

Genotoksični učinci sevoflurana i izoflurana na stanice bubrega miša Swiss albino

Pavlić, Darko

Master's thesis / Diplomski rad

2011

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:470148>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-27**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Darko Pavlić

**GENOTOKSIČNI UČINCI SEVOFLURANA I IZOFLURANA NA STANICE
BUBREGA MIŠA SWISS ALBINO**

Diplomski rad

Zagreb, 2011

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za animalnu fiziologiju, pod neposrednim vodstvom doc. dr. sc. Gordane Brozović i suvoditeljstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja naziva diplomirani inženjer biologije, smjer molekularna biologija.

Zahvala

Zahvaljujem se voditeljici doc. dr. sc. Gordani Brozović te suvoditeljici prof. dr. sc. Nadi Oršolić na susretljivosti, strpljenju i ljubaznosti prilikom izrade ovog rada.

Zahvaljujem osoblju Zavoda za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na pomoći, te na ugodnoj i poticajnoj atmosferi u laboratoriju.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

GENOTOKSIČNI UČINCI SEVOFLURANA I IZOFLURANA NA STANICE BUBREGA MIŠA SWISS ALBINO

Darko Pavlić

Zavod za animalnu fiziologiju, Prirodoslovno-matematički fakultet, Rooseveltov trg 6, Zagreb

U radu je istraživano oštećenje DNA stanica bubrega miša Swiss albino nakon višestrukog izlaganja inhalacijskim anestetici sevofluranu i izofluranu. Za procjenu oštećenja DNA upotrijebljen je alkalni komet test, a praćena su 3 parametra: duljina repa (TL), repni moment (TM) i intenzitet repa (TI). Stupanj oštećenja DNA određivan je neposredno nakon izlaganja sevofluranu, odnosno izofluranu, te nakon 2 h, 6 h i 24 h. Srednje vrijednosti sva 3 parametra bile su statistički značajno više u eksperimentalnim skupinama u odnosu na kontrolne skupine, s tim da je kod miševa izloženih sevofluranu utvrđen kontinuiran porast oštećenja DNA unutar 24 h nakon izlaganja, dok je kod izoflurana najveće oštećenje opaženo 2 sata nakon izlaganja, nakon čega je došlo do popravka.

Rad sadrži: 44 stranice, 8 slika, 2 tablice, 81 literaturnih navoda; izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: bubreg / genotoksičnost / inhalacijski anestetici / izofluran / komet test / sevofluran / oštećenje DNA.

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici, Rooseveltov trg 6, Zagreb

Voditelj: Dr. sc. Gordana Brozović, doc.
Suvoditelj: Dr. sc. Nada Oršolić, red. prof.
Ocjenjivači: Dr. sc. Nada Oršolić, red. prof.
Dr. sc. Višnja Besendorfer, red. prof.
Dr. sc. Damjan Franjević, doc.
Zamjena: Dr. sc. Domagoj Đikić, doc.

Rad prihvaćen: 14. 09. 2011.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor Thesis

**GENOTOXIC EFFECTS OF SEVOFLURANE AND ISOFLURANE ON KIDNEY CELLS IN
SWISS ALBINO MICE**

Darko Pavlič

Department of Animal Physiology, Faculty of Science , Rooseveltov trg 6, Zagreb

DNA damage of kidney cells in Swiss Albino mice after repeated exposure to inhalation anesthetics sevoflurane and isoflurane has been investigated. For evaluation of DNA damage alkaline comet assay has been used. Three parameters have been measured – tail length (TL), tail moment (TM) and tail intensity (TI), immediately after exposure to sevoflurane and isoflurane, as well as 2 h, 6 h and 24 h after exposure. Mean values of all three parameters have been significantly higher in experimental groups compared to the control groups. DNA damage in mice exposed to sevoflurane increased continuously within 24 h after exposure, while isoflurane induced highest DNA damage 2 h after exposure and afterwards DNA repair was observed.

The thesis includes: 44 pages, 8 pictures, 2 tables, 81 references; original in Croatian.

Thesis is deposited in Central biological library, Rooseveltov trg 6, Zagreb

Keywords: comet assay / DNA damage / genotoxicity / inhalation anesthetics / isoflurane / kidney / sevoflurane.

Supervisor: Dr. sc. Gordana Brozović, Assistant Professor
Co-supervisor: Dr. sc. Nada Oršolić, Professor
Reviewers: Dr. sc. Nada Oršolić, Professor
Dr. sc. Višnja Besendorfer, Professor
Dr. sc. Damjan Franjević, Assistant Professor
Substitute: Dr. sc. Domagoj Đikić, Assistant Professor

Thesis accepted: September 14, 2011

POPIS KRATICA

8OHdG – 8-hidroksi-2'-deoksigvanozin

AP mjesta – apurinska i apirimidinska mjesta

AP-1 – aktivator protein 1

BER – popravak izrezivanjem baza

cyclodA – 8,5'-ciklo-2'-deoksiadenozin

cyclodG – 8,5'-ciklo-2'-deoksigvanozin

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

EDTA – etilendiaminotetraoctenakiselina

FAPyG – hidroksi-5-formaminopirimidin

GSH – glutation

HFIP – heksafluoroizopropanol

MAC – minimalna alveolarna koncentracija

mRNA – glasnička ribonukleinska kiselina

NER – popravak izrezivanjem nukleotida

NF- KB – nuklearni faktor KB

PARP-a (poly(ADP-ribose)polymerase

RNA – ribonukleinska kiselina

ROS – reaktivne kisikove vrste

RNS – reaktivne dušikove vrste

SD – standardna devijacija

SOD – superoksid dismutaze

TI – intenzitet repa

TL – duljina repa

TM – repni moment

SADRŽAJ

1	UVOD	1
1.1	Inhalacijski anestetici	1
1.1.1	Sevofluran	2
1.1.2	Izofluran	3
1.2	Citokromi P450	4
1.3	Bubrezi	5
1.3.1.1	Nefrotoksičnost	5
1.4	Reaktivni kisikovi i dušikovi spojevi	6
1.5	Oksidativni stres	9
1.6	Mehanizmi oštećenja DNA u oksidativnom stresu	10
1.6.1	Reaktivne kisikove vrste	10
1.6.1.1	Hidroksilni radikal	10
1.6.1.2	Vodikov peroksid	11
1.6.1.3	Kisik u singletnom stanju	12
1.6.2	Reaktivne dušikove vrste	12
1.6.3	Ostali radikali	13
1.6.4	UV zračenje	14
1.7	Posljedice oštećenja DNA reaktivnim vrstama	15
1.7.1	Mutacije	15
1.7.2	Pogrešna ugradnja	16
1.7.3	Promjena u genskoj ekspresiji	16
1.8	Popravlak DNA	17
1.8.1	Obrat kemijske promjene na bazama	17
1.8.2	Popravlak izrezivanjem (ekscizijski popravlak)	18
1.8.3	Popravlak sklon pogreškama	19
1.8.4	Rekombinacijski popravlak	19
1.9	Inhalacijski anestetici kao promotori oksidativnog stresa	19
1.10	Komet test	21
2	CILJ RADA	24
3	MATERIJALI I METODE	25
3.1	Materijali	25
3.1.1	Kemikalije	25
3.1.2	Uređaji	25

3.1.3	Pokusne živali	26
3.2	Metode	26
3.2.1	Izlaganje mišev a anestetiku	26
3.2.2	Komet test	27
3.2.3	Statistička obrada podatka	28
4	REZULTATI	29
5	RASPRAVA	34
6	ZAKLJUČAK	37
7	POPIS CITIRANE LITERATURE	38

1 UVOD

1.1 Inhalacijski anestetici

U suvremenoj anesteziji dostupan je velik broj različitih vrsta anestetika i tehnika anestezije. Inhalacijski anestetici imaju brojne prednosti zbog kojih se vrlo često koriste za uvođenje u anesteziju ili za održavanje anestezije, sami ili u kombinaciji s intravenskim anestheticima. Inhalacijski anestetici osobito su prikladni za anesteziju onkoloških bolesnika, budući da se kod takvih bolesnika dužina i opseg operacijskog zahvata često ne mogu predvidjeti i ovise o intraoperacijskom kirurškom i patohistološkom nalazu, a nerijetko su potrebne ponavljane operacije zbog uklanjanja ili redukcije primarnog tumora, regionalnih ili udaljenih metastaza, recidiva bolesti, patoloških fraktura ili komplikacija same operacije. Inhalacijski anestetici su lako hlapljive tekućine koje u organizam ulaze udisanjem, a zatim difuzijom kroz alveolokapilarnu membranu prelaze u krvotok kojim se dopremaju do svih ostalih organa i do središnjeg živčanog sustava. Inhalacijski anestetici su male, hidrofobne molekule koje lako prolaze kroz staničnu membranu i potiskuju mitohondrijsku respiraciju. Isporuca putem isparivača na anesteziološkom aparatu omogućuje brzi uvod u anesteziju, kao i buđenje, a za vrijeme trajanja operacije lako se mijenja dubina anestezije. U novije se vrijeme inhalacijski anestetici počinju primjenjivati i za sedaciju bolesnika na respiratorima u jedinicama intenzivnog liječenja.

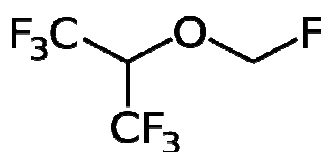
Inhalacijski anestetici mogu se primjenjivati u smjesi plinova s kisikom i dušikovim(II) oksidom ili zrakom, sa samim kisikom ili kao dio opće anestezije u kombinaciji s intravenskim anestheticima. Koncentracija inhalacijskih anestetika izražava se putem MAC-a (minimalna alveolarna koncentracija). Jedan MAC je koncentracija inhalacijskog anestetika koja kod 50% osoba sprječava pokrete za vrijeme kirurškog zahvata. Za kiruršku anesteziju koristi se koncentracija od 1,25 do 2 MAC-a inhalacijskih anestetika. Donedavno jedini inhalacijski anestetik u našoj zemlji – halotan, koji spada u skupinu halogeniranih ugljikovodika, posljednjih je godina zamijenjen halogeniranim eterima izofluranom, sevofluranom, desfluranom i enfluranom. Halotan se i dalje upotrebljava u slabije razvijenim zemljama zbog niske

cijene, premda je dokazano da može inducirati hepatitis u osjetljivih pojedinaca (Walton i sur., 1974)

Veći dio inhaliranih anestetika uklanja se iz organizma disanjem, no jedan se dio metabolizira u jetri putem obitelji citokrom oksidaza P-450 i izlučuje putem bubrega, što ukazuje na važnost utvrđivanja njihove eventualne toksičnost.

1.1.1 Sevofluran

Sevofluran (1,1,1,3,3,3-heksafluoro-2-(fluorometoksi)propan, $\text{CH}_2\text{F}-\text{O}-\text{CH}(\text{CF}_3)_2$) je nezapaljivi fluorirani derivat metil-izopropil etera, kemijski srodan enfluranu i izofluranu. To je snažan inhalacijski anestetik novije generacije sintetiziran 1970., a u upotrebi od 1985. Njegova prednost u odnosu na starije inhalacijske anestetike, poput halotana i metoksiflurana, dijelom je posljedica nižih koeficijenata raspodjele krv-plin (0,6) i ulje-plin (55) (Basel, 2008). Uvod u anesteziju i oporavak su brži, a kontrola dubine anestezije i indukcija su laki. MAC je 2,05 vol %. Metabolizira se oko 5% udahnutog sevoflurana, uglavnom preko 2E1 odjeljka citokroma P-450 u jetri, a manji dio se defluorira u bubregu putem citokroma P-450. Glavni metaboliti sevoflurana, prisutni i u krvi i u urinu, su heksafluoroizopropanol (HFIP) i nefrotoksični anorganski fluorid. Međutim, koncentracija HFIP-a u krvi je mala zbog brze glukuronizacije i izlučivanja urinom.



Slika 1. Struktura sevoflurana

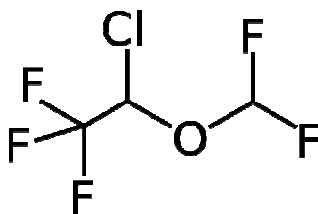
Poznato je da inhalacijski anestetici smanjuju bubrežnu funkciju smanjujući glomerularnu filtraciju, protok krvi kroz bubrege i izlučivanje elektrolita. Te promjene su uglavnom sekundarne, kao odgovor na krvnožilne, simpatičke i endokrine reakcije. Smatra se da sevofluran ima niski hepatotoksični potencijal (Kharasch, 1996). Međutim, pokazano je da povišena koncentracija metabolita HFIP-a može

dovesti do depresije središnjeg živčanog sustava u miševa *in vivo* te prouzročiti citotoksičnost stanica jetre *in vitro*. Oštećenja jetre posljedica su imunoalergijskog odgovora na reaktivne metabolite kovalentno vezane na proteine jetre (Kharasch, 1995). Potencijalna toksičnost metabolita ujedno je i glavni razlog što je sevofluran ušao u kliničku upotrebu tek 15 godina nakon sinteze. Potencijalno toksični raspadni proizvod je fluorometil 2-2-difluoro-1-(trifluorometil) vinil eter (Komponenta A). Klinički podaci nisu pokazali da Komponenta A ima mutageno ili karcinogeno djelovanje, ali može izazvati nefrotoksičnost u štakora. Osim toga, Eger-a i suradnici (1998) su pokazali da je raspadni proizvod vinil eter alkilirajući spoj koji povećava učestalost izmjena sestrinskih kromatida.

