umar D, King A, Exley C (2018) Aluminium in brain tissue in autism. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 46: 76–82.
205. Nam SM, Kim JW, Yoo DY, Jung HY, Choi JH, Hwang IK, Seong JK, Yoon YS (2016) Reduction of adult hippocampal neurogenesis is amplified by aluminium exposure in a model of type 2 diabetes. *Journal of Veterinary Science* 17 (1): 13–20.
206. Pratico D, Uryu K, Sung S, Tang S, Trojanowski JQ, Lee VM (2002) Aluminum modulates brain amyloidosis through oxidative stress APP transgenic mice. *FASEB Journal* 16 (9): 1138–1140.
207. Campbell A, Bondy SC (2000) Aluminum induced oxidative events and its relation to inflammation: a role for the metal in Alzheimer's disease. *Cellular and Molecular Biology* 46 (4): 721–730.



208. Chen Z, Zhong C (2014) Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neuroscience Bulletin* 30 (2): 271–281.
209. Liaquat L, Sadir S, Batool Z, Tabassum S, Shahzad S, Afzal A, Haider S (2019) Acute aluminum chloride toxicity revisited: study on DNA damage and histopathological, biochemical and neurochemical alterations in rat brain. *Life Sciences* 217: 202–211.
210. Carocci A, Catalano A, Sinicropi MS, Genchi G (2018) Oxidative stress and neurodegeneration: the involvement of iron. *Biometals* 31 (5): 715-735.
211. Anders A, Gilbert S, Garten W, Postina R, Fahrenholz F (2001) Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and pro-protein convertases. *FASEB Journal* 15 (10): 1837–9.
212. Hwang EM, Kim SK, Sohn JH, Lee JY, Kim Y, Kim YS, Mook-Jung I (2006) Furin is an endogenous regulator of alpha-secretase associated APP processing. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 349 (2): 654–9.
213. Silvestri L, Camaschella C (2008) A potential pathogenetic role of iron in Alzheimer's disease. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 12 (5a): 1548-1550.
214. Zhang Y, Gao X, Bai X, Yao S, Chang YZ, Gao G (2022) The emerging role of furin in neurodegenerative and neuropsychiatric diseases. *Translational Neurodegeneration* 11 (1): 39.
215. Jiang C, Li G, Huang P, Liu Z, Zhao B (2017) The gut microbiota and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 58 (1): 1-15.
216. Hippus H, Neundörfer G (2003) The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 5 (1): 101-108.
217. Zhang XX, Tian Y, Wang ZT, Ma YH, Tan L, Yu JT (2021) The epidemiology of Alzheimer's disease modifiable risk factors and prevention. *Journal of Prevention of Alzheimer's Disease* 8 (3): 313-321.
218. Tahami Monfared AA, Byrnes MJ, White LA, Zhang Q (2022) Alzheimer's disease: epidemiology and clinical progression. *Neurology and Therapy* 11 (2): 553-569.
219. Luy M, Minagawa Y (2014) Gender gaps life expectancy and proportion of life in poor health. *Health Reports* 25 (12): 12–9.
220. Wimo A, Guerchet M, Ali GC, Wu YT, Prina AM, Winblad B, Jonsson L, Liu Z, Prince M (2017) The worldwide costs of dementia 2015 and comparisons with 2010. *Alzheimer's & Dementia* 13 (1): 1–7.

221. Adlimoghaddam A, Roy B, Albeni BC (2018) Future Trends and the Economic Burden of Dementia in Manitoba: Comparison with the Rest of Canada and the World. *Neuroepidemiology* 51 (1-2): 71–81.
222. Lam K, Pan K, Linnekamp JF, Medema JP, Kandimalla R (2016) DNA methylation based biomarkers in colorectal cancer: A systematic review. *Biochimica et Biophysica Acta* 1866 (1): 106–20.
223. Villemagne VL, Burnham S, Bourgeat P, Brown B, Ellis KA, Salvado O, Szoeki C, Macaulay SL, Martins R, Maruff P, Ames D, Rowe CC, Masters CL (2013) Amyloid  $\beta$  deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study. *Lancet Neurology* 12 (4): 357–67.
224. Radak D, Resanovic I, Isenovic ER (2014) Link between oxidative stress and acute brain ischemia. *Angiology* 65 (8): 667-676.
225. Chin-Chan M, Navarro-Yepes J, Quintanilla-Vega B (2015) Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: alzheimer and Parkinson diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9: 124.
226. Ramachandran S, Sanjay S, Dhanaraju M (2013) Antiamnesic effect of Piracetam potentiated with *Embllica officinalis* and *Curcuma longa* in aluminium induced neurotoxicity of Alzheimer's disease. *International Journal of Advanced Research* 1: 185–96.
227. De-Paula VJ, Radanovic M, Diniz BS, Forlenza OV (2012) Alzheimer's disease. *Sub-cellular Biochemistry* 65: 329–352
228. Tosun D, Landau S, Aisen PS, Petersen RC, Mintun M, Jagust W, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2017) Association between tau deposition and antecedent amyloid- $\beta$  accumulation rates in normal and early symptomatic individuals. *Brain* 140 (5): 1499-1512.
229. Mahdi O, Baharuldin MTH, Nor NHM, Chiroma SM, Jagadeesan S, Moklas MAM (2019) Chemicals used for the induction of Alzheimers disease-like cognitive dysfunctions in rodents. *Biomedical Research and Therapy* 6 (11): 3460-3484.
230. Mohandas E, Rajmohan V, Raghunath B (2009) Neurobiology of Alzheimer's disease. *Indian Journal of Psychiatry* 51 (1): 55–61.
231. Swerdlow RH, Khan SM (2004) A mitochondrial cascade hypothesis blright for sporadic Alzheimer's disease. *Medical Hypotheses* 63 (1): 8–20.
232. Swerdlow RH, Kish SJ (2002) Mitochondria in Alzheimer's disease. *International Review of Neurobiology* 53: 341–85.

