Učinak izoflurana i željezo dekstrana na biokemijske i upalne parametre tkiva i organa u štakora

Paparić Miletić, Elizabeta

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:683635

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Elizabeta Paparić

Učinak izoflurana i željezo dekstrana na biokemijske i upalne parametre tkiva i organa u štakora

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

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

Veliko hvala mojoj profesorici i mentorici dr. sc. Nadi Oršolić na ukazanom povjerenju, razumijevanju, strpljenju, i savjetima pri izradi ovog diplomskog rada, te je uvijek imala svoja vrata otvorena za moja pitanja.

Posebno se zahvaljujem asistentici Dyani Odeh koja mi je svojim znanjem i vremenom uvelike olakšala izvođenje eksperimenta i pisanje ovog rada.

Također se zahvaljujem Lydiji Gaćini koja mi je svojim radom i prisutnošću olakšala dane provedene u laboratoriju, te mi pomagala u izvedbi eksperimentalnog dijela rada.

Zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za animalnu fiziologiju koji su mi na bilo koji način pomogli, a posebno hvala tehničarima Mariji Potočić i Hrvoju Jedvaj, na strpljenju, razumijevanju i pomoći tijekom boravka u laboratorijima.

Želim se zahvaliti svojoj kolegici i prijateljici Aniti Mišić koja je bila uz mene u svim trenucima mojeg fakultetskog obrazovanja, a naročito u ovom vremenu izrade diplomskog rada. Hvala na svakoj pomoći, utjesi, smijehu i druženju.

Posebno se želim zahvaliti svojim roditeljima, Jadranki i Šimi, koji su bili uz mene tijekom cijelog mojeg života, koji su me podupirali, ohrabrivali i uvijek vjerovali u moj uspjeh. Veliko hvala mojim sestrama Ani i Katarini koje su me uvijek razveseljavale, bodrile, slušale i pratile na putu.

Najveće hvala mojem suprugu Ivanu na svom strpljenju i slušanju, razumijevanju i utjesi, ljubavi i radosti koju mi je pružio, a posebno hvala što mi je uvijek davao snage za naprijed, vjerovao u moj uspjeh i bio moj oslonac.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

Učinak izoflurana i željezo dekstrana na biokemijske i upalne parametre u štakora

Elizabeta Paparić
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Anestetici su vrste lijekova u plinovitom, tekućem ili drugom obliku, čija je funkcija uvođenje i/ili održavanje anestezije s ciljem olakšavanja kirurških i drugih bolnih zahvata. Izofluran ima brzo farmakološko djelovanje i apsorbanciju, te potiče brz oporavak nakon anestezije. Međutim, dugotrajno izlaganje anesteticima djeluje negativno na periferne organe i tkiva, te potiče upalu, oksidacijski stres, nekrozu i apoptozu vodeći pojavnosti neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti. Željezo je neizostavni dio živućeg organizma i poremećajem njegove homeostaze nastaje redoks aktivno željezo koje utječe na stvaranje ROS-a, ozljeda tkiva, poremećaja rasta stanica, te u konačnici na pojavu oksidacijskog stresa. Temeljem navedenog, cilj rada jest istražiti utjecaj primjene anestetika izoflurana samog i/ili združenog sa željezo dekstranom na razinu oksidacijskog stresa i posljedične upale na uzorcima tkiva jetre, slezene i bubrega. Dobiveni rezultati ukazuju da dugotrajna primjena izoflurana i željezo-dekstrana samog ili u kombinaciji povećava razinu oksidacijskog stresa i upale u stanicama jetre, bubrega i slezene te vodi njihovom oštećenju na što ukazuje povećanje biokemijskih parametara u serumu te hemoliza eritrocita.

(78 stranica, 25 slika, 6 tablica, 77 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici Prirodoslovno - matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb, Hrvatska.
Ključne riječi: inhalacijski anestetici, izofluran, željezo dekstran, upala, oksidacijski stres
Voditelj: prof. dr. sc. Nada Oršolić
Ocjenitelji: prof. dr. sc. Nada Oršolić; izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner; izv. prof. dr. sc. Sandra Radić Brkanac
Rad prihvaćen: 29.11.2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

The effect of isoflurane and iron dextran on biochemical and inflammatory parameters of tissues and organs in rats

Elizabeta Paparić
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Anesthetics are types of medicines in a gaseous, liquid or other form, whose function is the introduction and/or maintenance of anesthesia with the aim of facilitating surgical and other painful interventions. Isoflurane has rapid pharmacological activity and absorbance, and stimulates rapid recovery after anesthesia. Long-term exposure to anesthetic acts negatively on peripheral organs and tissues, stimulates inflammation, oxidative stress, necrosis, and apoptosis leading to neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's disease. Iron is an indispensable part of the living organism and the disorder of its homeostasis produces redox active iron that affects the formation of ROS, tissue injury, cell growth disorder, and ultimately the appearance of oxidative stress. The aim of the study was to investigate the effect of isoflurane itself and/or the combination of iron dextran on the level of oxidative stress and consequent inflammation on liver, spleen and kidney tissues. The obtained results indicate that long-term use of isoflurane and iron-dextran alone or in combination increases the level of oxidative stress and inflammation in the liver, kidney and spleen cells and leads to their impairment, indicating an increase in biochemical parameters in serum and hemolysis of erythrocyte.

(78 pages, 25 figures, 6 tables, 77 references, original in: Croatian)
Thesis deposited in the Central Biological Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia.
Key words: inhalation anesthetics, isoflurane, iron dextran, inflammation, oxidative stress
Supervisor: Dr. Nada Oršolić, Prof.
Reviewers: Dr. Nada Oršolić, Prof.; Dr. Jasna Lajtner, Assoc. Prof.; Dr. Sandra Radić Brkanac, Assoc. Prof.
Thesis accepted: 29.11.2018.

1. UVOD 1
1.1. Anestezija 1
1.1.2. Opća anestezija 2
1.1.3. Lokalna anestezija 3
1.2. Anestetici 4
1.2.1. Inhalacijski anestetici 6
1.3. Izofluran 9
1.4. Teški metali 12
1.4.1. Željezo 13
1.4.2. Željezo dekstran 16
1.5. Upala i oksidacijski stres 19
1.5.1. Utjecaj izoflurana na pojavu upale i oksidacijskog stresa 23
1.5.2. Aktivacija upale i oksidacijskog stresa prilikom upotrebe željezo dekstrana 25
1.6. Cilj rada 27
2. MATERIJALI I METODE 28
2.1. Materijali 28
2.1.1. Pokusne životinje 28
2.1.2. Kemijski spojevi 28
2.1.2.1. Izofluran 28
2.1.2.2. Željezo dekstran 28
2.1.2.3. Priprema željezo dekstrana 28
2.1.3. Laboratorijska oprema 29
2.2. Metode 30
2.2.1. Praćenje promjena tjelesne mase 30
2.2.2. Relativni indeks težine organa 30
2.2.3. Obrada životinja 30
2.2.4. Priprema i izolacija tkiva 32

2.2.5. Analiza biokemijskih parametara 32
2.2.6. Osmotska otpornost eritrocita 32
2.2.7. Metode biljega oksidacijskog stresa 33
2.2.7.1. Određivanje proteina po Lowry-u 33
2.2.7.2. Mjerenje enzimske aktivnosti katalaze (CAT) 34
2.2.7.3. Određivanje koncentracije malondialdehida (MDA) 34
2.2.7.4. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) 36
2.2.7.5. Mjerenje koncentracije ukupnog glutationa (GSH) 37
2.2.8. Statistička obrada podataka 39
3. REZULTATI 40
3.1. Relativni indeks težine jetre 40
3.2. Relativni indeks težine slezene 41
3.3. Relativni indeks težine bubrega 42
3.4. Mjerenje oksidacijskog stresa u perifernim organima štakora 43
3.4.1. Ukupni proteini u uzorcima organa jetre štakora 43
3.4.2. Razina lipidne peroksidacije (MDA) u uzorcima organa jetre štakora 44
3.4.3. Razina ukupnog glutationa (GSH) u uzorcima organa jetre štakora 45
3.4.4. Enzimska aktivnost katalaze (CAT) u uzorcima organa jetre štakora 46
3.4.5. Enzimska aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u uzorcima organa jetre štakora 47
3.4.6. Ukupni proteini u uzorcima organa slezene štakora 48
3.4.7. Razina lipidne peroksidacije (MDA) u uzorcima organa slezene štakora 49
3.4.8. Razina ukupnog glutationa (GSH) u uzorcima organa slezene štakora 50
3.4.9. Enzimska aktivnost katalaze (CAT) u uzorcima organa slezene štakora 51
3.4.10. Enzimska aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u uzorcima organa slezene štakora 52
3.4.11. Ukupni proteini u uzorcima organa bubrega štakora 53
3.4.12. Razina lipidne peroksidacije (MDA) u uzorcima organa bubrega štakora 54

3.4.13. Razina ukupnog glutationa (GSH) u uzorcima organa bubrega štakora 55

3.4.14. Enzimska aktivnost katalaze (CAT) u uzorcima organa bubrega štakora 56

3.4.15. Enzimska aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u uzorcima organa bubrega štakora 57

3.5. Analiza biokemijskih parametara 58

3.6. Osmotska fragilnost eritrocita 61

4. RASPRAVA 62

5. ZAKLJUČAK 72

6. LITERATURA 73

POPIS KRATICA:

4-HNE – 4-hidroksinon (engl. *4-hydroxynonenal*)

Aβ – Amiloid beta (engl. *Amyloid beta*)

AGE – Krajnji produkti glikacije (engl. *Advanced glycation end products*)

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

ALB – Albumin (engl. *Albumin*)

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

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

AMY – Amilaza (engl. *Amylase*)

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

AP-1 – Aktivacijski protein 1 (engl. *Activator protein 1*)

BACE – Aspartil β-proteazni APP-cjepajući enzim (engl. *Aspartyl protease beta-site APP-cleaving enzyme*)

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

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

BSA – Albumin goveđeg seruma (engl. *Bovine serum albumin*)

CAT – Katalaza (engl. *Catalase*)

CBF – Protok krvi u mozgu (engl. *Cerebral blood flow*)

COX-2 – Ciklooksigenaza-2 (engl. *Cyclooxygenase*-2)

CRE – Kreatinin (engl. *Creatinine*)

CRF – Kronično zatajenje bubrega (engl. *Chronic renal failure*)

DNA – Deoksiribonukleinska kiselina (engl. *Deoxiribonucleic acid*)

DTNB – 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoična kiselina (engl. *5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)*)

EPSP – Pobudni postsinaptički potencijal (engl. *Excitatory postsynaptic potential*)

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

Fe-dekstran – Željezo dekstran (engl. *Iron dextran*)

$GABA_A$ – γ-aminomaslačna kiselina tipa A (engl. *γ-Aminobutyric acid type A*)

GLOB – Globulin (engl. *Globuline*)

GLU – Glukoza (engl. *Glucose*)

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

GR – Glutation reduktaza (engl. *Glutathione reductase*)

GSH – Glutation (engl. *Glutathione*)

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

H2AX – H2A histon obitelji X (engl. *H2A histone family member X*)

HIF-1 – Hipoksijom inducirani faktor 1 (engl. *Hypoxia-inducible factor 1*)

HMW – Visokomolekularna težina (engl. *High molecular weight*)

ICP – Intrakranijalni tlak (engl. *Intracranial pressure*)

IgE – Imunoglobulin E (engl. *Immunoglobulin E*)

IGF-1 – Inzulinu sličan faktor rasta 1 (engl. *Insulin-like growth factor*)

IgG – Imunoglobulin G (engl. *Immunoglobulin G*)

IL – Interleukin (engl. *Interleukine*)

iNOS – Induktivna sintaza dušikovog oksida (engl. *Inducible nitric oxide synthase*)

IR – Ishemija-reperfuzija (engl. *Ischemia reperfusion*)

IV – Intravenozno (engl. *Intravenous*)

K_{2P} – Domena dviju pora pozadine K^+ kanala (engl. *Two-pore-domain background* K^+ *channels*)

LOX – Lipooksigenaza (engl. *Lipooxygenase*)

LMW – Niskomolekularna težina (engl. *Low molecular weight*)

MAC – Minimalna alveolarna koncentracija (engl. *Minimal alveolar concentracion*)

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

MCAO – Srednja cerebralna arterookluzija (engl. *Middle cerebral arteryocclusion*)

MDA – Malondialdehid (engl. *Malondialdehyde*)

MMP – Matriks metaloproteinaze (engl. *Matrix metalloproteinase*)

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

NFAT – Nuklearni faktor aktiviranih T stanica (engl. *Nuclear factor of activated T cells*)

NF-κB – Nuklearni čimbenik κB (engl. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NK – Prirodnoubilačke (engl. *Natural killer*)

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

NOS – Reaktivna dušikova vrsta (engl. *Reactive nitrogen species*)

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

PHOS – Fosfati (engl. *Phosphates*)

PN – Parenteralna prehrana (engl. *Parenteral nutrition*)

rHuEPO – Rekombinantni humani eritropoetin (engl. *Recombinant human erythropoietin*)

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

RyR – Ryanodin receptor (engl. *Ryanodine receptor*)

SAH – Subarahnoidalno krvarenje (engl. *Subarachnoid hemorrhage*)

SIN – Sustavni upalni odgovor (engl. *Systemic inflammatory response*)

SNpc – Stanice bazalnih ganglija srednjeg mozga (engl. *Substantia nigra pars compacta*)

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

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

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

TDI – Ukupna doza infuzije (engl. *Total dose infusion*)

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

TGF-β – Transformirajući čimbenik rasta (engl. *Transforming growth faktor-β*)

TNB – 5-tionitrobenzoična kiselina (engl. *2-nitro-5-thiobenzoic acid*)

TNF-α – Čimbenik tumorske nekroze α (engl. *Tumor necrosis factor α*)

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

VEGF – Krvožilni endotelni čimbenik rasta (engl. *Vascular endothelial growth factor*)

XOD – Ksantin oksigenaza (engl. X*anthine oxygenase*)

1. UVOD

1.1. Anestezija

Anestezija je medicinska metoda kojom se, prije izvođenja operacije koristeći anestetik, pacijenta ili životinju dovodi u stanje sna (opća anestezija) ili se dio tijela ne osjeća kako bi se izbjegla bol (lokalna anestezija). Cilj provođenja anestezije jest postizanje bolesnikove:

1. nesvjesnosti,
2. amnezije,
3. analgezije,
4. nepokretnosti,
5. slabljenja odgovora autoimunoga živčanog sustava na bolnu stimulaciju, pritom kojih treba dati optimalne doze lijekova s ciljem postizanja pravoga učinka, a izbjegavanja nuspojava ili toksičnosti lijekova, te održavanja unutarnje homeostaze (Jukić i sur., 2015).

Prva faza sekvencijalnog postupka je indukcija koja inicira privremeno stanje nesvijesti, amnezije, analgezije i opuštanja mišića, a sve počinje pripremom pacijenta i procjenom u sigurnom i nadziranom okruženju anestetske sobe gdje se provode primijena lijekova i intervencija dišnih puteva, te anestetik zatim prolazi faze održavanja, ekscitacije i oporavka (Dean i Chapman, 2018). Pacijenta se uvodi u opću anesteziju, njena uloga je omogućiti intubaciju osobe ili životinje, te se u pravilu izvodi intravenskom primjenom anestetika (Jukić i sur., 2015).

Nakon završetka indukcijske faze slijedi faza održavanja gdje se kontinuirano daje intravenozni (IV) anestetik, no u većini slučajeva dolazi do uvođenja hlapljivog anestetika jer se koncentracija IV anestetika u mozgu ubrzano smanjuje, a koncentracija hlapljivog doseže anestetičke koncentracije sporo što dovodi do potencijalnog raskoraka u dubini anestezije, te se pacijenta povezuje sa dišnim kružnim putem primjenjujući pare ili svježi plin kako bi se postigla srednja alveolarna koncentracija (MAC, engl. *Minimal alveolar concentration*) od najmanje 0,8 izbjegavajući slučajnu svjesnost (Dean i Chapman, 2018).

U konačnici dolazi do oporavka koje počinje kako se zahvat bliži kraju, te ovisi o starosti pacijenta, njegovom zdravstvenom stanju i tipu operacijskog zahvata (Dean i Chapman, 2018).

