

# Oksidacijsko-redukcijske promjene na mozgu štakora uzrokovane izofluranom i željezo-dekstranom

---

Mišić, Anita

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:217:863218>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-18**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**Prirodoslovno-matematički fakultet**  
**Biološki odsjek**

**Anita Mišić**

**OKSIDACIJSKO-REDUKCIJSKE PROMJENE NA MOZGU ŠTAKORA  
UZROKOVANE IZOFLURANOM I ŽELJEZO-DEKSTRANOM**

**Diplomski rad**

**Zagreb, 2018.**

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre eksperimentalne biologije.

*Želim izraziti zahvalnost svojoj mentorici prof. dr. sc. Nadi Oršolić na razumijevanju i pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada.*

*Veliko hvala asistentici Dyani Odeh, koja me vodila kroz praktični dio i kroz pisanje ovog rada. Hvala na pomoći, razumijevanju i strpljenju.*

*Zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu koji su doprinijeli izradi ovog rada, a posebice tehničarki Mariji Potočić koja je uvijek bila tu kada nešto zatreba i svojom vedrinom olakšala rad u laboratoriju. Također zahvaljujem kolegici Lydii na nesebično ukazanoj pomoći u ekperimentalnom dijelu.*

*Zahvaljujem i kolegici Elizabeti na pomoći prilikom izvedbe eksperimentalnog dijela ovog rada. Naši provedeni sati i sati u laboratoriju uz smijeh, nervozu i potporu ostat će zauvijek u sjećanju.*

*Veliku zahvalnost dugujem svojoj obitelji i prijateljima koji su uvijek bili uz mene i pružali mi potporu u svemu. Posebice hvala mojim roditeljima koji su mi omogućili bezbrižno studiranje ovih pet godina, te mojoj sestri Diani i mom didu. Hvala vam na svakoj riječi podrške, svakoj kritici i na bezuvjetnoj ljubavi bez koje ništa ovo ne bi bilo moguće.*

*Hvala vam što ste vjerovali u mene.*

---

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

### OKSIDACIJSKO-REDUKCIJSKE PROMJENE NA MOZGU ŠTAKORA UZROKOVANE IZOFLURANOM I ŽELJEZO-DEKSTRANOM

Anita Mišić

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Inhalacijski anestetici normalno se smatraju nereaktivnim, ali pod odgovarajućim uvjetima metaboliziraju se u reaktivne slobodne radikale i stupaju u reakcije s dijelovima stanica pri čemu dovode do oštećenja. U mozgu željezo igra važnu ulogu u proizvodnji mijelina, metabolizmu monoaminskih transmitera i sintezi GABA. S druge strane, nakupljanje željeza u mozgu mijenja metabolizam stanica mozga i vodi povećanju oksidacijskog stresa te neurodegeneraciji. Cilj rada bio je istražiti mogući antioksidativni/prooksidativni učinak izoflurana i željezo-dekstrana, kao i njihovo zajedničko djelovanje na uzorcima tkiva mozga štakora: a) procjenom razine neuroupale, mjerenjem relativne težine mozga u odnosu na zdravu kontrolu; b) promjene u oksidacijsko-redukcijskom statusu mjerenjem razine malondialdehida (MDA, krajnjeg produkta lipidne peroksidacije) i glutationa (GSH), te aktivnosti katalaze (CAT) i superoksid dismutaze (SOD); c) analizom promjene hematoloških pokazatelja krvi, te osmotske fragilnosti eritrocita. Rezultati ukazuju da izofluran uzrokuje oksidacijski stres u mozgu, dok njegova kombinacija s Fe-dekstranom ima neuroprotektivno djelovanje. Fe-dekstran uzrokuje povećanu lipidnu peroksidaciju i neuroupalu. Izofluran i kombinacija izoflurana i Fe-dekstrana uzrokuje porast razine eritrocita te pad svih ostalih hematoloških parametara, dok sam Fe-dekstran uzrokuje pad svih hematoloških parametara.

(65 stranica, 22 slike, 8 tablica, 79 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Centralnoj biološkoj biblioteci Prirodoslovno - matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

Ključne riječi: izofluran, Fe-dekstran, oksidacijski stres

Voditelj: prof.dr.sc. Nada Oršolić

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Nada Oršolić

izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner

izv. prof. dr. sc. Sandra Radić Brkanac

Rad prihvaćen: 31.10.2018.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

### OXIDATION-REDUCTION CHANGES IN THE RAT BRAIN INDUCED BY ISOFLURANE AND IRON-DEXTRAN

Anita Mišić

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Inhaled anesthetics are normally considered non-active, but under appropriate conditions, they are metabolized in reactive free radicals and reacting with cellular parts, causing damage. In the brain, iron plays an important role in the production of myelin, metabolism of monoamine transmitters and GABA synthesis. On the other hand, the accumulation of iron in the brain changes brain cell metabolism and leads to increased oxidative stress and neurodegeneration. Aim of this study was to investigate the possible antioxidant/prooxidative effect of isoflurane and Fe-dextran, as well as their combined interaction on the rat brain tissue samples: a) evaluation of the neuro-inflammation, by measuring the relative weight of the brain compared to a healthy control group; b) changes in the oxido-reduction status by measuring the level of malondialdehyde (MDA, end product of lipid peroxidation) and glutathione (GSH), activity of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD); c) analyzing changes in haematological parameters and osmotic fragility of erythrocytes. Results indicate that isoflurane causes oxidative stress in the brain, while its combination with Fe-dextran has neuroprotective action. Fe-dextran causes increased lipid peroxidation and neuro-inflammation. Isoflurane and its combined usage with Fe-dextran causes increased levels of erythrocyte and decreased of all hematological parameters, while alone Fe-dextran causes decreased of all hematological parameters.

(65 pages, 22 figures, 8 tables, 79 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library, Faculty of Science, University of Zagreb.

Key words: isoflurane, Fe-dextran, oxidative stress

Supervisor: Dr. Nada Oršolić, Prof.

Reviewers: Dr. Nada Oršolić, Prof.

Dr. Jasna Lajtner, Assoc. Prof.

Dr. Sandra Radić Brkanac, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 31.10.2018.

# SADRŽAJ:

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 INHALACIJSKI ANESTETICI .....	2
1.1.1 Toksičnost inhalacijskih anestetika.....	6
1.1.2 Mehanizam djelovanja .....	7
1.1.3 Izofluran .....	8
1.2 REAKTIVNE KISIKOVE VRSTE (ROS) I OKSIDACIJSKI STRES ....	12
1.2.1 Lipidna peroksidacija.....	15
1.2.2 Antioksidacijski obrambeni mehanizmi .....	16
1.2.2.1. Enzimatski obrambeni mehanizmi.....	17
1.2.2.2. Neenzimatski obrambeni mehanizmi.....	19
1.3 METALI.....	20
1.3.1 Željezo.....	21
1.3.2 Fe-dekstran.....	23
1.4 CILJ ISTRAŽIVANJA.....	25
<b>2. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>26</b>
2.1. MATERIJALI.....	26
2.1.1. Pokusne životinje .....	26
2.1.2. Kemijski spojevi .....	26
2.1.2.1. <i>Izofluran</i> .....	26
2.1.2.2. <i>Željezo dekstran</i> .....	26
2.1.2.3. <i>Priprema željezo dekstrana</i> .....	26
2.1.3. Laboratorijska oprema .....	27
2.2. METODE.....	27
2.2.1. Praćenje promjena tjelesne mase .....	27
2.2.1.1. <i>Relativni indeks težine organa</i> .....	27

2.2.2. Obrada životinja.....	27
2.2.3. Izolacija i priprema tkiva .....	28
2.2.4. Određivanje parametara oksidacijskog stresa .....	29
2.2.4.1. <i>Određivanje proteina metodom po Lowry-u</i> .....	29
2.2.4.2. <i>Mjerenje količine lipidne peroksidacije</i> .....	30
2.2.4.3. <i>Mjerenje količine ukupnog glutationa (GSH)</i> .....	31
2.2.4.4. <i>Mjerenje enzimske aktivnosti katalaze</i> .....	32
2.2.4.5. <i>Mjerenje enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)</i> .....	32
2.2.5. Analiza hematoloških parametara krvi .....	33
2.2.6. Osmotska otpornost eritrocita .....	34
2.2.7. Statistička obrada podataka.....	34
<b>3. REZULTATI .....</b>	<b>35</b>
3.1. RELATIVNI INDEKS TEŽINE MOZGA .....	35
3.2. ODREĐIVANJE PARAMETARA OKSIDACIJSKOG STRESA.....	36
3.2.1. <i>Određivanje količine proteina u uzorcima tkiva mozga štakora</i> .....	36
3.2.2. <i>Mjerenje razine lipidne peroksidacije (MDA) u uzorcima tkiva mozga štakora</i> ....	37
3.2.3. <i>Mjerenje ukupne količine glutationa (GSH) u uzorcima tkiva mozga štakora</i> .....	38
3.2.4. <i>Mjerenje enzimske aktivnosti katalaze u uzorcima tkiva mozga štakora</i> .....	39
3.2.5. <i>Mjerenje enzimske aktivnosti SOD u uzorcima tkiva mozga štakora</i> .....	40
3.3. ANALIZA HEMATOLOŠKIH POKAZATELJA KRVI .....	41
3.3.1. <i>Analiza ukupnog broja eritrocita</i> .....	41
3.3.2. <i>Analiza hemoglobina</i> .....	42
3.3.3. <i>Analiza hematokrita</i> .....	43
3.3.4. <i>Ostali hematološki pokazatelji</i> .....	44
3.4. ANALIZA LEUKOCITA I DIFERENCIJALNE KRVNE SLIKE .....	45
3.4.1. <i>Analiza ukupnog broja leukocita</i> .....	45



3.4.2. Analiza diferencijalne krvne slike .....	46
3.5. OSMOTSKA OTPORNOST ERITROCITA .....	47
<b>4. RASPRAVA .....</b>	<b>48</b>
<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>56</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>58</b>

## **POPIS KRATICA:**

5-HT – 5-hidroksitriptamin (engl. *5-hydroxytryptamine*)

A $\beta$  – amiloid beta (engl. *Amyloid beta*)

Ach – acetilkolin (engl. *Acetylcholine*)

AD – Alzheimerova bolest (engl. *Alzheimer's disease*)

ALS – amiloidna lateralna skleroza (engl. *Amyloid lateral sclerosis*)

AMPA – receptor  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionske kiseline (engl.  *$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors*)

APP – amiloid prekursor protein (engl. *Amyloid precursor protein*)

BACE 1 –  $\beta$ -mjesto cijepajući enzim (egl. *B-site APP cleaving enzyme*)

Bax – regulatorni protein apoptoze Bax (egl. *Apoptosis regulator BAX*)

BBB – krvno-moždana barijera (engl. *Blood-brain barrier*)

Bcl-2 – B- stanični limfom 2 (Engl. *B-cell lymphoma*)

CAT – katalaza (engl. *Catalase*)

CNS – centralni živčani sustav (engl. *Central nervous system*)

CSF – cerebrospinalna tekućina (engl. *Cerebrospinal fluid*)

ER – endoplazmatski retikulum (engl. *Endoplasmatic reticulum*)

GABA –  $\gamma$ -aminomaslačna kiselina (engl.  *$\Gamma$ -Aminobutyric acid*)

GPX – glutation peroksidaza (engl. *Glutathione peroxidase*)

GSH – glutation (engl. *Glutathione*)

GSGG – glutation disulfid (engl. *Glutathion disulfide*)

HA – hlapljivi anestetici (engl. *Volatile anesthetic*)

IRPs – regulatori željeznog proteina (engl. *Iron regulatory proteins*)

LO $\bullet$  – lipidni radikal (engl. *Lipid radical*)

LOO $\bullet$  – peroksilni radikal (engl. *Peroxyl radical*)

LOOH – lipidni hidroperoksil (engl. *Lipid hydroperoxyl*)

LP – lipidna peoksidacija (engl. *Lipid peroxidation*)

MAC – alveolarna koncentracija anestetika (egl. minimum alveolar concentration of anesthetics)

MAPK – mitogen aktivirane proteinske kinaze (engl. *Mitogen - activated preotein kinases*)

MDA – malondialdehid (engl. *Malondialdehyde*)

Mr – molekularna masa (engl. *Molecular weight*)

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

NF- $\kappa$ B – nuklearni čimbenik  $\kappa$ B (engl. *Nuclear factor  $\kappa$ B*)

NMDA – N-metil-D-aspartat (engl. *N-methyl-D-aspartate*)

PD – Parkinsonova bolest (engl. *Parkinson's disease*)

PEN-2 – presenilin pojačivač 2 (engl. *Presenilin enhancer 2*)

POD – postoperativni delirijum (engl. *Postoperative delirium*)

POCD – postoperativni kognitivni pad (engl. *Postoperative cognitive dysfunction*)

PS-1 – presenilin 1 (engl. *Presenilin 1*)

PS-2 – presenilin 2 (engl. *Presenilin 2*)

PUFA – višestruko nezasićene masne kiseline (engl. *Polyunsaturated fatty acids*)

ROS – reaktivne kisikove vrste (engl. *Reactive oxygen species*)

SOD – superoksid dismutaza (engl. *Superoxide dismutase*)

SR – sarkoplazmatski retikulum (engl. *Sarcoplasmic reticulum*)

TBARS – reaktivne tvari tiobarbiturne kiseline (engl. *Thiobarbituric acid reactive substances*)

TEER – trans-endotelni električni otpor (engl. *Transendothelial electrical resistance*)

TGF- $\beta$ 1 – transformirajući faktor rasta  $\beta$ 1 (engl. *Transforming growth factor  $\beta$ 1*)

TNF- $\alpha$  – tumor nekrozis faktor  $\alpha$  (engl. *Tumor necrosis factor  $\alpha$* )

# 1. UVOD

Anestezija je bitan korak prije početka same operacije i kod ljudi i kod životinja. To je medicinska metoda koja uključuje primjenu anestetika kako bi se postiglo odsustvo boli i/ili nesvjestica. Ovaj učinak postiže se djelovanjem anestetika na mozak ili periferni živčani sustav kako bi se suzbili odgovori na senzorsku stimulaciju. Anestezija može biti opća i lokalna. Opća anestezija uključuje gubitak svijesti, obično u svrhu ublažavanja boli tijekom operacije što se postiže gubitkom osjećaja za bol i gubitkom tonusa skeletnih mišića, dok lokalna uključuje gubitak osjeta u jednom dijelu tijela blokiranjem provođenja signala u živcima. Opća anestezija može se primijeniti inhalacijskim anestetikom, intravenskim lijekovima, ili najčešće kombinacijom oba. Za sve ove oblike anestezije utvrđeno je da moduliraju imunološki sustav i utječu na urođeni i stečeni imunitet (Stollings i sur., 2016). Stadiji opće anestezije uključuju uvod u anesteziju, održavanje anestezije i buđenje iz anestezije (Jukić i sur., 2016).

Prva kirurška anestezija upotrijebljena je 1846. godine s dietil-eterom. Sljedeće godine uveden je kloroform, a nakon toga dušikov oksid (1863. godine) i ciklopropan (1929. godine). Rastom broja električnih uređaja u operacijskim salama javila se potreba za sigurnim, nezapaljivim inhalacijskim anestheticima, stoga je 1956. godine uveden halotan. Nakon halotana uslijedila je pojava nekoliko halogeniranih alkana i etera, ali zbog njihovih kancerogenih i eksplozivnih svojstava ili toksičnosti metabolita uklonjeni su iz uporabe u razvijenim zemljama (Pihlainen i Ojanperä, 1998). Od nedavno u Hrvatskoj najčešće korišteni inhalacijski anestetik bio je halotan, a danas se upotrebljavaju još izofluran i sevofluran (Brozović i sur., 2006).

## 1.1 INHALACIJSKI ANESTETICI

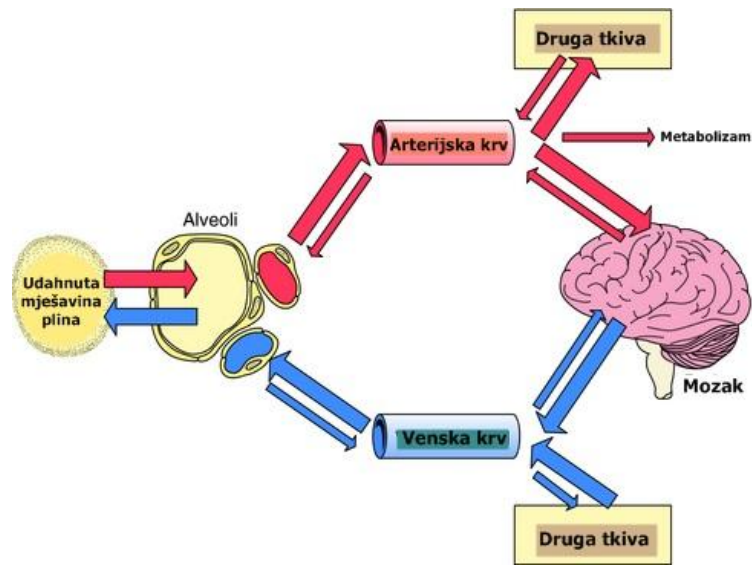
Zahtjevi za klinički korisnim anestetičkim lijekom nužno su strogi i uključuju: široku granicu sigurnosti, ukupnu reverzibilnost anestetičkog lijeka i odsutnost dugotrajne toksičnosti. Uspješan inhalacijski anestetik mora kombinirati kapacitet za depresiju središnjeg živčanog sustava sa niskom razinom uplitanja u respiraciju i cirkulaciju. Učinci na središnji živčani sustav moraju biti brzo reverzibilni (Cohen, 1978).

Inhalacijski anestetici se primjenjuju kao komponenta mješavine plinova. Parcijalni tlak je dio ukupnog tlaka koji pridonosi jedna komponenta mješavine plinova, pri čemu svaka komponenta pridonosi tlaku u izravnoj proporciji s njenom molarnom frakcijom. Parcijalni tlak anestetičkog plina mjera je njegove termodinamičke aktivnosti i određuje njegov farmakološki učinak. Obično se navodi kao postotak isporučene plinske mješavine, pri čemu je atmosferski tlak blizu 1 atm (760 mm Hg). Maksimalni parcijalni tlak hlapljivog spoja je njegov tlak pare i jedinstven je za svaki anestetik te se povećava uz povećanje temperature (Forman i Ishizawa, 2016).

Općenito prihvaćeni moderni fluorirani inhalacijski anestetici su halotan, enfluran, izofluran, sevofluran i desfluran. Po stastavu halotan je halogenirani ugljikovodik, dok su ostali halogenirani eteri. Svi spojevi su lako hlapive, bezbojne tekućine koje ulaze u tijelo kroz inhalaciju, a zatim se difuzijom prenose kroz alveokapilarnu membranu u krvotok a onda krvotokom u središnji živčani sustav i u sve druge organe (Slika 1) (Pihlainen i Ojanperä, 1998). Hlapljivi anestetici se isporučuju u dišni sustav putem isparivača. To je najprihvatljiviji način kojim bi se tekući inhalacijski anestetik pretvorio u oblik koji bi se mogao dostaviti bolesniku u obliku pare. Isparivač je uređaj koji se obično nalazi priključen na anestezijski aparat, a isporučuje zadanu koncentraciju hlapljivog anestetika (Jukić i sur., 2016). Većina inhalacijskih anestetika eliminira se iz tijela putem disanja; međutim dio njih se metabolizira u jetri preko obitelji citokroma P450 oksidaze i izlučuje se kroz bubrege (Brozović i sur., 2006). Indukcija mikrosomalnih enzima jetre, primjerice fenitoin, izoniazid, fenobarbital, alkohol, povećava metabolizam anestetika (Pihlainen i Ojanperä, 1998).

Inhalacijski anestetici spadaju među potencijalno opasne lijekove jer koncentracija koja uzrokuje poremećaj cirkulacije je samo 2-4 puta veća od odgovarajuće koncentracije anestetika, primjerice za halotan, terapijska koncentracija za održavanje anestezije iznosi

0,5-2 %, a toksična doza može biti svega 3 %. Međutim, kontrolirani uvjeti tokom anestezije smanjuju morbiditet i smrtnost uzrokovanu predoziranje (Pihlainen i Ojanperä, 1998).



**Slika 1.** Put ulaska i izlaska inhalacijskog anestetika (preuzeto i prilagođeno sa <https://clinicalgate.com/general-anesthetics/>)

Topljivost anestetika je ključna za nastup, dubinu i trajanje anestezije. Mnogo je koeficijenata koji opisuju topljivost plina u tekućini, a kod anestetika je to izraz topljivosti inhalacijskog anestetika u krvi ili tkivu pri određenoj temperaturi. Postoji snažna korelacija između jačine anestetika i njegove lipidne topljivosti. To se može vidjeti u Tablici 1 uspoređujući koeficijent raspodjele masnoće: krv i minimalnu vrijednost alveolarne koncentracije (MAC). MAC je alveolarna koncentracija anestetika koja sprječava pokrete u 50 % ljudi i životinja izloženih štetnim stimulansima (Pihlainen i Ojanperä, 1998).

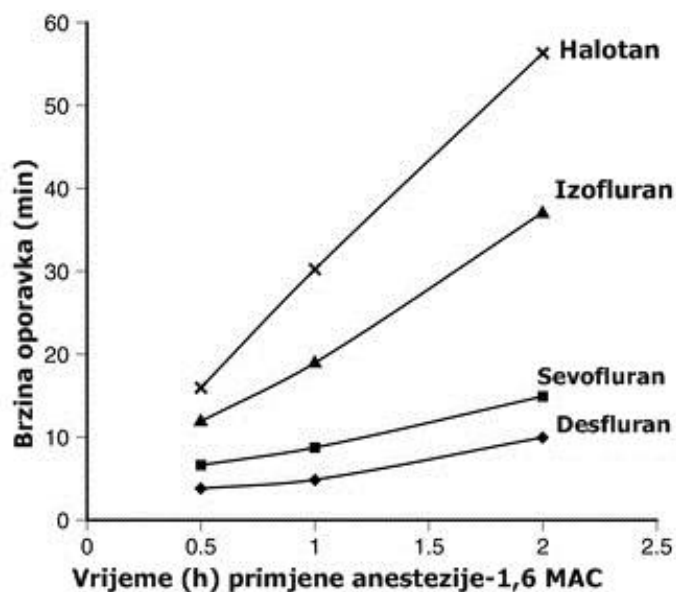
**Tablica 1.** Najvažnija fizička svojstva inhalacijskih anestetika\*

	Halotan	Desfluran	Enfluran	Izofluran	Sevofluran
Molekulska masa (Mr) g/mol	197,381	168,036	184,491	184,491	200,053
Točka vrenja °C	50,2	23,5	56,5	48,5	58,5
Tlak pare (20°C, mmHg)	244	669	172	240	157
Koeficijent raspodjele					
Krv:plin (37°C)	2,57	0,42	1,9	1,38	0,68
Masnoće:krv (37°C)	<u>51,1</u>	<u>27,2</u>	<u>31,0</u>	<u>44,9</u>	<u>47,5</u>
Mozak:krv (37°C)	1,94	1,29	1,4	1,57	1,7
MAC (%/1 atm)	<u>0,74</u>	<u>6,0</u>	<u>1,6</u>	<u>1,15</u>	<u>1,71</u>

\*Preuzeto od Pihlainen i Ojanperä, 1998

Kod strukturno sličnih spojeva jačina anestetika raste s porastom molekularne mase zbog veće lipofilnosti. Kod strukturno različitih spojeva to nije slučaj. Primjerice, sevofluran ima veću molekularnu masu od izoflurana, a ima slabiju anestetičku moć (Pihlainen i Ojanperä, 1998). Budući da je većina anestetika hidrofobna, oni imaju tendenciju da pokazuju visoku topljivost u tkivima s visokim sadržajem lipida i vežu se na mnoge proteine koji tvore hidrofobne džepove (Forman i Ishizawa, 2016).