233. Bubber P, Haroutunian V, Fisch G, Blass JP, Gibson GE (2005) Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: mechanistic implications. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society* 57 (5): 695-703.
234. Cottrell DA, Borthwick GM, Johnson MA, Ince PG, Turnbull DM (2002) The role of cytochrome c oxidase deficient hippocampal neurones in Alzheimer's disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 28 (5): 390-396.
235. Wegmann S, Biernat J, Mandelkow E (2021) A current view on Tau protein phosphorylation in Alzheimer's disease. *Current Opinion in Neurobiology* 69: 131-138.
236. Swerdlow RH (2007) Mitochondria in cybrids containing mtDNA from persons with mitochondriopathies. *Journal of Neuroscience Research* 85 (15): 3416–28.
237. Duan AR, Jonasson EM, Alberico EO, Li C, Scripture JP, Miller RA (2017) Interactions between tau and different conformations of tubulin: implications for tau function and mechanism. *Journal of Molecular Biology* 429 (9): 1424–38.
238. Medina M, Avila J (2014) The role of extracellular Tau in the spreading of neurofibrillary pathology. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8: 113.
239. Neselius S, Zetterberg H, Blennow K, Randall J, Wilson D, Marcusson J (2013) Olympic boxing is associated with elevated levels of the neuronal protein tau in plasma. *Brain Injury* 27 (4): 425–33.
240. Chirita CN, Congdon EE, Yin H, Kuret J (2005) Triggers of fulllength tau aggregation: a role for partially folded intermediates. *Biochemistry* 44 (15): 5862–5872.
241. Sahara N, Maeda S, Murayama M, Suzuki T, Dohmae N, Yen SH (2007) Assembly of two distinct dimers and higherorder oligomers from full-length tau. *European Journal of Neuroscience* 25 (10): 3020–3029.
242. Mondragón-Rodríguez S, Basurto-Islas G, Santa-Maria I, Mena R, Binder LI, Avila J (2008) Cleavage and conformational changes of tau protein follow phosphorylation during Alzheimer's disease. *International Journal of Experimental Pathology* 89 (2): 81–90.
243. Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Guerrero-Muñoz MJ, Jackson GR, Kaye R (2010) Preparation and characterization of neurotoxic tau oligomers. *Biochemistry* 49 (47): 10039– 10041.

244. 244. Patterson KR, Remmers C, Fu Y, Brooker S, Kanaan NM, Vana L (2011) Characterization of prefibrillar tau oligomers in vitro and in Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry* 286 (26): 23063– 23076.
245. Gerson JE, Castillo-Carranza DL, Kaye R (2014) Advances in therapeutics for neurodegenerative tauopathies: moving toward the specific targeting of the most toxic tau species. *ACS Chemical Neuroscience* 5 (9): 752–69.
246. Guerrero-Muñoz MJ, Gerson J, Castillo-Carranza DL (2015) Tau Oligomers: The Toxic Player at Synapses in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9: 464.
247. Giacobini E, Gold G (2013) Alzheimer disease therapy moving from amyloid- $\beta$  to tau. *Nature Reviews Neurology* 9 (12): 677–86.
248. Brier MR, Gordon B, Friedrichsen K, McCarthy J, Stern A, Christensen J, Ances BM (2016) Tau and A $\beta$  imaging, CSF measures, and cognition in Alzheimer's disease. *Science Translational Medicine* 8 (338): 338-66.
249. Kadavath H, Hofele RV, Biernat J, Kumar S, Tepper K, Urlaub H, Zweckstetter M (2015) Tau stabilizes microtubules by binding at the interface between tubulin heterodimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (24): 7501-7506.
250. 250. Sündermann F, Fernandez MP, Morgan RO (2016) An evolutionary roadmap to the microtubule-associated protein MAP Tau. *BMC Genomics* 17: 1-16.
251. Iqbal K, Liu F, Gong C, Grundke-Iqbal I (2010) Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Current Alzheimer Research* 7 (8): 656-664.
252. Armstrong RA (2009) The molecular biology of senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Folia Neuropathologica* 47 (4): 289-299.
253. Jacobs HI, Hopkins DA, Mayrhofer HC, Bruner E, van Leeuwen FW, Raaijmakers W, Schmahmann JD (2018) The cerebellum in Alzheimer's disease: evaluating its role in cognitive decline. *Brain* 141 (1): 37-47.
254. 254. Tanzi RE, Bertram L (2005) Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* 120 (4): 545-555.
255. Murphy MP, LeVine III H (2010) Alzheimer's disease and the  $\beta$ -amyloid peptide. *Journal of Alzheimer's Disease* 19 (1): 1-17.
256. Skovronsky DM, Lee VM, Trojanowski JQ (2006) Neurodegenerative diseases: new concepts of pathogenesis and their therapeutic implications. *Annual Review of Pathology* 1 (1):151–70.

