

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prirodoslovno - matematički fakultet**  
**Biološki odsjek**

**PROMJENE OKSIDACIJSKO-REDUKCIJSKOG STATUSA TKIVA I  
ORGANA U ŠTAKORA NAKON IZLAGANJA SEVOFLURANU I  
ALUMINIJEVOM KLORIDU**

**Lydia Gaćina**

**Zagreb 2018.**

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za Animalnu fiziologiju 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 magistra eksperimentalne biologije.

*Mojoj dragoj profesorici, dr. sc. Nadi Oršolić velika hvala na strpljenju, razumijevanju, podršci i svakoj toploj riječi prilikom izrade ovog diplomskog rada.*

*Hvala i asistentici Dyani Odeh, koja me vodila kroz pisanje većeg dijela ovog rada. Naše dogodovštine tijekom mjerenja i analize podataka – lijepe ili ne – pamtiti ću dok sam živa.*

*Zahvaljujem prof. dr. sc. Domagoju Đikiću na pruženoj prilici i ukazanom povjerenju.*

*Zahvaljujem i asistentu Vedranu Balti uz čiji sam rad učila i usavršavala eksperimentalni dio vezan uz ovaj rad.*

*Zahvaljujem i svim profesorima i djelatnicima Zavodu za animalnu fiziologiju na pomoći i konstruktivnim savjetima, a posebno tehničarima Mariji Potočić i Hrvoju Jedvaj, koji su uvijek bili strpljivi i uslužni, te mi tako olakšali rad u laboratoriju.*

*Hvala mojim roditeljima, mome tati Vojku na podršci i svakom ispričanom vicu u tijeku mog akademskog školovanja, i mojoj mami Ivanki na razumijevanju i neizmjernoj ljubavi. Hvala i mojoj sestri Aniti na uveseljavanju i svemu što mi je pružila.*

*Mojim prijateljima, hvala vam na pomoći prilikom izvedbe eksperimentalnog dijela ovog rada i potpori u svim aspektima života.*

*Hvala i mom Dariju na motivaciji i vjerovanju u mene kada mi je to najviše trebalo.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

### PROMJENE OKSIDACIJSKO-REDUKCIJSKOG STATUSA TKIVA I ORGANA U ŠTAKORA NAKON IZLAGANJA SEVOFLURANU I ALUMINIJEVOM KLORIDU

Lydia Gaćina

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Inhalacijski se anestetici primjenjuju za uvod u anesteziju ili za održavanje anestezije. Glavni mehanizmi toksičnosti anestetika uključuju unutarstaničnu akumulaciju metabolita, stvaranje haptena te stvaranje slobodnih radikala. Aluminijski je prooksidans i uzrokuje oksidacijski stres (OS) sam ili u nazočnosti željeza. Visoka razina aluminijske uzrokuje neurotoksičnost, nefrotoksičnost i hepatotoksičnost. Temeljem navedenog cilja rada bio je istražiti: a) antioksidacijski/prooksidacijski učinak sevoflurana na  $\text{AlCl}_3$  izazvani oksidacijski stres praćenjem promjena u oksido-redukcijskom statusu u stanicama perifernih organa jetre, slezene, bubrega i pluća mjerenjem razine malondialdehida (MDA), krajnjeg produkta lipidne peroksidacije, glutationa (GSH), te aktivnosti enzima katalaze (CAT) i superoksid dismutaze (SOD); b) procijeniti razinu upale, mjerenjem relativne težine perifernih organa u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu; c) analizom promjene tjelesne težine, biokemijskih pokazatelja krvi i osmotske fragilnosti eritrocita kao pokazatelja oštećenja stanica i tkiva i cjelokupnog organizma. Rezultati ukazuju kako sevofluran i  $\text{AlCl}_3$  primjenjeni sami ili u kombinaciji imaju najveći prooksidacijski i proupalni učinak na jetru i bubreg, dok u tkivu pluća i slezene ovaj učinak nije zamjećen. Razinu oštećenja i toksičnost sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  potvrđuju i manje promjene u tjelesnoj težini životinja, biokemijskim parametrima, posebice u ALP, ALT, amilazi i razini fosfora te osmotska fragilnost eritrocita.

(90 stranica, 40 slika, 6 tablica, 109 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Centralnoj biološkoj biblioteci Prirodoslovno - matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb, Hrvatska.

Ključne riječi: sevofluran,  $\text{AlCl}_3$ , oksidacijski stres, upala

Voditelj: prof. dr.sc. Nada Oršolić

Ocjenitelji:

Rad prihvaćen:

## **BACIS DOCUMENTATION CARD**

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Division of Biology

Graduation Thesis

### CHANGES IN THE OXIDATION-REDUCTION STATUS IN RAT TISSUE AND ORGANS AFTER BEING EXPOSED TO SEVOFLURANE AND ALUMINIUM CHLORIDE

Lydia Gaćina

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Inhalational anesthetics are used for induction or maintaining anesthesia. Main mechanisms of anesthetic toxicity include intracellular accumulation of metabolites, hapten generation and free radical formation. Aluminium is a prooxidant and can cause oxidative stress (OS) alone, or in the presence of iron. High levels of aluminium cause neurotoxicity, nephrotoxicity and hepatotoxicity. The aim of this study was to investigate: a) the antioxidant/prooxidative effect of sevoflurane on  $\text{AlCl}_3$  induced oxidative stress by observing changes in the oxido-reduction status in the peripheral organs liver, spleen, kidney and lung by measuring the level of malondialdehyde (MDA), the final product of lipid peroxidation, glutathione (GSH), and catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) enzyme activity; b) estimate the level of inflammation by measuring the relative weight of peripheral organs in relation to the healthy control group; c) analysis of body weight changes, biochemical blood indicators, and osmotic fragility of erythrocytes as indicators of cell and tissue damage and of the entire organism. The results indicate that sevoflurane and  $\text{AlCl}_3$  alone or in combination have the highest prooxidative and proinflammatory effects on liver and kidney, while this effect wasn't observed in lung and spleen tissue. Minor changes in animal body weight, biochemical parameters, especially in ALP, ALT, amylase and phosphorus levels and osmotic fragility of erythrocytes also confirm sevoflurane and  $\text{AlCl}_3$  extent of damage and toxicity.

(90 pages, 40 figures, 6 tables, 109 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia.

Key words: sevoflurane,  $\text{AlCl}_3$ , oxidative stress, inflammation

Supervisor: prof. dr.sc. Nada Oršolić

Reviewers:

Thesis accepted:

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. INHALACIJSKI ANESTETICI</b> .....	<b>1</b>
1.1.1. OKSIDACIJSKI STRES U MOZGU IZAZVAN INHALACIJSKIM ANESTETICIMA.....	1
1.1.2. NEUROPROTEKTIVNI UTJECAJ ANESTETIKA .....	3
1.1.3. KARDIOPROTEKTIVNI UTJECAJ ANESTETIKA .....	4
1.1.4. SEVOFLURAN .....	6
1.1.4.1. Utjecaj sevoflurana na apoptozu .....	6
1.1.4.2. Genotoksičnost sevoflurana.....	7
1.1.4.3. Oštećenja perifernih tkiva i organa uzrokovana sevofluranom – animalni modeli .....	8
1.1.4.4. Utjecaj sevoflurana na tkiva i stanične linije kod ljudi .....	9
1.1.4.5. Zaštitni učinak sevoflurana.....	10
<b>1.2. UTJECAJ ALUMINIJA</b> .....	<b>12</b>
1.2.1. DOSTUPNOST ALUMINIJA.....	13
1.2.2. TOKSIČNOST ALUMINIJA.....	14
1.2.2.1. Genotoksičnost aluminija .....	14
1.2.3. ALUMINIJ UZROKUJE NEUROTOKSIČNOST I NEURODEGENERATIVNE BOLESTI .....	15
1.2.4. ALUMINIJ IZAZIVA OKSIDACIJSKI STRES U PERIFERNIM TKIVIMA I ORGANIMA ŠTAKORA .....	17
<b>1.3. OKSIDACIJSKI STRES</b> .....	<b>20</b>
1.3.1. REAKTIVNI SPOJEVI KISIKA (ROS) I DUŠIKA (RNS).....	20
1.3.2. PRIRODNI ANTIOKSIDANSI.....	22
1.3.3. UTJECAJ OKSIDACIJSKOG STRESA NA STANIČNE STRUKTURE .....	24
1.3.4. OKSIDACIJSKI STRES IZAZIVA APOPTOZU STANICA.....	26
1.3.4.1. Oksidacijski stres i mitohondriji.....	27
<b>1.4. CILJ RADA</b> .....	<b>30</b>
<b>2. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>31</b>
<b>2.1. MATERIJALI</b> .....	<b>31</b>
2.1.1. POKUSNE ŽIVOTINJE .....	31

2.1.2. KEMIJSKI SPOJEVI.....	31
2.1.2.1. Sevofluran .....	31
2.1.2.2. Aluminijev klorid 6-hidrat.....	31
2.1.2.3. D - galaktoza .....	32
2.1.2.4. Priprema aluminijevog klorida .....	32
2.1.3. LABORATORIJSKA OPREMA .....	32
<b>2.2. METODE .....</b>	<b>32</b>
2.2.1. PRAĆENJE PROMJENA TJELESNE MASE .....	32
2.2.1.1. Relativni indeks težine organa.....	32
2.2.2. OBRADA ŽIVOTINJA .....	33
2.2.3. IZOLACIJA I PRIPREMA TKIVA .....	34
2.2.4. ODREĐIVANJE PARAMETARA OKSIDACIJSKOG STRESA .....	34
2.2.4.1. Određivanje proteina metodom po Lowry-u .....	34
2.2.4.2. Mjerenje razine lipidne peroksidacije .....	35
2.2.4.3. Mjerenje razine ukupnog glutaciona (GSH) .....	36
2.2.4.4. Mjerenje enzimatske aktivnosti katalaze .....	37
2.2.4.5. Mjerenje enzimatske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD).....	37
2.2.5. ANALIZA BIOKEMIJSKIH PARAMETARA .....	38
2.2.6. OSMOTSKA OTPORNOST ERITROCITA .....	38
2.2.7. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA .....	39
<b>3. REZULTATI.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1. PROMJENA TEŽINE ŠTAKORA.....</b>	<b>40</b>
3.1.1. RELATIVNI INDEKS JETRE .....	41
3.1.2. RELATIVNI INDEKS SLEZENE.....	42
3.1.3. RELATIVNI INDEKS PLUĆA .....	43
3.1.4. RELATIVNI INDEKS BUBREGA .....	44
<b>3.2. OKSIDACIJSKI STRES U PERIFERNIM TKIVIMA ORGANA ŠTAKORA .....</b>	<b>45</b>
3.2.1. UKUPNI PROTEINI U UZORCIMA TKIVA JETRE ŠTAKORA.....	45
3.2.2. MJERENJE RAZINE LIPIDNE PEROKSIDACIJE (MDA) U UZORCIMA TKIVA JETRE ŠTAKORA .....	46
3.2.3. MJERENJE RAZINE UKUPNOG GLUTATIONA (GSH) U UZORCIMA TKIVA JETRE ŠTAKORA.....	47

3.2.4. MJERENJE ENZIMSKE AKTIVNOSTI KATALAZE (CAT) U UZORCIMA TKIVA JETRE ŠTAKORA .....	48
3.2.5. MJERENJE ENZIMSKE AKTIVNOSTI SUPEROKSID DIZMUTAZE (SOD) U UZORCIMA JETRE ŠTAKORA .....	49
3.2.6. UKUPNI PROTEINI U UZORCIMA TKIVA SLEZENE ŠTAKORA .....	50
3.2.7. MJERENJE RAZINE LIPIDNE PEROKSIDACIJE (MDA) U UZORCIMA TKIVA SLEZENE ŠTAKORA ....	51
3.2.8. MJERENJE RAZINE UKUPNOG GLUTATIONA (GSH) U UZORCIMA TKIVA SLEZENE ŠTAKORA .....	52
3.2.9. MJERENJE ENZIMSKE AKTIVNOSTI KATALAZE (CAT) U UZORCIMA TKIVA SLEZENE ŠTAKORA..	53
3.2.10. MJERENJE ENZIMSKE AKTIVNOSTI SUPEROKSID DIZMUTAZE (SOD) U UZORCIMA SLEZENE ŠTAKORA .....	54
3.2.11. UKUPNI PROTEINI U UZORCIMA TKIVA PLUĆA ŠTAKORA.....	55
3.2.12. MJERENJE RAZINE LIPIDNE PEROKSIDACIJE (MDA) U UZORCIMA TKIVA PLUĆA ŠTAKORA.....	56
3.2.13. MJERENJE RAZINE UKUPNOG GLUTATIONA (GSH) U UZORCIMA TKIVA PLUĆA ŠTAKORA .....	57
3.2.14. MJERENJE ENZIMSKE AKTIVNOSTI KATALAZE (CAT) U UZORCIMA TKIVA PLUĆA ŠTAKORA ...	58
3.2.15. MJERENJE ENZIMSKE AKTIVNOSTI SUPEROKSID DIZMUTAZE (SOD) U UZORCIMA PLUĆA ŠTAKORA .....	59
3.2.16. UKUPNI PROTEINI U UZORCIMA TKIVA BUBREGA ŠTAKORA.....	60
3.2.17. MJERENJE RAZINE LIPIDNE PEROKSIDACIJE (MDA) U UZORCIMA TKIVA BUBREGA ŠTAKORA .	61
3.2.18. MJERENJE RAZINE UKUPNOG GLUTATIONA (GSH) U UZORCIMA TKIVA BUBREGA ŠTAKORA...	62
3.2.19. MJERENJE ENZIMSKE AKTIVNOSTI KATALAZE (CAT) U UZORCIMA TKIVA BUBREGA ŠTAKORA .....	63
3.2.20. MJERENJE ENZIMSKE AKTIVNOSTI SUPEROKSID DIZMUTAZE (SOD) U UZORCIMA BUBREGA ŠTAKORA .....	64
<b>3.3. ANALIZA BIOKEMIJSKIH PARAMETARA .....</b>	<b>65</b>
<b>3.4. OSMOTSKA FRAGILNOST ERITROCITA .....</b>	<b>68</b>
<b>4. RASPRAVA.....</b>	<b>69</b>
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>79</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>81</b>



POPIS KRATICA:

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

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

AK – aminokiselina (engl. *Aminoacid*)

Akt – protein kinaza B (engl. *Protein kinase B*)

ALB – albumin (engl. *Albumin*)

ALP – alkalna fosfataza (engl. *Alkaline phosphatase*)

ALT – alanin aminotransferaza (engl. *Alanine aminotransferase*)

AMP – adenzin monofosfat (engl. *Adenosine monophosphate*)

AMY – amilaza (engl. *Amylase*)

ANT – adenin nukleotid translokaza (engl. *Adenin nucleotide translocase*)

APC – anestetikom potaknuta prekondicioniranje (engl. *Anesthetic induced preconditioning*)

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

ATP – adenzin trifosfat (engl. *Adenosine Triphosphate*)

ATSDR – Agencija za otrovne tvari i registar bolesti (engl. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*)

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

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

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

BUN – dušik uree u krvi (engl. *Blood urea nitrogen*)

CA - kromosomske aberacije (engl. *Chromosomal aberrations*)

Caco-2 - karcinomu debelog crijeva (engl. *Colon carcinoma*)

CAT – katalaza (engl. *Catalase*)

CCPDK II – kalcij/kalmodulin – vezana protein kinaza II (engl. *Calcium/calmodulin-binding protein kinase II*)

cGMP – ciklični gvanozin monofosfat (engl. *Cyclic guanosine monophosphate*)

CRE – kreatinin (engl. *Creatinine*)

CREB - ciklični AMP vezni protein (engl. *Cyclic AMP response element binding protein*)

CO<sub>2</sub> – ugljikov dioksid (engl. *Carbon dioxide*)

CuZnSOD – citosolna superoksid dismutaza (engl. *Cytosol superoxide dismutase*)

CMR - moždani metabolizam (engl. *Cerebral metabolic rate*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *Deoxyribonucleic acid*)

EC – SOD – izvanstanična SOD (engl. *Extracellular SOD*)

EFSA – Europska agencija za sigurnost hrane (engl. *European Food Safety Authority*)

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

ERK – vanstanična signalom regulirana kinaza (engl. *Extracellular signal – regulated kinase*)

ETC – lanac elektrona (engl. *Electron transport chain*)

FAO - Organizacija za prehranu i poljoprivredu (engl. *Food and Agriculture Organization*)

FDA - Agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*)

FDVE - fluorometil-2,2-difluoro-1-(trifluorometil)-vinil eter (engl. *Fluoromethyl-2,2-difluoro-1-(trifluoromethyl)-vinyl ether*)

GABA– γ-aminomaslačna kiselina (engl. *γ-Aminobutyric acid*)

GDP – gvanozin disofat (engl. *Guanosine diphosphate*)

GLOB – globulin (engl. *Globuline*)

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

GS – glutamin sintaza (engl. *Glutamine synthase*)

GSH – glutation (engl. *Glutathione*)

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

GTP – gvanozin trifosfat (engl. *Guanosine triphosphate*)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – vodikov peroksid (engl. *Hydrogen peroxide*)

Hep-2 - karcinom grkljana (engl. *Larynx carcinoma*)

HFIP – heksafluoroisopropanol (engl. *Hexafluoroisopropanol*)

HO<sub>2</sub>• – hidroperoksilni radikal (engl. *Hydroperoxyl radical*)

HOCl – hipokloritna kiselina (engl. *Hypochlorite acid*)

HYP – hipoksija (engl. *Hypoxia*)

IκB – inhibitorni κB (engl. *Inhibitory κB*)

IL – interleukin (engl. *Interleukine*)

IP<sub>3</sub> - Inozitol-1,4,5-trifosfat (engl. *Inositol-1,4,5-triphosphate*)

IRP-2 – željezo regulirajući proteini (engl. *Iron regulatory proteins*)

JECFA – Zajednički stručni odbor FAO/WHO za prehrambene aditive (engl. *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*)

K<sup>+</sup> - kalijev ion (engl. *Potassium ion*)

K<sub>ATP</sub> – kalijev kanal (engl. *Potassium channel*)

LD<sub>50</sub> – letalna doza; standardna mjera toksičnosti tvari koja će ubiti pola obrađene populacije (engl. *Lethal dose*)

LO• - lipidni radikal (engl. *Lipid radical*)

LOO• - peroksilni radikal (engl. *Preoxyl radical*)

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

LOX – lipooksigenaza (engl. *Lipoxygenase*)

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

MDA – malondialdehid (engl. *Malondialdehyde*)

Mdm - 2 – engl. *Murine double minute 2 protein*

MI - metabolička inhibicija (engl. *Metabolic inhibition*)

MIA PaCa-2 – karcinom gušterače (engl. *Pancreatic carcinoma*)

MN – mikronukleus (engl. *Micronucleus*)

MnSOD – mitohondrijska SOD (engl. *Mitochondrial SOD*)

MTP – mitohondrijska tranzicijska pora (engl. *Mitochondrial transition pore*)

Na<sup>+</sup> - natrijev ion (engl. *Sodium ion*)

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

NF-κB – nuklearni čimbenik κB (engl. *Nuclear factor κB*)

NFT – unutar-neuralni neurofibrilarni čvorovi (engl. *Intranuronal neurofibrillary tangles*)

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

NO – dušikov oksid (engl. *Nitric oxide*)

NO<sub>2</sub> – dušikov (IV) oksid (engl. *Nitrogen dioxide*)

OH<sup>•</sup> – hidroksilni radikal (engl. *Hidroxy radical*)

<sup>1</sup>O<sub>2</sub> – singletni kisik (engl. *Singlet oxygen*)

O<sup>2-</sup> – superoksidni anion (engl. *Superoxide anion*)

ONOO<sup>-</sup> – peroksinitrit (engl. *Peroxynitrite*)

p38 MAPK – p38 mitogen-aktivirana kinaza (engl. *p38 mitogen-activated protein kinase*)

p53 – tumor supresor protein (engl. *Tumor suppressor protein*)

PCD – programirana stanična smrt (engl. *Programmed cell death*)

PHOS – fosfati (engl. *Phosphates*)

PI3K - fosfatidilinozitol-3-OH kinaza (engl. *Phosphatidylinositol-3-OH kinase*)

PKC – protein kinaza C (engl. *Protein kinase C*)

PLA<sub>2</sub> – fosfolipaza A<sub>2</sub> (engl. *Phospholipase A<sub>2</sub>*)

PLC - fosfolipaza C (engl. *Phospholipase C*)

PMN – polimorfonuklearni neutrofili (engl. *Polymorphonuclear neutrophils*)

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

rCBF - regionalni cerebralni protok krvi (engl. *Regional cerebral blood flow*)

RO• – alkoksilni radikal (engl. *Alkoxy radical*)

RO<sub>2</sub>• – peroksidni radikali (engl. *Peroxide radicals*)

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

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

SCCS - Znanstveni odbor za sigurnost potrošača (engl. *Scientific Committee on Consumer Safety*)

SCE - izmjena sestrinskih kromatida (engl. *Sister chromatid exchange*)

SCGE - gel elektroforeza pojedinačnih stanica (engl. *Single cell-gel electrophoresis*)

SH – sarc homologna domena (engl. *Sarc homology domain*)

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

SP – senilni plakovi (engl. *Senile plaques*)

SW-620 - slabo diferencirane stanice metastaza karcinoma debelog crijeva u limfnom čvoru (engl. *Poorly differentiated cells from lymph node metastasis of colon carcinoma*)

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

TBIL – ukupni bilirubin (engl. *Total bilirubin*)

TNR- $\alpha$  – tumor nekrosis faktor  $\alpha$  (engl. *Tumor necrosis factor  $\alpha$* )

TP – ukupni proteini (engl. *Total protein*)

VDAC – o voltaži ovisan anionski kanal (engl. *Voltage dependent anion channel*)

VEGF - krvožilni endotelni čimbenik rasta (engl. *Vascular endothelial growth factor*)

XOD – ksantin oksidaza (engl. *Xantin oxidase*)

WHO - Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World health organisation*)

WI-38 – stanična linija normalnih fibroblasta (engl. *Normal fibroblast cell line*)

# 1. UVOD

## 1.1. INHALACIJSKI ANESTETICI

Opća anestezija je jedno od najvećih dostignuća medicine; ona omogućava sigurno izvođenje zahtjevnih operacija, čak i kod jako mladih ili starih pacijenata. Ipak, ona nije bez rizika, a to je činjenica koju dnevno prihvaća velik broj oboljelih.

Inhalacijski se anestetici često primjenjuju za uvod ili održavanje anestezije, naročito kod zahtjevnijih i opsežnijih operacija. To su lako hlapljive tekućine koje u organizam ulaze disanjem, a zatim difuzijom kroz alveokapilarnu membranu prelaze u krvotok. Krvotokom se zatim dopremaju do središnjeg živčanog sustava i ostalih organa. Veći dio ovih anestetika se iz organizma uklanja respiracijom, međutim jedan se dio metabolizira u jetri putem obitelji citokrom oksidaza P-450 i izlučuje putem bubrega. Njihovi metaboliti mogu izazvati akutnu ili kroničnu toksičnost putem nekoliko mehanizama: 1) unutarstanično nakupljanje metabolita, 2) stvaranje haptena koji mogu dovesti do hiperosjetljivosti ili imunoreakcije, i 3) stvaranje reaktivnih metabolita koji se mogu kovalentno vezati za stanične makromolekule i stvarati slobodne radikale. Vezanje reaktivnih metabolita inhalacijskih anestetika za proteine tkiva, može uzrokovati formiranje haptent-protein konjugata. Nadalje, konjugati mogu voditi prema sintezi specifičnih protutijela i time prouzrokovati imunološki odgovor. U normalnim uvjetima, glutation i sulfhidril imaju funkciju staničnih antioksidansa koji konjugiraju slobodne radikale, dok u slučaju njihove nestašice štetan utjecaj slobodnih radikala dovodi do stanične smrti. Zbog lipofilne prirode inhalacijskih anestetika, do najvećeg oštećenja dolazi u lipidnim membranama stanica (Brozović i sur., 2006).

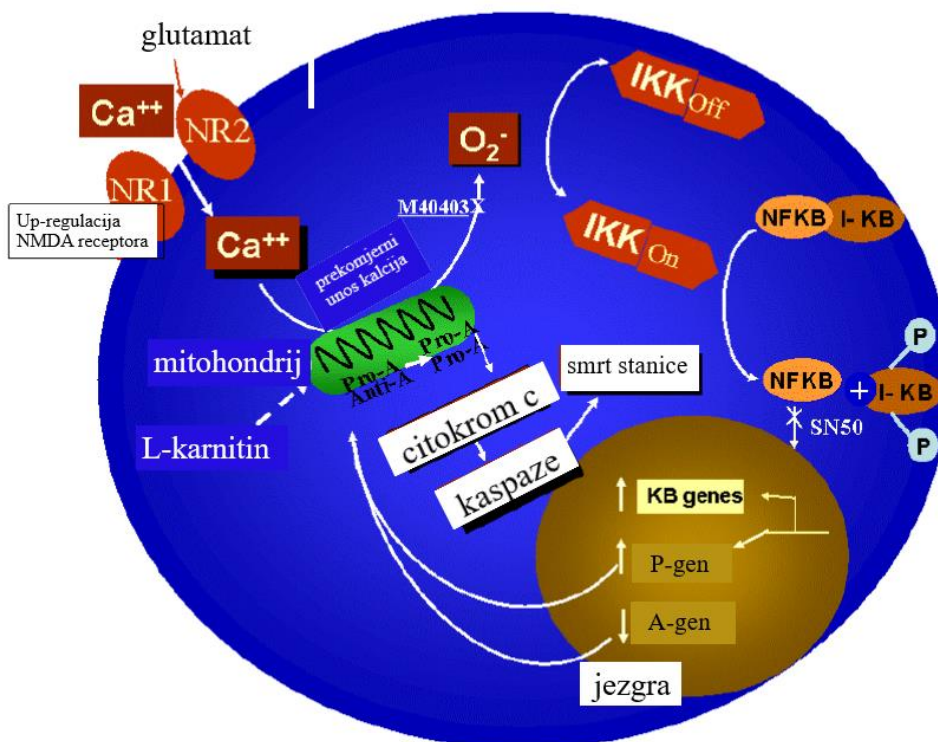
### **1.1.1. Oksidacijski stres u mozgu izazvan inhalacijskim anesticima**

Neurotoksičnost je definirana kao strukturna ili funkcionalna promjena živčanog sustava kao rezultat nekog kemijskog, biološkog ili fizičkog čimbenika. Ranjivost živčanog sustava je vrlo visoka u periodu razvoja, kada krvno-moždana barijera nije do kraja razvijena, kada je stopa neurogeneze i sinaptogeneze vrlo visoka, te neurotransmiteri imaju drukčiji učinak nego u odraslom mozgu, primjerice GABA ( $\gamma$ -aminomaslačna kiselina) je u periodu razvoja mozga ekscitacijski neurotransmiter i pored neurotransmisije regulira proliferaciju i diferencijaciju matičnih stanica. Osim rane faze razvoja mozga, mozak starih jedinki je također osjetljiv, iako iz drugih razloga. Mozak zrele jedinke, kao i mozak mlade jedinke,

sadrži nezrele stanice koje se mogu razviti u neurone i inkorporirati u neuronske krugove. Također sadrži i područja koja konstantno remodeliraju sinaptičke veze u vrlo dinamičkom procesu koji se zove sinaptička plastičnost i koji je temelj učenja i pamćenja. Mozak starih jedinki trpi štetu nastalu zbog starosti, kao što je smanjenje neurona, gubitak različitih neurotransmitera i receptora, niske stope neurogeneze i sinaptogeneze i akumulacija toksičnih nusproizvoda. Iz navedenih razloga, takav mozak ima smanjenu sposobnost kompenzacije, uslijed čega je, kao i mozak mladih jedinki, podložniji učinku neurotoksičnosti.

Inhalacijski anestetici su biološki i kemijski čimbenici koji imaju sposobnost uplitanja u neurotransmisiju, bilo pozitivno modulirajući inhibitornu GABA neurotransmisiju ili antagonizirajući glutamatom posredovanu ekscitacijsku neurotransmisiju, N-metil-D-aspartat (NMDA) koji ima vezno mjesto za glutamat.

Rezultati brojnih istraživanja govore u prilog tome kako aktivacija NMDA ili GABA receptora uzrokuje smrt neurona. Ipak, mehanizmi nisu potpuno razjašnjeni. Poznato je kako kontinuirano izlaganje anestheticima dovodi do deregulacije pojedinih NMDA receptora, odnosno do regulacije NR1 podjedinice (Slika 1).



**Slika 1.** Prikaz smrti neurona uslijed obrade anestheticima (Wang i sur., 2010)

Uslijed toga dolazi do prekomjernog nakupljanja kalcija (NMDA je kalcijev kanal), čija koncentracija prelazi mitohondrijsku mogućnost puferiranja, te se remeti lanac elektrona što uzrokuje prekomjernu produkciju ROS-a. Također, promjenom konformacije NMDA

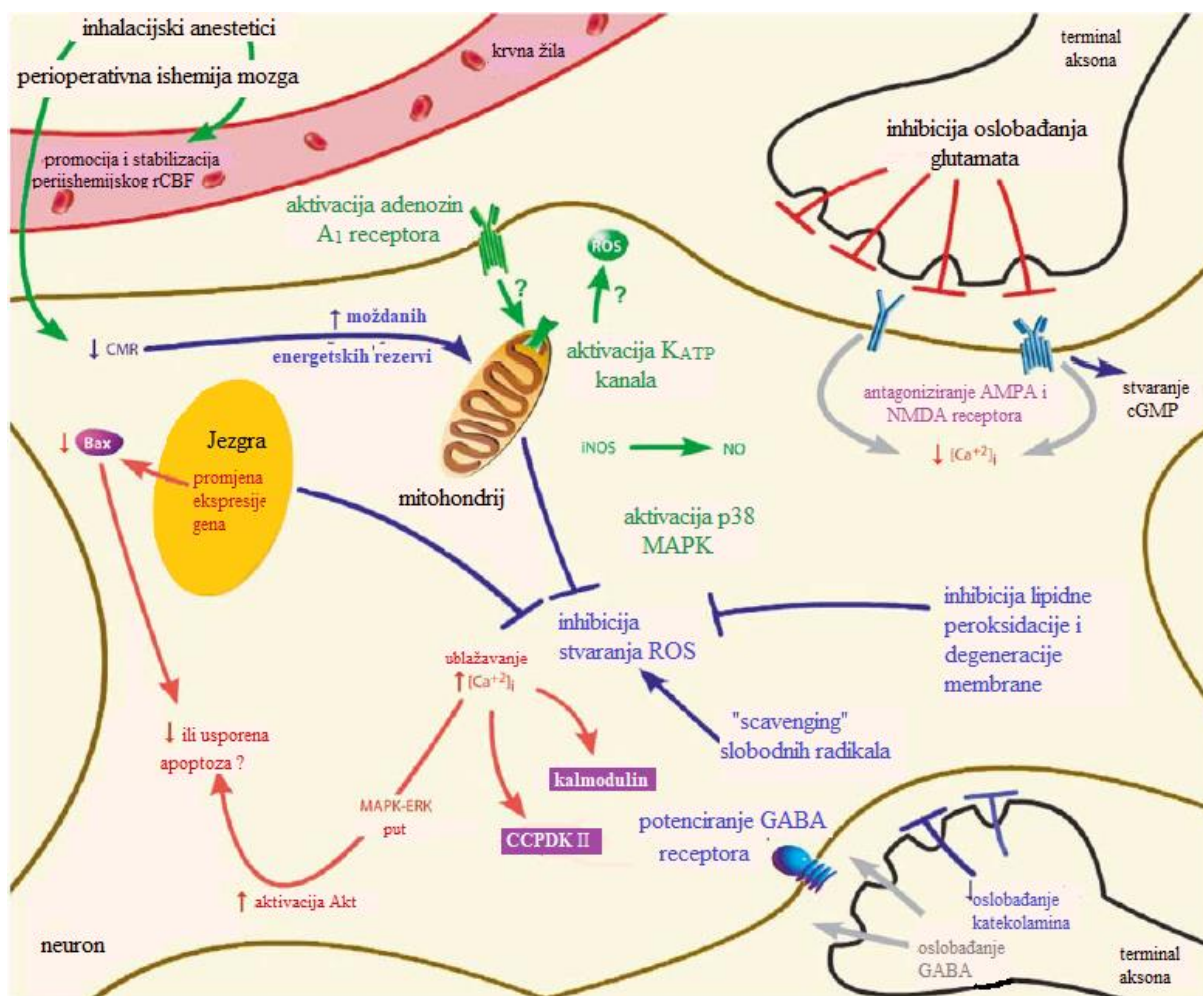


receptora dolazi do oslobađanja inhibitornog I $\kappa$ B s transkripcijskog čimbenika NF $\kappa$ B. NF $\kappa$ B tada prelazi u jezgru stanice, gdje uzrokuje povećanu transkripciju proapoptotskih gena. Proapoptotski proteini koji tada nastaju tvore pore u membranama mitohondrija, što dovodi do otpuštanja citokroma c u citosol, gdje on aktivira kaspaze, a one posljedično dovode do apoptotske smrti stanice (Wang i sur., 2010).

### **1.1.2. Neuroprotektivni utjecaj anestetika**

Inhalacijski se anestetici mogu davati prije ishemije mozga, kada govorimo o stvaranju svojevrsne obrane od manjih ozljeda (engl. *preconditioning*), ili tijekom same ishemije, kada je glavna funkcija anestetika neurozaštita (engl. *neuroprotection*).

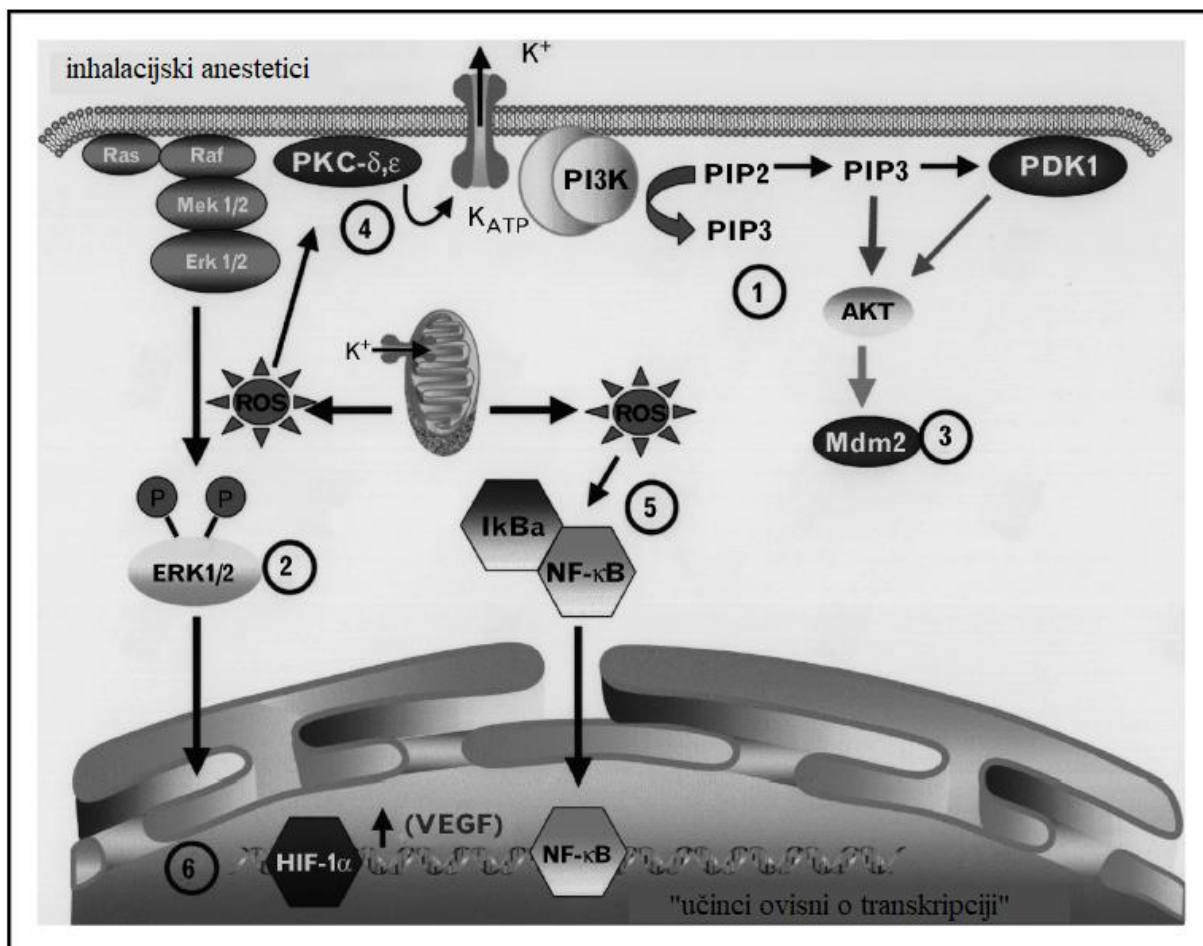
Inhalacijski anestetici, davani prije ili za vrijeme ishemije, stabiliziraju peri-ishemijski regionalni cerebralni protok krvi (engl. *regional cerebral blood flow*, rCBF) i smanjuju moždani metabolizam (engl. *cerebral metabolic rate*, CMR), te tako povećavaju razinu energije u mozgu (Slika 2). Neurozaštitni učinak se može ostvariti inhibicijom stvaranja ROS-a u neuronima, vezanjem na slobodne radikale i inhibicijom lipidne peroksidacije i degeneracije membrane neurona. Također, inhalacijski anestetici mogu modulirati ekscitotoksičnost smanjenjem oslobađanja katekolamina, potenciranjem GABAergične neurotransmisije i inhibicijom neurotransmisije posredovane glutamatom. Antagonisti AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroksil-5-metil-4-izoksazol propionska kiselina) i NMDA receptora za glutamat mogu smanjiti koncentraciju Ca<sup>2+</sup> i povećati proizvodnju glutamat-receptor povezanog cikličnog gvanozin monofosfata (cGMP). Paradoksalno neurodegenerativnom učinku anestetika, inhalacijskim anestheticima posredovano povećanje koncentracije Ca<sup>2+</sup> može imati zaštitni učinak u ishemijskom mozgu ako se anestetik primjeni prije ishemije. Takav porast koncentracije kalcija može modulirati zaštitne procese u mozgu koji su ovisni o kalciju, kao što su kalmodulin, CCPDKII (kalcij/kalmodulin-vezana protein kinaza II) i MAPK-ERK put (mitogen aktivirane protein kinaze, izvorno nazvane ERK, vanstaničnim signalom regulirane kinaze (engl. *extracellular signal-regulated kinases*). Djelovanjem na MAPK-ERK put, anestetici djeluju na aktiviranje antiapoptotskog faktora Akt (protein kinaze B), čime se smanjuje ili usporava apoptoza zbog smanjene ekspresije Bax proteina. Aktivacija adenozin A<sub>1</sub> receptora također može potaknuti otvaranje i aktivaciju kalijevih (K<sub>ATP</sub>) kanala za koje se pretpostavlja kako mijenjaju proizvodnju ROS-a smanjujući intraishemijsko nakupljanje kalcija u mitohondrijima i povećavajući postishemijsku proizvodnju energije (Kitano i sur., 2007). Navedeni mehanizmi prikazani su na Slici 2.



Slika 2. Neurozaštitni mehanizmi anestetika (Kitano i sur., 2007)

### 1.1.3. Kardioprotektivni utjecaj anestetika

Osim u zaštiti moždanih stanica, inhalacijski se anestetici mogu koristiti i u zaštiti srčanog tkiva, odnosno u zaštiti od ishemijsko-reperfuzijskih oštećenja *in vivo* (Bienengraeber i sur., 2005). Brojna istraživanja su potvrdila zaštitni učinak anestetika u slučajevima začepjenja i reperfuzije koronarne arterije (Slika 3), koji se zove anestetikom potaknuto prekondicioniranje (APC). Nekoliko je bitnih čimbenika u APC, a zajednički su onima u anestetikom potaknutoj zaštiti ishemijskog mozga. Mehanizam zaštite srčanih stanica prikazan je na Slici 3.