1.1.2 Izofluran

Izofluran (2-kloro-2-(difluorometoksi)-1,1,1-trifluoroetan, $\text{CHF}_2\text{-O-CHCl-CF}_3$) nezapaljivi je halogenirani eter, izomer enflurana. Nizak koeficijent topljivosti krv-plin (1,4) omogućava upotrebu manje količine izoflurana, zbog čega su indukcija i oporavak od anestezije brži. MAC izoflurana je 1,17 vol%. Preko 99% inhalirane doze izlučuje se nepromijenjeno izdisanjem (Basel, 2008). Oksidacijom se metabolizira približno 0,2% izoflurana, najsporije od fluoriranih inhalacijskih anestetika i to uglavnom u jetri putem citokroma P-450 2E1 i 3A. Glavni metaboliti su trifluorooctena kiselina i fluoridni ion, u približnom omjeru 2:1. Njihove koncentracije su takve da ne mogu izazvati organska oštećenja, a izlučuju se urinom. Izofluran ne uzrokuje aritmije, ne mijenja osjetljivost na kateholamine, ali izaziva jaču respiracijsku depresiju od halotana. Prema istraživanju Egera i suradnika nije teratogen, niti karcinogen (1978). Rijetko dovodi do hepatitisa i oštećenja funkcije bubrega zbog prisutnosti anorganskih fluorida, međutim prilikom dugotrajnih inhalacija može prouzročiti oštećenje bubrega (Kenna i Jones, 1995). Još uvijek nema granične vrijednosti za profesionalnu izloženost. Uvođenje izoflurana u kliničku upotrebu odgađano je zbog istraživanja iz 1976. čiji rezultati ukazuju na mogućnost nastanka tumora jetre štakora nakon dužeg izlaganja štakora izofluranu. Rezultati dosadašnjih istraživanja su različiti i često proturječni. Sardas i suradnici (1998) ukazuju da izofluran može prouzročiti oštećenje DNA, a potvrđena je i hepatotoksičnost izoflurana (Ihtiyar i sur., 2006; Njoku i sur., 1997). Danas se njegova upotreba u

humanoj medicini smanjuje, a zamjenjuju ga sevofluran, desfluran i intravenski anestetik propofol. Međutim, još se uvijek često upotrebljava za veterinarske anestezije.



Slika 2. Struktura izoflurana

1.2 Citokromi P450

Medu enzimima I faze biotransformacije, sustav citokroma P450 prednjači po katalitičkoj svestranosti. Ova superporodica enzima predstavlja najvažniji enzimski sustav uključen u biotransformaciju mnogih endogenih i egzogenih spojeva uključujući lijekove (Rendic i DiCarlo, 1997; Rendic, 2002). Među fiziološke supstrate ovih enzima pripadaju steroidi, masne kiseline, prostaglandini, leukotrieni i biogeni amini, dok ksenobiotici uključuju lijekove, biljne toksine i toksične spojeve iz okoliša. Citokromi pretežno kataliziraju oksidacijske reakcije, djelujući kao monooksigenaze, oksidaze i peroksidaze, ali mogu sudjelovati i u redukcijским reakcijama. U reakcijama I. faze metabolizma nastaju funkcionalne skupine koje služe kao konjugacijska mjesta u reakcijama II. faze. Mnogi ksenobiotici se detoksificiraju ili aktiviraju u reaktivne intermedijare (Autrup, 2000). Najveće koncentracije enzima P450 uključenih u biotransformaciju nalaze se u membranama endoplazmatskog retikuluma, uglavnom u jetri, premda se enzimi citokromi P450 mogu naći u gotovo svim tkivima i organima (crijeva, pluća, bubrezi, mozak, limfociti, placenta). Stoga P450 enzimi imaju važnu ulogu u regulaciji intenziteta i trajanja aktivnosti lijeka, u detoksifikaciji ksenobiotika i aktivaciji ksenobiotika u toksične, mutagene i kancerogene metabolite (Nebert i sur., 1999; Rendic, 2002).

1.3 Bubrezi

Bubrezi su parni žljezdani organi mokraćnog sustava i igraju važnu ulogu u regulaciji sastava i volumena tjelesnih tekućina.

Osnovna građevna jedinica bubrega je nefron. Svaki nefron ima splet glomerularnih kapilara nazvan *glomerul*, kroz koji se velika količina tekućine filtrira iz krvi i dugački kanalić (tubul) u kojemu se, na putu do bubrežne nakapnice, filtrirana tekućina pretvara u mokraću. Glomerul je mreža glomerularnih kapilara koje se granaju i međusobno anastomoziraju. Glomerularne su kapilare prekrivene epitelnim stanicama, a cijeli je glomerul uložen u *Bowmanovu čahuru*. Na Bowmanovu čahuru se nadovezuje proksimalni kanalić, koji se nastavlja u Henleovu petlju i zatim u distalni kanalić, u kori bubrega. Distalni kanalići se slijevaju u sabirne kanaliće. Uz te kanaliće se nalaze kapilare, te dolazi do reapsorpcije korisnih tvari. Vrhovi piramida, koje tvore sabirni kanalići, ulaze u bubrežnu čašicu, a bubrežna čašica se slijeva u bubrežnu nakapnicu koja se nastavlja u mokraćovod (C.Guyton i E.Hall, 2006).

Bubrezi su glavni put za uklanjanje metaboličkih razgradnih proizvoda: uree iz metabolizma aminokiselina, kreatinina iz mišića, mokraćne kiseline koja uglavnom nastaje razgradnjom nukleinskih kiselina, bilirubina i raznih drugih metabolita. Bubrezi uklanjaju i većinu toksina.

Bubrezi imaju i druge funkcije poput:

- nadzora nad ravnotežom vode i elektrolita;
- nadzora nad osmolarnošću i koncentracijom elektrolita u tjelesnim tekućinama;
- regulacije arterijskog tlaka;
- regulacije kiselo-bazne ravnoteže;
- lučenja i metabolizma hormona;
- glukoneogeneze.

1.3.1.1 Nefrotoksičnost

Bubreg je posebno osjetljiv organ na utjecaj toksičnih tvari iz više razloga. Visoki renalni protok krvi osigurava da velika količina tvari iz cirkulacije bude u doticaju s bubrežnim tkivom, pa je samim time i povećana vjerojatnost oštećenja. Bubrežna sposobnost koncentriranja tvari posljedično ima i visoku koncentraciju

toksičnih tvari u bubregu, pa tako i netoksične (niske) koncentracije u bubrezima mogu postati toksične jer se tubularna tekućina u odnosu na plazmu koncentrira u omjeru 500:1.

U bubrezima se događaju i biotransformacije izvornih tvari u toksične metabolite slično kao i u jetri, no razina enzimatskih sustava je niža, tako da reaktivni metaboliti koji nastaju u bubregu mogu reagirati s tkivnim makromolekulama. Bubrežna ne može regenerirati oštećene nefrone niti stvarati nove, pa je bubrežna funkcija često ireverzibilno oštećena.

1.4 Reaktivni kisikovi i dušikovi spojevi

Svi aerobni organizmi za život neophodno trebaju kisik. Zbog visokog elektrokemijskog potencijala on je idealan krajnji akceptor elektrona i pokretačka sila reakcija oksidativne fosforilacije koje stanice opskrbljuju energijom (Stryer, 1995). Ipak, u redukciji O_2 skrivena je potencijalna opasnost i njegove su visoke koncentracije kroz duža vremenska razdoblja štetne. Čak i pri normalnim koncentracijama, zbog oksidativnih reakcija, kisik može dovesti do oštećenja stanica. Toksičnost O_2 su već u 18. stoljeću otkrili Lavoisier, Priestley i Scheele, ali je tek 1954. godine pokazano da je ona povezana s nastajanjem kisikovih slobodnih radikala i drugih reaktivnih kisikovih spojeva (Gerschman i sur., 1954).

Slobodni radikali su molekule, atomi ili ioni koji u vanjskoj ljusci imaju jedan ili više nesparenih elektrona (Halliwell i Gutteridge, 2007). Zbog nesparenog elektrona, koji predstavlja slobodnu valenciju, slobodni radikali su, uz neke iznimke, kemijski jako reaktivni pa imaju nisku specifičnost za reaktante te mogu reagirati s brojnim organskim i anorganskim molekulama. Tako se u biološkim sustavima, u kemijskoj reakciji oksidacije, mogu brzo i nepredvidivo spojiti s bilo kojom prostorno bliskom molekulom proteina, lipida, ugljikohidrata ili nukleinske kiseline. Vezivanjem slobodnih radikala na spomenute organske molekule mogu nastati novi radikali s mogućnošću pokretanja novog niza neenzimskih lančanih reakcija.

Slobodni radikali nastaju uslijed apsorpcije zračenja, u redukcijsko-oksidacijskim reakcijama tijekom patoloških i normalnih fizioloških procesa poput već spomenute oksidativne fosforilacije u mitohondrijima (Lee i Wei, 2007), prijenosa elektrona u sistemu citokroma P-450 u endoplazmatskom retikulumu (Fulton i sur.,

1997), oksidacije masnih kiselina u peroksisomima (Crane i Masters, 1984), metabolizma arahidonske kiseline u staničnim membranama (Caccese i sur., 2000), fagocitoze (Knight, 2000). Slobodni radikali mogu nastati i tijekom enzimske oksidacije i autooksidacije različitih kemijskih spojeva poput tiola, oksihemoglobina, hidrokinona, kateholamina, pri čemu dolazi do redukcije molekularnog kisika i nastajanja superoksida, najčešće uz prisutnost prijelaznih metala (Halliwell, 1995).

Kao što je već spomenuto, glavni razlog toksičnosti kisika je njegovo svojstvo stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*; ROS) koje imaju veliku važnost u biološkim sustavima. Reaktivni kisikovi spojevi obuhvaćaju kisikove radikale poput superoksidnog aniona ($O_2^{\cdot-}$), hidroksilnog radikala ($OH^{\cdot}$) i perhidroksilnog radikala ($HOO^{\cdot}$), ali i druge reaktivne neradikalske spojeve kisika kao što su vodikov peroksid (H_2O_2), reaktivni (singlet) kisik (1O_2), hipoklornu kiselinu ($HOCl$) te ozon (O_3). Reaktivne kisikove vrste stvaraju se u organizmu tijekom fizioloških i patoloških metaboličkih procesa tijekom redukcije i ekscitacije kisika. Za vrijeme staničnog disanja, na unutrašnjoj strani mitohondrija, molekularni se kisik procesom oksidativne fosforilacije u sistemu citokrom C oksidaza reducira do vode, pri čemu se kao međuproizvod oslobađa mala, ali značajna količina reaktivnih spojeva. Superoksidni anion ($O_2^{\cdot-}$) ako nastaje redukcijom jednog elektrona molekule kisika. Zbog ograničene topljivosti u mastima, ne može prodrijeti duboko u stanicu te mu je djelovanje ograničeno na mjesto nastanka. U kiseloj sredini superoksidni anion veže proton i nastaje još reaktivniji perhidroksilni radikal ($HOO^{\cdot}$). Superoksidni anion se spontano, ali i uz pomoć superoksid dismutaze (SOD), te vodikovih iona, prevodi u vodikov peroksid, snažan oksidans koji uz prisustvo prijelaznih metala, dvovalentnog iona željeza (Fe^{2+}) i jednovalentnog iona bakra (Cu^+), može prihvatiti jedan elektron stvarajući vrlo toksičan hidroksilni radikal ($OH^{\cdot}$). Za razliku od superoksidnog aniona, vodikov peroksid je topljiv u mastima pa može djelovati na mjestima udaljenim u odnosu na mjesto stvaranja. Fentonovom i Haber-Weissovom reakcijom iz H_2O_2 nastaje hidroksilni radikal koji je izrazito reaktivan, te kao takav reagira sa svim vrstama biomolekula. U Fentonovoj reakciji, dvovalentni ion željeza reagira s vodikovim peroksidom i pri tom prelazi u trovalentni ion željeza (Fe^{3+}), uz nastajanje hidroksilnog radikala i hidroksilnog iona. U Haber-Weissovoj reakciji superoksidni anion reagira s vodikovim peroksidom, pri čemu također nastaju hidroksilni radikal i hidroksilni ion. Vodikov peroksid može Fentonovom reakcijom ili

pod utjecajem hemskog enzima, mijeloperoksidaze, stvoriti i neke druge radikale poput hipoklorne kiseline. Hipoklorna kiselina nastaje u neutrofilima, snažan je oksidans i antimikrobni agens.

Tijekom fagocitoze se u makrofazima, neutrofilima i eozinofilima također se kontinuirano stvaraju reaktivni kisikovi spojevi . Slobodni radikali potječu od snažnog oksidativnog metabolizma, „oksidativnog praska“, pri čemu nastaju superoksid, vodikov peroksid, hidroksilni radikal, hipoklorna kiselina i dušikov(II) oksid.

Uz reaktivne kisikove spojeve, veliku važnost u biološkim sustavima imaju i reaktivne dušikove vrste (*engl. reactive nitrogen species*, RNS), u koje ubrajamo dušikove slobodne radikale kao što su dušikov(II) oksid ($\text{NO}^\bullet$) i dušikov(IV) oksid ($\text{NO}_2^\bullet$), te spojeve i molekule poput dušičaste kiseline (HNO_2), peroksinitrita (ONOO^-), peroksinitritne kiseline (ONOOH), alkil peroksinitrata (ROONO) i nitrozilnog kationa (NO^+) . Dušikov(II) oksid nastaje u endotelnim, živčanim i upalnim stanicama, a nastaje iz L-arginina djelovanjem dušik oksid sintetaze (Moncada i Higgins, 1993). Sudjeluje u regulaciji krvnog tlaka, u upalnim reakcijama, inhibiciji agregacije trombocita i proliferacije glatkih mišićnih stanica , ali je i toksičan te ima važnu ulogu u oštećenju tkiva tijekom kronične upale, infarkta mozga i septičkog šoka (Halliwell, 1995). Dušikov(II) oksid posjeduje prooksidativna i antioksidativna svojstva. U reakciji sa superoksidom stvara vrlo toksičan peroksinitrit koji može potaknuti lipidnu peroksidaciju (Huie i Padmaja, 1993). Peroksinitrit s lipofilnim peroksilnim radikalima ($\text{ROO}^\bullet$) stvara relativno stabilni ROONO koji može zaustaviti proces lipidne peroksidacije. Dakle, veća količina dušikovog(II)oksida štiti lipide staničnih membrana od oštećenja .