257. Golde ET, Eckmann BC, Younkin SG (2000) Biochemical detection of A $\beta$  isoforms: implications for pathogenesis, diagnosis and treatment of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1502 (1): 172–187.
258. Sanchez-Varo R, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, De Castro V, Jimenez S, Ruano D, Vizueté M, Davila JC, Verdugo JMC, Jimenez AJ, Victorica J, Gutierrez A (2012) Abnormal accumulation of autophagic vesicles correlates with axonal and synaptic pathology in young Alzheimer's mice hippocampus. *Acta Neuropathologica* 123 (1): 53–70.
259. Marszałek M (2016) Alzheimer's disease against peptides products of enzymatic cleavage of APP protein. Forming and variety of fibrillating peptides—some aspects. *Advances in Hygiene and Experimental Medicine* 70: 787-796.
260. Butterfield DA, Drake J, Pocernich C, Castegna A (2001) Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid  $\beta$ -peptide. *Trends in Molecular Medicine* 7 (12): 548-554.
261. Maurer K, Volk S, Gerbaldo H (1997) Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet* 349: 1546-549.
262. Dong S, Duan Y, Hu Y, Zhao Z (2012) Advances in the pathogenesis of Alzheimer's disease: a re-evaluation of amyloid cascade hypothesis. *Translational Neurodegeneration* 1 (1): 18.
263. Zhu X, Perry G, Moreira PI, Aliev G, Cash AD, Hirai K, Smith MA (2006) Mitochondrial abnormalities and oxidative imbalance in Alzheimer disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 9 (2): 147-153.
264. Cardoso SM, Proença, MT, Santos S, Santana I, Oliveira CR (2004) Cytochrome c oxidase is decreased in Alzheimer's disease platelets. *Neurobiology of Aging* 25 (1): 105-110.
265. Ding Q, Martin S, Dimayuga E, Bruce-Keller AJ, Keller JN (2006) LMP2 knock-out mice have reduced proteasome activities and increased levels of oxidatively damaged proteins. *Antioxidants & Redox Signaling* 8 (1-2): 130–135.
266. Hampel H, Mesulam MM, Cuelllo AC, Khachaturian AS, Vergallo A, Farlow M R, Cholinergic System Working Group and for the Alzheimer Precision Medicine Initiative (APMI) (2019) Revisiting the cholinergic hypothesis in Alzheimer's disease: emerging evidence from translational and clinical research. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease* 6 (1): 2-15.

267. Terry AV, Buccafusco JJ (2003) The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 306 (3): 821–7.
268. Haam J, Yakel JL (2017) Cholinergic modulation of the hippocampal region and memory function. *Journal of Neurochemistry* 142 (2): 111-121.
269. Klinkenberg I, Sambeth A, Blokland A (2011) Acetylcholine and attention. *Behavioural Brain Research* 221 (2): 430-442.
270. Terry Jr AV, Callahan PM (2019) Nicotinic acetylcholine receptor ligands, cognitive function, and preclinical approaches to drug discovery. *Nicotine and Tobacco Research* 21 (3): 383-394.
271. Pepeu G, Giovannini MG (2004) Changes in acetylcholine extracellular levels during cognitive processes. *Learning & Memory* 11 (1): 21-27.
272. Hasselmo ME (2006) The role of acetylcholine in learning and memory. *Current Opinion in Neurobiology* 16 (6): 710-715.
273. Šipicki S, Rajić Džolić Z (2017) Terapija Alzheimerove bolesti: sadašnjost i budućnost. *Farmaceutski glasnik* 73 (9): 603-612.
274. Pasqualetti G, Tognini S, Calsolaro V, Polini A, Monzani F (2015) Potential drug–drug interactions in Alzheimer patients with behavioral symptoms. *Clinical Interventions in Aging* 10: 1457-1466.
275. Manoharan S, Guillemin GJ, Abiramasundari RS, Essa MM, Akbar M, Akbar MD (2016) The role of reactive oxygen species in the pathogenesis of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and Huntington's disease: a mini review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016: 8590578.
276. Chen R, Lai UH, Zhu L, Singh A, Ahmed M, Forsyth NR (2018) Reactive oxygen species formation in the brain at different oxygen levels: the role of hypoxia inducible factors. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 6: 132.
277. Gibson GL, Allsop D, Austen BM (2004) Induction of cellular oxidative stress by the beta-amyloid peptide involved in Alzheimer's disease. *Protein & Peptide Letters* 11 (3): 257–70.
278. Abdul HM, Sultana R, Keller JN, Clair DKS, Markesbery WR, Butterfield DA (2006) Mutations in amyloid precursor protein and presenilin-1 genes increase the basal oxidative stress in murine neuronal cells and lead to increased sensitivity to oxidative

- stress mediated by amyloid beta-peptide (1-42), HO and kainic acid: implications for Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* 96 (5): 1322–35.
279. Butterfield DA, Reed T, Newman SF, Sultana R (2007) Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free Radical Biology and Medicine* 43 (5): 658–77.
280. Sultana R, Butterfield DA (2008) Redox proteomics studies of in vivo amyloid beta-peptide animal models of Alzheimer's disease: insight into the role of oxidative stress. *Proteomics Clinical Applications* 2 (5): 685–96.
281. Cheignon C, Tomas M, Bonnefont-Rousselot D, Faller P, Hureau C, Collin F (2018) Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biology* 14: 450–64.
282. Salim S (2017) Oxidative Stress and the Central Nervous System. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 360 (1): 201–205.
283. Cogley JN, Fiorello ML, Bailey DM (2018) 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. *Redox Biology* 15: 490–503.
284. Patki G, Solanki N, Atrooz F, Allam F, Salim S (2013) Depression, anxiety-like behavior and memory impairment are associated with increased oxidative stress and inflammation in a rat model of social stress. *Brain Research* 1539: 73-86.
285. Schippling S, Kontush A, Arlt S, Buhmann C, Stürenburg HJ, Mann U (2000) Increased lipoprotein oxidation in Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine* 28 (3): 351-360.
286. Mohsen MMAE, Iravani MM, Spencer JPE, Rose S, Fahim AT, Motawi TMK (2005) Age-associated changes in protein oxidation and proteasome activities in rat brain: Modulation by anti-oxidants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 336 (2): 386 – 391.
287. Picklo MJ, Montine TJ, Amarnath V, Neely MD (2002) Carbonyl toxicology and Alzheimer's disease. *Toxicology and Applied Pharmacology* 184 (3): 187 – 197.
288. Bassett CN, Montine TJ (2003) Lipoproteins and lipid peroxidation in Alzheimer's disease. *Journal of nutrition, health & aging* 7 (1): 24 – 29.
289. Sastre J, Pallardó FV, Viña J (2003) The role of mitochondrial oxidative stress in aging. *Free Radical Biology and Medicine* 35 (1): 1-8.