1.1.2. Opća anestezija

Općom se anestezijom pacijentu oduzima svijest, bolni podražaji mu se ublažuju, te se osigurava gubitak refleksije koja pomaže u operativnom procesu. Bolesnik se u opću anesteziju može uvesti i održavati primjenom tvari intravenskim, inhalacijskim ili kombiniranim putem, a u svakodnevnoj praksi najčešći je uvod intravenskim lijekovima, te održavanje dominantno inhalacijskim (Jukić i sur., 2015). Odsutnost svijesti tijekom opće anestezije obično se može uočiti kao gubitak reakcije na naredbu ili odsutstvo izričitog sjećanja, međutim, tijekom progresivnog produbljenja opće anestezije mnogi pacijenti prestaju reagirati i odvajaju se od okoline, ali ipak zadržavaju određeni subjektivni osjećaj postojanja što se naziva 'parcijalnom svijesti' (Sleigh i sur., 2018). Najčešće korišteni lijekovi za vođenje opće anestezije su:

1. adjuvantni lijekovi (antiemetici, antiaritmici, simpatomimetici, parasimpatomimetici i sl.)
2. inhalacijski anestetici (N_2O, sevofluran, izofluran, desfluran, halotan)
3. intravenski anestetici (tiopental, propofol, etomidat, ketamin, midazolam)
4. mišićni relaksansi (sukcinilkolin, pankuronij, vekuronij, rokuronij, atrakurij itd.)
5. opioidi (morfin, fentanil, sufentanil, alfentanil, remifentanil) (Jukić i sur., 2015).

Opći anestetici djeluju specifično na simpatički prijenos u središnjem živčanom sustavu pojačavajući inhibicijski prijenos i smanjujući ekscitacijski prijenos, a sinaptički mehanizmi općih anestetika uključuju i presinaptičke učinke na oslobađanje odašiljača i postsinaptičke učinke na funkciju receptora (Hemmings Jr., 2009). Smatra se da opći anestetici potiskuju imunosni odgovor i potiču proces metastaziranja stanica raka (Tedore, 2015).

Pod utjecajem opće anestezije postoji šansa od 1 naprema 10 000 da se pojavi anafilaksija koja predstavlja generaliziranu ili sustavnu reakciju preosjetljivosti i može biti alergijska (IgE, IgG ili posredovana komplementom) ili nealergijska gdje se lijekom izravno stimulira degranulacija mastocita i bazofila (Dean i Chapman, 2018). Također, postoje podaci kako opći anestetici značajno moduliraju ekspresiju nuklearnog faktora kapa B (NF-κB, engl. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) i proupalne gene u bubrezima štakora (Aravindan i sur., 2006).

1.1.3. Lokalna anestezija

Lokalna ili regionalna anestezija se provodi na određenom dijelu tijela pacijenta, te djeluje na sva tkiva, a njen učinak je reverzibilan. Dijeli se na centralnu (subduralna, epiduralna) i perifernu (regionalna intravenska), te lokalnu infiltracijsku anesteziju kojima se osobu održava pri svjesti sa svim refleksima, međutim, dio tijela gubi osjet na vanjske podražaje (Jukić i sur., 2015). Lokalni anestetici djeluju zaštitnički u odnosu na rast tumora i metastaziranje putem izravne citotoksičnosti, indukcije apoptoze, inhibicije proliferacije, migracije i invazije, te modulacije ekspresije gena putem metilacije DNA (Tedore, 2015). Lokalna anestezija je jednostavnija od opće, pacijent je budan i svjestan, te je oporavak brži.

Većina lokalnih anestetika sadržava hidrofilnu amino skupinu koja je spojena sa središnjim lancem lipofilnog aromatskog ostatka, pripremaju se kao soli hidroklorne ili sulfurne kiseline, te su takve soli u obliku jakih kiselih otopina, ali je iritacija tkiva minimalna zbog velike sposobnosti neutralizacije od strane organizma (Jukić i sur., 2015). Lokalna anestezija smanjuje akutnu bol, kroničnu bol nakon nekih kirurških postupaka, postoperativnu mučninu i povraćanje, te plućne komplikacije, međutim neka su istraživanja pokazala kako je povezana sa smanjenjem recidiva raka, infekcijama kirurških mjesta, te smrtnosti (Hutton i sur., 2018).

Ona blokira provodljivost živčanih impulsa u svim živčanim tkivima kako bi se stvorio nedostatak osjećaja na anesteziranom području čija širina ovisi o mjestu davanja otopine lokalnog anestetika, ukupno danog volumena, koncentracije anestetika i sposobnosti anestetika da prodire u tkiva (Jukić i sur., 2015). U visokim je koncentracijama citotoksična za neurone, a toksičnost korelira sa topljivosti lipida, te uključuje smrt stanice uzrokovanu nekrozom ili apoptozom (Tedore, 2015). Primjena lokalnog anestetika kod kirurških rana je učinkovita nakon manjih kirurških zahvata, ali nije se pokazala djelotvornom nakon većih operacija, te intraperitonealna primjena lokalnih anestetika ima kratkotrajan i slab analgetski učinak nakon laparoskopskih postupaka (Kehlet i Dahl, 2003).

1.2. Anestetici

Anestetici su vrste lijekova u plinovitom, tekućem ili drugom obliku. Prvi anestetik koji se koristio u operativne svrhe 1846. godine, bio je dietil-eter. Međutim, zbog njegovih lako hlapljivih i zapaljivih svojstava stvorila se potreba za pronalaskom novih anestetika, te se danas koriste fluorirani inhalacijski anestetici od kojih je u najvećoj mjeri zastupljen izofluran. U Hrvatskoj je u Zadru 13. ožujka 1847. godine, prvi put obavljena operacija korištenjem eterske narkoze (Jukić i sur., 2015).

Unos anestetika može biti putem ulja, spreja ili kapljično, injekcijom u venu ili inhalacijski plinom. Postupak anestezije provodi se s ciljem olakšavanja kirurških i drugih bolnih zahvata. Anestetici djeluju tako što zaustavljaju živčane signale koji održavaju stanje svijesti, čime induciraju stanje sna, te nakon prestanka djelovanja anestetika, živčani signali počinju dopirati ponovno do mozga vraćajući pacijentu svijest. Neke nuspojave anestetika mogu biti osjećaj slabosti ili povraćanje, vrtoglavica, drhtanje, glavobolja, svrbež, upala, bol i slično, međutim one uglavnom traju kratko. Većina anestetika se potpuno ili djelomično metabolizira u jetri pa kod nje dolazi često do ozljeda koje uključuju oksidacijski stres, nekrozu jetre i apoptozu (Zhu i sur., 2017).

Prema načinu unosa, anestetike dijelimo na: inhalacijske, injekcijske (intravenozne, intramuskularne i subkutane), oralne i rektalne. Inhalacijski anestetici detaljnije su opisani u sljedećem poglavlju. Injekcijski anestetici unose se u tijelo putem igle, te su u tekućem stanju. Tekući se anestetik na ovaj način unosi direktno u venu (intravenozno) i uključuje u protok krvi, te ima najbrže djelovanje. Intramuskularni unos podrazumijeva unos tekućine iglom direktno u mišićno tkivo gdje se anestetik također brzo apsorbira, dok je apsorpcija kod subkutanog unosa, u prostor između kože i mišića, sporija. Opći anestetici djeluju kao posrednici na simpatički prijenos u središnjem živčanom sustavu pojačavajući inhibicijski prijenos i reducirajući ekscitacijsku transmisiju uključujući djelovanje na presinaptičke i postsinaptičke učinke (Hemmings Jr., 2009).

Postoje dva temeljna mehanizma djelovanja i međureakcije kako lijekova tako i anestetika, a to su farmakodinamika i farmakokinetika. Farmakodinamika se bavi proučavanjem promjena što ih neko sredstvo izaziva i mehanizmima tih promjena, te proučava odnos između koncentracije sredstva i odgovora na isti u svrhu izbora terapije. Farmakokinetika, s druge strane, proučava promjene koncentracije sredstva u određenom vremenu i u različitim dijelovima tijela, te se bavi apsorpcijom, raspodjelom, biotransformacijom i eliminacijom sredstva u namjeni odabira najpogodnije količine sredstva.

Pokazalo se da gotovo svi anestetici imaju negativan utjecaj na različite komponente imunosnog sustava, kao što je inhibicija imunosti posredovana stanicama ili stvaranje promjene u ravnoteži između proupalnih i protuupalnih citokina (Tedore, 2015). Anestetičke molekule se umeću u lipidni dvosloj čime membrane postaju fluidnije i nepravilne, također dolazi do smanjenja temperatura prijelazne faze membrana, odvajanja lateralnih faza, te mijenjanja električnih svojstava membrana kao što su membranska dielektrična konstanta i površinski dipolni potencijal (Urban i sur., 2006).

1.2.1. Inhalacijski anestetici

Inhalacijski anestetici su lako hlapljive tekućine, unose se i eliminiraju dišnim putem, imaju slabiju biotransformaciju u jetri, te difuzijom preko alveokapilarne membrane ulaze u krvotok kojim dalje putuju prema organima i središnjem živčanom sustavu. To su male, hidrofobne molekule koje jednostavno prelaze barijeru stanične membrane, oslabljuju stanično disanje, te omogućavaju brzu indukciju, brzu promjenu dubine anestezije i brz oporavak. Njihovo je uklanjanje neovisno o bubrežnoj i jetrenoj funkciji, a neki dokazi upućuju na njihova moguća kardioprotektivna svojstva (Spence i sur., 2017). Imaju protuupalni učinak u različitim organima, kao što su živčani sustav, srce, dišni sustav i bubrezi (Blum i Zuo, 2013), te povećavaju ionsku propusnost liposoma koja je povezana s njihovom koncentracijom (Urban i sur., 2006).

Na sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku nalaze se u tekućem stanju, ali imaju sposobnost prelaska u plinovitu fazu zbog visokog tlaka pare, te im je zbog velike površine pluća pristup cirkulaciji brz kao i njihovi farmakološki učinci pa su tako gotovo trenutačno apsorbirani i izbjegavaju metabolizam jetre (Brozović i sur., 2017). Inhalacijski anestetici se najčešće primjenjuju u općoj anesteziji za uvod u anesteziju i za njeno održavanje u kombinaciji s intravenskim lijekovima. Inhalacijska indukcija podrazumijeva unos visokih koncentracija hlapljivih anestetika koji se potom apsorbiraju kroz alveolarnu membranu u cirkulaciju i difundiraju preko krvne moždane barijere konačno dosežući odgovarajuće koncentracije koje uzrokuju nesvjesticu (Dean i Chapman, 2018). Umanjuju neurološka i histološka oštećenja nastala cerebralnom ishemijom smanjujući brzinu moždanog metabolizma i depolarizaciju periinfarkta, te inhibirajući ekscitotoksičnost glutamata (Nellgard i sur., 2000).

Nazočnost i djelovanje anestetika može se odrediti u različitim tkivima, uključujući pluća, mozak, i spinalnu tekućinu, te posebice u krvi (Pihlainen i Ojanpera, 1998). Odnos između doze i učinka anestetika iskazuje se putem minimalnog MAC-a koji izražava koncentraciju inhalacijskog anestetika, u volumnim postotcima (vol%), koja kod 50% pacijenata, sprječava refleksno kretanje u vrijeme operacijskog zahvata pri bolnoj stimulaciji (incizija kože, električna stimulacija).

Čimbenici koji povećavaju brzinu indukcije inhalacijskih anestetika su: udahnuta koncentracija hlapljivog anestetika, alveolarna ventilacija, funkcionalni rezidualni kapacitet, topljivost (koeficijent raspodjele krvi i plina), srčani 'output' (količina krvi koju srce pumpa u određenom vremenu), alveolarno-venski parcijalni gradijent tlaka i drugi učinak plina (engl. *Second gas effect*) (Dean i Chapman, 2018). Drugi učinak plina uzrokovan je

koncentracijskim učinkom dušikovog (I) oksida (N_2O, engl. *Nitrous oxide*) na parcijalne tlakove ostalih plinova u alveolarnoj smjesi tako što brzi unos visokih koncentracija N_2O proizvodi porast alveolarne koncentracije kisika i pratećih hlapljivih anestetičkih tvari (Peyton i sur., 2011). Trenutni dokazi upućuju na dvostruke učinke hlapljivih anestetika na upalni proces: mogu inhibirati upalu izazvanu raznim potencijalno štetnim podražajima, kao što su ishemija i spojevi koji induciraju upalu, te izazvati neuroupalu u odsutstvu tih podražaja (Blum i Zuo, 2013).

Svi inhalacijski anestetici uzrokuju ovisno o dozi, određeni stupanj depresije srčane akcije i vazodilataciju uz posljedični pad krvnog tlaka, te postoji mogućnost pojave genotoksičnih učinaka. Smanjuju respiracijski volumen, te dovode do porasta frekvencije disanja i smanjenja respiracijskog odgovora na ugljični dioksid. Također dovode do smanjenja jetrenog protoka ovisno o primijenjenoj dozi. Jedan od učinaka inhalacijskih anestetika jest redukcija stanične nekroze koja se javlja uslijed dugotrajne okluzije koronarne arterije, te reperfuzije. Oni također proizvode farmakološki preduvjet protiv miokardijskog infarkta u eksperimentalnim modelima ozljede ishemijom i reperfuzijom, imaju važne zaštitne učinke na srce kod ljudi s bolestima koronarnih arterija, te smanjuju apoptotični odgovor na ishemiju i druge oblike ozljede tkiva (Jamnicki-Abegg i sur., 2005). Jednako tako, inhalacijski anestetici smanjuju cerebrovaskularnu otpornost i povećavaju protok krvi u mozgu (CBF, engl. *Cerebral blood flow*), te imaju potencijal povećanja intrakranijalnog tlaka (ICP, engl. *Intracranial pressure*), što je posebno opasno u pacijenata s neusklađenim ICP (Campkin, 1984).

Farmakološki gledano, razlikujemo dvije vrste inhalacijskih anestetika:

1. moćne inhalacijske anestetike koji pokazuju pozitivnu modulaciju $GABA_A$ receptora (engl. *γ-Aminobutyric acid type A*) i anestetski djeluju na druge receptore ili kanale uključujući povećanje inhibitornih receptora glicina, inhibiciju ekscitacijskog NMDA (engl. *N-methyl-D-aspartate*) tipa glutamata i neuronskih nikotinskih acetilkolinskih receptora, aktivaciju domene dviju pora K_{2P} kanala (engl. *Two-pore-domain background K^+ channels*) i propuštanje kalijevih (K^+, engl. *Potassium ion*) kanala, te inhibiciju presinaptičkih natrijevih (Na^+, engl. *Sodium ion*) kanala; i
2. plinovite inhalacijske anestetike koji uključuju ciklopropan, N_2O i ksenon, koji su inaktivni na $GABA_A$ receptorima, ali blokiraju NMDA receptore i aktiviraju određene K_{2P} kanale pri kliničkim koncentracijama (Hemmings Jr., 2009).

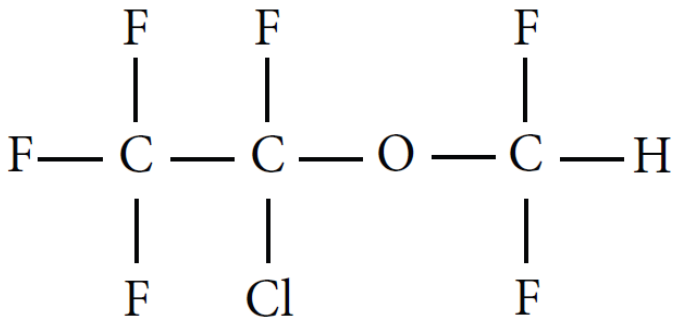
Na razini kralježnične moždine, inhalacijski anestetici smanjuju prijenos štetnih aferentnih informacija koje se rasprostiru uzlazno od kralježnične moždine do moždanog

korteksa preko talamusa, čime se smanjuje supraspinalni podražaj, inhibiraju spinalnu eferentnu neuronsku aktivnost reducurajući pokrete u odgovoru na bol, te smanjuju moždani protok krvi i metabolizam glukoze (Khan i sur., 2014). Inhibiraju neuronske naponske kanale Na^+ pri kliničkim koncentracijama, a redukcija u otpuštanju neurotransmitera uzrokovana hlapljivim anesteticima uključuje inhibiciju presinaptičih akcijskih potencijala kao rezultat blokade Na^+ kanala u izoliranim živčanim završecima štakora (Hemmings Jr., 2009). Oni mogu smanjiti ishemičnu moždanu ozljedu, te ublažavaju ekscitotoksičnost inhibiranjem otpuštanja glutamata i postsinaptičkim odgovorima posredovanim receptorom glutamata (Kawaguchi i sur., 2005).