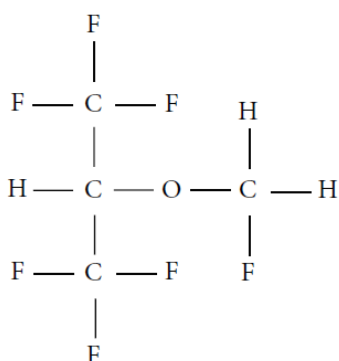
**Slika 3.** Unutarstanični prijenosa signala u APC (Pratt i sur., 2006)

Inhalacijski anestetici utječu na ERK 1/2 i PI3K (fosfatidilinozitol-3-OH kinaza) stanične puteve. Oni na ERK utječu preko Ras obitelji G-vezanih proteina koje hidroliziraju GTP (gvanozin-trifosfat), pri čemu nastaje GDP (gvanozin-difosfat) i jedna molekula fosfata koji fosforilira ERK, te ju tako aktivira. Djelovanje na PI3K posredovano je kalijevim kanalima, odnosno  $\delta$  i  $\epsilon$  izoformama protein kinaze C koja posreduje u senzitivaciji  $K_{ATP}$  kanala (4) (Ludwig i sur., 2004). Ona posljedično aktivira antiapoptotsku Akt kinazu (1). Aktivacija Akt rezultira fosforilacijom Mdm2 (engl. *murine double minute-2*) proteina koji je negativni regulator tumor supresor proteina p53 (3).

Poznata je činjenica kako anestetici uzrokuju povećanje proizvodnje ROS-a, koje mogu aktivirati, tj. fosforilirati I $\kappa$ B (inhibitor  $\kappa$ B), zbog čega dolazi do njegovog odvajanja od NF $\kappa$ B (5) (Zandi i Karin, 1999). NF $\kappa$ B tada prelazi u jezgru stanice gdje, zajedno s ERK 1/2 (2), potiče transkripciju citokina i krvožilnog endotelnog čimbenika rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) (6). VEGF je, pored antiapoptotskih citokina, bitan čimbenik u zaštiti od oštećenja stanice, čija je funkcija angiogeneza i ponovno uspostavljanje dovoda kisika (Pratt i sur., 2006).

#### 1.1.4. Sevofluran

Sevofluran [fluorometil-2,2,2-trifluoro-1-(trifluorometil) etil eter] se u kliničkoj praksi koristi od 90-tih godina prošlog stoljeća, a danas je jedan od najčešće korištenih anestetika, koji se zbog svog slatkastog mirisa naročito koristi u pedijatriji (Slika 4). To je anestetik male topljivosti u krvi, zbog čega pruža brzo dovođenje u stanje anestezije, ali i brzo buđenje (Lee i sur., 2015). Zbog svoje sličnosti s drugim anestheticima iz obitelji flurana (Burrows i sur., 2004), te zbog njihove nekarcinogenosti, sevofluran nije bio podvrgnut formalnom ispitivanju od strane američke Agencije za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration, FDA*) (Braz i Karahalil, 2015). Iz tog se razloga danas mnogi znanstvenici bave procjenom njegove toksičnosti, ali i zaštite kako *in vitro*, tako i *in vivo*.



**Slika 4.** Struktura sevoflurana (Lee i sur., 2015)

Poznata je činjenica kako inhalacijski anestetici potiču stvaranje ROS-a, koje onda aktiviraju stanične puteve kao što je MAPK. MAPK zauzvrat oslobađa NFκB od IκB, te NFκB tada prelazi u jezgru, gdje potiče transkripciju proupalnih citokina (IL-1, IL-6, IL-8) i enzima lipooksigenaze (LOX), te TNF-α, zbog čega dolazi do oštećenja DNA (Lee i sur., 2015). Čini se, ipak, kako sevofluran nema jednako štetan utjecaj na stanice, kao neki drugi često korišteni inhalacijski anestetici.

##### 1.1.4.1. *Utjecaj sevoflurana na apoptozu*

Održavanje dovoljne razine kalcija u ER-u (endoplazmatskom retikulumu) ima važnu ulogu u normalnoj strukturi ER-a, sintezi proteina, rastu i smrti stanice. Prekomjerno oslobađanje kalcija iz ER-a ili smanjeni unos u ER dovodi do njegovog manjka u ER-u, te posljedično do apoptotske smrti stanice. Bcl-2 je obitelj gena koji su aktivni posrednici u procesu apoptoze, a sastoji se od antiapoptotskih (Bcl-2) i proapoptotskih (Bax) gena. Bcl-2 može spriječiti apoptozu suzbijanjem prekomjernog izlaska kalcija iz ER-a. Ravnoteža Bcl-2 i Bax gena ima, dakle, važnu ulogu u određivanju sudbine stanice.

Različiti inhalacijski anestetici na ovu ravnotežu djeluju drugačije. Za izofluran je dokazano kako potiče neravnotežu, odnosno potiče transkripciju proapoptotskog Bax proteina, dok kod sevoflurana nije takav slučaj. Sevofluran ili inhibira oslobađanje kalcija iz ER-a, odnosno potiče transkripciju Bcl-2 gena, ili nema nikakav utjecaj na ovu ravnotežu. Točni mehanizmi ovog fenomena još nisu razjašnjeni (Wei i sur., 2005).

#### ***1.1.4.2. Genotoksičnost sevoflurana***

Do genotoksičnosti anestetika ne dolazi direktno od njih, već mahom od njihovih metabolita. Oni se, u raznim postotcima, metaboliziraju u jetri pomoću obitelji citokrom oksidaza P-450 i izlučuju putem bubrega. Samo se 5% sevoflurana metabolizira u tijelu i jedini je inhalacijski anestetik koji prolazi proces konjugacije. On se razdvaja na heksafluoroizopropanol (HFIP) i anorganski fluorid. Iako je HFIP neuro- i hepatotoksičan, kao i anorganski fluorid, vjeruje se kako ovi spojevi ne dostižu razinu koja bi mogla izazvati ova oštećenja. Puno toksičniji spoj od njih, vinil eter, poznat i kao spoj A, nastaje pri doticaju sevoflurana sa absorberom bazičnog CO<sub>2</sub> (Braz i Karahalil, 2015).

Mnogi su znanstvenici pokušali odrediti razinu genotoksičnosti sevoflurana, pri čemu su neki tvrdili kako on nema genotoksičan učinak (Szyfter i sur., 2004). Ipak, s novijim je istraživanjima toksični učinak je potvrđen.

Prilikom istraživanja ovog učinka koriste se biomarkeri ranog biološkog utjecaja, kao što su DNA mikročip analiza, izmjena sestrinskih kromatida (engl. *sister chromatid exchange*, SCE), kromosomske aberacije (engl. *chromosomal aberrations*, CA), mikronukleus (MN) test) i gel elektroforeza pojedinačnih stanica (engl. *single cell-gel electrophoresis*, SCGE). Istraživanja Braz i Karahalil (2015), Brozović i suradnika (2008; 2010), te Rozgaj i suradnika (2009) pokazala su koliki je razmjer oštećenja uzrokovanih sevofluranom. Do najvećeg je oštećenja došlo odmah nakon obrade, a od toga najviše na leukocitima. Od oštećenja nađeni su lomovi DNA alkalnim komet testom i veći broj mikronukleusa u odnosu na kontrolnu skupinu. Oštećenja jetre, bubrega i mozga bila su vidljiva 6 h nakon izlaganja sevofluranu, što je period koji je potreban za dostavu i metabolizam sevoflurana u jetri, nakon čega metaboliti krvlju idu u ostale organe i tkiva. Stanice bubrega pokazale su se najosjetljivijima na ovaj tip oštećenja. Popravak DNA nastupio je minimalno 24 h nakon izlaganja sevofluranu, a za potpuni popravak trebalo je oko 5 dana.

Iz navedenog je očito kako sevofluran ima genotoksični utjecaj, međutim, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se odredilo vrijeme potrebno za popravak DNA, te usporedio

njegov utjecaj s drugim anestheticima u klinički relevantnim dozama. Ono što je također očito je kako bi se u anesteziji trebali koristiti anestetici koji nemaju mogućnost biotransformacije.

#### ***1.1.4.3. Oštećenja perifernih tkiva i organa uzrokovana sevofluranom – animalni modeli***

Inhalacijski anestetici imaju, manje ili više, toksičan utjecaj na organizam. Glavne mete njihovih metabolita su jetra, gdje se anestetici metaboliziraju, bubrezi, preko kojih se metaboliti izbacuju iz organizma, pluća, koja su prvi organ na udaru inhalacijskih anestetika i slezena, gdje se oštećeni eritrociti razgrađuju. Utjecaj anestetika ovisi o starosti i spolu jedinke. Sevofluran tako izaziva najveća oštećenja kod starih ženki štakora, praćena s oštećenjima kod starih mužjaka. Također, do oštećenja dolazi i kod mladih ženki štakora, dok ovaj utjecaj nije primjećen kod mladih mužjaka (Arslan i sur., 2010).

Kharasch i suradnici (2006) promatrali su promjenu ekspresije gena u bubrezima štakora obrađenih s fluorometil-2,2-difluoro-1-(trifluorometil)-vinil eterom (FDVE). Ovaj spoj izaziva nekrozu proksimalnih tubula, koja je popraćena povećanom koncentracijom kreatinina u serumu, povećanom diurezom i ekskrecijom proteina, glukoze i renalnih tubularnih enzima. FDVE reagira s glutationom, dajući tako glutation konjugate, koji se mogu cijepati na netoksične merkapturate koji se izlučuju urinom, ili toksične konjugate merkapturane kiseline čija razina toksičnosti nije poznata. Osim toga, u ovom je istraživanju potvrđeno kako doza koja izaziva nefrotoksičnost također ima sposobnost mijenjanja ekspresije gena. Geni koji su tada eksprimirani imaju velik utjecaj na toksičnost (apoptozu, oksidacijski stres i/ili nekrozu) i odgovor na ozljedu (upalu, regeneraciju, popravak). Dolazi dakle do povećane ekspresije antiapoptotskih gena (npr. glutation peroksidaza i osteopontin (privlači makrofage, sprječava apoptozu), naročito 24 h nakon izlaganja FDVE, a njihova ekspresija pada ovisno o vremenu obrade. Ovo otkriće potvrđeno je i pronalaskom veće renalne ozljede 24 h nakon izlaganja spoju FDVE, nego nakon 72 h i više (Kharasch i sur., 2006).

Ipak, razina oštećenja nastalih zbog obrade sevofluranom je manja je nego kod nekih drugih inhalacijskih anestetika, kao što je propofol ili izofluran. Također, neki organi, kao što su pluća, manje su podložni promjenama (Kovacic i Somanathan, 2011). Temeljem navedenog, prije primjene anestetika posebnu pažnju treba obratiti na poremećaj ili bolest od kojih jedinka pati.

#### ***1.1.4.4. Utjecaj sevoflurana na tkiva i stanične linije kod ljudi***

Sevofluran iz pluća prelazi u krv, otkuda odlazi u druga tkiva i organe. Ipak, donedavno nisu postojali značajni dokazi o njegovom utjecaju na krvne stanice, pogotovo leukocite. Polimorfonuklearni neutrofilni (PMN) su važan dio perifernih leukocita koji se bore protiv patogenih mikroorganizama fagocitozom i proizvodnjom visokih razina ROS-a (Amer i Fibach, 2005). Različite proupalne tvari, kao što je sevofluran, također mogu potaknuti stvaranje ROS-a ili NO-a u PMN-u. Sevofluran dovodi i do smanjene koncentracije GSH zbog povećane proizvodnje superoksidnog radikala i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ali i do aktivacije kaspaze 3, te do smanjenja membranskog potencijala mitohondrija. Najvažnija uloga PMN-a je ubijanje mikroorganizama, međutim ukoliko dođe do pretjerane proizvodnje ROS-a, govorimo o autotoksičnosti, odnosno mogućnosti izazivanja oštećenja DNA, proteina i lipida od strane PMN-a. Kako sevofluran izaziva povećanu proizvodnju ROS-a i aktivaciju kaspaze 3, može se zaključiti kako on ustvari ima zaštitni učinak na okolna tkiva i organe sprječavajući autotoksičnost PMN-a (Wong i sur., 2006).

Utjecaj sevoflurana proučavan je i na nekim oblicima tumora, odnosno njihovim staničnim linijama. Kvolik i suradnici (2004) su proveli istraživanje na karcinomu debelog crijeva (Caco-2), karcinomu grljana (Hep-2), karcinomu gušterače (MIA PaCa-2), slabo diferenciranim stanicama metastaza karcinoma debelog crijeva u limfnom čvoru (SW-620) i normalnim fibroblastima (WI-38). Ovo istraživanje je provedeno zbog poznatih štetnih utjecaja anestetika, kao što su mutageneza i karcinogeneza. Sevofluran, nakon 2 i 4 h primjene blago potiče rast Caco-2 stanica, međutim već nakon 6 h značajno inhibira njihov rast. Slično djeluje i na stanične linije SW-620 i Hep-2, dok na MIA PaCa-2 i WI-38 ima manji utjecaj. Iz ovih je rezultata vidljivo kako sevofluran ima veći utjecaj na tumorske, nego na normalne stanice, a slične su rezultate, na normalnim stanicama bubrega, dobili Muckter i suradnici (1998). Do ovoga vjerojatno dolazi zbog većeg protoka krvi u tumorskim stanicama i smanjene upale u plućima (Hep-2). Apoptoza je zamjećena u svim stanicama izloženima sevofluranu, iako nije bila kvantificirana, zbog čega bi se u budućim istraživanjima trebale koristiti osjetljivije metode, kao što je protočna citometrija (Kvolik i sur., 2004).

Sevofluran ima negativni učinak i u skeletnim mišićima. Inozitol-1,4,5-trifosfat (IP<sub>3</sub>) je sekundarni glasnik koji ima važnu ulogu u pobudi hipermetaboličke aktivnosti skeletnih mišića, kao i u malignoj hipertermiji.

Maligna hipertermija je poremećaj skeletnih mišića do kojeg dolazi nakon izlaganja inhalacijskim anestheticima. Ukoliko jedinka ima predispoziciju za hipertermiju, nakon obrade anestetikom dolazi do pojave tahikardije, hipertermije, povećanog nastajanja ugljičnog

dioksida, te na kraju smrti. Tijekom maligne hipertermije dolazi do unutarstaničnog nakupljanja kalcija. Njegovo otpuštanje iz sarkoplazmatskog retikuluma kontrolira  $IP_3$  preko  $IP_3$  receptora. Povećanje koncentracije  $IP_3$  uzrokuje povećanje unutarstanične koncentracije  $Ca^{2+}$ , te tako izaziva stanični odgovor, uključujući kontrakciju mišića i depolarizaciju plazma membrane. Do oslobađanja  $IP_3$  dolazi preko PLC (fosfolipaza C), koja je aktivirana receptorima na staničnoj membrani, kao što je G-vezani protein što dovodi do stimulacije aktivnosti tirozin kinaza, fosfolipaza  $A_2$  ( $PLA_2$ ) i protein kinaze C (PKC).

Kudoh i Matsuki (2000) dokazali su i sevofluranovu sposobnost povećanja proizvodnje  $IP_3$ . Do povećanje proizvodnje  $IP_3$  dolazi zbog toga što sevofluran stimulira PLC,  $PLA_2$  i tirozin kinazne receptore preko G vezanih proteina, a s povećanom proizvodnjom  $IP_3$  dolazi i do unutarstaničnog nakupljanja kalcija. Prema tome, sevofluran ima sposobnost potaknuti malignu hipertermiju.

#### **1.1.4.5. Zaštitni učinak sevoflurana**

Sevofluran štiti neurone od smrti izazvane nedostatkom glukoze i kisika, vjerojatno stabiliziranjem membranskog potencijala mitohondrija (Wise-Faberowski i sur., 2003).

Sevofluran također štiti neurone moduliranjem ravnoteže između proapoptoskih i antiapoptoskih proteina. Dva su glavna mehanizma ishemijske smrti neurona: apoptoza i nekroza. Apoptoza je aktivni proces potaknut proteinima, čije su tipične značajke smanjenje veličine stanice, pupanje membrane, stvaranje apoptotičkih tjelešaca i kondenzacija kromatina. Glavni protein u apoptozi je p53, koji je aktiviran oksidacijskim stresom i fragmentacijom DNA, i koji povećava koncentraciju proapoptoskog proteina Bax. p53 je povezan s antiapoptotstkim proteinom Mdm-2 (engl. *murine double minute 2 protein*) povratnom vezom. Protein Bcl-2 služi u zaštiti stanice od ishemijske smrti na nekoliko načina: 1) regulacijom transporta kalcija preko mitohondrijske membrane, 2) zaštitom od prodiranja kroz mitohondrijsku membranu i 3) kontrolom staničnih antioksidansa. Bcl-2 i Bax su dimeri od kojih je Bcl-2 homodimer (građen od dva Bcl-2 proteina), dok je Bax heterodimer (jedan Bcl-2 i jedan Bax protein). Kojeg će dimera biti više u stanici, ovisi o njihovim koncentracijama u stanici. Sevofluran potiče stvaranje antiapoptotstkih proteina Bcl-2 i Mdm-2. Drugi mehanizam ishemijske smrti neurona je nekroza. Ona je, za razliku od apoptoze, pasivan proces. Morfološki, nekroza je karakterizirana bubrenjem stanice, piknozom jezgre, kariolizom, povećanom citoplazmatskom eozinofilijom i upalnim odgovorom. Sevofluran sprječava eozinofilno oštećenje mozga. On smanjuje cerebralni metabolizam, te tako obnavlja ravnotežu između potražnje i opskrbe energije i kisika.



Sevofluran također umanjuje oslobađanje cerebralnih katekolamina i ekscitotoksičnih neurotransmitera (npr. glutamata). Ukratko, sevofluran štiti neurone od smrti, do koje uglavnom dolazi procesom apoptoze, a manjim dijelom i nekroze (Pape i sur., 2006).

Wise-Faberowski i suradnici (2003) su otkrili kako sevofluran štiti neurone i od smrti izazvane nedostatkom glukoze i kisika, vjerojatno stabiliziranjem membranskog potencijala mitohondrija, odnosno pozitivnim reguliranjem Bcl-2 proteina.

Osim navedenog, sevofluran ima sposobnost zaštite srčanog tkiva od ishemijom potaknutog iscrpljivanja ATP-a (adenozin trifosfata), prekomjernog nakupljanja kalcija i oksidacijskog stresa. Zaštita je temeljena na aktivaciji PKC, otvaranju mitohondrijskih  $K_{ATP}$  kanala i stvaranju ROS-a. Bouwman i suradnici (2009) proveli su istraživanje čiji je cilj bio odrediti razlikuje li se ova sposobnost u drukčijim slučajevima ishemije – hipoksiji (HYP) i metaboličkoj inhibiciji (MI). Cijanidom potaknuta ishemija može izazvati metaboličku inhibiciju. Cijanid aktivira citokrom c oksidazu u kompleksu IV mitohondrijskog lanca elektrona (engl. *electron transport chain*, ETC), što rezultira trošenjem ATP-a i stvaranjem ROS-a. Hipoksija je, s druge strane, povezana sa smanjenjem koncentracije  $O_2$ , čime se sprječava prijenos elektrona iz kompleksa IV, a to također dovodi do smanjenja ATP-a. Ona također uzrokuje smanjenu potrošnju kisika u mitohondrijima, što dovodi do stvaranja superoksidnog radikala. Hipoksija je, za razliku od MI, popraćena reoksigenacijom, što može dovesti do dodatnog oštećenja srca.

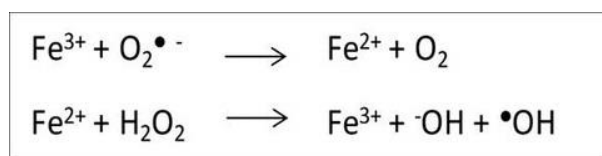
Relativni doprinos triju signalnih molekula u sevofluranom potaknutoj zaštiti srca nisu ovisni o tipu stimulansa koji je potaknuto ishemiju. Aktivacija PKC, otvaranje mitohondrijskih  $K_{ATP}$  kanala i stvaranje ROS-a najvažniji su dijelovi ove zaštite. Razlike između HYP i MI su: 1) različiti izvori ROS-a, 2) viša koncentracija ROS-a kod MI zbog veće prisutnosti kisika i 3) mitohondrijsko signaliziranje ovisno o NO-u tijekom hipoksije. Proizvodnja ROS-a tijekom prekondicioniranja sevofluranom je uključena u inhibiciju ETC, što sugerira kako su razlike između HYP i MI odgovorne za varijacije u zaštitnom odgovoru nakon obrade sevofluranom. Zaštita od hipoksije je klinički relevantnija, međutim trovanje cijanidom odgovara trovanju ugljičnim monoksidom. Aktivirani unutarstanični signalni put, dakle nije ovisan o stimulanu, što znači da im je zajednički čimbenik razina ROS-a (Bouwman i sur., 2006).

## 1.2. UTJECAJ ALUMINIJA

Aluminij je najzastupljeniji metal i treći najzastupljeniji kemijski element u Zemljinoj kori. Zbog velikog afiniteta prema kisiku u prirodi se nikad ne pojavljuje u elementarnom obliku, nego u obliku različitih spojeva s kisikom, sumporom, silicijem i sl. (Liang i sur., 2012). Aluminijske su kemijske značajke složene, topljivost mu je povećana u kiselim ili lužnatim uvjetima, dok pri neutralnom pH podliježe hidrolizi, precipitira i stvara  $\text{Al}(\text{OH})_3$  (Bharathi i sur., 2008).

Ovaj metal ima široku primjenu u svakodnevnom životu ljudi, te zbog toga ima lak pristup našem tijelu kroz pribor za jelo, kozmetiku, pa čak i vodu (Liang i sur., 2012). Bez obzira na put primjene, aluminij je poznat neurotoksin, te je povezan s više neurodegenerativnih bolesti, kao što je Alzheimerova bolest. Ipak, istraživanja *in vivo* i *in vitro* pokazala su kako njegova fiziološka aktivnost i biološka dostupnost uvelike ovise o njegovoj kemijskoj formi (Dörnyei i sur., 2003; Zhou i Yokel, 2005).

Aluminij je metal niskog redoks potencijala koji, unatoč tome, može izazvati oksidacijska oštećenja stanica: a) može potaknuti željezom izazvanu lipidnu peroksidaciju preko Fentonove reakcije (Slika 5), ili b) lipidnu peroksidaciju koja nije izazvana željezom, c) oksidaciju NADH koja nije izazvana željezom, te d) stvaranje hidroksil radikala ( $\text{HO}^\bullet$ ). Mehanizmi preko kojih može doći do oštećenja stanica su: a) vezanje aluminija za ciljni supstrat - negativno nabijene fosfolipide koje sadrže polinezasićene masne kiseline, uslijed čega dolazi do stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS-a) (kao što su  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^-$  i  $\text{OH}^\bullet$ ) (Verstraeten i sur., 2004), b) njegovo vezanje za druge pro-oksidanse, kao što je željezo, što uzrokuje lipidnu peroksidaciju preko Fentonove reakcije, pri čemu dolazi do stvaranja ROS-a i  $\text{Fe}^{3+}$  ili, c) vezanje za oksidans, kao što je superoksidni anion ( $\text{O}_2^-$ ), gdje nastaje kompleks  $\text{Al-O}_2^-$ , čime se povećava oksidacijska sposobnost  $\text{O}_2^-$  (Exley, 2004).



**Slika 5.** Fentonova reakcija (Anon, 2018a)

### **1.2.1. Dostupnost aluminija**

Aluminij se može nazvati „zelenim“ metalom jer zadovoljava brojne ekološke i tehnološke zahtjeve. Osim toga, njegova su kemijska i mehanička svojstva poput čelika, bakra, olova ili titana. Aluminij je metal male gustoće, visoke čvrstoće i dugotrajnosti, bez mirisa, te je otporan na koroziju zbog stvaranja tankog oksidnog sloja na površini metala koji ga štiti od daljnje oksidacije. Iz svih navedenih razloga, vrlo se često koristi u svakodnevnom životu, zbog čega dolazi do njegova povećana izlaganja. Osim u građevinarstvu, elektro sektoru, autotransportu, pa čak pakiranju hrane i pića, aluminij se koristi i u brojnim kozmetičkim proizvodima, posebice su najčešći antiperspiranti i ruževi za usne.

U kozmetičkoj se industriji koristi nekoliko spojeva s aluminijem: spojevi topljivi u vodi (jednostavni organski i anorganski spojevi, aluminijev benzoat, klorohidrati) i spojevi netopljivi u vodi (minerali, gline, karbohidrati, soli masnih kiselina). Prema Znanstvenom odboru za sigurnost potrošača (SCCS, engl. *Scientific Committee on Consumer Safety*) od 2014. god. najčešći spojevi u antiperspirantima su aluminijevi derivati, kao što je aluminijev klorid ( $\text{AlCl}_3$ ), dok je u ruževima za usne najčešći spoj aluminijev oksid ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) koji se dobiva reakcijom aluminijevog klorida i aluminijevog sulfata ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ). Većina aluminijevih spojeva koja se koristi u antiperspirantima je u netopljivom obliku, zbog čega je samo mali postotak tako primjenjenog aluminija biodostupan. U ostatku antiperspiranata se koriste spojevi koji su topljivi pri niskom pH, međutim, i oni se u doticaju s kožom (proizvodima znojnih žlijezda i bakterija prirodno prisutnih na koži) pretvaraju u netopljive spojeve.

Aluminij u hrani ili vodi se slabo apsorbira u gastrointestinalnom sustavu ljudi. Osim toga, postoji bitna razlika u apsorpciji različitih spojeva koji sadrže aluminij, te postoje različiti ligandi u hrani koji mogu povećati ili smanjiti apsorpciju. Ligandi koji povećavaju apsorpciju uglavnom tvore komplekse topljive u vodi (limunska i mliječna kiselina), dok ligandi koji smanjuju apsorpciju tvore netopljive spojeve (fosfati ili otopljeni silikat). Postoji nekoliko manjih istraživanja koja su se bavila procjenom apsorpcije aluminija kod ljudi (Jouhannau i sur., 1993; Hohl i sur., 1994; Drüeke i sur., 1997; Yokel i sur., 2001) čiji je krajnji zaključak kako apsorpcija aluminija može varirati i do deset puta, uzimajući u obzir samo razlike u kemijskim spojevima u obliku kojih je aluminij dostupan. Dosadašnja istraživanja ukazuju i kako bi koncentracija aluminija u vodi trebala biti 10 000 puta veća nego što stvarno jest, kako bi došlo do najmanjih prepoznatljivih promjena kod štakora (Poirier i sur., 2011). Uzimajući u obzir dosadašnje rezultate, jasno je kako su potrebna daljnja istraživanja u svrhu dobivanja konačnih statistički značajnih rezultata apsorpcije aluminija.

## **1.2.2. Toksičnost aluminija**

Brojna istraživanja su se bavila procjenom toksičnosti aluminija Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA, engl. *European Food Safety Authority*, 2008, 2011); Agencija za otrovne tvari i registar bolesti (ATSDR, engl. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, 2008); Procjene zajedničkog stručnog odbora FAO/WHO o aditivima u hrani (JECFA, engl. *Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*, 2008, 2011). U daljnjem je tekstu kratak sažetak dobivenih rezultata.

Akutna toksičnost prilikom oralne primjene aluminijevih spojeva (bromidi, kloridi, nitrati, sulfati) je srednja do niska. Prema rezultatima istraživanja, LD<sub>50</sub> (engl. *lethal dose*) standardna mjera toksičnosti tvari koja će ubiti pola obrađene populacije za takve spojeve iznosi 162 – 750 mg Al/kg tjelesne težine štakora, ovisno o kemijskom spoju kojim je populacija obrađena.

Lokalni se utjecaj aluminija odnosi na primjenu antiperspiranta koji sadrže aluminij. Sorenson i suradnici su 1974. godine zaključili kako aluminijevi spojevi u antiperspirantima nisu štetni za kožu. Ipak, kod određenih osoba, može se pojaviti iritacija kože izazvana upravo tim spojevima. Također, kod ljudi koji pate od hiperhidroze (pretjerano znojenje), nakon obrade aluminijevim kloridom heksahidratom (AlCl<sub>3</sub> x 6H<sub>2</sub>O) može doći do iritacije kože (Ellis i Scurr, 1979; Goh, 1990).

Istraživanja sustavne toksičnosti nakon višekratnog izlaganja proučavala su učinke oralne primjene, dok lokalna primjena nije proučavana. Rezultati ovih istraživanja variraju, ovisno o spoju kojim su životinje obrađene, a spojevi koji su se koristili bili su nitrati i sulfati. Subkronična primjena doze od 104 mg Al/kg tjelesne težine/dan uzrokovala je promjene kao što su smanjena tjelesna težina, te blage histopatološke promjene u tkivima slezene, bubrega i jetre štakora. Pri nešto višim dozama uočen je i utjecaj na kosti, testise te želudac. Slijedom toga, ozbiljnost promjena rasla je s povećanjem doze. Ipak, glavni toksični utjecaj aluminija je njegova neurotoksičnost (potpoglavlje 1.2.4) i nefrotoksičnost (potpoglavlje 1.2.5).

### ***1.2.2.1. Genotoksičnost aluminija***

Aluminijevi spojevi nisu bili dokazani kao mutageni u dosadašnjim istraživanjima na bakterijskim stanicama i stanicama sisavaca, ali neki su izazvali oštećenja DNA, te su imali utjecaj na cjelovitost kromosoma i segregaciju *in vitro* (EFSA, 2008). Predloženo je nekoliko indirektnih mehanizama koji mogu objasniti genotoksični utjecaj (strukturne kromosomske

aberracije, gubitak kromosoma, izmjene između sestrinskih kromatida). Ti su mehanizmi sljedeći: križno povezivanje (engl. *cross-linking*) DNA s kromosomskim proteinima, međureakcija sa sastavljanjem mikrotubula i funkcijom diobenog vretena, indukcija oksidacijskog oštećenja, oštećenje lizosomske membrane oslobađanjem DNaza i sl. Bitno je naznačiti kako je do ovih oštećenja došlo prilikom unosa visokih doza aluminijskih spojeva (EFSA, 2008).

### **1.2.3. Aluminij uzrokuje neurotoksičnost i neurodegenerativne bolesti**

Tkivo mozga je vrlo osjetljivo na oksidacijski stres iz nekoliko razloga: zbog njegove visoke potrošnje kisika (20% ukupne tjelesne potrošnje), mnoštva polinezasićenih masnih kiselina u membranama stanica, visokog udjela željeza (Fe) i niske antioksidacijske enzimske aktivnosti. Aluminij može potaknuti lipidnu peroksidaciju, promijeniti aktivnost postojećih antioksidacijskih enzima kao što je SOD (superoksid dismutaza) ili potaknuti oksidaciju uzrokovanu željezom. Globularni protein feritin je vrlo bitan u dostavljanju željeza u mozak, preko krvno-moždane barijere. Međutim, ukoliko dođe do oštećenja mozga, dolazi do otpuštanja metalnih iona željeza i bakra, koji kataliziraju nastanak slobodnih radikala kao što je hidroksilni radikal (OH<sup>•</sup>) (Friedman, 2011). Rezultat ovih događaja je stvaranje slobodnih radikala koji izazivaju lezije mozga povezane s Alzeimerovom bolesti (Liang i sur., 2012).

Neurodegenerativne bolesti karakterizirane su brojnim patološkim promjenama koje imaju slične procese kao što je oksidacijski stres, aktivnost slobodnih radikala, nakupljanje proteina, mitohondrijska disfunkcija i gubitak energije. One su posredovane ili potaknute neravnotežom metalnih iona koja dovodi do promjena u kritičnim biološkim sustavima i pokreće kaskadu događaja koji rezultiraju smrću stanice. Iako točni mehanizmi još nisu razjašnjeni, dosadašnja istraživanja pokazuju kako dolazi do promjena u redoks prijelazim metalima (engl. *redox transition metals*), naročito u željezu i bakru (EFSA, 2008).

Izlaganje aluminiju više od 120 minuta može izazvati oštećenja karakteristična za Alzheimerovu bolest (AD). Klinička slika AD uključuje progresiju poremećaja učenja, gubitak pamćenja i pad kognitivnih sposobnosti. Karakterizira ju veliki pad u broju neurona, stvaranje neurofibrilarnih snopića (engl. *neurofibrillary tangles*, NFT) i senilnih plakova (SP) (Slika 6). Neurofibrilarni snopići nastaju nakupljanjem hiperfosforiliranog tau proteina, dok su senilni plakovi rani toksični događaj do kojeg dolazi postepenim nakupljanjem amiloid β proteina (Aβ) (Liang i sur., 2012).

### NEUROFIBRILARNI SNOPIĆI



### SENILNI PLAKOVI

**Slika 6.** NFT i SP (Anon, 2018b)

Tau proteini su normalno eksprimirani u aksonima i dendritima neurona, gdje služe u sklapanju monomera tubulina u mikrotubule, koji su odgovorni za održavanje oblika i polarnosti neurona te u aksonalnom prijenosu. Uslijed abnormalne fosforilacije, odnosno hiperfosforilacije tau proteina, dolazi do spiralizacije tau molekula te do unutarstaničnog nakupljanja. Kada stanica opterećena ovim formacijama doživi smrt, tau molekule se nakupljaju izvanstanično, u neurofibrilarne snopiće (Ferreira i sur., 2008). Pretpostavljena mjesta fosforilacije su Ser 199/202/205, Thr 212, Thr 231/Ser 235, Ser 262/356 te Ser 404, dok fosforilacija na mjestima Thr 231, Ser 396 i Ser 422 uzrokuje međusobno povezivanje tau proteina u navedene snopiće. Koncentracija tau proteina do 300 puta je veća kod oboljelih od AD, nego u zdravoj populaciji.

Amiloid  $\beta$  protein se također nalazi u zdravom mozgu, a postoje 2 oblika,  $A\beta_{40}$  i  $A\beta_{42}$ , ovisno o tome od koliko se aminokiselina sastoji (40 ili 42).  $A\beta$  nastaje cijepanjem amiloid prekursor proteina (APP), čije cijepanje započinje enzim BACE1 (engl.  *$\beta$ -site APP cleaving enzyme*), nakon čega proces dovršavaju proteolitički enzimi, sekretaze.  $\beta$  i  $\gamma$  sekretaze su glavni enzimi koji cijepaju APP na amino- i karboksil- kraju, te su direktno odgovorne za nastanak  $A\beta$  peptida. Osim ovih sekretaza, postoji i sekretaza  $\alpha$  čija je uloga zaštitna, budući ona potiče stvaranje sAPP- $\alpha$ , koji sprječavaju nastanak neurotoksičnih  $A\beta$  peptida (Rodrigo, 2009).

Molekule  $A\beta$  proteina se u zdravom mozgu nakupljaju u oligomere. Ako dođe do pogreške prilikom slaganja u oligomere, dolazi do patološkog nakupljanja ovih oligomera, koji su toksični za stanicu, u senilne plakove.  $A\beta_{42}$  oblik proteina ima veću sklonost stvaranju ovih oligomera (Ferreira i sur., 2008). Koncentracija amiloid  $\beta$  proteina kod osoba oboljelih



Kim i sur., 2007; Wu i sur., 2012). Prisutnost Al u tkivima podrazumijeva povećanu koncentraciju OH<sup>-</sup> iona i njegovih prekursora koji mogu biti neutralizirani jedino pomoću sakupljača slobodnih radikala (Sharma i Sharma, 2012).

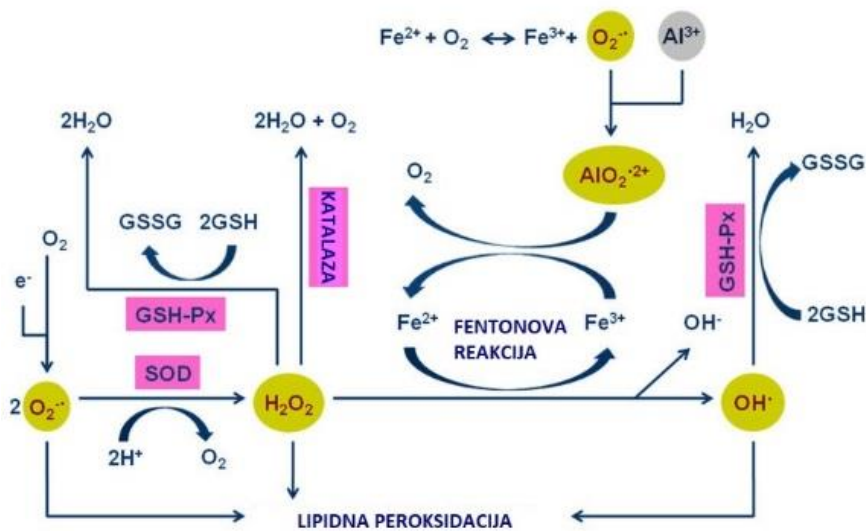
Toskičnost aluminijske na periferne organe štakora proučavali su Berlyne i suradnici (1972). Aluminijski se, u zdravoj jedinki, izlučuje bubrezima. Zbog toga je postavljena hipoteza kako će kod jedinki sa zatajenjem bubrega nakupljanje aluminijske rezultirati toksičnim učinkom, a ta je hipoteza dokazana povišenom razinom aluminijske u plazmi. Ipak, osim ovog opažanja, nije se puno znalo o utjecaju aluminijske, osim pada u koncentraciji fosfata. Berlyne i suradnici pretpostavljali su kako drugi poremećaji nisu zamjećeni zbog mahom netopljivih aluminijskih soli kojima su životinje u prijašnjim istraživanjima bile obrađene, a bilo je potrebno zaključiti o kojim je sve poremećajima riječ, budući su ljudi sa zatajenjem bubrega bili liječeni aluminijskim hidroksidom (Al(OH)<sub>3</sub>). U njihovom istraživanju, obrađene životinje imale su sljedeće promjene: letargija, periorbitalno krvarenje, anoreksija, povećana koncentracija Al u plazmi i sl. Osim toga, aluminijski spojevi su nađeni u različitim tkivima i organima, kao što su mozak, jetra, srce, mišići i kosti. U jetri je bila vidljiva smanjena respiracija te smanjena koncentracija proteina. Također, nađena je blago povišena koncentracija fosfata, zbog čega je odbačena dotadašnja tvrdnja kako je to glavni poremećaj koji se pojavljuje zbog aluminijske. Visoka koncentracija aluminijske pronađena je i u kostima, zbog čega je postavljena pretpostavka kako on utječe i na nastanak osteoporoze. Također, do nakupljanja aluminijske došlo je u epitelu rožnice, što je uzrokovalo periorbitalno krvarenje. Ipak, mehanizmi ovih oštećenja nisu bili razjašnjeni. Zbog navedenih dokaza, kao i zbog činjenice kako se zatajenje bubrega u ljudi u to vrijeme liječilo obradom aluminijskim, ovi su znanstvenici zaključili kako su potrebna daljnja istraživanja o utjecaju aluminijske, te kako bi se liječenje aluminijskim trebalo uzeti sa zadržkom (Berlyne i sur., 1972).

Aluminijska je neurotoksičnost, kao i njegova sposobnost izazivanja neurodegenerativnih bolesti, dobro poznata, zbog toga što su se dosadašnja istraživanja uglavnom bavila upravo ovom problematikom. Ipak, poznato je i kako Al potiče oksidacijski stres i upalu u brojnim perifernim tkivima i organima, kao što su jetra, slezena, bubreg, pluća i sl. (SCCS, 2014). Kako su bubreg i jetra glavni filtratorski sustavi u tijelu, upravo ti organi trpe najveću štetu zbog nakupljanja Al.