Brzina oporavka od anestezije je obrnuto proporcionalna topljivosti anestetika: najbrži oporavak je s najmanje topljivim anestetikom. Razlika se pojačava trajanjem anestezije (Slika 2) (<https://clinicalgate.com/inhalational-anaesthetic-agents/>).



**Slika 2.** Brzina oporavka od anestezije (preuzeto i prilagođeno s <https://clinicalgate.com/inhalational-anaesthetic-agents/>)

Veliki postotak starijih pacijenata (>65 godina) nakon izlaganja anestheticima pokazuje postoperativni delirijum (POD), a mnogi naknadno razvijaju postoperativni kognitivni pad (POCD). Postoperativna kognitivna disfunkcija povezana je s neurodegenerativnim bolestima, a karakteriziraju je akutni napadi poremećaja pozornosti i kognitivne promjene. Postavlja se pitanje kakav je učinak anestetika na mozak? Krvno moždana barijera (BBB) regulira kretanje raznih biomolekula u mozak i iz njega, što je presudno za uspostavljanje i održavanje homeostaze mozga i omogućavanje normalne funkcije neurona i glija stanica unutar mikro okoliša mozga. Čimbenici koji ometaju funkciju BBB mogu potaknuti prolazno ili kronično propuštanje komponenti plazme u moždano tkivo, čime se ometa homeostaza i pokreću se bolesti, a upravo inhalacijski anestetici povećavaju propusnost krvno-moždane barijere (BBB). Nekoliko neurodegenerativnih bolesti, osobito Alzheimerova bolest (AD), pokazuju raspad BBB kao dosljednu patološku osobinu koja vjerojatno pridonosi i inicijaciji i progresiji bolesti (Acharya i sur., 2015).



### **1.1.1 Toksičnost inhalacijskih anestetika**

Iako su svi inhalacijski anestetici male molekule topljive u lipidima koje dijele zajedničko svojstvo međureakcije s anestetiskim ciljanim mjestima unutar mozga, oni se značajno razlikuju s obzirom na njihovu toksičnost (Kenna i Jones, 1995). Postoji značajna povezanost između metabolizma anestetika i razvoja toksičnosti. Većina lijekova se metabolizira u tijelu do manje toksičnih derivata, no to nije uvijek tako. Povremeno se kemijski inertni spojevi mogu transformirati u reaktivne metabolite koji se mogu kombinirati sa makromolekulama tkiva i time mogu nastati otrovni spojevi. Malo anestetičkih sredstava, izuzev kloroforma, mogu izazvati izravno stanično oštećenje. Predložena su tri alternativna puta povezanosti metabolizma anestetika i njihove toksičnosti: a) akumulacija toksičnih koncentracija metabolita; b) proizvodnja reaktivnih međuprodukata koji tvore nepovratne veze s makromolekulama tkiva; c) te formiranje haptena koji bi mogli proizvesti preosjetljivost ili imunološke odgovore (Cohen, 1978).

Iako se halogenirani inhalacijski anestetički lijekovi normalno smatraju nereaktivnim, pod odgovarajućim uvjetima metaboliziraju se u reaktivne slobodne radikale koji stupaju u kemijske reakcije sa dijelovima stanica (proteinima, lipidima, ugljikohidratima, molekulama DNA) pri čemu dovode do biokemijskih, strukturnih i funkcionalnih poremećaja. U najstabilnijim spojevima, elektronske orbite svih atoma popunjene su s parovima elektrona suprotnog spina. Međutim, neki fizički ili kemijski čimbenici, poput onih izazvanih metabolizmom, mogu poremetiti ovo uravnoteženo stanje, stvarajući spojeve koji sadrže atom s jednim oslabljenim elektronom u vanjskoj orbiti. Uklanjanjem jednog elektrona iz para, procesom koji se zove oksidacija, molekula postaje nestabilna i reaktivna ("radikalna" molekula) koja napada susjedne biomolekule u okolini stvarajući nove slobodne radikale - lančanom reakcijom. Nastankom slobodnih radikala u stanici mijenja se razina antioksidanasa koji su odgovorni za uklanjanje slobodnih radikala i sprječavanje oštećenja. Pojavom neravnoteže između nastanka slobodnih radikala i njihovog uklanjanja putem antioksidacijskih mehanizama nastaje oksidacijski stres (Türkan i sur., 2005).

### **1.1.2 Mehanizam djelovanja**

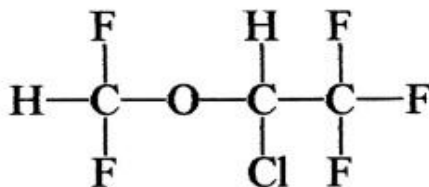
Mehanizam djelovanja inhalacijskih anestetika može se podijeliti na: makroskopski, mikroskopski i molekularni. Makroskopski uključuje djelovanje na razini mozga i leđne moždine. U leđnoj moždini putem smanjenja prijenosa štetnih aferentnih signala u talamus, inhibicije spinalnih refleksa i smanjenja motoričkih odgovora. U mozgu uzrokuju depresiju cerebralnog protoka krvi i metabolizma glukoze. Mikroskopski mehanizam odnosi se na sinapse i aksone. Djeluje putem inhibicije predsinaptičke ekscitatorke aktivnosti ACh (acetilkolina), 5-HT (5-hidroksitriptamin receptora) i glutamina, te povećanje postsinaptičke inhibicijske aktivnosti GABA. Anestetički agensi također mogu mijenjati funkciju molekula unutar CNS-a. No specifični mehanizam djelovanja hlapljivih anestetika (HA) na molekularnoj razini nije još u cijelosti poznat. Dosadašnja istraživanja pokazala su da hlapljivi anestetici svoj učinak ostvaruju djelujući na više meta u središnjem živčanom sustavu. Proučavajući mehanizme djelovanja HA došlo se do spoznaje da djeluju na aktivaciju kaspaza, povećavaju nastajanje  $\beta$ -amiloidnog proteina, povisuju proupalne citokine i čimbenik nekroze tumora, TNF- $\alpha$  (engl. *tumor necrosis factor*), te podržavaju apoptozu stanice. A upravo ti mehanizmi mogli bi dati odgovor na promjenu kognitivnih funkcija nakon izlaganja hlapljivim anestheticima. Na stanje memorije i svijesti djeluje potiskujući funkciju m-ACh receptora. Izofluran povećava razinu transformirajućeg čimbenika, TGF- $\beta$ 1 (engl. *transforming growth factor  $\beta$  1*), te povećava broj kaveola u staničnoj membrani mozga (Acharya i sur., 2015). Smatra se da je mehanizam kojim izofluran podržava otpornost mozga na nastalu ishemiju porast koncentracije unutarstaničnog  $\text{Ca}^{2+}$ , aktivacija NMDA (N-metil-D-aspartat) receptora i mitogenima aktivirane protein kinaze, MAP (engl. *mitogen activated protein kinase*) (Khan i sur., 2014).

Anestetici imaju sposobnost suprimirati brzinu metabolizma mozga, antagonizirati ekscitotoksičnost posredovanu glutatom i poboljšati inhibicijski sinaptički prijenos. Stoga postoji znatan interes za otkrivanjem anestetika koji mogu smanjiti ishemijsku neuronsku ozljedu (Kawaguchi i sur., 2005). Brojni istraživači pokazali su da se to može postići hlapljivim anestheticima. Miura i sur. (1998) pokazali su da su hipokampalna CA1 ozljeda i kortikalna ozljeda, nakon skoro kompletne globalne ishemije, bile manje kod štakora anestetiziranih izofluranom u usporedbi s onima koji primaju ketamin ili dušikov oksid i fentanil. Soonthon-Brant i sur. (1999) su pokazali da je volumen infarkta nakon fokalne cerebralne ishemije kod štakora anestetiziranih izofluranom bio znatno niži nego kod životinja koje su bile ili bez primijenjene anestezije ili obrađene s fentanilom. Također se pokazalo da

HA mogu ublažiti ekscitotoksičnost inhibiranjem otpuštanja glutamata i postsinaptičkim odgovorima posredovanim receptorom glutamata. No precizan mehanizam kojim HA smanjuju ozljedu mozga nije u potpunosti definiran. Smatra se i da je jedan od mogućih mehanizama utjecaj anestetika na sinaptički ton, te da neuronska apoptoza može imati važnu ulogu u napredovanju ozljede mozga (Kawaguchi i sur., 2005).

### 1.1.3 Izofluran

Izofluran,  $C_5H_2ClF_5O$  (Slika 3), je halogenirani eter, hlapljiva, bezbojna tekućina pri sobnoj temperaturi (Pihlainen i Ojanperä, 1998).



**Slika 3.** Struktura izoflurana (R,S)-1-kloro-2,2,2-trifluoro-etil difluorometil eter (preuzeto i prilagođeno od Pihlainen i Ojanperä, 1998)

Koristi se od 1980-ih, ima izrazito nisku stopu metabolizma (Tablica 2) i topljivosti što dovodi do smanjene indukcije anestezije tijekom operacije i skraćuje vrijeme oporavka nakon operacije (Lee i sur., 2015). Gotovo je otporan na biorazgradnju, te je inhalacijski spoj koji je dobar izbor za neurokirurške operacije (Dale i Brown, 1987). Ima neugodan miris, pa nije dobar za uvod u anesteziju, nego samo za održavanje (Jukić i sur., 2016).

**Tablica 2.** Stopa metabolizma pojedinog inhalacijskog anestetika\*

Anestetik	Stopa metabolizma (%)
Halotan	20-46
Enfluran	2,4-8,5
Sevofluran	2,5-3,3
Izofluran	0,2
Desfluran	0,02

\*Preuzeto od Pihlainen i Ojanperä, 1998

Citotoksičnost izoflurana ovisna je o dozi. Pri niskim dozama izofluran ima neuroprotektivni učinak, dok pri visokim dozama dolazi do neurotoksičnosti (Wei i sur., 2005).

Pokazalo se da izofluran smanjuje ekscitotoksičnu ozljedu posredovanu s NMDA i AMPA (receptor  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionske kiseline) *in vivo* kod štakora. Također može smanjiti učestalost širenja depresivnih prolaznih depolarizacija tijekom fokalne ishemije. Te depolarizacije povećavaju dotok kalcija u neurone, čime se povećava neuronska ozljeda. Inhibicija tih depolarizacija izofluranom može ograničiti ozljedu uzrokovanu fokalnom ishemijom (Kawaguchi i sur., 2005).

Održavanje dovoljne količine kalcija unutar endoplazmatskog retikuluma (ER) ima ključnu ulogu u normalnoj ER strukturi, sintezi proteina, rastu stanica i smrti. Prekomjerno oslobađanje kalcija, od ER preko aktivacije receptora rianodina i/ili smanjenje unosa kalcija putem inhibicije kalcijeve ATPaze na ER membrani, dovodi do smanjenja kalcija ER-a i naknadne smrti stanica putem apoptoze.

Apoptoza je genetski određen i aktivan oblik stanične smrti koji ima bitnu ulogu u fiziološkim i patološkim uvjetima tijekom embrionalnog razvoja i kasnijeg života višestaničnih organizama. Može se pokrenuti izvanstaničnim ili unutarstaničnim signalima. Kod apoptoze, specifična klasa cistein proteaza, nazvanih kaspazama, aktivirana je u amplifikacijskoj proteolitičkoj kaskadi. Neaktivne prokaspase su konstitutivno eksprimirane u zdravih stanica, a pojavom apoptotičkih podražaja, aktiviraju se (Loop i sur., 2005). Članovi obitelji Bcl-2 su aktivni medijatori apoptoze koji ili inhibiraju (npr. Bcl-2) ili olakšavaju (npr. Bax) apoptoznu staničnu smrt. Održavanje ravnoteže Bcl-2 i Bax utječe na homeostazu ER gdje  $\text{Ca}^{2+}$  igra važnu ulogu u određivanju sudbine stanica; razina  $\text{Ca}^{2+}$  ključna je za ulazak

stanice u proliferaciju ili apoptozu. Izofluran smanjuje omjer Bcl-2/Bax, a svaki spoj koji smanjuje taj omjer može potaknuti apoptozu (Wei i sur., 2005).

Hlapljivi anestetici različito utječu na homeostazu kalcija. Izofluran inducira otpuštanje  $\text{Ca}^{2+}$  iz ER reverzibilno u cerebrokortikalnim i hipokampalnim neuronima. Također inducira otpuštanje  $\text{Ca}^{2+}$  iz sarkoplazmatskog retikuluma (SR), analogno ER u neuronima, aktiviranjem receptora rianodina ili inhibiranjem unosa  $\text{Ca}^{2+}$  u SR (Wei i sur., 2005). Wei i sur. (2005) pokazali su da izofluran inhibira sintezu proteina i izlučivanje, te inducira citotoksičnost u ljudskim i štakorskim hepatocitima, te apoptozu kod humanih limfocita. U razvoju mozga štakora, izofluran u kliničkim koncentracijama (0,75 % izoflurana tijekom 6 sati) uzrokuje neurodegenerativna oštećenja i trajne nedostatke u učenju. Iako je blokada NMDA receptora i/ili aktivacije GABA receptora predložena za neurodegenerativne procese uzrokovane izofluranom u razvoju mozga, vjerojatno je da je u ovom slučaju neurotoksičnost izoflurana uzrokovana iscrpljivanjem  $\text{Ca}^{2+}$  iz ER-a.

Alzheimerova bolest (AD) najčešći je oblik demencije povezane s dobi. Glavna patološka obilježja AD su proizvodnja i/ili nakupljanje amiloid  $\beta$ -proteina ( $\text{A}\beta$ ).  $\text{A}\beta$  protein je mali peptid koji sadrži 39-43 aminokiseline, a nastaje od amiloidnog prekursorskog proteina (APP), kojeg na N-terminalnom kraju cijepa  $\beta$ -sekretaza, a na C-terminalnom kraju  $\gamma$ -sekretaza.  $\beta$ -sekretazu kodira gen BACE1 (od engl.  *$\beta$ -site APP-cleaving enzyme 1*) dok je  $\gamma$ -sekretaza je membranski kompleks koji se sastoji od četiri proteina: presenilina (PS1 ili PS2), nikastrina, proteina PEN-2 i APH-1, s presenilinom u aktivnom mjestu tog kompleksa. Izofluran mijenja obradu APP-a, povećava razinu  $\text{A}\beta$  i povećava  $\text{A}\beta$  agregaciju. Također može inducirati aktivaciju kaspaze i apoptozu, što zatim povećava aktivnosti BACE i  $\gamma$ -sekretaze. Povećani BACE i  $\gamma$ -sekretaza mogu olakšati obradu APP-a te povećati nakupljanje  $\text{A}\beta$  proteina. Konačno, povećana akumulacija  $\text{A}\beta$  proteina potiče izofluranom induciranu kaspazu i apoptozu. Alternativno, izofluran može inducirati ciklus apoptoze i nakupljanje  $\text{A}\beta$  proteina promovirajući  $\text{A}\beta$  njihovo agregiranje. Otkriveno je da su  $\text{iA}\beta 5$  i klokinol, učinkoviti inhibitori  $\text{A}\beta$  agregacije, specifično smanjuju apoptozu induciranu izofluranom. Pokazalo se da izofluran može izazvati začarani ciklus apoptoze (Slika 4) što u konačnici dovodi do stanične smrti. Ovi nalazi upućuju na to da bolesnici s povišenim razinama  $\text{A}\beta$  mogu biti osjetljiviji na citotoksičnost izazvanu izofluranom. Moguće je da su povišene razine  $\text{A}\beta$  također povezane s postoperativnom kognitivnom disfunkcijom, suptilnim oblikom demencije nakon operacije i anestezije. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se utvrdilo jesu li

dogadjaji postoperativne kognitivne disfunkcije povezani s povišenom razinom A $\beta$  u ljudskom mozgu, CSF i plazmi (Xie i sur., 2007).



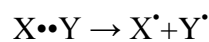
**Slika 4.** Izofluran izaziva začarani ciklus (preuzeto i prilagođeno od Xie i sur., 2007)

Kod manjih operacija, izofluran ima protuupalno i antioksidativno djelovanje na plućno i srčano tkivo, ali ne i na mozak (Lee i sur., 2015). S druge strane, dugoročno izlaganje inhalacijskim anestheticima ima negativan utjecaj. Jedan od mehanizama toksičnosti je oksidacijski stres (Kovacic i Somanathan, 2011).

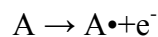
## 1.2 REAKTIVNE KISIKOVE VRSTE (ROS) I OKSIDACIJSKI STRES

Slobodni radikali su kemijski spojevi s nesparenim elektronima, smatraju se vrlo aktivnim molekulama. Stanice su razvile vlastite antioksidacijske obrambene sustave kako bi na taj način spriječile sintezu slobodnih radikala i njihove toksične učinke. Oni se sastoje od enzima koji razgrađuju perokside, enzima koji vezuju prijelazne metale ili spojeve koji se smatraju sredstvima za uklanjanje slobodnih radikala. Reaktivne vrste oksidiraju biomolekule koje će dodatno izazvati ozljede tkiva i staničnu smrt. Slobodni radikali mogu nastati različitim mehanizmima (Borza i sur., 2013).

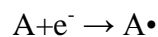
1) homolitičko cijepanje kovalentne molekule, svaki atom zadržava jedan elektron:



2) gubitak jednog elektrona



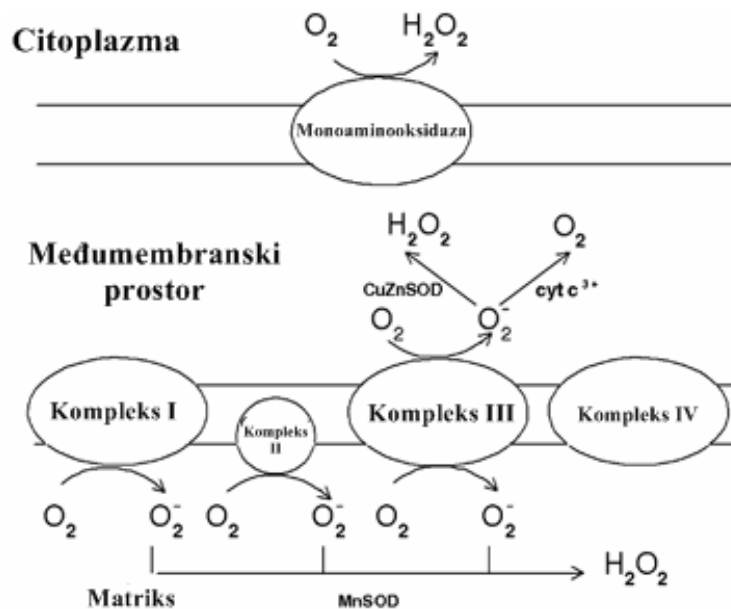
3) primanje jednog elektrona



Zbog svoje prisutnosti u atmosferi, ali i u tijelu, reakcija slobodnih radikala s kisikom je neizbježna (Borza i sur., 2013). Reaktivne kisikove vrste (ROS) su reaktivne molekule i slobodni radikali izvedeni iz molekularnog kisika. Ove molekule, proizvedene kao nusprodukti tijekom mitohondrijskog prijenosa elektrona aerobnog disanja ili oksidacijsko-redukcijskih reakcija enzima i oksidacije metalnih katalizatora, mogu izazvati niz štetnih događaja. Izvorno se mislio da su samo fagocitne stanice odgovorne za proizvodnju ROS-a kao mehanizmima obrane stanica domaćina (Held, 2015). Slobodni radikali izvedeni iz kisika važni su medijatori ozljeda stanica i smrti. Ne samo da su te visoko reaktivne kemijske vrste važne za proces starenja, već su izravno ili neizravno uključene u različite kliničke poremećaje, kao što su ateroskleroza, ishemijsko-reperfuzijska ozljeda, plućna toksičnost, makularna degeneracija i rak. Osim toga, oni igraju važnu ulogu u kroničnoj granulomatoznoj bolesti i djeluju kao sekundarni izvori stanične ozljede kod kroničnih upalnih procesa i nekoliko poremećaja središnjeg živčanog sustava (Türkan i sur., 2005), a mogu poslužiti i kao unutarstanični i međustanični glasnici (Held, 2015).

Oksidacijski stres može nastati neravnotežom između proizvodnje reaktivnih kisikovih radikala i njihovog uklanjanja. Iako je ROS neophodan za normalan metabolizam, kao što je ubijanje vanjskih štetnih čimbenika i održavanje stanične signalizacije u stanicama, prekomjerna proizvodnja ROS-a može dovesti do stanične disfunkcije. Akumulacija oksidacijskog stresa igra važnu ulogu u etiologiji raznih kroničnih bolesti uključujući neurodegenerativne bolesti, rak te bolesti srca i krvnih žila (Lee i sur., 2015).