Inhalacijski anestetici imaju negativan utjecaj na imunosnu funkciju i širenje raka, gdje povećavaju koncentraciju čimbenika rasta krvožilnog endotela (VEGF, engl. *Vascular endothelial growth factor*) i matrične metaloproteinaze (MMPs, engl. *Matrix metalloproteinase*) (stimulatora angiogeneze) koji povećavaju migraciju stanica; te povećavaju regulaciju hipoksijom induciranih čimbenika koji posreduju u zaštitnim učincima inhalacijskih anestetika na ozljede ishemije i reperfuzijskih bolesti, ali su uključeni i u povećanu tumorigenezu i metastaziranje utječući na angiogenezu, energiju metabolizma, proliferaciju stanica, apoptozu i migraciju stanica (Tedore, 2015). Istodobna primjena inhalacijskog anestetika sa cisplatinom, smanjuje učinkovitost cisplatina reducirajući njegove štetne sposobnosti, mehanizmom kompetitivnog vezanja na isto mjesto vezanja lijeka (Brozović i sur., 2011). Inhalacijski anestetici smanjuju pobudni postsinaptički potencijal (EPSPs, engl. *Excitatory postsynaptic potentials*) u spinalnim i hipokampalnim neuronima koji se neizravno pripisuje presinaptičkom mehanizmu, te smanjuju kortikalnu osjetiljivost neurona na primijenjeni glutamat koji predstavlja postsinaptički mehanizam (Hemmings Jr., 2009).

1.3. Izofluran

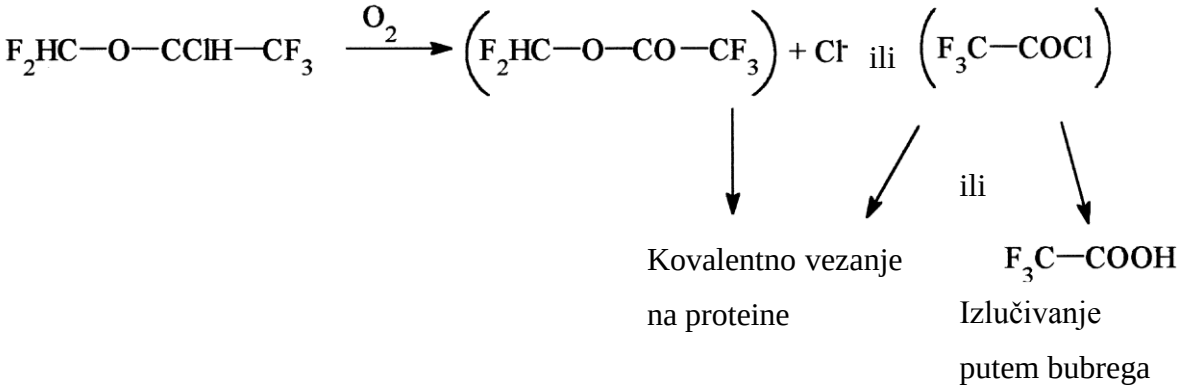
Izofluran (Slika 1) je patentiran 1969. godine, a u upotrebi se nalazi od 1980-ih godina. Halogeni je metil-etilni eter, bezbojna, nezapaljiva tekućina iritirajućeg djelovanja na respiratorni sustav, čiji MAC iznosi 1,2 vol%. Zbog toga mu je primjena kao sredstvo za uvod u anesteziju ograničena. Koristi se kao inhalacijski anestetik čime se izbjegavaju problemi vezani uz injicirane anestetike, kao što je dug poluživot, nedostatak spojeva za preokretanje aktivnosti u slučaju predoziranja ili mogućih nuspojava, te relativno mala razlika između terapijske i letalne doze (Szczesny i sur., 2004). Međutim, odličan je anestetik za neurokiruršku anesteziju zbog zanemarivog djelovanja na moždani protok krvi i intrakranijalni tlak, te u slučaju jetrenih bolesti zbog održavanja postojećeg krvnog protoka kroz portalnu venu (Karadža i sur., 2004).



Slika 1. Struktura izoflurana (preuzeto od: Lee i sur., 2015).

Izofluran se u mjeri od 0,2% podvrgava oksidacijskom metabolizmu enzimima citokroma P450 u jetri, bubregu i plućima (Brozović i sur., 2017). Nunn (1985) je proveo istraživanje u kojem je ustanovio kako izofluran održava stabilnim srčani ritam, arterijski tlak, te potiče brz oporavak nakon anestezije zbog slabe topljivosti. Međutim, neki manji nedostaci ustanovljeni tijekom istog istraživanja uključuju blago nadražujuću prirodu anestetika, povremeni slučaj tahikardije, te pojavu delirija i boli pri buđenju iz anestezije. Izofluran inducira reverzibilno otpuštanje kalcijevih iona (Ca^{2+}, engl. *Calcium ion*) iz endoplazmatskog retikuluma (ER, engl. *Endoplasmatic reticulum*) u cerebrokortikalne i hipokampalne neurone, te iz sarkoplazmatskog retikuluma (SR, engl. *Sarcoplasmic reticulum*) aktivacijom rianodin receptora (RyRs, engl. *Ryanodine receptor*) ili inhibicijom unosa Ca^{2+} u SR u kojem je sadržaj Ca^{2+} smanjen (Wei i sur., 2005).

Szczesny i sur. (2004) ustanovili su da u djelovanju od 6,5 sati, izofluran ne utječe na ritmičke oscilatorne kontrakcije i relaksaciju prekapilarnih arteriola u mikrocirkulaciji, te održava stabilnim srednji arterijski krvni tlak i brzinu otkucaja srca. Ima antioksidativno i protutumorsko djelovanje na sve stanice, osim na neurone, čime smanjuje upalu i oksidativni stres u manjim operacijama (Lee i sur., 2015), te otvara krvno-moždanu barijeru što može povećati propusnost intravaskularnih tvari u tkivo mozga (Blum i Zuo, 2013). Unos inhalacijom, dopušta mu brzu apsorpciju i cirkulaciju zbog velike površine pluća i brzo farmakološko djelovanje, a koristeći komet test, može se uočiti potencijalna genotoksičnost izoflurana tijekom i nakon anestezije (Brozović i sur., 2017), te je pojednostavljeni metabolički put izoflurana prikazan na Slici 2 (Pihlainen i Ojanpera, 1998).



Slika 2. Biotransformacija izoflurana (preuzeto i prilagođeno prema: Pihlainen i Ojanpera, 1998).

S druge strane povećava koronarni protok više nego što je potreba miokarda za kisikom čime stvara mogućnost 'krađe' odnosno preusmjeravanja protoka iz granično prokrvljenih dijelova miokarda u one dobro prokrvljene što posljedično rezultira ishemijom miokarda (Doyle, 2007). Iako izofluran ima manji toksični učinak na jetru pokazan je i blagi porast aminotransferaza, te su zabilježeni slučajevi u kojima je navedeni anestetik doveo do izraženije jetrene disfunkcije, ali i fulminantnog hepatitisa te jetrene nekroze. Izofluran u anestetičkim dozama djeluje antiproliferativno i citogenetički na tumorske i zdrave ljudske stanice, međutim pokazano je da izofluran uzrokuje velika oštećenja DNA na periferne leukocite, te potiče pojavu genotoksičnih učinaka posebice na moždane i jetrene stanice (Brozović i sur., 2011).

Prozvodnja i/ili akumulacija amiloidnog beta proteina (Aβ, engl. *Amyloid beta*) glavni su patološki znak Alzheimerove bolesti, a stvara se putem proteolize amiloidnog prekursorskog proteina (APP, engl. *Amyloid precursor protein*) pomoću aspartil β-proteaznog

APP-cjepajućeg enzima (BACE, engl. *Aspartyl protease beta-site APP-cleaving enzyme*), β-sekretaze ili γ-sekretaze (Xie i sur., 2007). U istom radu, navedeno je kako izofluran može inducirati apoptozu i aktivaciju kaspaze 3 (neovisno o djelovanju APP), te povećava nakupljanje Aβ i razinu BACE.

Subtoksična izloženost izofluranu može povećati akutnu otpornost tubularnih stanica. Uočene smanjene razine otpuštanja laktat dehidrogenaze i održavanje koncentracije ATP-a (engl. *Adenosine Triphosphate*) potvrđuju djelovanje izoflurana koji sprječava bubrežne tubularne ozljede. Izofluran inhibira apoptozu u bubrežnoj srži koja je posredovana kašnjenjem aktivacije kaspaza. Također, izofluran stimulira fosforilaciju proteina koji signaliziraju preživljenje i u isto vrijeme aktivira protein kinazu B (Akt, engl. *Protein kinase B*), antiapoptotički čimbenik, koji potiče preživljenje stanica (Aravindan i sur., 2006). Visoka doza izoflurana izaziva neurotoksičnost, inhibira sintezu i sekreciju proteina, inducira citotoksičnost hepatocita ljudi i štakora, te inducira apoptozu ljudskih limfocita, a u razvoju mozga štakora kliničke koncentracije izoflurana uzrokuju neurodegenerativne promjene i trajne nedostatke u učenju (Wei i sur., 2005).

U odnosu na enfluran i metoksifluran, izofluran je otporniji na defluoriranje i može se koristiti za dulje vrijeme trajanja operacije bez značajnog povećanja razine fluorida u serumu (Khan, 2014). Izofluran smanjuje ekscitotoksičnu ozljedu i reducira depresivnu frekvenciju širenja tranzitnih depolarizacija tijekom fokalne ishemije koje inače povećavaju dotok Ca^{2+} u neurone čime se povećava neuronska ozljeda, a njihova inhibicija ograničava ozljedu (Kawaguchi i sur., 2005).

1.4. Teški metali

Metali imaju važnu ulogu u raznim biološkim procesima te je održavanje njihove homeostaze regulirano mehanizmima unosa, skladištenja i izlučivanja kako bi se održali u određenim granicama. Poremećaj homeostaze metala, može dovesti do vezanja metala za druga proteinska vezna mjesta ili pogrešnog vezanja metala za vezna mjesta namijenjena drugim metalima, te dovesti do oksidativnih oštećenja bioloških makromolekula, stvaranja radikala i nastanka mnogih bolesti (Jomova i Valko, 2011). Metalima posredovano stvaranje radikala uzrokuje razne modifikacije DNA baza, modificiranje homeostaze kalcija i sulfhidrila, te pojačanu lipidnu peroksidaciju gdje lipidni peroksidi, nastali napadom radikala na fosfolipidne ostatke polinezasićenih masnih kiselina, mogu dalje reagirati sa redoks metalima stvarajući mutagene i kancerogene malondialdehidne (MDA, engl. *Malondialdehyde*), 4-hidroksinonenalne (4-HNE, engl. *4-hydroxynonenal*) i druge egzocikličke DNA adukte (etano i/ili propano adukte) (Valko i sur., 2005).

Metali utječu na transkripciju gena, ekspresiju i aktivaciju brojnih signalnih proteina, uključujući receptore čimbenika rasta, G-proteine kao što je ras, tirozin kinaze kao što je c-src, proteine mitogen aktivirane proteinske kinaze (MAPK, engl. *Mitogen - activated protein kinases*) i nuklearne transkripcijske čimbenike kao što su NF-κB, nuklearni faktor aktiviranih T stanica (NFAT, engl. *Nuclear factor of activated T cells*), aktivacijski protein 1 (AP-1, engl. *Activator protein 1*), tumor supresor protein (p53, engl. *Tumor suppressor protein*) i hipoksijom inducirani faktor 1 (HIF-1, engl. *Hypoxia-inducible factor 1*) (Leonard i sur., 2004). Najznačajniji učinak metala na signalne putove zapažen je kod MAPK/AP-1 i NF-κB puteva, gdje je NF-κB uključen u upalne reakcije, a AP-1 je važan za rast i diferencijaciju stanica (Valko i sur., 2005). Ti učinci mogu uključivati aktivaciju ili inaktivaciju, biti izravni preko međureakcije metala sa proteinima ili neizravni stvaranjem metalom induciranih reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, engl. *Reactive oxygen species*) (Leonard i sur., 2004).

Koncentracija radikala proizvedenih unutar stanica utječe na selektivnu aktivaciju transkripcijskih čimbenika AP-1 i NF-κB čija je aktivacija uključena u staničnu diobu i proliferaciju, te gena p53 koji štiti kontrolnu točku staničnog ciklusa i čija inaktivacija omogućuje nekontroliranu proliferaciju, te se stanična apoptoza ili smrt mogu povezati s izlaganjem karcinogenim metalima (Valko i sur., 2005). Antioksidansi (enzimski i neenzimski) pružaju zaštitu od napada slobodnih radikala posredovanih metalima, pa tako vitamin E i melatonin mogu spriječiti većinu metalom posredovanih oštećenja u *in vitro* sustavima, ali i u životinja sa povišenim razinama metala u organizmu (Valko i sur., 2005).

1.4.1. Željezo

Željezo je vrlo važan metal u tijelu čovjeka što se može uočiti iz činjenice da se nalazi u strukturi hemoglobina kojeg nalazimo u krvi, te ima funkciju prenošenja kisika. Sudjeluje u proizvodnji crvenih krvnih stanica, ima ključnu ulogu u staničnom metabolizmu, katalizira mnoge enzimske reakcije, posreduje u imunosnom odgovoru i pomaže u proizvodnji vezivnih tkiva i neurotransmitera u mozgu (Juluri i sur., 2013). Preporučeni oralni unos željeza iznosi 15 mg/dan, gdje zdrave odrasle osobe apsorbiraju 5-10% željeza iz hrane, te je to osnova za procijenjenu parenteralnu potrebu od približno 1 mg/dan koja nadoknađuje gubitke uklanjanja kože i sluznice iz crijeva i genitourinarnog sustava (Burns i Pomposelli, 1999). Prosječna težina čovjeka sadrži oko 4-5 g željeza, a u biološkim se sustavima nalazi u tri oksidacijska stanja:

1. Fe (II) koji je na fiziološkom pH topljiv, ali nestabilan u vodenom mediju, te reagira s molekularnim kisikom (O_2, engl. *Molecular oxygen*) u svrhu stvaranja Fe (III) i superoksida;
2. Fe (III) koji se na fiziološkom pH precipitira kao oksihidroksidni polimer; i
3. Fe (IV) koji je vrlo rijedak (Valko i sur., 2005).

Skladišni oblik željeza javlja se u dva oblika, kao: (1) topljiva proteinska jezgra feritina koji predstavlja klasu jednolančanih, metal vezujućih proteina sa dva vezna mjesta, te ima svojstvo stroge povezanosti i međuovisnosti vezanja metala i aniona; i (2) kao dio netopljivog hemosiderina koji se sastoji od anorganskog željeza povezanog sa proteinima i drugim tvarima u promijenjivim omjerima, te može potjecati od razgrađenog feritina (Aisen i Listowsky, 1980). Feritin se sastoji od velikog proteinskog premaza (apoferitina) koji okružuje jezgru oksidiranog vodikovog željeza koja može sadržavati do 4 500 atoma željeza, a njen se promjer kreće između 4 i 9 nm, dok je vanjski promjer molekule 12 nm (Coe i sur., 1995).

Iako je željezo potrebno u organizmu za njegovu normalnu funkciju, smatra se da ima kancerogene posljedice na organizam koje nastaju stvaranjem ROS-a u prisutstvu metala (Leonard i sur., 2004). Zbog svoje elektronske strukture i sposobnosti upravljanja elektronskim reakcijama smatra se glavnom komponentom u proizvodnji i metabolizmu slobodnih radikala u biološkim sustavima (Valko i sur., 2015). Smatra se da željezo može utjecati na redoks stanje, inhibicijom enzima uključenih u antioksidacijsku obranu. Željezo je učinkoviti katalizator tirozinske nitracije drugim citotoksičnim oksidantom, peroksinitritom (Lipscomb i sur., 1997).