Osim izravnog djelovanja na razne biološke entitete prisutne u organizmu, neke od reaktivnih vrsta mogu se oksidoredukcijskim reakcijama prevesti u još agresivnije oblike, kao što je već pokazano na primjeru nastanka vrlo toksičnog hidroksilnog radikala. Moguće su i međusobne reakcije kisikovih i dušikovih reaktivnih vrsta, pa tako superoksidni anion u reakciji s dušikvim(II) oksidom stvara još jedan izuzetno agresivan oblik, peroksinitrit.



Izvori slobodnih radikala mogu biti endogeni i egzogeni. Endogeni slobodni radikali u organizmu mogu nastati tijekom metabolizma kisika, fagocitoze, kemotaksije, apoptoze, koagulacije, hipoksije ili hiperoksije. Egzogeni izvor slobodnih radikala mogu biti dim cigareta, lijekovi, prehrana, pesticidi, radioaktivno ili UV-zračenje.

1.5 Oksidativni stres

Oksidativni stres definira se kao pomak ravnoteže u staničnim oksidativno-redukcijskim reakcijama u smjeru oksidacije. Oksidativni stres se javlja ako oksidacijski procesi prevladaju antioksidativne sposobnosti stanica, tkiva ili organizma. Riječ je o stanju prekomjernog stvaranja reaktivnih molekulskih vrsta, pri čemu dolazi do neuravnoteženog stvaranja slobodnih radikala i premašivanja mogućnosti neke stanice da ih razgradi, što rezultira oštećenjem stanica. Drugim riječima, oksidativni stres može se definirati kao oštećenje tkiva uvjetovano poremećajem ravnoteže pro- i anti-oksidativnoga sustava. U ravnotežnim uvjetima, slobodni se radikali razgrađuju djelovanjem staničnih antioksidansa, uz pomoć enzima kao što su SOD, katalaze i glutathion peroksidaze ili neenzimatski uz pomoć glutathiona (GSH) (Siems i sur., 1998). Do pomaka ravnoteže može doći ukoliko je smanjena antioksidativna sposobnost organizma ili ako je povećano stvaranje radikala i drugih reaktivnih vrsta pri čemu dolazi do poremećaja ravnoteže prooksidansa i antioksidansa u korist prooksidansa. Oksidacijsko oštećenje može utjecati na strukturu i funkciju brojnih biomolekula (polinezasićenih lipida, ugljikohidrata, proteina i nukleinskih kiselina), što konačno rezultira promjenama u strukturi i funkciji stanica, tkiva i organa. Tako nastala oštećenja mogu narušiti homeostazu iona, prijenos signala u stanici, gensku transkripciju i dovesti do drugih poremećaja. Oksidativni stres ima značajnu ulogu u etiopatogenezi kardiovaskularnih i infektivnih bolesti, karcinoma, dijabetesa, neurodegenerativnih bolesti, fibroze, hemolize, procesa starenja. U takvim patološkim procesima povećana je

koncentracija i aktivnost slobodnih radikala, a posredovani su izvanstaničnim otpuštanjem reaktivnih kisikovih vrsta iz granulocita, aktivacijom ksantin oksidaze i fosfolipaze, promjenom u transportnom lancu elektrona u mitohondrijima itd. (Bergendi i sur., 1999) Razlike između patološkog i „fiziološkog“ oksidacijskog stresa su različite promjene na makromolekulama, pojedinačnim stanicama i organizmu u cijelosti. Razmjer oštećenja nastalog kao posljedica oksidativnog stresa ovisi o stupnju, trajanju i mehanizmu kojim je izazvan te o organskom sustavu koji je pogođen. Teški oksidativni stres uzrokuje teška oštećenja staničnih struktura što naposljetku dovodi do smrti stanice (Bergendi i sur., 1999).

1.6 Mehanizmi oštećenja DNA u oksidativnom stresu

DNA, kao svaka druga molekula, može biti izložena različitim kemijskim reakcijama. Oksidativni stres ubrzava oštećenje DNA što se može mjeriti kao lančani lom i/ili kemijske modifikacije na DNA bazama i na deoksiribozi. Fiziološki relevantne razine O^{2-} , NO, H_2O_2 ili organskih peroksida ne ulaze u reakcije s DNA u značajnoj mjeri, ali O^{2-} i NO mogu reagirati s radikalima koji nastaju nakon izlaganja DNA agresivnijim reaktivnim vrstama.

1.6.1 Reaktivne kisikove vrste

1.6.1.1 Hidroksilni radikal

Zbog visoke reaktivnosti $OH^\bullet$, izlaganjem DNA ovom radikalnu stvaraju se brojni proizvodi. Primjerice, $OH^\bullet$ se može adirati na gvanin na mjesta 4, 5 i 8 u purinskom prstenu. Adicijom na C-8 nastaje C-8 OH adukt radikal, koji se može reducirati u 8-hidroksi-7,8-dihidrogvanin, oksidirati u 8-hidroksigvanin ili može doći do otvaranja prstena nakon koje slijedi redukcija i protoniranje, pri čemu nastaje 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formaminopirimidin (FAPyG). Slične adicije mogu se dogoditi i na adeninu. Pirimidini u reakciji s $OH^\bullet$ daju različite proizvode, pa tako kod timina može doći do adicije $OH^\bullet$ na prsten ili gubitka $H^\bullet$ iz metilne skupine. Nastali radikali daju različite proizvode, uključujući timin glikol (5,6 dihidroksi-6-hidrotimin), 5 hidroksi-5-metilhidantoin, 5 formil uracil i 5-(hidroksimetil) uracil. I citozin stvara više produkata, uključujući citozin glikol i 5,6-dihidroksicitozin. Djelovanjem $OH^\bullet$ na deoksiribozu

nastaju deseci produkata. Sve pozicije su podložne gubitku vodika, pri čemu se stvaraju radikali s ugljikom u središtu. U prisutnosti kisika, oni brzo prelaze u šećerne peroksilne radikale, koji prolaze kroz različite reakcije, uključujući disproporcioniranje, pregradnju, eliminaciju vode i fragmentaciju C-C veze, pri čemu nastaju različiti karbonilni proizvodi. Pri niskim razinama O_2 , C-5' radikali deoksiriboze mogu poživjeti dovoljno dugo da se adiraju na C-8 purinskog prstena u istom nukleozidu, uz nastajanje cikličkih produkata 8,5'-ciklo-2'-deoksigvanozina (cyclodG) i 8,5'-ciklo-2'-deoksiadenozina (cyclodA). $OH^\bullet$ može napasti i jezgrine proteine. Proteinski radikali mogu stvoriti unakrsne veze (engl. *cross-links*) s radikalima dušičnih baza, što može ometati razmatanje kromatina, popravak, replikaciju i transkripciju DNA (Altman i sur., 1995). Osim toga, radikali dušičnih baza mogu napasti ostatke aminokiselina. Primjerice, alilni radikal timina može napasti tirozinske ostatke, pri čemu nastaju timin-tirozin unakrsne veze. Tako je pokazano da se djelovanjem željezo nitrilotriacetata povećavaju razine timin-tirozina u bubrežnom kromatinu u štakora (Toyokuni i sur., 1995).

1.6.1.2 Vodikov peroksid

Dodavanjem vodikovog peroksida stanicama često se povećava lom lanaca DNA već u prvim minutama, što je praćeno povećanjem broja modificiranih baza u DNA. Međutim, kao što je već spomenuto, H_2O_2 ne oštećuje DNA izravno; za oštećenje je odgovoran visokoreaktivni $OH^\bullet$ radikal koji nastaje Fentonovom ili Haber-Weissovom reakcijom. Prethodna obrada stanica s određenim kelirajućim agensima za metalne ione (poput O-fenantrolina) sprječava oštećenje DNA peroksidima. Da bi došlo do Fentonove reakcije i stvaranja $OH^\bullet$ radikala, željezni ioni moraju biti u neposrednoj blizini DNA. Osim $OH^\bullet$, oštećenja DNA mogu uzrokovati i okso bakreni kompleksi koji nastaju reakcijom bakra i vodikovog peroksida. Ioni potrebni za Fentonovu reakciju su prisutni u jezgri, ali to ne znači da se nalaze u molekularnoj formi koja će uzrokovati stvaranje $OH^\bullet$ radikala. Naime, postoji i mogućnost da se oksidacijskim stresom otpuštaju stanični ioni bakra i željeza koji se onda lako vežu za DNA. Na taj način DNA postaje podložna napadu H_2O_2 . Opaženo je da su u ljudskim limfocitima razine 8OHdG u DNA pozitivno korelirane s raspoloživim (engl. *pool*) željezom. Poznato je da se raspoloživo željezo povećava dodatkom H_2O_2 . U kultiviranim stanicama povećanje razine Fe^{2+} u hranjivom mediju

povećava razinu oštećenja DNA uzrokovanih oksidativnim stresom (Zastawny i sur., 1995).

Prisutnost metalnih iona na DNA pogoduje stvaranju $\text{OH}^\bullet$ na specifičnim mjestima koja dovode do oštećenja DNA koja tzv. hvatači $\text{OH}^\bullet$ teško mogu zaštititi. Osim toga, neki hvatači $\text{OH}^\bullet$ mogu i sami stvarati radikale koji mogu dovesti do oštećenja DNA. Među njima su format, 2-propanol, glicerol, a u anoksičnim uvjetima i dimetilsulfoksid.

1.6.1.3 Kisik u singletnom stanju

Kisik u singletnom stanju (pobuđeni ili reaktivni kisik) znatno je manje učinkovit u oštećenju DNA u odnosu na $\text{OH}^\bullet$. Neučinkovit je u stvaranju lančanog loma i napada samo gvanin. Karbonatni, peroksilni i alkoksilni radikali također imaju ograničenu mogućnost oštećenja DNA. S druge strane, ozon može fragmentirati DNA i oksidirati baze (posebice gvanin i timin), bilo izravno, bilo putem $\text{OH}^\bullet$ radikala koji se stvaraju u vodenoj otopini (Duarte i sur., 2001).

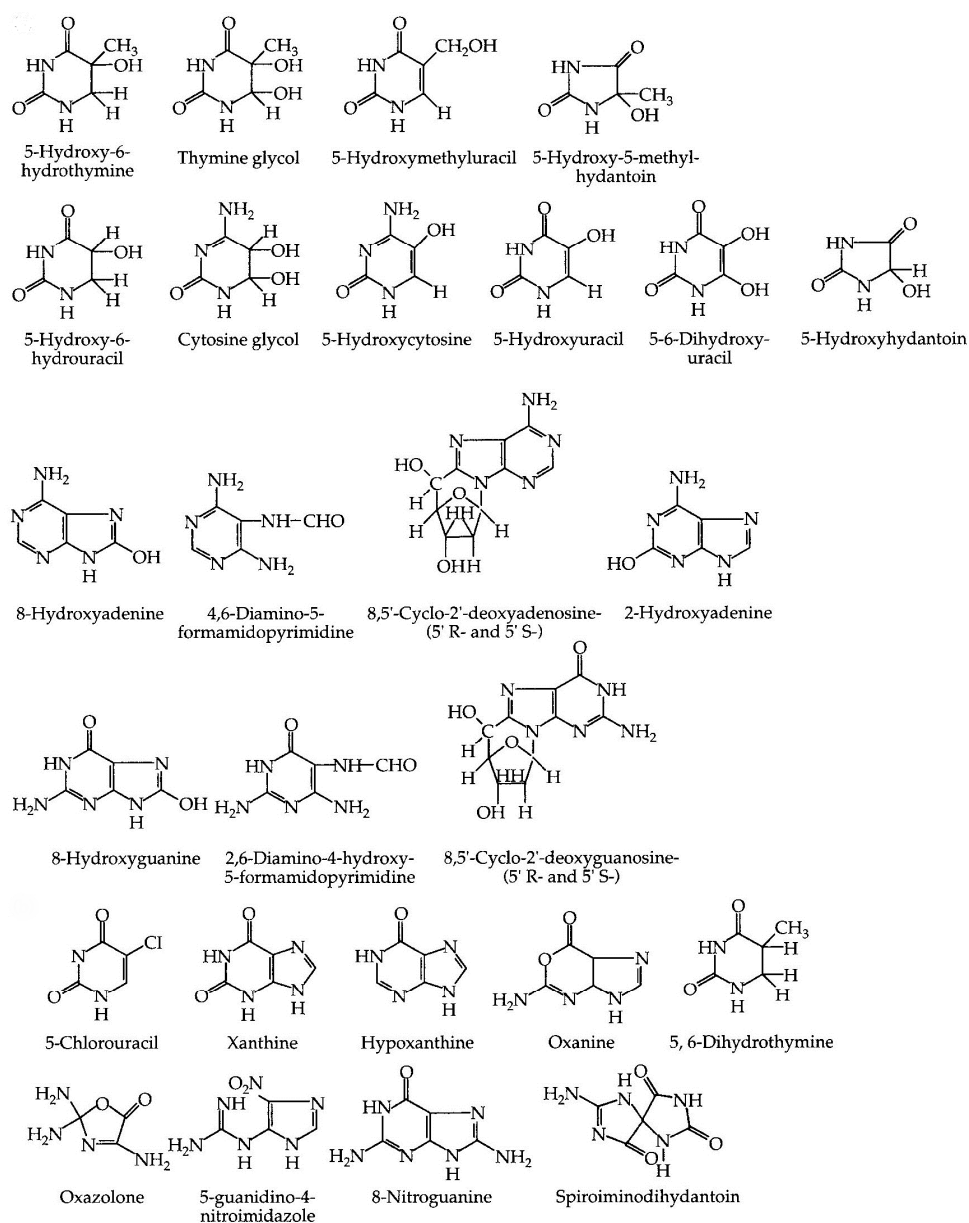
1.6.2 Reaktivne dušikove vrste

Izloženost DNA N_2O_3 ili HNO_2 (vjerojatno putem N_2O_3) može deaminirati DNA baze, pri čemu se citozin prevodi u uracil, 5-metilcitozin u timin, adenin u hipoksantin, a gvanin, koji je i najpodložniji napadu, u ksantin i oksanin (Zhao i sur., 2001), (Toshiaki i sur., 2003). Oksanin se može unakrsno vezati za amino skupine nuklearnih proteina. Peroksinitrit prevodi gvanin u 8-nitrogvanin koji se brzo gubi iz DNA spontanom depurinacijom. Stabilniji konačni proizvod je 5-gvanidino-4-nitroimidazol (Toshiaki i sur., 2003). Nešto 8OHdG se stvara kad ONOO^- napadne DNA, ali se brzo oksidira s ONOO^- . I drugi oksidativni proizvodi se mogu dalje oksidirati, ali to je posebno izraženo za 8OHdG koji je znatno podložniji oksidaciji u odnosu na gvanin, bazu koja je već sama po sebi najpodložnija oksidaciji od četiriju DNA baza.