Ipak, najviše se istraživanja bavilo njegovim utjecajem na mozak, zbog čega su Ghorbel i suradnici (2016) proveli istraživanje o utjecaju aluminijske na nastanak oksidacijskog stresa u jetri štakora. Rezultati su pokazali povećanje razine MDA i O<sub>2</sub><sup>-</sup>, što dokazuje uključenost Al u stvaranje ROS-a (Slika 8). Uslijed prekomjernog stvaranja superoksidnog



radikala, došlo je do smanjenja aktivnosti katalaze i glutation peroksidaze, te do povećanja aktivnosti SOD, što je posljedično dovelo do nakupljanja  $\text{H}_2\text{O}_2$  u stanicama (Slika 8). Osim  $\text{H}_2\text{O}_2$ , u stanicama je došlo i do nakupljanja  $\text{Ca}^{2+}$ , što dokazuje kako Al utječe na homeostazu kalcija, te do nakupljanja ALT (alanin aminotransferaza) i AST (aspartat aminotransferaza), dvaju proteina pokazatelja oštećenja jetre. Također, došlo je do povećane ekspresije proupalnih citokina, kao što su  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-6 i IL-1b (Ghorbel i sur., 2015). Ovi su znanstvenici postavili hipotezu kako metaloproteinaze imaju veliki utjecaj u oštećenju jetrenih stanica, međutim točni mehanizmi još nisu razjašnjeni.



**Slika 8.** Mehanizmi djelovanja aluminijskog (Yuan i sur., 2012)

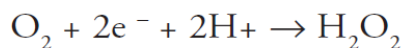
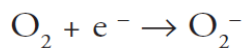
Kako se ova istraživanja razlikuju u brojnim čimbenicima, kao što su starost obrađenih životinja, način obrade (koncentracija i vrsta primjenjenog aluminijskog spoja), istraženi mehanizmi i korištene metode, potrebna su daljnja i temeljitija istraživanja koja će ih upotpuniti i povezati dosadašnja istraživanja.

## 1.3. OKSIDACIJSKI STRES

Aerobni organizmi imaju sposobnost oksidiranja nekih tvari i reduciranja drugih, pri čemu je krajnji oksidans molekularni kisik ( $O_2$ ) (Roberts i sur., 2009). U normalnim biološkim uvjetima,  $O_2$  neenzimatskom oksidacijom povremeno oduzima elektrone drugim molekulama, što uzrokuje nastanak slobodnih radikala (Štefan i sur., 2007). Slobodni radikali su, dakle, produkti normalnog aerobnog mehanizma (McDermott, 2000), međutim, ukoliko njihova proizvodnja prelazi antioksidacijsku staničnu aktivnost, to definiramo kao oksidacijski stres, koji oštećuje stanične membrane i molekule DNA te doprinosi razvoju upalnih bolesti (McCord, 2000). Slobodni radikali su vrlo nestabilne kemijske čestice koje imaju nespareni elektron. Oni nastaju homolitičkim cijepanjem kovalentne veze, pri čemu svaki elektron ostaje vezan u susjednom atomu. Zbog nesparenoga elektrona, ove su čestice vrlo reaktivne. Kako ove čestice nastaju u normalnim biološkim uvjetima, stanice organizma imaju obrambene mehanizme s ciljem njihovog neutraliziranja. U organizmu postoji nekoliko skupina antioksidacijskih enzima uključujući superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutation peroksidaze (GPx) (Štefan i sur., 2007). Dosadašnja istraživanja upućuju na oksidacijski stres kao primarni uzrok patogeneze upale, djelomičnih ishemija i metaboličkih bolesti (Love, 1999). Također, akumulacijom oksidacijskog stresa, može doći do razvitka brojnih kroničnih bolesti kao što su neurodegenerativne bolesti, bolesti kardiovaskularnog sustava, ali i do nastanka raka (Hussain i sur., 2003; Sugamura i Keaney, 2011; Sanders i Greenamyre, 2013; Song i sur., 2014). Zbog velike važnosti pravovremeno otkrivanje ovog poremećaja, razvijeno je nekoliko biomarkera mjerenjem: a) razine slobodnih radikala; b) oštećenja DNA, lipida i proteina c) aktivnosti enzimskih antioksidansa.

### 1.3.1. Reaktivni spojevi kisika (ROS) i dušika (RNS)

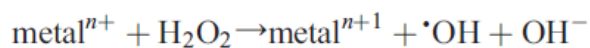
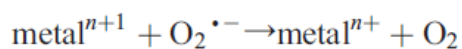
Kisik je snažno oksidacijsko sredstvo, čija reakcija potpune redukcije ima veliki redukcijski potencijal. Molekula kisika u svome elementarnom stanju ima dva nesparena elektrona. Ukoliko ona primi jedan elektron, dolazi do nastanka superoksidnog radikala ( $O_2^{\cdot-}$ ), dok primanjem dva nesparena elektrona nastaje peroksidni anion ( $O_2^{2-}$ ). Peroksidni anion (Slika 9) tada može prijeći u vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) sljedećom reakcijom:



**Slika 9.** Nastanak vodikovog peroksida proteiniranjem peroksidnog aniona (Štefan i sur., 2007)

Osim ova dva aniona, u slobodne kisikove radikale spadaju i hidroksilni ( $\text{OH}^\bullet$ ) i hidroperoksilni ( $\text{HO}_2^\bullet$ ) radikali, dok su u ROS uključene čestice koje nisu slobodni radikali, kao što su vodikov peroksid i singletni kisik ( $^1\text{O}_2$ ) (Štefan i sur., 2007).

Postoji nekoliko mehanizama nastanka ROS-a, koji su objašnjeni u daljnjem tekstu. Prvi je mehanizam metalne indukcije nastanka kisikovih radikala Fentonovom reakcijom (Slika 5) (Inoue i sur., 1989; Data i sur., 1993). U ovoj reakciji tranzicijski metalni ion ( $\text{metal}^{n+}$ ) reagira s  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tvoreći tako hidroksilni radikal i oksidirani metalni ion ( $\text{metal}^{n+1}$ ). Do nastanka ROS-a može doći i Haber-Weissovom reakcijom (Weinstein i Bielski., 1979; Freeman i sur., 1982; Leonard i sur., 1998), prilikom koje oksidirani metal ( $\text{metal}^{n+1}$ ) biva reduciran pomoću superoksidnog radikala. Tako reduciran stupa u reakciju s  $\text{H}_2\text{O}_2$ , uslijed čega ponovno dolazi do nastanka hidroksilnog radikala (Slika 10).



**Slika 10.** Haber-Weissova reakcija (Leonard i sur., 2004)

Ova je reakcija posebno važna u procesu fagocitoze, kada makrofagi proizvode velike količine  $\text{O}_2^{\bullet-}$  tijekom respiratornog praska (engl. *respiratory burst*). Kako metali služe kao katalizatori Haber-Weissove reakcije, fagocitoza čestica koje ih sadrže može izazvati ovaj događaj. Osim ovih reakcija, postoji još nekoliko mehanizama koji mogu potaknuti stvaranje ROS-a. Neki metalni ioni mogu reagirati izravno sa staničnim mehanizmima (Quintiliani i sur., 1977; Shi i sur., 1990, 1994), te potaknuti neke stanične signalne puteve. Na primjer, metalni ion može reagirati s aminokiselinom kao što je cistein, uslijed čega dolazi do nastanka tiolnih radikala. Ovi radikali tada mogu izazvati oštećenje stanice, ili reagirati s drugim tiolnim molekulama, pri čemu nastaje  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , koji onda potiče nastanak  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Metali mogu biti reducirani pomoću flavoenzima, glutation reduktaze i sl. Tijekom ovog se procesa  $\text{O}_2$  također reducira u  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , koristeći NADPH kao kofaktor. Također, metalni ioni mogu izazvati nastanak ROS-a indirektnim mehanizmom, aktivacijom staničnih proizvođača radikala, kao što je

NADH oksidaza. Ipak, do nastanka ROS-a dolazi i u normalnom staničnom metabolizmu i obrani, npr. pri transportu elektrona u mitohondrijima i lizosomima (Leonard i sur., 2004).

Uz ROS, postoje i reaktivne dušikove vrste (RNS), od kojih su najvažniji dušikov (II) oksid ( $\text{NO}^*$ ) i dušikov (IV) oksid ( $\text{NO}_2$ ).  $\text{NO}^*$  je relaksacijski čimbenik krvožilnog sustava, koji može reagirati s endogenim radikalima, kao što je  $\text{O}_2^*$ , stvarajući tako peroksinitrite ( $\text{ONOO}^-$ ). Peroksinitriti su vrlo jaki oksidansi koji se, pri niskom pH i neovisno o prisutnosti prijelaznih metala, razgrađuju u hidroksilne radikale (Štefan i sur., 2007).

### **1.3.2. Prirodni antioksidansi**

Antioksidansi su tvari koje dovode do odgađanja ili inhibicije oksidacije supstrata. Njihovo se djelovanje može opisati mehanizmima: uklanjanjem kisika ili metalnih iona, uklanjanjem ciljnih ROS-a, slobodnih radikala ili singletnog kisika (Štefan i sur., 2007). Antioksidansi se dijele na unutarstanične, membranske i izvanstanične antioksidanse.

Unutarstanični antioksidansi brane stanicu od oksidacijskih oštećenja na nekoliko razina: spriječavanjem nastanka slobodnih radikala, njihovom neutralizacijom, popravkom oštećenja nastalih djelovanjem slobodnih radikala, ili spriječavanjem popravka oštećenih molekula, ukoliko je njihov broj prevelik. Neki unutarstanični antioksidansi su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) i glutation peroksidaza (GPx) (Tablica 1). SOD je metaloenzim, kojeg kod ljudi postoje tri vrste: citosolna (CuZnSOD), mitohondrijska (MnSOD) i izvanstanična (EC-SOD). GPx je većinom citosolni enzim, dok se u mitohondrijima nalazi oko 10%. U sisavaca postoji najmanje 5 GPx izozima.

Membranski antioksidansi su vitamin E,  $\beta$ -karoten i koenzim Q (Tablica 1). Oni se svojim lipofilnim dijelovima ugrađuju u membranske sustave, a glavna im je funkcija neutraliziranje lipofilnih radikala koji nastaju u unutrašnjosti membrana. Tako vitamin E reagira s peroksilnim radikalima brže nego oni uspiju reagirati s nezasićenim masnim kiselinama i proteinima. U plazmi, vitamin E štiti lipoproteine od oksidacije, dok je antioksidacijski učinak  $\beta$ -karotena *in vivo* manje izražen.

Primarna uloga izvanstaničnih antioksidansa je zadržavanje iona željeza i bakra u nereaktivnim oblicima, te spriječavanje njihovog mogućeg međudjelovanja s  $\text{O}_2^*$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Također, iako u izvanstaničnoj tekućini nema unutarstaničnih enzima, dokazana je prisutnost glikoliziranih oblika GPx i SOD. Izvanstanični antioksidansi su transferin, laktoferin, haptoglobin, hemopleksin, albumin, ceruloplazmin, EC-SOS, EC-GSHPx, bilirubin, urati i glukoza (Tablica 1).

Osim ove tri vrste, postoje endogeni i egzogeni antioksidansi. Egzogeni se mogu unositi hranom i dodacima prehrani, a neki od njih su vitamin C, selen, karotenoidi i polifenoli, dok endogeni nastaju u organizmu, ali se u njega mogu unijeti i prehranom. Takvi su antioksidansi na primjer glutation i koenzim Q10. Njihovo je djelovanje prikazano u Tablici 1:

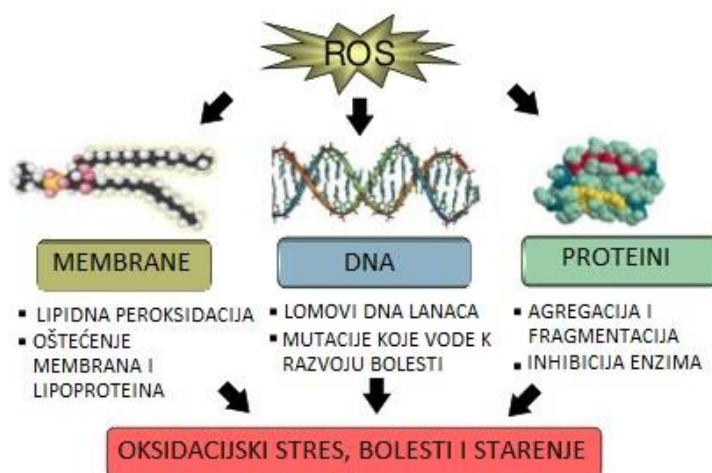
**Tablica 1.** Učinci unutarstaničnih, membranskih, izvanstaničnih, te endogenih i egzogenih antioksidansa (Štefan i sur., 2007).

<b>Unutarstanični antioksidansi</b>	
Superoksid dismutaza (SOD)	Katalitički uklanja $O_2^{\cdot-}$
Katalaza (CAT)	Uklanja $H_2O_2$ kada je prisutan u velikim koncentracijama
Glutation peroksidaza (GPx)	Uklanja $H_2O_2$ kada je prisutan u malim koncentracijama; također uklanja organske hidroperokside
Citokrom oksidaze	Priječi oslobađanje aktivnih kisikovih spojeva tijekom redukcije $O_2$ u $H_2O$
<b>Membranski antioksidansi</b>	
Vitamin E	Antioksidacijsko djelovanje ostvaruje kidanjem lanaca
B-karoten	Ima sposobnost uklanjanja singletnog kisika i slobodnih radikala
Koenzim Q	Ima antioksidacijsko djelovanje u respiratornom lancu
<b>Izvanstanični antioksidansi</b>	
Transferin	Veže ione željeza
Laktoferin	Veže željezo pri nižim vrijednostima pH-a
Haptoglobin	Veže hemoglobin
Hemopleksin	Veže hem
Albumin	Veže bakar, hem i uklanja HOCl
Ceruloplazmin	Veže ione bakra, koristi vodikov peroksid za reoksidaciju bakra
EC-SOD	Katalitički uklanja superoksidni anion
EC-GSHPx	Katalitički uklanja hidroperokside
Bilirubin	Uklanja peroksilne radikale

Urati	Uklanjaju radikale i vežu metale
Glukoza	Uklanja OH•
<b>Endogeni i egzogeni antioksidansi</b>	
Glutation	Uklanja radikale, koristi se za konjugaciju, za regeneraciju askorbata, te kao koenzim
Vitamin C	Uklanja slobodne radikale doniranjem elektrona, pri čemu nastaje slabo reaktivni askorбилni radikal
Polifenoli	Uklanjaju slobodne radikale i vežu metalne ione
Bilirubin	Uklanja peroksilne radikale
Urati	Uklanjaju radikale i vežu metalne ione
Glukoza	Uklanja hidroksilne radikale
Selen	Koenzim glutacion peroksidaza

### 1.3.3. Utjecaj oksidacijskog stresa na stanične strukture

Oksidacijsko oštećenje bioloških struktura podrazumijeva kombinirano djelovanje slobodnih radikala i elemenata u tragovima (željeza i/ili bakra). Strukture koje podliježu ovom tipu oštećenja su proteini, lipidi i molekule DNA (Slika 11).



**Slika 11.** Utjecaj ROS-a na stanične strukture (Anon, 2018d)

Do oštećenja proteina najčešće dolazi Fentonovom reakcijom, gdje je željezo katalizator reakcije. Iz ovoga slijedi kako je oštećenje pojedinih aminokiselina koje grade

proteine ovisno o njihovoj udaljenosti od veznog mjesta Fe iona ili od aktivnog mjesta enzima koji sadrži Fe ili Cu (što je udaljenost manja, to je oštećenje veće). Aminokiseline (AK) koje su najosjetljivije su lizin, prolin, histidin i arginin. Oksidacijsko oštećenje ovih AK u proteinskoj strukturi, enzimom koji sadrži Fe i pomoću  $H_2O_2$ , izaziva stvaranje karbonil-1 skupina na proteinima, odnosno, dolazi do oksidacije proteina. Takve proteine neutralne proteaze razgrađuju do aminokiselina. Ovo oštećenje najčešće izaziva brzi gubitak enzimske aktivnosti mnogih proteina, kao što je glutamin sintaza (GS), međutim, može dovesti i do aktivacije nekih proteina, inaktivirajući njihove inhibitore (Floyd i Carney, 1992). Strukturno, prilikom reakcije sa slobodnim radikalima, može doći i do križnog povezivanja (engl. *cross linking*) proteina. Do ovog poremećaja može doći u prisutstvu molekularnog kisika, ali i u njegovoj odsutnosti kod proteina koji su relativno otporni na redukciju. Proteini se mogu i fragmentirati pomoću  $H_2O_2$  i keliranih metala, uslijed čega dolazi do oslobađanja hidroksilnih radikala ( $OH^\bullet$ ). Prilikom ovog događaja ne nastaju fragmenti različitih dužina, već oni čija je dužina određena (Gutteridge i sur., 1983; Wolff i sur., 1986). Broj fragmenata varira ovisno o proteinu, pri čemu kolagen daje najveći broj. Kako fragmentacija povećava broj amino-skupina, ovo cijepanje predstavlja hidrolizu peptidne veze (Wolff i sur., 1986).

Osim oštećenja proteina, slobodni radikali izazivaju i oštećenje staničnih lipida. Zasićene masne kiseline i masne kiseline koje sadrže jednu dvostruku vezu, puno su otpornije na djelovanje ROS-a, negoli polinezasićene masne kiseline (PUFA). Lipidnu peroksidaciju najčešće uzrokuje  $OH^\bullet$ . Ovaj proces sastoji se od tri dijela: inicijacije, propagacije i terminacije. Započinjanje peroksidacije odnosi se na izdvajanje metilenske ( $-CH_2-$ ) skupine pomoću ROS-a, uslijed čega iz PUFA-e nastaju slobodni lipidni radikali ( $LO^\bullet$ ). Prisutnost dvostrukih veza u masnim kiselinama oslabljuje C-H veze na atomima ugljika u blizini dvostruke veze, što čini premještanje vodika lakšim. Ugljikovi radikali koji tako nastaju, pokušavaju se stabilizirati tvoreći diene, koji se u aerobnim uvjetima mogu spajati s  $O_2$ , te tako stvarati peroksilne radikale ( $LOO^\bullet$ ). Oni dalje eliminiraju  $H^\bullet$  iz neke druge organske molekule, uključujući PUFA, pri čemu se oblikuju lipidni hidroperoksidi ( $LOOH$ ) i reaktivni ugljikovi radikali koji nastavljaju reakciju. Faza propagacije uključuje disocijaciju  $LOOH$  u  $LO^\bullet$  u prisutnosti željeza, što dovodi do reinicijalizacije peroksidacije. Disocijacijom  $LOOH$  dolazi do nakupljanja kratkolančanih produkata aldehida i ugljikovodika. Slobodni radikali koji mogu reagirati s PUFA su  $OH^\bullet$ ,  $HO_2^\bullet$ ,  $RO^\bullet$  i  $RO_2^\bullet$ , dok je superoksidni radikal nedovoljno reaktivan za eliminaciju vodika (Štefan i sur., 2007).

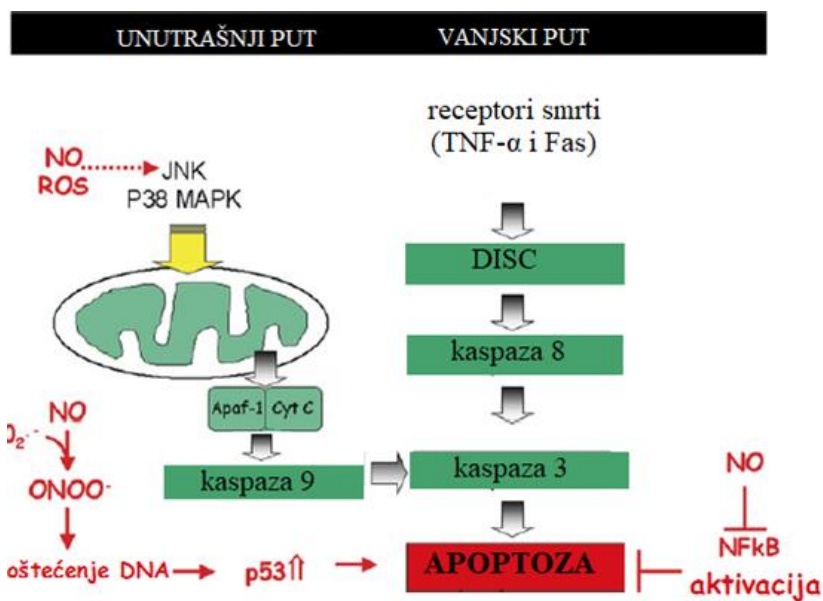
Do oštećenja molekula DNA može doći direktnim i indirektnim mehanizmima. Kako je stanica osjetljiva na oštećenja DNA, ovi su mehanizmi od posebnog interesa pri

istraživanju oksidacijskih oštećenja. Hiperbarični kisik, gamma zračenje, te tvari koje potiču nastanak  $H_2O_2$  i  $O_2^-$  su mutageni koji mogu izazvati deleciju kromosoma, kromosomske dicentrike i izmjenjivanje između sestrinskih kromatida. U slučajevima vanjskog izazivanja nastanka ROS-a (npr. prilikom aktiviranja fagocita dodavanjem  $H_2O_2$ ), oštećenje se može spriječiti dodavanjem katalaze. SOD nije dobra u uklanjanju ROS-a, a pretpostavlja se kako ne može lako proći kroz staničnu membranu. Ipak, ni superoksidni radikal, ni vodikov peroksid ne ulaze u reakciju s DNA, zbog čega su postavljena dva moguća mehanizma. Prvi mehanizam jest formiranje  $OH^\bullet$  radikala.  $H_2O_2$ , koji lako prolazi kroz stanične membrane, može ući u jezgru, te tamo reagirati s ionima željeza ili bakra. Ipak, zbog vrlo visoke reaktivnosti ovog radikala i zbog njegove nemogućnosti difundiranja na velike udaljenosti, ova je hipoteza točna jedino u slučajevima kada do njegovog formiranja dođe u neposrednoj blizini DNA. Kako bi do njegovog formiranja došlo u neposrednoj blizini DNA, mora se dogoditi jedna od sljedećih situacija: a) metalni ioni moraju uvijek biti prisutni oko DNA, što je moguće u slučaju bakrovih iona, za koje se pretpostavlja kako su vezani za kromosome ili b) metalni se ioni uslijed oksidacijskog stresa mogu otpustiti u stanicu, te se onda vezati za DNA. Drugi mogući mehanizam nastanka DNA oštećenja jest izazvanje slijeda metaboličkih događaja koji vode k aktiviranju nukleaza, koje onda cijepaju okosnicu DNA. Takav primjer je porast u koncentraciji unutarstaničnog kalcija ( $Ca^{2+}$ ), koji može fragmentirati DNA aktivirajući endonukleaze ovisne o  $Ca^{2+}$ . Navedeni mehanizmi nisu međusobno isključivi (Halliwell i Aruoma, 1991).

#### **1.3.4. Oksidacijski stres izaziva apoptozu stanica**

Postoje dva puta aktivacije apoptoze: vanjski i unutrašnji put (Slika 12). Vanjski je put aktiviran signalima preko receptora smrti, kao što su TNF- $\alpha$  (engl. *tumor necrosis factor- $\alpha$* ) i Fas/Fas-ligand. Ovi čimbenici smrti stanice djeluju preko DISC signalnog kompleksa (engl. *death-inducing signaling complex*) i kaspaze 8. Unutrašnji se put aktivira staničnim stresom (potpoglavlje 1.3.4.1) i prenosi signal, preko kaspaza opstanka, u mitohondrije gdje dolazi do aktivacije kaspaze 9 oslobađanjem citokroma c. Ova dva puta aktivacije apoptoze konvergiraju na kaspazi 8, koja dovodi do smaknuća stanice. ROS i RNS mogu djelovati na nekoliko točaka ovih puteva. ROS može modulirati signalne molekule preživljavanja, kao što je c-Jun-N-terminalna kinaza i MAP kinaza (p38 protein kinaza aktivirana mitogenima), dok RNS može djelovati dvostruko. Dušikov oksid (NO) može izazvati oštećenje DNA, te tako dovesti do apoptoze aktivirane proteinom p53, ili može uzrokovati aktivaciju NF $\kappa$ B, te tako spriječiti apoptozu (Roberts i sur., 2009).





**Slika 12.** Unutrašnji i vanjski put apoptoze (Roberts i sur., 2009)

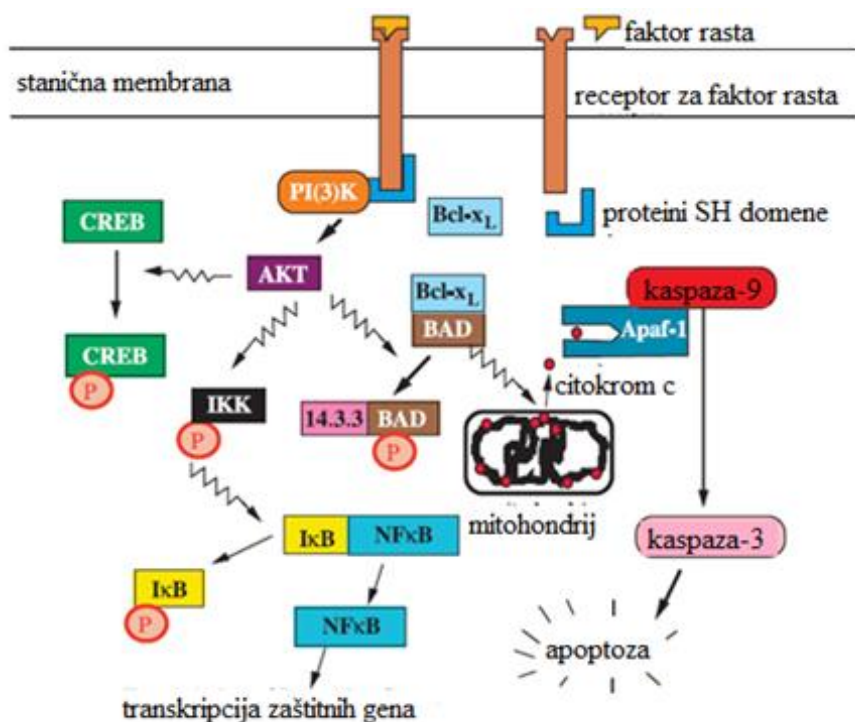
#### 1.3.4.1. Oksidacijski stres i mitohondriji

Superoksidni radikal je primarni kisikov radikal proizveden u mitohondrijima, vjerojatno neenzimatskim mehanizmom. Ubisemikvinon (engl. *ubisemiquinone*) koji nastaje u reakcijama transporta elektrona u respiracijskom lancu, donira elektron molekuli kisika, te tako pruža stalni izvor superoksida (Fridovitch, 1995). Kako superoksid može reagirati s enzimima u čijem je središtu željezo (npr. sukcinat dehidrogenazu ili NADH-ubikvinon oksidoreduktazu), te tako uzrokovati oslobađanje iona željeza, potreban je enzim koji brzo uklanja ovaj radikal. Taj je enzim SOD, uz pomoć se kojeg ovaj radikal uklanja pretvorbom u  $H_2O_2$  prije nego stupi u međureakciju sa svojim supstratom. Drugi, puno štetniji radikal je hidroksil radikal, koji nastaje Fentonovom reakcijom iz  $H_2O_2$ , u prisutnosti željezovih ili bakrovih iona. U spriječavanju oštećenja od strane hidroksil radikala služi enzim GPx, koji vodikov peroksid pretvara u vodu (Beyer, 1991; Fridovitch, 1995).

Jesu li ROS središte procesa apoptoze (programirana stanična smrt, PCD), jesu li važne samo u nekim oblicima PCD, ili su samo nuspojava tog procesa? Ovo pitanje je, izgleda, nastalo zbog različitih pokretača procesa apoptoze. S druge strane, stanična je smrt dio procesa koji nije slučajan i vodi sazrijevanju organizma, i koji je dio razvojne biologije svih vrsta. Poznato je kako se povećanje koncentracije ROS-a može otkriti u ranim stadijima apoptoze aktivirane proteinom p53, otpuštanjem ceramida ili TNF-om (engl. *tumor necrosis factor*). Suprotno tome, sami slobodni radikali kao što su  $H_2O_2$  ili  $O_2^-$ , mogu biti pokretači apoptoze (Liu i sur., 1996).

Apoptoza je proces gdje se cistein proteaze aktiviraju kroz kompleks signalnih kaskada, što uzrokuje razaranje DNA, uslijed čega dolazi do stanične smrti. Nekoliko mitohondrijskih komponenti igra ključnu ulogu u ovoj kaskadi. Početni je signal oslobađanje citokroma c s njegovog veznog mjesta na vanjskoj strani unutrašnje membrane mitohondrija, te njegovo otpuštanje u citosol. Različiti su uzroci ovog oslobađanja, a pretpostavlja se kako se događaju odjednom, s promjenom u propusnosti unutrašnje membrane mitohondrija. U uvjetima niskog ATP-a, visoke koncentracije citosolnog kalcija ili povećanom proizvodnjom ROS-a, adenin nukleotidni translokator (engl. *adenine nucleotide translocator*), koji se nalazi na unutrašnjoj membrani mitohondrija, prolazi kroz konformacijsku promjenu koja omogućuje otpuštanje membranskog potencijala i pH gradijenta. Ovaj se događaj naziva promjena propusnosti mitohondrija (engl. *mitochondrial permeability transition*, MPT) ili otvaranje mitohondrijske prijelazne pore (engl. *mitochondrial transition pore*, MTP) (Raha i Robinson, 2002).

Otpuštanje citokroma c može se potaknuti dodavanjem Bax (Bid, Bax, Baf) grupe proteina. Ovi proteini se oslobađaju mehanizmima koji se pokreću uskraćivanjem čimbenika rasta, sustavima koji nadziru oštećenja stanice, ili preko liganda citokina. U nekim sustavima je dokazana translokacija Bad i Bax iz citosola u mitohondrij, kao odgovor na slobodne radikale ili neke druge apoptotske poticaje (von Harsdorf i sur., 1999). Događaji koji prethode oslobađanju citokroma c ili promjeni permeabilnosti još nisu razjašnjeni. Poznato je kako se protein Bad inaktivira fosforilacijom pomoću Akt kinaze (protein kinaza B) (Slika 13), dok se njime upravlja faktorima preživljavanja kao što je IL-3 (Vander Heiden i sur., 1999).



**Slika 13.** Uloga Akt (protein kinaze B) (Raha i Robinson, 2001)

Prisutstvo ili uskraćivanje čimbenika rasta može značiti život ili smrt brojnim stanicama, zbog postojanja receptora za čimbenike rasta, koji odgovaraju na vezanje vanjskog liganda regrutacijom SH (engl. *sarc homology*) domena (Slika 12). Ove domene sadrže proteine koji djeluju kao aktivatori fosfoinozotid-3 kinaze, a ona tada potiče proizvodnju fosfoinozotid-3-fosfata. Fosfoinozotid-fosfat aktivira Akt (protein kinazu B), serin/treonin protein kinazu. Akt kao supstrat ima brojne supstrate koji su ključni u procesu apoptoze. Najvažniji od njih su ciklični AMP vezni protein (engl. *cyclic AMP response element binding protein*, CREB), IκB kinaza, proapoptotski protein Bad i kaspaza 9 (Hengartner, 2000). Neto učinak aktivacije Akt je smanjenje kataboličkih puteva aktivacijom CREB i uklanjanje apoptotičkih stimulansa pomoću Bad i kaspaze 9. Fosforilacija IκB kinaze uzrokuje fosforilaciju IκB i otpuštanje NFκB u jezgru, gdje NFκB započinje transkripciju brojnih obrambenih mehanizama, uključujući MnSOD (Raha i Robinson, 2001).

Bax grupa proteina, dakle, otpušta citokrom c promjenom voltaže anionskog kanala (engl. *voltage dependent anion channel*, VDAC) na vanjskoj mitohondrijskoj membrani (Narita i sur., 1998; Shimizu i sur., 1999; Hengartner, 2000). Ugradnja VDAC u liposome ne doprinosi propusnosti citokroma c, a dodavanje Bcl-xL zapravo ograničava propusnost liposoma s VDAC za saharozu, dok Bax i Bad povećavaju tu propusnost i omogućavaju prijelaz citokroma c preko membrane.

Ovaj proces odgovara poznatim staničnim utjecajima ove grupe proteina, ali i istraživanjima ovih događaja kod kvasaca s izbrisanim ekspresijom VDAC, gdje nije dolazilo do oslobađanja citokroma c. Također, poznata je činjenica kako suženje VDAC pora, koje su povezane s adenin nukleotid translokazom (engl. *adenine nucleotide translocase*, ANT), uzrokuje restrikciju transporta nukleotida, što dovodi do povećanja membranskog potencijala, skupa s povećanom ekspresijom Bcl-2 grupe proteina. Činjenica kako Bax može reagirati s ANT bilo direktnim ili indirektnim putem temeljena je na istraživanju Marzo i suradnika (1998), koji su dokazali kako su kvasci zaštićeni od apoptoze zbog nulte ekspresije ANT (Raha i Robinson, 2001).

## 1.4. Cilj rada

Podaci ukazuju kako dugotrajno izlaganje anestheticima može biti uzrok nastanka Alzheimerove bolesti koja ne pogađa samo centralni živčani sustav nego izaziva sustavne promjene u organizmu dovodeći do nastanka upale, oksidacijskog stresa i dr. Do pojave oksidacijskog stresa, upale i oštećenja DNA dolazi kod bolesnika podvrgnutih većim kirurškim zahvatima koji traju dulje od 120 minuta. Učinak anestetika na tkiva i organe je različit. Unatoč navedenom, malo je poznato o utjecaju anestetika na periferne organe, posebice u kombinaciji s  $\text{AlCl}_3$ , stoga je glavni cilj ovoga istraživanja procijeniti razinu upale i oksidacijskog stresa na uzorcima perifernih organa nastalih zbog primjene anestetika sevoflurana samog i/ili združenog s  $\text{AlCl}_3$ .

Temeljem navedenog specifični ciljevi rada su istražiti:

a) antioksidacijski/prooksidacijski učinak sevoflurana na  $\text{AlCl}_3$  izazvani oksidacijski stres praćenjem promjena u oksido-redukcijskom statusu u stanicama perifernih organa jetre, slezene, bubrega i pluća mjerenjem razine malondialdehida (MDA), krajnjeg produkta lipidne peroksidacije, glutathiona (GSH), te aktivnosti enzima katalaze (CAT) i superoksid dismutaze (SOD);

b) razinu upale, mjerenjem relativne težine perifernih organa u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu;

c) promjene težine životinja, biokemijskih pokazatelja krvi i osmotske fragilnosti eritrocita kao pokazatelja oštećenja stanica i tkiva te cjelokupnog organizma.

## 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 (Sevofluran i  $\text{AlCl}_3$  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. *Sevofluran*

Kao inhalacijski anestetik korišten je sevofluran ( $\text{C}_4\text{H}_3\text{F}_7\text{O}$ ;  $M_r = 200,005$  g/mol) proizvođača Baxter.

##### 2.1.2.2. *Aluminijev klorid 6-hidrat*

Korišten je aluminijev klorid 6-hidrat ( $\text{AlCl}_3$ ;  $M_r = 241,45$ ) proizvođača Gram-mol d.o.o., Hrvatska.

### **2.1.2.3. D - galaktoza**

Korištena je D (+) -galaktoza (Laktoglukoza; C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>; Mr: 180,16 g/mol) proizvođača Merck, Njemačka. Pripremljena je otopina D-galaktoze otapanjem 432,48 mg D-galaktoze u 10 mL fosfatnog pufera (PBS) do konačne koncentracije od 120 mM.

### **2.1.2.4. Priprema aluminijevog klorida**

Otopina aluminijevog klorida je pripremljena otapanjem AlCl<sub>3</sub> u dozi od 50 mg/kg u destiliranoj vodi. U tako pripremljenu otopinu aluminijeva klorida je dodana prethodno opisana otopina D-galaktoze. Otopine su pomiješane u jednakom volumenu (1:1) i pH je podešen na 7,4 sa 1 M NaOH.

### **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:

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

### 2.2.2. Obrada životinja

Patofiziološke promjene su izazvane intraperitonealnim (*ip*) injiciranjem otopine  $\text{AlCl}_3$  u subkroničnoj dozi od 50 mg/kg štakora i 120 mM D-galaktoze, te anestezijskim štakora sevofluranom (1,5 %) tijekom 21 dana (Tablica 2).

Pokusne životinje su podjeljene u četiri skupine po 6 životinja: 1. skupinu su činili štakori koji su služili kao kontrola te su primali 0,9 % NaCl svaki drugi dan tijekom 21 dana. Drugu skupinu su činili štakori koji su bili izloženi kroz dva sata 1,5 % inhalacijskom anestetiku sevofluranu svaki drugi dan tijekom 21 dana. Treću skupinu su činili štakori koji su primali *ip* gore opisanu otopinu  $\text{AlCl}_3$  + D(+) galaktoze svaki drugi dan tijekom 21 dana, dok su četvrtu skupinu činile životinje koje su 2 h nakon *ip* injiciranja otopine  $\text{AlCl}_3$  + D(+) galaktoze primale 1,5 % inhalacijski anestetik sevofluran kroz dva sata svaki drugi dan tijekom 21 dana.

Nakon 21 dana obrade životinja, životinje su anestezijske i analgezijske *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 2.** Pokusne skupine i način obrade

Skupine pokusnih životinja	Način obrade životinja unutar istraživanja			
	Sastav pokusne otopine	Doziranje	Način primjene	Period obrade (dani)
0. Kontrola	0,9 % NaCl	0,5 mL svaki drugi dan	<i>ip</i>	21
1.sevofluran	sevofluran, inhalacijski anestetik	1,5 % svaki drugi dan	inhalacijski	21
2. $\text{AlCl}_3$ 50 mg/kg + 120 mM D-galaktoza	50 mg/kg $\text{AlCl}_3$ u 0,5 mL $\text{dH}_2\text{O}$ + 120 mM D-galaktoza u PBS-u	0,5 mL svaki drugi dan	<i>ip</i>	21
3. $\text{AlCl}_3$ 50 mg/kg + 120 mM D-galaktoza u kombinaciji sa sevofluranom	50 mg/kg $\text{AlCl}_3$ u 0,5 mL $\text{dH}_2\text{O}$ + 120 mM D-galaktoza u PBS-u u kombinaciji sa sevofluranom	0,5 mL pokusne otopine u kombinaciji sa 1,5 % inhalacijskim anestetikom svaki drugi dan	<i>ip</i> + inhalacijski	21

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

Izolirana tkiva jetre, slezene, pluća i bubrega pohranjena su na -80 °C do pripreme za analizu. Tjedan dana nakon pohrane, odvagano je 70-100 mg organa u Eppendorf epruvetu volumena 2 mL, dodan fosfatni pufer (PBS) u omjeru 1:10 te su uzorci homogenizirani ultrazvučnim homogenizatorom. Dobiveni homogenati su centrifugirani na 15000 okretaja kroz 15 min na 4 °C, a nakon centrifugiranja je odvojen nadtalog, te su napravljena razrjeđenja. Potom su svi uzorci pohranjeni na -20 °C do analiza.

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

#### ***2.2.4.1. Određivanje proteina metodom po Lowryju***

U određivanju količine proteina koristio se protokol koji su predložili Lowry i sur. (1951).

Ova metoda bazira se na reakciji  $\text{Cu}^{2+}$  iona i Folinova reagensa (komercijalni reagens razrijeđen vodom, Mr: 260,2 g/mol), koji sadrži fosfovolframsku i fosfomolibdensku kiselinu, sa proteinima. Ioni  $\text{Cu}^{2+}$  vežu se u lužnatom mediju na peptidne veze i reduciraju u  $\text{Cu}^+$  te nastaje kompleks  $\text{Cu}^+$  - protein. Nakon dodatka Folinova reagensa dolazi do reakcije  $\text{Cu}^+$  - protein kompleksa sa Folinovim reagensom pri čemu se razvija konačno plavo obojenje otopine.