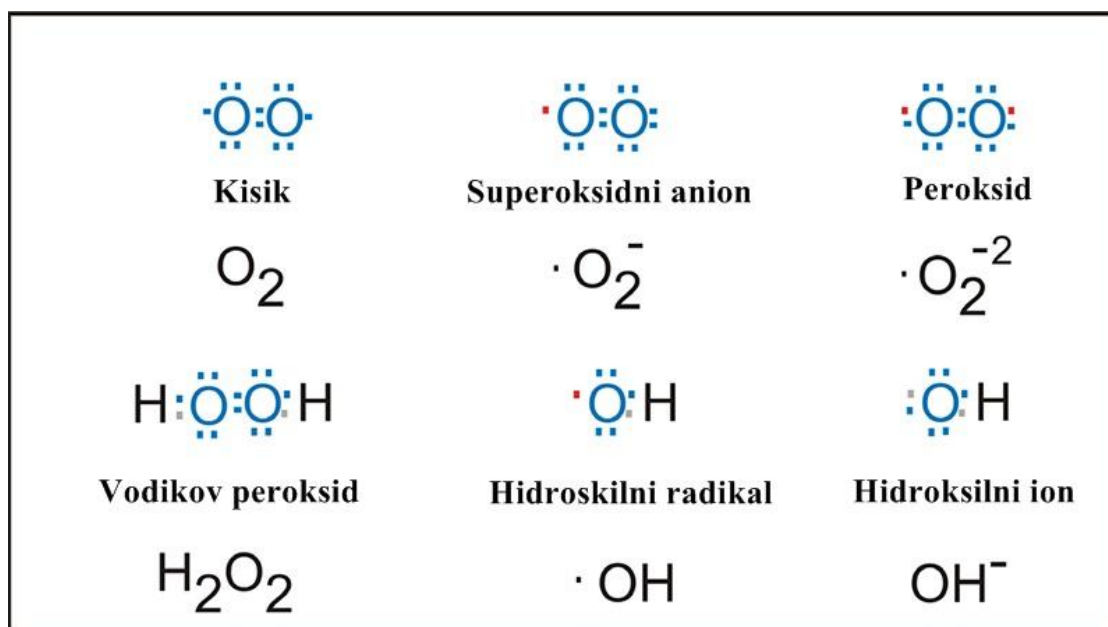
Prijelaz elektrona duž enzima respiratornog lanca nije potpuno učinkovit. Razni respiratorni kompleksi propuštaju elektrone na kisik, naročito kompleks I i III, tako stvarajući superoksidni radikal ( $O_2^-$ ) (Slika 5). Ova vrsta može smanjiti citokrom c (u međumembranskom prostoru), ili se može pretvoriti u vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) i kisik (u matriksu i međumembranskom prostoru). Povećane koncentracije  $O_2^-$  u stanju mirovanja mogu smanjiti prijelazne metale (koji zauzvrat reagiraju s  $H_2O_2$  stvarajući hidroksilne radikale ( $OH\bullet$ ) ili mogu reagirati s dušikovim oksidom i nastaje peroksinitrit. I  $OH\bullet$  i peroksinitrit su jaki oksidansi koji neselektivno reagiraju s lipidima i proteinima nukleinskih kiselina (Turrens, 2004).



**Slika 5.** Mjesta stvaranja superoksidnog radikala ( $O_2^-$ ) u respiratornom lancu (preuzeto i prilagođeno od Turrens, 2004)



Većina reaktivnih vrsta kisika nastaje kao nusproizvod tijekom prijenosa mitohondrijskih elektrona. Pored toga, ROS se formira kao nužan međuprodukt oksidacijskih reakcija kataliziranih metalima. Atomski kisik ima dva nepovezana elektrona u zasebnim orbitama u svojoj vanjskoj ovojnici elektrona. Ova elektronska struktura čini kisik osjetljivim na stvaranje radikala (Held, 2015). Najvažniji ROS su superoksidni anionski radikal ( $O_2^-$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) i visokoreaktivni hidroksilni radikal ( $OH\cdot$ ) (Leonard i sur., 2004), tu su još i hidroksil ion i dušikov oksid (Slika 6) (Held, 2015).

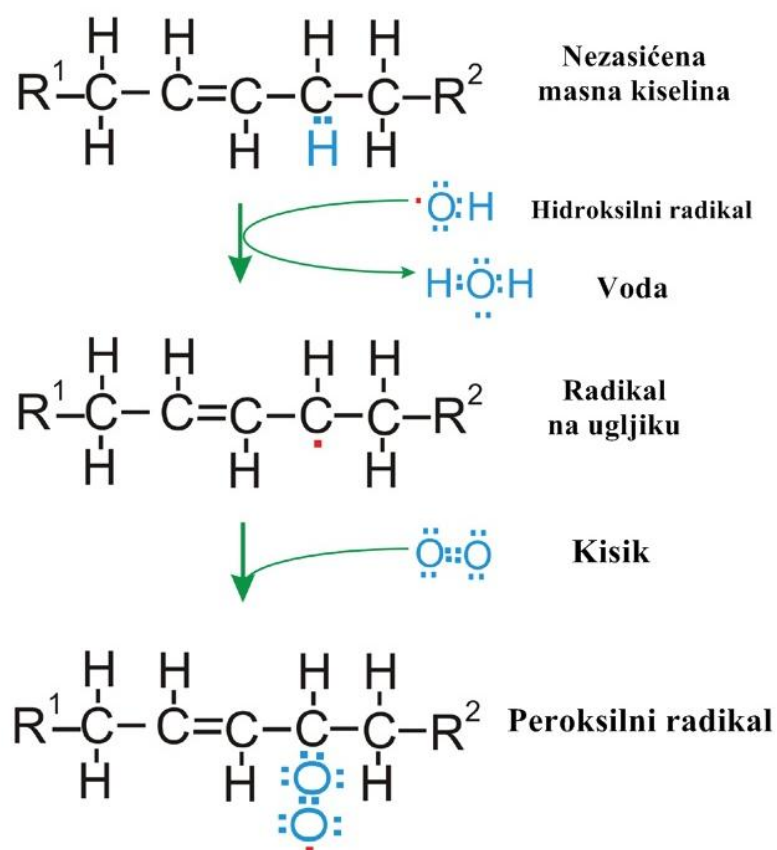


**Slika 6.** Elektronske strukture reaktivnih kisikovih vrsta (crvene točke označavaju nesparene elektrone) (preuzeto i prilagođeno prema Held, 2015)

Živčani sustav je osobito osjetljiv na oksidacijski stres iz slijedećih razloga: (1) visoka potrošnja kisika u mozgu rezultira prekomjernom proizvodnjom ROS-a; (2) neuronske membrane bogate su polinezasićenim masnim kiselinama, koje su posebno osjetljive na napad slobodnih radikala; (3) antioksidacijski obrambeni mehanizmi su slabi - posebice su niske razine katalaze, glutation peroksidaze i vitamina E; (4) visoka nazočnost željeza u mozgu i oštećenje mozga rezultira trenutnim otpuštanjem željeznih iona sposobnih za kataliziranje reakcija slobodnih radikala (Gadoth i Göbel, 2011).

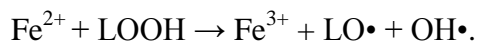
### 1.2.1 Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija je jedan od najčešćih pokazatelja stvaranja slobodnih radikala; ključni je pokazatelj oksidacijskog stresa. To je proces u kojem slobodni radikal "ukrade" elektrone iz lipida u staničnim membranama, što rezultira oštećenjem stanica. Proces se odvija mehanizmom lančane reakcije slobodnih radikala. Sastoji se od tri glavne faze: inicijacija, propagacija i terminacija (Borza i sur., 2013). Višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA) zajednički su cilj slobodnih radikala. Lipidnu peroksidaciju najčešće uzrokuje hidroksilni radikal (OH•), međutim i pojedini drugi radikali mogu pokrenuti ovaj proces. To ostavlja nespareni elektron na masnoj kiselini koja tada može zarobiti kisik, stvarajući peroksi radikal (Slika 7). Lipidni peroksidi su nestabilni i razgrađuju se kako bi nastali kompleksni niz spojeva koji uključuju reaktivne karbonilne spojeve, poput malondialdehida (MDA) (Held, 2015) i drugih reaktivnih spojeva s tiobarbiturnom kiselinom (TBARS). Zasićene masne kiseline i masne kiseline koje sadrže jednu dvostruku vezu, mnogo su otpornije prema djelovanju ROS-a negoli PUFA-e (Štefan i sur., 2007).

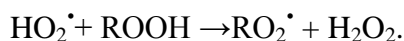


**Slika 7.** Ilustrirani prikaz lipidne peroksidacije (preuzeto i prilagođeno prema Held, 2015).

Željezo je izravno povezano s lipidnom peroksidacijom. Ono može reagirati s lipidnim hidroperoksidima (LOOH), dajući reaktivne lipidne alkoksilne radikale (LO•) koji dalje sudjeluju u širenju lipidne oksidacije:



Lipidnu peroksidaciju katalizira hemski i nehemiški vezano željezo. Disocijacijom LOOH-a dolazi do nakupljanja kratkolančanih konačnih produkata peroksidacije, vrste aldehida i ugljikovodika. Superoksidni radikal je negativnog naboja i ne sudjeluje u ovom procesu jer nema sposobnost ulaska u unutrašnjost stanične membrane. Hidroperoksilni radikal ( $\text{OH}_2^{\bullet}$ ) vrlo je reaktivan, te može potaknuti peroksidaciju stvarajući peroksidne radikale:



Unos masnih kiselina hranom, poglavito  $\omega$ -3 PUFA-e, praćeno je povećanjem aktivnosti superoksid dismutaze i katalaze, što upućuje na povećanu lipidnu peroksidaciju. Povećana lipidna peroksidacija u biološkim membranama dovodi do gubitka fluidnosti, povećanja permeabilnosti prema  $\text{H}^+$  i drugim ionima, mogućeg otpuštanja sadržaja iz stanice i opadanja vrijednosti membranskoga potencijala. Također dovodi do povećanog rizika za razvoj ateroskleroze i drugih upalnih bolesti (Štefan i sur., 2007).

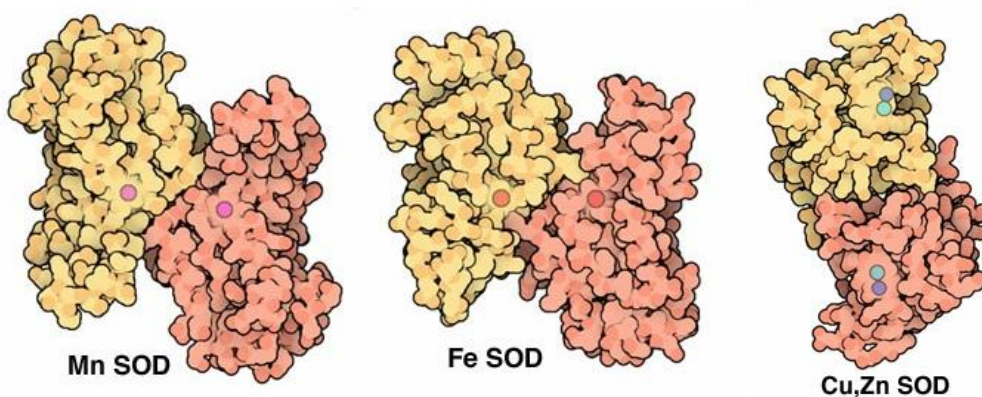
### **1.2.2 Antioksidacijski obrambeni mehanizmi**

Postoji kritična ravnoteža između oksidansa i antioksidacijske zaštite. Ako stanice nisu u stanju održavati ovu redoks ravnotežu, dolazi do kroničnog upalnog stanja. To može dovesti do oštećenja stanica i okolnog tkiva zbog aktivacije signalnih putova, produkcije upalnih citokina, promjena ekspresije gena i drugih staničnih modifikacija te nastanka raznih bolesti. Proizvodnja ROS-a je dio normalnog metabolizma stanica i obrane. Lanac prijenosa elektrona u mitohondrijima i lizosomima proizvodi reaktivne vrste kao dio normalne stanične funkcije (Jomova i Valko, 2011). Stanice pokušavaju neutralizirati nastanak ROS-a s antioksidansima. Djelovanje antioksidansa uključuje različite mehanizme: uklanjanje slobodnih radikala, uklanjanje metalnih iona, uklanjanje kisika, ili utjecanje na smanjivanje lokalnih koncentracija kisika, te uklanjanje ROS-a (Štefan i sur., 2007).

### 1.2.2.1. Enzimatski obrambeni mehanizmi

Enzimi superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) i glutation peroksidaza (GPX) su najpoznatije komponente biološkog zaštitnog sustava (Zhang i sur., 2012).

SOD je prvi enzim detoksikacije i najmoćniji endogeni antioksidans u stanici koji djeluje protiv ROS-a. Metaloenzim je i stoga zahtijeva metalni kofaktor za svoju aktivnost, primjerice željezo (Fe), cink (Zn) bakar (Cu) i mangan (Mn). Temeljem navedenog razlikujemo tri SOD oblika (Slika 8), a to su: (1) Fe-SOD, koji se obično nalazi u prokariotima i kloroplastima nekih biljaka (2) Cu/Zn-SOD prevladava u eukariotima i raspodijeljen je u osnovi u citosolu, ali se također nalazi u kloroplastima i peroksisomima i (3) Mn-SOD prisutan u prokariotima i mitohondrijima eukariota (Ighodaro i Akinloye, 2017). Smatra se da SOD štiti od slobodnih radikala koji nastaju procesom starenja i ishemijskim oštećenjem tkiva. Također utječe na upalu. Mutacije u Cu/Zn-SOD povezane su s obiteljskom amiloidnom lateralnom sklerozom (ALS). SOD neutralizira superoksidni radikal pretvarajući ga u vodikov peroksid koji je manje reaktivan (Slika 9). Budući da je nepolaran, može difundirati kroz membrane stanica i organa, i stoga djeluje široko kao drugi glasnik u putovima prijenosa signala. Vodikov peroksid se s druge strane neutralizira u vodi enzimima katalaze i glutation peroksidaze (Slika 9) (Burton i Jauniaux, 2011).

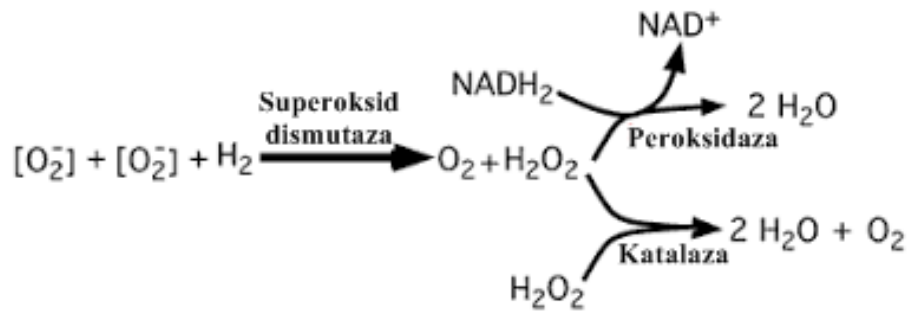


**Slika 8.** Oblici SOD-a (preuzeto sa: <http://pdb101.rcsb.org/motm/94>)

CAT je tetramerni protein s četiri slične podjedinice od kojih svaka polipeptidna podjedinica sadrži jedan željezo protoporfirin. CAT je zajednički antioksidacijski enzim prisutan gotovo u svim živim tkivima koja koriste kisik. Enzim koristi ili željezo ili mangan kao kofaktor. Vrlo je učinkovit, u jednoj sekundi može uništiti milijune molekula vodikovog peroksida. Enzim se nalazi prvenstveno u peroksisomima, a odsutan je u mitohondrijama stanica sisavaca. Jedina iznimka su mitohondriji prisutni u srcu štakora (Ighodaro i Akinloye, 2017).

GPX važan je unutarstanični enzim koji razgrađuje vodikov peroksid u vodu i lipidne peroksidge u njihove odgovarajuće alkohole, uglavnom u mitohondrijima i ponekad u citosolu. U većini slučajeva njegova aktivnost ovisi o mikronutrijentnom kofaktoru-selenu. Iz tog razloga često se naziva selenocistein peroksidaza. Enzim igra ključnu ulogu u inhibiranju procesa lipidne peroksidacije i stoga štiti stanice od oksidativnog stresa (Ighodaro i Akinloye, 2017).

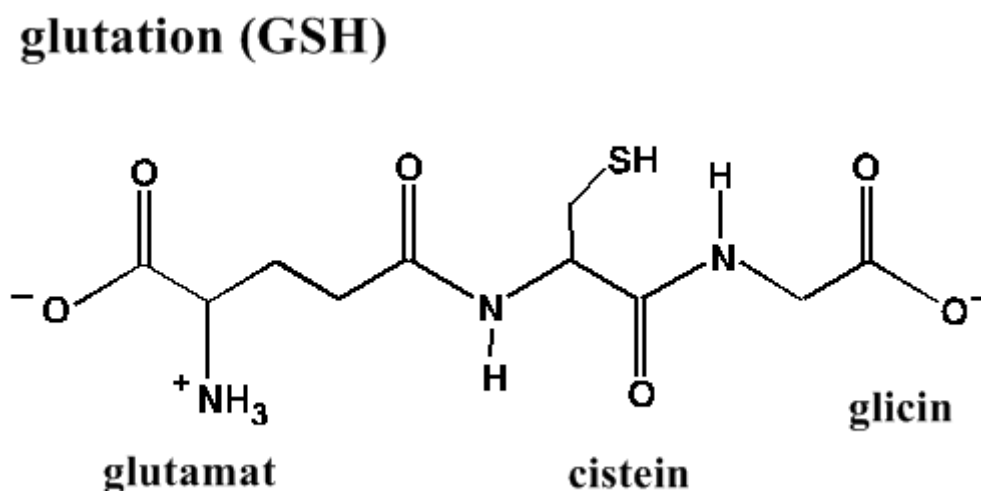
Važno je da antioksidacijski enzimi djeluju zajedno, jer neravnoteža u koncentracijama superoksidnog radikala i vodikovog peroksida može rezultirati stvaranjem mnogo opasnijeg hidroksilnog radikala (OH•) (Burton i Jauniaux, 2011).



**Slika 9.** Neutralizacija superoksidnog radikala i vodikovog peroksida (preuzeto i prilagođeno s: <http://lecturer.ukdw.ac.id/dhira/NutritionGrowth/images/superoxide.gif>)

### 1.2.2.2. Neenzimatski obrambeni mehanizmi

Postoji niz neenzimatskih molekula koje igraju ulogu u neutralizaciji slobodnih radikala. Jedne od najvažnijih su glutacion, vitamin C i vitamin E. Glutacion (Slika 10) može biti najvažnija unutarstanična obrana od štetnih učinaka reaktivnih vrsta kisika. Ovaj tripeptid (glutamil-cisteinil-glicin) osigurava izloženu sulfhidrilnu skupinu koja služi kao cilj napada. Postoji u relativno velikim količinama i služi za detoksifikaciju peroksida i regeneraciju brojnih važnih antioksidansa (npr.  $\alpha$ -tokoferola i askorbinske kiseline). Reakcije s molekulama ROS oksidiraju glutacion (GSSG), a reducirani oblik glutaciona (GSH) se regenerira pomoću NADPH ovisne reduktaze:  $\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{GSH} + \text{NADP}^+$ . Omjer oksidiranog oblika glutaciona i reduciranog oblika je dinamički pokazatelj oksidativnog stresa organizma (Held, 2015). Općenito, bilo koje stanje povezano sa prekomjernom proizvodnjom ROS-a smanjit će razine GSH ili omjer GSH/GSSG (Frijhoff i sur., 2015).



**Slika 10.** Strukturna formula glutaciona (preuzeto i prilagođeno sa:

<http://cultua.info/glutathione/>)

Vitamin C ili askorbinska kiselina je molekula topiva u vodi koja može smanjiti ROS, dok je vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol) molekula topiva u lipidima za koju se pretpostavlja da igra sličnu ulogu u membranama (Held, 2015). Vitamin C može djelovati izravno reakcijom s vodenim peroksilnim radikalima, i posredno, obnavljanjem antioksidacijskih svojstava vitamina E (Bendich i sur., 1986). Uklanja slobodne radikale doniranjem elektrona, pri čemu nastaje slabo reaktivan askorbilni radikal (Štefan i sur., 2007). Polinezasićene masne kiseline

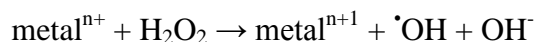
su vrlo osjetljive na napad slobodnih radikala. Smatra se da vitamin E sprječava širenje peroksidacije koju iniciraju slobodni radikali kroz masne kiseline fosfolipida kao antioksidans koji razara lanac (Pekiner, 2003). Vitamin E reagira s peroksilnim radikalima brže no što oni uspiju reagirati s nezasićenim masnim kiselinama i proteinima (Štefan i sur., 2007).

Redoksni aktivni metali kao što su željezo (Fe), bakar (Cu), krom (Cr), kobalt (Co) i drugi metali prolaze redoks reakcije i posjeduju sposobnost proizvodnje reaktivnih radikala (Jomova i Valko, 2011).

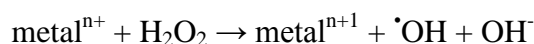
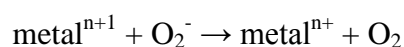
### 1.3 METALI

Teški metali pokazuju sposobnost izazivanja oksidacijskog stresa stvaranjem ROS-a. Oksidacijski stres uzrokovan teškim metalima rezultat je negativnog pomaka ravnoteže između proizvodnje ROS-a i sposobnosti bioloških sustava da se lako suprotstavljaju oštećenju uzrokovanom ROS-om ili da ga brzo popravljaju. Toksičnost teških metala uzrokovana je njihovim izravnim vezivanjem s tiolnim skupinama proteina/enzima uzrokujući narušavanje njihovih trodimenzionalnih konformacija ili zamjenu dvovalentnih metalnih iona iz njihovog katalitičkog džepa, koji su u suštini potrebni proteinima/enzimima kao kofaktorima za njihovu optimalnu aktivnost. Poremećaji u ovom normalnom redoks stanju kod teških metala mogu uzrokovati toksične učinke posredno kroz proizvodnju slobodnih radikala (Gupta i sur., 2015).

Metali mogu uzrokovati proizvodnju ROS-a kroz različite mehanizme. Jedan od najvažnijih mehanizama stvaranja slobodnih radikala posredovano metalima je putem Fentonske i Haber-Weissove reakcije. U Fentonskoj reakciji metal reagira s vodikovim peroksidom i nastaje visokoreaktivni hidroskilni radikal (OH•) i oksidirani metalni ion:



U Haber-Weissovoj reakciji oksidirani metalni ion se reducira sa superoksidnim anionskim radikalom ( $\text{O}_2^-$ ) te reagira s  $\text{H}_2\text{O}_2$  pri čemu nastaje OH•:



Metali također uzrokuju aktivaciju nuklearnih transkripcijskih čimbenika, aktivaciju različitih signalnih proteina, zaustavljanje staničnog ciklusa i apoptozu (Leonard i sur., 2004).