1.6.3 Ostali radikali

Neke aminokiseline koje se nalaze u hranjivim staničnim podlogama, posebice histidin, mogu pojačati oštećenje DNA s H_2O_2 . Budući da se ovi učinci obično smanjuju u prisutnosti kelatora metalnih iona, moguće je da uključuju metalnu vezu (Cantoni i Vascul, 1997).

Hipoklorna kiselina napada prije svega pirimidinske baze u DNA, premda je moguća i klorinacija adenina (pri čemu nastaje 8-kloroadenin). Glavni konačni proizvodi su timin glikol i 5-klorocitozin (Spencer i sur., 2000), koji je otkriven na mjestima upale kod štakora.



Slika 3. Modifikacije DNA baza u međureakciji s reaktivnim vrstama (izvor: (Halliwell i Gutteridge, 2007))

1.6.4 UV zračenje

UV zračenje lako oštećuje DNA. Prvo, UV-C zrake mogu prevesti H_2O_2 u $\text{OH}^\bullet$. Drugo (i znatno važnije), UV zračenje dovodi do kovalentnog unakrsnog vezanja susjednih pirimidina, pri čemu nastaju ciklobutanski pirimidinski dimeri i 6-4 fotoproizvodi.

1.7 Posljedice oštećenja DNA reaktivnim vrstama

1.7.1 Mutacije

Posljedice promjene strukture DNA znatno su veće nego promjene na drugim staničnim komponentama poput RNA ili proteina, budući da DNA služi kao jedinstvena i trajna kopija staničnog genoma. Oštećenje DNA (oksidativno ili drugo) obično zaustavlja replikaciju i staničnu diobu, preko mehanizma koji uključuje protein p53, dok se popravak ne završi. Previše oštećenja na DNA može dovesti do smrti stanice preko p53 posredovane apoptoze i/ili NAD⁺ trošenja preko PARP-a (poly(ADP-ribose)polymerase). Međutim, ako sva oštećenja na bazama ili šećerima nisu ukonjena, prije početka ili nastavka replikacije DNA može se dogoditi sinteza DNA polimerazama sklonim pogrešci. Polimeraze koje su normalno uključene u replikaciju DNA imaju učinkovit mehanizam popravka, ali u sintezi DNA koja sadrži oštećenja, one su zamijenjene s drugim polimerazama koje su sposobne izvršiti replikaciju i preko mjesta oštećenja i na taj način povećati postotak mutacija. Više modificiranih DNA baza može se krivo sparivati. Primjerice, budući da se adenin uparuje s timinom, njegovom deaminacijom nastaje hipoksantin koji može činiti par s citozinom. Uracil čini par s adeninom radije nego s gvaninom, pa tako reaktivne dušikove vrste uzrokuju AT↔GC tranzicije. 8-nitrogvaninski ostaci u DNA mogu uzrokovati G→T transverzije, kao i sponatanu deaminaciju ostavljajući AP mjesta koja mogu prouzročiti mutaciju. 5-gvanidino-4-nitroimidazol je također mutagen, jer uzrokuje G→C transverziju te G→A i G→T tranziciju. Prisutnost timin glikola snažno blokira replikaciju, ali može dovesti i do T→C tranzicija. 5-hidroksicitozin i 5-hidroksiuracil mogu se krivo spariti s adeninom, pri čemu nastaju C→T tranzicije. 5-hidroksimetiluracil krivo se sparuje s gvaninom. 8-hidroksigvanin dovodi do GC→TA transferijskih mutacija, budući da se vodikovom vezom može vezati na adenin, premda se najveći dio 8-hidroksigvanina ispravno sparuje s citozinom.

Neki oksidacijski proizvodi 8OHdG, poput oksaluronske kiseline, oksazalona, cijanurne kiseline i spiroiminodihidantoina, mogu biti više mutageni od 8OHdG (Hah i sur., 2005). 8-hidroksiadenin ima malu mogućnost krivog sparivanja s gvaninom, ali uglavnom se ispravno sparuje s timinom i manje je mutagen od 8OHG. Smatra se da purini s otvorenim prstenom (FAPyG, FAPyA) blokiraju replikaciju DNA. Neki konačni proizvodi lipidne peroksidacije mogu se također vezati na DNA i uzrokovati mutacije.

1.7.2 Pogrešna ugradnja

Reaktivne vrste mogu promijeniti nukleozide i nukleotide prije njihove ugradnje

Mutacije u eksonima mogu imati za posljedicu promijenjene proteine, međutim

(engl. *splicing*). Mutacije u promotorskim regijama mogu utjecati na vezanje transkripcijskih faktora i mijenjati gensku ekspresiju. Na primjer, zamjena G sa 8OHdG u promotorskoj regiji, mijenja vezanje AP-1 ili NF-KB. Isto tako, postoji mogućnost da oksidativno oštećenje baze može međudjelovati s metilacijom CpG (događaj koji uobičajeno suprimira gensku transkripciju), pa se posljedično tome može transkribirati gen koji se u normalnim uvjetima ne bi prepisivao (Valinluck i sur., 2004).

1.8 Popravak DNA

Kako bi se održala cjelovitost staničnog genoma, stanice su razvile mehanizme za popravak oštećenja. Popravak DNA promjena uzrokovanih oksidacijom neophodan je aerobima da prežive mutacije. Mehanizmi popravka DNA mogu se podijeliti u dvije osnovne skupine: (1) izravni obrat kemijske reakcije odgovorne za oštećenje DNA i (2) uklanjanje oštećenih baza nakon čega slijedi njihova zamjena s novosintetiziranom DNA. U slučaju da oba mehanizma zataje, evolucija je razvila i dodatne mehanizme koji pomažu stanici da se nosi s oštećenjima (Cooper, 2004).

1.8.1 Obrat kemijske promjene na bazama

Izravni obrat kemijski promijenjene DNA ponekad je način popravka oskidirane DNA. Samo nekoliko tipova oštećenja DNA popravljaju se na ovaj način. Primjerice, *Escherichia coli* sadrži enzim DNA fotoliazu, koji se veže na pirimidinske dimere, apsorbira svjetlo iz plavog dijela UV spektra, te tako dobivenu energiju koristi za razdvajanje dimera. Stvaranje ovakvih dimera narušava strukturu DNA i blokira transkripciju i replikaciju nizvodno od mjesta oštećenja, pa je njihov popravak usko povezan sa sposobnošću stanica da prežive UV zračenje. Izravni obrat dimerizacijske reakcije naziva se fotoreaktivacijom, jer se za kidanje strukture ciklobutanskog prstena koristi energija vidljive svjetlosti. Slični enzimi su nađeni i kod eukariota, ali ne i u ljudi.

Drugi oblik izravnog popravka odnosi se na oštećenja proizašla iz reakcije alkilirajućih agensa i DNA. Osobito važan tip oštećenja je metilacija O⁶ pozicije

gvanina, jer O⁶-metilgvanin stvara komplementarne parove s timinom umjesto s citozinom. Ova lezija može biti popravljena djelovanjem enzima O⁶-metilgvanin-DNA-metiltransferaze, koji prenosi metilnu skupinu s O⁶-metilgvanina na cisteinski ostatak u svom aktivnom mjestu. Time je uklonjena potencijalno mutagena kemijska modifikacija i obnovljen izvorni gvanin. Enzimi koji kataliziraju ovu reakciju zastupljeni su u znatnom broju kod prokariotskih i eukariotskih organizama, uključujući i čovjeka.

1.8.2 Popravak izrezivanjem (ekscizijski popravak)

U popravku izrezivanjem, oštećena DNA biva prepoznata i uklonjena, bilo u obliku slobodnih baza, bilo u obliku nukleotida. Nastala pukotina se zatim popunjava sintezom novog lanca DNA korištenjem neoštećenog komplementarnog lanca kao kalupa. Stanice se bore sa širokim spektrom različitih oštećenja s tri tipa popravka izrezivanjem: izrezivanje baza, izrezivanje nukleotida i popravak krivo sparenih baza

Popravak izrezivanjem baza (engl. *Base excision repair*, BER) vrlo je čest tip popravka kod oksidativnog oštećenja DNA. Oštećena baza biva prepoznata i uklonjena iz molekule DNA. U tom tipu popravka sudjeluju DNA-glikozilaze koje prepoznaju hipoksantin stvoren deaminacijom adenina, pirimidinske dimere, alkilirane purine (osim O⁶-alkil gvanina) i baze oštećene oksidacijom ili ionizirajućim zračenjem. Rezultat aktivnosti DNA-glikozilaze je formiranje apirimidinskog ili apurinskog mjesta (uobičajno zvanim AP mjestom). Ta mjesta popravljaju se djelovanjem AP-endonukleaze koja kida lanac DNA uz AP mjesto, a nastala pukotina popunjava se onda djelovanjem DNA-polimeraze i ligaze. BER uključuje popravak mnogih oksidacijskih oštećenja DNA poput uklanjanja hipoksantina, uracila, derivata oksidiranog uracila (5-hidroksiuracila, aloksana i izodialurične kiseline), FAPy i 8OHdG.

Popravak izrezivanjem nukleotida (engl. *Nucleotide excision repair*, NER) ne prepoznaje samo specifična oštećenja baza poput BER-a, nego široku skupinu oštećenih baza, uključujući dimere uzrokovane UV zračenjem, te velike skupine dodane bazama DNA kao rezultat međureakcije različitih kancerogena s DNA. Ovaj tip popravka prepoznaje oksidacijska oštećenja kao što su 8OHdG i ciklo-2'-deoksiadenozin.

Popravak krivo sparenih baza (engl. *mismatch repair*) korektivni je mehanizam koji provjerava novorepliciranu DNA. Mehanizam ovog popravka je otkriti i specifično izrezati krivo sparenu bazu iz novosintetiziranog lanca DNA. Jednolančani lomovi DNA ili povezivanje proteina MutS i MutL s replikacijskim sustavom mogli bi određivati koji je lanac potrebno popraviti. Proteini MutS i MutL zatim se vežu za krivo sparenu bazu i upravljaju isjecanjem DNA između loma lanca i krivo sparenih baza.

1.8.3 Popravak sklon pogreškama

Mehanizmi izravnog obrata oštećenja DNA i popravka izrezivanjem popravljaju oštećenje DNA prije replikacije tako da se DNA može sintetizirati korištenjem neoštećenog lanca DNA kao kalupa. U slučaju da ovi mehanizmi zakažu, stanica ipak ima alternativne mehanizme za popravak oštećenja DNA u replikacijskim rašljama. Stanice posjeduju nekoliko specijaliziranih DNA polimeraza koje su u stanju izvršiti replikaciju i preko mjesta oštećenja DNA. Replikacija oštećene DNA djelovanjem takvih specijaliziranih polimeraza može dovesti do učestalog ugrađivanja neodgovarajućih baza pa se ovakav popravak naziva „popravak sklon pogreškama“ (engl. *error-prone repair*).

1.8.4 Rekombinacijski popravak

Rekombinacijski popravak se zasniva na zamjeni oštećene DNA rekombinacijom s neoštećenom molekulom. Ovaj mehanizam je čest u popravku oštećenja na koji se nailazi u vrijeme replikacije. Rekombinacijski popravak ovisi o činjenici da je jedan lanac roditeljske DNA ostao neoštećen, i da je replikacijom dao normalnu sestrinsku molekulu. Rekombinacijski popravak pruža glavni mehanizam za popravak dvolančanih lomova.

1.9 Inhalacijski anestetici kao promotori oksidativnog stresa

Sevofluran i izofluran se eliminiraju iz tijela izdisajem, a samo mali dio (2-5%, odnosno 0,2%) metabolizira se preko 2E1 odjeljka citokroma P-450.

Eksperimenti u kojima je korišten citokrom P-450 2E1 pročišćen iz štakora i ljudi (Kharasch i Thummel, 1993), potvrdili su rezultate *in vitro* istraživanja s jetrenim mikrosomima i pokazali da je ovaj izozim dominantan, ako ne i jedini enzim koji sudjeluje u defluorinaciji sevoflurana i izoflurana. Enzim CYP2E1, odgovoran za biotransformaciju sevoflurana u jetri, sposoban je za stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta, kao što su O^{2-} i H_2O_2 tijekom katalitičkog ciklusa. Prisutnost željezovih iona za vrijeme stvaranja O_2 može dovesti do stvaranja visokoreaktivnog hidroksilnog radikala. Povećana koncentracija fluorida, koji nastaje kao konačni produkt metabolizma sevoflurana i izoflurana, može inhibirati katalazu i tako umanjiti obranu od reaktivnih vrsta. Istraživanja su također pokazala da fluorid može poticati stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta u leukocitima (Rzeuski i sur., 1998). Neka istraživanja pokazala su da izlaganje sevofluranu i izofluranu inducira apoptozu u humanim limfocitima, ovisno o dozi i vremenu (Matsuoka i sur., 2001), te povezanost tako inducirane apoptoze sa povećanom proizvodnjom reaktivnih kisikovih vrsta (Delogu i sur., 2001). Unatoč tome što je za uvod u anesteziju korišten propafol, čije su antioksidativne aktivnosti opisane (Allauchiche i sur., 2001; Tsuchiya i sur., 2001) jednolančani lomovi DNA, oksidirane purinske i pirimidinske baze dokazane su nakon 15 minuta od izlaganja anestetima u limfocitima periferne krvi.