Metodom po Lowryju izmjerena je koncentraciju proteina u tkivima jetre, slezene, pluća i bubrega, korištenjem razrjeđenja 10x. U svaku epruvetu stavljanje je 100  $\mu\text{L}$  nadtaloga i 2 mL otopine D te su potom uzorci inkubirani 10 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim je dodano 200  $\mu\text{L}$  otopine Folinova reagensa, nakon čega su uzorci vorteksirani te ponovo inkubirani u mraku na sobnoj temperaturi 30 minuta. Apsorbancija je mjerena na spektrofotometru na valnoj duljini od 600 nm. Kao standard je korišten albumin goveđeg seruma (engl. *Bovine serum albumin*, BSA) u poznatim koncentracijama (od 2 mg/mL prema manjim koncentracijama (1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125; 0,015625 mg/mL). Vrijednosti proteina dobivene su korištenjem standarne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji BSA iz koje je prvo izračunat nagib pravca. Korištenjem dobivene vrijednosti nagiba pravca, izračunata je koncentracija proteina u uzorcima prema formuli:

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

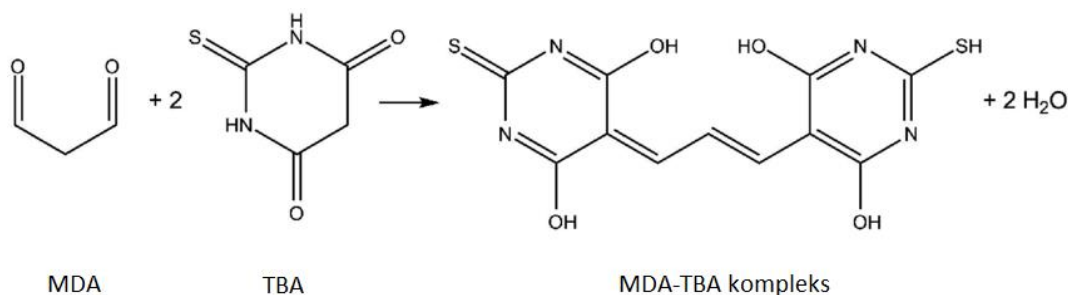
Dobivene koncentracije izražene su kao mg proteina/mL.



#### 2.2.4.2. Mjerenje razine lipidne peroksidacije

Količinu lipidne peroksidacije određena je modificiranim protokolom koji su predložili Jayakumar i sur. (2007).

Ovom se metodom mjeri koncentracija malondialdehida (MDA), jednog od glavnih produkata lipidne peroksidacije, koji u organizmu nastaje kada reaktivni kisikovi spojevi razgrađuju višestruke nezasićene masne kiseline. Metoda koja se najčešće koristi za određivanje koncentracije MDA u biološkom uzorku je derivatizacija MDA s 2-tiobarbituratnom kiselinom (TBA) pri čemu MDA reagira s dva ekvivalenta TBA i nastaje MDA-(TBA)<sub>2</sub> kompleks (Slika 14). Reakcija se odvija u kiselim uvjetima i pri temperaturi od 95° C pri čemu nastaje crveni fluorescentni kompleks MDA-(TBA)<sub>2</sub> čija se koncentracija mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini 532 nm. Princip ove metode se zasniva na sljedećoj reakciji:



**Slika 14.** Mehanizam reakcije TBARS s tiobarbiturnom kiselinom (Anon, 2018e)

Za mjerenje MDA u uzorcima tkiva korišteni su homogenati. U Eppendorf epruvete stavljeno je 100  $\mu$ L homogenata i 1,6 mL otopine A (Tablica 3). Pripremljene epruvete na stalku bile su omotane aluminijskom folijom i stavljene u vodenu kupelj na 95 °C 60 minuta. Nakon toga, stalak s epruvetama stavljen je na led kako bi se otopina naglo ohladila, prilikom čega su se folikule, nastale mješanjem uzorka i otopine A, slegnule na dno. Kako bi se lakše odvojio nadtalog, uzorci su centrifugirani 10 minuta na 5000 okretaja. Apsorbancija nadtaloga mjerena je spektrofotometrijski na 532 nm. Ukupna koncentracija MDA izračunata je pomoću ekstinkcijskog koeficijenta za MDA ( $\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) prema sljedećoj formuli:

$$c = \frac{A_{\text{uzorka}} \times V_{\text{reakcijske smjese}}}{\epsilon \times V_{\text{uzorka}} \times c_{\text{proteina u uzorku}}}$$

Koncentracija je iskazana kao nmol MDA po mg proteina.

**Tablica 3.** 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 razine ukupnog glutationa (GSH)

Koncentracija ukupnog glutationa određena je prema modificiranom protokolu koji je predložio Tietze (1969).

Metoda se temelji na reakciji tiolnog reagensa 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoične kiseline (DTNB, Ellmanov reagens) s GSH pri čemu se stvara kromofor (5-tionitrobenzoična kiselina - TNB koja apsorbira pri valnoj duljini 405 - 414 nm. Osim TNB, stvara se i miješani disulfid, GS - TNB čijom se redukcijom pomoću GSH reduktaze (GR) i NADPH otpušta molekula TNB i reciklira GSH. Brzina nastanka TNB proporcionalna je reciklirajućoj reakciji koja je proporcionalna koncentraciji glutationa u uzorku. Pri ovoj metodi sav oksidirani GSH (disulfid GSSG) prisutan u reakcijskoj smjesi ili nastao iz miješanog disulfida GS-TNB brzo se reducira do GSH. Konačan rezultat koji se dobije odgovara ukupnoj koncentraciji reduciranog i oksidiranog GSH u uzorku.

Za mjerenje GSH u uzorcima tkiva, korišteno je razrjeđenje 40x za jetru i slezenu, te razrjeđenje 10x za pluća i bubreg. Koncentracija ukupnog GSH mjeri se u mikrotitarskoj pločici. U svaku jažicu stavljeno je 20 µL uzorka, 40 µL 0,035 M HCl i 40 µL 10 mM DTNB, te je apsorbancija mjerena na valnoj duljini od 415 nm. Zatim je dodano 100 µL otopine GR (20 µL GR (50 U/mL) + 9980 µL 0,8 mM NADPH) te je apsorbancija mjerena tijekom 5 min. Nacrtani su pravci za sve standarde kao promjena apsorbancije u vremenu. Očitani su nagibi

pravaca, nacrtan je pravac kao ovisnost nagiba pravca o koncentraciji GSH. Konačno, taj dobiveni pravac korišten je za dobivanje koncentracije ukupnog GSH u uzorku prema

$$c = \frac{(\text{nagib pravca} - \text{nagib pravca slijepe probe})}{\text{nagib pravca standarda}} \times \text{razrjeđenje}$$

sljedećoj formuli

Koncentracija ukupnog GSH prikazna je kao  $\mu\text{M}$  GSH po mL proteina.

#### 2.2.4.4. Mjerenje enzimatske aktivnosti katalaze (CAT)

Aktivnost katalaze određena je spektrofotometrijskom metodom po Aebiju (1984).

Ovom se metodom aktivnost katalaze određuje kao količina potrošenog  $\text{H}_2\text{O}_2$  koji se razgađuje na vodu i kisik. U kivetu ukupnog volumena 1 mL dodano je 980  $\mu\text{L}$  10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  te 20  $\mu\text{L}$  uzorka. Korištena razrjeđenja uzoraka bila su: 40x za jetru i slezenu, te 10x za pluća i bubreg. Aktivnost katalaze mjerila se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 240 nm tijekom jedne minute i izračunata je prema formuli:  $c = \frac{A_{\text{uzorka}}}{\varepsilon(\text{H}_2\text{O}_2) \times l} \times \text{razrjeđenje}$ , 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 enzimatske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

Aktivnost superoksid dismutaze određena je prema metodi inhibicije redukcije citokroma  $c$  u sustavu ksantin/ksantin oksidaza (XOD) (metoda po Flohéu i Öttingu, 1971).

Superoksid dismutaza je metaloenzim koji katalizira dismutaciju dvaju superoksidnih radikala ( $\text{O}_2^-$ ) u  $\text{H}_2\text{O}_2$  i  $\text{O}_2$ . U ovoj su metodi korištene dvije slijepe probe. Prva se sastojala od otopine A te je apsorbancija mjerena u UV-160 Shimadzu spektrofotometru na 550 nm tijekom 3 minute. Druga slijepa proba služila je za namještanje aktivnosti ksantin oksidaze (XOD), koja mora biti oko 0,025 U/min. U kivetu je dodano 25  $\mu\text{L}$  fosfatnog pufera, 1,45 mL otopine A, a zatim enzim XOD u početnom volumenu od 25  $\mu\text{L}$  (Tablica 4). Nakon što se postigla optimalna aktivnost SOD, uzorci su analizirani. U svaku reakcijsku smjesu, umjesto pufera, dodano je 25  $\mu\text{L}$  uzorka te odgovarajući volumen ksantin oksidaze i odmah nakon toga mjerena je apsorbancija u spektrofotometru.

Za određivanje aktivnosti SOD prvo je izračunat postotak inhibicije aktivnosti XOD prema formuli:  $\% \text{ inhibicije} = 100 - \frac{\Delta A_{\text{uzorka}}}{\Delta A_{\text{slijepe probe}}} \times 100$ . Iz % inhibicije je zatim izračunata aktivnost SOD izražena kao U/mL uzorka prema formuli:

$aktivnost\ SOD = 10 \frac{\% inhibicije + 12,757}{30,982}$ . Aktivnost SOD izražena kao U/mg proteina je zatim izračunata prema formuli:  $aktivnost\ SOD = \frac{aktivnost\ SOD\ U/mL}{c_{proteina\ u\ uzroku}} \times razrjeđenje$ . Korištena razrjeđenja bila su 40x za jetru i slezenu, te 10x za pluća i bubreg.

**Tablica 4.** Priprema otopina za određivanje aktivnosti SOD

Otopine	Način pripreme otopina
50 mM PBS	Pomiješati 17 mL (1,56 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O u 50 mL dH <sub>2</sub> O) i 183 mL (5,678 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> u 200 mL dH <sub>2</sub> O), namjestiti pH=7,8 te nadopuniti do 800 mL
50 mM PBS s 0,1 mM EDTA	3,72 mg EDTA u 100 mL 50 mM PBS
Reakcijska otopina A	190 mL 0,05 mM citokroma c (29 mg citokroma c u 50 mM PBS s 0,1 mM EDTA do 190 mL) i 19 mL 1 mM ksantina (3 mg ksantina u 19,74 mL 1 mM NaOH, teško se otapa, lagano zagrijavati)
Reakcijska otopina B XOD (aktivnost 0,8 U/mL)	40 µL ksantin oksidaze i 960 µL dH <sub>2</sub> O

### **2.2.5. Analiza biokemijskih parametara**

Za procjenu biokemijskih parametara krvi, uzorci krvi bili su prikupljeni u epruvete s vakuumom bez antikoagulansa, te je serum bio korišten za daljnju biokemijsku analizu. Od biokemijskih parametara određeni su: albumin (ALB), alanin aminotransferaza (ALT), alkalna fosfataza (ALP), amilaza (AMY), dušik uree u krvi (engl. *blood urea nitrogen*, BUN), kreatinin (CRE), glukoza u krvi, ukupni bilirubin (engl. *total bilirubin*, TBIL), ukupni proteini (engl. *total protein*, TP), natrij, kalij, kalcij, fosfati i globulin (GLOB) korištenjem VetScan® kita (engl. *Comprehensive Diagnostic Profile reagent rotor*) na VetScan® VS2 uređaju (Abaxis, UK).

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

Selektivno propusne stanične membrane uspostavljaju osmotski gradijent između stanične i izvanstanične tekućine. Jačina osmotskog tlaka ovisi o koncentraciji nedifuzibilnih

iona s obje strane membrane. Za 0,9 % otopinu NaCl kaže se da je **izotonična**: stave li se eritrociti u takav medij, preko njihove će se membrane uspostaviti osmotska ravnoteža između stanične i izvanstanične tekućine, pa će neto ulaz i izlaz vode biti nula. U **hipertoničnom** mediju, npr. 1,8 % NaCl, stanice gube svoj normalni bikonkavni oblik uslijed brzog osmotskog gubitka vode. U **hipotoničnom** mediju, npr. 0,4 % NaCl ili destilirana voda, dolazi do povećanog ulaska vode u stanicu: stanice bubre, narušava se cjelovitost stanične membrane i dolazi do hemolize – hemoglobin izlazi iz stanice i otapa se u okolnom mediju.

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

Pripremljen je niz epruveta s po 0,9 mL 0,9 %; 0,8 %; 0,7 %; 0,6 %; 0,5 %; 0,4 %; 0,3 %; 0,2 %; 0,1 % i 0,0 % otopine NaCl. Uzorak krvi promiješan je štapićem kako bi se dobila homogena suspenzija stanica. Pipetom se zatim rasporedi po 0,01 mL uzorka krvi u priređene epruvete, nakon čega se uzorci inkubiraju 30 minuta. Epruvete se zatim centrifugiraju 10 min na 2200 okretaja/min. Nadtalog se zatim mjeri spektrofotometrijski na 540 nm, pri čemu se prva epruveta (0,9% NaCl) koristi kao slijepa proba.

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

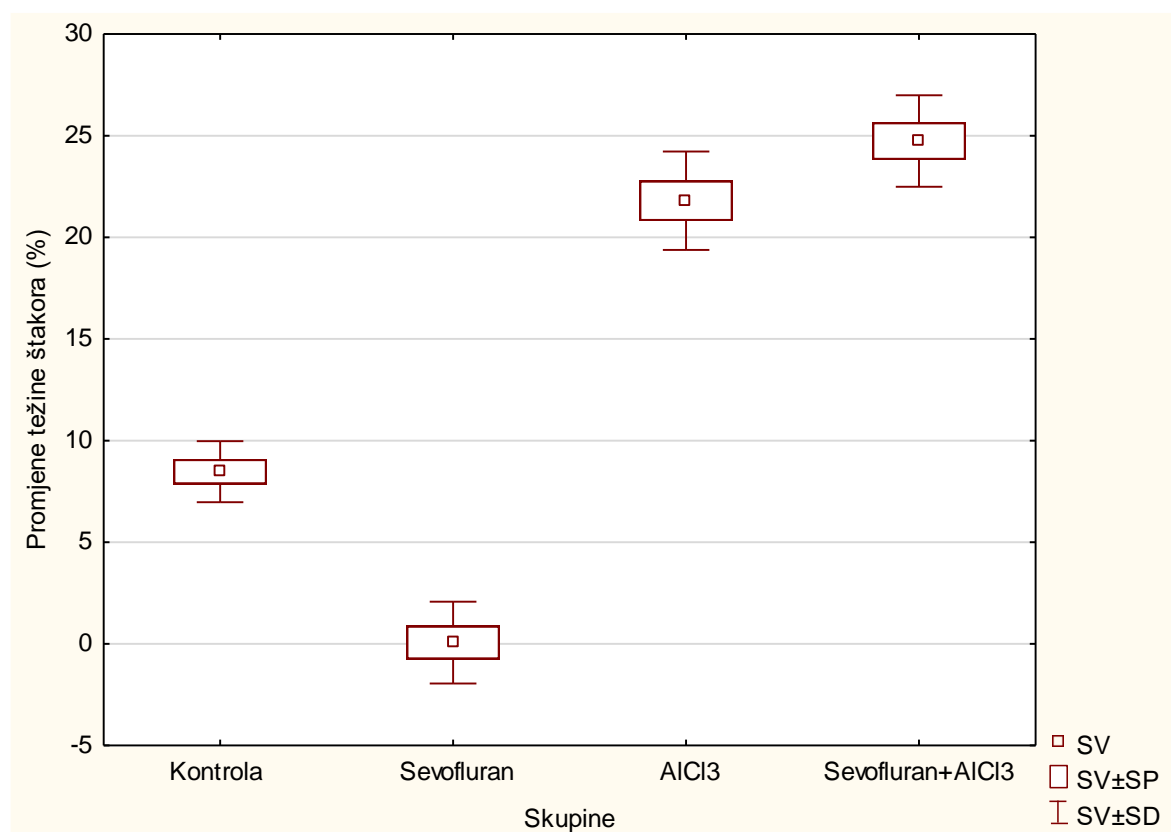
Statistička analiza je provedena pomoću STATISTICA 13 programa (StatSoft, Tulsa, OK, USA), a statistička točnost određena je s  $P < 0,05$ . Svi rezultati izraženi su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška (SV  $\pm$  SP). Podaci su analizirani pomoću Kruskal-Wallis ANOVA-a testa. Daljnja analiza razlika između skupina napravljena je višestrukom komparacijom srednjih vrijednosti svih skupina. Rezultati su prikazani tablično i grafički pomoću box-plot prikaza.

Za pripremu podataka korišten je računalni program Microsoft Excel 2003, dok je za statističku analizu podataka korišten statistički program STATISTICA 13.0 (StatSoft, Tulsa, SAD).

## 3. REZULTATI

### 3.1. Promjena težine štakora

Analiza rezultata promjene težine štakora ukazuje na značajne promjene obrađenih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 15). U skupini obrađenoj s  $\text{AlCl}_3$  i kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  vidljiva je povećana težina štakora nakon obrade, dok je kod skupine obrađene sevofluranom primjećena smanjena težina štakora u odnosu na kontrolnu skupinu. Statistički značajna odstupanja vidljiva su između skupina kako slijedi: Kontrola vs Sevofluran +  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,05$ ); Sevofluran vs  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,01$ ); Sevofluran vs Sevofluran +  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,001$ ).



**Slika 15.** Promjena težine štakora obrađenih sevofluranom,  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom i kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom.

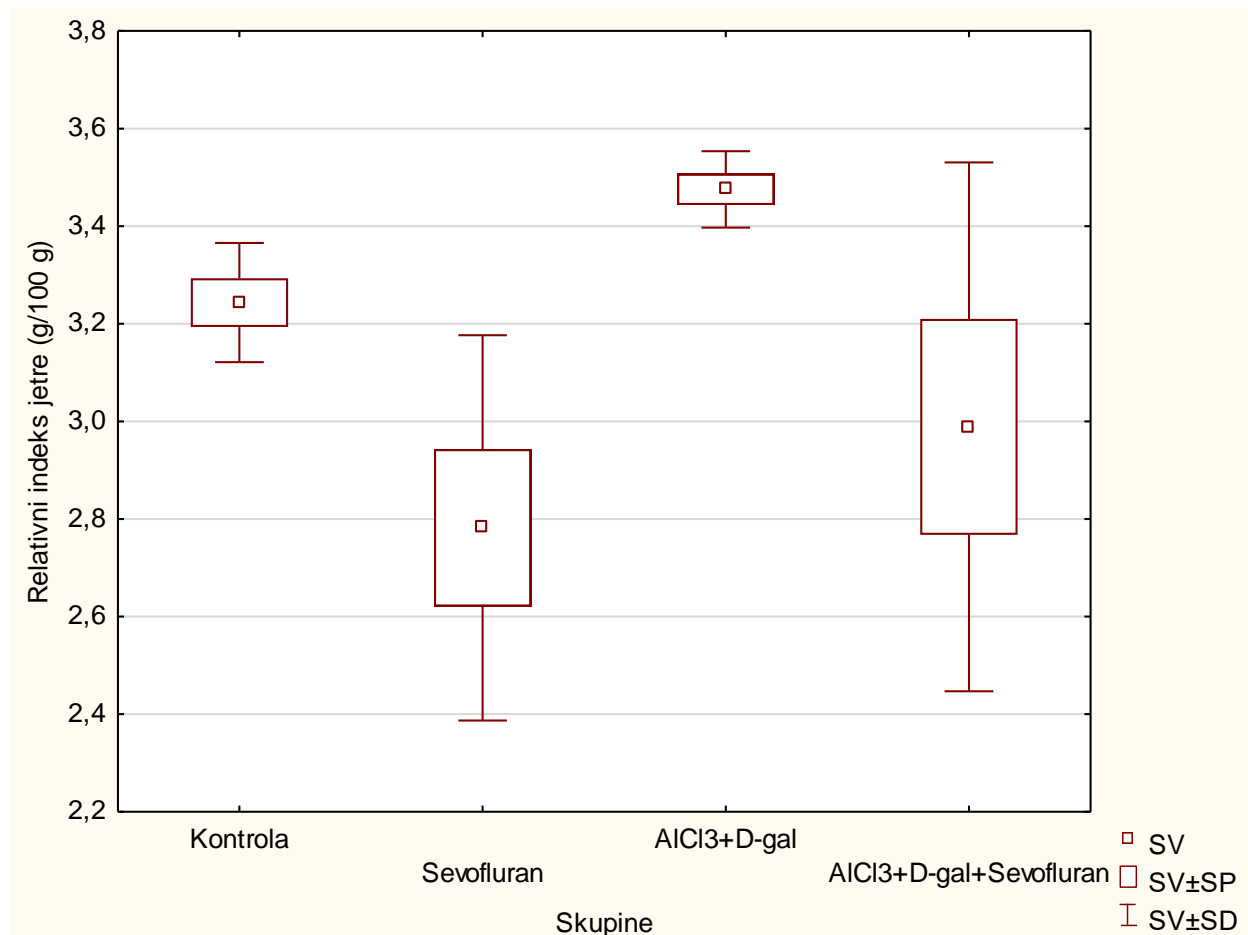
Štakori ( $N=6$ ) su obrađeni sevofluranom (1,5 %),  $\text{AlCl}_3$  (50 mg/kg) ili kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  (2 h nakon *ip* injiciranja  $\text{AlCl}_3$ , štakori su izloženi 1,5 % sevofluranu) svaki drugi dan tijekom 21 dana. Dobiveni su rezultati prikazani kao  $\text{SV} \pm \text{SD}$  (SP).

Statistički značajno različito: Kontrola vs Sevofluran +  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,05$ ); Sevofluran vs  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,01$ ); Sevofluran vs Sevofluran +  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,001$ ).

Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija;  $\text{AlCl}_3$  – aluminijski klorid; D-gal – D-galaktoza.

### 3.1.1. Relativni indeks jetre

Analiza rezultata relativnog indeksa jetre (Slika 16) pokazuje statistički značajne razlike između skupina izloženih sevofluranu i  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,01$ ) i skupina izloženih  $\text{AlCl}_3$  i kombinaciji sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,05$ ).



**Slika 16.** Relativni indeks jetre štakora obrađenih sevofluranom,  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom i kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom.

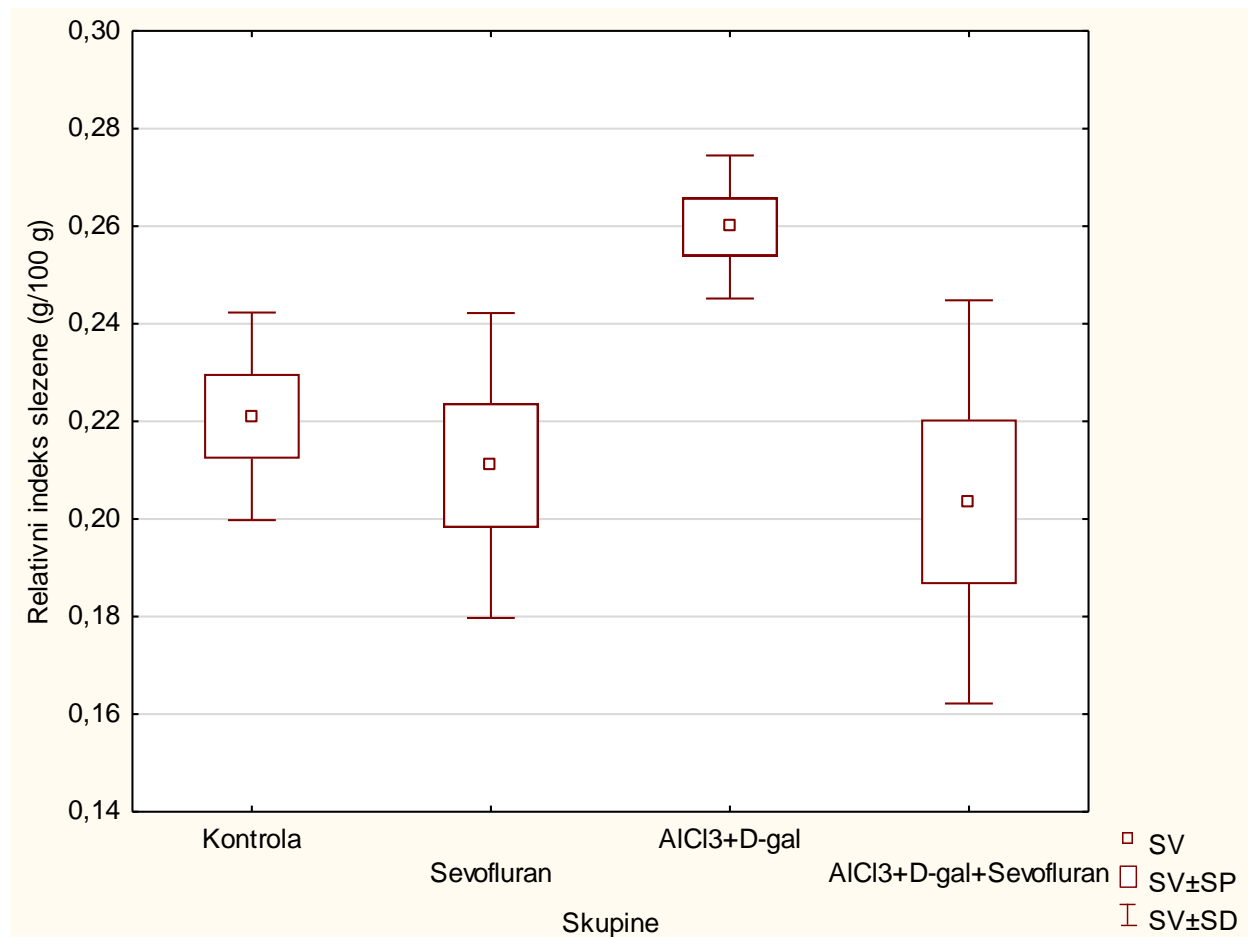
Štakori (N=6) su obrađeni sevofluranom (1,5 %),  $\text{AlCl}_3$  (50 mg/kg) ili kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  (2 h nakon *ip* injiciranja  $\text{AlCl}_3$ , štakori su izloženi 1,5 % sevofluranu) svaki 2 dan tijekom 21 dana. Dobiveni su rezultati prikazani kao  $\text{SV} \pm \text{SD}$  (SP).

Statistički značajno različito: Sevofluran vs  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,01$ );  $\text{AlCl}_3$  vs Sevofluran +  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,05$ ).

Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija,  $\text{AlCl}_3$  – aluminij klorid, D-gal – D-galaktoza.

### 3.1.2. Relativni indeks slezene

Analiza rezultata relativnog indeksa slezene (Slika 17) pokazuje statistički značajnu razliku jedino između skupine izložene  $\text{AlCl}_3$  i one izložene kombinaciji sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,05$ ).



**Slika 17.** Relativni indeks slezene štakora obrađenih sevofluranom,  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom i kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom.

Štakori (N=6) su obrađeni sevofluranom (1,5 %),  $\text{AlCl}_3$  (50 mg/kg) ili kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  (2 h nakon *ip* injiciranja  $\text{AlCl}_3$ , štakori su izloženi 1,5 % sevofluranu) svaki 2 dan tijekom 21 dana. Dobiveni su rezultati prikazani kao  $\text{SV} \pm \text{SD}$  (SP).

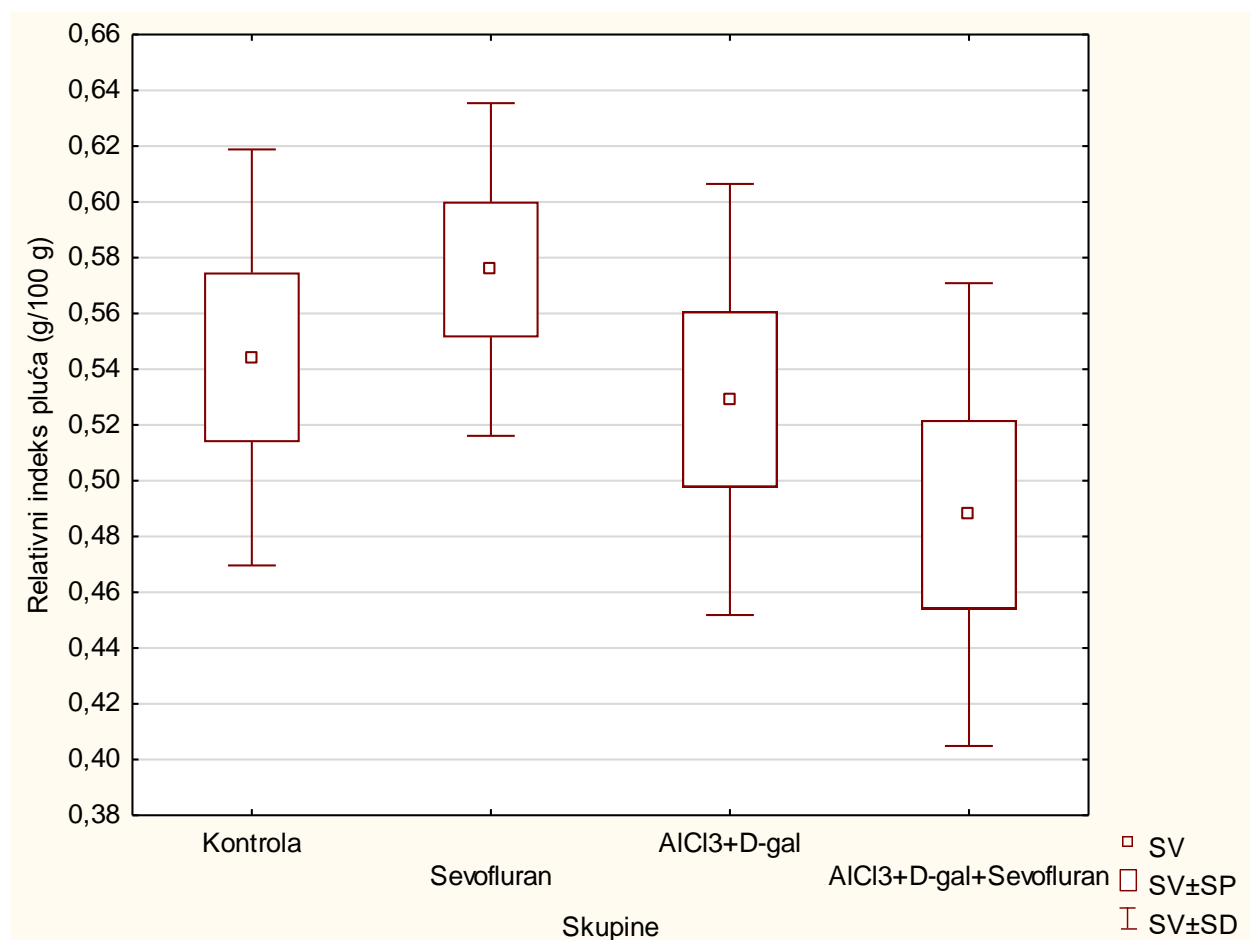
Statistički značajno različito:  $\text{AlCl}_3$  vs Sevofluran +  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,05$ ).

Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija,  $\text{AlCl}_3$  – aluminij klorid, D-gal – D-galaktoza.



### 3.1.3. Relativni indeks pluća

Analiza rezultata relativnog indeksa pluća pokazuje kako nema statistički značajne razlike između nijedne od skupina (Slika 18).



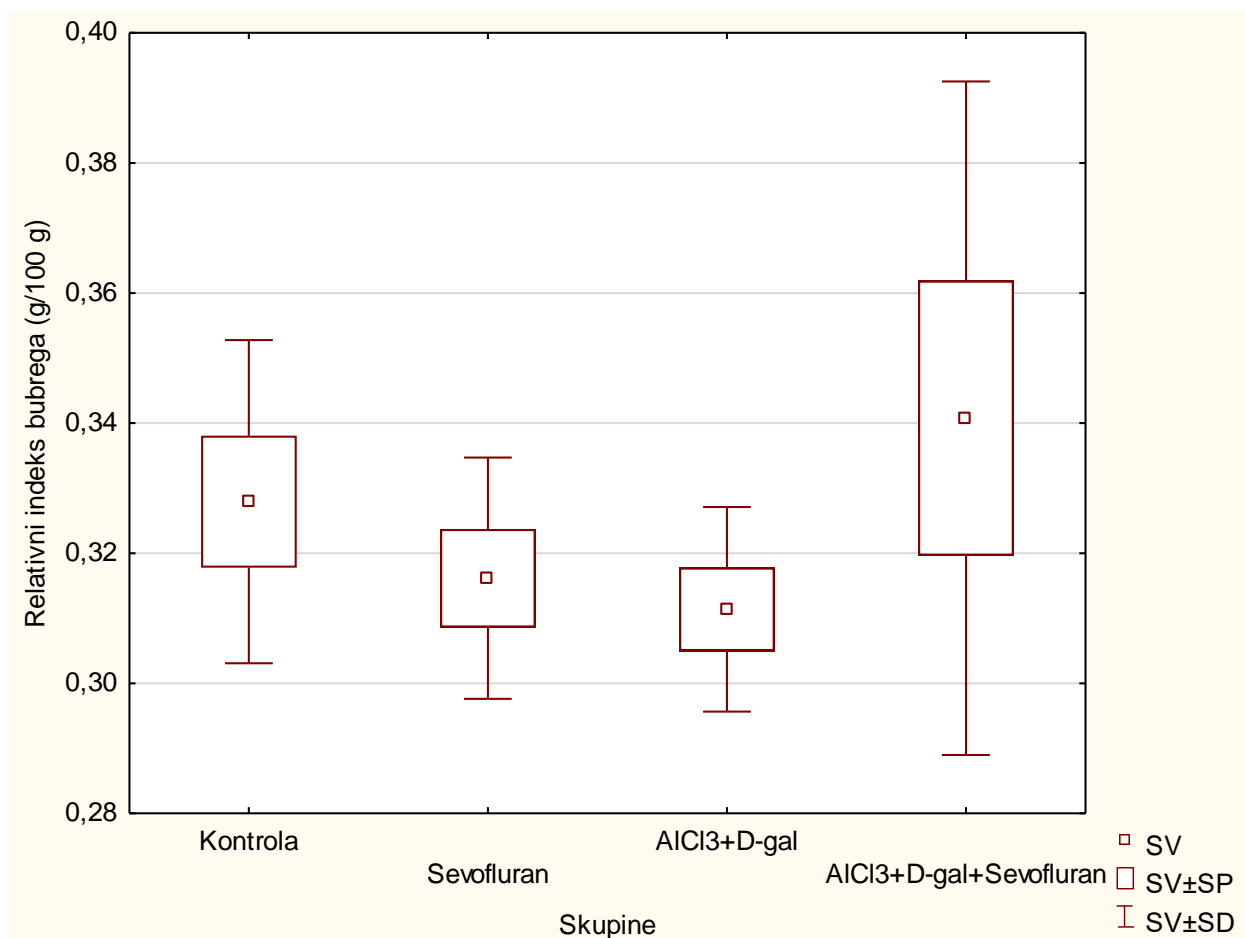
**Slika 18.** Relativni indeks pluća štakora obrađenih sevofluranom,  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom i kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom.

Štakori (N=6) su obrađeni sevofluranom (1,5 %),  $\text{AlCl}_3$  (50 mg/kg) ili kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  (2 h nakon *ip* injiciranja  $\text{AlCl}_3$ , štakori su izloženi 1,5 % sevofluranu) svaki 2 dan tijekom 21 dana. Dobiveni su rezultati prikazani kao  $\text{SV} \pm \text{SD}$  (SP).

Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija,  $\text{AlCl}_3$  – aluminij klorid, D-gal – D-galaktoza.

### 3.1.4. Relativni indeks bubrega

Analiza rezultata relativnog indeksa bubrega pokazuje kako nema statistički značajne razlike između nijedne od skupina (Slika 19).



**Slika 19.** Relativni indeks bubrega štakora obrađenih sevofluranom, AlCl<sub>3</sub> s D-galaktozom i kombinacijom sevoflurana i AlCl<sub>3</sub> s D-galaktozom.

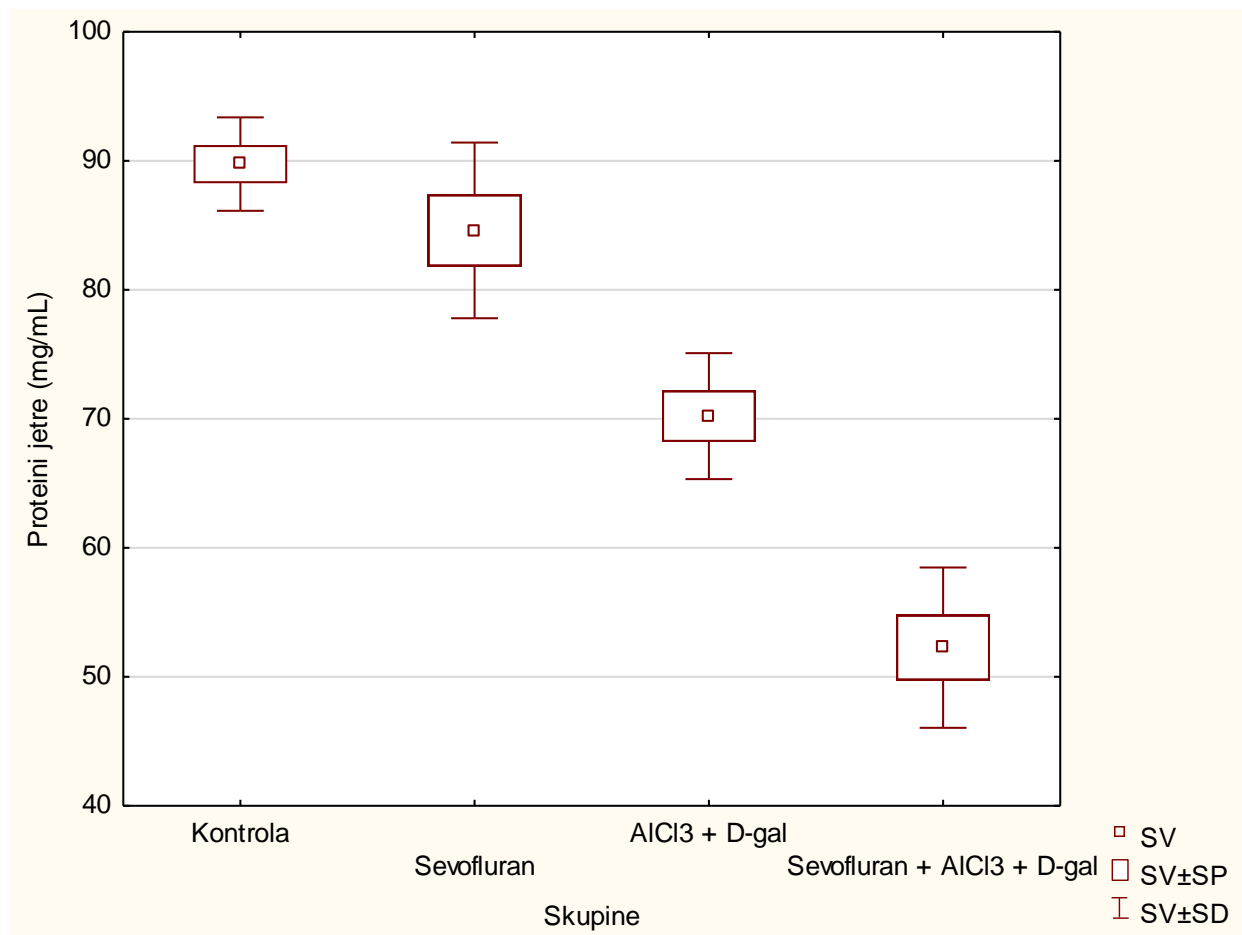
Štakori (N=6) su obrađeni sevofluranom (1,5 %), AlCl<sub>3</sub> (50 mg/kg) ili kombinacijom sevoflurana i AlCl<sub>3</sub> (2 h nakon *ip* injiciranja AlCl<sub>3</sub>, štakori su izloženi 1,5 % sevofluranu) svaki 2 dan tijekom 21 dana. Dobiveni su rezultati prikazani kao SV± SD (SP).

Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija, AlCl<sub>3</sub> – aluminij klorid, D-gal – D-galaktoza.

## 3.2. Oksidacijski stres u perifernim tkivima organa štakora

### 3.2.1. Ukupni proteini u uzorcima tkiva jetre štakora

Rezultati mjerenja ukupnih proteina u tkivu jetre štakora (Slika 20) pokazuju manju količinu proteina u svim skupinama u odnosu na kontrolnu skupinu. Rezultati analize količine proteina u tkivu jetre štakora ukazuju na statistički značajnu razliku između kontrolne skupine i skupine obrađene kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,001$ ) i skupine obrađene kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu ( $P < 0,01$ ).