Poremećaj homeostaze metalnih iona može dovesti do oksidativnog stresa, stanje koje nadvladava zaštitu tijela od antioksidansa i potom uzrokuje oštećenje DNA, peroksidaciju lipida, modifikaciju proteina i druge učinke koji vode nastanku brojnih bolesti, uključujući rak, kardiovaskularne bolesti, dijabetes, aterosklerozu, neurološke poremećaje (Alzheimerova bolest, Parkinsonove bolesti), kronične upale i druge. Mehanizam stvaranja slobodnih radikala izazvanih metalima čvrsto je pod utjecajem djelovanja staničnih antioksidansa. Mnogi antioksidanti niske molekulske mase (askorbinska kiselina (vitamin C),  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E), glutation (GSH), karotenoidi, flavonoidi i drugi antioksidansi) mogu kelirati metalne ione, čime se smanjuje njihova katalitička aktivnost da se dobije ROS. Dva glavna antioksidacijska enzima, superoksid dismutaza (SOD) i katalaza (CAT) sadrže, kao sastavni dio svojih aktivnih mjesta, metalni ioni u borbi protiv toksičnih učinaka metalima induciranih slobodnih radikala. Metali igraju važnu ulogu u širokom rasponu bioloških procesa živih sustava. Homeostaza metalnih iona, održava se čvrsto reguliranim mehanizmima upijanja, skladištenja i izlučivanja, stoga je kritična za život i održava se u strogim granicama (Jomova i Valko, 2011).

Razni antioksidansi (enzimski i neenzimski) osiguravaju zaštitu od metala koji uzrokuju štete izazvane slobodnim radikalima. Općenito, antioksidansi mogu zaštititi toksičnost uzrokovanu metalima na više načina: (a) keliranjem željeznih iona i sprječavanjem reakcije s molekulskim kisikom ili peroksidima, (b) keliranje željeza i njegovo održavanje u redoks statusu, što sprječava željezo da reducira molekularni kisik i (c) zarobljavanjem bilo kojeg stvorenog radikala (Jomova i Valko, 2011).

### **1.3.1 Željezo**

Željezo (Fe) nije samo bitan mikronutrijent, već i bio-katalizator ključnih oksidacijsko-redukcijski reakcija, svojstvo koje pogoduje stvaranju staničnih reaktivnih vrsta kisika (ROS) kada se postignu prekomjerne razine prijelaznog metala. U takvim uvjetima postiže se oksidacijsko propadanje biomolekula s gubitkom njihovih funkcija, pro-oxidacijsko stanje tkiva koje se može procijeniti mjerenjem omjera oštećenje/zaštita kao indikatora. To uključuje indeks lipidnog radikala ( $LR^{\bullet}$ ) / $\alpha$ -tokoferola (aT) i omjera askorbil radikal( $A^{\bullet}$ )/askorbat (AH), koji reflektiraju stvarni oksidativni obrambeni status uglavnom na



lipofilnoj i hidrofilnoj razini, čime se osigurava rana i jednostavna dijagnoza stresa (Nakatsuka i sur., 2009).

Suprotno teškom razvoju oksidacijskog stresa, umjereno povećanje ROS-a u određenom razdoblju može regulirati ekspresiju gena s citoprotektivnim odgovorima, što predstavlja preventivnu zaštitu protiv kasnijeg štetnog događaja. U takvim uvjetima, umjerene razine ROS mogu regulirati funkciju proteina putem reverzibilne oksidacije sulfhidril i/ili ekspresije gena induciranjem promjena u specifičnoj funkciji kinaze, fosfataze ili faktora transkripcije. ROS mogu aktivirati redukcijski osjetljive transkripcijske čimbenike kao što je NF- $\kappa$ B, koji koordiniraju različite biološke reakcije (Nakatsuka i sur., 2009).

Željezo je ključna komponenta mnogih proteina bitnih za funkciju mozga, uključujući citokrom a, b i c, citokrom oksidazu i komplekse željezo-sumpor u mitohondrijskom lancu transporta elektrona. Također je kofaktor za neke enzime koji su uključeni u sintezi DNA. Razinu željeza u mozgu kontrolira krvno-moždana barijera (BBB) i sustav bjelančevina za kontrolu željeza u mozgu (Ong i Farooqui, 2005). Poznato je da je željezo uključeno u neuronske bolesti kao što su neurodegenerativne bolesti, ishemija mozga i epilepsija. Iako je ono bitno za sisavce u prijenosu kisika, sustavno preopterećenje željeza uzrokuje cirozu jetre, srčanu bolest i dijabetes kod pacijenata s hemokromatozom. U mozgu željezo igra važnu ulogu u proizvodnji mijelina, metabolizmu monoaminskih transmitera i sintezi GABA. S druge strane, akumulacija beta-amiloida s željezom utvrđena je kao izravni izvor oksidacijskog stresa kod Alzheimerove bolesti (Nakatsuka i sur., 2009).

Istraživanje koje su proveli Piloni i suradnici (2015) upućuje na to da se sadržaj Fe u korteksu i striatumu povećava u većoj mjeri nego u hipokampusu, pri čemu su aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) i katalaze (CAT) znatno povećane u korteksu, ali ne u striatumu i hipokampusu. Ovi podaci upućuju na to da različita područja mozga pokazuju različito osjetljivost na učinke povećane koncentracije željeza.

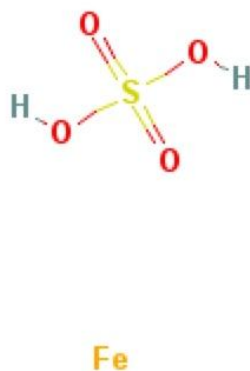
Mozak teži samo nekoliko posto tjelesne mase, ali čini oko 20 % ukupne bazalne potrošnje kisika iz mitohondrija. U ljudskom mozgu, željezo se prvenstveno skladišti feritinom u mijelinskim ovojnicama. Akumulira se fiziološki s godinama, dosežući plato u dobi od 40-50 godina (Haider, 2015). Kod Alzheimerove bolesti (AD) pronađene su povišene razine feritina u tkivu mozga (Ayton i sur., 2015). Eksperimentalna ozljeda leđne moždine otkrila je da željezo može pojačati oksidacijsko oštećenje u lezijama središnjeg živčanog

sustava. Uočeno je da željezo oslobođeno u izvanstaničnom prostoru tijekom raspada mijelina pojačava prvi val oksidacijskog stresa kod multiple skleroze (Haider, 2015).

Željezo se javlja u oksidacijskim stanjima +II i +III. Željezni ioni su topivi u biološkim tekućinama i generiraju se u prisutnosti kisika oštećujući hidroksilne radikale. Željezni ioni su nestabilni u vodenim medijima i obično reagiraju s molekulskim kisikom u obliku željeznih iona i superoksidnog anionskog radikala. Oksidirani oblik željeza je netopiv u vodi pri neutralnom pH i precipitira se u obliku željeznog hidroksida. Željezna homeostaza je složen proces jer postoji mnogo različitih proteina koji ne reagiraju samo na ukupno preopterećenje željeza u tijelu, već i na podražaje poput hipoksije, anemije i upale. Oko 65 % željeza je vezano za hemoglobin, 10 % je sastavni dio mioglobina, citokroma i enzima koji sadrže željezo, a 25 % je vezano za željezne proteine za skladištenje, feritin i hemosiderin. Oko 0,1 % željeza cirkulira u plazmi vezano za transferin. Proces keliranja ne samo da olakšava transport željeza u stanice, nego također sprječava toksičnost slobodnog radikala posredovanog željeza. Proces stjecanja i skladištenja staničnog željeza reguliran je regulatorima željeznog proteina (IRPs). Preopterećenje željeza je stanje koje je karakteristično za pacijente koji pate od hemokromatoze, što uzrokuje širenje oštećenja organa. Mnoga su istraživanja dokazala da mutacije u enzimima superoksid dismutaze i regulatornih proteina željeza mogu dovesti do suvišnih razina superoksidnih anionskih radikala i preopterećenja željezom. Disregulacija homeostaze željeza u mozgu ključni je čimbenik za rane neuropatološke događaje u Alzheimerovoj bolesti (AD), uključujući oksidacijski stres, upalne procese, amiloidno taloženje, tau fosforilaciju i neuronalni regulacijski neuspjeh u staničnom ciklusu te apoptozu (Jomova i Valko, 2011).

### **1.3.2 Fe-dekstran**

Željezo dekstran,  $\text{FeH}_2\text{O}_4\text{S}$  (Slika 11), je tamno smeđa, lagano viskozna otopina, koristi se za liječenje nedostatka željeza. Doze željeznog dekstrana koje premašuju zahtjeve za obnovu hemoglobina i nadopunjavanje željezne prehrane mogu dovesti do hemosideroze (Fokalno ili generalizirano taloženje Fe bez pratećeg oštećenja tkiva). Zabilježeni su slučajevi teških, ponekad fatalnih alergijskih reakcija (gubitak svijesti, kolaps, poteškoće s disanjem, oticanje ili konvulzije) i ozbiljno nizak krvni tlak (hipotenzija) uz upotrebu željeznog dekstrana.



**Slika 11.** 2D struktura Fe-dekstrana (preuzeto sa:

[https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/iron\\_dextran#section=Molecular-Formula](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/iron_dextran#section=Molecular-Formula))

Taj gusti spoj željeza i dekstrana, može prijeći krvno moždanu barijeru (BBB) tako da oponaša patološki put u središnjem živčanom sustavu. Zabilježeno je da može ući u mozak i pohraniti se u cerebralna tkiva kao što je korteks. Smatra se da je akumulacija željeza uključena u patogenezu Parkinsonove bolesti (PD). PD je progresivna neurodegenerativna bolest povezana s gubitkom dopaminergičkih neurona i rezultira kliničkim sindromom kojeg karakterizira tremor, krutost i teško pogoršana pokretljivost (Jiang i sur., 2007).

Oberhauser i sur. (1970) proveli su istraživanje sa 40 zečeva i 12 majmuna kojima su intravenski ubrizgavali željezo u obliku željezo-dekstrana. Nakon određene kumulativne doze, životinje su razvile neurološki sindrom koji uključuje abnormalne pokrete slične parkinsonovom tremoru. Istodobno je opaženo da je željezo prešlo krvno-moždanu barijeru i pojavilo se u mozgu. Koncentracija željeza u bazalnom gangliju bila je znatno viša nego u cerebralnom korteksu (Oberhauser i sur., 1970).

Piloni i suradnici (2016) prikazuju da je kronična primjena Fe-dekstrana (50 mg/kg /dan, 5 puta tjedno tijekom 4 tjedna) izazvala pojačanu lipidnu peroksidaciju i poboljšanje oksidacije bjelančevina u cerebralnom korteksu, povezanu sa smanjenjem sadržaja neenzimatskog antioksidansa i aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) i katalaze (CAT), što rezultira ozbiljnom neurotoksičnošću. Suprotno tome, akutna obrada Fe-dekstranom (pojedinačna doza od 500 mg/kg) dovela je do razvoja oksidacijskog stresa u mozgu štakora s paralelnim poticanjem aktivnosti CAT i DNA vezujućeg nuklearnog čimbenika- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), kao staničnih zaštitnih parametara.

## 1.4 CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj rada je istražiti mogući antioksidativni/prooksidativni učinak izoflurana i željezo-dekstrana, kao i njihovo zajedničko djelovanje na uzorcima tkiva mozga štakora primjenom metoda kako slijedi: analiza osmotske fragilnosti eritrocita, promjena hematoloških pokazatelja krvi, procjena razine neuroupale, mjerenje relativne težine mozga, te mjerenje biljega oksidacijskog stresa (razina cjelokupnog glutaciona i lipidne peroksidacije, aktivnost katalaza i superoksid dismutaza).

## **2. MATERIJALI I METODE**

### **2.1. MATERIJALI**

#### **2.1.1. 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 24 Y59 štakora podijeljenih u 4 skupine sa po 6 životinja obzirom na obradu (izofluran i željezo dekstran sami i /ili u kombinaciji) koje su bile hranjene standardnom hranom za laboratorijske životinje (Standard Diet GLP, 4RF21, Mucedola, Settimo Milanese MI, Italija), uz stalnu dostupnost vode. Uvjeti su bili standardni (dnevni ritam od 12 sati dana i 12 sati mraka, temperatura 24 °C uz kontroliranu vlažnost zraka).

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).

#### **2.1.2. Kemijski spojevi**

##### **2.1.2.1. *Izofluran***

Kao inhalacijski anestetik korišten je izofluran ( $C_3H_2ClF_5O$ ;  $M_r=184,492$  g/mol) proizvođača Baxter.

##### **2.1.2.2. *Željezo dekstran***

Korišten je željezo dekstran ( $FeH_2O_4S$ ;  $M_r = 153,917$  g/mol) proizvođača Santa Cruz Biotechnology, SAD.

##### **2.1.2.3. *Priprema željezo dekstrana***

Otopina željezo dekstrana pripremljena je otapanjem  $FeH_2O_4S$  u dozi od 50 mg/kg životinje u pročišćenoj vodi.

### **2.1.3. Laboratorijska oprema**

Centrifuga: Centrifuge 5702 (proizvođač: Eppendorf, Njemačka);

Spektrofotometar: Libra S22 (proizvođač: Biochrom, UK)

Vaga: ABS 220 – 4 (proizvođač: Kern & Sohn, Njemačka)

Vortex: Vortex Genius 3 (proizvođač: IKA, SAD)

Homogenizator: Sonopuls mini (proizvođač: Bandelin, Njemačka).

## **2.2. METODE**

### **2.2.1. Praćenje promjena tjelesne mase**

Prije početka izvođenja pokusa, kao i tijekom izvođenja pokusa, životinje su pojedinačno označene i izvagane, te su na temelju toga razvrstane u skupine s približno sličnom tjelesnom masom ( $\pm 10$  g). Na temelju mase životinja za pojedinu skupinu određena je količina pojedinačnih pripravka koje su davane tijekom pokusa, te je praćena promjena mase tijekom istih. Mjerenja tjelesnih masa su izvršena digitalnom vagom.

#### ***2.2.1.1. Relativni indeks težine organa***

Relativna težina organa izračunata je prema sljedećoj formuli:

$$\text{relativna težina organa} = \frac{\text{ukupna težina organa} \times 100}{\text{konačna tjelesna težina}} \text{ i izražena u g/ 100 g.}$$

### **2.2.2. Obrada životinja**

Patofiziološke promjene su izazvane intraperitonealnim (*ip*) injiciranjem otopine željezo dekstrana u subkroničnoj dozi od 50 mg/kg štakora, te anesteziranjem štakora izofluranom (1,5 %) tijekom 28 dana (Tablica 3).

Pokusne životinje su podijeljene u četiri skupine po 6 životinja: Prvu skupinu su činili štakori koji su služili kao kontrola te su primali 0,9 % NaCl svaki drugi dan tijekom 28 dana. Drugu skupinu su činili štakori koji su bili izloženi kroz dva sata 1,5 % inhalacijskom anestetiku izofluranu svaki drugi dan tijekom 28 dana. Treću skupinu su činili štakori koji su primali *ip* gore opisanu otopinu željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana, dok su četvrtu skupinu činile životinje koje su 2 h nakon *ip* injiciranja otopine željezo dekstrana primale 1,5 % inhalacijski anestetik izofluran kroz dva sata svaki drugi dan tijekom 28 dana.

Nakon 28 dana obrade životinja, životinje su anestetizirane i analgezirane *ip* injiciranjem kombinacije Narketana® (Vetoquinol S.A. BP 189 Lure Cedex, Francuska) i Xylapana® (Vetoquinol Biowet Sp., Gorzow, R. Poljska), te žrtvovane kako bi se prikupila tkiva i organi za daljnju analizu.

**Tablica 3.** Pokusne skupine i način obrade

Oznaka skupine	Sastav pokusne otopine	Doziranje	Način primjene	Period obrade (dani)
0. Kontrola	0,9 % NaCl	0,5 mL svaki drugi dan	<i>ip</i>	28
1. Izofluran	izofluran, inhalacijski anestetik	1,5 % svaki drugi dan	inhalacijski	28
2. FeH <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S 50 mg/kg	50 mg/kg FeH <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S u 0,5 mL pro aqua	0,5 mL svaki drugi dan	<i>ip</i>	28
3. FeH <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S 50 mg/kg u kombinaciji sa izofluranom	50 mg/kg FeH <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S u 0,5 mL pro aqua u kombinaciji sa izofluranom	0,5 mL pokusne otopine u kombinaciji sa 1,5 % inhalacijskim anestetikom svaki drugi dan	<i>ip</i> + inhalacijski	28

### **2.2.3. Izolacija i priprema tkiva**

Nakon tjedan dana odvagano je 75 - 100 mg organa u Eppendorf epruvetu volumena 2 mL, te je dodan fosfatni pufer (PBS) u omjeru 1:10. Uzorci su zatim homogenizirani ultrazvučnim homogenizatorom. Homogenati su centrifugirani 15 min na 15 000 okretaja na 4 °C, odvojen je supernatant u novu Eppendorf epruvetu, te su napravljena razrjeđenja 10x i 40x. Svi uzorci su zatim pohranjeni do analize na -20 °C.

## **2.2.4. Određivanje parametara oksidacijskog stresa**

### ***2.2.4.1. Određivanje proteina metodom po Lowry-u***

Metodom po Lowry-u (1951) određena je količina proteina u uzorcima tkiva mozga. Metoda kombinira biuretsku reakciju i oksidaciju aromatskih bočnih ogranaka. Biuretska reakcija temelji se na redukciji bakra u reakciji sa peptidnom vezom u lužnatim uvjetima. Ioni  $\text{Cu}^{2+}$  vežu se na peptidne veze i reduciraju u  $\text{Cu}^+$  te nastaje kompleks  $\text{Cu}^+$  - protein. Dodatkom Folinova reagensa dolazi do reakcije  $\text{Cu}^+$  - protein kompleksa sa Folinovim reagensom pri čemu se razvija plavo obojenje otopine.

Uzorci tkiva mozga razrijeđeni su 10 puta. U epruvetu je stavljeno 100  $\mu\text{L}$  nadtaloga i 2 mL otopine D (Tablica 4) te je 10 min inkubirano na sobnoj temperaturi. Nakon toga je dodano 200  $\mu\text{L}$  otopine E (Tablica 4). Uzorci su vorteksirani i stavljeni na inkubaciju u mraku u trajanju od 30 min. Na spektrofotometru mjerena je apsorbancija na valnoj duljini od 600 nm. Kao standard je korišten albumin goveđeg seruma (engl. *Bovine serum albumin*, BSA) u poznatim koncentracijama (2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125; 0,015625 mg/mL). Nagib pravca je određen korištenjem standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji BSA, te su koncentracije proteina u uzorcima izračunate preko nagiba pravca, po formuli:

$$c = \left( \frac{A_{uzorka} - b_{st.krivulje}}{\text{nagib pravca st.krivulje}} \right) \times \text{razrijeđenje}$$

. Koncentracije su izražene kao mg proteina/mL

uzorka.



**Tablica 4.** Priprema otopina za određivanje proteina

Otopine	Način pripreme
Otopina A: 2 % (w/v) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> u 0,1M NaOH	9,6 g + 480 mL 0,1M NaOH
Otopina B: 1 % (w/v) natrij-kalij tartarat u dH <sub>2</sub> O	0,1 g + 10 mL dH <sub>2</sub> O
Otopina C: 0,5 % (w/v) CuSO <sub>4</sub> × 5H <sub>2</sub> O u dH <sub>2</sub> O	0,05 g + 10 mL dH <sub>2</sub> O
<b>Otopina D</b>	pomiješati otopine A:B:C u omjeru 48:1:1
<b>Otopina E</b>	pomiješati Folin & Ciocalteu's phenol reagens i dH <sub>2</sub> O u omjeru 2:1 ( npr. 14 mL Folin & Ciocalteu's phenol reagens + 7 mL dH <sub>2</sub> O )

#### 2.2.4.2. Mjerenje količine lipidne peroksidacije

Modificiranom metodom koju su opisali Jayakumar i sur. (2007) određena je količina lipidne peroksidacije. U ovoj metodi mjeri se količina jednog od glavnih produkata lipidne peroksidacije - malondialdehida (MDA). MDA u organizmu nastaje kada reaktivni kisikovi spojevi razgrađuju višestruko nezasićene masne kiseline. Za određivanje koncentracije MDA u biološkom uzorku najčešće se koristi metoda derivatizacije MDA s 2-tiobarbituratnom kiselinom (TBA) pri čemu MDA reagira s dva ekvivalenta TBA i nastaje MDA-(TBA)<sub>2</sub> kompleks. Reakcija se odvija na visokoj temperaturi (95°C) i u kiselim uvjetima pri čemu nastaje crveni fluorescentni kompleks MDA-(TBA)<sub>2</sub> čija se koncentracija mjeri na spektrofotometru pri valnoj duljini od 532 nm.

Za mjerenje MDA u uzorcima tkiva mozga korišteni su homogenati. U Eppendorf epruvetu stavljeno je 100 µL uzorka i dodano 1,6 mL prethodno pripremljene otopine A (Tablica 5). Epruvete na stalku su zatim bile umotane u aluminijsku foliju i stavljene u vodenu kupelj 60 min na 95 °C. Nakon toga stalak s epruvetama je stavljen na led 10 min kako bi se otopina naglo ohladila, te su potom uzorci centrifugirani na 5000 okretaja 10 min. Na taj način su se folikule koje su nastale miješanjem uzorka i otopine A slegnule na dno. Supernatant je odvojen i mjerena je apsorbancija na spektrofotometru pri valnoj duljini od 532 nm. Ukupna koncentracija MDA izračunata je pomoću ekstinkcijskog koeficijenta za MDA ( $\epsilon$

=  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) prema sljedećoj formuli:  $c = \frac{A_{uzorka} \times V_{reakcijske \text{ smjese}}(\text{mL})}{\epsilon \times V_{uzorka}(\text{mL}) \times c_{\text{proteina u uzorku}}(\frac{\text{mg}}{\text{mL}})}$ . Ukupna koncentracija MDA izražena je kao nmol MDA po mg proteina.