Nedostatak željeza najčešći je uzrok anemije željeza u tkivima, a jedna od najgorih posljedica njegovog nedostatka jest mentalna retardacija u djece. Nedostatak željeza je

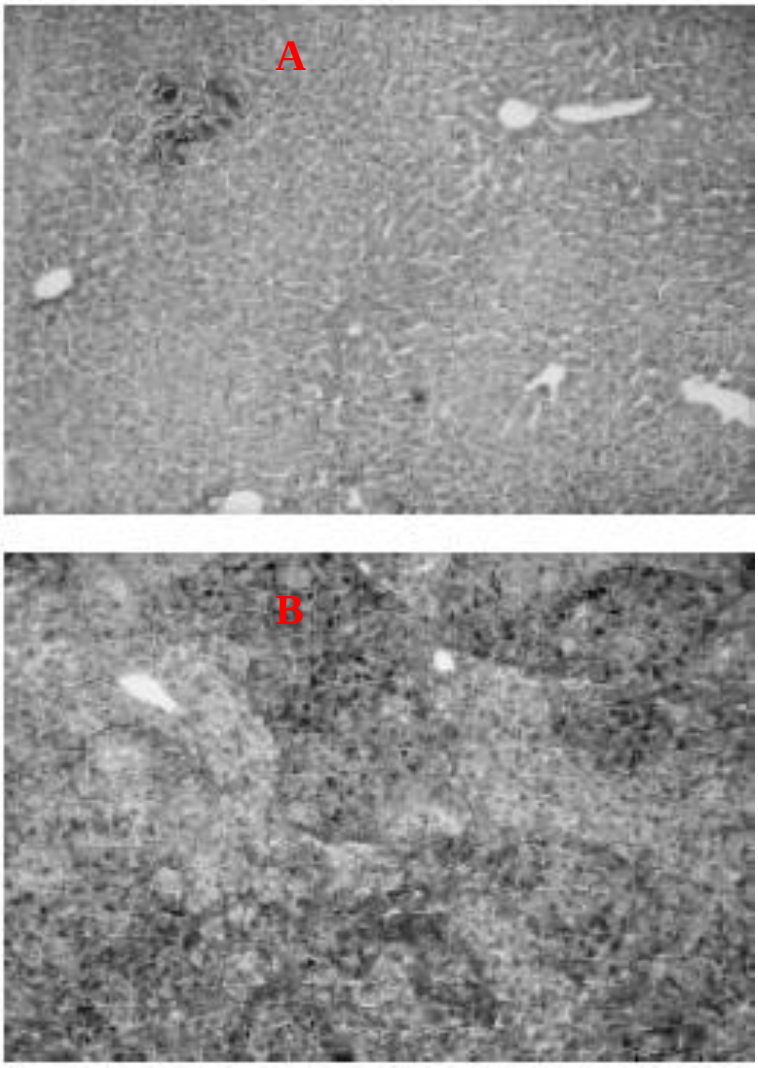
prisutniji u dojenčadi, djece i žena u vrijeme poroda, a neadekvatne pohrane željeza u tijelu mogu dovesti do ozbiljnih zdravstvenih posljedica, te smrti (Juluri i sur., 2013). Prekomjerna količina željeza je rjeđi slučaj u koji su uključeni poremećaji u apsorpciji i prijenosu željeza, te sekundarni poremećaji koji su povezani sa bolestima jetre i srca, rakom, neurodegenerativnim poremećajima, dijabetesom, hormonalnim abnormalnostima i abnormalnostima imunosnog sustava (Valko i sur., 2005).

Kako bi se kontrolirala reaktivnost željeza, on je u organizmu prisutan u kompleksu sa proteinima, a metabolizam željezovih iona kontroliran je mašinerijom koja otkriva njegovu koncentraciju, obavlja njegov prijenos u krvi i preko membrana, osigurava ione željeza tijekom slaganja i sazrijevanja proteina, te skladišti ione željeza (Cheignon i sur., 2018). Transferin i feritin, prijenosni i skladišni proteini metabolizma željeza smanjenjem katalitičke aktivnosti željeza u redoks rekacijama s jednim elektronom mogu smanjiti izloženost stanica potencijalno štetnim vrstama poput peroksida, superoksida i hidroksilnog radikala ($OH^{\bullet}$, engl. *Hidroxyl radical*), te dovoljno čvrsto vežu željezo kako bi spriječili formiranje netopljivih hidrolitičkih produkata, iako reverzibilno tako da je metal dostupan stanicama po potrebi (Aisen i Listowsky, 1980).

Višak parenteralnog željeza i onog iz hrane izdvaja se putem retikuloendotelnog sustava i može dovesti do hepatosplenične sideroze koja je sekundarni uzrok preopterećenosti željezom, dok je nasljedna hemokromatoza primarni uzrok (Burns i Pomposelli, 1999). Prekomjerno kronično izlaganje željezu povezano je s oštećenjem stanica jetre (Slika 3) i fibrozom što u konačnici dovodi do ciroze. Preopterećenje željezom vodi pojačanoj lipidnoj peroksidaciji bioloških membrana i narušavanju funkcije organa (Masini i sur., 2000). Uzroci nedostatka željeza uključuju neadekvatan unos, kroničan gubitak mase tijela ili njihovu kombinaciju. Nadoknada nedostatka željeza može se postići povećanim oralnim unosom željeza u obliku dodataka, međutim, zbog netolerantnosti nekih pacijenata na oralnu terapiju ili gastrointestinalne disfunkcije, rješenje se nalazi u parenteralnom unosu željeza (Burns i Pomposelli, 1999).

Nakupljanje željeza, zajedno sa cinkom i bakrom, u amiloidnim plakovima oznaka je Alzheimerove bolesti (Cheignon i sur., 2018). Željezo u Alzheimerovoj bolesti ima patofiziološku ulogu katalizatora stvaranja slobodnih radikala na temelju posjedovanja slabo vezanog elektrona i sposobnosti postojanja u više valencija, pa tako je dvovalentni Fe^{2+} (engl. *Ferrous ion*) sposoban prenositi jedan elektron i omogućiti proizvodnju slobodnih radikala (Markesbery, 1997).

Željezo je u dijelu srednjeg mozga zvanom SNpc (lat. *Substantia nigra pars compacta*) prisutno u visokim koncentracijama, međutim, u jednom obliku parkinsonizma magnetskom rezonancom se može utvrditi abnormalno povećanje paramagnetskog učinka željeza u repatoj jezgi (engl. *Caudate nucleus*) i putamenu bazalnih ganglija (Montgomery, 1995).



Slika 3. Akumulacija kolagena u gerbilima (skočimiševima) obrađenim željezom. Na slici A prikazani su dijelovi jetre iz kontrole, a slika B prikazuje željezom obrađeno tkivo jetre gdje se primjećuje dramatična akumulacija kolagena (fibroza) (preuzeto od: Masini i sur., 2000).

1.4.2. Željezo dekstran

Kompleksi željezo dekstrana farmaceutski su važni sintetički modeli proteina feritina koji skladišti željezo, te se sastoje od dekstranskog (linearna (1-6)-poli-D-glukoza) omotača koji okružuje vodenu jezgru željezovog oksida i koriste se za liječenje anemija u nedostatku željeza (Oshtrakh i sur., 1994). Dekstrani čine skupinu skladišnih polisaharida i koriste se u medicini, prirodno se nalaze u kvascu i bakterijama, te su korišteni kao 'umjetna krv' zbog sposobnosti stvaranja kompleksa sa željezom (Graczykowski i Dobek, 2011). Jezgra od željeza u kompleksima željezo dekstrana ima svojstva slična feritinu i kao kod feritina, karboksilatnim je skupinama povezana sa vanjskim premazom koji je kod željezo dekstrana sastavljen od ugljikohidrata (Coe i sur., 1995). Masa željezne jezgre iznosi 105 kDa, a ukupnog željezo dekstran kompleksa, komercijalno dostupnog kao imferon, 166 kDa (Graczykowski i Dobek, 2011). Komercijalno je dostupan kao stabilna, bistra, viskozna i crvenkasto-smeđa koloidna suspenzija koja sadrži 5% željeza i 20% dekstrana (Juluri i sur., 2013).

Apsorpcija željezo dekstrana vrši se kroz stanice retikuloendotelnog sustava gdje makrofagna aktivnost ovisi o veličini čestica (Lazaro i sur., 2003). Otpušteno željezo, iz retikuloendotelnog sustava, preuzima transferin u plazmi i prenosi ga u koštanu srž gdje se ugrađuje u molekulu hemoglobina. Također, veliki dio željeza veže se za raspoložive proteinske dijelove kojima se formiraju hemosiderin ili feritin, fiziološki oblici željeza (Graczykowski i Dobek, 2011). Kod pacijenata na hemodijalizi, pokazalo se da željezo dekstran poboljšava pohranu željeza i smanjuje korištenje rekombinantnog humanog eritropoetina (rHuEPO, engl. *Recombinant human erythropoietin*) što rezultira smanjenjem ukupnih troškova (Greenbaum i sur., 2000).

Željezo dekstran prvenstveno djeluje na jetru i dobar je model procjene toksičnosti željeza, te kronični unos željezo dekstrana izaziva značajnu lipidnu peroksidaciju i povećanu oksidaciju proteina u cerebralnom korteksu, a ujedno je povezan sa smanjenjem sadržaja neenzimatskih antioksidansa, superoksid dismutaze (SOD, engl. *Superoxide dismutase*) i aktivnosti katalaze (CAT, engl. *Catalase*) što rezultira teškom neurotoksičnošću, dok akutna doza dovodi do pojave oksidacijskog stresa u mozgu štakora s povećanjem aktivnosti katalaze i vezanja NF-κB sa DNA koji djeluju kao zaštitni stanični parametri (Piloni i sur., 2016).

Intramuskularne injekcije kompleksa željezo dekstrana često korištene za liječenje anemije u ljudi, uzrokuju sarkom vretena stanica ili pleomorfni sarkom u štakora na mjestu ubrizgavanja, a zbog rizika od anafilaksije unos se vrši putem 'ukupne doze infuzije' (TDI, engl. *Total dose infusion*) ili održavanjem doze parenteralnom prehranom (PN, engl.

Parenteral nutrition) (Valko i sur., 2005). Kod djece, održavanje doziranja željezo dekstrana ima manji rizik od anafilaksije u usporedbi sa TDI-om, te oblici niskomolekulskog (LMW, engl. *Low molecular weight*) željezo dekstrana imaju manji rizik od anafilaksije nego one visokomolekulskog (HMW, engl. *High molecular weight*) (Lee i sur., 2017). Parenteralni željezo dekstran koristi se za opskrbljivanje željeza u pacijenata na kroničnoj hemodijalizi, sa kroničnim gastrointestinalnim gubitcima i u kirurškim zahvatima gdje pacijenti odbijaju transfuziju krvi, a nuspojave se javljaju od blage akutne anemije do teške anafilaktičke reakcije, pogoršanja autoimunih bolesti, mišićnih bolesti, maligniteta vezivnog tkiva, sindroma preopterećenja željezom i infekcije oštećenom imunosti (Burns i Pomposelli, 1999). Različiti pripravci parenteralnog željeza koriste se za liječenje anemije i kod kroničnog zatajenja bubrega (CRF, engl. *Chronic renal failure*) zajedno s eritropoetinom (Lim i Vaziri, 2004b), te u slučajevima melapsorpcijskog sindroma, Chronove bolesti, upalne bolesti crijeva i kronične opstrukcije crijeva (Juluri i sur., 2013).

Najučinkovitiji način pružanja potpore crvenim krvnim stanicama u terapijama za anemiju kronične bolesti bubrega je intravenski unos željeza (Pai i sur., 2007). Kada, u liječenju pacijenata na hemodijalizi, oralna terapija ne uspijeva održati odgovarajuće količine pohranjenog željeza, primijenjuje se intravenozni pripravak željezo dekstrana koji dovodi do brzog poboljšanja eritropoeze (Fishbane i sur., 1996). Zabilježeno je da su ukupne doze željezo dekstrana pogoršale simptome reumatoidnog artritisa i vaskularne bolesti kolagena, te su povezane s većom pojavnošću anafilaksije (Burns i Pomposelli, 1999).

Od svih pacijenata koji primaju parenteralnu terapiju željeza, njih 26% doživljava ograničavajuće i blage nuspojave, a 3% pacijenata ima ozbiljnije simptome od kojih 0,1-0,6% razvija anafilaksiju koja ugrožava život, te se većina reakcija događa odmah tijekom davanja odgovarajuće doze i popratni poremećaji uključuju dispneju, glavobolju, crvenilo, bol u prsima, bol u trbuhu ili leđima, povišenu temperaturu, napadaje, hipotenziju, urtikariju i anafilaksiju; a odgođene se reakcije javljaju jedan do tri dana nakon infuzije i povezane su s taloženjem željeza u tkivima koje uključuje mijalgiju, artralgiju, flebitis i limfoadenopatiju (Burns i Pomposelli, 1999). Parenteralno davanje lijeka povezano je s neposrednim nuspojavama kao što su dispneja, bolovi u trbuhu ili leđima, mučnina i povraćanje, vrućica, utrikarija i moguće fatalne anafilaktičke reakcije (Juluri i sur., 2013). Zbog onesposobljavanja tijela da spriječi preopterećenje željezom, intravenozna primjena preparata željeza dovodi do brzog i nefiziološkog porasta željeza u kratkom vremenu, te je moguća niska razina toksičnosti jer kemijska struktura preparata minimizira otpuštanje katalitički aktivnog željeza u izvanstanični prostor (Lim i Vaziri, 2004b).

Ponovljena primjena parenteralnog kompleksa željezo dekstrana može potencijalno rezultirati toksičnim količinama slobodnog željeza u krvi, te je predložena usporena i produljena transdermalna isporuka željeza putem kože koja simulira usporenu intravenoznu infuziju, s ciljem izbjegavanja pretjeranog zasićenja transferina i kontrole pohrane željeza u sistemskoj cirkulaciji, međutim ona je ograničena zbog velike molekularne mase i visoke hidrofilnosti, te se u tom slučaju koriste mikroinjekcije koje olakšavaju isporuku makromolekula i koloidnih lijekova preko kože (Juluri i sur., 2013).

1.5. Upala i oksidacijski stres

Upala je reakcija organizma na ozljedu tkiva, te su u upalnu reakciju uključeni specifični i nespecifični mehanizmi obrane. To je reakcija na fizički, kemijski ili biološki uzrok ozljede, gdje imunosne stanice razaraju, razrjeđuju ili ograđuju štetnu tvar i vlastite uništene stanice nakon čega slijedi proces reparacije ili cijeljenja (Andreis i sur., 2010). U slučaju izostanka regulacije upale može doći do oštećenja tkiva, septičkog šoka, poremećaja homeostaze, autoimunosti, te kroničnih autoupalnih bolesti.

U slučaju infekcije i pojave upale postoji vjerojatnost obrane od infekcije, ali i vjerojatnost stvaranja autoimunosti, oštećenja tkiva, te pojave septičkog šoka. Oštećenjem tkiva može doći do popravka nastalih oštećenja ili do pojave fibroze, metaplazije, te rasta tumora. U stresnim reakcijama upala može pomoći pri prilagodbi na novonastalu situaciju i uspostavljanju homeostaze ili voditi nastanku autoupalnih bolesti tijekom dužeg perioda.

U upali sudjeluju stanice kao što su makrofagi (fagocitoza i baktericidni učinak), pomoćničke T-stanice, NK stanice (engl. *Natural killer*), neutrofili (fagocitoza i baktericidni učinak), bazofili (medijator upale – histamin), eozinofili (izlučuju toksične tvari za otklanjanje parazita), monociti (fagocitoza), te mnoge druge koje proizvode citokine koji djeluju kao kemijski signali, te dovode do početka kaskadne imunoreakcije. Infekcija i ozljeda pokreću sustavni upalni odgovor (SIN, engl. *Systemic inflammatory response*) čiji je cilj ograničavanje ozljeda, popravak tkiva i povećanje imunosti, a klasični odgovor uključuje vrućicu, hipotenziju, tahikardiju, hiperglikemiju, povećani katabolizam proteina i smanjenu zasićenost željezo-transferinom povećavajući razinu bakra i cinka u serumu (Burns i Pomopnelli, 1999).