Što se tiče antioksidacijskih učinaka sevoflurana, neki autori smatraju da je ovaj spoj sposoban proizvesti reaktivne kisikove vrste, kao što su OH , O^{2-} (Kevin i sur., 2003) i H_2O_2 (Wong i sur., 2006), te pojačavati lipoperoksidaciju (Sato i sur., 1994), što dovodi do slabljenja antioksidacijskog enzimskog sustava u više vrsta tkiva (Türkan i sur., 2005). Izloženost sevofluranu izravno potiče stvaranje peroksinitrita kao i značajna intracelularna povećanja H_2O_2 i/ili peroksida, superoksida i dušikovog oksida (NO) u polinuklearnim leukocitima periferne krvi unutar jednog sata od izloženosti sevofluranu. Povećano trošenje glutationa (GSH) u polinuklearnim leukocitima, također je izraženo u prisutnosti sevoflurana (Wong i sur., 2006). Nagađa se da je sevofluran sposoban mijenjati tok elektrona duž respiratornog lanca na mitohondrijskoj razini, zbog čega dolazi do stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (Riess i sur., 2005). Pokazano je i da međureakcija između sevoflurana i citokroma P450 2E1 s enzimatskim inducerima može dovesti do oksidativnog stresa kod dugotrajnog i ponavljajućeg izlaganja (Bezerra i sur., 2010).

Novije publikacije raspravljaju o fenomenu anestetičkog predkondicioniranja (engl. *anesthetic preconditioning*, APC), kod kojeg se uslijed kratkog izlaganja sevofluranu i desfluranu štiti srčani mišić i drugi organi protiv štetnog učinka koji na tkiva mogu izazvati procesi ishemije i reperfuzije. Povećano stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (Hanouz i sur., 2007; Tanaka i sur., 2002; Riess i sur., 2005) i mitohondrijsko rasprezanje putem otvaranja mitohondrijskih kalijevih kanala (Marinovic i sur., 2006) čine se kritičnim događajima u početku APC signalne kaskade. Povećano stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta u APC pripisano je otvaranju mitohondrijskih ATP-osjetljivih K^+ kanala (Tanaka i sur., 2003). Međutim, druge studije sugeriraju da je otvaranje mitohondrijskih K_{ATP} kanala inducirano reaktivnim kisikovim vrstama (Zhang i sur., 2001).

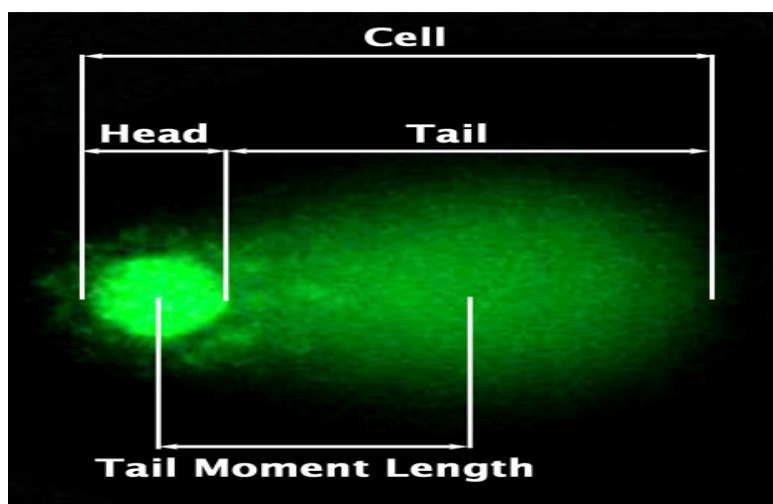
1.10 Komet test

Komet test ili mikrogel elektroforeza vrlo je djelotvorna, a istovremeno praktična i relativno jeftina tehnika za procjenu oštećenja i popravaka molekule DNA na razini pojedinačnih stanica (Collins i sur., 1997). S obzirom da se može koristiti za sve vrste biljnih i životinjskih tkiva te da je za izvođenje testa dovoljan mali broj stanica, a rezultati se mogu dobiti unutar nekoliko sati, komet test postao je općeprihvaćena tehnika u istraživanjima genotoksičnosti *in vitro* i *in vivo* (Betti i sur., 1994; Tice i sur., 2000). Prvu mikrogel elektroforezu proveli su još 1984. Östling i Johanson koji su istraživali oštećenja DNA u pojedinačnim stanicama uklopljenim u agarozni gel. Komet test temelji se na svojstvu polomljenih krajeva negativno nabijene molekule DNA, koji liziranjem postaju slobodni, da putuju u električnom polju od jezgre prema anodi. Bivša stanična jezgra i polomljeni ulomci razvučeni u električnom polju oblikuju „glavu“ i „rep“ komete (Singh i sur., 1988), po čemu je metoda i dobila ime. U posljednjih desetak godina metoda je korištena kako u bazičnim, tako i primijenjenim istraživanjima, ali potrebno je upozoriti da je ograničena na praćenje lomova DNA koji su u najvećoj mjeri popravljivi staničnim mehanizmima popravka. Zbog toga je važno istovremeno korištenje drugih metoda kako bi se normirali uvjeti rada u metodi i reducirale varijabilnosti. U genotoksičnim istraživanjima poseban interes predstavljaju oni mutageni spojevi koji uz direktno oštećenje molekule DNA izazivaju i dodatne, tzv. međuveze između lanaca DNA, kao

što su npr. neki citostatici, formaldehid, metali i sl. Različite modifikacije komet testa omogućuju otkrivanje i drugih vrsta oštećenja, primjerice nepotpunog ekscizijskog popravka i unakrsnih veza između lanaca DNA (Olive, 1999; Plappert i sur., 1995). Osim oštećenja DNA, komet testom se može pratiti i popravak DNA (Müller i sur., 1994).

Danas se uglavnom upotrebljavaju dvije izvedbe komet testa. Prva izvedba koju su predložili Olive i suradnici (1990) odvija se u neutralnim uvjetima i omogućuje specifično otkrivanje dvolančanih lomova u molekuli DNA. Drugi način izvedbe – komet test u alkalnim uvjetima (pH 13) opisali su Singh i suradnici (1988). Ta se izvedba smatra optimalnom za otkrivanje učinaka različitih genotoksičnih tvari, a omogućuje specifično otkrivanje jednolančanih lomova, mjesta osjetljivih na lužine te ukriženog povezivanja između molekula DNA-DNA i DNA-proteini. Mjesta osjetljiva na lužine nastaju u dijelovima molekule DNA gdje postoje apurinska i apirimidinska, tzv. AP mjesta. Ta su mjesta podložnija oštećenjima pa se u lužnatim uvjetima pretvaraju u lomove. Izvedba komet testa vrlo je jednostavna: pojedinačne stanice najprije se uklapaju u „agarni sendvič“ gel na brušenim predmetnim stakalcima, citoplazma se lizira pod neutralnim ili alkalnim uvjetima, a stanične jezgre izlože se djelovanju električnog polja. Za liziranje stanica primjenjuje se otopina s visokom koncentracijom etilendiaminotetraoctene kiseline (EDTA) i detergenata. EDTA pospješuje destabiliziranje membrana tvoreći kelate s ionima metala vezanim uz membranske strukture stanice. Detergenti, pak, djeluju na molekule lipida iz stanične membrane, izazivajući razaranje membranskih struktura stanice i oslobađanje ukupne DNA. Potom se DNA denaturira u lužnatom ili neutralnom puferu koji osim što denaturira DNA, pospješuje uklanjanje soli oslobođenih razaranjem staničnih struktura, koje bi mogle neutralizirati negativne naboje fosfatnih skupina DNA i ometati pokretljivost DNA u gelu za vrijeme elektroforeze (Fairbairn i sur., 1995). Tijekom elektroforeze, pod utjecajem električnog polja, ulomci DNA nastali jednolančanim ili dvolančanim lomovima izlaze iz jezgre i kroz pore agaroznog gela putuju prema anodi, dok glavnina DNA zbog velike molekularne mase ne može putovati kroz pore gela prema anodi. Brzina putovanja ulomka molekule DNA ovisi o njegovoj dužini – kraći ulomci putuju kroz gel brže, a duži sporije te tako nastupa njihovo razdvajanje prema veličini (Plappert i sur., 1995). Ukoliko je oštećenje molekule DNA malo, ona se više isteže nego putuje. Porastom broja oštećenja,

dijelovi molekule DNA slobodno putuju i tvore rep komete sve do krajnjeg slučaja (apoptotične stanice) u kojoj su glava i rep komete jasno razdvojeni. Za mikroskopski vidljiv pomak dovoljno je da molekula DNA putuje samo djelić milimetra. Jedan prekid molekule (uzrokovan genotoksinom) dovoljan je da se takva višestruka uzvojnica DNA raspe iz svoje čvrste strukture. Komet test može otkriti i stanice u apoptozi te nekrotične stanice. Za bojanje se najčešće koristi etidijev bromid, a mogu se koristiti propidijev jodid i akridin oranž. Nakon bojanja s fluorescencijskom bojom, u gelu se mogu uočiti kometi različitih veličina. Pod epifluorescencijskim mikroskopom obično se analizira 50-100 stanica koje se razvrstavaju po dužini repa, obično u pet kategorija od 0 do 4 (Collins i sur., 1997; Singh i sur., 1988). Oštećenje DNA procjenjuje se na osnovi udjela DNA u „repu“ kometa i udjela DNA u „glavi“ kometa. Za to danas postoje sustavi za analizu slike, u kojima je epifluorescencijski mikroskop povezan s računalom, a pomoću posebnih računalnih programa za svaki pojedinačni komet istovremeno se mjeri više parametara (Garaj-Vrhovac i Kopjar, 1998). U početku se kao glavni pokazatelj za procjenu oštećenja DNA uzimala vrijednost dužine repa , zatim repni moment, a u novije se vrijeme postotak DNA u repu.



Slika 5. Vizualizacija oštećenja DNA primjenom komet tehnike

2 CILJ RADA

Cilj ovog rada bio je izmjeriti oštećenja DNA u stanicama bubrega miševa Swiss albino nakon višekratnog izlaganja sevofluranu i izofluranu, u ovisnosti o vremenu proteklom nakon izlaganja. Odredili smo stupanj oštećenja DNA spomenutih stanica zdravih miševa Swiss albino neposredno nakon izlaganja sevofluranu i izofluranu i usporedili sa stupnjevima oštećenja DNA nakon 2, 6 i 24 sata upotrebom visokoosjetljive tehnike alkalnog komet testa. Za određivanje razlika u popravku nakon ponavljane inhalacije sevoflurana i izoflurana, komet test je upotrijebljen za analizu jednostrukih lančanih lomova i unakrsnih veza.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Kemikalije

U istraživanju smo koristili sljedeće kemikalije:

- sevofluran (Sevorane®, Abbott Laboratories Ltd, Queenborough, Velika Britanija)
- izofluran (Forane®, Abbott Laboratories Ltd, Queenborough, Velika Britanija)
- natrijev klorid, NaCl (Kemika, Zagreb)
- natrijev etilendiaminotetraacetat, Na₂EDTA (Sigma, USA)
- agaroza normalnog tališta (NMP) (Sigma, USA)
- agaroza niskog tališta (LMP) (Sigma, USA)
- natrijev sarkozinat (Sigma, USA)
- Tris-HCl pufer (Sigma, USA)
- Triton X-100 (Sigma, USA)
- dimetil sulfoksid (Sigma, USA)
- natrijev hidroksid (Kemika, Zagreb)
- etidijev bromid (Sigma, USA)

3.1.2 Uređaji

U istraživanju smo upotrebljavali sljedeće uređaje:

- anestezijski aparat Sulla 800 (Dräger, Njemačka)
- respiracijski monitor PM 8050 (Dräger, Njemačka)
- kadica za elektroforezu (Life Technologies Ltd, USA)
- epifluorescencijski mikroskop Leitz Orthoplan (Ernst Leitz Wetzlar, Njemačka)

3.1.3 Pokusne životinje

U istraživanju smo rabili miševe muškog spola visokosrodnog soja Swiss albino (*Mus musculus* L.), starosti 2 mjeseca, mase 20-25 g iz uzgoja Zavoda za animalnu fiziologiju. Miševe smo držali u kavezima (najviše do pet životinja po kavezu) pri 22 ± 1 °C te ih hranili standardnom hranom za laboratorijske životinje (Standard Diet GLP, 4RF 1, Mucedola, Settimo Milanese MI, Italija), uz stalnu dostupnost vode *ad libitum*. Istraživanje smo proveli po etičkim načelima važećim u Republici Hrvatskoj (Zakon o zaštiti laboratorijskih životinja, NN 19, 1999. i prema Vodiču za držanje i korištenje laboratorijskih životinja (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, DHHS (NIH) Publ # 86-23).

3.2 Metode

3.2.1 Izlaganje miševa anestetiku

Miševe smo anestezirali sevofluranom (2,4 vol. %) i izofluranom (1,7 vol. %) u kontinuiranom toku sa smjesom kisika i zraka u omjeru 50:50 (3 L min^{-1}) u posebno izrađenom inkubatoru spojenom s anestezijskim aparatom Sulla 800, putem isparivača za inhalacijske anestetike. Respiracijskim monitorom PM 8050 vršili smo monitoring inspiratornih koncentracija inhalacijskih anestetika i kisika. Primijenili smo poluotvoreni način isporuke anestetika, što znači da smo struju plinova usmjerili u jednom smjeru, bez povratka, a izdahnute plinove odvodili putem odvodne cijevi u atmosferu. Dubina anestezije ocijenjena je zadovoljavajućom kad su miševi mirno spavali, spontano disali i nisu micali repom. Eksperimentalne grupe miševa bile su izložene sevofluranu, odnosno izofluranu 3 dana po 2 sata dnevno. Po pet neizloženih jedinki upotrijebljene su kao kontrola.