290. Lovell MA, Markesbery WR (2007) Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Research* 35 (22): 7497 – 7504.
291. Thornalley PJ (1998) Glutathione-dependent detoxification of alpha-oxoaldehydes by the glyoxalase system—involvement in disease mechanisms and antiproliferative activity of glyoxalase I inhibitors. *Chemico-Biological Interactions* 111 – 112, 137 - 151.
292. Garcia T, Esparza JL, Nogués MR, Romeu M, Domingo JL, Gómez M (2010) Oxidative stress status and RNA expression in hippocampus of an animal model of Alzheimer's disease after chronic exposure to aluminum. *Hippocampus* 20 (1): 218-225.
293. Wang H, Liu H, Liu R (2003) Gender difference in glutathione metabolism during aging in mice. *Experimental Gerontology* 38 (5): 507 – 517.
294. Casado A, Encarnación López-Fernández M, Concepción Casado M, de La Torre R (2008) Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in vascular and Alzheimer dementias. *Neurochemical Research* 33 (3): 450-458.
295. Bradley-Whitman MA, Lovell MA (2015) Biomarkers of lipid peroxidation in Alzheimer disease (AD): an update. *Archives of toxicology* 89 (7): 1035-1044.
296. Zabel M, Nackenoff A, Kirsch WM, Harrison FE, Perry G, Schrag M (2018) Markers of oxidative damage to lipids, nucleic acids and proteins and antioxidant enzymes activities in Alzheimer's disease brain: a meta-analysis in human pathological specimens. *Free Radical Biology and Medicine* 115: 351-360.
297. McGrath LT, McGleenon BM, Brennan S, McColl D, McIlroy S, Passmore AP (2001) Increased oxidative stress in Alzheimer's disease as assessed with 4-hydroxynonenal but not malondialdehyde. *Qjm* 94 (9): 485-490.
298. Tamagno E, Robino G, Obbili A, Bardini P, Aragno M, Parola M (2003) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 4-hydroxynonenal mediate amyloid beta-induced neuronal apoptosis by activating Jnos and p38MAPK. *Experimental Neurology* 180 (2): 144 – 155.
299. Wang J, Xiong S, Xie C, Markesbery WR, Lovell MA (2005) Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* 93 (4): 953-962.
300. Barzilai A, Yamamoto KI (2004) DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair* 3 (8-9): 1109-1115.



301. Mattson MP, Chan SL (2003) Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell Calcium* 34 (4-5): 385 - 397.
302. White AR, Barnham KJ, Bush AI (2006) Metal homeostasis in Alzheimer's disease. *Expert Review of Neurotherapeutics* 6 (5): 711 – 722.
303. Gella A, Durany N (2009) Oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Adhesion & Migration* 3 (1): 88-93.
304. Christen Y (2000) Oxidative stress and Alzheimer disease. *American Journal of Clinical Nutrition* 71 (2): 621–629.
305. Dua R, Gill KD (2001) Aluminium phosphide exposure: implications on rat brain lipid peroxidation and antioxidant defence system. *Pharmacology & Toxicology* 89 (6): 315-319.
306. Agostinho P, Cunha AR, Oliveira C (2010) Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Current Pharmaceutical Design* 16 (25): 2766-2778.
307. Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein D L, Kummer MP (2015) Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology* 14 (4): 388-405.
308. Simpson DS, Oliver PL (2020) ROS generation in microglia: understanding oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease. *Antioxidants* 9 (8): 743.
309. Zhang W, Gao J, Yan Z, Huang X, Guo P, Sun L, Liu Z, Hu Y, Zuo L, Yu S (2018) Minimally Toxic Dose of Lipopolysaccharide and  $\alpha$ -Synuclein Oligomer Elicit Synergistic Dopaminergic Neurodegeneration: Role and Mechanism of Microglial NOX2 Activation. *Molecular Neurobiology* 55 (1): 619–632.
310. Malnar M, Košiček M, Hećimović S (2009) Alzheimerova bolest: od molekularnog mehanizma do rane dijagnoze. *Medicina Fluminensis* 45 (3): 234-243.
311. Šimić G, Španić E, Horvat LL, Hof PR (2019) Blood-brain barrier and innate immunity in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 168: 99-145.
312. Rama Rao N, Mani Kiran SS, Prasanthi NL (2010) Pharmaceutical Impurities: An Overview. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research* 44 (3): 301-310.

313. Jayakumar T, Thomas PA, Geraldine P (2007) Protective effect of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on antioxidants of major organs of aged rats. *Experimental Gerontology* 42 (3): 183-191.
314. Tietze F (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry* 27 (3): 502-522.
315. Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105: 121-126.
316. Flohé L, Ötting F (1971) Superoxide dismutase assays. *Methods in Enzymology* 105: 70-76.
317. Griess P (1879) Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen“. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 12: 426-8.
318. Ambriović Ristov A, Brozović A, Bruvo Mađarić B, Četković H, Herak Bosnar M, Hranilović D, Katušić Hećimović S, Meštrović Radan N, Mihaljević S, Slade N, Vujaklija D (2007) Metode u molekularnoj biologiji. Institut Ruđer Bošković Zagreb.
319. Iyer RK, Yoo PK, Kern RM, Rozengurt N, Tsoa R, O'Brien WE, Yu H, Grody WW, Cederbaum SD (2002) Mouse model for human arginase deficiency. *Molecular Cell Biology* 22 (13): 4491-4498.
320. Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M (1994) Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *Journal of Immunological Methods* 174 (1-2): 231-235.
321. Rodríguez PC, Ochoa AC (2008) Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunological Reviews* 222: 180- 191.
322. 322. Campbell L, Saville CR, Murray PJ, Cruickshank SM, Hardman MJ (2013) Local arginase 1 activity is required for cutaneous wound healing. *Journal of Investigative Dermatology* 133 (10): 2461-2470.
323. Lim NKH, Villemagne VL, Soon CP, Laughton KM, Rowe CC, McLean CA, Masters CL, Evin G, Li QX (2011) Investigation of matrix metalloproteinases, MMP-2 and MMP-9, in plasma reveals a decrease of MMP-2 in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 26 (4): 779-786.
324. Wang XX, Tan MS, Yu JT, Tan L (2014) Matrix metalloproteinases and their multiple roles in Alzheimer's disease. *BioMed Research International* 2014 (1): 908636.