**Slika 20.** Koncentracija ukupnih proteina u uzorcima tkiva jetre štakora obrađenih sevofluranom,  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom i kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom.

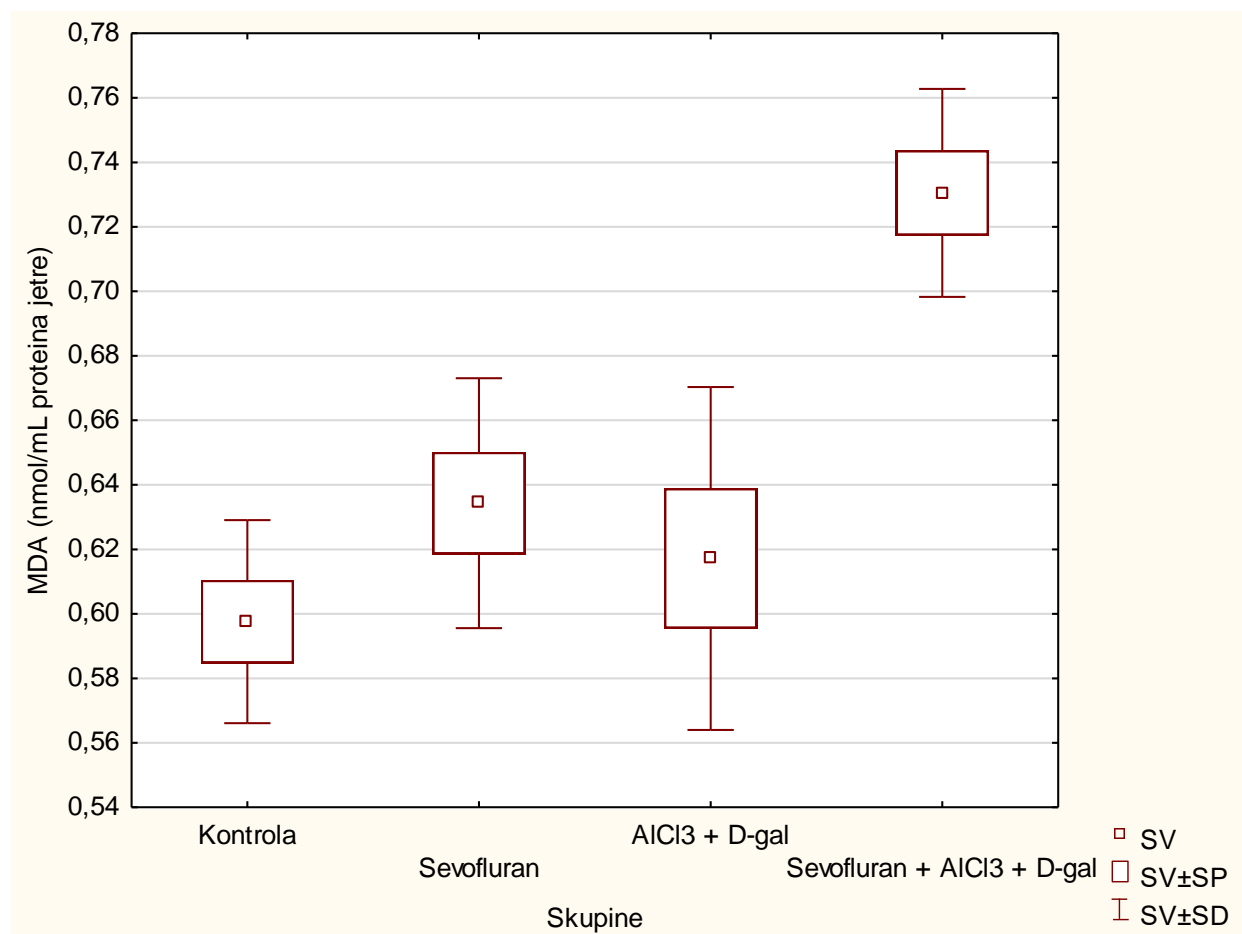
Štakori (N=6) su obrađeni sevofluranom (1,5 %),  $\text{AlCl}_3$  (50 mg/kg) ili kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  (2 h nakon *ip* injiciranja  $\text{AlCl}_3$ , štakori su izloženi 1,5 % sevofluranu) svaki drugi dan tijekom 21 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV $\pm$  SD (SP).

Statistički značajno različito: Kontrola vs Sevofluran +  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,001$ ); Sevofluran vs Sevofluran +  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,01$ ).

Kratice: SV - srednja vrijednost, SP - standardna pogreška, SD - standardna devijacija;  $\text{AlCl}_3$  - aluminij klorid, D-gal – D-galaktoza.

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

Rezultati mjerenja MDA u tkivu jetre štakora (Slika 21) pokazuju veću vrijednost u skupinama obrađenim sevofluranom ili kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  u odnosu na kontrolnu skupinu. Rezultati analize količine MDA u tkivu jetre štakora ukazuju na statistički značajnu razliku između kontrolne skupine i skupine obrađene kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,01$ ) i skupine obrađene kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  u odnosu na skupinu izloženu  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,05$ ).



**Slika 21.** Koncentracija MDA u uzorcima tkiva jetre štakora obrađenih sevofluranom,  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom i kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom.

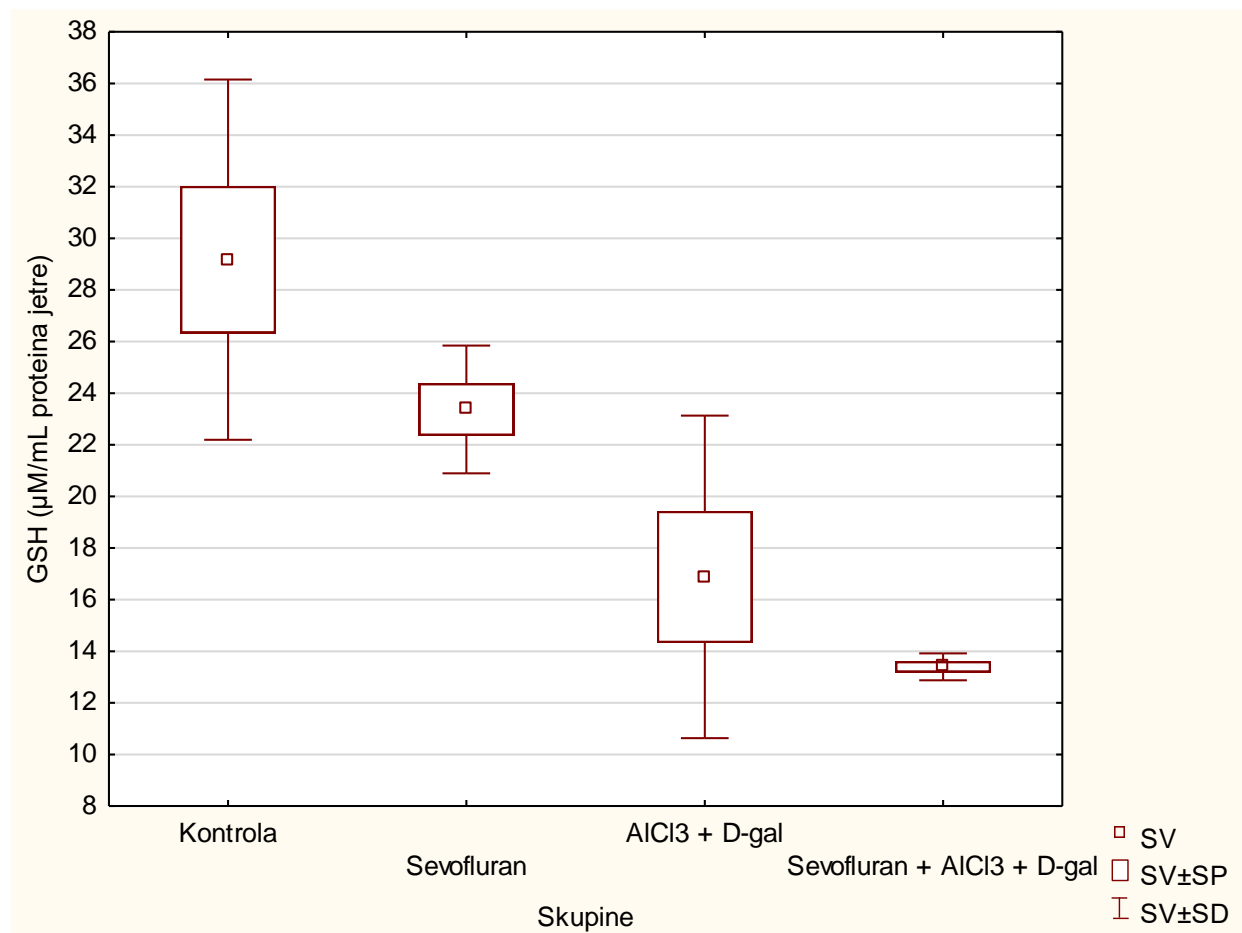
Štakori (N=6) su obrađeni sevofluranom (1,5 %),  $\text{AlCl}_3$  (50 mg/kg) ili kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  (2 h nakon *ip* injiciranja  $\text{AlCl}_3$ , štakori su izloženi 1,5 % sevofluranu) svaki drugi dan tijekom 21 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $\text{SV} \pm \text{SD}$  (SP).

Statistički značajno različito: Kontrola vs Sevofluran +  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,01$ );  $\text{AlCl}_3$  vs Sevofluran +  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,05$ ).

Kratice: SV - srednja vrijednost, SP - standardna pogreška, SD - standardna devijacija;  $\text{AlCl}_3$  - aluminij klorid, D-gal - D-galaktoza.

### 3.2.3. Mjerenje razine ukupnog glutationa (GSH) u uzorcima tkiva jetre štakora

Rezultati određivanja koncentracije ukupnoga glutationa (Slika 22) ukazuju na pad koncentracije GSH u svim obrađenim skupinama u odnosu na kontrolnu skupinu. Razlika u koncentraciji GSH postoji između kontrolne skupine i skupine izložene  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,05$ ) i između kontrolne skupine i skupine obrađene kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,01$ ).



**Slika 22.** Koncentracija GSH u uzorcima tkiva jetre štakora obrađenih sevofluranom,  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom i kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom.

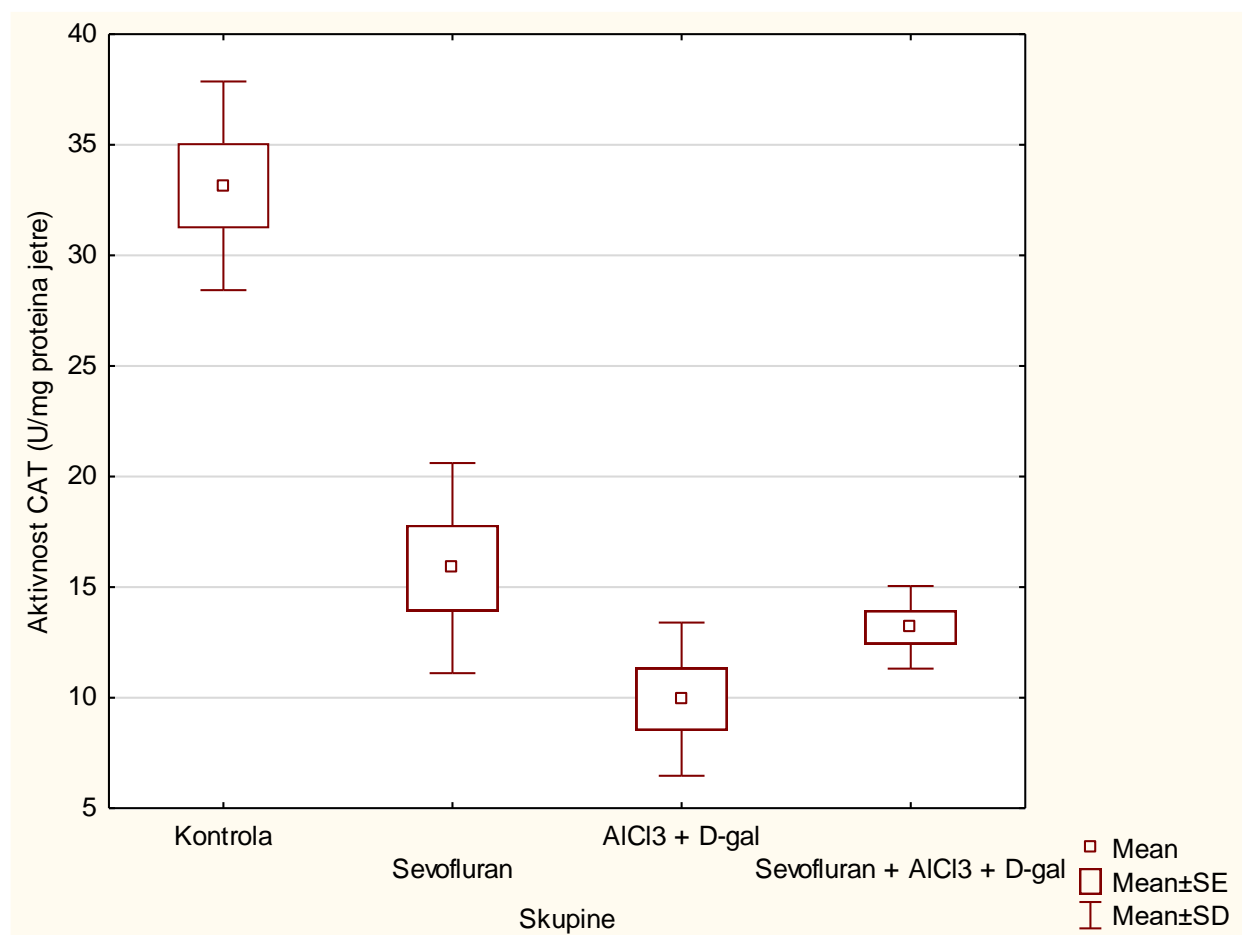
Štakori (N=6) su obrađeni sevofluranom (1,5 %),  $\text{AlCl}_3$  (50 mg/kg) ili kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  (2 h nakon *ip* injiciranja  $\text{AlCl}_3$ , štakori su izloženi 1,5 % sevofluranu) svaki drugi dan tijekom 21 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $\text{SV} \pm \text{SD}$  (SP).

Statistički značajno različito: Kontrola vs  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,05$ ); Kontrola vs Sevofluran +  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,01$ ).

Kratice: SV - srednja vrijednost, SP - standardna pogreška, SD - standardna devijacija;  $\text{AlCl}_3$  – aluminij klorid, D-gal – D-galaktoza.

### 3.2.4. Mjerenje enzimske aktivnosti katalaze (CAT) u uzorcima tkiva jetre štakora

Rezultati određivanja aktivnosti CAT (Slika 23) u uzorcima tkiva jetre pokazali su nižu aktivnost CAT u svim obrađenim skupinama u odnosu na kontrolnu skupinu. Statistički značajna razlika vidljiva je u skupini izloženoj  $\text{AlCl}_3$  u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,001$ ) i u skupini izloženoj kombinaciji sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,05$ ).



**Slika 23.** Koncentracija CAT u uzorcima tkiva jetre štakora obrađenih sevofluranom,  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom i kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom.

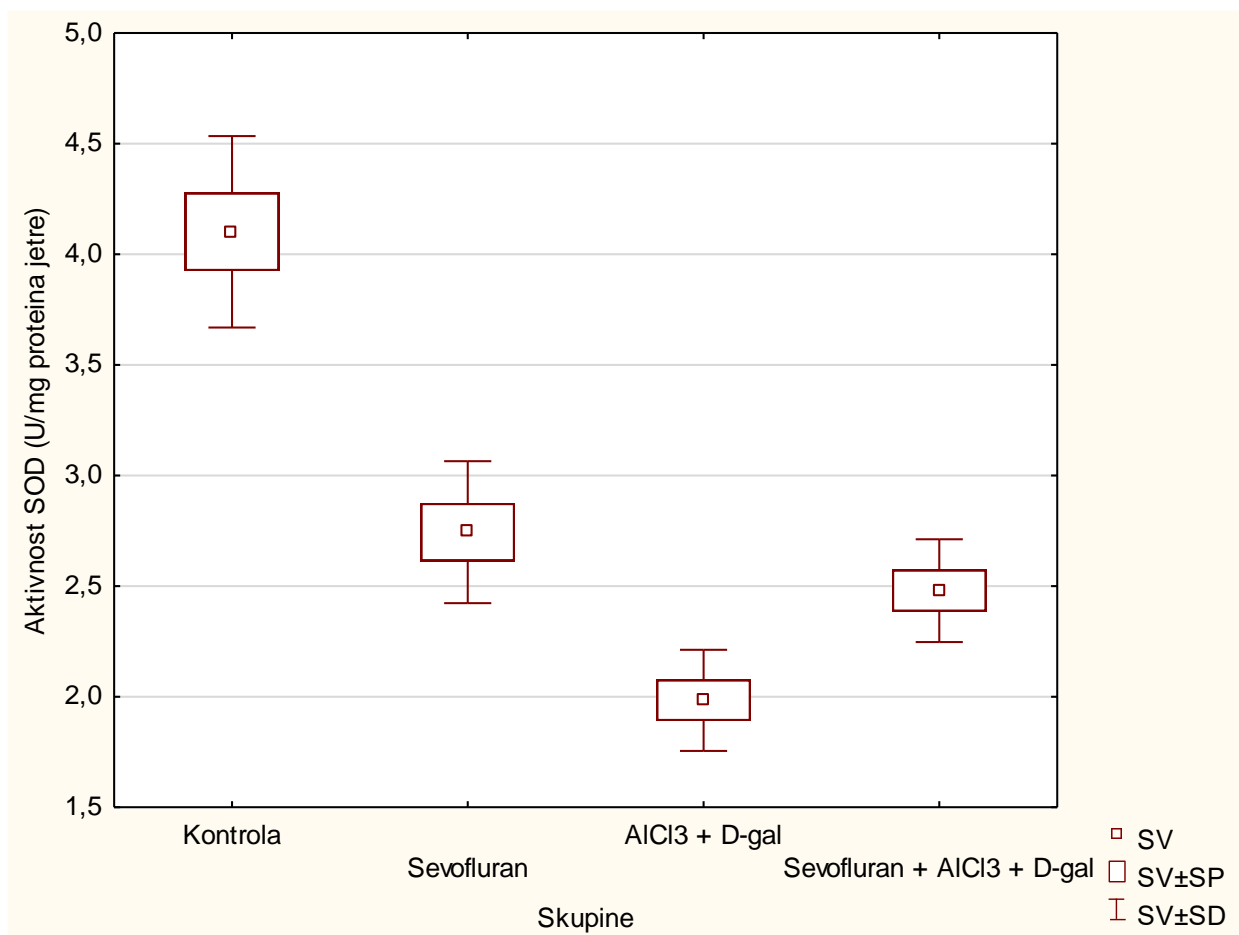
Štakori (N=6) su obrađeni sevofluranom (1,5 %),  $\text{AlCl}_3$  (50 mg/kg) ili kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  (2 h nakon *ip* injiciranja  $\text{AlCl}_3$ , štakori su izloženi 1,5 % sevofluranu) svaki drugi dan tijekom 21 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $\text{SV} \pm \text{SD}$  (SP).

Statistički značajno različito: Kontrola vs  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,001$ ); Kontrola vs Sevofluran +  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,05$ ).

Kratice: SV - srednja vrijednost, SP - standardna pogreška, SD - standardna devijacija  $\text{AlCl}_3$  – aluminij klorid, D-gal – D-galaktoza.

### 3.2.5. Mjerenje enzimске aktivnosti superoksid dizmutaze (SOD) u uzorcima jetre štakora

Rezultati mjerenja aktivnosti SOD prikazani su na Slici 24. Niža aktivnost SOD uočena je svim obrađenim skupinama u odnosu na kontrolnu skupinu. Statistički značajna razlika uočena je samo u skupini izloženoj  $\text{AlCl}_3$  u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,001$ ).



**Slika 24.** Aktivnost SOD u uzorku tkiva jetre štakora obrađenih sevofluranom,  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom i kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom.

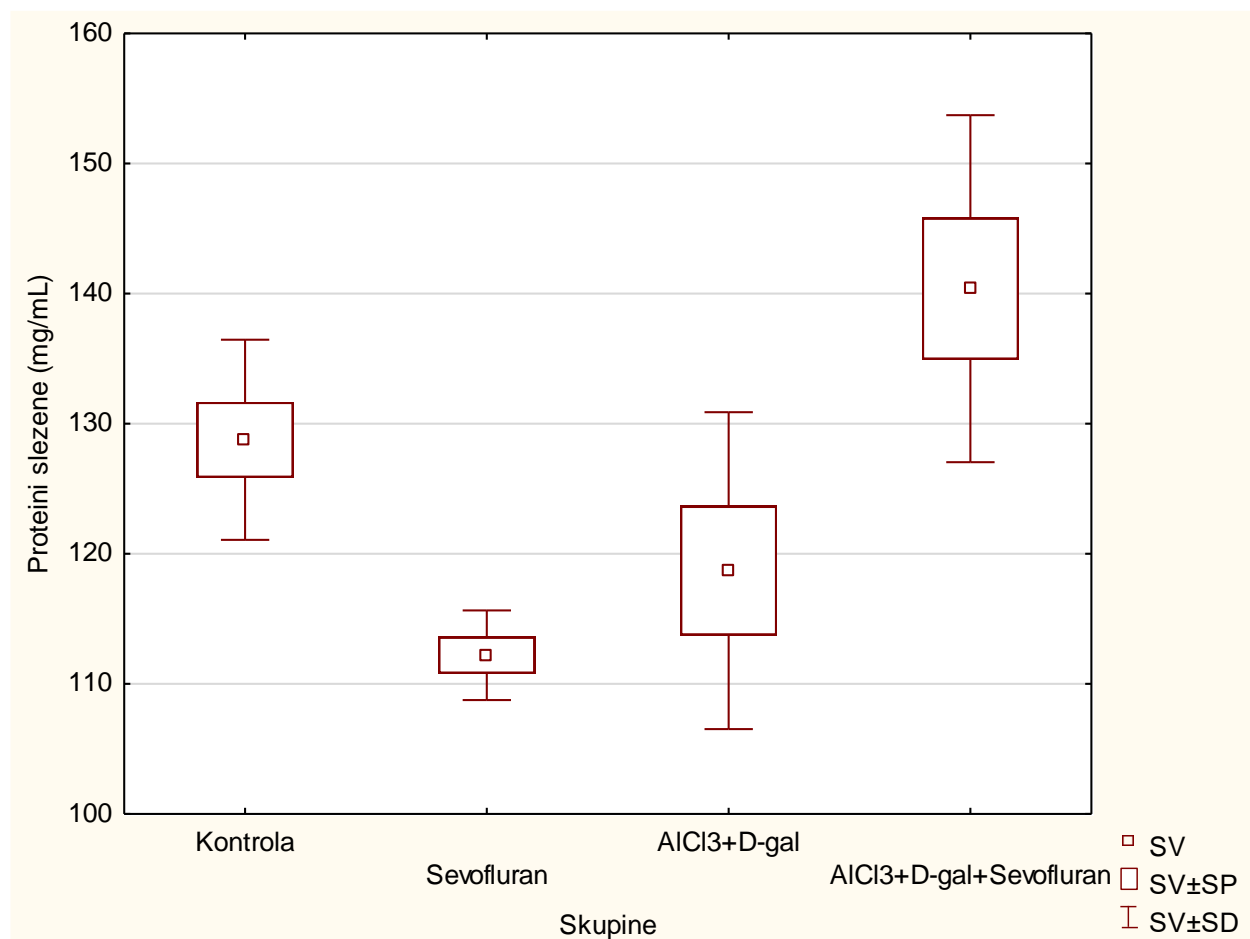
Štakori (N=6) su obrađeni sevofluranom (1,5 %),  $\text{AlCl}_3$  (50 mg/kg) ili kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  (2 h nakon *ip* injiciranja  $\text{AlCl}_3$ , štakori su izloženi 1,5 % sevofluranu) svaki drugi dan tijekom 21 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $\text{SV} \pm \text{SD}$  (SP).

Statistički značajno različito: Kontrola vs  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,001$ ).

Kratice: SV - srednja vrijednost, SP - standardna pogreška, SD - standardna devijacija;  $\text{AlCl}_3$  – aluminij klorid, D-gal – D-galaktoza.

### 3.2.6. Ukupni proteini u uzorcima tkiva slezene štakora

Rezultati mjerenja ukupnih proteina u tkivu slezene štakora (Slika 25) pokazuju veću količinu proteina u skupini obrađenoj kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$ , dok je u skupinama obrađenim sevofluranom i  $\text{AlCl}_3$  ona manja nego u kontrolnoj skupini. Statistički značajna razlika postoji između skupine obrađene sevofluranom i skupine obrađene kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,01$ ) i skupine obrađene  $\text{AlCl}_3$  i kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,05$ ).



**Slika 25.** Koncentracija ukupnih proteina u uzorcima tkiva slezene štakora obrađenih sevofluranom,  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom i kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom.

Štakori ( $N=6$ ) su obrađeni sevofluranom (1,5 %),  $\text{AlCl}_3$  (50 mg/kg) ili kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  (2 h nakon *ip* injiciranja  $\text{AlCl}_3$ , štakori su izloženi 1,5 % sevofluranu) svaki drugi dan tijekom 21 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $\text{SV} \pm \text{SD}$  (SP).

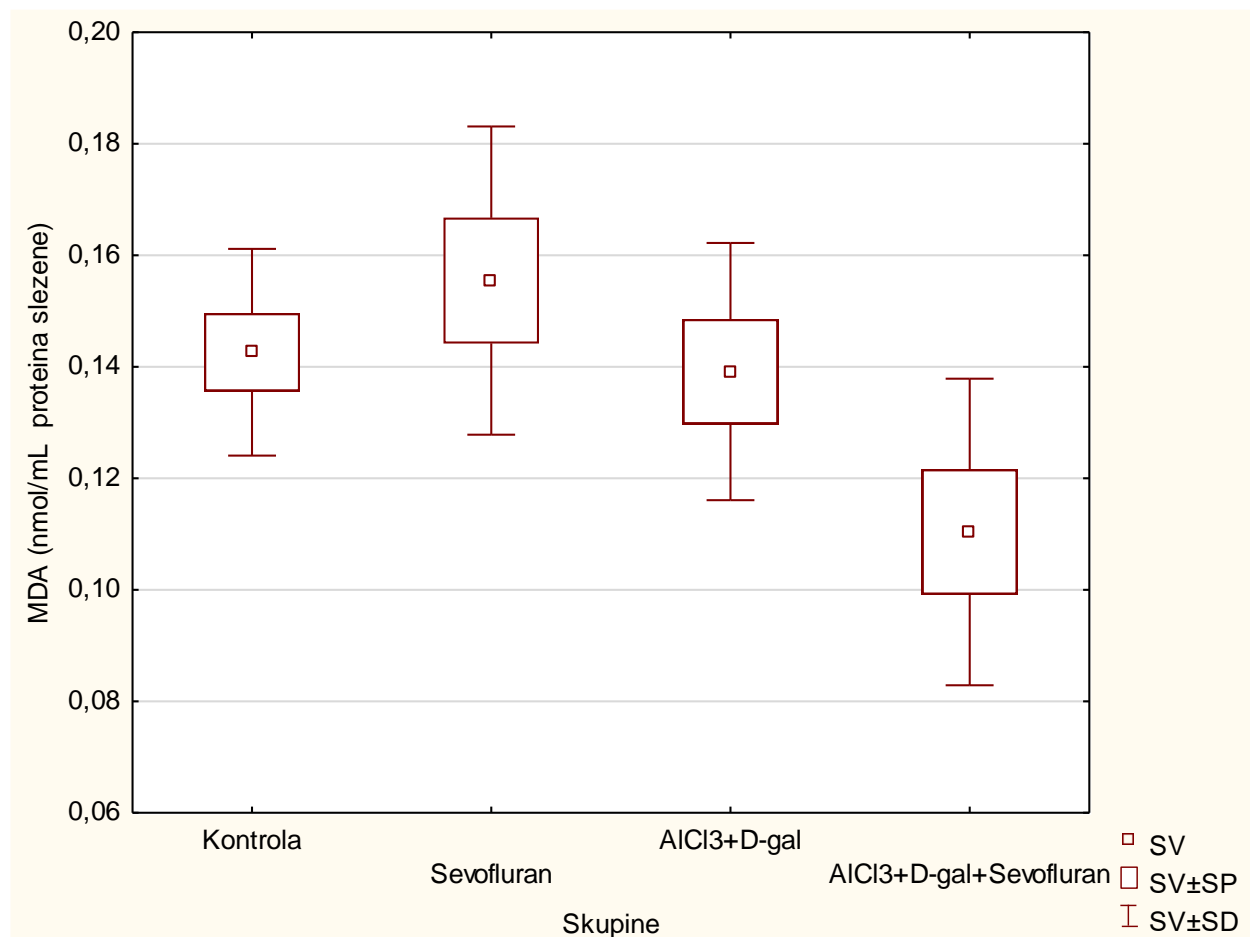
Statistički značajno različito: Sevofluran vs Sevofluran +  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,01$ );  $\text{AlCl}_3$  vs Sevofluran +  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,05$ ).

Kratice: SV - srednja vrijednost, SP - standardna pogreška, SD - standardna devijacija;  $\text{AlCl}_3$  - aluminij klorid, D-gal - D-galaktoza.



### 3.2.7. Mjerenje razine lipidne peroksidacije (MDA) u uzorcima tkiva slezene štakora

Rezultati mjerenja MDA u tkivu slezene štakora (Slika 26) pokazuju najmanju vrijednost MDA u skupini obrađenoj sevofluranom i  $\text{AlCl}_3$  u odnosu na kontrolnu skupinu. Statistički značajna razlika postoji samo između skupine obrađene sevofluranom i skupine obrađene kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,05$ ).



**Slika 26.** Koncentracija MDA u uzorcima tkiva slezene štakora obrađenih sevofluranom,  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom i kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom.

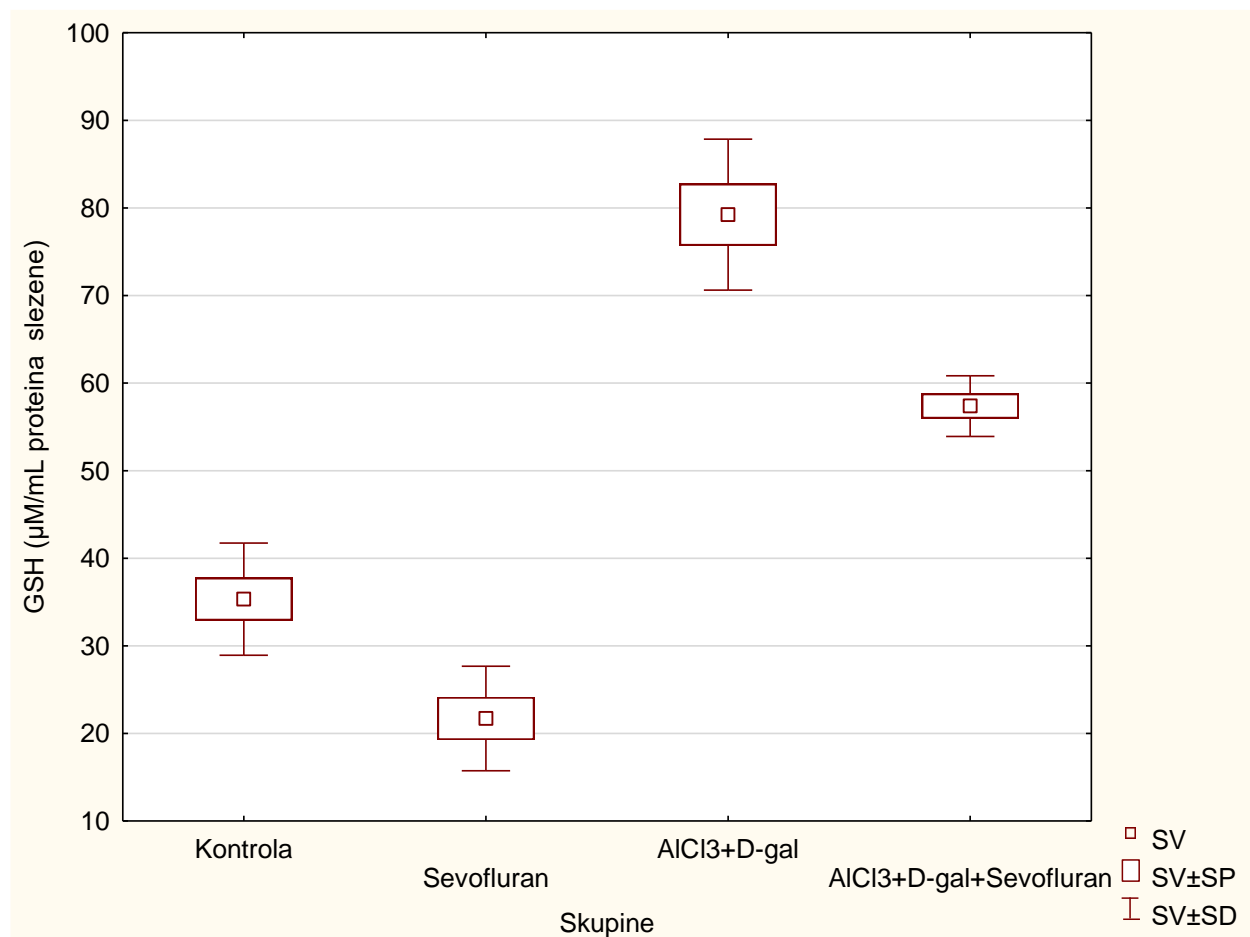
Štakori (N=6) su obrađeni sevofluranom (1,5 %),  $\text{AlCl}_3$  (50 mg/kg) ili kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  (2 h nakon *ip* injiciranja  $\text{AlCl}_3$ , štakori su izloženi 1,5 % sevofluranu) svaki drugi dan tijekom 21 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $\text{SV} \pm \text{SD}$  (SP).

Statistički značajno različito: Sevofluran vs Sevofluran +  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,05$ ).

Kratice: SV - srednja vrijednost, SP - standardna pogreška, SD - standardna devijacija;  $\text{AlCl}_3$  - aluminij klorid, D-gal - D-galaktoza.

### 3.2.8. Mjerenje razine ukupnog glutationa (GSH) u uzorcima tkiva slezene štakora

Rezultati određivanja koncentracije ukupnoga glutationa (Slika 27) pokazuju najmanju koncentraciju GSH u skupini obrađenoj sevofluranom, dok je koncentracija GSH u skupini obrađenoj kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  najviša. Statistički značajna razlika u koncentraciji GSH postoji između kontrolne skupine i skupine obrađene  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,05$ ); skupine obrađene sevofluranom i skupine obrađene  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,001$ ); skupine obrađene sevofluranom i skupine obrađene kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,05$ ).



**Slika 27.** Koncentracija GSH u uzorcima tkiva slezene štakora obrađenih sevofluranom,  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom i kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom.

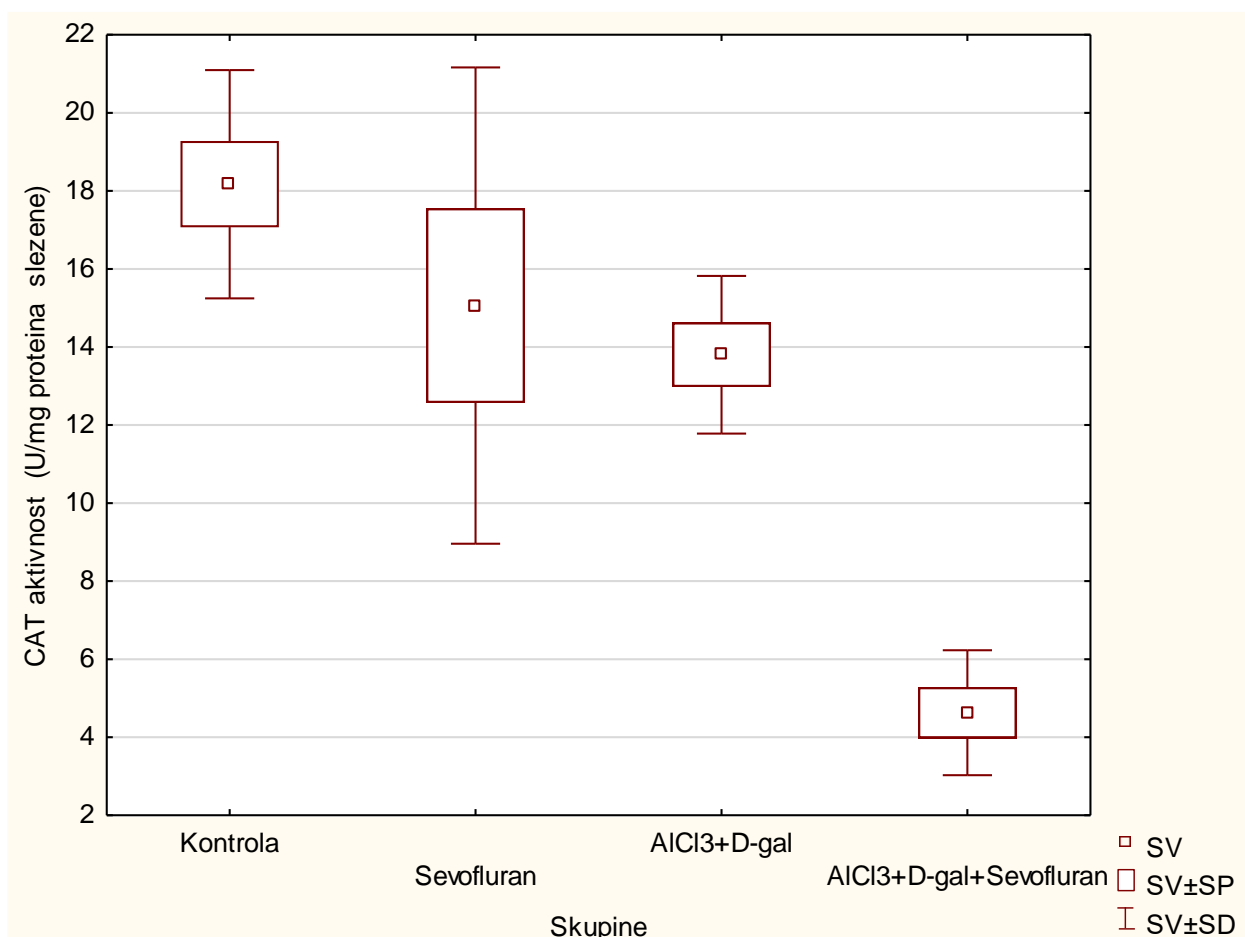
Štakori (N=6) su obrađeni sevofluranom (1,5 %),  $\text{AlCl}_3$  (50 mg/kg) ili kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  (2 h nakon *ip* injiciranja  $\text{AlCl}_3$ , štakori su izloženi 1,5 % sevofluranu) svaki drugi dan tijekom 21 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $\text{SV} \pm \text{SD}$  (SP).

Statistički značajno različito: Kontrola vs  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,05$ ); Sevofluran vs  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,001$ ); Sevofluran vs Sevofluran +  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,05$ ).

Kratice: SV - srednja vrijednost, SP - standardna pogreška, SD - standardna devijacija;  $\text{AlCl}_3$  - aluminij klorid, D-gal - D-galaktoza.

### 3.2.9. Mjerenje enzimске aktivnosti katalaze (CAT) u uzorcima tkiva slezene štakora

Rezultati određivanja aktivnosti CAT (Slika 28) u uzorcima tkiva slezene pokazali su najmanju aktivnost CAT u skupini obrađenoj kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$ . Statistički značajna razlika vidljiva je jedino između kontrolne skupine i skupine obrađene kombinacijom  $\text{AlCl}_3$  i sevoflurana ( $P < 0,001$ ).



**Slika 28.** Koncentracija CAT u uzorcima tkiva slezene štakora obrađenih sevofluranom,  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom i kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom.