Upala se dijeli na akutnu i kroničnu, te se javlja kao imunoreakcijski odgovor. Na početak upale utječu mnogobrojni citokini koje sintetiziraju stražarske stanice, a dijelimo ih na protuupalne, proupalne i regulacijske. Neki protuupalni citokini su interleukin (engl. *Interleukine*) 4 (IL-4), IL-9 i IL-13; proupalni: IL-1, IL-6, čimbenik tumorske nekroze α (TNF-α, engl. *Tumor necrosis factor-α*) i IL-12; regulacijski: IL-10, te transformirajući čimbenik rasta (TGF-β, engl. *Transforming growth faktor-β*). Povišeno oslobađanje citokina znak je upale, a uključeni su IL-1, TNF i IL-6 koji se javljaju zajedno sa povišenim razinama glukagona, kortizola i epinefrina, te posreduju u metaboličkoj kaskadi sustavnog upalnog odgovora (Burns i Pomponelli, 1999).

Akutna upala je početna reakcija organizma na ozljedu, te dolazi do povećanog protoka krvi na mjesto upale, te prodora plazme i leukocita u ozlijeđeno područje. Karakteristike akutne upale su crvenilo, oteklina, toplina, bol i oštećenja određenih funkcija.

Dugotrajno djelovanje dovodi do razvitka u kroničnu upalu koja je u suštini štetnog utjecaja zbog neliječenja akutne upale, te može doći do razvoja različitih poremećaja u koje spadaju i tumori.

Na mjestima upale i raznih ozljeda, moguća je pojava raka, a u njegovom formiranju i progresiji ključnu ulogu imaju upalne stanice, gdje 'promocija' raka rezultira novačenjem upalnih stanica, oslobađanjem kemijskih medijatora, oksidacijskim oštećenjem, te neuspješnom apoptozom koja u konačnici dovodi do nepromijenjene i nastavljene proliferacije stanica i pojave angiogeneze tumora (Tedore, 2015).

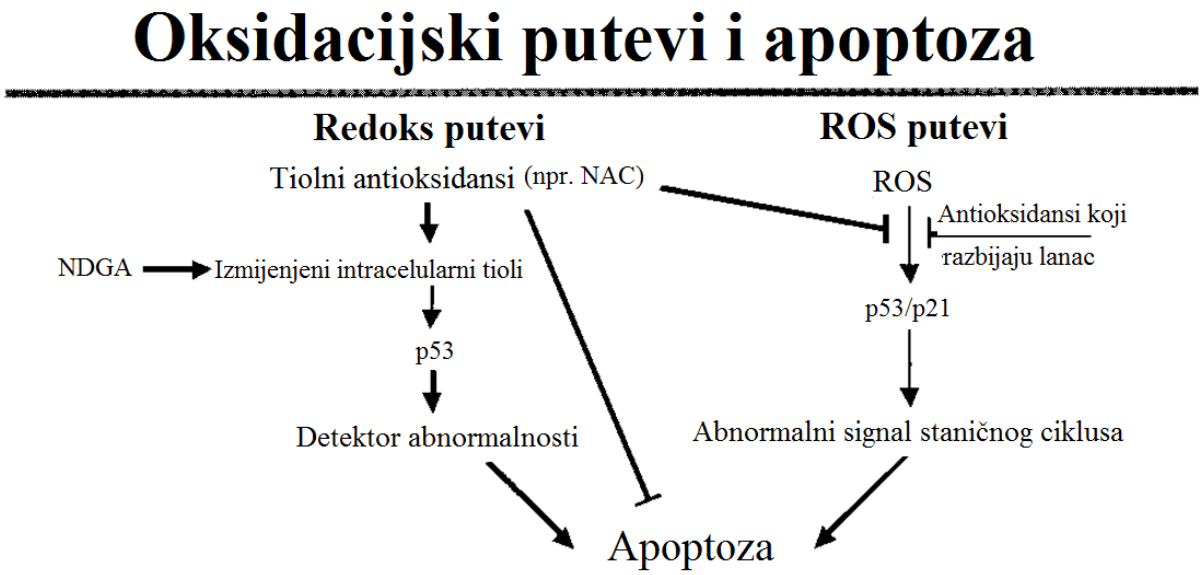
Pretvorba energije jedan je od temeljnih procesa života, a u organizmima je prisutno kretanje iona preko polupropusne membrane koje se koristi za stvaranje ionskog gradijenta, tj. redoks reakcija u kojima se elektroni prenose od prvotnog donora preko nekoliko posrednika do konačnog receptora, a kod ljudi i životinja je to O_2 čija je prednost visoki redoks potencijal i energija u reakciji: $O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$ (Cheignon i sur., 2018).

Oksidacijski stres je stanje u kojem se javlja nesrazmjer u stvaranju i otklanjanju ROS-a i dušikovog (II) oksida (NO, engl. *Nitric oxide*), dolazi do smanjenja antioksidacijske zaštite, te se nastala oštećenja na tkivima i organima ne mogu uspješno popraviti. Ima bitnu ulogu u slučaju kroničnih upalnih odgovora, novačenjem imunosnih stanica na oštećena područja. Anaerobno okruženje i O_2, kao konačni akceptor elektrona, rezultiraju stalnom proizvodnjom ROS-a koji nastaju enzimski (npr. u makrofagima za ubijanje napadača) ili neenzimski, kao sporedna reakcija u respiratornom lancu (Cheignon i sur., 2018). Uočeno je da oksidacijski stres sudjeluje u promicanju aktivacije raznih upalnih transkripcijskih čimbenika (NF-κB, AP-1, p53) praćeno produkcijom raznih upalnih medijatora koji otežavaju upalni odgovor. Posljedično tome, velike količine upalnih medijatora kroničnom upalom uzrokuju oksidacijski stres.

Slobodne reaktivne čestice su atomi ili molekule koje sadrže nespareni elektron, zbog kojega su visoko reaktivni, a njega neutraliziraju antioksidansi. Prema definiciji, antioksidanski spoj je endogena ili egzogena molekula koja kada je prisutna u niskim koncentracijama u usporedbi s oksidirajućim supstratom, značajno odgađa ili inhibira oksidaciju supstrata mehanizmima uklanjanja ROS-a, gašenja izvora ROS-a i regeneracije endogenih antioksidansa (Cheignon i sur., 2018). Prva linija obrane protiv ROS-a je sprječavanje njihovog formiranja, tj. prevencija, a u slučaju već stvorene štetne vrste dolazi do deaktiviranja presretanjem štetnih vrsta u svrhu sprječavanja daljnjih reakcija formiranjem neradikalnih i nereaktivnih krajnjih produkata, dok se u slučaju neučinkovitosti prethodnih

procesa obavlja popravak nastalih oštećenja (Sies, 1997). U ljudskim stanicama enzimatsku antioksidantsku obranu pružaju SOD, CAT i glutation peroksidaza (GPx, engl. *Glutath ione peroxidase*) (Halliwell i Gutteridge, 1986).

Konstantno izmjenjivanje ravnoteže između ROS-a i antioksidansa može povećati osjetljivost na neke poremećaje kao što su upala, autoimune bolesti, rak, dijabetes, ishemija-reperfuzija (IR, engl. *Ischemia reperfusion*) ozljede, ozljede pluća, neurodegenerativne i kardiovaskularne bolesti (Sharma i Kutala, 2013). ROS utječe na pojavu apoptoze remećenjem raznih redoks reguliranih transkripcijskih čimbenika ili signalnih puteva što je prikazano na Slici 4 (Kehrer, 2000).



Slika 4. Oksidacijski putevi koji aktiviraju apoptozu. Reaktivni kisikovi radikali mogu dovesti do oštećenja koja izravno aktiviraju apoptozu. ROS ili tiol antioksidansi mogu mijenjati unutarstanični oksidativni tonus, rezultirajući abnormalnim signalnim putevima koji u konačnici stimuliraju apoptozu (preuzeto i prilagođeno prema: Kehrer, 2000).

Akumulacija oksidacijskog stresa ima važnu ulogu u etiologiji različitih kroničnih bolesti kao što su neurodegenerativne bolesti, kardiovaskularne bolesti i rak, te su razvijeni razni biomarkeri za određivanje stanja oksidacijskog stresa kao što su: prekid dvostrukih lanaca DNA koji se može otkriti fosforilacijom histona H2AX (engl. *H2A histone family member X*), nastanak ulomaka DNA i njihova migracija komet testom, oštećenje lipida proizvodnjom MDA i 4-HNE koji su dobro poznati biomarkeri lipidne peroksidacije (Lee i sur., 2015). Povećana koncentracija MDA dobivena lipidnom peroksidacijom i smanjena funkcija antioksidacijskog sustava, niske razine SOD-a i glutationa (GSH, engl. *Glutathione*)

pronađena je u bolesnika na hemodijalizi, te djeluje nepovoljno na proteine, lipide i nukleinske kiseline oštećujući baze DNA (posebno gvanin putem oksidacije) ili modificirajući šećere čime se kod bolesnika s CRF može povećati rizik od kasnijeg razvoja raka (Sung i sur., 2013). Slobodni radikali su korisni u fagocitozi bakterija i redoks signalizaciji, međutim djeluju toksično u međureakciji s vitalnim molekulama kao što je DNA stvarajući stabilne adukte čime se inducira mutagenost (Sharma i Kutala, 2013).

Alzheimerova bolest karakterizirana je progresivnim pogoršanjem kognitivnih funkcija koje se mogu povezati sa značajnom redukcijom volumena mozga u odnosu na zdrave osobe, a atrofija proizlazi iz degeneracije sinapsi i smrti neurona, naročito u hipokampusu, regiji koja je zaslužna za sjećanje i prostornu orijentaciju (Cheignon i sur., 2018). U Alzheimerovoj bolesti dolazi do povećanog oksidacijskog stresa što je dokazano:

1. povećanom količinom željeza, aluminija i žive koji su sposobni stimulirati stvaranje slobodnih radikala;
2. povećanom peroksidacijom lipida, smanjenom količinom polinezasićenih masih kiselina u mozgu i povećanim 4-HNE, aldehidnim produktom lipidne peroksidacije u ventrikularnoj tekućini;
3. povećanom oksidacijom proteina i DNA;
4. smanjenom energijom metabolizma i sniženom oksidazom citokroma c;
5. povećanom količinom proizvoda glikacije (AGE, engl. *Advanced glycation end products*), MDA, karbonila, peroksinitrita, hem oksigenaze-1 i SOD-1 u neurofibrilarnim zapletima i senilnim plakovima (SP, engl. *Senile plaques*); i
6. istraživanjima koja pokazuju da je Aβ peptid sposoban stvarati slobodne radikale (Markesbery, 1997).

Oboljeli od Parkinsonove bolesti imaju povećanu osjetljivost na oksidacijski stres koji je povezan s povećanom autooksidacijom dopamina uzrokovanom visokim koncentracijama željeza (Montgomery, 1995). U mozgu osobe oboljele od Parkinsonove bolesti dolazi do smanjenja razine feritina i povećanja koncentracije željeza u nigralnim dopaminergičkim neuronima, smanjenja GSH, te povećanja peroksidacije lipida u nazočnosti željeza što vodi uništenju stanica (Halliwell, 1992).

1.5.1. Utjecaj izoflurana na pojavu upale i oksidacijskog stresa

Pojava upale služi zaštiti domaćina od nepovoljnih podražaja kao što su patogena infekcija i mehanički stres. Jedan od najvažnijih biljega upale je transkripcijski čimbenik NF-κB koji potiče ekspresiju proupalnih citokina (IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α) i enzima (COX-2, iNOS, LOX), te promotora oštećenja DNA. Izofluran uzrokuje povećanje oksidacije lipida i proteina, parametara oksidacijskog stresa, te ima snažan genotoksični učinak koji je na vrhuncu 120 minuta nakon anestezije, a aktivnost popravka DNA počinje trećeg dana nakon anestezije i završava petoga dana (Brozović i sur., 2017). Isto tako, postoji razlika u pojavi oksidacije, upale i oštećenja DNA odnosno oštećenja moždanog tkiva s obzirom na vrstu zahvata i duljinu trajanja anestezije.

Iako mehanizam djelovanja hlapljivih anestetika nije u potpunosti razjašnjen, anestetici aktiviraju kaspaze, povećavaju nastajanje Aβ proteina, povisuju proupalne citokine, posebice TNF-α, te podržavaju apoptozu stanica. Pri operacijama se u krvotok otpuštaju razni proupalni citokini, kao što je TNF-α i interleukin IL-β, što potvrđuje da upalni odgovor ima ključnu ulogu u patogenezi i neurodegenerativnim poremećajima kao što je Alzheimerova bolest (Naidu i sur., 2013). Proupalni citokini djeluju na središnji živčani sustav direktno ili indirektno, preko slabopropusne krvno moždane barijere ili mijenjajući aferentnu funkciju vagalnog živca. Glia stanice se mogu aktivirati, te potaknuti otpuštanje raznih upalnih medijatora (Ologunde i Ma, 2011). Dugotrajna upala koja podrazumijeva poremećenu urođenu imunost ili produljeni stanični stres inducira disfunkciju, a može voditi prema povećanom riziku razvoja kroničnih bolesti.

Pod hipoksičnim uvjetima, izofluran djeluje zaštitno međureakcijom s putevima koji uključuju fosfolipazu C koja aktivira antiapoptotičke puteve, te otpuštanje Ca^{2+} iz unutarstaničnih skladišta (Burchell i sur., 2013). Kod životinja izofluran ima zaštitni učinak na ventrikularne miocite tako da djeluje na stanja uzrokovana neravnotežom kisika poput hipoksije, pojave hidrogen peroksida i upalnog odgovora induciranog neutrofilima. Kod životinja su također smanjeni biljezi oksidacijskog oštećenja i medijatori upale djelovanjem izoflurana, dok je povećano stvaranje antioksidativnih enzima. Temeljem navedenog, pokazano je da izofluran ima antioksidativno i protuupalno djelovanje na plućno i srčano tkivo, ali ne i na moždano (Lee i sur., 2015).

Apoptoza bubrežnih stanica potencijalni je okidač upale i potiče patogenezu akutnog otkazivanja bubrega, međutim subtoksično izlaganje izofluranu može povećati otpornost tubularnih stanica, te spriječiti staničnu smrt, tj. inhibirati apoptozu posredstvom kašnjenja aktivacije kaspaza (Aravindan i sur., 2006). Stanična smrt inducirana izofluranom

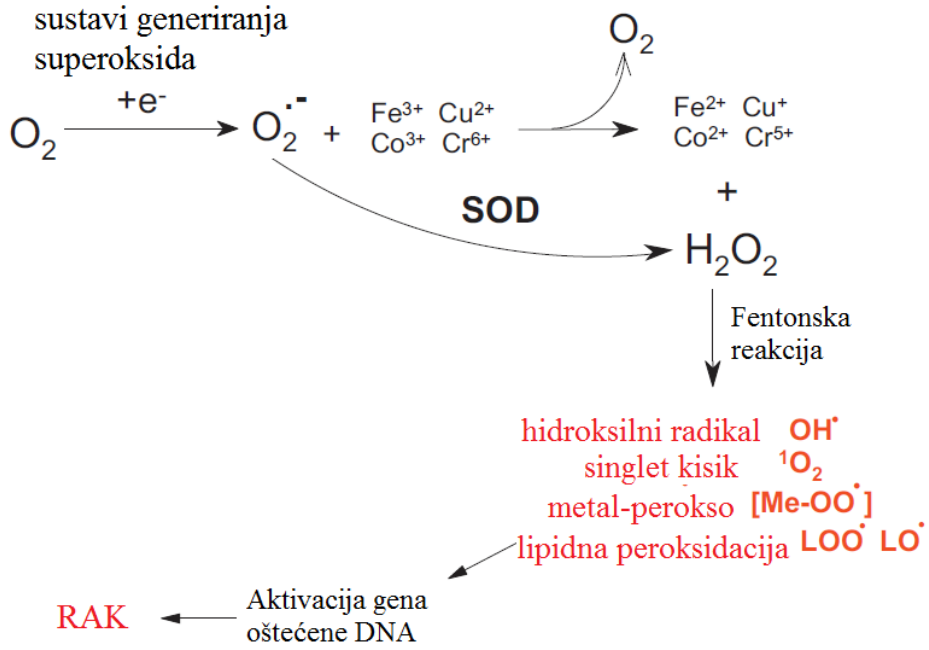
karakterizirana je jezgrenom kondenzacijom, fragmentacijom i aktivacijom kaspaze 3 i 9 (Wei i sur., 2005). Dugotrajna upala i disfunkcija stanica mogu dovesti do kroničnih oboljenja povećanjem infiltracije upalnih imunosnih stanica, te povećanja oksidacijskog stresa.