325. Artuković Nadinić I, Barić Rafaj R, Bedrica Lj, Pavlak M, Lipar M, Mrljak V (2020) Hecpidin – peptidni hormon, glavni regulator metabolizma željeza. *Veterinarska stanica* 51 (2): 187-198.
326. Poonlarp C, Palmer C, Connor JR (1998) Cellular distribution of ferritin subunits in postnatal rat brain. *Journal of Comparative Neurology* 400 (1) : 73-86.
327. Pfefferbaum A, Adalsteinsson E, Spielman D, Sullivan EV, Lim KO (1999) In vivo brain concentrations of N-acetyl compounds, creatine, and choline in Alzheimer disease. *Archives of General Psychiatry* 56 (2): 185-192.
328. Ellman GL, Courtney KD, Andres V(Jr), Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7: 88- 95.
329. Yasutake C, Kuroda K, Yanagawa T, Okamura T, Yoneda H (2006) Serum BDNF, TNF-alpha and IL-1beta levels in dementia patients: comparison between Alzheimer's disease and vascular dementia. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 256 (7): 402-406.
330. Laske C, Stransky E, Leyhe T, Eschweiler GW, Wittorfl A, Richartzl E, Bartels M, Buchkremer G, Schott K (2006) Stage-dependent BDNF serum concentrations in Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission* 113 (9): 1217–1224.
331. O'Farrell RA, Foley AG, Buggy DJ, Gallagher HC (2018) Neurotoxicity of inhalation anesthetics in the neonatal rat brain: effects on behavior and neurodegeneration in the piriform cortex. *Anesthesiology Research and Practice* 2018 (1): 6376090.
332. Imai A, Steffey EP, Farver TB, Ilkiw JE (1999) Assessment of isoflurane-induced anesthesia in ferrets and rats. *American Journal of Veterinary Research* 60 (12): 1577–1583.
333. Cesarovic N, Nicholls F, Rettich A, Kronen P, Hassig M, Jirkof P, Arras M (2010) Isoflurane and sevoflurane provide equally effective anaesthesia in laboratory mice. *Laboratory Animals* 44 (4): 329–336.
334. Wren-Dail MA, Dauchy RT, Blask DE, Hill SM, Ooms TG, Dupepe LM, Bohm RP Jr. (2017) Effect of Isoflurane Anesthesia on Circadian Metabolism and Physiology in Rats. *Comparative Medicine* 67 (2): 138-146.
335. Baden JM, Kundomal YR, Mazze RI, Kosek JC (1988) Carcinogen bioassay of isoflurane in mice. *Anesthesiology* 69 (5): 750-3.

336. Bhatia A, Saikia PP, Dkhar B, Pyngrope H (2022) Anesthesia protocol for ear surgery in Wistar rats (animal research). *Animal Models and Experimental Medicine* 5 (2): 183-188.
337. Lechner J, von Baehr V (2015) Chemokine RANTES/CCL5 as an unknown link between wound healing in the jawbone and systemic disease: is prediction and tailored treatments in the horizon? *EPMA Journal* 6 (1): 1-9.
338. Wheaton WW, Chandel NS (2011) Hypoxia regulates cellular metabolism. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 300 (3): 385-393.
339. Arici S, Karaman S, Dogru S, Arici A, Karaman T, Tapar H, Suren M, Kaya Z (2013) Effects of isoflurane in an intoxication model: experimental study. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 17 (13): 1738-43.
340. Pokhrel LR, Grady KD (2021) Risk assessment of occupational exposure to anesthesia Isoflurane in the hospital and veterinary settings. *Science of the Total Environment* 783: 146894.
341. Pekcan YÖ, Şencan A, Katırcıoğlu K, Aksun M, Savacı HS (2021) Effects of propofol, desflurane and isoflurane on perioperative blood glucose level in intracranial mass operation: A randomized controlled trial. *Journal of Surgical Arts* 14 (1): 41-47.
342. Tanaka K, Kawano T, Tomino T, Kawano H, Okada T, Oshita S, Nakaya Y (2009) Mechanisms of impaired glucose tolerance and insulin secretion during isoflurane anesthesia. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists* 111 (5): 1044-1051.
343. Fernández-Meré LA, LA SZ (2008) Sevoflurane and liver dysfunction. *Revista Espanola de Anestesiologia y Reanimacion* 55 (3): 184-185.
344. Gallego L, Soro M, Alvariño A, Noguera I, Belda F (2015) Integridad renal y hepática tras la sedación prolongada con sevoflurano administrado a través del dispositivo AnaConDa®: comparación con la sedación intravenosa con propofol en modelo animal. *Revista Espanola de Anestesiologia y Reanimacion* 62 (4): 191–203.
345. Gentz BA, Malan TP (2001) Renal Toxicity with Sevoflurane. *Drugs* 61 (15): 2155–2162.
346. Brozović G, Oršolić N, Rožgaj R, Kasuba V, Knežević F, Knežević AH, Benković V, Lisičić D, Borojević N, Đikić D (2010) DNA damage and repair after exposure to sevoflurane in vivo, evaluated in Swiss albino mice by the alkaline comet assay and micronucleus test. *Journal of Applied Genetics* 51 (1): 79-86.