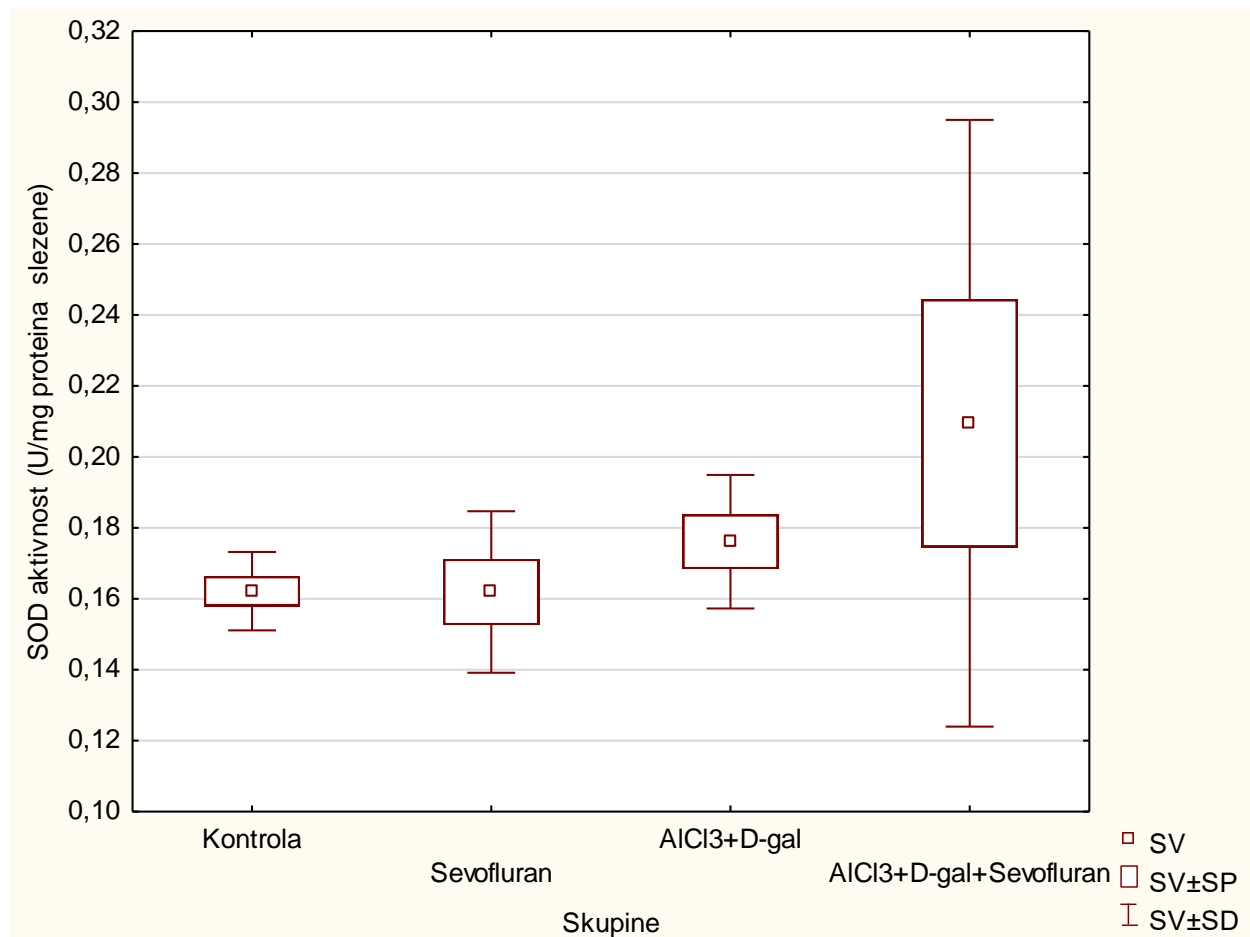
Štakori (N=6) su obrađeni sevofluranom (1,5 %),  $\text{AlCl}_3$  (50 mg/kg) ili kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  (2 h nakon *ip* injiciranja  $\text{AlCl}_3$ , štakori su izloženi 1,5 % sevofluranu) svaki drugi dan tijekom 21 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $\text{SV} \pm \text{SD}$  (SP).

Statistički značajno različito: Kontrola vs Sevofluran +  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,001$ ).

Kratice: SV - srednja vrijednost, SP - standardna pogreška, SD - standardna devijacija  $\text{AlCl}_3$  – aluminij klorid, D-gal – D-galaktoza.

### 3.2.10. Mjerenje enzimске aktivnosti superoksid dizmutaze (SOD) u uzorcima slezene štakora

Rezultati mjerenja aktivnosti SOD prikazani su na Slici 29. Nema statistički značajne razlike između nijedne od skupina.



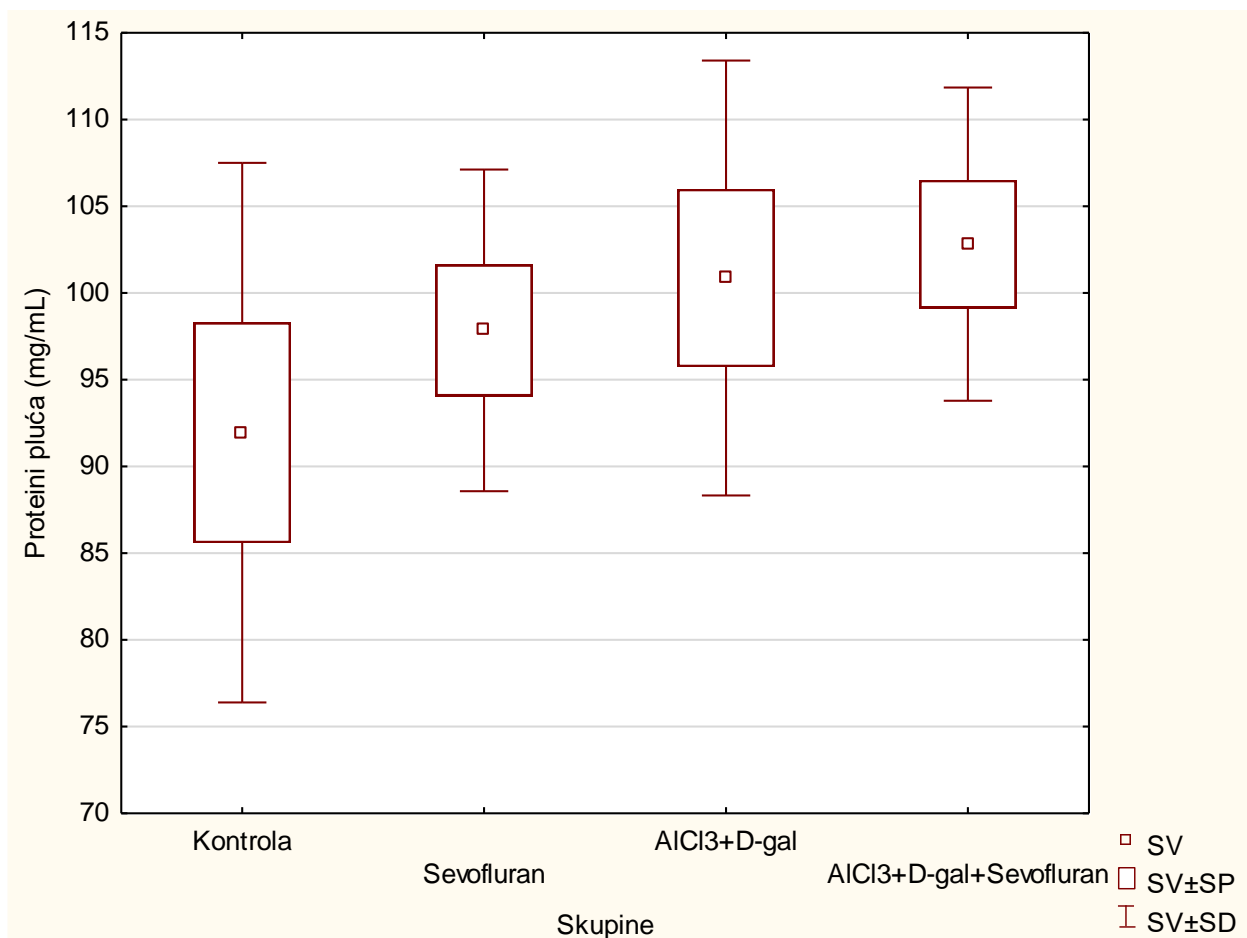
**Slika 29.** Aktivnost SOD u uzorku tkiva slezene štakora obrađenih sevofluranom, AlCl<sub>3</sub> s D-galaktozom i kombinacijom sevoflurana i AlCl<sub>3</sub> s D-galaktozom.

Štakori (N=6) su obrađeni sevofluranom (1,5 %), AlCl<sub>3</sub> (50 mg/kg) ili kombinacijom sevoflurana i AlCl<sub>3</sub> (2 h nakon *ip* injiciranja AlCl<sub>3</sub>, štakori su izloženi 1,5 % sevofluranu) svaki drugi dan tijekom 21 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV± SD (SP).

Kratice: SV - srednja vrijednost, SP - standardna pogreška, SD - standardna devijacija; AlCl<sub>3</sub> - aluminij klorid, D-gal - D-galaktoza.

### 3.2.11. Ukupni proteini u uzorcima tkiva pluća štakora

Rezultati mjerenja ukupnih proteina u tkivu pluća štakora (Slika 30) pokazuju kako nema statistički značajne razlike između nijedne od skupina.



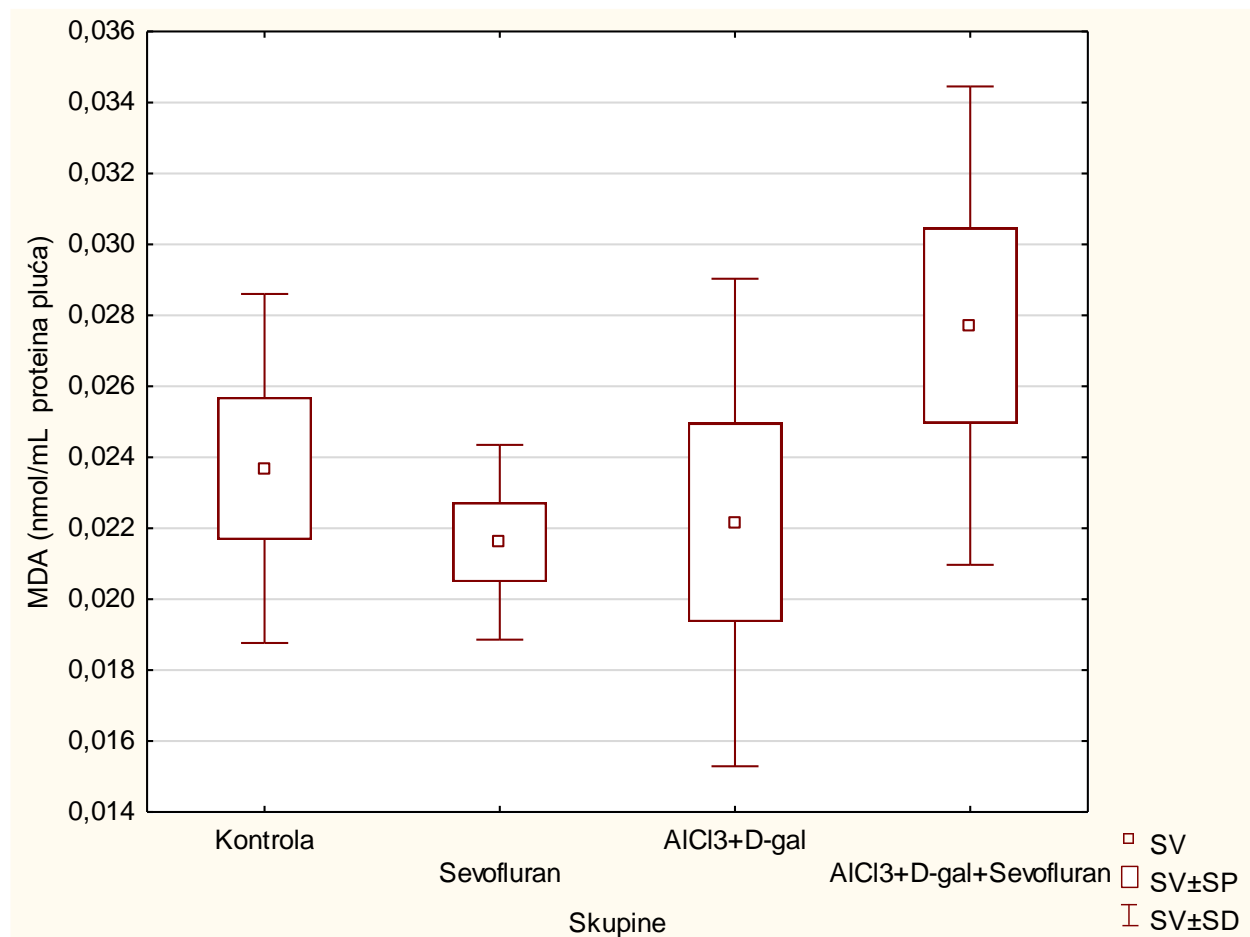
**Slika 30.** Koncentracija ukupnih proteina u uzorcima tkiva pluća štakora obrađenih sevofluranom,  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom i kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom.

Štakori (N=6) su obrađeni sevofluranom (1,5 %),  $\text{AlCl}_3$  (50 mg/kg) ili kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  (2 h nakon *ip* injiciranja  $\text{AlCl}_3$ , štakori su izloženi 1,5 % sevofluranu) svaki drugi dan tijekom 21 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $\text{SV} \pm \text{SD}$  (SP).

Kratice: SV - srednja vrijednost, SP - standardna pogreška, SD - standardna devijacija  $\text{AlCl}_3$  – aluminij klorid, D-gal – D-galaktoza.

### 3.2.12. Mjerenje razine lipidne peroksidacije (MDA) u uzorcima tkiva pluća štakora

Rezultati mjerenja MDA u tkivu pluća štakora prikazani su na Slici 31. Nema statistički značajne razlike u koncentraciji MDA između nijedne od skupina.



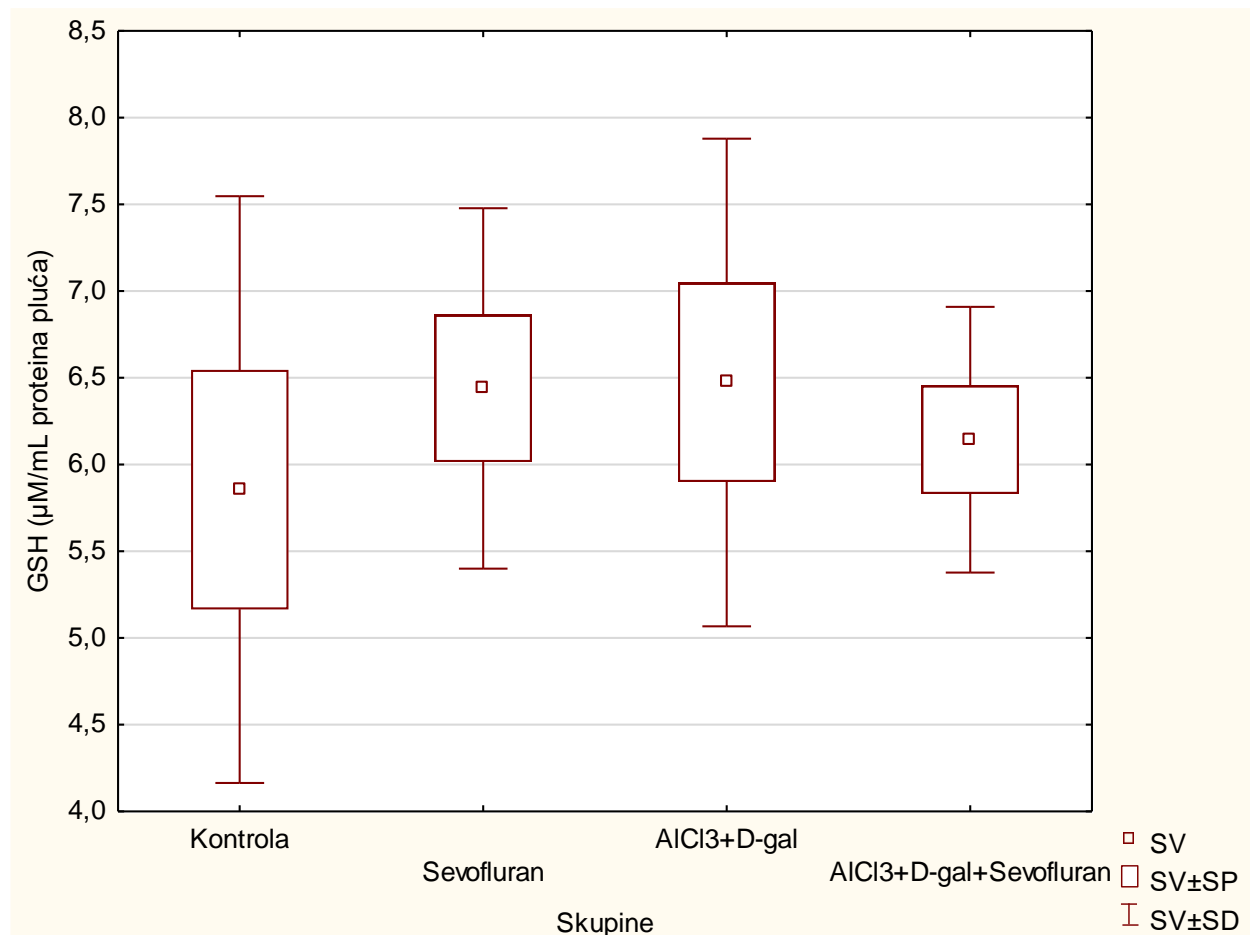
**Slika 31.** Koncentracija MDA u uzorcima tkiva pluća štakora obrađenih sevofluranom, AlCl<sub>3</sub> s D-galaktozom i kombinacijom sevoflurana i AlCl<sub>3</sub> s D-galaktozom.

Štakori (N=6) su obrađeni sevofluranom (1,5 %), AlCl<sub>3</sub> (50 mg/kg) ili kombinacijom sevoflurana i AlCl<sub>3</sub> (2 h nakon *ip* injiciranja AlCl<sub>3</sub>, štakori su izloženi 1,5 % sevofluranu) svaki drugi dan tijekom 21 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV± SD (SP).

Kratice: SV - srednja vrijednost, SP - standardna pogreška, SD - standardna devijacija; AlCl<sub>3</sub> - aluminij klorid, D-gal - D-galaktoza.

### 3.2.13. Mjerenje razine ukupnog glutationa (GSH) u uzorcima tkiva pluća štakora

Rezultati određivanja koncentracije ukupnoga glutationa u uzorcima tkiva pluća štakora prikazani su na Slici 32. Nema statistički značajne razlike u koncentraciji GSH između nijedne od skupina.



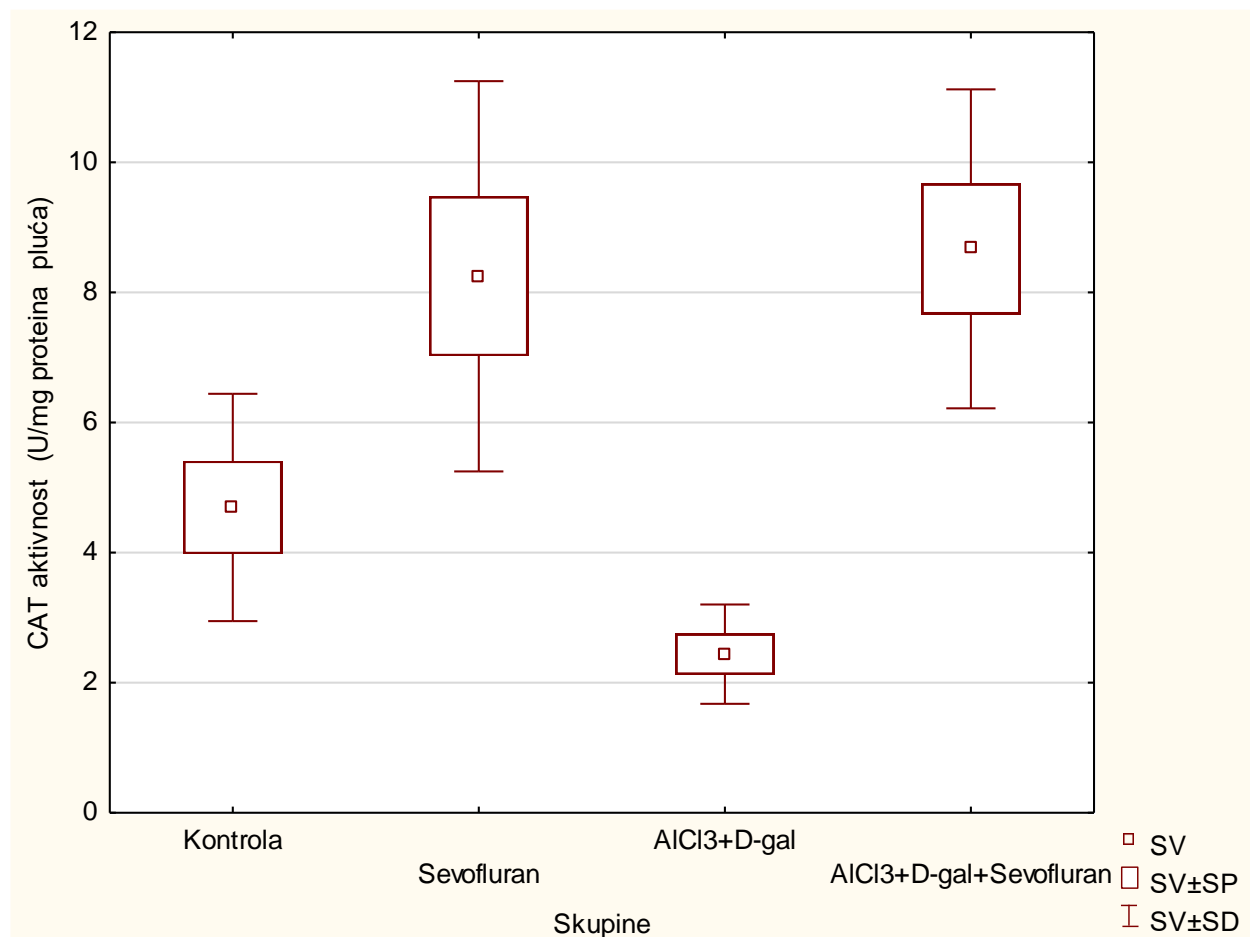
**Slika 32.** Koncentracija GSH u uzorcima tkiva pluća štakora obrađenih sevofluranom, AlCl<sub>3</sub> s D-galaktozom i kombinacijom sevoflurana i AlCl<sub>3</sub> s D-galaktozom.

Štakori (N=6) su obrađeni sevofluranom (1,5 %), AlCl<sub>3</sub> (50 mg/kg) ili kombinacijom sevoflurana i AlCl<sub>3</sub> (2 h nakon *ip* injiciranja AlCl<sub>3</sub>, štakori su izloženi 1,5 % sevofluranu) svaki drugi dan tijekom 21 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV±SD (SP).

Kratice: SV - srednja vrijednost, SP - standardna pogreška, SD - standardna devijacija; AlCl<sub>3</sub> - aluminij klorid, D-gal - D-galaktoza.

### 3.2.14. Mjerenje enzimске aktivnosti katalaze (CAT) u uzorcima tkiva pluća štakora

Rezultati određivanja aktivnosti CAT (Slika 33) u uzorcima tkiva pluća pokazali su najmanju aktivnost CAT u skupini obrađenoj s  $\text{AlCl}_3$ . Statistički značajna razlika vidljiva je između skupine obrađene sevofluranom i skupine obrađene  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,05$ ) i između skupine obrađene  $\text{AlCl}_3$  i skupine obrađene kombinacijom sevoflurana i s  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,01$ ).



**Slika 33.** Koncentracija CAT u uzorcima tkiva pluća štakora obrađenih sevofluranom,  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom i kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom.

Štakori (N=6) su obrađeni sevofluranom (1,5 %),  $\text{AlCl}_3$  (50 mg/kg) ili kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  (2 h nakon *ip* injiciranja  $\text{AlCl}_3$ , štakori su izloženi 1,5 % sevofluranu) svaki drugi dan tijekom 21 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $\text{SV} \pm \text{SD}$  (SP).

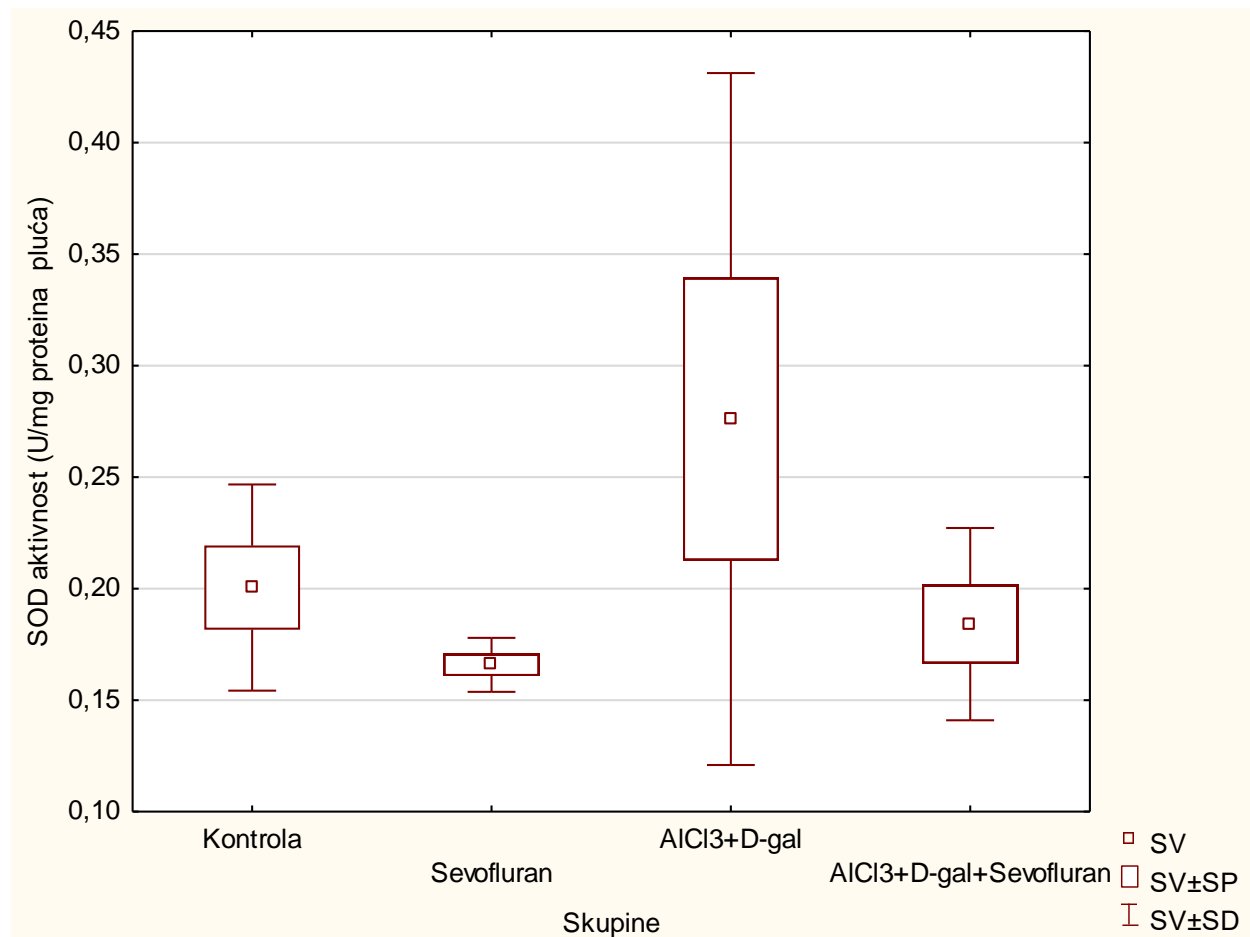
Statistički značajno različito: Sevofluran vs  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,05$ );  $\text{AlCl}_3$  vs Sevofluran +  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,01$ ).

Kratice: SV - srednja vrijednost, SP - standardna pogreška, SD - standardna devijacija  $\text{AlCl}_3$  – aluminij klorid, D-gal – D-galaktoza.



### 3.2.15. Mjerenje enzimске aktivnosti superoksid dizmutaze (SOD) u uzorcima pluća štakora

Rezultati mjerenja aktivnosti SOD prikazani su na Slici 34. Nema statistički značajne razlike između nijedne od skupina.



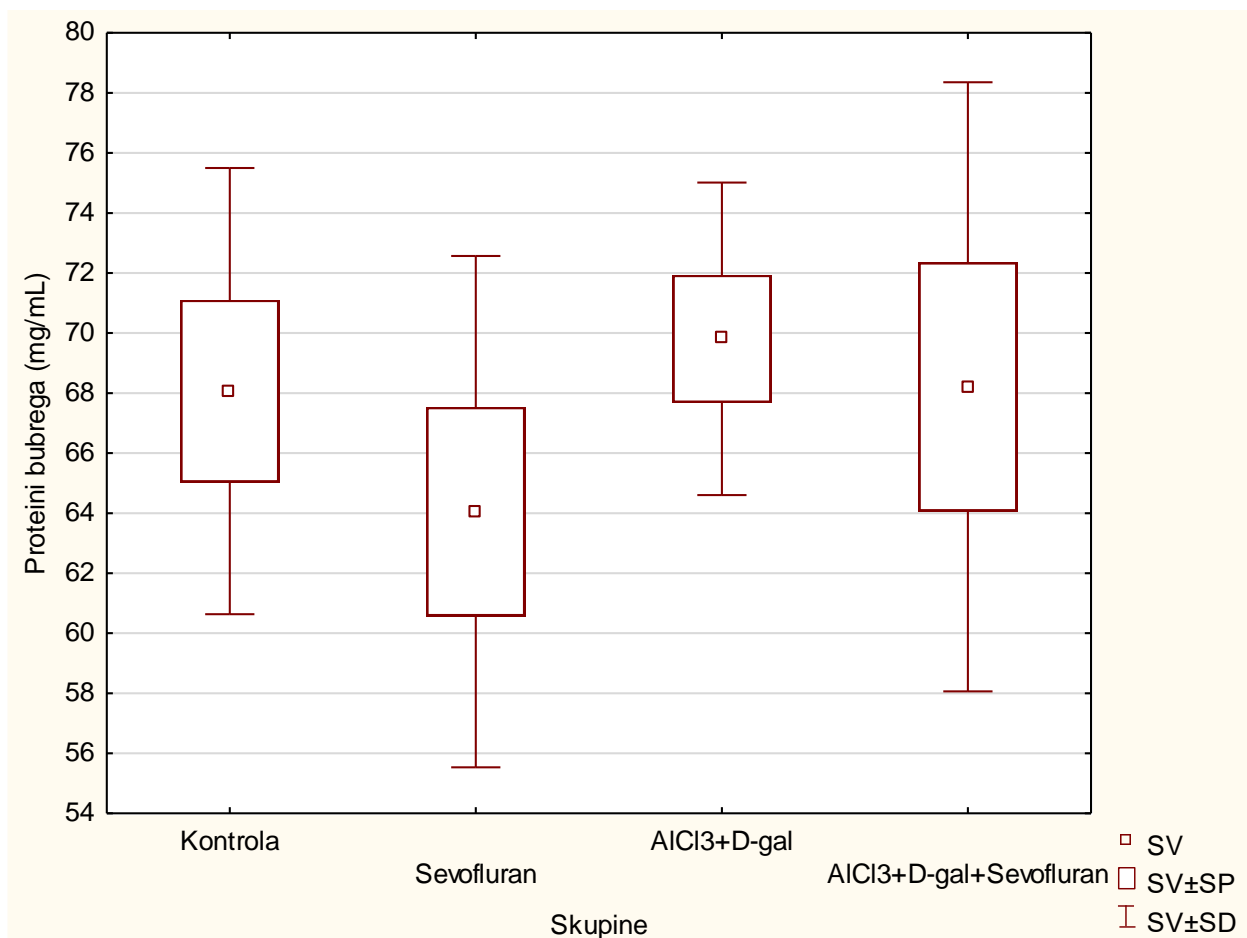
**Slika 34.** Aktivnost SOD u uzorku tkiva pluća štakora obrađenih sevofluranom, AlCl<sub>3</sub> s D-galaktozom i kombinacijom sevoflurana i AlCl<sub>3</sub> s D-galaktozom.

Štakori (N=6) su obrađeni sevofluranom (1,5 %), AlCl<sub>3</sub> (50 mg/kg) ili kombinacijom sevoflurana i AlCl<sub>3</sub> (2 h nakon *ip* injiciranja AlCl<sub>3</sub>, štakori su izloženi 1,5 % sevofluranu) svaki drugi dan tijekom 21 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV± SD (SP).

Kratice: SV - srednja vrijednost, SP - standardna pogreška, SD - standardna devijacija; AlCl<sub>3</sub> - aluminij klorid, D-gal - D-galaktoza.

### 3.2.16. Ukupni proteini u uzorcima tkiva bubrega štakora

Rezultati mjerenja ukupnih proteina u tkivu bubrega štakora (Slika 35) pokazuju kako nema statistički značajne razlike između nijedne od skupina.



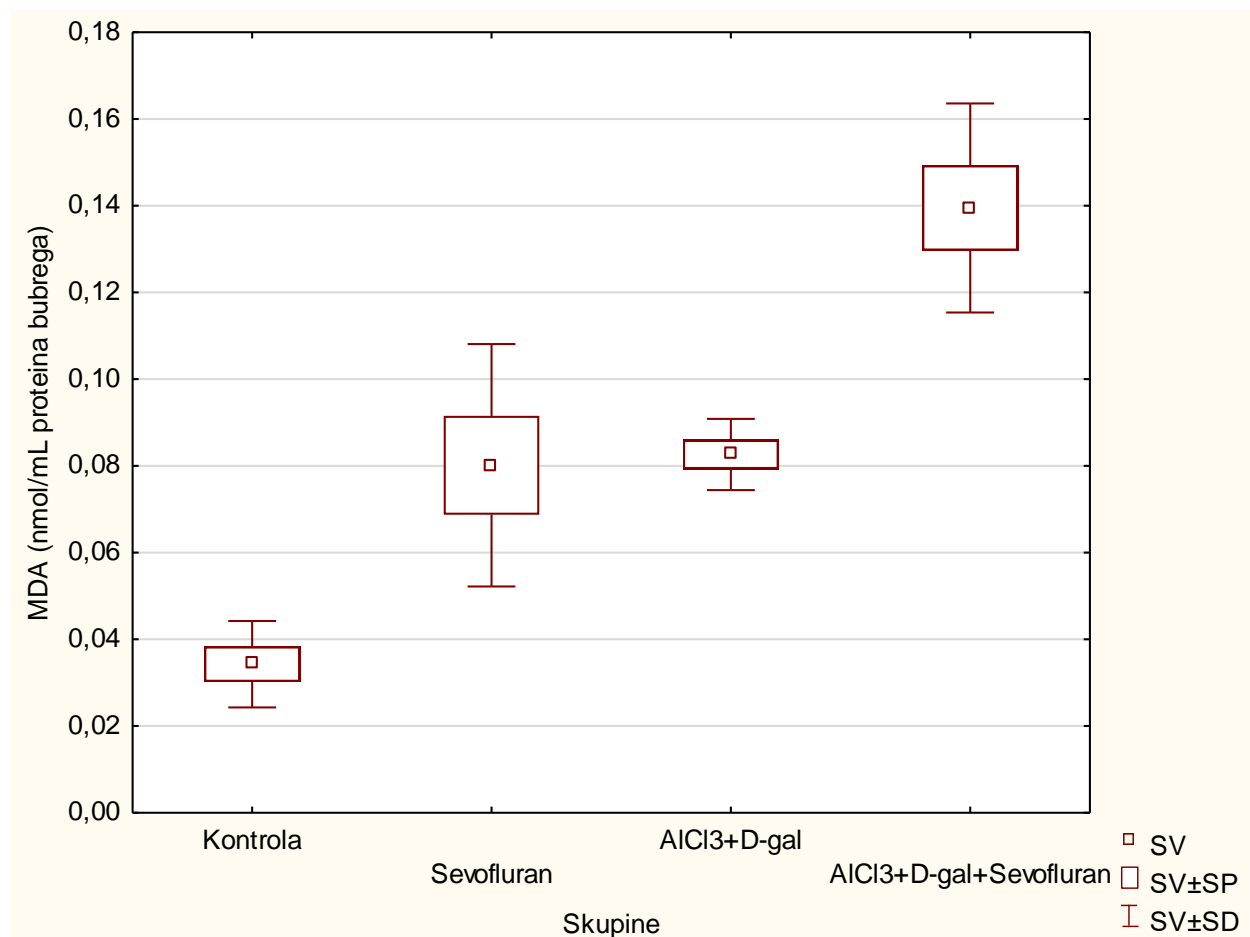
**Slika 35.** Koncentracija ukupnih proteina u uzorcima tkiva bubrega štakora obrađenih sevofluranom, AlCl<sub>3</sub> s D-galaktozom i kombinacijom sevoflurana i AlCl<sub>3</sub> s D-galaktozom.

Štakori (N=6) su obrađeni sevofluranom (1,5 %), AlCl<sub>3</sub> (50 mg/kg) ili kombinacijom sevoflurana i AlCl<sub>3</sub> (2 h nakon *ip* injiciranja AlCl<sub>3</sub>, štakori su izloženi 1,5 % sevofluranu) svaki drugi dan tijekom 21 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV± SD (SP).

Kratice: SV - srednja vrijednost, SP - standardna pogreška, SD - standardna devijacija AlCl<sub>3</sub> – aluminij klorid, D-gal – D-galaktoza.

### 3.2.17. Mjerenje razine lipidne peroksidacije (MDA) u uzorcima tkiva bubrega štakora

Rezultati mjerenja MDA u tkivu bubrega štakora (Slika 36) pokazuju najmanju vrijednost MDA u kontrolnoj skupini, dok je najveća u skupini obrađenoj kombinacijom sevofluranom i  $\text{AlCl}_3$ . Statistički značajna razlika postoji samo između kontrolne skupine i skupine obrađene kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,001$ ).



**Slika 36.** Koncentracija MDA u uzorcima tkiva bubrega štakora obrađenih sevofluranom,  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom i kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom.