**Tablica 5.** Priprema otopina za određivanje koncentracije MDA

Otopine	Način pripreme otopina
8,1 % SDS	0,81 g SDS-a u 10 mL dH <sub>2</sub> O
20 % octena kiselina	20 mL 99,5 % octene kiseline i 2,31 mL HCl, nadopuni se do 50 mL dH <sub>2</sub> O i podesi pH = 3,5 te nadopuni dH <sub>2</sub> O do 100 mL
0,8 % TBA	0,8 g TBA u 40 mL dH <sub>2</sub> O uz lagano zagrijavanje. Nakon što se otopi dodaje se 500 μL 5M NaOH te se nadopuni s dH <sub>2</sub> O do 100 mL.
Otopina A	100 μL 8,1 % SDS + 750 μL 20 % octene kiseline (pH = 3,5) + 750 μL 0,81 % TBA

#### 2.2.4.3. Mjerenje količine ukupnog glutationa (GSH)

Prema modificiranoj metodi koju je opisao Tietze (1969) određena je količina ukupnog glutationa u uzorcima tkiva mozga. Metoda se temelji na reakciji između tiolonog reagensa 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoične kiseline (DTNB, Ellmanov reagens) i GSH pri čemu nastaje kromofor (5-tionitrobenzoična kiselina (TNB)) koji se može očitati fotometrijski na valnoj duljini 412 nm. Osim TNB, stvara se GS-TNB koji se reducira pomoću GSH reduktaze i NADPH pri čemu se otpušta druga molekula TNB i reciklira se GSH. Brzina nastanka TNB je proporcionalna reciklirajućoj reakciji koja je proporcionalna koncentraciji GSH u uzorku. U ovoj metodi sav oksidirani GSH (disulfid GSSG) brzo se reducira do GSH. Konačan dobiveni rezultat odgovara ukupnoj koncentraciji oksidiranog i reduciranog GSH u uzorku.

Mjerenje koncentracije ukupnog GSH provedeno je u mikrotitarskoj pločici korištenjem razrjeđenja 10x za uzorke mozga. U svaku pojedinu jažicu dodano je 20 μL uzorka, 40 μL 0,035 M HCl i 40 μL 10 mM DTNB i zatim se mjeri apsorbancija na valnoj duljini od 415 nm. Nakon toga dodano je 100 μL otopine GR (20 μL GR (50 U/mL) + 9980

$\mu\text{L}$  0,8 mM NADPH) te je apsorbancija mjerene tijekom 5 min. Za sve standarde nacrtani su pravci kao promjena apsorbancije u vremenu. Nagibi pravca su očitani, te je nacrtan pravac kao ovisnost nagiba pravca o koncentraciji GSH. Taj dobiveni pravac korišten je za dobivanje koncentracije ukupnog GSH u uzorku prema formuli:  $c = \frac{\text{nagib pravca} - \text{nagib slijepe probe}}{\text{nagib pravca standarda}} \times \text{razrjeđenje}$ . Koncentracija ukupnog GSH prikazna je kao  $\mu\text{M}$  GSH po mL proteina.

#### 2.2.4.4. Mjerenje enzimske aktivnosti katalaze

Spektrofotometrijskom metodom po Aebiju (1984) određena je aktivnost katalaze. Za određivanje katalaze korištena su razrjeđenja 10x. U kivetu ukupnog volumena 1 mL dodano je 20  $\mu\text{L}$  uzorka i 980  $\mu\text{L}$  prethodno pripremljenog 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  (113  $\mu\text{L}$  30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  + 99,887 mL PBS). Aktivnost katalaze mjerila se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 240 nm tijekom jedne minute i izračunata je prema formuli:  $CAT = \frac{A_{uzorka}}{\varepsilon(\text{H}_2\text{O}_2) \times l} \times \text{razrjeđenje}$ , gdje je ekstinkcijski koeficijent  $\varepsilon = 39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , a broj l je jednak putu koji zraka svijetla prođe kroz kivetu (1 cm). Dobivena koncentracija izražena je kao U/mg proteina, što odgovara  $\mu\text{mol}$  razgrađenog  $\text{H}_2\text{O}_2$  u minuti po miligramu proteina.

#### 2.2.4.5. Mjerenje enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

Prema metodi po Flohé i Ötting (1971) određena je aktivnost superoksid dismutaze u uzorcima. Metoda se temelji na inhibiciji redukcije citokroma c u sustavu ksantin/ksantin oksidaza (XOD). SOD je metaloenzim koji katalizira dismutaciju dvaju superoksidnih radikala ( $\text{O}_2^-$ ) u  $\text{H}_2\text{O}_2$  i  $\text{O}_2$ .

U metodi su korištene dvije slijepe probe. Prva slijepa proba bila je samo otopina A (Tablica 6) te je u spektrofotometru mjerena apsorbancija na valnoj duljini od 550 nm tijekom 3 min. Druga slijepa proba koristila se za namještanje aktivnosti ksantin oksidaze (XOD). Ta aktivnost trebala je biti oko 0,025 U/min. U kivetu je stavljeno 25  $\mu\text{L}$  fosfatnog pufera, 1,45 mL otopine A i na kraju enzim XOD u početnom volumenu od 25  $\mu\text{L}$ . Uzorci su analizirani nakon što se postignula optimalna aktivnost SOD. U svaku reakcijsku smjesu, umjesto pufera, dodano je 25  $\mu\text{L}$  uzorka i odgovarajući volumen ksantin oksidaze te je odmah nakon toga mjerena apsorbancija u spektrofotometru. Za određivanje aktivnosti SOD prvo je izračunat postotak inhibicije aktivnosti XOD prema formuli:  $\% \text{inhibicije} = 100 - \frac{\Delta A_{uzorka}}{\Delta A_{slijepe probe}} \times 100$ . Iz % inhibicije je izračunata aktivnost SOD izražena kao U/mL uzorka

prema formuli:  $\text{aktivnost SOD} = 10^{\frac{\% \text{inhibicije} + 12,757}{30,932}}$ . Aktivnost SOD (U/mg proteina) je

izračunata prema formuli:  $aktivnost\ SOD = \frac{aktivnost\ SOD\ U/mL}{c_{proteina\ u\ uzorku}} \times razrjedenje$ . Korištena razrjedenja uzoraka mozga bila su 10x.

**Tablica 6.** Priprema otopina za određivanje aktivnosti superoksid dismutaze

Otopine	Način pripreme otopina
50 mM PBS	Pomiješati 17 mL (1,56 g $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$ u 50 mL $dH_2O$ ) i 183 mL (5,678 g $Na_2HPO_4$ u 200 mL $dH_2O$ ), 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 $\mu$ L ksantin oksidaze i 960 $\mu$ L $dH_2O$

### 2.2.5. Analiza hematoloških parametara krvi

Uzorci krvi za analizu hematoloških parametara uzeti su iz aksilarnog spleta krvnih žila pokusnih životinja. Uzorci su stavljeni u heparinizirane staklene vacuutainere s dodatkom EDTA (Becton Dickinson, Plymouth, UK) te su pohranjeni na temperaturi od 4 °C tijekom 2 sata do određivanja hematoloških parametara. Od hematoloških parametara određivan je broj eritrocita (Erc), broj leukocita (Lkc), hematokrit (Hct), koncentracija hemoglobina (Hb), broj segmentiranih neutrofila, broj limfocita, monocita i eozinofila. Hematološki parametri određivani su na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu preporučenim analitičkim metodama. Određeni su na elektronskom brojaču Horiba ABX169 (Micros, Francuska).

### **2.2.6. Osmotska otpornost eritrocita**

Osmotski gradijent između stanične i izvanstanične tekućine uspostavljaju selektivno propusne stanične membrane. O koncentraciji nedifuzibilnih iona s obje strane membrane ovisi jačina osmotskog tlaka. Za 0,9 % otopinu NaCl kažemo da je izotonična: stave li se eritrociti u takav medij, preko njihove će se membrane uspostaviti osmotska ravnoteža između stanične i izvanstanične tekućine, tako da će neto ulaz i izlaz vode biti nula. U hipertoničnom mediju, npr. 1,8 % NaCl, uslijed brzog osmotskog gubitka vode, stanice gube svoj normalni bikonkavni oblik. U hipotoničnom mediju, npr. 0,4 % NaCl, dolazi do povećanog ulaska vode u stanicu: narušava se cjelovitost stanične membrane, stanice bubre i dolazi do hemolize – hemoglobin izlazi iz stanice i otapa se u okolnom mediju.

Metoda se temelji na različitim osmotskim otpornostima pojedinih eritrocita i činjenici kako broj stanica koje su u hemolizi ovisi o hipotoničnosti izvanstaničnog medija. Pokazatelj stupnja osmotske hemolize je koncentracija oslobođenog hemoglobina u svakoj test otopini. Cilj je istražiti odnos između osmolalnosti medija u kojem su eritrociti suspendirani i stupnja hemolize. Ova metoda služi kao pokazatelj metaboličkih poremećaja unutar eritrocita, stupnja oštećenja stanične membrane eritrocita, sinteze enzima ili poremećaja u strukturi hemoglobina.

Pripremljen je niz epruveta: 0,9 mL 0,9 %; 0,8 %; 0,7 %; 0,6 %; 0,5 %; 0,4 %; 0,3 %; 0,2 %; 0,1 % i 0,0 % otopine NaCl. Štapićem je pomiješan uzorak krvi kako bi se dobila homogena suspenzija stanica. Pipetom se stavi po 0,01 mL uzorka krvi u pripremljene epruvete, te se uzorci inkubiraju 30 minuta. Epruvete se centrifugiraju 10 min na 2200 okretaja/min. Spektrofotometrijski se mjeri odvojeni supernatant na 540 nm, a kao slijepa proba koristi se prva epruveta (0,9 % NaCl).

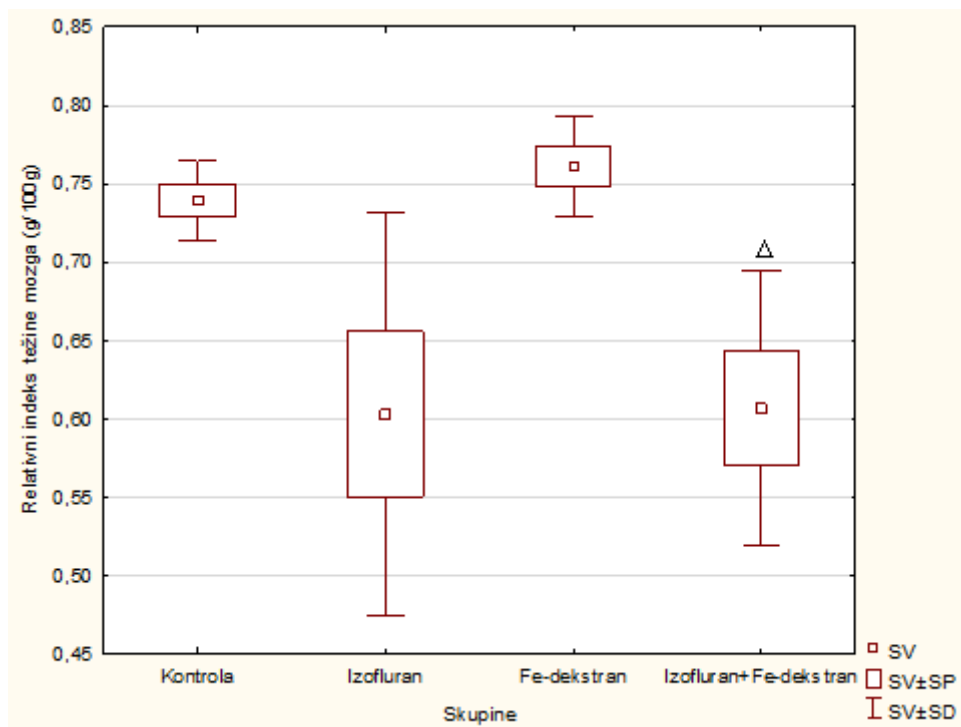
### **2.2.7. Statistička obrada podataka**

Za pripremu podataka korišten je računalni program Microsoft Excel 2016. Statistička analiza je provedena putem programa STATISTICA 13 (StatSoft, Tulsa, OK, USA), a statistička točnost određena je s  $P < 0,05$ . Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška (SV  $\pm$  SP). Pomoću Kruskal-Wallis ANOVA-a testa analizirani su podaci. Višestrukom komparacijom srednjih vrijednosti svih skupina napravljena je daljnja analiza razlika između skupina. Rezultati su prikazani grafički i tablično pomoću box-plot prikaza.

### 3. REZULTATI

#### 3.1. RELATIVNI INDEKS TEŽINE MOZGA

Analizom rezultata relativnog indeksa težine mozga (Slika 12) vidljiva je statistički značajna razlika u skupini obrađenoj Fe-dekstranom u odnosu na skupinu obrađenu kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana ( $P < 0,05$ ).

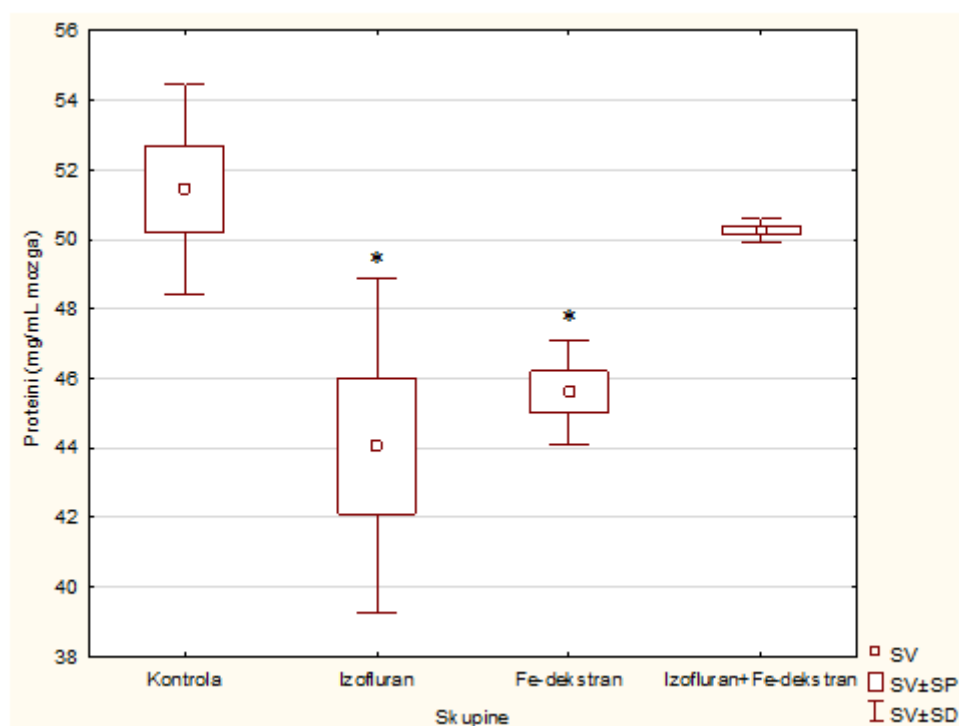


**Slika 12.** Relativni indeks težine mozga štakora obrađenih izofluranom, Fe-dekstranom i kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana. Štakori (N=6) su obrađeni sa izofluranom (1,5 %), Fe-dekstranom (50 mg/kg) ili kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana (2 h nakon intraperitonealnog injiciranja Fe-dekstrana, štakori su izloženi 1,5 % izofluranu) svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV± SD (SP). (<sup>Δ</sup>Statistički značajno različito u odnosu na Fe-dekstran ( $^{\Delta}P < 0,05$ ). Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija).

## 3.2. ODREĐIVANJE PARAMETARA OKSIDACIJSKOG STRESA

### 3.2.1. Određivanje količine proteina u uzorcima tkiva mozga štakora

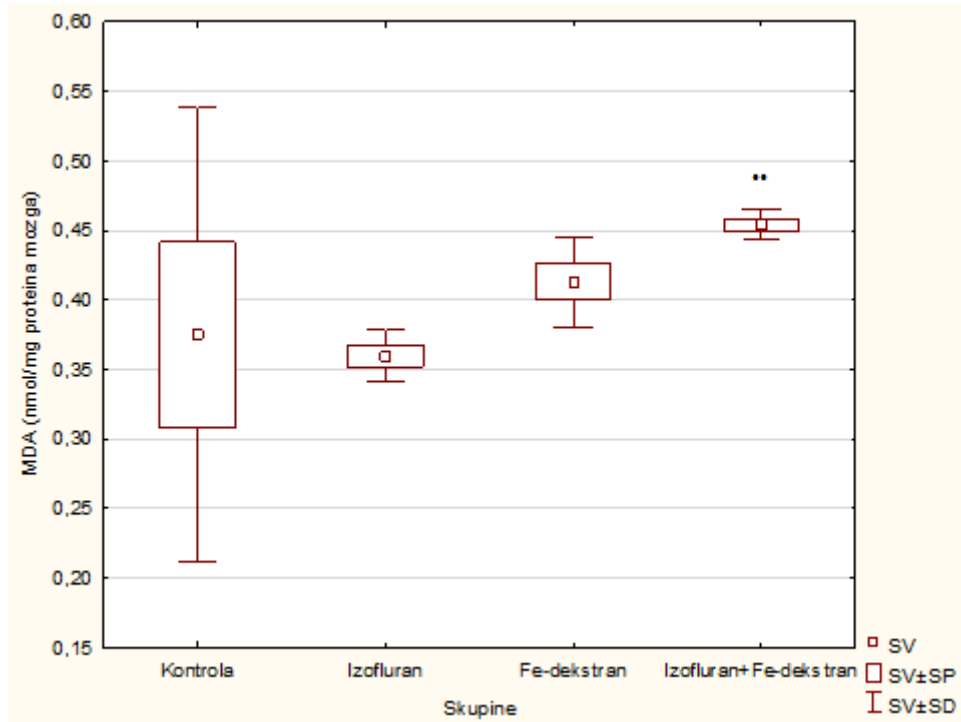
Analizom rezultata količine proteina u uzorcima tkiva mozga štakora (Slika 13) uočene su statistički značajne razlike u skupinama: kontrola vs izofluran ( $P < 0,05$ ) i kontrola vs Fe-dekstran ( $P < 0,05$ ). Rezultati pokazuju manju koncentraciju proteina u skupini obrađenoj izofluranom i skupini obrađenoj Fe-dekstranom u odnosu na kontrolnu skupinu.



**Slika 13.** Koncentracija proteina u uzorcima tkiva mozga štakora obrađenih izofluranom, Fe-dekstranom i kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana. Štakori (N=6) su obrađeni sa izofluranom (1,5 %), Fe-dekstranom (50 mg/kg) ili kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana (2 h nakon intraperitonealnog injiciranja Fe-dekstrana, štakori su izloženi 1,5 % izofluranu) svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SD (SP). (\* Statistički značajno različito u odnosu na kontrolu ( $P < 0,05$ ). Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija).

### 3.2.2. Mjerenje razine lipidne peroksidacije (MDA) u uzorcima tkiva mozga štakora

Rezultati mjerenja razine MDA u uzorcima tkiva mozga štakora (Slika 14) pokazuju statistički značajnu razliku u skupini obrađenoj sa izofluranom u odnosu na skupinu obrađenu kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana ( $P < 0,01$ ). Rezultati u skupini obrađenoj izofluranom pokazuju manju koncentraciju MDA u odnosu na skupinu obrađenu izofluranom i Fe-dekstranom.

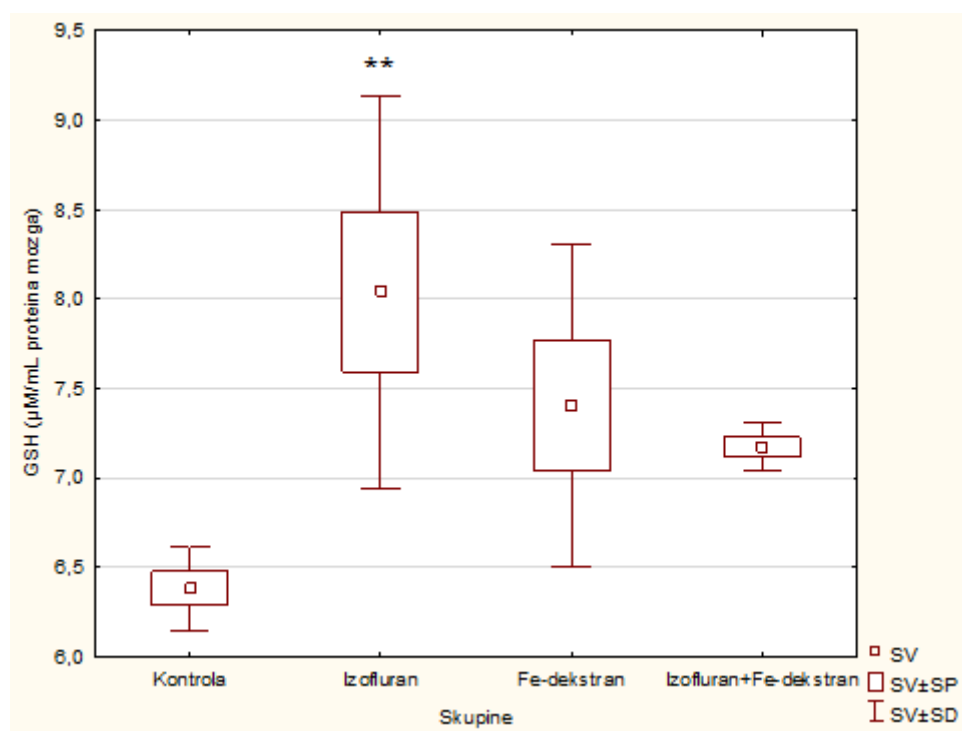


**Slika 14.** Koncentracija MDA u uzorcima tkiva mozga štakora obrađenih izofluranom, Fe-dekstranom i kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana. Štakori (N=6) su obrađeni sa izofluranom (1,5 %), Fe-dekstranom (50 mg/kg) ili kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana (2 h nakon intraperitonealnog injiciranja Fe-dekstrana, štakori su izloženi 1,5 % izofluranu) svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SD$  (SP). (\*Statistički značajno različito u odnosu na izofluran (\*\* $P < 0,01$ )). Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija).