Korištenje izoflurana kao anestetika u operaciji za modeliranje neonatalne ishemije/hipoksije, dovelo je do pretpostavke kako izofluran može imati zaštitne učinke na novorođenčad, te posebno pokazuje neuroprotektivni učinak u nekoliko modela moždanog udara, uključujući subarahnoidalno krvarenje (SAH, engl. *Subarachnoid hemorrhage*), srednju cerebralnu arterookluziju (MCAO, engl. *Middle cerebral arteryocclusion*), intracerebralno krvarenje, traumatsku ozljedu mozga i neonatalnu hipoksičnu/ishemijsku ozljedu mozga (Zhao i sur., 2016). Smatra se da izofluran inhibira ekscitotoksičnost koja je pokrenuta akumulacijom glutamata tijekom ishemije što rezultira smanjenjem nekroze gdje izofluran smanjuje izvanstanični glutamat, te je ujedno i antagonist GABA receptora koji osigurava inhibicijski učinak protiv ekscitotoksičnosti (Burchell i sur., 2013).

1.5.2. Aktivacija upale i oksidacijskog stresa prilikom upotrebe željezo dekstrana

Stvaranje slobodnih radikala posredstvom metala uzrokuje razne modifikacije DNA baza, poboljšava lipidnu peroksidaciju i mijenja homeostazu kalcija i sulfhidrila, a lipidni peroksidi koji nastaju napadom radikala na ostatke fosfolipida polinezasićenih masnih kiselina mogu nadalje reagirati s redoks metalima stvarajući mutageni i karcinogeni MDA, 4-HNE i druge eksocikličke DNA, etano i/ili propano, adukte (Valko i sur., 2005). Dokazi o pojačanoj aktivnosti glia stanica nakon obrade životinja sa željezom ukazuju na ubrzanje patoloških i upalnih događaja. Višak iona željeza koji prijeđu krvnomoždanu barijeru ili se otpuštaju prilikom oštećenja mozga induciraju oksidacijski stres i stvaranje ROS-a preko Fentonske i Haber-Weissove reakcije (Slika 5).

U Fentonskoj reakciji metal reagira s vodikovim peroksidom (H_2O_2, engl. *Hydrogen peroxide*) pri čemu nastaje reaktivni $OH^{\bullet}$, te oksidirani Fe^{3+} (engl. *Ferric ion*). On se reducira superoksidnim anionom (O^{2-}, engl. *Superoxide anion*) u Fe^{2+} u Haber-Weissovoj reakciji te opet reagira s H_2O_2. Hidroksilni radikali oštećuju proteine DNA i membranske lipide. ROS-ovi imaju ulogu u poticanju stvaranja oštećenja stanica koja mogu voditi karcinogenezi, mogu poticati kaskadnu reakciju nastajanja novih ROS-ova, stimuliraju upalu koja uključuje izlučivanje kemotaktičkih čimbenika, čimbenika rasta, proteolitičkih enzima, lipooksigenaza i ciklooksigenaza, inaktivaciju antiproteolitičkih enzima i oslobađanje signalnih proteina (Leonard i sur., 2004).



Slika 5. Putevi oksidacijskog stresa uzrokovanog redoks aktivnim metalima (preuzeto i prilagođeno prema: Jomova i Valko, 2011).

Intravenozni željezni pripravci koriste se u rutinskom liječenju anemije, zajedno sa eritropoetinom, kod bolesnika s CRF kod kojih je karakteristična upala i pojava oksidacijskog stresa (Lim i Vaziri, 2004b). Mehanizmi povezani s oštećenjem jetre u kroničnom preopterećenju željezom uključuju povećanu krhkost lizosomalne membrane posredstvom željezom inducirane lipidne peroksidacije, te peroksidacijsko oštećenje organela kao što su mikrosomi i mitohondriji (Stohs i Bagchi, 1995).

Dokazano je da željezo-dekstran u subkroničnim dozama potiče oksidacijski stres i obrambene antioksidacijske mehanizme u štakora (Piloni i sur., 2015). Unos željeza oralnim putem rezultira njegovom slabom apsorbancijom u gornjem dijelu gastrointestinalnog sustava i većina se nakuplja u upaljenom dijelu debelog crijeva, te putem Fentonove reakcije nastaju ROS-ovi koji dalje potiču oštećenja i povećanje propusnosti sluznice, novačenje neutrofila i aktivaciju transkripcijskih čimbenika, npr. NF-κB, regulirajući transkripciju adhezijskih molekula, citokina i enzima uključenih u upalni odgovor (Carrier i sur., 2001).

Sama pojava oksidacijskog stresa može biti posljedica poremećaja homeostaze iona željeza pa dolazi do nastanka redoks aktivnog željeza. Takvo željezo stvara ROS-ove koji uzrokuju ozljede tkiva, poremećaj rasta stanica i oksidacijski stres. Povećana lipidna peroksidacija vodi modifikaciji proteina, te oštećenju što vodi nastanku neuroloških poremećaja kao što su Alzheimerova ili Parkinsonova bolest (Jomova i Valko, 2011). Pojava oksidacijskog stresa, upale i oštećenja DNA uočena je kod bolesnika podvrgnutih većim kirurškim zahvatima, kao što su abdominalne i ortopedske operacije, histerektomije, kolecistektomije i torakotomije. Kod manjih operacija ne javljaju se promjene takvog oblika.

Povećana toksičnost uzrokovana kompleksom željezo dekstrana može se povezati sa pojavom CRF-a jer se u kardiovaskularnim tkivima povećava oksidacijski stres. Primjena samo jedne doze željezo dekstrana rezultira značajnim poboljšanjem anemije. Jedini do sad dokazani utjecaj jednokratne primjene željezo dekstrana jest umjereno povećanje oksidacijskog stresa, dok ista količina ne djeluje negativno na funkciju bubrega (Lim i Vaziri, 2004b). Jednako tako ioni željeza utječu na aktivnost i aktivaciju NF-κB, aktivnost transkripcijskog čimbenika AP-1, te ekspresiju i transkripciju p53, a ujedno i potiču njegove mutacije (Leonard i sur., 2004).

1.6. Cilj rada

Dugotrajno izlaganje anesteticima djeluje negativno na periferne organe i tkiva, te potiče upalu, oksidacijski stres, nekrozu, apoptozu vodeći pojavnosti neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti. Nazočnost visoke razine metala tijekom izlaganja anesteziji izofluranom na periferna tkiva i organe nije dostatno istražena. Temeljem navedenog, cilj rada jest istražiti utjecaj primjene anestetika izoflurana samog i/ili združenog sa željezo dekstranom na razinu oksidacijskog stresa i posljedične upale na uzorcima tkiva jetre, slezene i bubrega.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

2.1.1. Pokusne životinje

Za istraživanje su korištena oba spola visokosrodnih štakora Y59 stara 3 mjeseca uzgojena na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno - matematičkog fakulteta u Zagrebu. Navedeno je istraživanje provedeno na ukupno 24 Y59 štakora podijeljenih u 4 skupine sa po 6 životinja ovisno o obradi (izofluran i željezo dekstran sami i /ili u kombinaciji) koji su bili hranjeni standardnom hranom za laboratorijske životinje (Standard Diet GLP, 4RF21, Mucedola, Settimo Milanese MI, Italija), te koji su imali stalni pristup vodi. Uvjeti su bili standardni (dnevni ritam od 12 sati dana i 12 sati mraka, temperatura od 24 °C uz kontroliranu vlažnost zraka).

Istraživanje je provedeno prema etičkim načelima važećima u Republici Hrvatskoj (Zakon o zaštiti životinja, NN 102/2017) i Vodiču za držanje i korištenje laboratorijskih životinja (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHHS (NIH) Publ # 86-23).

2.1.2. Kemijski spojevi

2.1.2.1. Izofluran

Kao inhalacijski anestetik korišten je izofluran ($C_3H_2ClF_5O$; Mr = 184,49 g/mol) proizvođača Baxter.

2.1.2.2. Željezo dekstran

Korišten je željezo dekstran (FeH_2O_4S; Mr = 153,92 g/mol) proizvođača Santa Cruz Biotechnology, SAD.

2.1.2.3. Priprema željezo dekstrana

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

2.1.3. Laboratorijska oprema

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

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

Spektrofotometar: Libra S22 (proizvođač: Biochrom, UK);

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

VetScan® VS2 uređaj (proizvođač: Abaxis, UK);

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

2.2. Metode

2.2.1. Praćenje promjena tjelesne mase

Tijekom izvođenja pokusa, te neposredno prije početka izvođenja pokusa, životinje su pojedinačno izvagane i označene, te su na temelju tih podataka razvrstane u skupine sa približno sličnom tjelesnom masom (± 10 g). Za pojedinu je skupinu, na temelju mase životinja, određena količina pojedinačnih pripravaka koji su davani tijekom pokusa, te je primjenom istih praćena promjena mase. Mjerenja tjelesnih masa, izvršena su digitalnom vagom.

2.2.2. Relativni indeks težine organa

Relativna težina organa izračunata je prema sljedećoj formuli:

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

2.2.3. Obrada životinja

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

Pokusne životinje podijeljene su 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 28 dana. Drugu su skupinu činili štakori koji su bili izloženi kroz dva sata 1,5% inhalacijskom anestetiku izofluranu svaki drugi dan tijekom 28 dana. Treću skupinu su činili štakori koji su intraperitonealno primali gore opisanu otopinu željezo dekstrana svaki drugi dan tijekom 28 dana, a četvrtu su skupinu činile životinje koje su dva sata nakon intraperitonealnog injiciranja otopine željezo dekstrana primale 1,5% inhalacijski anestetik izofluran kroz dva sata svaki drugi dan tijekom 28 dana.

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

Tablica 1. Pokusne skupine i način obrade

Oznaka skupine	**Sastav pokusne otopine**	**Doziranje**	**Način primjene**	**Period obrade (dani)**
0. Kontrola	0,9% NaCl	0,5 mL svaki drugi dan	*ip*	28
1. Izofluran	Izofluran, inhalacijski anestetik	1,5% svaki drugi dan	inhalacijski	28
2. FeH_2O_4S 50 mg/kg	50 mg/kg FeH_2O_4S u 0,5 mL aqua pro	0,5 mL svaki drugi dan	*ip*	28
3. FeH_2O_4S 50 mg/kg u kombinaciji sa Izofluranom	50 mg/kg FeH_2O_4S u 0,5 mL aqua pro u kombinaciji sa Izofluranom	0,5 mL pokusne otopine u kombinaciji sa 1,5% inhalacijskim anestetikom svaki drugi dan	*ip* + inhalacijski	28

2.2.4. Priprema i izolacija tkiva

Nakon tjedan dana odvagano je 75 - 100 mg tkiva u Eppendorf epruvetu volumena 2 mL, gdje je dodan fosfatni pufer (PBS) u omjeru 1:10, te su uzorci potom homogenizirani ultrazvučnom sondom (homogenizatorom). Dobiveni homogenati su centrifugirani na 15 000 okretaja kroz 15 min na 4 °C, nakon čega je izdvojen supernatant homogenata, te je napravljeno razrjeđenje 10x i 40x. Izolirana tkiva bubrega, jetre i slezene pohranjena su na -20 °C do pripreme za daljnje analize.

2.2.5. Analiza biokemijskih parametara

Kako bi se procijenili biokemijski parametri krvi, prikupljeni su uzorci krvi u epruvetama s vakuumom bez antikoagulansa, te je serum korišten za daljnju biokemijsku analizu. Biokemijski parametri koji su određivani su: alanin aminotransferaza (ALT, engl. *Alanine aminotransferase*), albumin (ALB, engl. *Albumin*), alkalna fosfataza (ALP, engl. *Alkaline phosphatase*), amilaza (AMY, engl. *Amylase*), dušik uree u krvi (BUN, engl. *Blood urea nitrogen*), kreatinin (CRE, engl. *Creatinine*), glukoza u krvi (GLU, engl. *Glucose*), ukupni bilirubin (TBIL, engl. *Total bilirubin*), ukupni proteini (TP, engl. *Total protein*), natrij, fosfor, kalcij, kalij i globulin (GLOB, engl. *Globuline*) korištenjem VetScan® kita (engl. *Comprehensive Diagnostic Profile reagent rotor*) na VetScan® VS2 uređaju (Abaxis, UK).

2.2.6. Osmotska otpornost eritrocita

Između stanične i izvanstanične tekućine, selektivno propusne stanične membrane uspostavljaju osmotski gradijent. Koncentracija nedifuzibilnih iona s obje strane membrane utječe na jačinu osmotskog tlaka. Izotonična otopina je 0,9% NaCl, što znači da ako se eritrociti stave u takav medij, preko njihove će se membrane uspostaviti osmotska ravnoteža između izvanstanične i stanične tekućine, te će neto izlaz i ulaz vode iznositi nula. U hipertoničnom mediju, kao što je 1,8% otopina NaCl, stanicama se mijenja njihov normalni bikonkavni oblik tijekom povećanog osmotskog gubitka vode. U hipotoničnom mediju, npr. 0,4% NaCl ili destilirana voda, javlja se povećani ulazak vode u stanicu pa stanica bubri, narušava se cjelovitost stanične membrane i dolazi do pojave hemolize: hemoglobin počinje izlaziti iz stanice i otapati se u okolnom mediju.

Metoda se temelji na činjenici kako broj stanica koje su u hemolizi ovisi o hipotoničnosti izvanstaničnog medija, te na različitim osmotskim otpornostima pojedinih eritrocita. Pokazatelj stupnja osmotske hemolize u svakoj test otopini je koncentracija oslobođenog hemoglobina. Cilj ove metode je ispitati odnos između osmolalnosti medija u

kojem su eritrociti suspendirani i stupnja hemolize. Ova metoda služi kao dobar indikator stupnja metaboličkih poremećaja unutar eritrocita, oštećenja stanične membrane eritrocita, poremećaja u strukturi hemoglobina ili sinteze enzima.

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. Kako bi se dobila homogena suspenzija stanica, uzorak krvi promiješan je štapićem. Potom se pipetom rasporedi po 0,01 mL uzorka krvi u priređene epruvete, nakon čega slijedi inkubacija uzoraka u vremenu od 30 minuta. Epruvete se potom centrifugiraju 10 min na 2200 okretaja/min. Supernatant se zatim mjeri spektrofotometrijski na 540 nm, a prva se epruveta (0,9% NaCl) koristi kao slijepa proba.

2.2.7. Metode biljega oksidacijskog stresa

2.2.7.1. Određivanje proteina po Lowry-u

U određivanju količine proteina koristio se protokol koji su predložili Lowry i sur. (1951). Metoda po Lowry-u temelji se na reakciji proteina s divalentnim ionima bakra (Cu^{2+}, engl. *Copper (II) ion*) i Folinovim reagensom (reagens razrijeđen vodom, Mr = 260,2 g/mol) koji sadrži fosfovolframsku i fosfomolibdensku kiselinu. U lužnatim uvjetima Cu^{2+} tvori kompleks s peptidnim vezama te se reducira u monovalentni ion bakra (Cu^{+}, engl. *Copper (I) ion*). Taj kompleks koji uključuje ostatke tirozina, triptofana i cisteina iz proteina te Cu^{+}, potom reagira s dodanim Folinovim reagensom. U toj reakciji nastaje nestabilni produkt koji se naposljetku reducira do molibden/volfram plavog obojenja otopine.