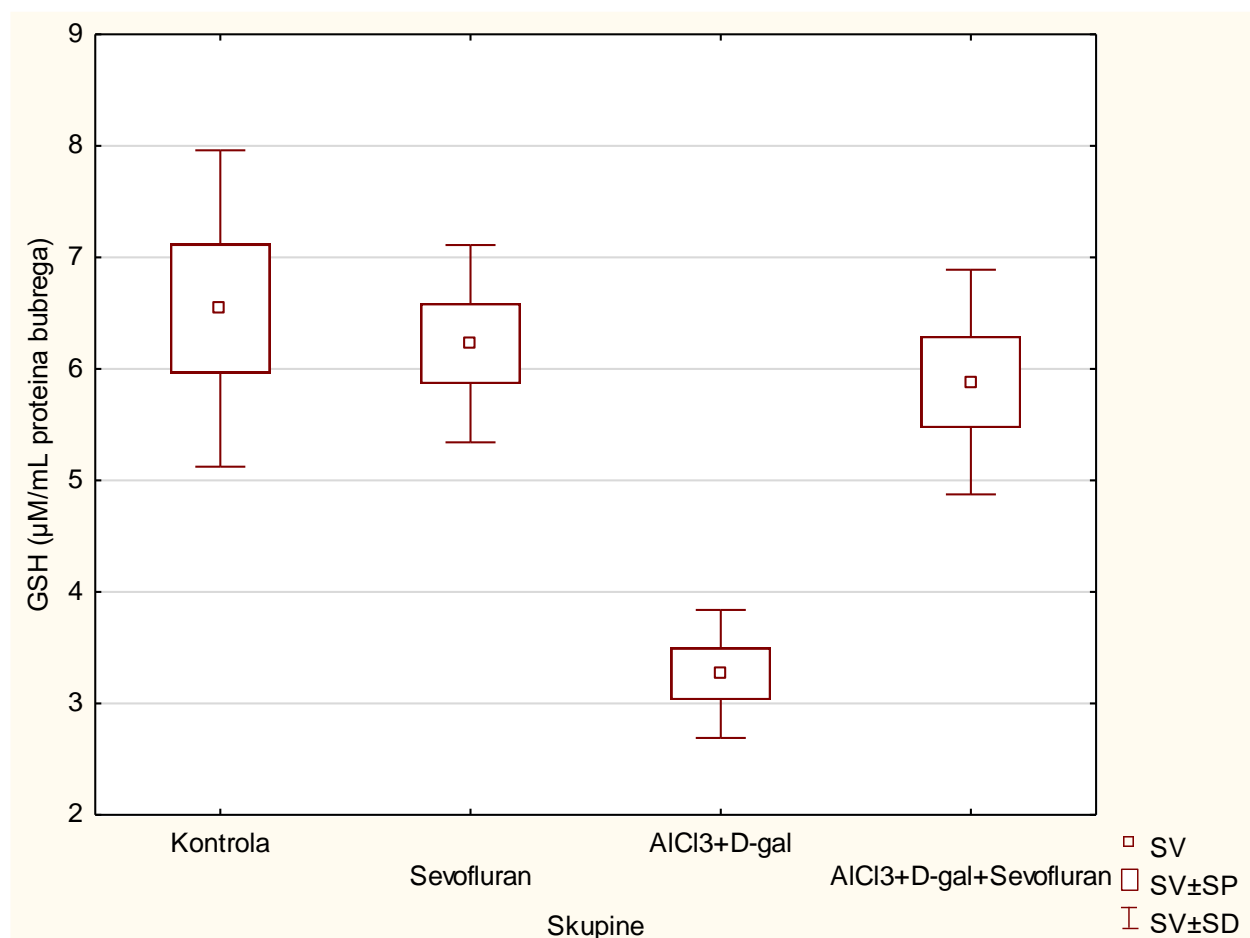
Štakori (N=6) su obrađeni sevofluranom (1,5 %),  $\text{AlCl}_3$  (50 mg/kg) ili kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  (2 h nakon *ip* injiciranja  $\text{AlCl}_3$ , štakori su izloženi 1,5 % sevofluranu) svaki drugi dan tijekom 21 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $\text{SV} \pm \text{SD}$  (SP).

Statistički značajno različito: Kontrola vs Sevofluran +  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,05$ ).

Kratice: SV - srednja vrijednost, SP - standardna pogreška, SD - standardna devijacija;  $\text{AlCl}_3$  - aluminij klorid, D-gal - D-galaktoza.

### 3.2.18. Mjerenje razine ukupnog glutationa (GSH) u uzorcima tkiva bubrega štakora

Rezultati određivanja koncentracije ukupnoga glutationa u uzorcima tkiva bubrega štakora prikazani su na Slici 37. Najmanja koncentracija GSH prisutna je u skupini obrađenoj  $\text{AlCl}_3$ . Statistički značajna razlika u koncentraciji GSH postoji između kontrolne skupine i skupine obrađene  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,01$ ) i skupine obrađene sevofluranom i one obrađene s  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,05$ ).



**Slika 37.** Koncentracija GSH u uzorcima tkiva bubrega štakora obrađenih sevofluranom,  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom i kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom.

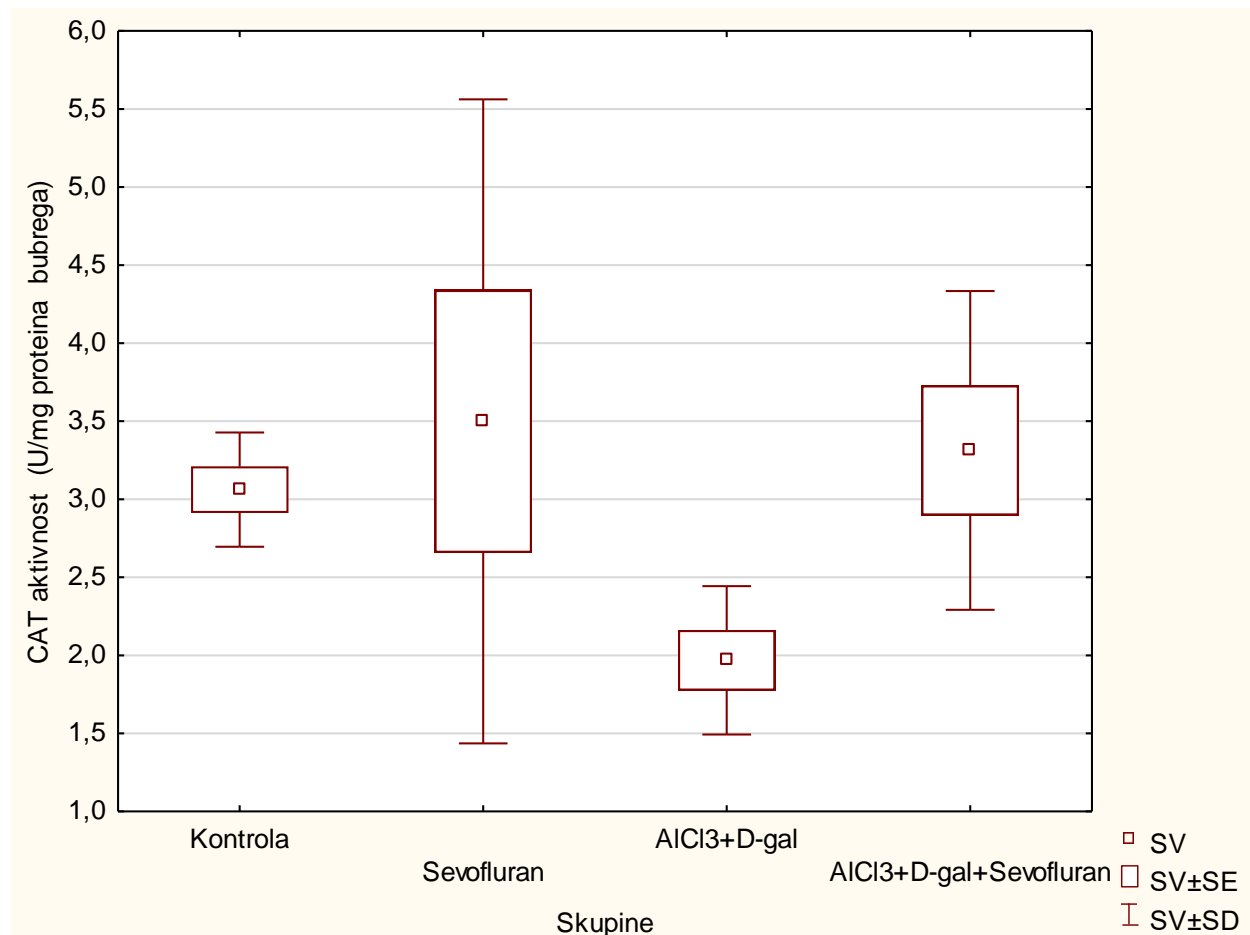
Štakori (N=6) su obrađeni sevofluranom (1,5 %),  $\text{AlCl}_3$  (50 mg/kg) ili kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  (2 h nakon *ip* injiciranja  $\text{AlCl}_3$ , štakori su izloženi 1,5 % sevofluranu) svaki drugi dan tijekom 21 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $\text{SV} \pm \text{SD}$  (SP).

Statistički značajno različito: Kontrola vs  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,01$ ); Sevofluran vs  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,05$ ).

Kratice: SV - srednja vrijednost, SP - standardna pogreška, SD - standardna devijacija;  $\text{AlCl}_3$  - aluminij klorid, D-gal - D-galaktoza.

### 3.2.19. Mjerenje enzimске aktivnosti katalaze (CAT) u uzorcima tkiva bubrega štakora

Rezultati određivanja aktivnosti CAT (Slika 38) u uzorcima tkiva bubrega pokazali su najmanju aktivnost CAT u skupini obrađenoj  $\text{AlCl}_3$ . Statistički značajna razlika nije vidljiva između nijedne od skupina.



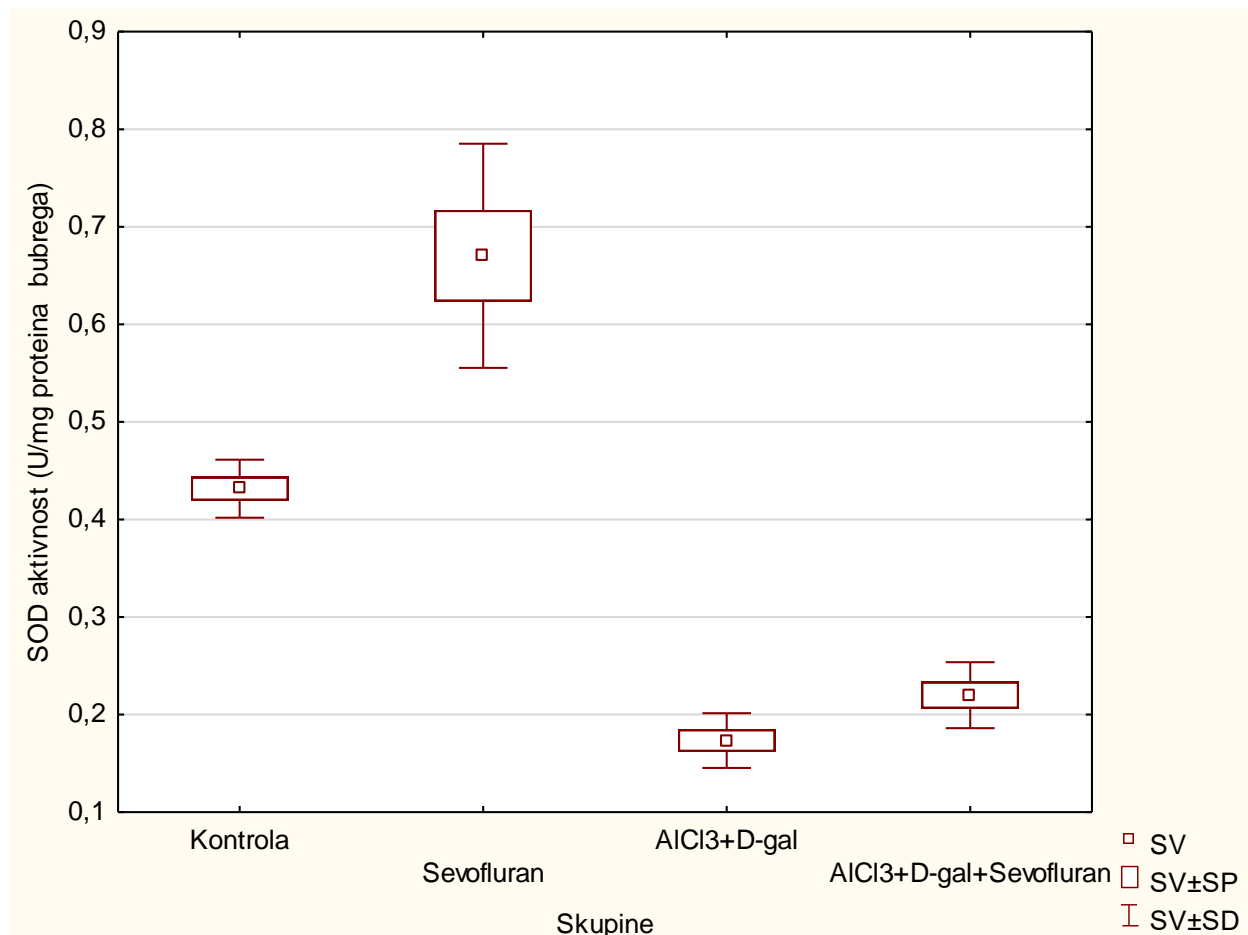
**Slika 38.** Koncentracija CAT u uzorcima tkiva bubrega štakora obrađenih sevofluranom,  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom i kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom.

Štakori (N=6) su obrađeni sevofluranom (1,5 %),  $\text{AlCl}_3$  (50 mg/kg) ili kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  (2 h nakon *ip* injiciranja  $\text{AlCl}_3$ , štakori su izloženi 1,5 % sevofluranu) svaki drugi dan tijekom 21 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $\text{SV} \pm \text{SD}$  (SP).

Kratice: SV - srednja vrijednost, SP - standardna pogreška, SD - standardna devijacija  $\text{AlCl}_3$  – aluminij klorid, D-gal – D-galaktoza.

### 3.2.20. Mjerenje enzimске aktivnosti superoksid dizmutaze (SOD) u uzorcima bubrega štakora

Rezultati mjerenja aktivnosti SOD prikazani su na Slici 39. Najveća aktivnost SOD bila je u skupini obrađenoj sevofluranom. Statistički značajna razlika postoji između kontrolne skupine i skupine obrađene  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,05$ ); skupine obrađene sevofluranom i skupine obrađene  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,001$ ); skupine obrađene sevofluranom i skupine obrađene kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,05$ ).



**Slika 39.** Aktivnost SOD u uzorku tkiva bubrega štakora obrađenih sevofluranom,  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom i kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  s D-galaktozom.

Štakori (N=6) su obrađeni sevofluranom (1,5 %),  $\text{AlCl}_3$  (50 mg/kg) ili kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  (2 h nakon *ip* injiciranja  $\text{AlCl}_3$ , štakori su izloženi 1,5 % sevofluranu) svaki drugi dan tijekom 21 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao  $\text{SV} \pm \text{SD}$  (SP).

Statistički značajno različito: Kontrola vs  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,05$ ); Sevofluran vs  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,001$ ); Sevofluran vs Sevofluran +  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,05$ ).

Kratice: SV - srednja vrijednost, SP - standardna pogreška, SD - standardna devijacija;  $\text{AlCl}_3$  - aluminij klorid, D-gal - D-galaktoza.

### **3.3. Analiza biokemijskih parametara**

Biokemijska analiza seruma iz krvi štakora pokazala je značajne razlike u koncentraciji enzima i proteina obrađenih skupina (Tablica 5) u odnosu na kontrolnu skupinu. Vrijednosti metabolita i supstrata (Tablica 6) pokazale su najveće promjene u skupini izloženoj  $AlCl_3$ , u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu i kontroli.

**Tablica 5.** Vrijednosti analize enzima i proteina u serumu štakora obrađenih sevofluranom, AlCl<sub>3</sub> s D-galaktozom i kombinacijom sevoflurana i AlCl<sub>3</sub> s D-galaktozom.

<b>ANALIZA BIOKEMIJSKIH PARAMETARA – ENZIMI I PROTEINI (X ± SP)</b>						
<b>TRETMAN</b>	<b>ALP (U/L)</b>	<b>ALT (U/L)</b>	<b>AMY (U/L)</b>	<b>ALB (g/L)</b>	<b>TP (g/L)</b>	<b>GLOB (g/L)</b>
<b>Kontrola</b>	172,67 ± 14,5	29,33 ± 0,56	553,00 ± 16,62	51,67 ± 1,84	67,33 ± 2,64	13,33 ± 0,56
<b>Sevofluran</b>	134,33 ± 8,66 ♦♦	31,33 ± 0,76 ♦	679,00 ± 42,38	55,00 ± 2,22	72,33 ± 3,10	17,00 ± 1,59
<b>AlCl<sub>3</sub> + D-gal</b>	226,00 ± 4,38	43,00 ± 0,73 ♦♦♦	593,33 ± 21,12	54,33 ± 0,42	68,33 ± 0,84	15,67 ± 1,72
<b>Sevofluran + AlCl<sub>3</sub> + D-gal</b>	213,67 ± 2,01	34,33 ± 0,56	810,67 ± 23,59 ♦♦	49,00 ± 0,73	66,00 ± 2,53	17,00 ± 1,59

Štakori (N=6) su obrađeni sevofluranom (1,5 %), AlCl<sub>3</sub> (50 mg/kg) ili kombinacijom sevoflurana i AlCl<sub>3</sub> (2 h nakon intraperitonealnog injiciranja AlCl<sub>3</sub>, štakori su izloženi 1,5 % sevofluranu) svaki 2 dan tijekom 21 dana. Dobiveni su rezultati prikazani kao SV± SD (SP).

♦ Statistički značajno različito u usporedbi s kontrolnom skupinom (♦  $P < 0,05$ ; ♦♦  $P < 0,01$ ; ♦♦♦  $P < 0,001$ ); Statistički značajno različito u usporedbi sa skupinom izloženom AlCl<sub>3</sub> (◊  $P < 0,05$ ).

Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija, AlCl<sub>3</sub> – aluminij klorid, D-gal – D-galaktoza.



**Tablica 6.** Vrijednosti analize metabolita i supstrata u serumu štakora obrađenih sevofluranom, AlCl<sub>3</sub> s D-galaktozom i kombinacijom sevoflurana i AlCl<sub>3</sub> s D-galaktozom.

ANALIZA BIOKEMIJSKIH PARAMETARA – METABOLITI I SUPSTRATI (X ± SP)								
TRETMAN	GLU (mmol/L)	TBIL (umol/L)	BUN (mmol/L)	PHOS (mmol/L)	CRE (umol/L)	Na <sup>+</sup> (mmol/L)	K <sup>+</sup> (mmol/L)	Ca (mmol/L)
<b>Kontrola</b>	15,40 ± 0,27	4,67 ± 0,21	7,03 ± 0,27	2,15 ± 0,06	38,00 ± 3,52	138,33 ± 1,72	5,77 ± 0,13	2,59 ± 0,03
<b>Sevofluran</b>	13,56 ± 0,72	5,00 ± 0	7,06 ± 0,46	2,75 ± 0,03	58,67 ± 6,28	146,00 ± 2,03	5,43 ± 0,24	2,72 ± 0,07
<b>AlCl<sub>3</sub> + D-gal</b>	15,70 ± 1,19	4,00 ± 0 •	7,46 ± 0,33	3,19 ± 0,06***	34,67 ± 5,67 •	143,33 ± 4,51	6,20 ± 0,20	2,57 ± 0,08
<b>Sevofluran + AlCl<sub>3</sub> + D-gal</b>	13,46 ± 0,49	4,67 ± 0,21	7,00 ± 0,10	2,75 ± 0,14	48,33 ± 1,72	138,00 ± 2,28	5,77 ± 0,15	2,56 ± 0,06

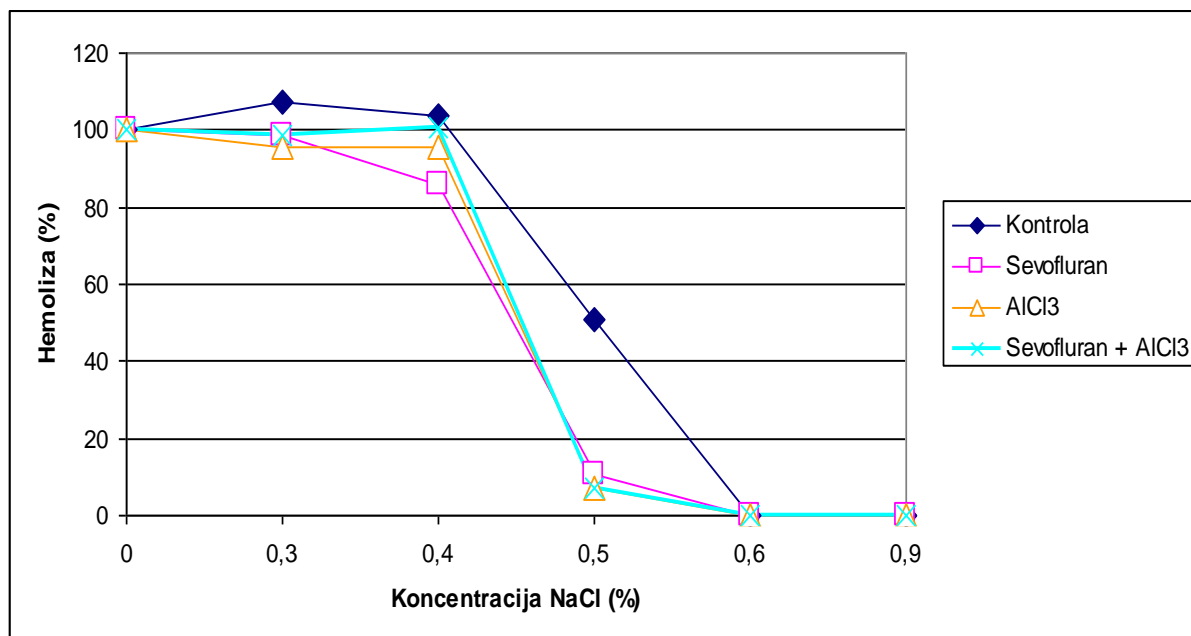
Štakori (N=6) su obrađeni sevofluranom (1,5 %), AlCl<sub>3</sub> (50 mg/kg) ili kombinacijom sevoflurana i AlCl<sub>3</sub> (2 h nakon intraperitonealnog injiciranja AlCl<sub>3</sub>, štakori su izloženi 1,5 % sevofluranu) svaki 2 dan tijekom 21 dana. Dobiveni su rezultati prikazani kao SV± SD (SP).

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

Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija, AlCl<sub>3</sub> – aluminij klorid, D-gal – D-galaktoza.

### 3.4. Osmotska fragilnost eritrocita

Analizom rezultata hemolize eritrocita (Slika 40) vidljivo je kako se kod svih skupina 100 %-tna hemoliza eritrocita dogodila pri koncentraciji NaCl 0,3 %. U kontrolnoj skupini do 50 %-tne hemolize eritrocita došlo je pri koncentraciji NaCl 0,5 %, dok je kod svih obrađenih skupina vidljivo odstupanje, tj. 50 %-tna hemoliza se događa pri manjoj koncentraciji NaCl.



**Slika 40.** Analiza % hemolize eritrocita štakora obrađenih sevofluranom, AlCl<sub>3</sub> s D-galaktozom i kombinacijom sevoflurana i AlCl<sub>3</sub> s D-galaktozom.

Štakori (N=6) su obrađeni sevofluranom (1,5 %), AlCl<sub>3</sub> (50 mg/kg) ili kombinacijom sevoflurana i AlCl<sub>3</sub> (2 h nakon *ip* injiciranja AlCl<sub>3</sub>, štakori su izloženi 1,5 % sevofluranu) svaki drugi dan tijekom 21 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV± SD (SP).

Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija, AlCl<sub>3</sub> – aluminij klorid, D-gal – D-galaktoza.

## 4. RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je istražiti antioksidacijski/prooksidacijski učinak sevoflurana na  $\text{AlCl}_3$  izazvani oksidacijski stres praćenjem: 1) promjena u oksido-redukcijskom statusu u stanicama perifernih organa jetre, slezene, bubrega i pluća mjerenjem razine malondialdehida (MDA - krajnjeg produkta lipidne peroksidacije), glutationa (GSH), te aktivnosti enzima katalaze (CAT) i superoksid dismutaze (SOD); 2) procjeniti razinu upale, mjerenjem relativne težine perifernih organa u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu; 3) analizom promjene biokemijskih pokazatelja krvi kao pokazatelja oštećenja tkiva i organa.

Mjerenje % promjene težine štakora (Slika 15) pokazalo je smanjenu težinu štakora u skupini izloženoj sevofluranu, dok je težina štakora u skupinama izloženim  $\text{AlCl}_3$  i kombinaciji sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  porasla. Do statistički značajne promjene težine došlo je u skupini izloženoj kombinaciji sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,05$ ); skupini izloženoj  $\text{AlCl}_3$  u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu ( $P < 0,01$ ); skupini izloženoj kombinaciji sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu ( $P < 0,001$ ). Porast u težini skupina izloženih  $\text{AlCl}_3$  može biti posljedica unosa D-galaktoze koja je, osim što omogućava narušavanje krvno-moždane barijere te tako omogućava veći ulazak aluminija u tkivo mozga, ključna i u stvaranju povećane količine ROS-a i naprednih glikacijskih krajnjih produkata (engl. *advanced glycation end products*, AGE) koji su usko povezani s patološkim promjenama raznih bolesti povezanih sa starenjem, posebice dijabetes, ateroskleroza, nefropatija, infekcija i Alzheimerovom bolešću.

D-galaktoza (D-gal) je monosaharid koji u normalnim koncentracijama može biti metaboliziran, međutim u povišenim koncentracijama potiče proizvodnju ROS-a i AGE. Međudjelovanje AGE sa staničnim receptorima kao što je RAGE (engl. *receptor for advanced glycation endproducts*) potiče aktivaciju proteinskog kompleksa NF- $\kappa$ B (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), čime se povećava stvaranje signalnih molekula upale i aktivacija astrocita i mikroglia. Kontinuirana obrada glodavaca D-gal dovodi do smanjene ekspresije proteina vezanih za pamćenje, pogoršanih sposobnosti učenja i pamćenja i patoloških promjena na astrocitama. RAGE, član imunoglobulinske superporodice molekula, eksprimiraju i jetrene stielatne stanice gdje ima ulogu u procesima fibrogeneze. Upala je način na koji tkivo pokušava smanjiti nastala oštećenja u tkivu. Nakupljanje leukocita u tom području rezultira povećanjem oštećenja i stimuliranjem fibrogeneze putem sekrecije topljivih medijatora i produkata vezanih uz oksidacijski stres. Prva linija obrane su specifični jetreni makrofagi tzv. Kupffer-ove stanice. One otpuštaju proupalne i fibrogene čimbenike

koji uključuju citokine, kemokine, superoksidni anion, dušikov oksid, eikozanoide, te lizosomalne i proteolitičke enzime. Kupfferove stanice otpuštaju i trombocitni faktor rasta (engl. *platelet-derived growth factor*, PDGF) i TGF- $\beta$ 1 koji pojačavaju fibrogenezu. Također, AlCl<sub>3</sub>, ali i sevofluran potiču oksidacijski stres u organima poput bubrega i jetre. Oksidacijski stres sudjeluje u promicanju aktivacije različitih proupalnih transkripcijskih čimbenika (NF $\kappa$ B, p53) koji potiču transkripciju upalnih medijatora. Usljed toga, AlCl<sub>3</sub> i sevofluran potiču upalni odgovor, koji je također mogao dovesti do promjene težine organa. Proupalni i fibrogeni čimbenici mogu utjecati na relativnu težinu jetre kao i drugih organa.

Analiza relativnog indeksa jetre (Slika 16) pokazala je smanjenu težinu jetre u skupini izloženoj sevofluranu i povećanu težinu u skupini izloženoj AlCl<sub>3</sub> u odnosu na kontrolnu skupinu. Do statistički značajne promjene relativnog indeksa došlo je u skupini izloženoj AlCl<sub>3</sub> u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu ( $P < 0,01$ ) i u skupini izloženoj kombinaciji sevoflurana i AlCl<sub>3</sub> u odnosu na skupinu izloženu AlCl<sub>3</sub> ( $P < 0,05$ ).

Analiza relativnog indeksa slezene (Slika 17) pokazala je povećanu težinu slezene u skupini izloženoj AlCl<sub>3</sub> u odnosu na skupinu izloženu AlCl<sub>3</sub>. To su ujedno i jedine dvije skupine između kojih postoji statistički značajna razlika ( $P < 0,05$ ).

Relativni indeks pluća (Slika 18) pokazao je kako nema statistički značajne razlike između nijedne od skupina. Opažen je blagi porast indeksa u skupini izloženoj sevofluranu, te blagi pad u relativnom indeksu skupina izloženih AlCl<sub>3</sub> i kombinaciji sevoflurana i AlCl<sub>3</sub>, iako te promjene nisu statistički značajne.

Relativni indeks bubrega (Slika 19) također je pokazao kako nema statistički značajne razlike između nijedne od skupina. Opažen je blagi pad u skupinama izloženim sevofluranu i AlCl<sub>3</sub>, dok je relativni indeks bubrega u skupini izloženoj kombinaciji sevoflurana i AlCl<sub>3</sub> raznolik, tj. postoje veća odstupanja od srednje vrijednosti.

Moguće je kako je u jetri i slezeni došlo do povećanja težine zbog unosa D-galaktoze, ali i njihove uloge da neprestano eliminiraju toksine iz krvi, posebice jetra kao ključni organ, dobro prokrvljen, s propusnim endotelnim stanicama koji sudjeluju u filtriranju krvi. Jetra sudjeluje u metabolizmu odnosno funkcioniranju izmjene tvari u organizmu. Jetrene stanice (hepatociti) imaju mnoštvo metaboličkih funkcija kao što su: sinteza albumina i čimbenika zgrušavanja ovisnih o vitaminu K, odstranjenje produkata metabolizma, poput bilirubina koji nastaje razgradnjom eritrocita i koji se putem žuči izlučuje u crijevo, spolnih hormona, skladištenje nekih vitamina (B12) i glikogena, metabolizam lijekova i drugih egzogenih i endogenih spojeva. Vjerojatno iz istog razloga nije došlo do povećanja težine pluća i bubrega.

Rezultati analize razine ukupnih proteina u tkivu jetre (Slika 20) pokazuju pad koncentracije proteina u svim obrađenim skupinama u odnosu na kontrolnu skupinu. Do statistički značajnog odstupanja došlo je u skupini izloženoj kombinaciji sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,001$ ) i u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu ( $P < 0,01$ ). Do najznačajnijeg odstupanja došlo je u skupinama izloženim  $\text{AlCl}_3$  i kombinaciji sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$ , zbog čega možemo zaključiti kako je razlog pada koncentracije proteina u obrađenim skupinama upravo toksičan učinak  $\text{AlCl}_3$  na jetrene stanice. Prema istraživanju Bharathi i suradnika (2008) aluminij uzrokuje promjene u transkripcijskim čimbenicima i promjene u ekspresiji gena, te time može uzrokovati promjene u količini ukupnih proteina.

Analizom oksidacijsko-redukcijskih promjena u tkivu jetre zamjećene su značajne promjene u skupinama obrađenim  $\text{AlCl}_3$  i kombinacijom sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  u odnosu na kontrolnu skupinu. Mjerenjem koncentracije MDA (Slika 21) primijećena je povišena razina MDA u svim obrađenim skupinama u odnosu na kontrolnu skupinu. Do statistički značajnog povećanja došlo je u skupini izloženoj kombinaciji sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,01$ ) i u skupini izloženoj kombinaciji sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,05$ ) u odnosu na skupinu izloženu  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,05$ ).

Slobodni radikali izazivaju i oštećenje staničnih lipida. Zasićene masne kiseline i masne kiseline koje sadrže jednu dvostruku vezu puno su otpornije na djelovanje ROS-a, negoli polinezasićene masne kiseline (PUFA). Slobodni radikali koji mogu reagirati s PUFA su  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{HO}_2^\bullet$ ,  $\text{RO}^\bullet$  i  $\text{RO}_2$ , dok je superoksidni radikal nedovoljno reaktivan za eliminaciju vodika (Štefan i sur., 2007). MDA je jedan od glavnih produkata lipidne peroksidacije, koji u organizmu nastaje kada reaktivni kisikovi spojevi razgrađuju višestruke nezasićene masne kiseline. Uzevši u obzir višu koncentraciju MDA u tkivima obrađenih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu, možemo zaključiti kako su ove doze sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  bile dovoljne za nastanak oksidacijskog stresa. Ovi rezultati su u skladu s brojnim prijašnjim istraživanjima koja govore kako aluminij može izazvati oksidacijska oštećenja putem nekoliko mehanizama: a) vezanjem za negativno nabijene fosfolipide u stanicama koji sadrže polinezasićene masne kiseline, što vodi stvaranju reaktivnih kisikovih vrsta (ROS-a); b) poticanjem željezom izazvane lipidne peroksidacije preko Fentonove reakcije, što uzrokuje formiranje ROS-a i  $\text{Fe}^{3+}$ ; c) neutralizacijom superoksidnog aniona ( $\text{O}_2^-$ ) s  $\text{Al}^{3+}$ , pri čemu nastaje Al- $\text{O}_2$ -kompleks koji povećava oksidacijski učinak  $\text{O}_2^-$  (Exley, 2004).

GSH je jedan od najvažnijih mehanizama antioksidacijske obrane stanice, a njegova visoka koncentracija štiti od ROS-a. GSH može reagirati izravno s radikalima u neenzimatskim reakcijama (Saez i sur., 1990) ili biti donor elektrona u reakciji redukcije

peroksida kataliziranoj GPx (Chance i sur., 1979). Iz rezultata ukupne koncentracije GSH (Slika 22) vidljivo je kako je do smanjenja koncentracije GSH u odnosu na kontrolnu skupinu došlo u svim obrađenim skupinama. Statistički značajna razlika postoji između kontrolne skupine i skupine izložene  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,05$ ) i skupine izložene kombinaciji sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,01$ ). Najniža koncentracija GSH bila je prisutna u skupini izloženoj kombinaciji sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$ . U svim obrađenim skupinama je vjerojatno došlo do trošenja GSH kako bi se neutralizirali prekomjerno stvoreni slobodni radikali.

Izlaganje sevofluranu uzrokuje povećanje proizvodnje ROS-a, zbog čega je moglo doći do trošenja GSH u stanicama jetre, pa i posljedičnog pada u koncentraciji GSH u odnosu na kontrolnu skupinu.  $\text{AlCl}_3$  ima puno veći prooksidacijski učinak u tkivima, te također uzrokuje povećanje proizvodnje ROS-a, zbog čega je pad koncentracije GSH u skupinama izloženim  $\text{AlCl}_3$  puno veći, negoli u skupini izloženoj samo sevofluranu.

Mjerenje aktivnosti enzima CAT (Slika 23) pokazalo je pad aktivnosti enzima u svim obrađenim skupinama u odnosu na kontrolnu skupinu. Do statistički značajnog pada došlo je u skupini izloženoj  $\text{AlCl}_3$  u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,001$ ), te u skupini izloženoj kombinaciji sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,05$ ).

Mjerenje enzimske aktivnosti SOD u tkivu jetre (Slika 24) pokazalo je pad enzimske aktivnosti SOD u svim obrađenim skupinama u odnosu na kontrolnu skupinu. U odnosu na kontrolnu skupinu, jedino je u skupini izloženoj  $\text{AlCl}_3$  došlo do statistički značajnog odstupanja ( $P < 0,001$ ).

Uloga SOD je dismutiranje superoksidnog aniona u  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Ghorbel i sur., 2006). Dismutiranjem ovog aniona troši se slobodna SOD, što dovodi do pada u njezinoj koncentraciji. Također, aktivnošću SOD dolazi do prekomjernog nastanka  $\text{H}_2\text{O}_2$ , kojeg GSH i CAT razgrađuju na  $\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{O}_2$ . Uslijed prekomjernog stvaranja  $\text{H}_2\text{O}_2$ , dolazi do „zasićenja“ slobodnih GSH i CAT, što znači kako dolazi do pada u koncentraciji GSH i aktivnosti CAT, a to je u skladu s dobivenim rezultatima.

Mjerenje ukupne koncentracije proteina u slezeni štakora pokazalo je sniženu koncentraciju proteina u skupinama izloženim sevofluranu i  $\text{AlCl}_3$  u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je koncentracija proteina u skupini izloženoj kombinaciji sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  bila povišena (Slika 25). Do statistički značajnog odstupanja došlo je u skupini izloženoj kombinaciji sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  u odnosu na skupinu obrađenu sevofluranom ( $P < 0,01$ ) i u skupini izloženoj kombinaciji sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  u odnosu na skupinu izloženu  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,05$ ). Prema istraživanju Bharathi i suradnika (2008) aluminij uzrokuje promjene u transkripcijskim čimbenicima mijenjajući ekspresiju gena, te time može uzrokovati promjene

u količini ukupnih proteina. Isto je poznato i za sevofluran. Do smanjenja koncentracije proteina u skupinama izloženim sevofluranu i  $\text{AlCl}_3$  moglo je doći zbog prekomjernog nakupljanja ROS-a, što je moglo dovesti do apoptotske smrti stanica. Koncentracija proteina u skupini izloženoj kombinaciji sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  bila je povišena, što se može objasniti povećanom transkripcijom proteina u svrhu zaštite stanice od ROS-a.

Rezultati analize koncentracije MDA u tkivu slezene pokazali su povišenu koncentraciju MDA u skupini izloženoj sevofluranu i sniženu koncentraciju MDA u skupinama izloženim  $\text{AlCl}_3$  i kombinaciji sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 26). Ipak nijedna od tih razlika nije statistički značajna. Do statistički značajnog odstupanja došlo je jedino u skupini izloženoj kombinaciji sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu ( $P < 0,05$ ). Koncentracija MDA u skupini izloženoj kombinaciji sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  je najniža od svih skupina.

Mjerenje razine ukupnog glutationa u tkivu slezene pokazalo je najnižu koncentraciju GSH u skupini izloženoj sevofluranu i najvišu koncentraciju GSH u skupini izloženoj  $\text{AlCl}_3$  u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 27). Do statistički značajnog odstupanja došlo je u skupini izloženoj  $\text{AlCl}_3$  u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,05$ ) i skupinu izloženu sevofluranu ( $P < 0,001$ ), te u skupini izloženoj kombinaciji sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu ( $P < 0,05$ ).

Mjerenje enzimske aktivnosti katalaze u tkivu slezene pokazalo je smanjenje aktivnosti u svim obrađenim skupinama u odnosu na kontrolnu (Slika 28), ali od njih je statistički značajna razlika bila između skupine izložene kombinaciji sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  i kontrolne skupine ( $P < 0,001$ ). Do značajnog pada aktivnosti CAT u skupini izloženoj kombinaciji sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  vjerojatno je došlo zbog prekomjernog nakupljanja  $\text{H}_2\text{O}_2$  koji je potrošio svu ili veći dio CAT.

Mjerenje enzimske aktivnosti SOD u tkivu slezene nije pokazalo statistički značajnu razliku između nijedne od skupina (Slika 29). U skupini izloženoj kombinaciji sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  došlo je do velikih odstupanja od srednje vrijednosti, što može biti razlog nedostatka statističkih razlika.

Rezultati mjerenja ukupnih proteina u tkivu pluća štakora također nisu pokazali statistički značajnu razliku. Ipak, u svim obrađenim skupinama došlo je do blagog povećanja koncentracije proteina (Slika 30).

Mjerenje koncentracije MDA također nije pokazalo statistički značajnu razliku između nijedne od skupina, iako je zabilježen blagi porast u koncentraciji MDA u skupini izloženoj kombinaciji sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  (Slika 31).

Mjerenja koncentracije GSH (Slika 32) i aktivnosti enzima SOD (Slika 34) također nisu pokazala statistički značajno odstupanje. Mjerenjem aktivnosti SOD pokazano je veliko odstupanje od srednje vrijednosti unutar skupine izložene  $\text{AlCl}_3$ .

Statistički značajno odstupanje vidljivo je u mjerenju enzimske aktivnosti CAT (Slika 33). Najniža aktivnosti CAT bila je u skupini izloženoj  $\text{AlCl}_3$ , dok je aktivnosti CAT bila viša u skupinama izloženim sevofluranu i kombinaciji sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$ . Statistički značajna odstupanja bila su u skupini izloženoj  $\text{AlCl}_3$  u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu ( $P < 0,05$ ) i u skupini izloženoj kombinaciji sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  u odnosu na skupinu izloženu  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,01$ ).

Ovi rezultati mogu biti posljedica protuupalnog i antioksidacijskog djelovanja sevoflurana u tkivu pluća.

Rezultati mjerenja ukupnih proteina (Slika 35) i enzimske aktivnosti CAT (Slika 38) u tkivima bubrega štakora nisu pokazala statistički značajno odstupanje između nijedne od skupina. Mjerenje aktivnosti CAT pokazalo je njenu najnižu aktivnost u skupini izloženoj  $\text{AlCl}_3$ , dok je mjerenje aktivnosti CAT u skupini izloženoj sevofluranu pokazalo značajno odstupanje od srednje vrijednosti unutar skupine.