347. Brozović G, Oršolić N, Knežević F, Horvat Knežević A, Benković V, Sakić K, Hrgović Z, Bendelja K, Fassbender WJ (2009) Genotoxicity and cytotoxicity of cisplatin treatment combined with anaesthetics on EAT cells in vivo. *Onkologie* 32 (6): 337-43.
348. Benković V, Milić M, Oršolić N, Knežević AH, Brozović G, Borojević N (2023) Different damaging effects of volatile anaesthetics alone or in combination with 1 and 2 Gy gamma-irradiation in vivo on mouse liver DNA: a preliminary study. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 74 (1): 22-33.
349. Gerber TJ, Fehr VCO, Oliveira SDS, Hu G, Dull R, Bonini MG, Beck-Schimmer B, Minshall RD (2019) Sevoflurane Promotes Bactericidal Properties of Macrophages through Enhanced Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Male Mice. *Anesthesiology* 131 (6): 1301-1315.
350. Kharasch ED (1995) Biotransformation of sevoflurane. *Anesthesia & Analgesia* 81 (6S): 27S-38S.
351. Eger EI, Gong D, Koblin DD, Bowland T, Ionescu P, Laster MJ, Weiskopf RB (1998) The effect of anesthetic duration on kinetic and recovery characteristics of desflurane versus sevoflurane, and on the kinetic characteristics of compound A, in volunteers. *Anesthesia & Analgesia* 86 (2): 414-421.
352. Shwe T, Pratchayasakul W, Chattipakorn N, Chattipakorn SC (2018) Role of D-galactose-induced brain aging and its potential used for therapeutic interventions. *Experimental Gerontology* 101: 13-36.
353. Ghorbel I, Chaabane M, Elwej A, Boudawara O, Abdelhedi S, Jamoussi K, Boudawara T, Zeghal N (2016) Expression of metallothioneins I and II related to oxidative stress in the liver of aluminium-treated rats. *Archives of Physiology and Biochemistry* 122 (4): 214-222.
354. 354. García-Ayllón MS, Silveyra MX, Andreasen N, Brimijoin S, Blennow K, Sáez-Valero J (2007) Cerebrospinal fluid acetylcholinesterase changes after treatment with donepezil in patients with Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* 101 (6): 1701-1711.
355. Picciotto MR, Higley MJ, Mineur YS (2012) Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron* 76 (1): 116-129.
356. Mosser DM, Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology* 8 (12): 958-969.

357. Sudduth TL, Schmitt FA, Nelson PT, Wilcock DM (2013) Neuroinflammatory phenotype in early Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 34 (4): 1051-1059.
358. Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK (2015) Arginase 1+ microglia reduce A $\beta$  plaque deposition during IL-1 $\beta$ -dependent neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation* 12: 1-13.
359. Kumar V, Bal A, Gill KD (2009) Susceptibility of mitochondrial superoxide dismutase to aluminium induced oxidative damage. *Toxicology* 255 (3): 117-123.
360. Kumar V, Bal A, Gill KD (2008) Impairment of mitochondrial energy metabolism in different regions of rat brain following chronic exposure to aluminium. *Brain Research* 1232: 94-103.
361. Orliaguet G, Vivien B, Langeron O, Bouhemad B, Coriat P, Riou B (2001) Minimum alveolar concentration of volatile anesthetics in rats during postnatal maturation. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists* 95 (3): 734-739.
362. Deckardt K, Weber I, Kaspers U, Hellwig J, Tennekes H, van Ravenzwaay B (2007) The effects of inhalation anaesthetics on common clinical pathology parameters in laboratory rats. *Food and Chemical Toxicology* 45 (9): 1709-1718.
363. Zuo Y, Li B, Xie J, Ma Z, Thirupathi A, Yu P, Shi Z (2020) Sevoflurane anesthesia during pregnancy in mice induces cognitive impairment in the offspring by causing iron deficiency and inhibiting myelinogenesis. *Neurochemistry International* 135: 104693.
364. Zhou ZB, Yang XY, Tang Y, Zhou X, Zhou LH, Feng X (2016) Subclinical concentrations of sevoflurane reduce oxidative stress but do not prevent hippocampal apoptosis. *Molecular Medicine Reports* 14 (1): 721-727.
365. Maloney SE, Yuede CM, Creeley CE, Williams SL, Huffman JN, Taylor GT, Wozniak DF (2019) Repeated neonatal isoflurane exposures in the mouse induce apoptotic degenerative changes in the brain and relatively mild long-term behavioral deficits. *Scientific Reports* 9 (1): 2779.
366. Andropoulos DB (2018) Effect of anesthesia on the developing brain: infant and fetus. *Fetal Diagnosis and Therapy* 43 (1): 1-11.
367. Areias J, Sola C, Chastagnier Y, Pico J, Bouquier N, Dadure C, Szabo V (2023) Whole-brain characterization of apoptosis after sevoflurane anesthesia reveals neuronal cell death patterns in the mouse neonatal neocortex. *Scientific Reports* 13 (1): 14763.
368. Liang G, Ward C, Peng J, Zhao Y, Huang B, Wei H (2010) Isoflurane causes greater neurodegeneration than an equivalent exposure of sevoflurane in the developing

- brain of neonatal mice. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists* 112 (6): 1325-1334.
369. Piloni NE, Perazzo JC, Fernandez V, Videla LA, Puntarulo S (2016) Sub-chronic iron overload triggers oxidative stress development in rat brain: implications for cell protection. *Biometals* 29 (1): 119-30.
370. Crowe A, Morgan EH (1992) Iron and transferrin uptake by brain and cerebrospinal fluid in the rat. *Brain Research* 592 (1-2): 8-16.
371. Nakatsuka I, Maeda S, Andoh T, Hayashi Y, Mizuno R, Higuchi H, Miyawaki T (2009) Oxidative changes in the rat brain by intraperitoneal injection of ferric nitrilotriacetate. *Redox Report* 14 (3): 109-114.
372. Becher B, Spath S, Goverman J (2017) Cytokine networks in neuroinflammation. *Nature Reviews Immunology* 17 (1): 49-59.
373. Kell DB, Pretorius E (2014) Serum ferritin is an important inflammatory disease marker, as it is mainly a leakage product from damaged cells. *Metallomics* 6 (4): 748-73.
374. Agoro R, Taleb M, Quesniaux VF, Mura C (2018) Cell iron status influences macrophage polarization. *Public Library of Science* 13 (5): 0196921.
375. Wise-Faberowski L, Raizada MK, Sumners C (2003) Desflurane and sevoflurane attenuate oxygen and glucose deprivation-induced neuronal cell death. *Journal of Neurosurgical Anesthesiology* 15 (3): 193-9.
376. Bouwman RA, van't Hof FN, de Ruijter W, van Beek-Harmsen BJ, Musters RJ, de Lange JJ, Boer C (2006) The mechanism of sevoflurane-induced cardioprotection is independent of the applied ischaemic stimulus in rat trabeculae. *British Journal of Anaesthesia* 97 (3): 307-14.
377. Dal Molin SZ, Krueel CR, de Fraga RS, Alboim C, de Oliveira JR, Alvares-da-Silva MR (2014) Differential protective effects of anaesthesia with sevoflurane or isoflurane: an animal experimental model simulating liver transplantation. *European Journal of Anaesthesiology* 31 (12): 695-700.
378. Odeh D, Oršolić N, Adrović E, Gaćina L, Perić P, Odeh S, Balta V, Lesar N, Kukolj M (2022) Effects of Volatile Anaesthetics and Iron Dextran on Chronic Inflammation and Antioxidant Defense System in Rats. *Antioxidants* 11 (4): 708.
379. Mohanty JG, Nagababu E, Rifkind JM (2014) Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Front Physiol* 5: 84.