Životinje smo žrtvovali cervikalnom dislokacijom (dopuštena metoda za male glodavce prema Zakonu o dobrobiti životinja, Narodne novine 19/99), te uzeli tkivo za analizu.

3.2.2 Komet test

Miševi, podijeljeni u dvije kontrolne skupine i 8 eksperimentalnih skupina, žrtvovani su 3. dan, odmah nakon posljednjeg izlaganja anestetcima (skupina S0), odnosno 2 sata (skupina S2), 6 sati (skupina S3) i 24 sata (skupina S4) nakon izlaganja. Svaka skupina sastojala se od 5 miševa. U ovom radu smo primijenili standardnu izvedbu komet testa koju su predložili Singh i sur. (1988). Za analizu su uzete stanice bubrega.

Tkivo bubrega protisnuli smo kroz mrežicu u pufer za homogenizaciju, pH 7,5 (0,075 M NaCl i 0,024 M Na₂EDTA), ohlađen na 4 °C i to u omjeru 1 g tkiva na 1 ml pufera. Na brušena predmetna stakla (Surgipath, USA) nanijeli smo svježe priređenu otopinu 1% agaroze normalnog tališta (NMP) i pokrili pokrovnicom. Nakon polimerizacije agaroze na sobnoj temperaturi sa stakla smo uklonili pokrovnicu i taj sloj gela. Na osušeno staklo pomoću mikropipete nakapali smo 300 µl 0,6% agaroze normalnog tališta (NMP) koju smo pokrili pokrovnicom i ostavili na ledu 10 minuta. Na stakalca smo zatim nanijeli sljedeći sloj koji se sastojao od 100 µl 0,5% agaroze niskog tališta (LMP) pomiješane s 5 µl uzorka (stanica bubrega), te ponovo pokrili pokrovnicom. Nakon 10 minuta polimeriziranja na ledu, taj sloj gela prekrili smo s 100 µl 0,5% agaroze niskog tališta i preparate ponovo držali na ledu 10 minuta. Nakon toga skinuli smo pokrovnicu i preparate staviti u otopinu za lizu.

Nakon uklanjanja pokrovnice, preparate smo uronili u ohlađeni (+4 °C) pufer za lizu (1% natrijev sarkozinat, 2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100 i 10 % dimetil sulfoksid), pH 10, i držali ih jedan sat na +4 °C.

Preparate smo iz pufera za lizu prebacili u pufer za denaturaciju (0,3 M NaOH, 1 mM Na₂EDTA), pH 12 i držali 20 minuta na +4 °C.

Elektroforezu smo proveli u vodoravnoj kadici za elektroforezu u puferu za denaturaciju (0,3 M NaOH, 1 mM Na₂EDTA), istosmjernom strujom stalne jakosti 300 mA i napona 25 V, tijekom 20 minuta.

Neutralizaciju smo radili ispiranjem s 0,4 M Tris-HCl puferom, pH 7,5, tri puta po 5 minuta.

Nakon zadnjeg ispiranja preparate smo obojili sa 100 μ l etidijevog bromida koncentracije 20 μ g/ml, u trajanju 10 minuta. Obojane preparate kratko smo ispirali u Tris-HCl puferu, pH 7,5.

Za svaki je uzorak analizirano 100 slučajno odabranih stanica. Ukupno 500 stanica iste vrste iz svake skupine analizirano je pod Leitz Orthoplan epifluorescencijskim mikroskopom (povećanje 250x) opremljenim s pobudim filterom od 515-560 nm i filterom na 590 nm. Mikroskop je bio priključen kamerom na računalno opremljen sustav za analizu slika (Commet Assay IV software, Perspective Instruments). Kometi su snimani pri stalnoj dubina gela, izbjegavajući rubove gela i povremene mrtve stanice. Oštećenje DNA mjereno je kao dužina repa (engl. *tail lenght*, TL = udaljenost migracije DNA od središta tijela jezgre), repni moment (engl. *tail moment*, TM = dužina repa x postotak DNA u repu) i intenzitet repa (eng. *tail intensity*, TI = % DNA koja migrira za vrijeme elektroforeze od jezgre do repa). Određivanjem sva tri parametra zajedno, može se dobiti više informacija o stupnju oštećenja DNA. Primjerice, TI u oštećenoj staničnoj populaciji može biti isti za dvije uspoređivane skupine, ali onda TL ukazuje na duljinu ulomka. TM kombinira TI i TL zajedno, pa je prikladan za statističku analizu.

3.2.3 Statistička obrada podataka

Za statističku analizu korišten je računalni program Statistica 5.0 (Statsoft, Tulsa, USA). Srednja vrijednost i standardno odstupanje računati su od svih životinja po grupi. Post-hoc analizu razlika među pojedinim skupinama proveli smo upotrebom Tukey's HSD (Honestly Significant Difference) testa. Za analizu varijance učinka sevoflurana korišten je ANOVA (Analysis of variance) test.

4 REZULTATI

U usporedbi s kontrolom, sve ciljane skupine (s iznimkom S0 za sevofluran) pokazale su porast u prosječnim TL, TM i TI vrijednostima u stanicama bubrega ($P < 0,05$). Oštećenje DNA bubrežnih stanica nakon ponavljano izlaganja sevofluranu bilo je u kontinuiranom porastu od drugog sata nakon izlaganja, a najviše nakon 24 sata. Izlaganje izofluranu uzrokovalao je najviše oštećenja nakon 2 sata, nakon čega se postupno smanjuje.

Tablica 1 Prikaz srednjih vrijednosti sa standardnom devijacijom (S.V.±SD) za dužinu repa (TL), repni moment (TM) i intenzitet repa (TI) izmjerenih u stanicama bubrega miša izloženih sevofluranu na izmjerenih 500 kometa.

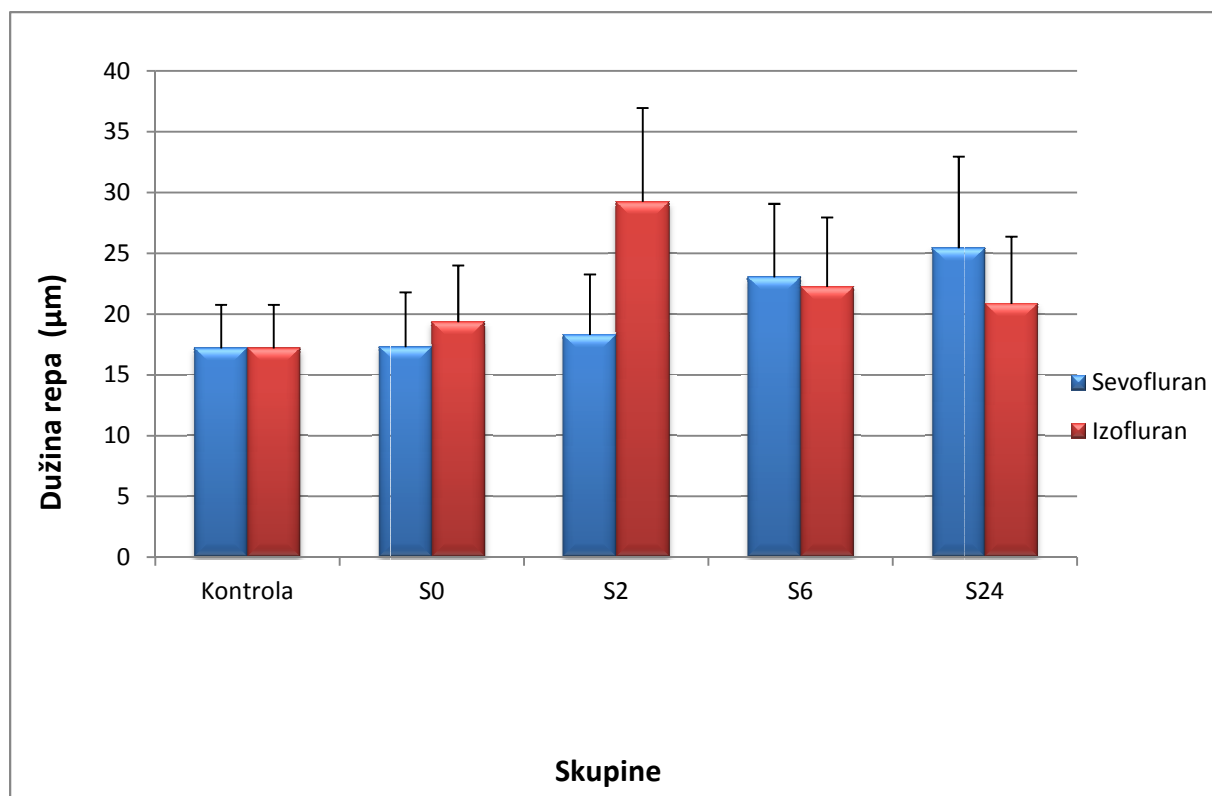
Skupina	TL Dužina repa/ μm S.V.± SD	TM Repni moment S.V.± SD	TI Intenzitet repa/% DNA u repu S.V.±SD
Sevofluran kontrola	17,19 ± 3,58 ^{cde}	0,36 ± 0,40 ^{de}	3,69 ± 4,04 ^{de}
Sevofluran 0 h (S0)	17,29 ± 4,52 ^{cde}	0,42 ± 0,47 ^{cde}	4,24 ± 4,59 ^{cde}
Sevofluran 2 h (S2)	18,28 ± 4,99 ^{abde}	0,29 ± 0,40 ^{bde}	2,91 ± 4,02 ^{bde}
Sevofluran 6 h (S6)	23,04 ± 6,03 ^{abce}	1,05 ± 1,04 ^{abce}	8,26 ± 7,71 ^{abce}
Sevofluran 24 h (S24)	25,43 ± 7,54 ^{abcd}	1,23 ± 0,98 ^{abcd}	10,05 ± 7,26 ^{abcd}

Mala slova obilježavaju značajne razlike ($P < 0,05$) za :^a kontrolu; ^b skupinu S0; ^c skupinu S2; ^d skupinu S6; ^e skupinu S24.

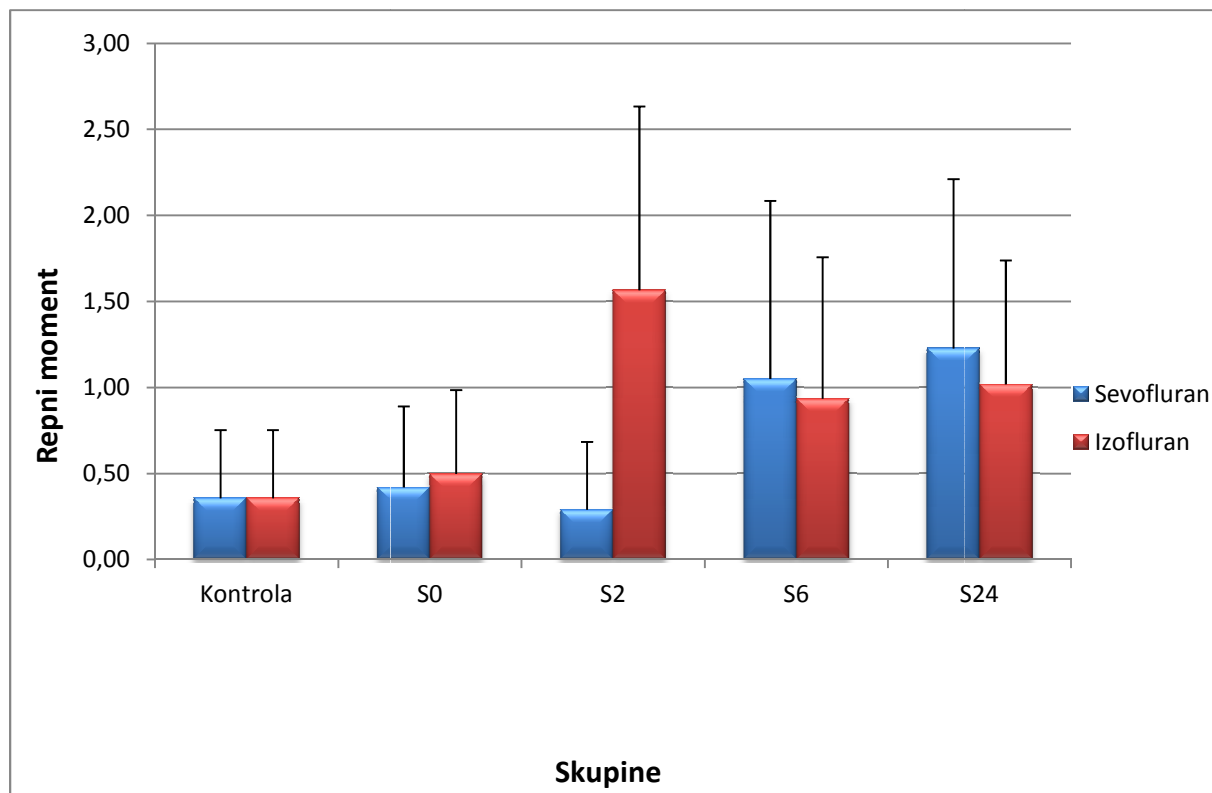
Tablica 2 Prikaz srednjih vrijednosti sa standardnom devijacijom (S.V. $\pm$ SD) za dužinu repa (TL), repni moment (TM) i intenzitet repa (TI) izmjerenih u stanicama bubrega miševa izloženih izofluranu na izmjerenih 500 kometa.