Ovom metodom izmjerena je koncentracija proteina iz tkiva bubrega, jetre i slezene korištenjem razrjeđenja 10x. U svaku je epruvetu dodano 100 μL supernatanta uzorka i 2 mL otopine D. Otopina D dobivena je miješanjem 2% Na_2CO_3 u 0,1M NaOH, natrij-kalij tartarata u destiliranoj vodi (dH_2O) i 0,5% $CuSO_4$ x $5H_2O$ u dH_2O u omjeru 48:1:1. Nakon toga, uzorci su inkubirani 10 min na sobnoj temperaturi. Potom je dodano 200 μL otopine Folinova reagensa (smjesa Folin & Ciocalteu's phenol reagens i dH_2O u omjeru 2:1), te su uzorci promiješani na vortexu i inkubirani dodatnih 30 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Apsorbancija je mjerena na spektrofotometru na valnoj duljini od 600 nm. Za baždarni graf korišten je albumin goveđeg seruma (BSA, engl. *Bovine serum albumin*) 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). Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji BSA izračunat je nagib pravca preko kojega su određene koncentracije proteina u uzorcima,

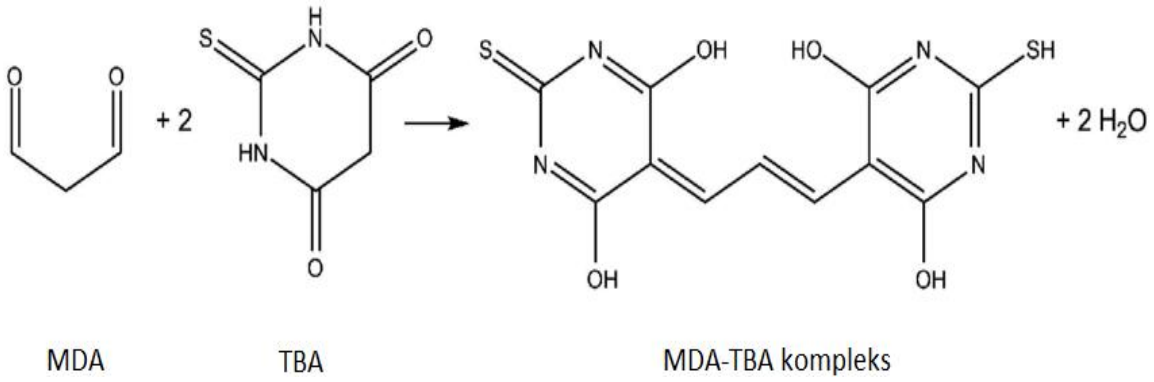
izražene u mg proteina/mL uzorka, prema formuli: $c = \left(\frac{A_{uzorka} - b_{staničnе\ krivulje}}{nagib\ pravca\ staničnе\ krivulje}\right) x\ razrjeđenje.$

2.2.7.2. Mjerenje enzimske aktivnosti katalaze (CAT)

Enzimska aktivnost katalaze metodom po Aebiju (1984) utvrđuje se kao količina potrošenog vodikovog peroksida, H_2O_2, koji se razgrađuje na vodu i kisik. Ova spektrofotometrijska metoda mjeri aktivnost katalaze na valnoj duljini od 240 nm u vremenu od jedne minute preko ekstinkcijskog koeficijenta H_2O_2 (ε = 39,4 m/Mcm). U kivetu, volumena 1 mL, dodano je 20 µL uzorka i 980 µL 10 mM H_2O_2. Za jetru i slezenu upotrijebljeno je razjeđenje 40x, a za bubreg 10x. Aktivnost katalaze se izražava kao U/mg proteina što predstavlja µmol razgrađenog H_2O_2 u minuti po mg proteina. Formula koja je korištena u izračunu glasi: $c = \frac{A_{uzorka}}{\varepsilon(H_2O_2) x\ 1}\ x\ razrjeđenje$, gdje broj 1 označava put koji zraka svjetla prođe kroz kivetu (1 cm).

2.2.7.3. Određivanje koncentracije malondialdehida (MDA)

Ovaj modificirani protokol, metode koju su predložili Jayakumar i sur. (2007), mjeri količinu lipidne peroksidacije preko koncentracije MDA koji je krajnji produkt lipidne peroksidacije. Kada reaktivni kisikovi spojevi (npr. peroksid i superoksid radikal) razgrađuju višestruke nezasićene masne kiseline nastaje MDA (reaktivni produkt) koji djeluje kao biomarker oksidacijskog stresa. Za utvrđivanje koncentracije MDA u biološkom uzorku najčešće se koristi metoda derivatizacije MDA s 2-tiobarbituratnom kiselinom (TBA) pri čemu MDA reagira s dva ekvivalenta TBA i nastaje MDA-$(TBA)_2$ kromogeni kompleks (Slika 6) kojeg mjerimo pomoću spektrofotometra. Reakcija se odvija u kiselim uvjetima na temperaturi od 95 °C i pritom nastaje MDA-$(TBA)_2$ crveni fluorescentni kompleks, te mu se koncentracija određuje pomoću spektrofotometra pri valnoj duljini od 532 nm. Načelo metode zasniva se na narednoj reakciji:



Slika 6. Mehanizam reakcije TBARS s tiobarbiturnom kiselinom (preuzeto i prilagođeno prema: Weitner i sur., 2016).

Kao slijepa proba korišten je PBS pufer. Postupak mjerenja MDA u uzorcima tkiva uključivao je upotrebu homogenata, tj. u Eppendorf epruvete, volumena 2 mL, izpipetirano je 100 µL homogenata i 1,6 mL reagensa A (Tablica 2). Prethodno pripremljene epruvete bile su odložene na stalak, te omotane aluminijskom folijom i potom inkubirane u vodenoj kupelji na 95 °C u vremenu od 60 minuta. Potom je stalak s epruvetama odložen na led u vremenu od 10 minuta kako bi se otopina naglo ohladila, tijekom čega su folikule, nastale kao proizvod mješanja uzorka i otopine A, ostale na dnu. Uzorci su potom centrifugirani 10 minuta na 5000 okretaja zbog lakšeg odvajanja supernatanta. Apsorbancija supernatanta mjerena je na spektrofotometru na 532 nm. Ukupna koncentracija MDA iskazana je kao nmol MDA po mg proteina, a dobivena je putem ekstinkcijskog koeficijenta za MDA (ε = 1,56 x 10^5/M) prema sljedećoj formuli: $c = \frac{A_{uzorka} \, x \, V_{reakcijske\ smjese}}{\varepsilon \, x \, V_{uzorka} \, x \, c_{proteina\ u\ uzorku}}$.

Tablica 2. Priprema otopina za određivanje koncentracije MDA

Otopine	**Način pripreme otopina**
8,1% SDS	0,81 g SDS-a + 10 mL dH_2O
20% octena kiselina	20 mL 99,5% octene kiseline i 2,31 mL HCl (37%), nadopuniti do 50 mL dH_2O i podesiti pH na 3,5, te nadopuniti dH_2O do 100 mL
0,8% TBA	0,8 g TBA + 40 mL dH_2O uz lagano zagrijavanje (35 - 40 °C). Nakon otapanja dodati 500 µL 5M NaOH, te nadopuniti s dH_2O do 100 mL
Reagens A	100 µL 8,1% SDS + 750 µL 20% octene kiseline (pH = 3,5) + 750 µL 0,81% TBA

2.2.7.4. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

Katalizacija dismutacije dvaju superoksidnih radikala (O_2^-) u H_2O_2 i molekularni kisik nastaje djelovanjem metaloenzima SOD. Njegova aktivnost utvrđena je metodom po Flohéu i Öttingu (1971) i određuje se inhibicijom redukcije citokroma c u sustavu ksantin/ksantin oksidaza (XOD, engl. *Xanthine oxygenase*).

U postupku su korištene dvije slijepe probe gdje se prva sastojala od otopine A, a apsorbancija se mjerila spektrofotometrom na 550 nm u vremenu od 3 minute. Druga slijepa proba služila je za postavljanje enzimske aktivnosti XOD-a, koja mora iznositi oko 0,025 U/min. U kivetu, nakon slijepe probe, dodano je 25 µL uzorka, 1,45 mL otopine A i odgovarajući volumen enzima XOD. Nakon dosegnute optimalne aktivnosti SOD, provedena je analiza uzoraka.

Za određivanje aktivnosti SOD izračunat je postotak inhibicije aktivnosti XOD prema formuli: $\%\ inhibicije = 100 - \frac{\Delta A_{uzorka}}{\Delta A_{aktivnost\ XOD}}\ x\ 100$. Iz postotka inhibicije potom je izračunata aktivnost SOD izražena u U/mL uzorka prema formuli: $Akt\ SOD = 10^{\frac{\%\ inhibicije + 12{,}757}{80{,}932}}$. SOD je izražena kao U/mg proteina i izračunata prema formuli: $Akt\ SOD = \frac{aktivnost\ SOD\ U/mL}{c_{protein\ a\ u\ uzorku}}\ x\ razrjeđenje$. Korištena razrjeđenja za jetru i slezenu bila su 40x, a za bubreg 10x.

Tablica 3. Priprema otopina za određivanje aktivnosti SOD

Otopine	**Način pripreme otopina**
50 mM PBS	17 mL (1,56 g $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$ u 50 mL dH_2O) + 183 mL (5,678 g Na_2HPO_4 u 200 mL dH_2O) = 200mL (namjestiti pH na 7,8 i nadopuniti do 800 mL dH_2O)
50 mM PBS s 0,1 mM EDTA	3,72 mg EDTA + 100 mL 50 mM PBS
Citokrom c 0,05 mM	29 mg cyt c + 190 mL 50 mM PBS + 0,1 mM EDTA
Xantin 1 mM	3 mg ksantina + 19,74 mL 1 mM NaOH (teško se otapa, lagano zagrijavati); cyt c (-20 °C); Xantin (+ 4 °C) otopiti na 30 - 40 °C (paziti da ne ispari)
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_2O

2.2.7.5. Mjerenje koncentracije ukupnog glutationa (GSH)

GSH je antioksidans prisutan u stanicama sisavaca u reduciranom obliku, a kao takav nastaje redukcijom oksidiranog oblika glutation disulfida (GSSG, engl. *Glutathion disulfide*) glutation reduktazom. Koncentracija ukupnog glutationa određena je modificiranim protokolom koju je predstavio Tietze (1969). Polazna točka metode je reakcija tiolnog reagensa 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoične kiseline (DTNB, Ellmanov reagens) sa sulfhidrilnom grupom GSH pri čemu nastaje kromofor, žuto obojena 5-tionitrobenzoična kiselina (TNB, engl. *2-nitro-5-thiobenzoic acid*) koja se pri valnoj duljini 405 - 414 nm može spektrofotometrijski očitati. Jednako tako stvara se i miješani disulfid, GS-TNB čijom daljnjom redukcijom glutation reduktazom (GR, engl. *Glutathione reductase*) i NADPH nastaje molekula TNB i reciklira GSH. Brzina kojom nastaje TNB razmjerna je reciklirajućoj reakciji koja je izravno proporcionalna koncentraciji glutationa u uzorku. Ovom metodom sav oksidirani GSH (disulfid GSSG) prisutan u reakcijskoj smjesi ili nastao iz miješanog disulfida GS-TNB, može se reducirati do GSH u prisutnosti GR i NADPH: $GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GR} 2GSH + NADP^+$. Konačno dobiveni rezultat slaže se s ukupnom koncentracijom reduciranog i oksidiranog GSH u uzorku.

Za potrebe mjerenja GSH u uzorcima tkiva, razrjeđenje korišteno za jetru i slezenu bilo je 40x, a za bubreg 10x. Koncentracija ukupnog GSH mjeri se u mikrotitarskoj pločici gdje je u svaku jažicu stavljeno 20 µL uzorka, 40 µL 10 mM DTNB (reagensa A) i 40 µL 0,035 M HCl, te se provodi inkubacija u vremenu od 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga se mjeri apsorbancija na valnoj duljini od 412 nm. Potom se dodaje 100 µL reakcijske smjese B, te je apsorbancija mjerena tijekom 5 min. Priprema navedenih otopina prikazana je u Tablici 4.

Tablica 4. Priprema otopina za određivanje koncentracije ukupnog GSH.

Otopine	**Način pripreme otopina**
0,035 M HCl	7 mL 0,1M HCl + 193 mL dH_2O ili iz 12,178 M HCl → 0,287 µL (37% HCl) + 99,713 mL dH_2O
0,5 M (50 mM) pufer PBS	17 mL 1 M Na_2HPO_4 x $2H_2O$ (3 g Na_2HPO_4 x $2H_2O$ do 17 mL dH_2O) + 183 mL 1M Na_2HPO_4 x $12H_2O$ (65,5 g Na_2HPO_4 x $12H_2O$ do 183 mL dH_2O)
0,5 M EDTA	37,2 g EDTA u 200 mL dH_2O
0,5 M pufer PBS s 0,5 M EDTA	200 mL 0,5 M PBS + 200 mL 0,5 M EDTA
Reakcijska smjesa A (10 mM DTNB) – Ellmanov reagens	100 µL 8,1% SDS + 750 µL 20% octene kiseline (pH = 3,5) + 750 µL 0,81% TBA
Reakcijska smjesa B	9980 µL 0,8 mM NADPH (0,8 mM NADPH: 6,67 mg NADPH + do 10 mL 0,5 M pufer PBS s 0,5 M EDTA) + 20 µL glutation reduktaze
Baždarni	0,6 mg GSH (reducirani glutation) + 10 mL 0,5 M pufer PBS s 0,5 M EDTA

Za sve su standarde nacrtani pravci kao promjena apsorbancije u vremenu. Nagibi pravaca su očitani, te je nacrtan pravac kao ovisnost nagiba pravca o koncentraciji GSH. Dobiveni je pravac, u konačnici, upotrijebljen za dobivanje koncentracije ukupnog GSH u uzorku prema formuli: $c = \frac{nagib\ pravca_{uzorak} - nagib\ pravca_{slijepa\ proba}}{nagib\ pravca_{standarda}}$ x razrjeđenje. Koncentracija ukupnog GSH izražena je kao µM GSH po mL proteina.