Mjerenje koncentracije MDA (Slika 36) pokazalo je porast u koncentraciji MDA u tkivu bubrega u svim skupinama u odnosu na kontrolu. Statistički značajna razlika bila je prisutna samo između kontrolne skupine i skupine izložene kombinaciji sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,05$ ). Brojni autori ukazuju kako aluminij može izazvati oksidacijska oštećenja putem nekoliko mehanizama: 1) vezanjem za negativno nabijene fosfolipide u stanicama koji sadrže polinezasićene masne kiseline vodi stvaranju reaktivnih kiskovih vrsta (ROS), 2) poticanjem željezom izazvane lipidne peroksidacije preko Fentonove reakcije, što uzrokuje formiranje ROS-a i formiranje  $\text{Fe}^{3+}$ , c) neutralizacijom  $\text{O}_2^-$  s  $\text{Al}^{3+}$ , zbog čega nastaje  $\text{Al-O}_2^-$  kompleks koji povećava oksidacijsku sposobnost  $\text{O}_2^-$  (Exley, 2004).

Rezultati mjerenja koncentracije GSH u tkivu bubrega pokazala su smanjenje koncentracije GSH u svim skupinama u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 37). Do najvećeg pada u koncentraciji GSH došlo je u skupini izloženoj  $\text{AlCl}_3$ . Statistički značajna odstupanja bila su prisutna u skupini izloženoj  $\text{AlCl}_3$  u odnosu na zdravu kontrolu ( $P < 0,01$ ) i u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu ( $P < 0,05$ ). Do ovog pada u koncentraciji GSH u skupini izloženoj  $\text{AlCl}_3$  vjerojatno je došlo zbog prekomjernog nakupljanja ROS, koje su uzrokovale redukciju GSH.

Mjerenje enzimske aktivnosti SOD (Slika 39) pokazalo je porast aktivnosti SOD u skupini izloženoj sevofluranu, te pad u skupinama izloženima  $\text{AlCl}_3$  i kombinaciji sevoflurana



i  $\text{AlCl}_3$ , u odnosu na kontrolnu skupinu. Statistički značajno odstupanje bilo je prisutno između kontrolne skupine i skupine izložene  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,05$ ); skupine izložene  $\text{AlCl}_3$  i one izložene sevofluranu ( $P < 0,001$ ); skupine izložene kombinaciji sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  i skupine izložene sevofluranu ( $P < 0,05$ ). Sevofluran štiti stanice moduliranjem ravnoteže između proapoptoskih i antiapoptoskih proteina, što može objasniti veću aktivnost SOD u skupini obrađenoj sevofluranom. Aluminij, s druge strane, potiče stvaranje ROS-a, što smanjuje koncentraciju slobodne SOD, a to objašnjava značajno smanjenu aktivnost superoksid dismutaze u skupinama izloženim  $\text{AlCl}_3$  i kombinaciji sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$ .

Krv je jedno od prvih tkiva koja dolaze u doticaj s anestheticima. Sevofluran lako difundira kroz alveolarne kapilare, dok se s druge strane aluminij krvlju prenosi vezan za molekule transferina. Analiza biokemijskih parametara pokazala je statistički značajne promjene u proteinima i enzimima (Tablica 5) i metabolitima i supstratima (Tablica 6) u serumu štakora. Obrada sevofluranom pokazala je statistički značajan utjecaj na ALP ( $P < 0,01$ ) i ALT ( $P < 0,05$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu. Obrada  $\text{AlCl}_3$  pokazala je značajan utjecaj na ALT ( $P < 0,001$ ) i PHOS ( $P < 0,001$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu; na TBIL ( $P < 0,05$ ) i CRE ( $P < 0,05$ ) u odnosu na skupinu obrađenu sevofluranom. Kombinacija sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  pokazala je statistički značajan utjecaj na AMY u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,05$ ) i u odnosu na skupinu izloženu samo  $\text{AlCl}_3$  ( $P < 0,05$ ). Razine glukoze, albumina, globulina i ukupnih proteina nisu bile promijenjene. Također, nije zamijećena statistički značajna razlika ni u koncentraciji mikronutrijenata:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  i  $\text{Ca}^+$ , iako je poznato kako sevofluran i  $\text{AlCl}_3$  mogu poremetiti staničnu ravnotežu ovih iona. Utjecaj sevoflurana na enzime kao što su ALT i ALP je u skladu s dosadašnjim istraživanjima, te upućuje da sevofluran inducira manja oštećenja jetre i bubrega u odnosu na izofluran i halotan (Brozović i sur., 2006).

Mjerenje osmotske fragilnosti eritrocita (Slika 40) pokazalo je kako je u kontrolnoj skupini došlo do veće hemolize u odnosu na obrađene skupine što može značiti kako je u obrađenim skupinama došlo do pojave novonastalih stanica koje imaju još očuvanu i neoštećenu membranu te mogu preživjeti u otopinama manje koncentracije od izotonične.

Osmotska fragilnost eritrocita mjeri stabilnost stanica, tako što se testira mogućnost stanica da "izdrže" hemolizu u otopinama soli što manje koncentracije. Test osmotske fragilnosti je grubi indeks omjera površine i volumena eritrocita (Amanullah i sur., 2013).

Iz analize rezultata hemolize (Slika 40) vidljivo je kako je postotak hemolize pri koncentraciji 0,8 % NaCl zanemariv, dok je do značajne hemolize došlo pri 0,50 % NaCl u kontrolnoj skupini. Dok je kod obrađenih skupina primjećena razlika u odnosu na kontrolu,

vidljivo je kako se 50 % hemolize dogodilo pri koncentraciji od oko 0,40 % NaCl. Pretpostavka je kako je u obrađenim skupinama došlo do prividno smanjene hemolize zbog izlaganja sevofluranu i  $\text{AlCl}_3$  i tako uzrokovanog oksidacijskog stresa koji je potaknuo propadanje zrelih eritrocita tijekom perioda obrade (21 dan). Drugim riječima, došlo je do pojačane hemolize oštećenih stanica i pojavnosti novih stanica zbog nastale hipoksije i potrebe organizma za kisikom. Gutteridge i suradnici (1985) su pokazali peroksidacijske promjene na membranama eritrocita pod utjecajem aluminija, kao i stvaranje rupa i lizu stanica. To može objasniti hemolitički učinak aluminija, koji uzrokuje promjene permeabilnosti membrana eritrocita što može biti potencijalni uzrok ometanja metabolizma stanica. Sevofluran je vjerojatno pojačao toksične učinke aluminija, budući je kombinacija sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  pokazala najveće promjene od obrađenih skupina.

Dobiveni podaci potvrđuju dio nekih od poznatih činjenica kako sevofluran i  $\text{AlCl}_3$  mogu utjecati na stanice perifernih organa, ali daju i nove podatke o njihovoj združenoj kombinaciji. Čini se kako su jetra i bubreg kao ključni organi u eliminaciji toksičnih metabolita najviše pogođeni te pri njihovoj združenoj primjeni najviše pažnje treba usmjeriti upravo na ove organe. Inhalacijski se anestetici često primjenjuju za uvod ili održavanje anestezije, naročito kod zahtjevnijih i opsežnijih operacija. Veći se dio anestetika iz organizma uklanja respiracijom, međutim jedan se dio metabolizira u jetri putem obitelji citokrom oksidaza P-450, i izlučuje putem bubrega (Fee i sur., 1997). Njihovi metaboliti mogu izazvati akutnu ili kroničnu toksičnost putem nekoliko mehanizama: 1) unutarstanično nakupljanje metabolita, 2) stvaranje haptena koji mogu dovesti do hiperosjetljivosti ili imunoreakcije, i 3) stvaranje reaktivnih metabolita koji se mogu kovalentno vezati za stanične makromolekule i stvarati slobodne radikale (Brozović i sur., 2006).

Najčešće korišteni inhalacijski anestetici su sevofluran i izofluran (po sastavu halogenirani eteri) koji uz besvijesno stanje imaju i analgetski učinak. Oni su pare hlapljivih tekućina, neionizirani, male molekulske mase i liposolubilni pri čemu brzo difundiraju u tkiva i uzrokuju brz uvod u anesteziju i brzo buđenje (Antkowiak, 2001). Anestezija se postiže izjednačavanjem parcijalnih tlakova inhalacijskog anestetika u alveolama, krvi i mozgu. Slabo se metaboliziraju i većinom se eliminiraju gotovo nepromijenjeni preko pluća (McHaourab i sur., 2001) što potvrđuju i naši rezultati. Nakon anestezije smanjen je metabolizam mozga pa tako imaju neuroprotektivno djelovanje, dok su protok krvi kroz mozak i intrakranijalni tlak povećani (Grasshoff i sur., 2006).

Metabolizmom sevoflurana stvara se heksafluoroizopropanol (HFIP) i anorganski fluoridi koji ne izazivaju oštećenja stanica jetre i bubrega (Kharasch i sur., 1995), ali njihova

povišena koncentracija može dovesti do depresije centralnog živčanog sustava u miševa *in vivo* te prouzročiti citotoksičnost stanica jetre *in vitro* (Conti i sur., 2006).

Sevofluran ima antioksidacijska i protuupalna svojstva u plućnom i srčanom tkivu, ali ne i moždanom. Kod ljudi se nefrotoksično djelovanje može očitovati povećanom oksidacijom lipida i proteina koja se javlja nakon anestezije kod operacija koje traju duže od 120 minuta. DNA oštećenja dokazana su komet testom. Periferni limfociti u bolesnika izloženih sevofluranu imali su povećano oštećenje DNA i smanjenu razinu glutationa koji regulira oksidaciju.

Nadalje, aluminij je metal koji nije podložan redoks promjenama i koji do stanica živčanog sustava dolazi preko krvi pomoću transferina ili monokarboksilata gdje prolazi kroz krvno-moždanu barijeru. Može se unijeti i nazalno olfaktornim putem ili preko cerebrospinalnog likvora. Metali poput aluminijska mogu ubrzati i potencirati nastanak neuralnih oštećenja kao i oštećenja jetre i bubrega. Aluminij se smatra jednim od čimbenika koji pridonose oksidacijskom stresu i stvaranju ROS-a (Katyal i sur., 1997).

Aluminij uzrokuje oksidacijska oštećenja stanica djelujući u obliku aluminijskog superoksida ( $\text{AlO}_2\bullet$ ) koji stabilizira ione željeza reducirajući ih iz  $\text{Fe}^{3+}$  u  $\text{Fe}^{2+}$  i katalizirajući stvaranje  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Sami ioni željeza potpomažu stvaranje ROS-a na način da kataliziraju Fentonovu reakciju u kojoj nastaju  $\text{OH}\bullet$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  pri čemu aluminij ima ulogu supresora superoksid dismutaze (SOD) i katalaze. Superoksidni radikali konvertirani su u  $\text{H}_2\text{O}_2$  koja se zbog smanjenog djelovanja katalaze ne razdvaja na  $\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{O}_2$ . Nakupljanje  $\text{H}_2\text{O}_2$  vodi do povećanog stvaranja  $\text{OH}\bullet$  radikala koji uzrokuju oštećenja proteina DNA i lipida membrane (Exley, 2004) što potvrđuju rezultati razine MDA jetre i bubrega (Slika 21, Slika 36).

Osim pro-upalne prirode aluminijska, aluminij je prooksidans i uzrokuje OS sam ili u nazočnosti željeza. Visoke količine slobodnog željeza su vrlo otrovne. Kada je unutarstanična razina željeza niska, IRP-2 aktivnost (engl. *Iron regulatory proteins*) povećava sintezu receptora transferin koji preuzimaju izvanstanično željeza, što uzrokuje da razina unutarstaničnog slobodnog željeza raste. IRP-2 također suprimira sintezu feritina koji inače vežu slobodno željezo. Aluminij disregulira stanični metabolizam željeza *in vitro* i *in vivo* stabiliziranjem IRP-2 (Ward sur., 2001). To uzrokuje da se stanice ponašaju kao da je u trajnom stanju nedostatka željeza. Dakle, akumulacija aluminijska izravno može proizvesti oksidacijski učinak u stanicama i može disregulirati metabolizam željeza koji dodatno pogoršava razinu oksidacijskog stresa. Vrlo je vjerojatno da *in vivo* oksidacijske aktivnosti aluminijska i željeza su nerazdvojive (Walton i Wang, 2009) i temeljem toga izazivaju povećani

oksidacijski stres na što ukazuju mjereni biljezi oksidacijskih oštećenja tkiva koji su dobar pokazatelj razine oksidacijskih oštećenja.

Biljezi oksidacijskog oštećenja tkiva su MDA (biljeg lipidne peroksidacije), te enzimi SOD, GSH-Px i katalaza. Sevofluran ima sposobnost izazivanja lipidne peroksidacije *in vivo* i *in vitro*, dok istovremeno ne dovodi do povećanja koncentracije antioksidacijskih enzima SOD i GSH-Px. Iz ovoga je vidljivo kako on potiče nastanak oštećenja izazvanih oksidacijskim stresom, bilo povećanjem razine ROS-a ili smanjenjem antioksidacijske zaštite (Türkan i sur., 2011). Uzevši u obzir kako oksidacijska oštećenja doprinose smanjenju funkcionalne sposobnosti pojedinih tkiva i organe, vrijedno bi bilo dalje spoznati koja su oštećenja trajna, a koja oštećenja se popravljaju brzo, ali i kako preventivno utjecati te smanjiti razinu oštećenja.

## 5. ZAKLJUČAK

Temeljem dobivenih rezultata možemo zaključiti sljedeće:

1.  $\text{AlCl}_3$  i kombinacija sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  uzrokovala je značajno povećanje tjelesne težine u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je sevofluran uzrokovao smanjenje tjelesne težine.
2. Mjerenje relativne težine organa pokazalo je najveći utjecaj sevoflurana na smanjenje relativne težine jetre, dok na drugim organima ovaj učinak nije zamjećen. Statistički značajna promjena vidljiva je u tkivu jetre i slezene, u skupini izloženoj kombinaciji sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$ , u odnosu na skupinu izloženu  $\text{AlCl}_3$ .
3. Mjerenje ukupne razine proteina pokazalo je najveći utjecaj kombinacije sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  na smanjenje koncentracije proteina u tkivu jetre u odnosu na kontrolnu skupinu; u tkivu slezene najveći utjecaj na smanjenje koncentracije proteina imao je sevofluran, dok na tkivima pluća i bubrega nije primjećen značajan učinak različitih obrada.
4. Mjerenje razine MDA pokazalo je povećanje koncentracije MDA u svim obrađenim skupinama u tkivu jetre i bubrega, a najveći je utjecaj u odnosu na kontrolnu skupinu imala kombinacija sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$ . Ovaj utjecaj nije zamjećen u tkivima slezene i pluća.
5. Mjerenje razine GSH pokazalo je, u usporedbi s kontrolnom skupinom, najveći utjecaj kombinacije sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  na smanjenje koncentracije GSH u tkivu jetre, dok je skupina obrađena  $\text{AlCl}_3$  pokazala nešto manji utjecaj; u tkivu bubrega najveći utjecaj na smanjenje koncentracije GSH izazvala je obrada  $\text{AlCl}_3$ ; u tkivu slezene primjećen je porast u koncentraciji GSH u skupini izloženoj  $\text{AlCl}_3$ , dok na tkivu pluća nije uočen nikakav utjecaj.
6. Mjerenje enzimske aktivnosti CAT pokazalo je najveći utjecaj  $\text{AlCl}_3$  na smanjenje aktivnosti CAT u tkivima jetre, pluća i bubrega u odnosu na kontrolnu skupinu, ali je do statistički značajnog odstupanja došlo samo u tkivu jetre, dok je u tkivu slezene najveći utjecaj imalo izlaganje kombinaciji sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$ .
7. Mjerenje enzimske aktivnosti SOD pokazalo je najveći utjecaj  $\text{AlCl}_3$  na smanjenje aktivnosti SOD u tkivima jetre i bubrega u odnosu na kontrolnu skupinu, dok u tkivima slezene i pluća nije bilo statistički značajne razlike među skupinama. U tkivu

bubrega došlo je i do povećanja aktivnosti SOD u skupini izloženoj sevofluranu u odnosu na kontrolnu skupinu.

8. Analiza biokemijskih parametara pokazala je značajne promjene koncentracije ALP i ALT u skupni izloženoj sevofluranu u odnosu na kontrolnu skupinu; kombinacija sevoflurana i  $\text{AlCl}_3$  uzrokovala je značajno povećanje koncentracije AMY u odnosu na kontrolnu skupinu i skupinu izloženu  $\text{AlCl}_3$ ; najveći je utjecaj imala obrada  $\text{AlCl}_3$ , koja je uzrokovala značajno povećanje koncentracije ALT i PHOS u odnosu na kontrolnu skupinu. Izlaganje  $\text{AlCl}_3$  također je uzrokovalo smanjenje koncentracije TBIL i CRE u odnosu na skupinu izloženu sevofluranu.
9. Analiza osmotske fragilnosti eritrocita ukazuje na gotovo jednak utjecaj svih obrada u odnosu na kontrolnu skupinu: sve obrade dovode do prividno smanjene hemolize uslijed stanične smrti starijih stanica izazvane obradom.

## 6. LITERATURA

Anonimous (2018a): <https://www.unigiessen.de/fbz/fb08/Inst/mbio/forschung/arbeitsgruppe-klug/projekte/ironmetabolism> Pristupljeno 16. siječnja 2018.

Anonimous (2018b): <http://www.nealhendrickson.com/mcdougall/2004nl/040600pualzheimer.htm> Pristupljeno 10. siječnja 2018.

Anonimous (2018c): <https://www.zmescience.com/medicine/genetic/chemical-switch-alzheimer-kill-neuron-654654/> Pristupljeno 20. veljače 2018.

Anonimous (2018d): <https://www.slideshare.net/AndreaJosFuentesBisbal/oxidative-stress-2014> Pristupljeno 03. ožujka 2018.

Anonimous (2018e): [https://www.researchgate.net/figure/Reaction-of-malondialdehyde-MDA-with-2-molecules-of-2-thiobarbituric-acid-TBA\\_fig1\\_304069866](https://www.researchgate.net/figure/Reaction-of-malondialdehyde-MDA-with-2-molecules-of-2-thiobarbituric-acid-TBA_fig1_304069866) Pristupljeno 07. siječnja 2018.

Amanullah M., Zaman G. S., Begum N. (2013): Safety Aspects in Treatment of Cancer by Carbamate Insecticides as Measured by Osmotic Fragility of Erythrocytes. *Journal of Clinical & Experimental Oncology* **2**(1): 1-5.

Amer J., Fibach E. (2005): Chronic oxidative stress reduces the respiratory burst response of neutrophils from beta-thalassaemia patients. *British Journal of Haematology* **129**: 435-441.

Antkowiak B. (2001): How do general anaesthetics work? *Naturwissenschaften* **88**(5): 2013-213.

Arslan M., Ozkose Z., Akyol G., Barit G. (2008): The age- and gender-dependent effects of desflurane and sevoflurane on rat liver. *Experimental and Toxicologic Pathology* **62**: 35-43.

ATSDR (2008): Toxicological profile for aluminium. Atlanta GA.: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.

Berlyne G. M., Yagil R., Ben Ari J., Weinberger G., Knopf E., Danovitch G. M. (1972): Aluminium toxicity in rats. *The Lancet* **299**: 564-568.

Beyer W., Imlay J., Fridovich I. (1991): Superoxide Dismutase. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology **40**: 221-253.

Bhalla P., Dhawan D. K. (2009): Protective role of lithium in ameliorating the aluminium-induced oxidative stress and histological changes in rat brain. Cellular and Molecular Neurobiology **29**(4): 513-521.

Bharathi, Vasudevaraju P., Govindaraju M., Palanisamy A. P., Sambamurti K., Rao K. S. (2008): Molecular toxicity of aluminium in relation to neurodegeneration. Indian Journal of Medical Research **128**: 545-546.

Bienengraeber M. W., Weihrauch D., Kersten J. R., Pagel P. S., Warltier D. C. (2005): Cardioprotection by volatile anesthetics. Vascular Pharmacology **42**: 243-252.

Bouwman R. A., van't Hof F. N. G., de Ruijter W., van Beek-Harmsen B. J., Musters R. J. P., de Lange J. J., Boer C. (2006): The mechanism of sevoflurane - induces cardioprotection is independent of the applied ischaemic stimulus in rat trabeculae. British Journal of Anaesthesia **97**(3): 307-314.

Braz M. G., Karahalil B. (2015): Genotoxicity of anesthetics *in vivo* (animals). BioMed Research International **2015**: 1-8.

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

Brozović G., Oršolić N., Knežević F., Horvat Knežević A., Benković V., Vrdoljak D. V., Šarić A. (2008): Evaluation of DNA damage *in vivo* induced by combined application of cisplatin and sevoflurane. European Journal of Anaesthesiology **25**: 642-647.

Brozović G., Oršolić N., Rozgaj R., Kasuba V., Knežević F., Horvat Knežević A., Benković V., Lisičić D., Borojević N., Đikić D. (2010): DNA damage and repair after exposure to sevoflurane *in vivo*, evaluated in Swiss albino mice by the alkaline comet assay and micronucleus test. Journal of Applied Genetics **51**(1): 79-86.

Burrows D. L., Nicolaidis A., Stephens G. C., Ferslew K. E. (2004): The distribution of sevoflurane in a sevoflurane induced death. Journal of Forensic Sciences **49**: 1-4.

Chance B., Sies H., Boveris A. (1979): Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiological Reviews **59**(3): 527-605.



- Conti A., Iacopino D. G., Fodale V., Micalizzi S., Penna O., Santamaria L. B. (2006): Cerebral haemodynamic changes during propofol–remifentanyl or sevoflurane anaesthesia: transcranial Doppler study under bispectral index monitoring. *British Journal of Anaesthesia* **97**(3): 333-339.
- Crapper D. R., Krishnan S. S., Dalton A. J. (1973): Brain aluminium distribution in Alzheimer's disease. *Journal of Inorganic Biochemistry* **103**: 1579-1584.
- Data A. K., Shi X., Kasprzak K. S. (1993): Effect of carnosine, homocarnosine, and anserine on hydroxylation of the guanine moiety in 2'-deoxyguanosine, DNA, and nucleohistone with hydrogen peroxide in the presence of nickel (II). *Carcinogenesis* **17**: 417-422.
- Dörnyei A., Kilyen M., Kiss T., Gyurcsik B., Laczkó I., Pécsváradi A., Simon M., Kotormán M. (2003): The effects of Al (III) speciation on the activity of trypsin. *Journal of Inorganic Biochemistry* **97**: 118-123.
- Drüeke T. B., Jouhanneau P., Banide H., Lacour B., Yiou F., Raisbeck G. (1997): Effects of silicon, citrate and the fasting state on the intestinal absorption of aluminium in rats. *Clinical Science* **92**: 63-67.
- EFSA (2008): Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Food Contact Materials (AFC). Safety of aluminium from dietary intake. *The EFSA Journal*. **6**(7): 1-34.
- EFSA (2011): Statement of EFSA on the Evaluation of a new study related to the bioavailability of aluminium in food. *EFSA Journal* **9**(5): 2157.
- Ellis H., Scurr J. H. (1979): Axillary hyperhidrosis – topical treatment with aluminium chloride hexahydrate. *Postgraduate Medical Journal* **55**: 868-869.
- Exley C. (2004): The pro-oxidant activity of aluminum. *Free Radical Biology and Medicine* **36**(3): 380-387.
- FAO/WHO (2012): Safety evaluation of certain food additives and contaminants: Prepared by the seventy-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). *WHO Food Additives Series* **65**: 3-86.
- Fee J. P. H., Thompson G. H. (1997): Comparative tolerability profiles of the inhaled anaesthetics **16**(3): 157-170.

- Ferreira P. C., Piai Kde A., Takayanagui A. M., Segura-Muñoz S. I. (2008): Aluminium as a risk factor for Alzheimer's disease. *Revista Latino-Americana De Enfermagem* **16**: 151-157.
- Floyd R. A., Carney J. M. (1992): Free radical damage to protein and DNA: Mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Annals of Neurology* **32**(S1): 22-27.
- Freeman B. A., Crap J. D. (1982): Biology and disease injury. *Laboratory Investigation* **47**: 412-426.
- Fridovitch I. (1995): Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual review of Biochemistry* **64**: 97-112.
- Friedman J. (2011): Why Is the Nervous System Vulnerable to Oxidative Stress? U: Gadoth N., Göbel H. (ur.) *Oxidative Stress and Free Radical Damage in Neurology. Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice. Humana Press* 19-27.
- Ghorbel I., Chaabane M., Elwej A., Boudawara O., Abdelhedi S., Jamoussi K., Boudawara T., Zeghal N. (2016): Expression of metallothioneines I and II related to oxidative stress in the liver of aluminium-treated rats. *Archives of Physiology and Biochemistry* **122**(4): 214-222.
- Ghorbel I., Maktouf S., Kallel C., Ellouze Chaabouni S., Boudawara T., Zeghal N. (2015): Disruption of erythrocyte antioxidant defence system, haematological parameters, induction of pro-inflammatory cytokines and DNA damage in liver of co-exposed rats to aluminium and acrylamide. *Chemico-Biological Interactions* **236**: 31-40.
- Goh C. L. (1990): Aluminium chloride hexahydrate versus palmar hyperhidrosis evaporimeter assessment. *International Journal of Dermatology* **29**: 369-370.
- Grasshoff C., Drexler B., Rudolph U., Antkowiak B. (2006): Anaesthetic drugs: linking molecular action to clinical effects. *Current Pharmaceutical Design* **12**: 3665-3679.
- Gutteridge J. M., Halliwell B., Treffry A., Harrison P. M., Blake D. (1983): Effect of ferritin-containing fractions with different iron loading on lipid peroxidation. *Biochemical Journal* **209**(2): 557-560.
- Gutteridge J. M., Quinlan G. J., Clark I., Halliwell B. (1985): Aluminium salts accelerate peroxidation of membrane lipids stimulated by iron salts. *Biochimica et Biophysica Acta – Lipids and Lipid Metabolism* **835**(3): 441-447.

- Halliwell B., Aruoma O. I. (1991): DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters **281**: 9-19.
- Hengartner M. O. (2000): The biochemistry of apoptosis. Nature **407**: 770-776.
- Hohl C., Gerisch P., Korschinek G., Nolte E., Ittel T. H. (1994): Medical application of <sup>26</sup>Al. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B **92**: 478-482.
- Hussain S. P., Hofseth L. J., Harris C. C. (2003): Radical causes of cancer. Nature Reviews Cancer **3**: 275-285.
- Inoue S., Kawanishi S. (1989): ESR evidence for superoxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen produced from hydrogen peroxide and nickel (II) complex of glycylglycyl-L-histidine. Biochemical and Biophysical Research Communications **159**: 445-451.
- Jouhanneau P., Lacour B., Raisbeck G., Yiou F., Banide H., Brown E., Drüeke T. (1993): Gastrointestinal absorption of aluminium in rats using <sup>26</sup>Al and accelerator mass spectrometry. Clinical Nephrology **40**(4): 244-248.
- Katyal R., Desigan B., Sodhi C. P., Ojha S. (1997): Oral aluminium administration and oxidative injury. Biological Trace Element Research **57**(2): 125-130.
- Kharasch E. D., Karol M. D., Lanni C., Sawchuk R. (1995): Clinical sevoflurane metabolism and disposition: I. Sevoflurane and metabolite pharmacokinetics. Anesthesiology **82**: 1369-1378.
- Kharasch E. D., Schroeder J. L., Bammler T., Beyer R., Srinouanprachanh S. (2006): Gene expression profiling of nephrotoxicity from the sevoflurane degradation product fluoromethyl-2,2-difluoro-1-(trifluoromethyl)vinyl ether („Compound A“) in rats. Toxicological Sciences **90**(2): 419-431.
- Kim Y., Olivi L., Cheong J. H., Maertens A., Bressler J. P. (2007): Aluminium stimulates uptake of non-transferrin bound iron and transferrin bound iron in human glial cells. Toxicology and Applied Pharmacology **220**: 349-356.
- Kitano H., Kirsch J. R., Hurn P. D., Murphy S. J. (2007): Inhalational anesthetics as neuroprotectants or chemical preconditioning agents in ischemic brain. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism **27**: 1108-1128.

Kovacic P., Somanathan R. (2011): Mechanism of anesthetic toxicity: metabolism, reactive oxygen species, oxidative stress, and electron transfer. *ISRN Anaesthesiology* **2011**: 1-10.

Kvolik S., Glavaš - Obrovac Lj., Bareš V., Karner I. (2005): Effects of inhalation anesthetics halothane, sevoflurane, and isoflurane on human cell lines. *Life Sciences* **77**: 2369-2383.

Kudoh A., Matsuki A. (2000): Sevoflurane stimulates inositol 1,4,5-triphosphate in skeletal muscle. *Anesthesia & Analgesia* **91**: 440-445.

Lee Y. M., Song B. C., Yeum K. J. (2015): Impact of volatile anesthetics on oxidative stress and inflammation. *BioMed Research International* **2015**: 1-8.

Leonard S. S., Gannett P. M., Rojanasakul Y., Schwegler - Berry D., Castranova V., Vallyathan V., Shi X. (1998): Cobalt - mediated generation of reactive oxygen species and its mechanism of action. *Journal of Inorganic Biochemistry* **70**: 239-244.

Leonard S. S., Harris G. K., Shi X. (2004): Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radical Biology & Medicine* **37**(12): 1921-1942.

Liang R. F., Li W. Q., Wang X. H., Zhang H. F., Wang H., Wang J. X., Zhang Y., Wan M. T., Pan B. L., Niu Q. (2012): Aluminium – Maltolate - Induces Impairment of Learning, Memory and Hippocampal Long-term Potentiation in Rats. *Industrial Health* **50**: 428-436.

Liu X., Kim C. N., Yang Y., Jemmerson R., Wang X. (1996): Induction of Apoptotic Program in Cell - Free Extracts: Requirement for dATP and Cytochrome c. *Cell* **86**(1): 147-157.

Love S. (1999): Oxidative Stress in Brain Ischemia. *Brain Pathology* **9**(1): 119-131.

Ludwig L. M., Weihrauch D., Kersten J. R., Pagel P. S., Warltier D. C. (2004): Protein kinase C translocation and Src protein tyrosine kinase activation mediate isoflurane induced preconditioning *in vivo*: potential downstream targets of mitochondrial adenosine triphosphate - sensitive potassium channels and reactive oxygen species. *Anesthesiology* **100**: 532-539.

Marzo I., Brenner C., Zamzami N., Jürgensmeier J. M., Susin S. A., Vieira H. L. A., Prévost M. C., Xie Z., Matsuyama S., Reed J. C., Kroemer G. (1998): Bax and Adenine Nucleotide Translocator Cooperate in the Mitochondrial Control of Apoptosis. *Science* **281**: 2027-2031.

Mchaourab A., Arain S. R., Ebert T. J. (2001): Lack of degradation of sevoflurane by a new carbon dioxide absorbent in humans. *Anesthesiology* **94**: 1007-1009.

- Muckter H., Zwing M., Bader S., Marx T., Doklea E., Liebl B., Fichtl B., Georgieff M. (1998): A novel apparatus for the exposure of cultured cells to volatile agents. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **40**: 63-69.
- Narita M., Shimizu S., Ito T., Chittenden T., Lutz R. J., Matsuda H., Tsujimoto Y. (1998): Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* **95**(25): 14681-14686.
- Pape M., Engelhard K., Eberspächer E., Hollweck R., Kellermann K., Zintner S., Hutzler P., Werner C. (2006): The long-term effect of sevoflurane on neuronal cell damage and expression of apoptotic factors after cerebral ischemia and reperfusion in rats. *International Anesthesia Research Society* **103**: 173-179.
- Poirier J., Semple H., Davies J., Lapointe R., Dziwenka M., Hiltz M., Mujibi D. (2011): Double-blind, vehicle-controlled randomized twelve-month neurodevelopmental toxicity study of common aluminium salts in the rat. *Neuroscience* **193**: 338-362.
- Pratt Jr. P., Wanh C., Weihrauch D., Bienengraeber M. W., Kersten J. R., Pagel P. S., Warltier D. C. (2006): Cardioprotection by volatile anesthetics: new applications for old drugs? *Current Opinion in Anaesthesiology* **19**: 397-403.
- Quintiliani M., Badiello R., Tamba M., Esfandi A., Gorin G. (1977): Radiolysis of glutathione in oxygen - containing solutions of pH 7. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry, and Medicine* **32**: 195-202.
- Raha S., Robinson B. H. (2002): Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. *American Journal of Medical Genetics* **106**(1): 62-70.
- Roberts R. A., Laskin D. L., Smith C. V., Robertson F. M., Allen M. G., Doorn J. A., Slikker W. (2009): Nitrate and oxidative stress in toxicology and disease. *Toxicological Sciences* **112**(1): 4-16.
- Rodrigo R. (2009): *Oxidative stress and antioxidants: Their role in human disease*. Nova Biomedical Books, New York.
- Rozgaj R., Kasuba V., Brozović G., Jazbec A. (2009): Genotoxic effects of anesthetics in operating personnel evaluated by the comet assay and micronucleus test. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **212**: 11-17.

Saez G. T., Bannister W. H., Bannister J. V. (1990): Free radicals and thiol compounds the role of glutathione against free radical toxicity. U: Vina J. (Ur.) Glutathione: Metabolism and Physiological Functions. CRC Press Online 237-254.

Sanders L. H., Greenamyre J. T. (2013): Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. *Free Radical Biology and Medicine* **62**: 111-120.

SCCS (2014): Scientific Committee on Consumer Safety. Opinion on the safety of aluminium in cosmetic products 34.

Sharma H. S., Sharma A. (2012): Neurotoxicity of engineered nanoparticles from metals. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets* **1**: 65–80.

Shi X. L., Dalal N. S. (1990): One-electron reduction of chromate by NADPH-dependent glutathione reductase. *Journal of Inorganic Biochemistry* **40**: 1-12.

Shi X. L., Dong Z., Dalal N. S., Gannett P. M. (1994): Chromate - mediated free radical generation from cysteine, penicillamine, hydrogen peroxide, and lipid hydroperoxides. *Biochimica et Biophysica Acta* **1226**: 65-72.

Shimizu S., Narita M., Tsujimoto Y., Tsujimoto Y. (1999): Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**: 483-487.

Song B. C., Joo N. S., Aldini G., Yeum K. J. (2014): Biological functions of histidine-dipeptides and metabolic syndrome. *Nutrition Research and Practice* **8**: 3-10.

Sorenson J. R., Campbell I. R., Tepper L. B., Lingg R. D. (1974): Aluminum in the Environment and Human Health. *Environmental Health Perspectives* **8**: 3-95.

Sugamura K., Keaney J. F. Jr. (2011): Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radical Biology & Medicine* **51**: 978-992.

Sumathi T., Shobana C., Kumari B. R., Nandhini D. N. (2011). Protective role of cynodon dactylon in ameliorating the aluminium-induced neurotoxicity in rat brain regions. *Biological Trace Element Research* **144**: 843–853.

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

- Štefan L., Tepšić T., Zavidčić T., Urukalo M., Tota D., Domitrović R. (2007): Lipidna peroksidacija - uzroci i posljedice. *Medicina* **43**: 84-93.
- Türkan H., Aydin A., Sayal A., Eken A., Akay C., Karahalil B. (2011): Oxidative and antioxidative effects of desflurane and sevoflurane on rat tissue *in vivo*. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **62**: 113-119.
- Vander Heiden M. G., Thompson C. B. (1999): Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nature Cell Biology* **1**: 209-216.
- von Harsdorf R., Li P. F., Dietz R. (1999): Signaling Pathways in Reactive Oxygen Species–Induced Cardiomyocyte Apoptosis. *Circulation* **99**(22): 2934-2941.
- Verstraeten S. V., Aimo L., Oteiza P. I. (2008): Aluminium and lead: molecular mechanisms of brain toxicity. *Archives of Toxicology* **11**: 789-802.
- Walton J. R. (2007): A longitudinal study of rats chronically exposed to aluminum at human dietary levels. *Neuroscience Letters* **1**: 29-33.
- Walton J. R., Wang M. X. (2009): APP expression, distribution and accumulation are altered by aluminum in a rodent model for Alzheimer's disease. *Journal of Inorganic Biochemistry* **103**(11): 1548-1554.
- Wang C., Zhang X., Liu F., Paule M.G., Slikker Jr. W. (2010): Anesthetic - induced oxidative stress and potential protection. *The Scientific World Journal* **10**: 1473-1482.
- Ward R. J., Zhang Y., Crichton R. R. (2001): Aluminium toxicity and iron homeostasis. *Journal of Inorganic Biochemistry* **87**: 9–14.
- 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.
- Weinstein J., Bielski B. H. J. (1979): Kinetics of the interaction of perhydroxyl and superoxide radicals with hydrogen peroxide. The Haber-Weiss reaction. *Journal of the American Chemical Society* **101**(1): 58-62.
- Wise-Faberowski L., Raizada M. K., Summers C. (2003): Desflurane and sevoflurane attenuate oxygen and glucose deprivation - induced neuronal cell death. *Laboratory Investigations* **15**(3): 193-199.

- Wolff S. P., Garner A., Dean R. T. (1986): Free radicals, lipids and protein degradation. *Trends in Biochemical Sciences* **11**(1): 27-31.
- Wong C. H., Liu T. Z., Chye S. M., Lu F. J., Liu Y. C., Lin Z. C., Chen C. H. (2006): Sevoflurane - induces oxidative stress and cellular injury in human peripheral polymorphonuclear neutrophils. *Food and Chemical Toxicology* **44**: 1399-1407.
- Wu Z., Du Y., Xue H., Wu Y., Zhou B. (2012): Aluminum induces neurodegeneration and its toxicity arises from increased iron accumulation and reactive oxygen species (ROS) production. *Neurobiology of Aging* **33**: 12–199.
- Yuan C. Y., Lee Y. J., Wang Hsu G. S. (2012): Aluminium overload increases oxidative stress in four functional brain areas of neonatal rats. *Journal of Biomedical Science* **19**: 1-51.
- Yokel R. A., Rhineheimer S. S., Brauer R. D., Sharma P., Elmore D., McNamara P. J. (2001): Aluminium bioavailability from drinking water is very low and is not appreciably influenced by stomach contents or water hardness. *Toxicology* **161**: 93-101.
- Yumoto S., Kakimi S., Oshaki A., Ishikawa A. (2009): Brain aluminium distribution in Alzheimer's disease and experimental neurofibrillary degeneration. *Journal of Inorganic Biochemistry* **103**: 1579-1584.
- Zandi E., Karin M. (1999): Bridging the gap: composition, regulation, and physiological function of the I $\kappa$ B kinase complex. *Molecular and Cellular Biology* **19**: 4547-4551.
- Zhou Y., Yokel R. A. (2005): The chemical species of aluminium influences its paracellular flux across and uptake into Caco-2 cells, a model of gastrointestinal absorption. *Toxicological Sciences* **87**: 15-26.



# ŽIVOTOPIS:

**Ime i prezime:** Lydia Gaćina

**Datum rođenja:** 19. 04. 1993., Zadar (Hrvatska)

## **Obrazovanje:**

2015. - 2018. Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu – Biološki odsjek, diplomski studij Eksperimentalna biologija, smjer: Fiziologija i imunobiologija

2013. - 2015. Sveučilište u Splitu, Odjel za studije mora - preddiplomski studij Biologija i ekologija mora

2007. – 2012. Prirodoslovno – matematička Gimnazija Zadar

## **Laboratorijska stručna praksa:**

- 2018. PMF – Biološki odsjek, Zavod za animalnu fiziologiju (pod vodstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić)
- 2017. PMF - Biološki odsjek, Zavod za animalnu fiziologiju (pod vodstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić)
- Studeni 2016.- svibanj 2017. - Biološki odsjek, Zavod za animalnu fiziologiju, usavršavanje u sklopu projekta: Application of innovative technologies for production of plant extract as an ingredients for functional food (nositelj projekta: prof. dr. sc. Domagoj Đikić)

**Noć biologije:** 13. travnja 2018.

## **Rad na projektu: Međunarodni bilateralni projekt MZOŠ „BIOECOCROMON-Biološka i ekološka istraživanja Južnog Jadrana“**

- Studeni 2016. - travanj 2017.  
PMF – Biološki odsjek, Zavod za animalnu fiziologiju  
(nositelj projekta: prof. dr. sc. Domagoj Đikić)

**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“

**Radno iskustvo:**

- Ljeto 2015., 2016. i 2017. Pomoćno osoblje u kuhinji – Konoba „Baroni“ – Mali Iž
- Ljeto 2007. – 2015. – razni studentski poslovi