Skupina	TL Dužina repa/ μm S.V. $\pm$ SD	TM Repni moment S.V. $\pm$ SD	TI Intenzitet repa/% DNA u repu S.V. $\pm$ SD
Izofluran kontrola	17,19 $\pm$ 3,58 ^{bcde}	0,36 $\pm$ 0,40 ^{bcde}	3,69 $\pm$ 4,04 ^{bcde}
Izofluran 0 h (S0)	19,36 $\pm$ 4,65 ^{acde}	0,50 $\pm$ 0,49 ^{acde}	11,84 $\pm$ 7,07 ^{ade}
Izofluran 2 h (S2)	29,23 $\pm$ 7,73 ^{abde}	1,57 $\pm$ 1,07 ^{abde}	11,84 $\pm$ 7,07 ^{ade}
Izofluran 6 h (S6)	22,24 $\pm$ 5,71 ^{abce}	0,94 $\pm$ 0,82 ^{abc}	8,01 $\pm$ 6,41 ^{abce}
Izofluran 24 h (S24)	20,85 $\pm$ 5,52 ^{abcd}	1,02 $\pm$ 0,72 ^{abc}	9,36 $\pm$ 6,09 ^{abcd}

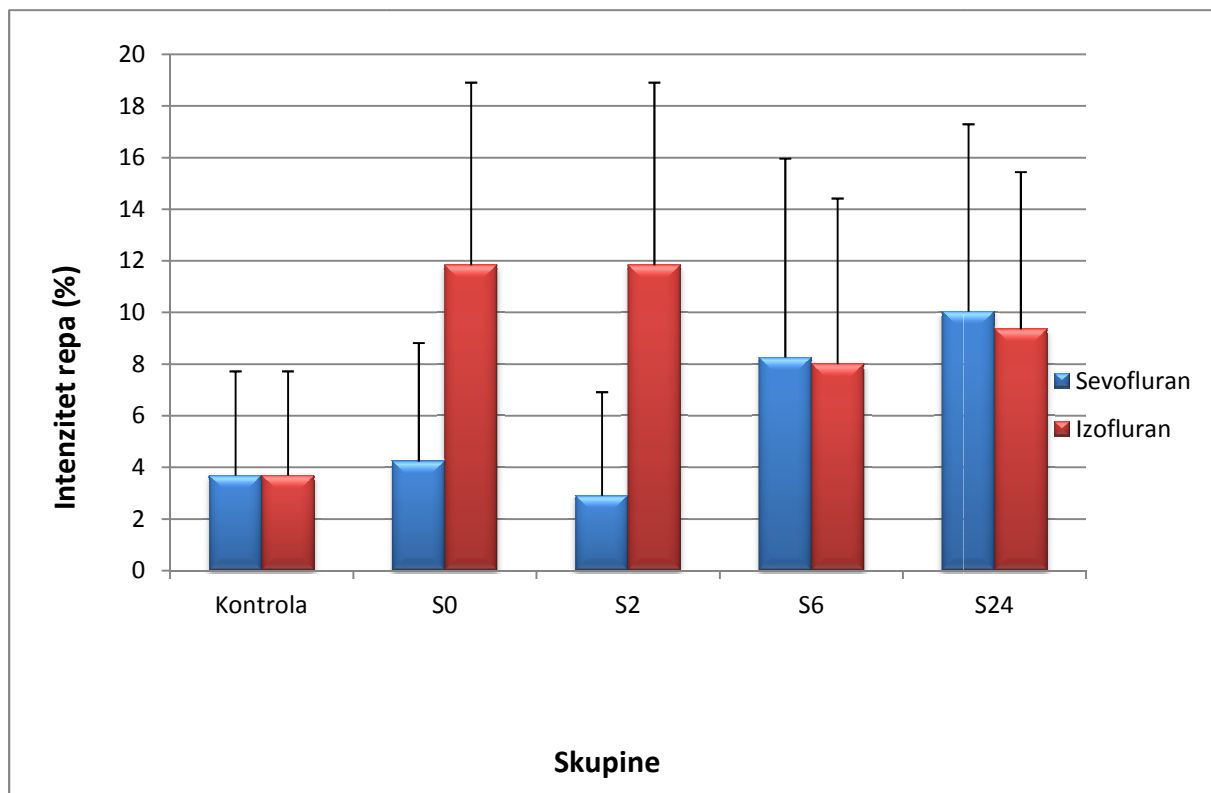
Mala slova obilježavaju značajne razlike ($P < 0,05$) za :^a kontrolu; ^b skupinu S0; ^c skupinu S2; ^d skupinu S6; ^e skupinu S24.



Slika 6. Učinak inhalacijskih anestetika sevoflurana i izoflurana na oštećenje DNA stanica bubrega miševa Swiss albino. Rezultati komet testa prikazani su kao prosječne vrijednosti dužine repa kometa + SD.



Slika 7. Učinak inhalacijskih anestetika sevoflurana i izoflurana na oštećenje DNA stanica bubrega miševa Swiss albino. Rezultati komet testa prikazani su kao prosječne vrijednosti repnog momenta + SD.



Slika 8. Učinak inhalacijskih anestetika sevoflurana i izoflurana na oštećenje DNA stanica bubrega miševa Swiss albino. Rezultati komet testa prikazani su kao prosječne vrijednosti intenziteta repa + SD.

5 RASPRAVA

Mnogi lijekovi i okolišni čimbenici mogu oštetiti DNA te je stoga važno razumjeti i predvidjeti posljedice izloženosti agensima koji oštećuju DNA. Složeno uzajamno djelovanje između brojnih staničnih puteva koji utječu na oštećenje i popravak DNA određuju konačne biološke posljedice izlaganja.

Česti primjer u kliničkoj praksi je opetovano izlaganje bolesnika djelovanju inhalacijskih anestetika. Osoblje koje radi u operacijskim dvoranama također je izloženo inhalacijskim anestheticama. Dokazan je povećani broj kromosomskih aberacija, kao i povećana učestalost izmjene sestrinskih kromatida kod osoblja u operacijskim salama u uvjetima izloženosti anestheticima (Karelova i sur., 1992; Lamberti i sur., 1989). Iz navedenih razloga važno je utvrditi genotoksičnost i citotoksičnost na stanice i tkiva kod višekratnog izlaganja tim agensima. Istraživanja koja su provedena na ljudima ne daju pravu sliku obzirom na razlike u dobi, spolu, životnim navikama, izloženosti drugim genotoksičnim tvarima. Dosadašnja istraživanja na staničnim kulturama pokazuju da inhalacijski anestetici mogu imati drugačiji utjecaj u *in vivo* uvjetima (Bazin i sur., 2004). Podaci o genotoksičnosti sevoflurana i izoflurana još uvijek su nedovoljni. Szyfter i suradnici (2004) zaključili su da sevofluran nema genotoksična svojstva *in vivo* i *in vitro*. Baden i sur. u radu na Swiss/Webster miševima zaključili su da izofluran nije toksičan, i da nema kancerogen učinak. Neki su drugi autori, međutim, dokazali genotoksičnost sevoflurana i izoflurana na periferalne krvne stanice kod izloženih medicinskih radnika te kod različitih tipova stanica miševa Swiss albino (Brozovic i sur., 2008; Rozgaj i sur., 2009). Istraživanjem provedenim na osoblju koje radi u operacijskim salama utvrđeno je da visoka koncentracija anestetika djeluje genotoksično, tj. dolazi do povećanog stvaranja mikronukleusa (Wiesner i sur., 2008). Citogenetske promjene u stanicama bubrega štakora nakon izlaganja različitim inhalacijskim anestheticima *in vivo* i *in vitro* dokazana su u istraživanju Robbiana i sur. te je dokazana genotoksičnost (Robbiano i sur., 1998).

Cilj ovog rada bio je istražiti genotoksični utjecaj sevoflurana i izoflurana na stanice bubrega miša Swiss albino kod ponavljajuće izloženosti ovim inhalacijskim anestheticima. Primijenili smo komet test kao posebno korisnu metodu u praćenju

opsega oštećenja DNA, kao i popravka DNA, nakon kratkotrajne ponavljajuće izloženosti niskim dozama toksina ili farmaceutika. Alkalijski komet test detektira mješavinu lezija – jednostruke i dvostruke lančane lomove, AP mjesta, međuproizvode popravka te, u slučaju razmnožavajućih stanica, i lomove povezane s replikacijom (Dusinska i Collins, 2008). Rezultati su pokazali statistički značajan porast u srednjim TL, TM i TI vrijednostima u usporedbi s kontrolom za oba ispitivana anestetika.

Oštećenje DNA opaženo je dva sata nakon izlaganja sevofluranu i bilo je u kontinuiranom porastu do 24 sata kada je bilo najveće. Premda sevofluran ima nisku topljivost u krvi i tkivu i metabolizira se u slobodni fluorid i heksafluoroizopropanol (HFIP), koji se brzo glukuronira i izbacuje putem urina (Kharasch, 1995), oko 5% udahnutog sevoflurana se metabolizira u jetri putem citokroma P450, posebno putem izoenzima 2E1 te poglavito u oksidativnom putu. Uzimajući u obzir da se značajno oštećenje DNA u stanicama bubrega dogodilo nakon 6 sati, može se zaključiti da je to vrijeme potrebno za biotransformaciju sevoflurana. Nakupljanje ostataka različitih metabolita sevoflurana i inhibicija procesa popravka tijekom tog vremena mogu objasniti više TL vrijednosti u stanicama bubrega, koje su pokazale kontinuiran porast u razini oštećenja DNA do 24 sata nakon izlaganja, kad je oštećenje DNA bilo najveće ($P < 0,05$ prema kontroli, S0, S2 i S6). Nadalje, porast oštećenja nakon 24 sata moguće je objasniti i učinkom oštećenih stanica na susjedne zdrave stanice, tzv. „bystander efektom“. Bystander efekt nastaje uslijed međustanične komunikacije, pri čemu stanice koje nisu bile izravno pod djelovanjem citotoksičnog spoja bivaju oštećene uslijed čimbenika koje oštećene stanice otpuštaju u medij ili putem pukotinskih pora. Bystender efekt može nastati uslijed izlaganja reaktivnim kisikovim vrstama (Azzam i sur., 2006).

Izlaganje izofluranu uzrokovalo je oštećenje DNA odmah nakon izlaganja. Maksimalno oštećenje opaženo je dva sata nakon izlaganja, a zatim se smanjilo. Oštećenje koje smo mi mjerili u stanicama bubrega predstavlja dinamičko ravnotežno stanje ('steady state'), s ravnotežom između unosa i uklanjanja (popravka). Treba imati na umu da se oštećenja DNA prije svega sastoje od prolaznih lezija. To objašnjava niže TL, TM i TI vrijednosti u skupini S6 i S24 koje ukazuju da funkcionira mehanizam popravka u bubrezima. Razlog zbog kojeg je maksimalno oštećenje opaženo nakon 2 sata, vjerojatno je posljedica brze eliminacije izoflurana izdisajem

nakon anestezije. Izofluran se se samo u malom dijelu (0,2%) metabolizira putem citokroma P450, te je stoga teško očekivati značajniji utjecaj metabolita na oštećenje DNA.

6 ZAKLJUČAK

- Ponavljajuća izloženost inhalacijskim anestheticima sevofluranu i izofluranu uzrokuje oštećenja DNA u stanicama bubrega miša Swiss albino.
- Oštećenja DNA kontinuirano se povećavaju unutar 24 sata nakon izlaganja sevofluranu, što se može objasniti njegovim metabolizmom i preostalim biotransformacijskim proizvodima, koji su i dalje prisutni u organizmu u razdoblju od 6 sati do 24 sata nakon izlaganja.
- Oštećenja DNA nakon izlaganja izofluranu najveća su 2 sata nakon izlaganja, nakon čega dolazi do popravka, što je vjerojatno posljedica njegove brze eliminacije iz organizma.
- Različito ponašanje dvaju anestetika vjerojatno je posljedica različite brzine eliminacije i stupnja metaboliziranja.

7 POPIS CITIRANE LITERATURE

Allauchiche, B., Debon, R., Goudable, J., Chassard, D., Duflo, F. (2001): Oxidative stress status during exposure to propofol, sevoflurane and deflurane. *Anesth. Analg* , 93, 981-985.

Altman, S. A., Zastawny, T. H., Randers-Eichhorn, L., Cacciuttolo, M. A., Akman, S. A., Dizdaroglu, M., i dr. (1995): Formation of DNA-protein cross-links in cultured mammalian cells upon treatment with iron ions. *Free Radic Biol Med* , 19 (6), 897-902.

Autrup, H. (2000): Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutat Res* , 464, 65-75.

Azzam, E. I., Little, S. M., B, J. (2006): Oxidative metabolism, gap junctions and the ionizing radiation-induced bystander effect. 22 (45).

Basel, R. C. (2008): Disposition of Toxic Drugs Chemicals in Man. Biomedical Publications.

Bazin, J., Constantin, J., Gindre, G. (2004): Laboratory animal anaesthesia: influence of anaesthetic protocols on experimental models. 23 (8), 811-8.

Bergendi, L., Beneš, L., Duračková, Z. (1999): Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* , 65, 1865-1874.

Betti, C., Davin, i. T., Gianess, i. L., Loprieno, N., R, B. (1994): Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat Res* , 375, 323-333.

Bezerra, F. J., Vale, N. B., Macedo, B. d., Rezende, A. A., Almeida, M. d. (2010): Evaluation of antioxidant parameters in eats treated with sevoflurane. *Rev. Bras. Anesthesiol* , 60, 162-5.

Brozovic, B., Orsolic, N., Knezevic, F., Horvat Knezevic, A., Benkovic, V., Vrdoljak, D., i dr. (2008): Evaluation of DNA damage in vivo induced by combined application of cisplatin and sevoflurane. *Eur J Anaesthesiol* , 25, 642-647.

C. Guyton, A., i E. Hall, J. (2006): Medicinska fiziologija. Medicinska naklada.

Caccese, D., Pratico, D., Ghiselli, A. (2000): Superoxide anion and hydroxyl radical release by collagen-induced platelet aggregation – role of arachidonic acid metabolism. *Thromb Haemost* , 83, 485-490.