380. Wang CY, Babitt JL (2016) Heparin regulation in the anemia of inflammation. *Current Opinion in Hematology* 23 (3): 189-197.
381. Shanmugam NKN, Ellenbogen S, Trebicka E, Wang L, Mukhopadhyay S, Lacy-Hulbert A, Cherayil BJ (2012) Tumor necrosis factor  $\alpha$  inhibits expression of the iron regulating hormone hepcidin in murine models of innate colitis. *Public Library of Science* 7 (5): 38136.
382. Meyer EJ, Nenke MA, Rankin W, Lewis JG, Torpy DJ (2016) Corticosteroid-binding globulin: a review of basic and clinical advances. *Hormone and Metabolic Research* 48 (06): 359-371.
383. Nairz M, Haschka D, Demetz E, Weiss G (2014) Iron at the interface of immunity and infection. *Frontiers in Pharmacology* 5: 152.
384. Pahl MV, Vaziri ND (2020) Immune Function in Chronic Kidney Disease. In *Chronic Renal Disease*, 2nd ed.; Kimmel, P.L., Rosenberg, M.E., Eds.; Publisher: Academic Press, Cambridge, Massachusetts, United States 503-519.
385. Rostoker G, Vaziri ND, Fishbane S (2016) Iatrogenic Iron Overload in Dialysis Patients at the Beginning of the 21st Century. *Drugs* 76 (7): 741-57.
386. Wessling-Resnick M (2010) Iron homeostasis and the inflammatory response. *Annual Review of Nutrition* 30: 105-122.
387. Bogdan AR, Miyazawa M, Hashimoto K, Tsuji Y (2016) Regulators of iron homeostasis: new players in metabolism, cell death, and disease. *Trends in Biochemical Sciences* 41 (3): 274-286.
388. Čepelak I, Dodig S, Dodig DČ (2020) Ferroptosis: regulated cell death. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 71 (2): 99-109.
389. Cheng Z, Li Y (2007) What Is Responsible for the Initiating Chemistry of Iron-Mediated Lipid Peroxidation: An Update. *Chemical Reviews* 107 (3): 748-66.
390. Zhou ZD, Tan EK (2017) Iron regulatory protein (IRP)-iron responsive element (IRE) signaling pathway in human neurodegenerative diseases. *Molecular Neurodegeneration* 12 (1): 75.
391. Aisen P, Listowsky I (1980) Iron transport and storage proteins. *Annual Review of Biochemistry* 49 (1): 357-393.
392. Powell JJ, Bruggraber SFA, Faria N, Poots LK, Hondow N, Pennycook TJ, Latunde-Dada GO, Simpson RJ (2014) A nano-disperse ferritin-core mimetic that efficiently corrects anemia without luminal iron redox activity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 10 (7): 1529–1538.



393. Ludwiczek S, Aigner E, Theurl I, Weiss G (2003) Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells. *Blood* 101 (10): 4148-4154.
394. Otagawa K, Ogawa T, Shiga R, Nakatani K, Ikeda K, Nakajima Y, Kawada N (2008) Attenuation of acute and chronic liver injury in rats by iron-deficient diet. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 294 (2): 311-20.
395. Wang L, Harrington L, Trebicka E, Shi HN, Kagan JC, Hong CC, Lin HY, Babitt JL, Cherayil BJ (2009) Selective modulation of TLR4-activated inflammatory responses by altered iron homeostasis in mice. *Journal of Clinical Investigation* 119 (11): 3322-8.
396. Bonaccorsi-Riani E, Danger R, Lozano JJ, Martinez-Picola M, Kodela E, Mas-Malavila R, Bruguera M, Collins HL, Hider RC, Martinez-Llordella M, Sanchez-Fueyo A (2015) Iron Deficiency Impairs Intra-Hepatic Lymphocyte Mediated Immune Response. *Public Library of Science* 10 (8): 0136106.
397. Pagani A, Nai A, Corna G, Bosurgi L, Rovere-Querini P, Camaschella C, Silvestri L (2011) Low hepcidin accounts for the proinflammatory status associated with iron deficiency. *Blood* 118 (3): 736-746.
398. Sindrilaru A, Peters T, Wieschalka S, Baican C, Baican A, Peter H, Scharffetter-Kochanek K (2011) An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. *Journal of Clinical Investigation* 121 (3): 985-997.
399. Zanganeh S, Hutter G, Spitler R, Lenkov O, Mahmoudi M, Shaw A, Daldrup-Link HE (2016) Iron oxide nanoparticles inhibit tumour growth by inducing pro-inflammatory macrophage polarization in tumour tissues. *Nature Nanotechnology* 11 (11): 986-994.
400. Hoeft K, Bloch DB, Graw JA, Malhotra R, Ichinose F, Bagchi A (2017) Iron loading exaggerates the inflammatory response to the toll-like receptor 4 ligand lipopolysaccharide by altering mitochondrial homeostasis. *Anesthesiology* 127 (1): 121-135.
401. Xia Y, Li Y, Wu X, Zhang Q, Chen S, Ma X, Yu M (2021) Ironing out the details: how iron orchestrates macrophage polarization. *Frontiers in immunology* 12: 669566.