### 3.2.3. Mjerenje ukupne količine glutationa (GSH) u uzorcima tkiva mozga štakora

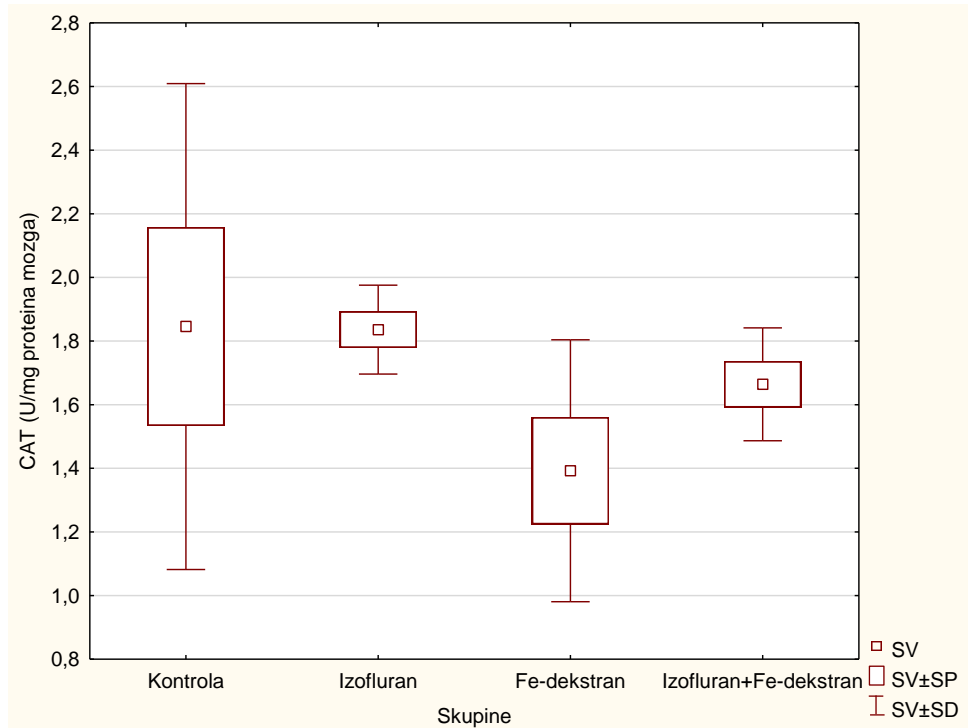
Rezultati mjerenja ukupne količine glutationa (Slika 15) u uzorcima tkiva mozga štakora pokazuju veću količinu GSH u svim skupinama u odnosu na kontrolnu skupinu. Međutim analizom rezultata statistički značajna razlika uočena je samo u skupini obrađenoj izofluranom u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,01$ ).



**Slika 15.** Koncentracija GSH u tkivu mozga štakora obrađenih izofluranom, Fe-dekstranom i kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana. Štakori (N=6) su obrađeni sa izofluranom (1,5 %), Fe-dekstranom (50 mg/kg) ili kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana (2 h nakon intraperitonealnog injiciranja Fe-dekstrana, štakori su izloženi 1,5 % izofluranu) svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SD$  (SP). (\* Statistički značajno različito u odnosu na kontrolu (\*\* $P < 0,01$ )). Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija).

### 3.2.4. Mjerenje enzimske aktivnosti katalaze u uzorcima tkiva mozga štakora

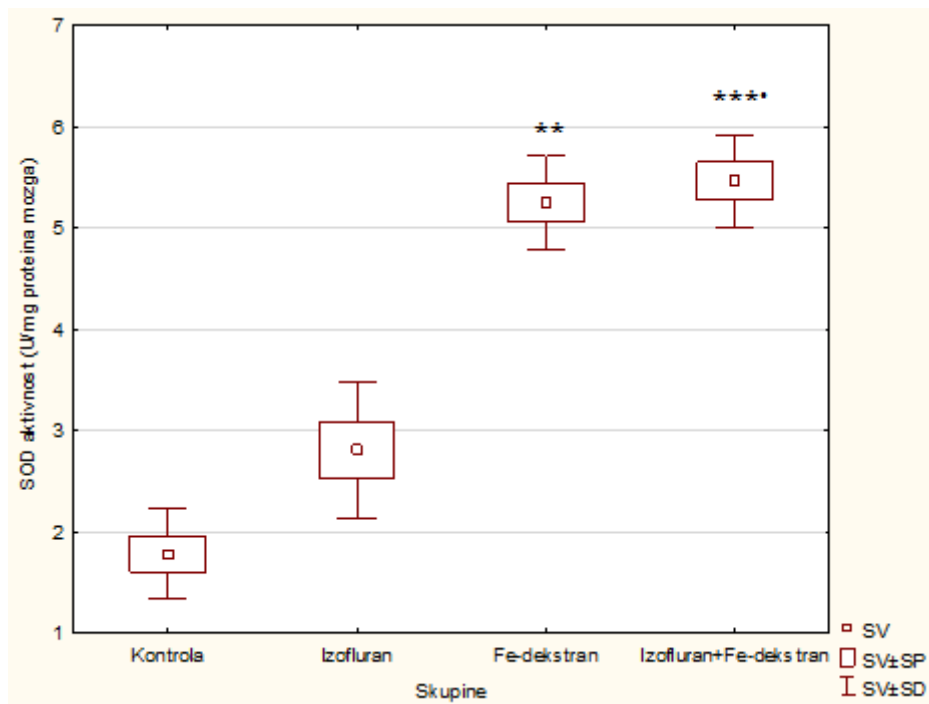
Rezultati mjerenja enzimske aktivnosti katalaze u uzorcima tkiva mozga štakora (Slika 16) ne pokazuju statistički značajnu razliku niti u jednoj obrađenoj skupini u odnosu na kontrolnu.



**Slika 16.** Koncentracija katalaze u uzorcima tkiva mozga štakora obrađenih izofluraom, Fe-dekstranom i kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana. Štakori (N=6) su obrađeni sa izofluranom (1,5 %), Fe-dekstranom (50 mg/kg) ili kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana (2 h nakon intraperitonealnog injiciranja Fe-dekstrana, štakori su izloženi 1,5 % izofluranu) svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SD$  (SP). (Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija).

### 3.2.5. Mjerenje enzimske aktivnosti SOD u uzorcima tkiva mozga štakora

Rezultati mjerenja enzimske aktivnosti SOD (Slika 17) u uzorcima tkiva mozga štakora pokazuju višu vrijednost u svim obrađenim skupinama u odnosu na kontrolnu skupinu. Analizom rezultata statistički značajna razlika uočena je u skupini obrađenoj Fe-dekstranom ( $P < 0,01$ ) i skupini obrađenoj kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana ( $P < 0,001$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu. Također je uočena manja aktivnost SOD u skupini obrađenoj izofluranom u odnosu na skupinu obrađenu kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana ( $P < 0,05$ ).

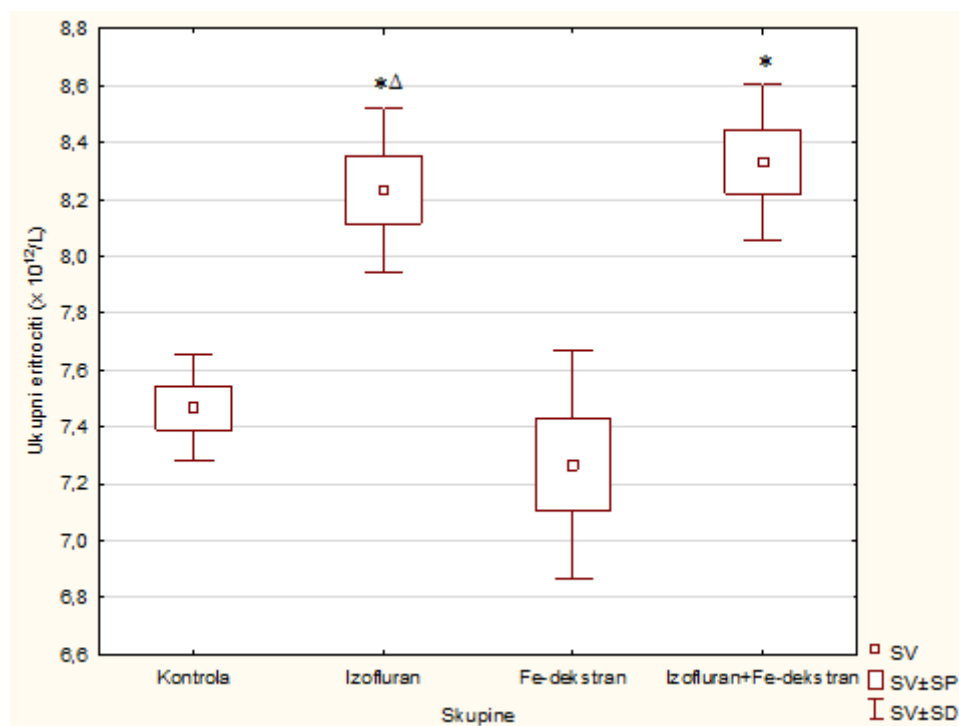


**Slika 17.** Aktivnost SOD u uzorcima tkiva mozga štakora obrađenih izofluranom, Fe-dekstranom i kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana. Štakori (N=6) su obrađeni sa izofluranom (1,5 %), Fe-dekstranom (50 mg/kg) ili kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana (2 h nakon intraperitonealnog injiciranja Fe-dekstrana, štakori su izloženi 1,5 % izofluranu) svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV± SD (SP). (\*Statistički značajno različito u odnosu na kontrolu (\*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ); \*Statistički značajno različito u odnosu na izofluran (\* $P < 0,05$ ). Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija).

### 3.3. ANALIZA HEMATOLOŠKIH POKAZATELJA KRVI

#### 3.3.1. Analiza ukupnog broja eritrocita

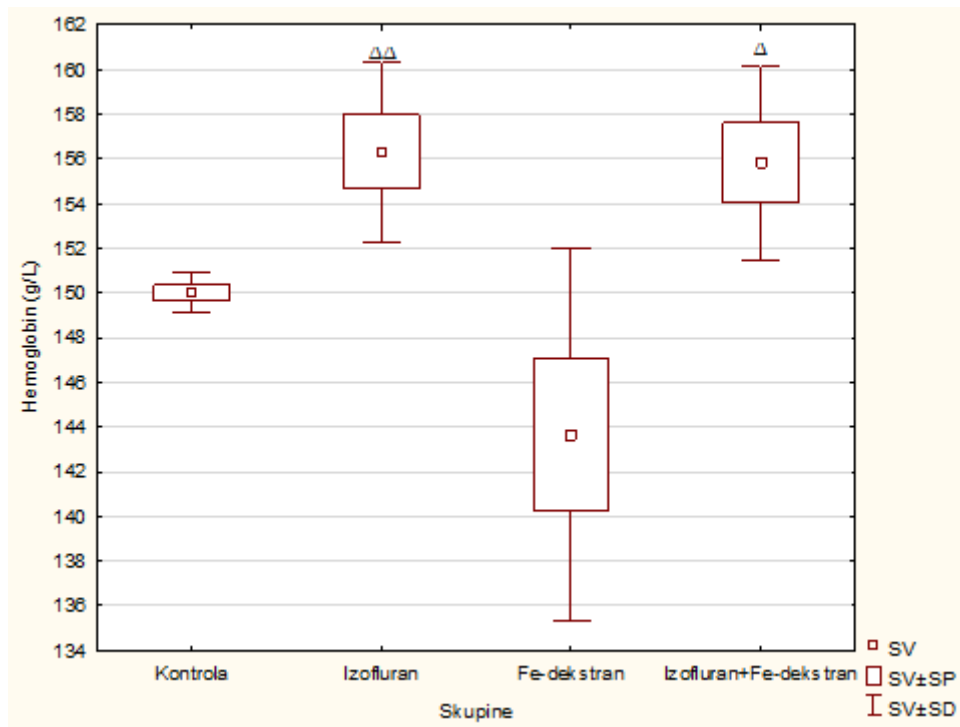
Rezultati analize ukupnog broja eritrocita (Slika 18) pokazuju statistički značajnu razliku u skupini obrađenoj izofluranom ( $P < 0,05$ ) i skupini obrađenoj kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana ( $P < 0,05$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu, te skupini obrađenoj izofluranom u odnosu na skupinu obrađenu Fe-dekstranom ( $P < 0,05$ ).



**Slika 18.** Ukupni broj eritrocita u uzorcima krvi štakora obrađenih izofluranom, Fe-dekstranom i kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana. Štakori (N=6) su obrađeni sa izofluranom (1,5 %), Fe-dekstranom (50 mg/kg) ili kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana (2 h nakon intraperitonealnog injiciranja Fe-dekstrana, štakori su izloženi 1,5 % izofluranu) svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV± SD (SP). (\* Statistički značajno različito u odnosu na kontrolu (\* $P < 0,05$ ); <sup>Δ</sup>Statistički značajno različito u odnosu na Fe-dekstran (<sup>Δ</sup> $P < 0,05$ ). Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija).

### 3.3.2. Analiza hemoglobina

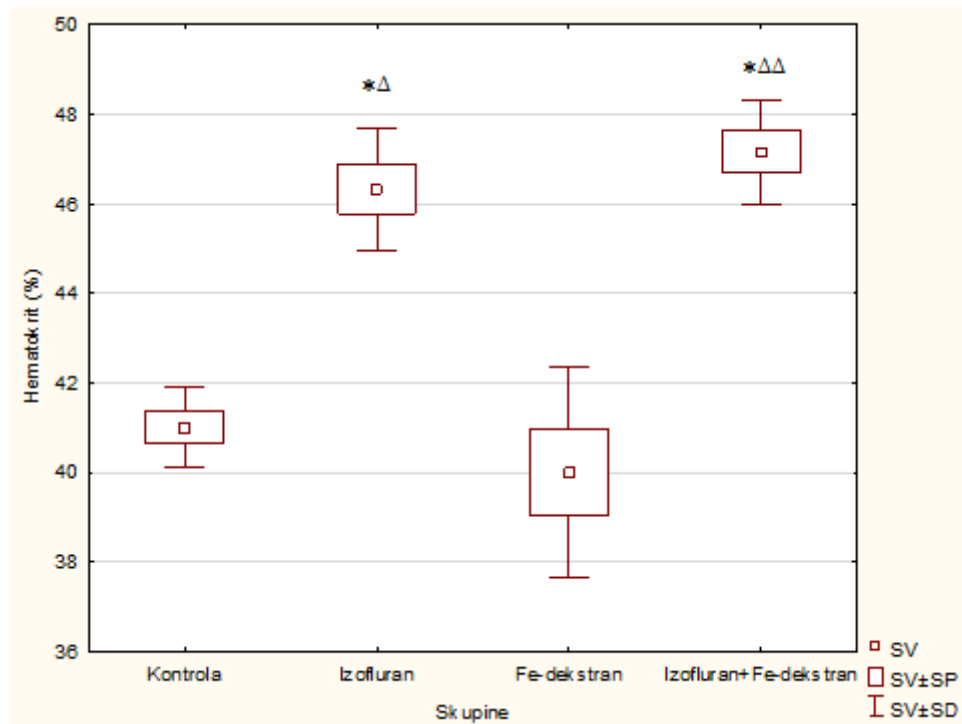
Analizom rezultata količine hemoglobina u uzorcima krvi štakora (Slika 19) uočena je statistički značajna razlika u skupini obrađenoj izofluranom u odnosu na skupinu obrađenu Fe-dekstranom ( $P < 0,01$ ) i skupini obrađenoj Fe-dekstranom u odnosu na skupinu obrađenu kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana ( $P < 0,05$ ).



**Slika 19.** Koncentracija hemoglobina u uzorcima krvi štakora obrađenih izofluranom, Fe-dekstranom i kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana. Štakori ( $N=6$ ) su obrađeni sa izofluranom (1,5 %), Fe-dekstranom (50 mg/kg) ili kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana (2 h nakon intraperitonealnog injiciranja Fe-dekstrana, štakori su izloženi 1,5 % izofluranu) svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SD$  (SP). ( $\Delta$ Statistički značajno različito u odnosu na Fe-dekstran ( $\Delta P < 0,05$ ;  $\Delta\Delta P < 0,01$ ). Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija).

### 3.3.3. Analiza hematokrita

Rezultati analize hematokrita (Slika 20) u uzorcima krvi štakora ukazuju na statistički značajnu razliku u skupini obrađenoj izofluranom ( $P < 0,05$ ) i skupini obrađenoj kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana ( $P < 0,05$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu, skupini obrađenoj izofluranom u odnosu na skupinu obrađenu Fe-dekstranom ( $P < 0,05$ ), te skupini obrađenoj Fe-dekstranom u odnosu na skupinu obrađenu kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana ( $P < 0,01$ ).



**Slika 20.** Koncentracija hematokrita u uzorcima krvi štakora obrađenih izofluranom, Fe-dekstranom i kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana. Štakori (N=6) su obrađeni sa izofluranom (1,5 %), Fe-dekstranom (50 mg/kg) ili kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana (2 h nakon intraperitonealnog injiciranja Fe-dekstrana, štakori su izloženi 1,5 % izofluranu) svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SD$  (SP). (\* Statistički značajno različito u odnosu na kontrolu ( $*P < 0,05$ );  $\Delta$  Statistički značajno različito u odnosu na Fe-dekstran ( $\Delta P < 0,05$ ;  $\Delta\Delta P < 0,01$ ). Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija).

### 3.3.4. Ostali hematološki pokazatelji

Rezultati ostalih hematoloških parametara prikazani su u Tablici 7. Najznačajnije promjene u svim hematološkim parametrima zabilježene su u skupini obrađenoj kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana, potom u skupini obrađenoj Fe-dekstranom, te skupini obrađenoj izofluranom.

**Tablica 7.** Analiza hematoloških pokazatelja u krvi štakora obrađenih izofluranom, Fe-dekstranom i kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana

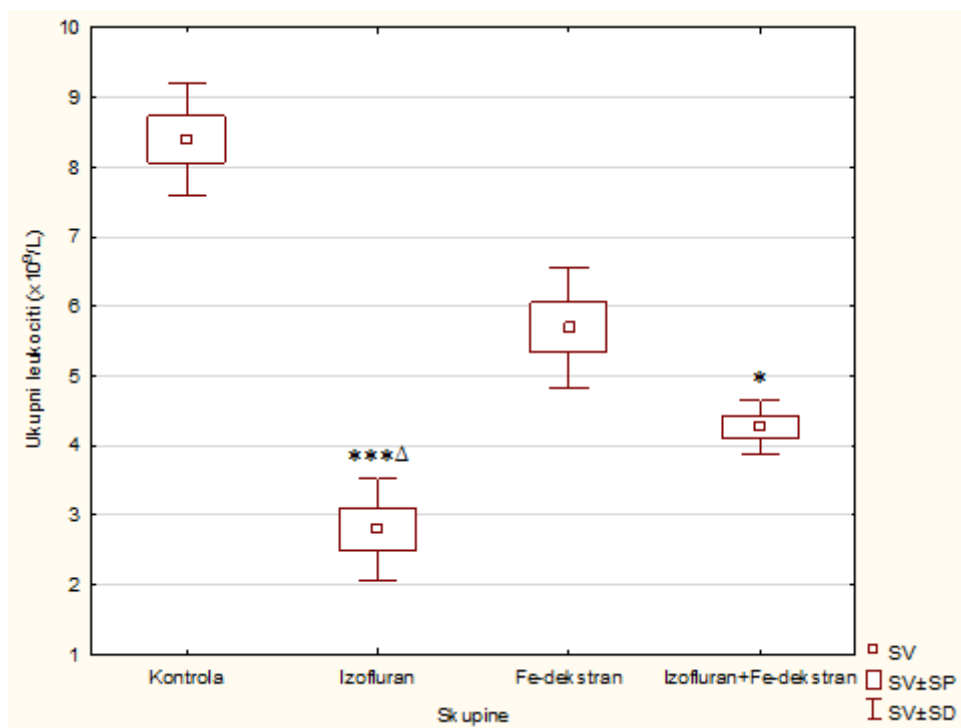
Skupine <sup>a</sup>	Hematološki pokazatelji krvi (x±SD)			
	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/L)	RDW (%)
<b>Kontrola</b>	55 ± 0,00 <sup>◇</sup>	20 ± 0,00	365,33 ± 5,81	14 ± 0,00 <sup>△△</sup>
<b>Izofluran</b>	56,00 ± 0,00 <sup>*△</sup>	19,00 ± 0,00	339,00 ± 3,57	13,00 ± 0,00
<b>Fe-dekstran</b>	55,00 ± 0,00 <sup>◇</sup>	19,66 ± 0,51	359,33 ± 8,11	12,33 ± 0,51 <sup>**</sup>
<b>Izofluran+Fe-dekstran</b>	56,00 ± 0,00 <sup>*△</sup>	18,33 ± 0,51 <sup>**△</sup>	331,00 ± 2,36 <sup>***△△</sup>	12,16 ± 0,41 <sup>**</sup>

<sup>a</sup> Štakori (N=6) su obrađeni sa izofluranom (1,5 %), Fe-dekstranom (50 mg/kg) ili kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana (2 h nakon intraperitonealnog injiciranja Fe-dekstrana, štakori su izloženi 1,5 % izofluranu) svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV± SD (SP). (\* Statistički značajno različito u odnosu na kontrolu (\**P* < 0,05; \*\**P* < 0,01; \*\*\**P* < 0,001); \*Statistički značajno različito u odnosu na izofluran (\**P* < 0,05); <sup>△</sup>Statistički značajno različito u odnosu na Fe-dekstran (<sup>△</sup>*P* < 0,05; <sup>△△</sup>*P* < 0,01). Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija).

### 3.4. ANALIZA LEUKOCITA I DIFERENCIJALNE KRVNE SLIKE

#### 3.4.1. Analiza ukupnog broja leukocita

Rezultati analize ukupnog broja leukocita (Slika 21) pokazuju manji broj leukocita u svim obrađenim skupinama u odnosu na kontrolnu skupinu. Statistički značajna razlika vidljiva je u skupini obrađenoj izofluranom ( $P < 0,001$ ) i skupini obrađenoj kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana ( $P < 0,05$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu, te u skupini obrađenoj izofluranom u odnosu na skupinu obrađenu Fe-dekstranom ( $P < 0,05$ ).



**Slika 21.** Ukupan broj leukocita kod štakora obrađenih izofluranom, Fe-dekstranom i kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana. Štakori (N=6) su obrađeni sa izofluranom (1,5 %), Fe-dekstranom (50 mg/kg) ili kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana (2 h nakon intraperitonealnog injiciranja Fe-dekstrana, štakori su izloženi 1,5 % izofluranu) svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SD (SP). (\*Statistički značajno različito u odnosu na kontrolu ( $*P < 0,05$ ;  $***P < 0,001$ );  $^{\Delta}$ Statistički značajno različito u odnosu na Fe-dekstran ( $^{\Delta}P < 0,05$ ). Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija).



### 3.4.2. Analiza diferencijalne krvne slike

Rezultati diferencijalne krvne slike prikazani su u Tablici 8. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Dobiveni rezultati ne pokazuju statističku značajnost između obrađenih skupina.