Cantoni, O., Vascul, P. G. (1997): The role of DNA damage in the cytotoxic response to hydrogen peroxide/histidine. *Pharmacol* , 29 (4), 513-6.

Collins, A., Dobson, V., Dušinská, M., Kennedy, G., i Štetina, R. (1997): The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Res* , 375, 183-193.

Cooper, M. G. (2004): *The Cell: A Molecular Approach*, Third Edition.

Crane, D., Masters, C. (1984): On the role of catalase in the oxidation of tissue fatty acids. *Arch Biochem Biophys* , 229, 104-111.

Delogu, G., Moretti, S., Famularo, G., Antonucci, A., Signore, L., Marcellini, S., i dr. (2001): Circulating neutrophils exhibit enhanced apoptosis associated with mitochondrial dysfunctions after surgery under general anesthesia. *Acta Anesth. Scand* , 45, 87-94.

Duarte, V., Gasparutto, D., Jaquinod, M., Cadet, J. R. (2001): Repair and mutagenic potential of oxaluric acid, a major product of singlet oxygen-mediated oxidation of 8-oxo-7,8-dihydroguanine. *Chem Res Toxicol* , 14 (1), 46-52.

Dusinska, M., Collins, A. (2008): The comet assay in human biomonitoring: gene–environment interactions. *Mutagenesis* , 23, 191–205.

Eger 2th, E., White, A., Brown, C., Biava, C., Corbett, T., Stevens, W. (1978): test of the carcinogenicity of enflurane, isoflurane, halothane, methoxyflurane, and nitrous oxide in mice. *Anest analg* , 57, 678-94.

Fairbairn, D., Olive, P., O'Neill, K. (1995): The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* , 566, 209-29.

Fulton, D., McGiff, J., Wolin, M. (1997): Evidence against cytochrome P450-derived reactive oxygen species as the mediator of the nitric oxide-independent vasodilator effect of bradykinin in the perfused heart of th rat. *J Pharm Exp Therap* , 280, 702-709.

Garaj-Vrhovac, V., Kopjar, N. (1998): The comet assay-a new technique for detection of DNA damage in genetic toxicology studies and human biomonitoring. *Period Biol* , 100 (3), 361-366.

Gerschman, R., Gilbert, D. L., Nye, S. W., Dwyer, P., Fenn, W. O. (1954): Oxygen Poisoning and X-irradiation: A Mechanism in Common. *Science* , 119, 623-626.

Hah, S. S., Kim, H. M., Sumbad, R. A., Bioorg, P. T. (2005): Hydantoin derivative formation from oxidation of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) and incorporation of ¹⁴C-labeled 8-oxodG into the DNA of human breast cancer cells. *Med Chem Let* , 15, 3627-31.

Halliwell, B. (1995) *Active oxygen in biochemistry*. London: Blackie AcademicProfessional.

Halliwell, B. (1995): Oxygen radicals, nitric oxide and human inflammatory joint disease. *Annal Rheumatic Dis* , 54, 505-510.

Halliwell, B., M.C.Gutteridge, J. (2007): Free Radical Biology and Medicine (4th ed.). Oxford.

Hanouz, J., Zhu, L., Lemoine, S., Durand, C., Lepage, O., Massett, i. M., i dr. (2007): Reactive oxygen species mediate sevoflurane- and desflurane-induced preconditioning in isolated human right atria in vitro . *Anesth Analg* , 105, 1534-9.

Henderson, J. P., J Byun, M. V., McCormick, M. L., Parks, W. C., Ridnour, L. A., Natl, J. W. (2001): Bromination of deoxycytidine by eosinophil peroxidase: a mechanism for mutagenesis by oxidative damage of nucleotide precursors. *Acad Sci U S A* , 94 (4), 1631-6.

Huie, R., Padmaja, S. (1993): The reaction of NO with superoxide. *Free Rad Res Commun* , 18, 195-199.

Ihtiyar, E., Algin, C., Haciolu, A., Isiksoy, S. (2006): Fatal isoflurane hepatotoxicity without re-exposure. *Indian J Gastroenterol* , 25 (1), 41-2.

Il Eger, E., Ionescu, P., Gong, D. (1998): Circuit absorption of halothane, isoflurane and sevoflurane. *Anesth Analg* , 86, 1070-4.

JagetiaGC, N. (2000): Effect of doxorubicin on cell survival and micronuclei formation in HeLa cells exposed to different doses of gamma-radiation. *Strahlenther Onkol* , 176, 422–428.

Karelova, J., Jablonicka, A., Gavora, J., Hano, L. (1992): Chromosome and sister-chromatid exchange analysis in peripheral lymphocytes, and mutagenicity of urine in anesthesiology personnel. *Int Arch Occup Environ Health* , 64 (4), 303-6.

Kenna, J., Jones, R. (1995): The organ toxicity of inhalation anaesthetics. *Anaesth Analg* , 81, S51-66.

Kevin, L., Novalija, E., Riess, M. (2003): Sevoflurane exposure generates superoxide but leads to decreased superoxide during ischemia and reperfusion in isolated hearts. *Anesth. Analg* , 96, 949-955.

Kharasch, E. (1995): Biotransformation of sevoflurane. *Anesth Analg* , 81, Supplement 6, 27–38.

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

Kharasch, E., Thummel, K. (1993): Identification of cytochrome P450 2E1 as the predominant enzyme catalyzing human liver microsomal defluorination of sevoflurane, isoflurane, and methoxyflurane. *Anesthesiology* , 79 (4), 795-807.

Knight, J. (2000): Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann Clin Lab Sci* , 30, 145-158.

- Lamberti, L., Bigatti, P., Ardito, G., Armellino, F. (1989): Chromosome analysis in operating room personnel. *Mutagenesis* , 4 (2), 95-7.
- Lee, H., Wei, Y. (2007): Mitochondrial role in life and death of the cell. *J Biomed Sci* , 7, 2-15.
- Marinovic, J., Bosnjak, Z., Stadnicka, A. (2006): Distinct roles for sarcolemmal and mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in isoflurane-induced protection against oxidative stress. *Anesthesiology* , 105, 98-104.
- Matsuoka, H., Kurosawa, S., Horinouchi, T., Kato, M., Hashimoto, Y. (2001): Inhalation anesthetics induce apoptosis in normal peripheral lymphocytes in vitro. *Anesthesiology* , 95, 1467-1472.
- Moncada, S., Higgs, A. (1993): The L-arginine-nitric oxide pathway. *New Eng J Med* , 329, 2002-2011.
- Müller, W., Bauch, T., Streffer, C., Niedereichholz, F., Böcker, W. (1994): Comet assay studies of radiation-induced DNA damage and repair in various tumor cell lines. *Int J Radiat Biol* , 65 (3), 315-319.
- Nebert, D., M, I.-S., AK, D. (1999): Genetic epidemiology of environmental toxicity and cancer susceptibility: human allelic polymorphisms in drug metabolizing enzyme genes, their functional importance, and nomenclature issues. *Drug Metabol Rev* , 31 (2), 467-487.
- Njoku, D., Laster, M., Gong, D., 2nd Eger, E., Reed, G., Martin, J. (1997): Biotransformation of halothane, enflurane, isoflurane, and desflurane to trifluoroacetylated liver proteins: association between protein acylation and hepatic injury. *Anesth Analg* , 84 (1), 173-8.
- Olive, P. (1999): DNA damage and repair in individual cells: application of the comet assay in radiobiology. *Int J Radiat Biol* , 75 (4), 395-405.
- Olive, P., Banáth, J., RE, D. (1990): Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the "comet assay". *Radiat Res* , 122, 86-94.
- Plappert, U., Raddatz, K., Roth, S., Fliedner, T. (1995): DNA damage detection in man after radiation exposure-the comet assay-its possible application for human monitoring. *Stem Cells* , 13 (1), 215-222.
- Rendic, S. (2002): Summary of information on human CYP enzymes Human P450 Metabolism Data. *Drug Metab Rev* , 34 (1-2), 83-488.
- Rendic, S., DiCarlo, F. (1997): Human Cytochrome P450 Enzymes: A Status Report Summarizing Their Reactions, Substrates, Inducers and Inhibitors. *Drug Metab Rev* , 29, 413-580.

Riess, M., Kevin, L., McCormick, J. (2005): Anesthetic preconditioning: the role of free radicals in sevoflurane-induced attenuation of mitochondrial electron transport in Guinea pig isolated hearts. *Anesth Analg* , 100, 46-53.

Riess, M., Kevin, L., McCormick, J., Jiang, M., Rhodes, S., Stowe, D. (2005): Anesthetic preconditioning: the role of free radicals in sevoflurane-induced attenuation of mitochondrial electron transport in Guinea pig isolated hearts. *Anesth Analg* , 100, 46-53.

Robbiano, L., Mereto, E., Migliazzi Morando, A., Pastore, P., Brambilla, G. (1998): Increased frequency of micronucleated kidney cells in rats exposed to halogenated anaesthetics. *Mutat Res* , 413 (1), 1-6.

Rozgaj, R., Kasuba, V., Brozović, G., Jazbec, A. (2009): Genotoxic effects of anaesthetics in operating theatre personnel evaluated by the comet assay and micronucleus test. *Int J Hyg Environ Health* , 212, 11-17.

Rzeuski, R., Chlubek, D., Machoy, Z. (1998): Interactions between fluoride and biological free radical reactions. *Fluoride* , 31, 43-45.

Sardas, S., Karabiyik, L., Aygun, N., Karakaya, A. (1998): DNA damage evaluated by the alkaline comet assay in lymphocytes of humans anaesthetized with isoflurane. *Mutat Res* , 418 (1), 1-6.

Sato, N., Fujil, K., Yuge, O. (1994): In vivo and in vitro sevoflurane-induced lipid peroxidation in guinea-pig liver microsomes. *Pharmacol Toxicol* , 75, 366-370.

Siems, W., Sommerburg, O., Mayer, H., Grune, T. (1998): Die wichtigsten Radikalquellen in menschlichen Organismus. *Pharm Ztg* , 143, 11-25.

Singh, N., Mc Coy, M., Tice, R., Schneider, EL. (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* , 175, 184-191.

Singh, N., McCoy, M., Tice, R., EL, S. (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* , 175, 184–191.

Spencer, J. P., Whiteman, M., Jenner, A., Halliwell, B. (2000): Nitrite-induced deamination and hypochlorite-induced oxidation of DNA in intact human respiratory tract epithelial cells. *Free Radic Biol Med* , 28 (7), 1039-50.

Stryer, L. (1995): *Biochemistry*. W.H. Freeman.

Szyfter, K., Szulc, R., Mikstacki, A., Stachecki, I., Rydzanicz, M., Jaoszyński, P. (2004): Genotoxicity of inhalation anaesthetics: DNA lesions generated by sevoflurane in vitro and in vivo. *J Appl Genet* , 45, 369–374.

- Tanaka, K., Weihrauch, D., Kehl, F., Ludwig, L., LaDisa, J. J., Kersten, J., i dr. (2002): Mechanism of preconditioning by isoflurane in rabbits: a direct role for reactive oxygen species. *Anesthesiology* , 97, 1485-90.
- Tanaka, K., Weihrauch, D., Ludwig, L., Kersten, J., Pagel, P., Warltier, D. (2003): Mitochondrial adenosine triphosphate-regulated potassium channel opening acts as a trigger for isoflurane-induced preconditioning by generating reactive oxygen species. *Anesthesiology* , 98, 935-43.
- Tice, R., Agerell, E., sur., A. D. (2000): The single cell gel / comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* , 35, 206-221.
- Toshiaki, N. H., Ohyama, Y., Suzuki, T., Makino, K., J, H. I. (2003): DNA-protein cross-link formation mediated by oxanine. A novel genotoxic mechanism of nitric oxide-induced DNA damage. *J Biol Chem* , 278 (27), 25264-72.
- Toyokuni, S., Mori, T., Dizdaroglu, M. (1995): Treatment of wistar rats with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate, causes dna-protein cross-linking between thymine and tyrosine in their renal chromatin. *International journal of cancer* , 62, 309.
- Tsuchiya, M., Asada, A., Maeda, K., Ueda, Y., Sato, E., Shindo, M., i dr. (2001): Propofol versus midazolam regarding their antioxidant activity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* , 163, 26-31.
- Türkan, H., Aydin, A., Sayal, A. (2005): Effect of volatile anesthetics on oxidative stress due to occupational exposure. *World J Surg* , 29, 540-542.
- Valinluck, V., Tsai, H.-H., Rogstad, D. K., Burdzy, A., Bird, A., Sowers, L. C. (2004): Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res* , 32 (14), 4100-8.
- Walton B, Simpson BR, Strunin L, Doniach D, Perrin J, Appleyard AJ (1976): Unexplained hepatitis following halothane. *Br Med J* , 1, 1171-1176
- Wiesner, G., Schiewe-Langgartner, F., Lindner, R., Gruber, M. (2008): Increased formation of sister chromatid exchanges, but not of micronuclei, in anaesthetists exposed to low levels of sevoflurane. *Anaesthesia* , 63, 861–864.
- Wong, C., Liu, T., Chye, S., Lu, F., Liu, Y., Lin, Z., i dr. (2006): Sevoflurane-induced oxidative stress and cellular injury in human peripheral polymorphonuclear neutrophils. *Food Chem Toxicol* , 44, 1399–140.
- Zastawny, T. H., Altman, S. A., Randers-Eichhorn, L., Madurawe, R., Lumpkin, J. A., Dizdaroglu, M., i dr. (1995): DNA base modifications and membrane damage in cultured mammalian cells treated with iron ions. *Free Radic Biol Med* , 18 (6), 1013-22.

Zhang, D., Chen, Y., Campbell, W., Zou, A., Gross, G., Li, P. (2001): Characteristics and superoxide-induced activation of reconstituted myocardial mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res* , 89, 1177-83.

Zhao, K., Whiteman, M., Spencer, J. P., Halliwell, B. (2001): DNA damage by nitrite and peroxynitrite: protection by dietary phenols. *Methods Enzymol* , 335, 296-307.