402. Odeh D, Oršolić N, Adrović E, Bilandžić N, Sedak M, Žarković I, Balta V (2024) The Impact of the Combined Effect of Inhalation Anesthetics and Iron Dextran on Rats' Systemic Toxicity. *International Journal of Molecular Sciences* 25 (12): 6323.
403. Das TK, Wati MR, Fatima-Shad K (2015) Oxidative stress gated by Fenton and Haber Weiss reactions and its association with Alzheimer's disease. *Archives of Neuroscience* 2 (2): 60038.
404. Ayton S, Lei P, Bush AI (2013) Metallostasis in Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine* 62: 76-89.
405. Xu Z, Dong Y, Wang H, Culley DJ, Marcantonio ER, Crosby G, Xie Z (2014) Age-dependent postoperative cognitive impairment and Alzheimer-related neuropathology in mice. *Scientific Reports* 4 (1): 3766.
406. Gonzalez-Dominguez R, Garcia-Barrera T, Gómez-Ariza JL (2014) Homeostasis of metals in the progression of Alzheimer's disease. *Biometals* 27 (3): 539-549.
407. Sastre M, Ritchie CW, Hajji N (2015) Metal ions in Alzheimer's disease brain. *JSM Alzheimer's Disease and Related Dementia* 2 (1): 1014.
408. Raha AA, Vaishnav RA, Friedland RP, Bomford A, Raha-Chowdhury R (2013) The systemic iron-regulatory proteins hepcidin and ferroportin are reduced in the brain in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications* 1: 1-19.
409. Graves S, Hernandez R, England C, Valdovinos H, Jeffery J, Barnhart T, Cai W, Nickles R (2016) TH-EF-207A-02: Imaging Pancreatic I2-Cell Function with 51/52Mn-PET. *Medical Physics* 43 (6): 3900.
410. Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Schuepbach RA, Rankin E, Vaulont S, Haase VH, Johnson RS (2007) Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *Journal of Clinical Investigation* 117 (7): 1926-1932.
411. Gozzelino R, Jeney V, Soares MP (2010) Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 50: 323-54.
412. Motterlini R, Otterbein LE (2010) The therapeutic potential of carbon monoxide. *Nature Reviews Drug Discovery* 9 (9): 728-43.
413. Motterlini R, Gonzales A, Foresti R, Clark JE, Green CJ, Winslow RM (1998) Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide contributes to the suppression of acute hypertensive responses in vivo. *Circulation Research* 83 (5): 568-77.
414. Chauveau C, Bouchet D, Roussel JC, Mathieu P, Braudeau C, Renaudin K, Tesson L, Soullillou JP, Iyer S, Buelow R, Anegon I (2002) Gene transfer of heme

- oxygenase-1 and carbon monoxide delivery inhibit chronic rejection. *American Journal of Transplantation* 2 (7): 581-92.
415. Cheng PY, Lee YM, Shih NL, Chen YC, Yen MH (2006) Heme oxygenase-1 contributes to the cytoprotection of alpha-lipoic acid via activation of p44/42 mitogen-activated protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Free Radical Biology and Medicine* 40 (8): 1313-22.
416. Semenza GL (2007) Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Signal Transduction Knowledge Environment* 2007 (407): 8.
417. Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA, Chen AJ, Sarma JV, Zetoune FS, McGuire SR, List RP, Day DE, Hoesel LM, Gao H, Van Rooijen N, Huber-Lang MS, Neubig RR, Ward PA (2007) Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. *Nature* 449 (7163): 721-5.

## **8. ŽIVOTOPIS**

Nikola Lesar rođen je 1987. godine u Rijeci gdje je završio studij medicine na Medicinskom fakultetu, Sveučilišta u Rijeci. Po završetku studija 2012. godine i nakon odrađenog liječničkog staža, 2014. godine zapošljava se u Klinici za tumore, KBC-a „Sestre milosrdnice“ u Zagrebu, gdje upisuje specijalizaciju iz anesteziologije, reanimatologije i intenzivne medicine, te 2019. godine stječe titulu specijaliste i nastavlja raditi na istom radnom mjestu. U periodu od 2020. do 2022. godine radi kao liječnik na Odjelu intenzivne njege *Primarnog respiratornog centra* za liječenje bolesnika oboljelih od COVID-19 u KB Dubrava, u Zagrebu.

Tijekom srednjoškolskog obrazovanja, obzirom na rezultate s plivačkih natjecanja, ima status vrhunskog sportaša. U periodu od 2012. godine do danas radi kao liječnik Ragbi kluba Zagreb i povremeno kao liječnik hrvatske ragbi reprezentacije. *Poslijediplomski studij Biologije, na PMF-u u Zagrebu*, upisuje 2016. godine. 2017. godine upisuje i završava tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama. Nadalje, član je Hrvatske liječničke komore. Svoja znanja i vještine je usavršavao je u Vasteras Central Hospital, Švedska, gdje je boravio tijekom ožujka i travnja 2019. godine sudjelujući na projektu: European Platform for Outcomes Research into Perioperative Interventions during Surgery for Cancer, pod vodstvom prof. dr. sc. Matsa Enlunda. Sudjeluje na domaćim i međunarodnim seminarima, kongresima, stručnim skupovima iz područja medicine, biologije i imunologije kao predavač ili izlažući poster. Do sada je objavio 7 znanstvenih radova, 15 sažetaka sa skupova i 1 rad u zbornicima skupova. Prikaz njegovih radova dostupni su na stranicama Hrvatske znanstvene bibliografije.