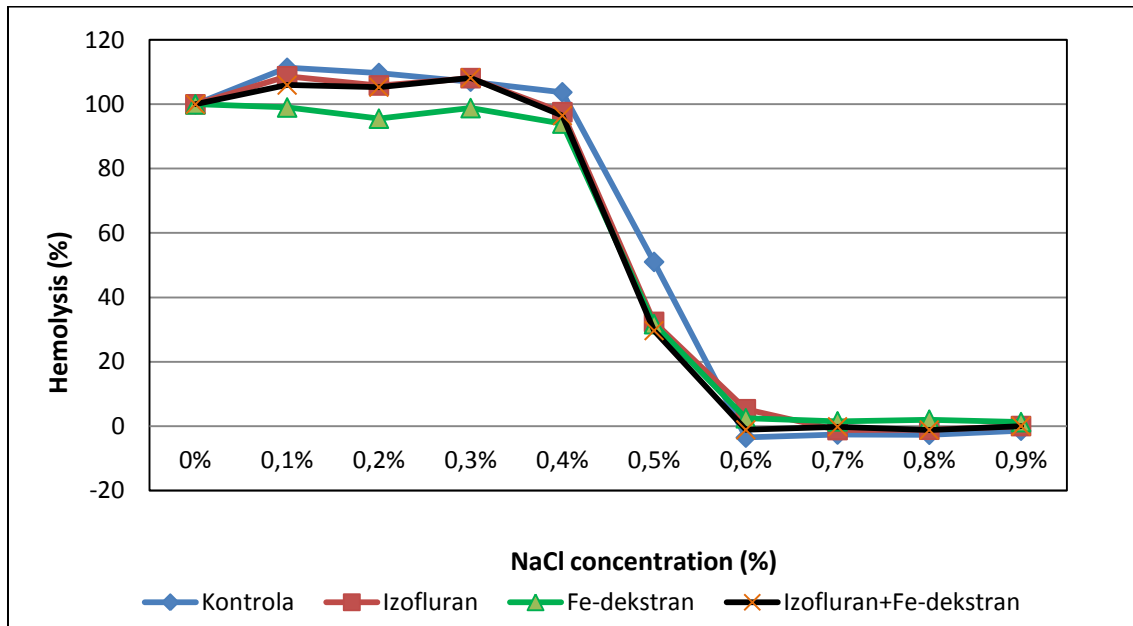
**Tablica 8.** Analiza diferencijalne krvne slike štakora obrađenih izofluranom, Fe-dekstranom i kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana

Skupine <sup>a</sup>	<i>Diferencijalna analiza periferne krvi (X<math>\pm</math>SD)</i>			
	Limfociti (%)	Neutrofili (%)	Monociti (%)	Eozinofili (%)
<b>Kontrola</b>	68,00 $\pm$ 8,53	29,66 $\pm$ 7,44	2,50 $\pm$ 0,57	1,00 $\pm$ 0,00
<b>Izofluran</b>	52,00 $\pm$ 5,36	47,33 $\pm$ 5,39	1,00 $\pm$ 0,00	1,00 $\pm$ 0,00
<b>Fe-dekstran</b>	65,66 $\pm$ 10,28	33,33 $\pm$ 9,85	1,50 $\pm$ 0,57	-
<b>Izofluran+Fe-dekstran</b>	59,50 $\pm$ 18,24	40,16 $\pm$ 17,83	1,00 $\pm$ 0,00	-

<sup>a</sup>Štakori (N=6) su obrađeni sa izofluranom (1,5 %), Fe-dekstranom (50 mg/kg) ili kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana (2 h nakon intraperitonealnog injiciranja Fe-dekstrana, štakori su izloženi 1,5 % izofluranu) svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV $\pm$  SD (SP). (Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija).

### 3.5. OSMOTSKA OTPORNOST ERITROCITA

Rezultati hemolize eritrocita (Slika 22) pokazuju da se kod svih skupina 100 % hemoliza eritrocita dogodila pri otprilike 0,1 % koncentraciji NaCl. Kod kontrolne skupine 50 % hemoliza eritrocita dogodila se pri nešto malo višoj koncentraciji od 0,5 % NaCl, dok je kod svih obrađenih skupina vidljivo da se 50 % hemolize eritrocita događa pri nižoj koncentraciji 0,5 % NaCl.



**Slika 22.** Analiza % hemolize eritrocita štakora obrađenih izofluranom, Fe-dekstranom i kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana. Štakori (N=6) su obrađeni sa izofluranom (1,5 %), Fe-dekstranom (50 mg/kg) ili kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana (2 h nakon intraperitonealnog injiciranja Fe-dekstrana, štakori su izloženi 1,5 % izofluranu) svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $SV \pm SD$  (SP).

## 4. RASPRAVA

Cilj rada bio je istražiti antioksidativni/prooksidativni učinak izoflurana i Fe-dekstrana, te njihovo zajedničko djelovanje na uzorcima tkiva mozga štakora praćenjem: 1) promjene relativne težine mozga štakora u odnosu na kontrolnu skupinu kako bi se procijenila razina neuroupale ili gubitka stanica procesom stanične smrti; 2) mjerenjem promjena u oksidacijsko-redukcijskom statusu mozga praćenjem biljega oksidacijskog stresa: a) količine malondialdehida (MDA) krajnjeg produkta lipidne peroksidacije, b) količine glutationa (GSH), glavnog staničnog neenzimatskog antioksidansa koji sprječava oštećenja stanica od toksičnih radikala i peroksida, c) aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD) koji katalizira dismutaciju superoksidnog aniona u molekularni kisik i vodikov peroksid i d) katalaze (CAT) koja katalizira kemijsku reakciju razgradnje toksičnog vodikovog peroksida na molekule kisika i vode; 3) analizom promjene hematoloških parametara krvi i osmotske otpornosti eritrocita kao pokazatelja toksičnosti izoflurana i Fe-dekstrana te njihove kombinacije.

ROS su nusprodukti normalnog staničnog metabolizma i djeluju kao esencijalne signalne molekule. Niska i umjerena količina ROS-a ima važan učinak na nekoliko fizioloških procesa, uključujući ubijanje štetnih patogena, zacjeljivanje rana i procese popravljanja tkiva. Međutim, nerazmjerno stvaranje ROS-a predstavlja ozbiljan problem za održavanje homeostaze i uzrokuje oksidacijsko oštećenje tkiva (Bhattacharyya i sur., 2014). Istraživanja su pokazala da dugotrajno izlaganje općim anestetima vodi povećanoj razini oksidacijskog i nitrativnog stresa u mozgu što posljedično vodi povećanoj smrti stanica mozga uzrokovanoj anestezijom. Zapaženo je da anestetički lijekovi uzrokuju široko rasprostranjenu apoptozu u mozgu štakora ovisnu o dozi, te da ROS može igrati važnu ulogu u apoptozu neurona (Wang i sur., 2010), posebice u mozgu koji se razvija (Ikonomidou i sur., 1999; Jevtović-Todorović i sur., 2003). Aktivacija N-metil D-aspartat NMDA ili  $\gamma$ -aminomaslačne kiseline GABA receptora može biti uzrok stanične smrti neurona (Ikonomidou i sur., 1999; Olney i sur., 2002).

Homeostaza staničnog željeza temelji se na dobroj međureakciji uzimanja željeza, unutarstaničnog transporta, skladištenja, korištenja i gubljenja željeza (Bresgen i Eckl, 2015). Doze Fe-dekstrana koje premašuju zahtjeve za obnovu hemoglobina i nadopunjavanja željezne pohrane mogu dovesti do hemosideroze. Željezo je neophodno za život, ali višak željeza može biti toksično za tkivo. Smatra se da željezo oštećuje tkivo prvenstveno

stvaranjem slobodnih radikala kisika kroz Fentonovu reakciju (Loh i sur., 2009). U mozgu je važno za prijenos kisika, prijenos elektrona, sintezu neurotransmitera i proizvodnju mijelina. Povišeno željezo je uključeno u patogenezu mnogih kroničnih neuroloških poremećaja uključujući Alzheimerovu bolest, Parkinsonovu bolest i multiplu sklerozu (Stankiewicz i sur., 2007).

Nadalje neki od podataka ukazuju da izofluran i sevofluran imaju antioksidativni i protuupalni učinak u svim stanicama, osim stanica mozga (Lee i sur., 2015). Različite pokusi na životinjama pokazuju da su izofluran i sevofluran ne samo da su sigurni, već i da mogu smanjiti oksidativni stres i upalu kod modela glodavaca. U čovjeku, istraživanja pokazuju da kratkotrajne operacije ne uzrokuju oksidativni stres, upalu i oštećenje DNA nakon izlaganja izofluranu i sevofluran dok velike i dugotrajne operacije povećavaju oksidativni stres, upalu i oštećenja DNA stanica mozga. Temeljem navedenog potrebno je istražiti ulogu anestezije u različitim okolnostima.

Naši podaci ukazuju da je relativni indeks mozga štakora (Slika 12) smanjen u skupini obrađenoj izofluranom i skupini obrađenoj kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je u skupini obrađenoj Fe-dekstranom zabilježen blagi porast relativnog indeksa mozga u odnosu na kontrolnu skupinu, ali bez statistički značajne razlike. Temeljem navedenog očito je da višekratna anestezija sama ili u kombinaciji s Fe-dekstranom vodi pojačanom propadanju stanica mozga (Slika 12). Suprotno tome, statistički značajna razlika zabilježena je između skupine obrađene Fe-dekstranom i skupine obrađene kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana ( $P < 0,05$ ), gdje skupina obrađena Fe-dekstranom ima veći relativni indeks mozga što ukazuje na postojanje neuropale. Almond i sur. (2017) u istraživanju na prasadi zapazili su povećanu tjelesnu težinu prasadi obrađenih sa Fe-dekstranom u dozi od 150 mg i 200 mg/kg. Oberhauser i sur. (1970) u istraživanju na zečevima i majmunima injiciranih intravenski s Fe-dekstranom, zapaženo je da željezo prolazi krvno-moždanu barijeru i pojačano se akumulira u mozgu. Moguće je da je povećani indeks težine mozga štakora u našem slučaju kod skupine obrađene Fe-dekstranom rezultat prelaska Fe-dekstrana preko krvno-moždane barijere što uzrokuje nakupljanje željeza u tkivu mozga te povećava razinu oksidacijskog stresa i neuropale. Mozak je jako osjetljiv na oksidacijski stres jer ima visoku stopu oksidativne metaboličke aktivnosti, visoku potrošnju kisika, nisku razinu zaštitnih antioksidacijskih enzima, visok omjer površine membrane na citoplazmatski volumen i neuronsku anatomsku mrežu osjetljivu na poremećaje (Bošković i sur., 2011). Promjene cjelovitosti krvno-moždane barijere mogu se procijeniti mjerenjem trans-

endotelnog električnog otpora (TEER). Prema istraživanju Thal i sur. (2012) hlapljivi anestetici, izofluran i sevofluran, znatno smanjuju TEER u miševa nakon 24 sata izloženosti plinu. Temeljem navedenog, moguće je da je u skupini obrađenoj kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana, izofluran ima neuroprotektivni učinak te se na taj način bori protiv akumulacije željeza u mozgu i smanjuje razinu neuroupale na što ukazuju rezultati relativnog indeksa mozga. Prema Grasshoff i sur. (2006) tijekom i nakon anestezije metabolizam mozga je smanjen što pogoduje neuroprotektivnom djelovanju.

Rezultati analize razine ukupnih proteina (Slika 13) u uzorcima tkiva mozga štakora pokazuju statistički značajnu razliku u skupini obrađenoj izofluranom ( $P < 0,05$ ) i skupini obrađenoj Fe-dekstranom ( $P < 0,05$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu. Razina ukupnih proteina u ovim skupinama niža je nego u kontrolnoj skupini. U skupini obrađenoj kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana nema značajne promjene u odnosu na kontrolnu skupinu. Moguće je da je u skupini obrađenoj izofluranom i skupini obrađenoj Fe-dekstranom došlo do stvaranja ROS-a što je prouzročilo promjene u proteinima. Visoke koncentracije ROS-a uzrokuju oksidacijske promjene koje mogu dovesti do promjene funkcije proteina, kemijske fragmentacije ili povećane osjetljivosti na proteolitičke enzime (Dröge, 2002). Povećanju razine ROS-a u određenim uvjetima pridonose i inhalacijski anestetici koji metaboliziraju u ROS te povećanje koncentracije željeza koje vodi genotoksičnom stresu i stvaranju superoksidnih aniona ( $O_2^-$ ) i vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ) te nastanku visoko reaktivnog hidroksilnog radikala ( $OH^\bullet$ ) (Haber-Weiss reakcija). Povećani oksidacijski stres zasigurno uzrokuje ozbiljna oštećenja membrane, proteina i DNA (Halliwell i Gutteridge, 1984).

Oksidacijski stres oštećenjem membrane vodi porastu krajnjih produkata lipidne peroksidacije (Halliwell, 2006), a jedan od glavnih produkata je upravo MDA. Lipidna peroksidacija složena je lančana reakcija razgradnje (oksidacije) višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA, engl. *polyunsaturated fatty acids*) koje se nalaze u sastavu lipida svih bioloških membrana. Analizom oksidacijsko-redukcijskih promjena u uzorcima tkiva mozga štakora zapažene su razlike u svih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu. Mjerenjem koncentracije MDA (Slika 14) uočena je povećana koncentracija MDA u skupini obrađenoj kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana u odnosu na kontrolnu skupinu, gdje je jedino i zabilježena statistički značajna razlika ( $P < 0,01$ ). U ostalim skupinama nije zabilježen statistički značaj porast koncentracije MDA u odnosu na kontrolnu skupinu. S obzirom da je do porasta koncentracije MDA došlo jedino u skupini obrađenoj kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana možemo zaključiti da je upotrijebljena doza jednog i drugog spoja u kombinaciji

bila dovoljna za pojavu oksidacijskog stresa što je dovelo do povećane lipidne peroksidacije i porasta koncentracije MDA. Tao i sur. (2013) u istraživanju na štakorima koji su izloženi 2 % izofluranu tijekom 3 h uočili su da nije došlo do značajne promjene koncentracije MDA u odnosu na kontrolnu skupinu što je u skladu sa našim rezultatima za skupinu obrađenu izofluranom. Njihov cilj bio je istražiti učinak izofluranske anestezije na sposobnost učenja i pamćenja, te aktivnost mozga kod odraslih štakora i došli su do zaključka da 2 % anestezija izoflurana ne mijenja sposobnost učenja i pamćenja te aktivnosti mozga kod odraslih štakora.

Jedan od indikatora oksidacijskog stresa je i iscrpljivanje antioksidacijskog glutaciona (GSH). Rani događaj nakon iscrpljivanja GSH je oslobađanje arahidonske kiseline ovisne o fosfolipazi A2. Arahidonska kiselina može uzrokovati oštećenje osiromašenih stanica kroz metabolizam lipooksigenaze. Generiranje superoksidnih radikala tijekom metabolizma arahidonske kiseline igra važnu ulogu u toksičnim događajima koji slijede GSH iscrpljivanje (Mytilineou i sur., 2002). Analiza rezultata mjerenja ukupne koncentracije GSH (Slika 15) pokazuje porast koncentracije GSH u svim obrađenim skupinama u odnosu na kontrolnu skupinu, ali jedino je statistički značajna razlika zabilježena u skupini obrađenoj izofluranom ( $P < 0,01$ ). Rezultati ukazuju na to da se organizam pokušava obraniti stvarajući povećane koncentracije GSH, kao jednog od najvažnijih mehanizama antioksidacijske obrane čija visoka koncentracija štiti od ROS-a. Također, visoka koncentracija glutaciona može značiti da organizam pokušava spriječiti moguću toksičnost uzrokovanu izloženim spojevima. Visoke koncentracije i prekomjerno izlaganje inhalacijskim anestheticima i Fe-dekstranu imaju toksični učinak, te su uključeni u patogenezu raznih bolesti uključujući Alzheimerovu bolest, Parkinsonova bolest i Huntington bolest (Gerlach i sur., 1994). Ova pretpostavka je podržana i od Yu i sur. (2011) koji pokazuju da stres izazvan visokim preopterećenjem Fe u štakora ojača složenost procjene rizika psihološkog stresa dok su Chen i sur (2013) pokazali da preopterećenje s Fe vodi smrti neurona procesom autofagije. Maaroufi i sur. (2009) razvili su kronični model preopterećenosti s Fe u dozi od 3 mg Fe/kg dnevno primijenjen kod odraslih štakora tijekom 5 dana koji vodi značajnoj akumulaciji Fe u hipokampusu, cerebelumu i bazalnom gangliju ali tek nakon 16 dana. Povećana toksičnost zahtjeva i značajan antioksidacijski odgovor na što ukazuju porast koncentracije superoksid dismutaze u svim obrađenim skupinama u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 17). Statistički značajna razlika kod mjerenja enzimske aktivnosti SOD zabilježena je u skupini obrađenoj Fe-dekstranom ( $P < 0,01$ ) i skupini obrađenoj kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana ( $P < 0,001$ ) u odnosu na

kontrolnu skupinu, te u skupini obrađenoj izofluranom ( $P < 0,05$ ) u odnosu na skupinu obrađenu kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana.

Za razliku od SOD aktivnosti CAT aktivnost je bila niža, posebice u skupini obrađenoj Fe-dekstranom ali bez statističke značajnosti. Smatra se da neodgovarajući signalno-antioksidacijski odgovor može biti početni uzrok smrti neurona kod nekih neurodegenerativnih bolesti (Ke i Qian, 2007). Prema istraživanju Chen i Liu (2016) u kojem su štakori kontinuirano izloženi 1,2 % izofluranu (4 mL/min) tijekom 2 h, izofluran kod starijih štakora značajno snižava razine antioksidacijskih obrambenih enzima uključujući SOD, GSH-Px i CAT, dok je razina MDA značajno povećana. Također dolazi do značajnog povećanja Bax i značajnog smanjenja Bcl-2 u odnosu na kontrolnu skupinu. Tijekom izloženosti proizvedene su velike količine oksidacijskog stresa. Njihovi rezultati pokazuju da izloženost izofluranom značajno smanjuje prostorno učenje i funkciju pamćenja kod starijih štakora. Naši rezultati nisu u skladu sa ovim rezultatima. Kod nas je u skupini izloženoj izofluranu došlo do povećane razine GSH i SOD, dok značajnije promjene u MDA i CAT nisu zabilježene. Također se ne slažu sa rezultatima koje su dobili Chen i sur. (2016) gdje izofluran uzrokuje smanjenje koncentracije GSH i SOD kod štakora izloženih 1,4 % izofluranu tijekom 2 h. Razlog ovom ne poklapanju mogli bi protumačiti kao rezultate različite koncentracije izoflurana kojoj su izloženi štakori tijekom perioda obrade ali i dužine vremena izlaganja izofluranu i Fe-dekstranu.

Naši rezultati mjerenja oksidacijsko-redukcijskih parametara djelomično se slažu sa istraživanjem koje su proveli Piloni i suradnici (2016). Njihovi rezultati pokazuju da je kronična primjena Fe-dekstrana (50 mg/kg /dan, 5 puta tjedno tijekom 4 tjedna) izazvala pojačanu lipidnu peroksidaciju (porast MDA) povezanu sa smanjenjem aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) i katalaze (CAT), što rezultira ozbiljnom neurotoksičnošću. Kod nas je došlo do porasta lipidne peroksidacije i smanjena aktivnosti katalaze, no aktivnost superoksid dismutaze je porasla, kao i razina GSH.

Prema dobivenim rezultatima možemo pretpostaviti kako je došlo do povećanog stvaranja superoksidnih radikala u svim obrađenim skupinama. Superoksidni radikali se potom neutraliziraju pomoću SOD koja ih pretvara u vodikov peroksid, manje reaktivan spoj. Vodikov peroksid se neutralizira u vodi enzimima katalaze i glutacion peroksidaze (Burton i Jauniaux, 2011). S obzirom na rezultate koji pokazuju da je koncentracija katalaze smanjena u svim skupinama možemo zaključiti da se vodikov peroksid neutralizira pomoću glutacion

peroksidaze. Glutation peroksidaza igra ključnu ulogu u inhibiranju procesa lipidne peroksidacije i stoga štiti stanice od oksidativnog stresa.

Utjecaj izoflurana i Fe-dekstrana pojedinačno, kao i njihov zajednički utjecaj vidljiv je i u hematološkim parametrima (Tablica 7 i 8; Slike 18-22). Krv je tjelesna tekućina koja dovodi potrebne tvari u stanice tijela kao što su hranjive tvari, kisik te transportira otpadne proizvode daleko od tih istih stanica. Najvažnija je tjelesna tekućina koja upravlja vitalnim funkcijama tijela poput disanja, cirkulacije, izlučivanja, osmotske ravnoteže i transporta metaboličkih tvari. Kruženje krvi u kardiovaskularnom sustavu bitno je za prijenos plinova, hranjivih tvari, minerala, metaboličkih proizvoda i hormona između različitih organa (Savithri i sur., 2010). Jedno je od prvih tkiva koje dolazi u doticaj sa inhalacijskim anestheticima. Dok se izofluran difuzijom prenosi kroz alveokapilarnu membranu u krvotok, željezo je u krvi u najvećoj mjeri vezano za hemoglobin, zatim za željezne proteine za skladištenje, feritin i hemosiderin, a najmanje cirkulira u plazmi vezan za transferin.

Eritrociti su crvene krvne stanice koje služe za prijenos kisika vezanog za hemoglobin, prijenos CO<sub>2</sub> i održavanje pH krvi. Hematokrit je direktno povezan sa hemoglobinom i koristi se za mjerenje krvnog kapaciteta, a MCV je mjera za prosječni obujam eritrocita. Analizom rezultata ukupnog broja eritrocita (Slika 18) uočen je povećan broj eritrocita u skupini obrađenoj izofluranom i skupini obrađenoj kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana, te snižen broj eritrocita u skupini obrađenoj Fe-dekstranom u odnosu na kontrolnu skupinu. Rezultati hematoloških parametara (Tablica 7) pokazuju povišene razine hemoglobina, hematokrita i MCV-a u skupini obrađenoj izofluranom i skupini obrađenoj kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana u odnosu na kontrolnu skupinu. Prema rezultatima u skupini obrađenoj izofluranom i skupini obrađenoj kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana uočavamo kako povišeni broj eritrocita prati i povišeni hemoglobin, hematokrit i MCV iz čega se može zaključiti kako imamo sniženu koncentraciju kisika u krvi i dolazi do stvaranja povećanog broja eritrocita kako bi se nadoknadile niže koncentracije kisika i zadovoljile potrebe organizma za kisikom što je posebice važno za mozak koji ne može funkcionirati bez potrebne količine kisika. Zbog nedostatka kisika i hranjivih tvari dolazi do oštećenja i odumiranja živčanih stanica u zahvaćenim dijelovima mozga što se manifestira oštećenjem funkcija kojima ti dijelovi mozga upravljaju. A porast hemoglobina omogućava povećanu sposobnost prenošenja kisika. Deckardt i sur. (2007) u istraživanju na laboratorijskim štakorima došli su do rezultata koji se ne slažu sa našima. Njihove ženke izložene izofluranu pokazale su blago smanjenje broja crvenih krvnih stanica, hemoglobina i hematokrita.



U skupini obrađenoj Fe-dekstranom snižen broj eritrocita popraćen je sniženim hemoglobinom i hematokritom u odnosu na kontrolnu skupinu, dok u MCV-u nema značajne promjene. To može ukazivati na pojavu anemije koja može biti posljedica oksidacijskog stresa uzrokovanog primjenom Fe-dekstrana. Iz toga proizlazi zaključak da su isporučene doze Fe-dekstrana prevelike i one su prouzročile pojavu oksidacijskog stresa koji je doveo do pojave anemije. Time je izazvan kontraučinak Fe-dekstrana koji inače služi za liječenje nedostatka željeza kada se primjenjuje u primjerenim dozama. Najčešći oblik anemije u organizmu je sideropenična anemija koja nastaje zbog smanjenog unosa, poremećene apsorpcije u probavnom sustavu, gubitka krvi ili zbog povećane potrebe za željezom. Naši rezultati ne slažu se sa rezultatima koje su dobili Oberhauser i sur. (1970) istraživanjem na zečevima i majmunima koji su obrađeni s Fe-dekstranom. U njihovom istraživanju imamo povišene koncentracije hemoglobina u krvi obrađenih životinja. Mogući uzroci tome mogli bi se vezati za različite skupine životinja, te različite doze i uvjete obrade kao i vrijeme obrade s Fe-dekstranom. Ostali hematološki parametri (Tablica 7) su sniženi u svim obrađenim skupinama u odnosu na kontrolnu skupinu. MCH se odnosi na težinu hemoglobina u prosječnom eritrocitu i u pravilu povećanje ili sniženje MCH usporedno prati promjenu MCV što kod nas nije slučaj. MCV je povišen dok je MCH snižen. Isti slučaj je zabilježen i sa sniženom razinom RDW (širina raspodjele volumena eritrocita) koji bi također trebao pratiti razinu MCV-a, a koji je u našim rezultatima povišen. Promjene u hematološkim parametrima skupine obrađene izofluranom uglavnom prate promjene u skupini obrađenoj kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana, dok su promjene u skupini obrađenoj Fe-dekstranom suprotne njima.

Bijele krvne stanice, leukociti, su stanice imunološkog sustava čija je osnovna zadaća zaštita organizma od stranih tijela i mikroorganizama. Relativni pomak u populaciji leukocita ukazuje na stres (Smutna i sur., 2010). Analizom naših rezultata (Slika 21) uočen je smanjen broj leukocita u svim obrađenim skupinama u odnosu na kontrolnu. Prema knjizi Laboratory Animal Medicine, 30-minutno izlaganje izofluranu uzrokuje smanjenje bijelih krvnih stanica za 15,4 % što je u skladu sa našim rezultatima u skupini obrađenoj izofluranom. Niska razina bijelih krvnih stanica može ukazivati na negativan utjecaj korištenih spojeva na imunološki sustav.

Test osmotske fragilnosti koristi se za određivanje stupnja hemolize na način da se eritrociti izlažu različitim koncentracijama fiziološke otopine (NaCl) (Tungjai i sur., 2018). Mjerenje osmotske fragilnosti eritrocita (Slika 22) pokazalo je da je u kontrolnoj skupini

došlo do nešto veće hemolize u odnosu na ostale obrađene skupine. Analizom rezultata (Slika 22) uočeno je da je do značajne hemolize došlo pri 0,5 % koncentraciji NaCl u kontrolnoj skupini, dok je kod svih obrađenih skupina uočeno da se 50 % hemolize dogodilo pri nešto nižoj koncentraciji NaCl. Možemo pretpostaviti kako je u obrađenim skupinama djelovanjem izoflurana i Fe-dekstrana došlo do snižene hemolize i pojave oksidacijskog stresa koji je uzrokovao propadanje zrelih eritrocita tijekom perioda obrade od 28 dana. Došlo je do pojačane hemolize oštećenih stanica, te je zbog nastale hipoksije i potrebe organizma za kisikom došlo do pojave novih stanica. Ovo je u skladu sa rezultatima količine eritrocita, hemoglobina i hematokrita u skupini obrađenoj izofluranom i skupini obrađenoj kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana gdje su te koncentracije povišene zbog nedostatka kisika što uzrokuje stvaranje novih eritrocita kako bi se tijelo opskrbilo potrebnom količinom kisika.

## 5. ZAKLJUČAK

Temeljem dobivenih rezultata možemo zaključiti:

1. Izofluran uzrokuje značajan porast koncentracije GSH što ukazuje na povećani oksidacijski stres u mozgu i ulogu GSH kao glavnog staničnog neenzimatskog antioksidansa koji sprječava oštećenja stanica od toksičnih radikala i peroksida.
2. Fe-dekstran uzrokuje lipidnu peroksidaciju i neuroupalu te posljedično vodi povećanju relativnog indeksa mozga.
3. Kombinacija izoflurana i Fe-dekstrana ne uzrokuje neke značajne promjene u oksidacijsko-redukcijskim parametrima; izofluran ima neuroprotektivno djelovanje u kombinaciji s Fe-dekstranom na što ukazuje porast aktivnosti superoksid dismutaze.
4. Izofluran i kombinacija izoflurana i Fe-dekstrana uzrokuju jednake promjene u hematološkim parametrima:
  - a. Povećavaju razinu eritrocita u krvi koja je popraćena s povećanom razinom hemoglobina, hematokrita i MCV-a što upućuje na nedostatak kisika u krvi.
  - b. Značajno snižavaju razinu leukocita.
  - c. Snižavaju preostale hematološke parametre.
5. Fe-dekstran uzrokuje:
  - a. Značajan pad razine proteina, te značajan porast enzimske aktivnosti superoksid dismutaze.
  - b. Pad ukupne količine eritrocita u krvi popraćen sa sniženom koncentracijom hemoglobina i hematokrita što ukazuje na anemiju koja je nastala kao rezultat povećanog oksidacijskog stresa nastalog prekomjernim opterećenjem stanica s Fe.

- c. Pad ukupne količine leukocita, kao i preostalih hematoloških parametara.
6. Rezultati ukazuju da različiti uvjeti i dužina izlaganja izofluranu u nazočnosti Fe zasigurno mogu biti različiti s obzirom na akumulaciju Fe u pojedinim regijama kao i složene mehanizme koji se odvijaju tijekom opterećenja s Fe. Bolje razumijevanje svih ovih važnih gledišta bitno će poboljšati naše znanje o metabolizmu Fe u mozgu kao i njegovu ulogu u razvoju neurodegenerativnih poremećaja.

## 6. LITERATURA

Acharya N. K., Goldwaser E. L., Forsberg M. M., Godsey G. A., Johnson C. A., Sarkar A., DeMarshall C., Kosciuk M. C., Dash J. M., Hale C. P., Leonard D. M., Appelt D. M., Nagele R. G. 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.

Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. **105**: 121-126.

Almond G., Byers E., Seate J., Boyer P. 2017. Supplemental iron dextran injections: Influence on hemoglobin concentrations and piglet growth. *Journal of Swine health and Production*. **25**: 309-312.

Anonimous. Pristupljeno, travanj 21, 2018, dostupno sa: <http://cultua.info/glutathione/>.

Anonimous. Pristupljeno, svibanj 05, 2018, dostupno sa: <https://clinicalgate.com/general-anesthetics/>.

Anonimous. Pristupljeno, svibanj 15, 2018, dostupno sa: <https://clinicalgate.com/inhalational-anaesthetic-agents/>.

Ayton S., Faux N. G., Bush A. I., Alzheimer's disease neuroimaging initiative. 2014. Ferritin levels in the cerebrospinal fluid predict Alzheimer's disease outcomes and are regulated by APOE. *Nature communications*. **6**: 1-9.

Bhattacharyya A., Chattopadhyay R., Mitra S., Crowe S. E. 2014. Oxidative Stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases. *Physiological Reviews*. **94**: 329–354.

Bendich A., Machlin L. J., Scandurra O., Burton G. W., Wayner D. D. M. 1986. The antioxidant role of vitamin C. *Advances in Free Radical Biology & Medicine*. **2**: 419-444.

Borza C., Muntean D., Dehelean C., Savoiu G., Serban C., Simu G., Andoni M., Butur M., Dragan S. 2013. Oxidative Stress and Lipid Peroxidation-A Lipid Metabolism Dysfunction. Chapter 2. Doi: 10.5772/51627

- Bošković M., Vovk T., Plesničar B. K., Grabnar I. 2011. Oxidative stress in Schizophrenia. *Current Neuropharmacology*. **9**: 301-312.
- Bresgen N., Eckl P. M. 2015. Oxidative Stress and the Homeodynamics of Iron Metabolism. *Biomolecules*. **5**: 808-847.
- Brozović G., Oršolić N., Knežević F., Knežević A. H., Šakić K., Benković V., Vrdoljak D. V. 2006. Interactions between inhaled anesthetics and cytostatic agents. *Libri Oncology*. **34**: 23-27.
- Burton G. J., Jauniaux E. 2011. Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* **25**: 287–299.
- Chen C., Garcia-Santos D., Ishikawa Y., Seguin A., Li L., Fegan K. H., Hildick-Smith G. J., Shah D. I., Cooney J. D., Chen W., King M. J., Yien Y. Y., Schultz I. J., Anderson H., Dalton A. J., Freedman M. L., Kingsley P. D., Palis J., Hattangadi S. M., Lodish H. F., Ward D. M., Kaplan J., Maeda T., Ponka P., Paw B. H. 2013. Snx3 Regulates Recycling of the Transferrin Receptor and Iron Assimilation. *Cell Metabolism*. **17**: 343-352.
- Chen L., Zhang B., Shan S., Zhao X. 2016. Neuroprotective effects of vitexin against isoflurane-induced neurotoxicity by targeting the TRPV1 and NR2B signaling pathways. *Molecular Medicine Reports*. **14**: 5607-5613.
- Chen X. T., Liu Z. W. 2016. Folic acid pretreatment attenuates isoflurane-induced cognitive dysfunction in aged rats. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. **9**: 15780-15787.
- Cohen E. N. 1978. Toxicity of inhalation anaesthetic agents. *British Journal of Anaesthesia*. **50**: 665-675.
- Dale O., Brown B. R. 1987. Clinical Pharmacokinetics of Inhalational Anaesthetics. *Clinical Pharmacokinetics*. **12**: 145-167.
- Deckardt K., Weber I., Kaspers U., Hellwig J., Tennekes H., van Ravenzwaay B. 2007. The effect of inhalation anaesthetics on common clinical pathology parameters in laboratory rats. *Food and Chemical Toxicology*. **45**: 1709–1718.
- Dröge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* **82**: 47-95.

Encyclopedia Britannica. Anesthetic. Pristupljeno svibanj 03, 2018, dostupno sa: <https://www.britannica.com/science/anesthetic>.

Flohé L., Otting F. 1984. Superoxide dismutase assays. *Methods in Enzymology*. **105**: 93-104.

Forman S. A., Ishizawa Y. 2016. Inhaled Anesthetic Pharmacokinetics: Uptake, Distribution, Metabolism, and Toxicity. str. 638-669.

Frijhoff J., Winyard P. G., Zarkovic N., Davies S. S., Stocker R., Cheng D., Knight A. R., Taylor E. L., Oettrich J., Ruskovska T., Gasparovic A. C., Cuadrado A., Weber D., Poulsen H. E., Grune T., Schmidt H. H. H. W., Ghezzi P. 2015. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*. **23**: 1144-1170.

Fox J. G., Anderson L. C., Otto G., Pritchett-Corning K. R., Whary M. T. 2015. *Laboratory Animal Medicine*. Third edition. Academic Press, US.

Gadoth N., Göbel H. H. (eds.) 2011. Oxidative Stress and Free Radical Damage in Neurology; Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice. pp. 19-26.

Gerlach M., Ben-Sachair D., Riederer P., Youdim M. B. H. 1994. Altered Brain Metabolism of Iron as a Cause of Neurodegenerative Diseases? *Journal of Neurochemistry*. **63**: 793-807.

Grasshoff C., Drexler B., Rudolph U., Antkowiak B. 2006. Anaesthetic drugs: linking molecular action to clinical effects. *Current Pharmaceutical Design*. **12**: 3665-3679.

Gupta V. K., Singh S., Agrawal A., Siddiqi N. J., Sharma B. 2015. Phytochemicals Mediated Remediation of Neurotoxicity Induced by Heavy Metals. *Biochemistry Research International*. **9**: 1-9.

Haider L. 2015. Inflammation, Iron, Energy Failure, and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. **10**: 1-10.

Halliwell B., Gutteridge J. M. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*. **219**: 1-14

Halliwell B. 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?. *Journal of Neurochemistry*. **97**: 1634-58.

Held P. 2015. An Introduction to Reactive Oxygen Species Measurement of ROS in Cells. BioTek Instruments Inc., Application Guide. 1-2.

Ighodaro O.M., Akinloye O.A. 2017. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. Alexandria. Journal of Medicine. **7**: 1-7.

Ikonomidou C., Bosch F., Miksa M., Bittigau P., Vockler J., Dikranian K., Tenkova T. I., Stefovská V., Turski L., Olney J. W. 1999. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. Science. **283**: 70-74

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

Jiang H., Song N., Wang J., Ren L. Y., Xie J. X. 2007. Peripheral iron dextran induced degeneration of dopaminergic neurons in rat substantia nigra. Neurochemistry International. **51**: 32–36.

Jomova K., Valko M. 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. Toxicology **283**: 65-87.

Jukić M., Carev M., Karanović N., Lojpur M. 2016. Anesteziologija i intenzivna medicina za studente medicine, dentalne medicine i zdravstvene studije. Katedra za anesteziologiju i intenzivnu medicinu. Str. 232

Kawaguchi M., Furuya H., Patel P. M. 2005. Neuroprotective effects of anesthetic agents. Journal of Anesthesia. **19**: 150-156.

Ke Y., Qian Z. M. 2007. Brain iron metabolism: Neurobiology and neurochemistry. Progress in Neurobiology. **83**: 149-173

Kenna J. G., Jones R. M. 1995. The organ toxicity of inhalation anaesthetics. Anaesth Analg. **81**: 551-66.

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



Kovacic P., Somanathan R. 2011. Mechanism of Anesthetics Toxicity: Metabolism, Reactive Oxygen Species, Oxidative stress and Electron Transfer. *International Scholarly Research Network*. **10**: 1-10.

Lee Y. M., Song B. C., Yeum K. J. 2015. Impact of Volatile Anesthetics on Oxidative stress and Inflammation. *Biomed research international*. **8**: 1-8.

Leonard S. S., Harris G. K., Shi X. 2004. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radical Biology & Medicine*. **37**: 1921-1942.

Loh A., Hadziahmetovic M., Dunaief J. L. 2009. Iron homeostasis and eye disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1790**: 637-649.

Loop T., Dovi-Akue D., Frick M., Roesslein M., Egger L., Humar M., Hoetzel A., Schmidt R., Borner C., Pahl H. L., Geiger K. K., Pannen B. H. J. 2005. Volatile Anesthetics Induce Caspase-dependent, Mitochondria-mediated Apoptosis in Human T Lymphocytes In Vitro. *Anesthesiology*. **102**: 1147-57.

Lowry, O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* **193**: 265-275.

Maaroufi K., Ammari M., Jeljeli M., Roy V., Sakly M., Abdelmelek H. 2009. Impairment of emotional behavior and spatial learning in adult Wistar rats by ferrous sulfate. *Physiology & Behavior*. **96**: 343-9.

Miura Y., Grocott H. P., Bart R. D., Pearlstein R. D., Dexter F., Warner D. S. 1998. Differential effects of anesthetic agents on outcome from near-complete but not incomplete global ischemia in the rat. *Anesthesiology*. **89**: 391-400.

Mytilineou C., Kramer B. C., Yabut J. A. 2002. Glutathione depletion and oxidative stress. *Parkinsonism & Related Disorders*. **8**: 385-387.

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**: 109-114.

Oberhauser E., Weinstein V., Asenjo A. 1970. Iron concentration in basal ganglia and cerebral cortex obtained by overloading rabbits and monkeys with iron dextran. *Journal Neurosurgery*. **32**: 677-679.

- Olney J. W., Wozniak D. F., Jevtovic-Todorovic V., Farber N. B., Bittigau P., Ikonomidou C. 2002. Drug induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Brain Pathology*. **12**: 488-498.
- Ong W. Y., Farooqui A. A. 2005. Iron, neuroinflammation, and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. **8**: 183-200.
- Pekiner B. D. 2003. Vitamin E as an antioxidant. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*. **32**: 243-267.
- Pihlainen K., Ojanperä I. 1998. Analytical toxicology of fluorinated inhalation anaesthetics. *Forensics Science International*. **97**: 117-133.
- Piloni N. E., Perezzo J. C., Fernandez V., Videla L. A., Puntarulo S. 2016. Sub-chronic iron overload triggers oxidative stress development in rat brain: implications for cell protection. *Biometals*. **29**: 119-130.
- Pubchem. Iron dextran. Pristupljeno: lipanj, 05, 2018, Dostupno sa: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/iron\\_dextran#section=Solubility](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/iron_dextran#section=Solubility).
- Salim S. 2017. Oxidative Stress and The Central Nervous System. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **360**: 201-205.
- Savithri Y., Sekhar P. R., Doss P. J. 2010. Changes in hematological profiles of albino rats under chlorpyrifos toxicity. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. **1**: 1-7.
- Smutna M., Svoboda M., Breinekova K. 2010. Pterins as Sensors of Response to the Application of Fe<sup>3+</sup>-Dextran in Piglets. *Sensors (Basel)*. **10**: 890-900.
- Soonthon-Brant V., Patel P.M., Drummond J.C., Cole D.J., Kelly P.J., Watson M. 1999. Fentanyl does not increase brain injury after focal cerebral ischemia in rats. *Anesthesia & Analgesia*. **88**: 49-55.
- Stankiewicz J., Panter S. P., Neema M., Arora A., Batt C., Bakshi R. 2007. Iron in Chronic Brain Disorders: Imaging and Neurotherapeutic Implications. *Neurotherapeutics*. **4**: 371-386.
- Stollings L. M., Jia L., Tang P, Dou H., Lu B., Xu Y. 2016. Immune Modulation by Volatile Anesthetics. *Anesthesiology*. **125**: 399-411.

- Štefan L., Tepšić T., Zavidic T., Urukalo M., Tota D., Domitrović R. 2007. Lipidna peroksidacija-uzroci i posljedice. Review. *Medicina*. **43**: 84-93.
- Tao W., Huang K., Shi B. 2013. Experimental study on the effects of isoflurane on the adult rat brain activity. *Chinese Journal of Laboratory Diagnosis*. **3**: 14
- Thal S. C., Luh C., Schaible E-V., Timaru-Kast R., Hedrich J., Luhmann H. J., Engelhard K., Zehendner C. M. 2012. Volatile Anesthetics Influence Blood-Brain Barrier Integrity by Modulation of Tight Junction Protein Expression in Traumatic Brain Injury. *Public Library of Science*. **7**: e50752.
- 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**: 502-22.
- Tungjai M., Phathakanon N., Ketnuam P., Tinlapat J., Kothan S. 2018. Determination of hemolysis, osmotic fragility and fluorescence anisotropy on irradiated red blood cells as a function of kV of medical diagnostic X-rays. *International Journal of Radiation Research*. **16**: 123-127.
- Turrens J.F. 2004. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Physiological Society*. **552**: 335–344.
- Türkan H., Aydin A., Sayal A. 2005. Effect of Volatile Anaesthetics on Oxidative Stress Due to Occupational Exposure. *World Journal of Surgery*. **29**: 540-542.
- Wang C., Zhang X., Liu F., Paule M. G., Slikker W., Jr. 2010. Anesthetic-Induced Oxidative Stress and Potential Protection. *The Scientific World JOURNAL*. **10**: 1473-1482.
- Wei H., Kang B., Wei W., Liang G., Meng Q. C., Li Y., Eckenhoff R. G. 2005. Isoflurane and sevoflurane affect cell survival and BCL-2/BAX ratio differently *Brain Research*. **1037**: 139-147.
- Xie Z., Dong Y., Maeeda U., Moir R. D., Xia W., Culley D. J., Crosby G., Tanzi R. E. 2007. The Inhalation Anesthetic Isoflurane Induces a Vicious Cycle of Apoptosis and Amyloid  $\beta$ -Protein Accumulation. *The Journal of Neuroscience*. **27**: 1247-1254.

Zhang Y., Zhang F. G., Meng C., Tian S. T., Wang Y. X., Zhao W., Chen J., Zhang X. S., Liang Y., Zhang S. D., Xing Y. J. 2012. Inhibition of Sevoflurane Postconditioning Against Cerebral Ischemia Reperfusion-Induced Injury in Rats. *Molecules*. **17**: 341-354.

Yu, S., Feng, Y., Shen, Z., Li, M., 2011. Diet supplementation with iron augments brain oxidative stress in a rat model of psychological stress. *Nutrition* **27**: 1048–1052.

# ŽIVOTOPIS

**Ime i prezime:** Anita Mišić

**Datum rođenja:** 17. 12. 1994., Split (Hrvatska)

## **Obrazovanje:**

- 2016. - 2018. Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu – Biološki odsjek, diplomski studij Eksperimentalna biologija, smjer: Fiziologija i imunobiologija
- 2013. - 2016. Sveučilišni studij za studije mora u Splitu, preddiplomski studij Biologija i Ekologija mora
- 2009. – 2013. Prirodoslovna-tehnička škola Split, smjer Prirodoslovna gimnazija

## **Laboratorijska stručna praksa:**

- 2017. PMF - Biološki odsjek, Zavod za animalnu fiziologiju (pod vodstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić)

## **Sažeci u zbornicima skupova:**

- Ledinski M., Oršolić N., Kukulj M., Odeh D., Mojzeš A., Uroić K., Pavunc L., Pamučar B., Nikolić B., Mateševac J., Paparić E., Mišić A., Đirlić N., Gaćina L. Analysis of intestine microbiome in the Alzheimer's disease rat model“ 2017 Annual Meeting of Croatian Immunological Society, Zagreb 20.-21.10.2017.

**Noć biologije:** 07.travnja 2017.

## **Radno iskustvo:**

- 2015. – 2017. Knjižara, papirnica, darovni dućan Palma (Mehanografija d.o.o.)