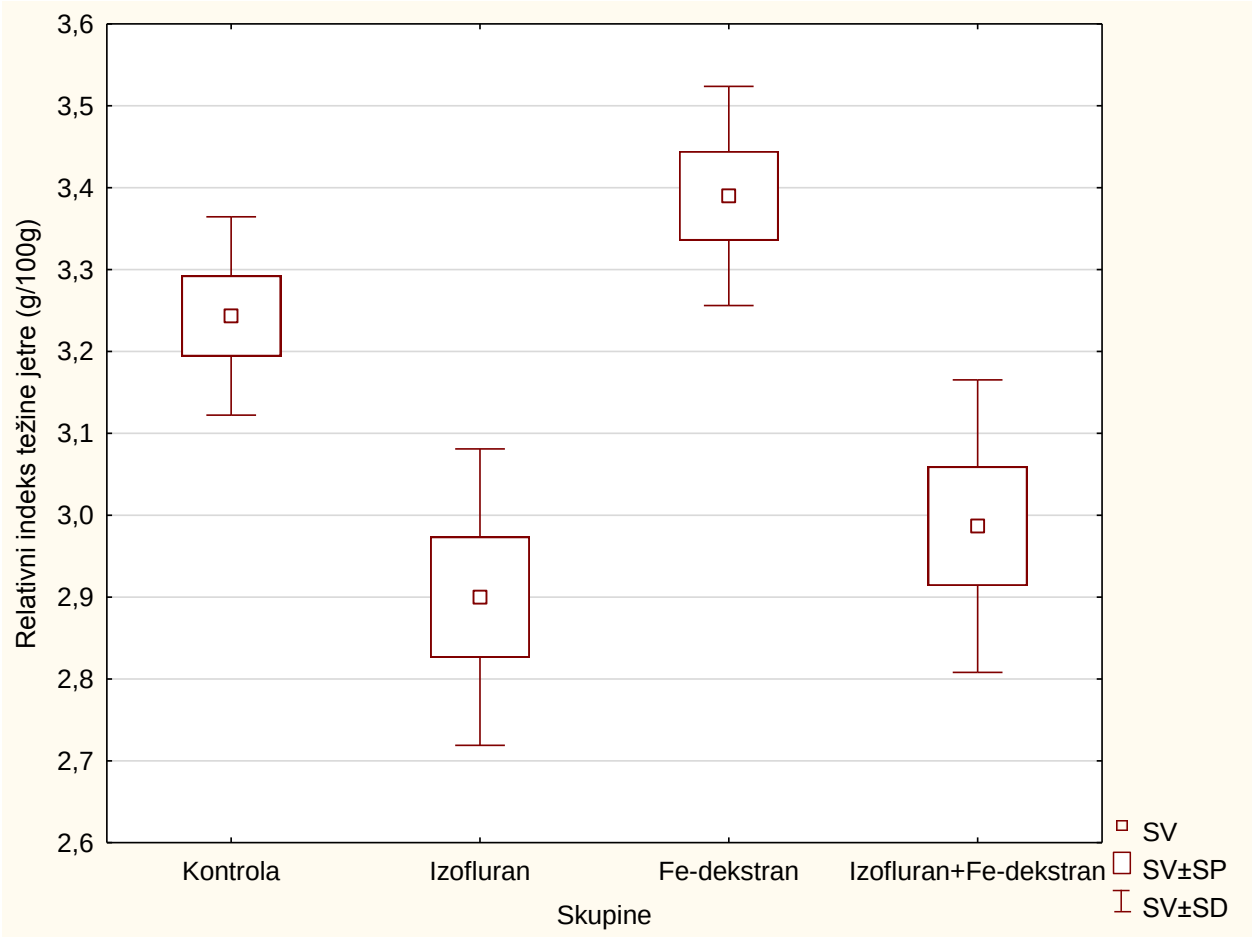
2.2.8. Statistička obrada podataka

Statistička je analiza podataka obrađena pomoću programa STATISTICA 13 (StatSoft, Tulsa, OK, USA), a statistička točnost je određena s $P < 0,05$. Svi ishodi su izraženi srednjom vrijednosti ± standardna pogreška (SV ± SP). Podaci su analizirani pomoću Kruskal-Wallis ANOVA-a testa. Daljnja ispitivanja razlika između skupina napravljena su višestrukom usporedbom srednjih vrijednosti svih skupina. Rezultati su prikazani grafički i tablično pomoću box-plot prikaza. Za pripremu podataka korišten je računalni program Microsoft Excel 2007.

3. REZULTATI

3.1. Relativni indeks težine jetre

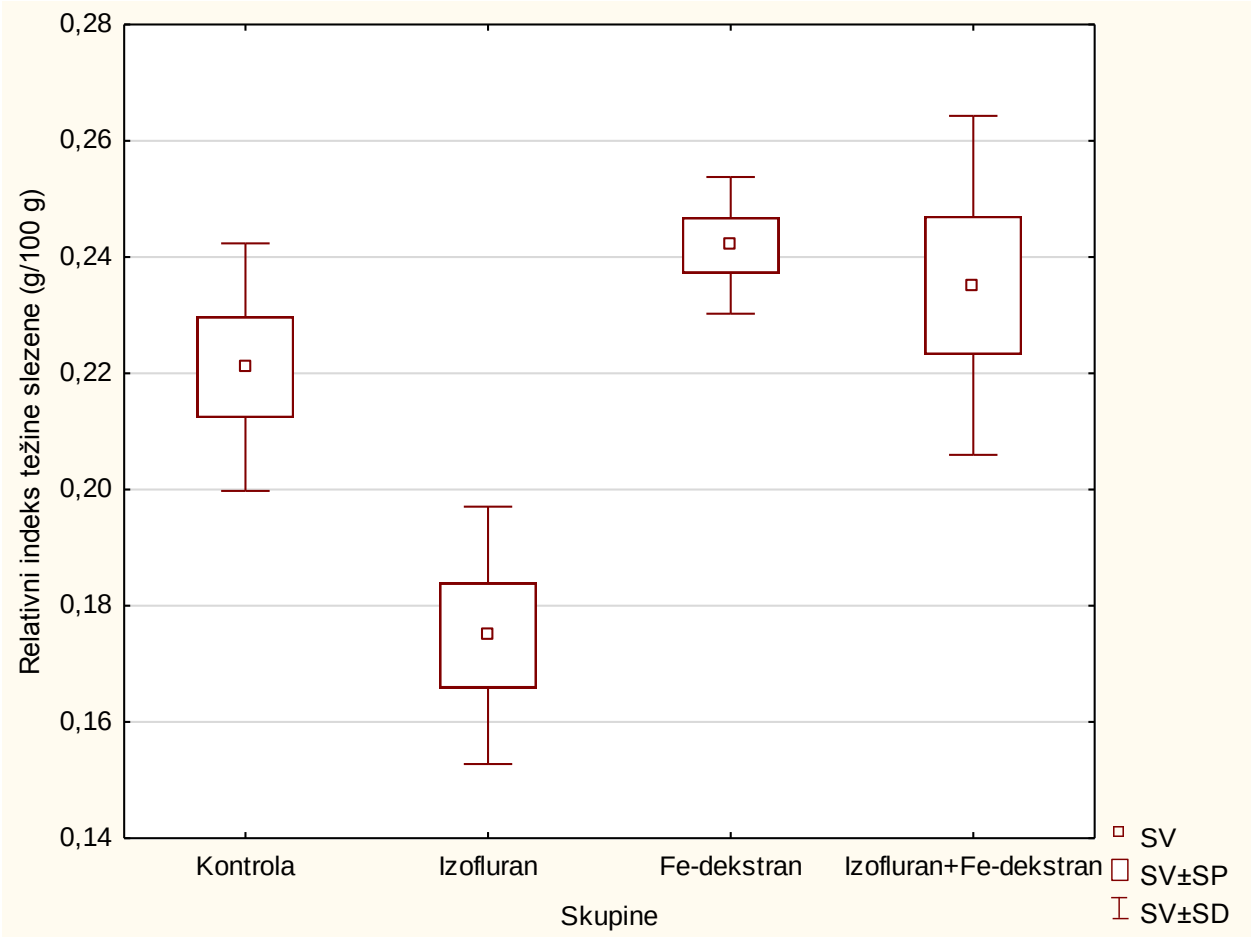
Štakori (N=6) obrađeni su izofluranom (1,5%), Fe-dekstranom (50 mg/kg) ili kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana (2 h nakon *ip* injiciranja Fe-dekstrana, štakori su izloženi 1,5% izofluranu kroz 2 h) svaki drugi dan tijekom 28 dana. Analizom rezultata relativnog indeksa težine jetre (Slika 7) pokazana je statistički značajna razlika između skupine izložene izofluranu u odnosu na skupinu injiciranu s Fe-dekstranom ($P < 0,01$), te između skupine obrađene Fe-dekstranom u odnosu na kombinaciju izoflurana i Fe-dekstrana ($P < 0,05$).



Slika 7. Relativni indeks težine jetre štakora obrađenih izofluranom, Fe-dekstranom i kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP (SD). Statistički značajno različito: Izofluran *vs* Fe-dekstran ($P < 0,01$); Fe-dekstran *vs* Izofluran + Fe-dekstran ($P < 0,05$). Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija, Fe-dekstran – željezo dekstran.

3.2. Relativni indeks težine slezene

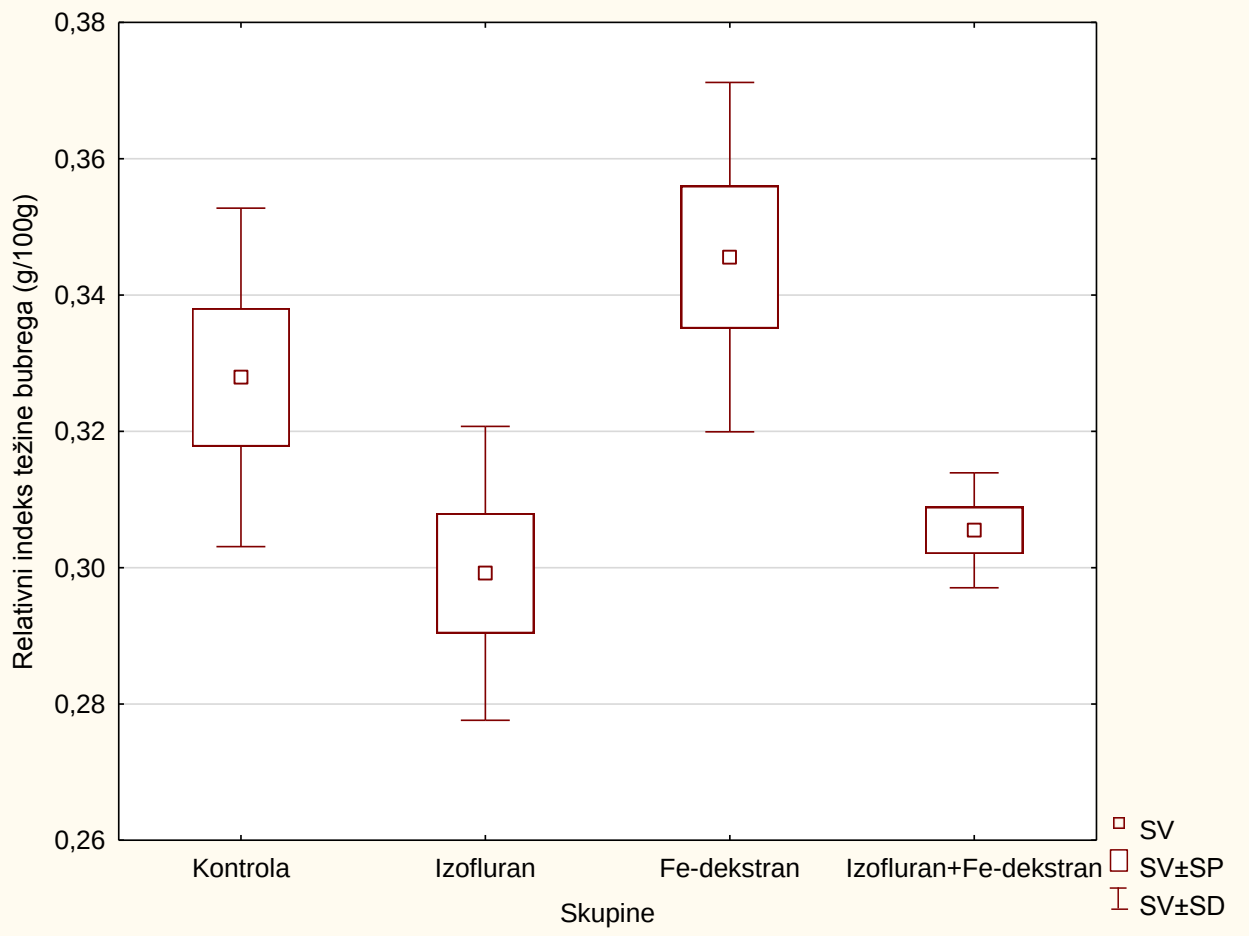
Analizom rezultata relativnog indeksa težine slezene (Slika 8) pokazana je statistički značajna razlika između skupine izložene izofluranu u odnosu na Fe-dekstran ($P < 0,05$) i skupine izložene izofluranu u odnosu na skupinu obrađenu kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana ($P < 0,05$).



Slika 8. Relativni indeks težine slezene štakora obrađenih izofluranom, Fe-dekstranom i kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana. Štakori (N=6) obrađeni su izofluranom (1,5%), Fe-dekstranom (50 mg/kg) ili kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana (2 h nakon *ip* injiciranja Fe-dekstrana, štakori su izloženi 1,5% izofluranu kroz 2 h) svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP (SD). Statistički značajno različito: Izofluran *vs* Fe-dekstran ($P < 0,05$); Izofluran *vs* Izofluran + Fe-dekstran ($P < 0,05$). Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija, Fe-dekstran – željezo dekstran.

3.3. Relativni indeks težine bubrega

Analizom rezultata relativnog indeksa težine bubrega (Slika 9) pokazana je statistički značajna razlika između skupine izložene izofluranu u odnosu na skupinu izloženu Fe-dekstranu ($P < 0,01$).

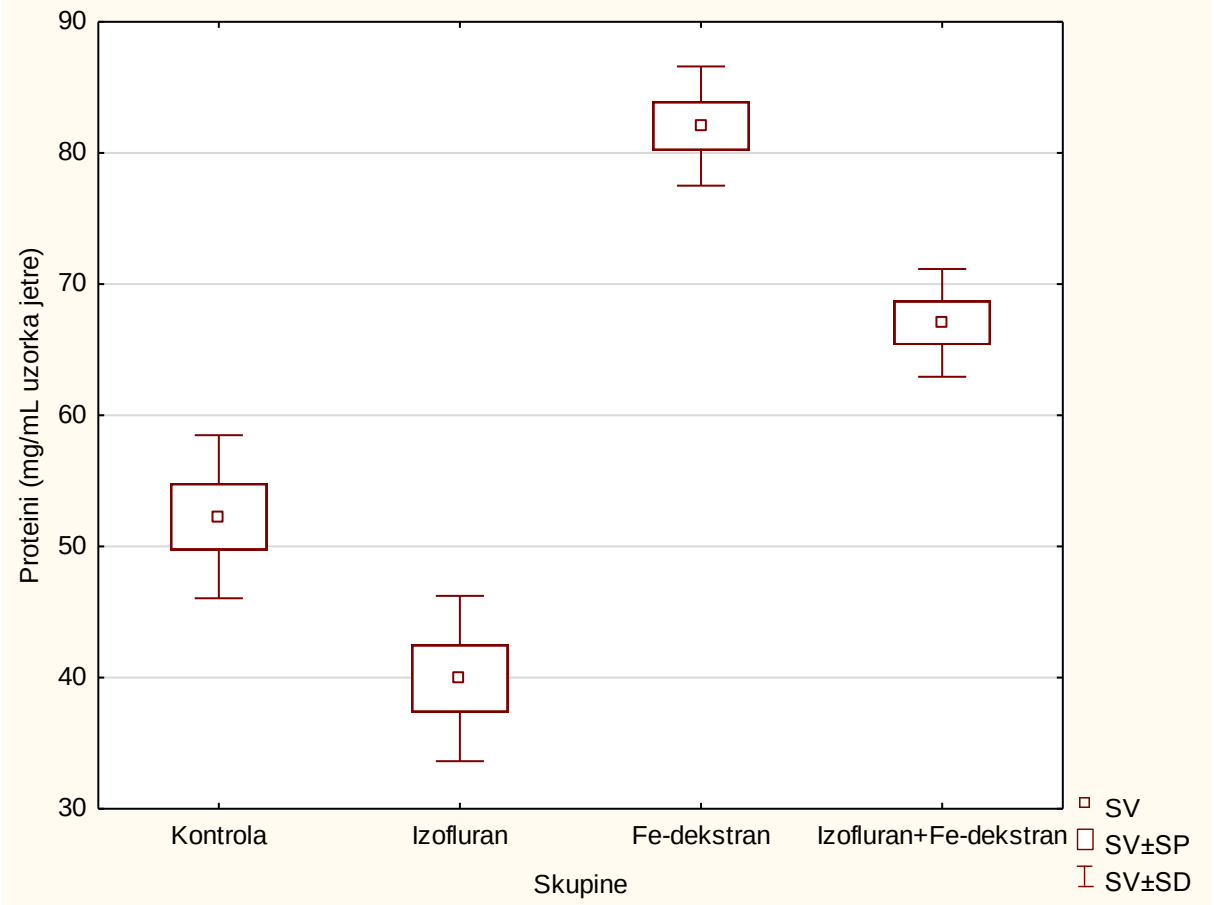


Slika 9. Relativni indeks težine bubrega štakora obrađenih izofluranom, Fe-dekstranom i kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana. Štakori (N=6) obrađeni su izofluranom (1,5%), Fe-dekstranom (50 mg/kg) ili kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana (2 h nakon *ip* injiciranja Fe-dekstrana, štakori su izloženi 1,5% izofluranu kroz 2 h) svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP (SD). Statistički značajno različito: Izofluran *vs* Fe-dekstran ($P < 0,01$). Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija, Fe-dekstran – željezo dekstran.

3.4. Mjerenje oksidacijskog stresa u perifernim organima štakora

3.4.1. Ukupni proteini u uzorcima organa jetre štakora

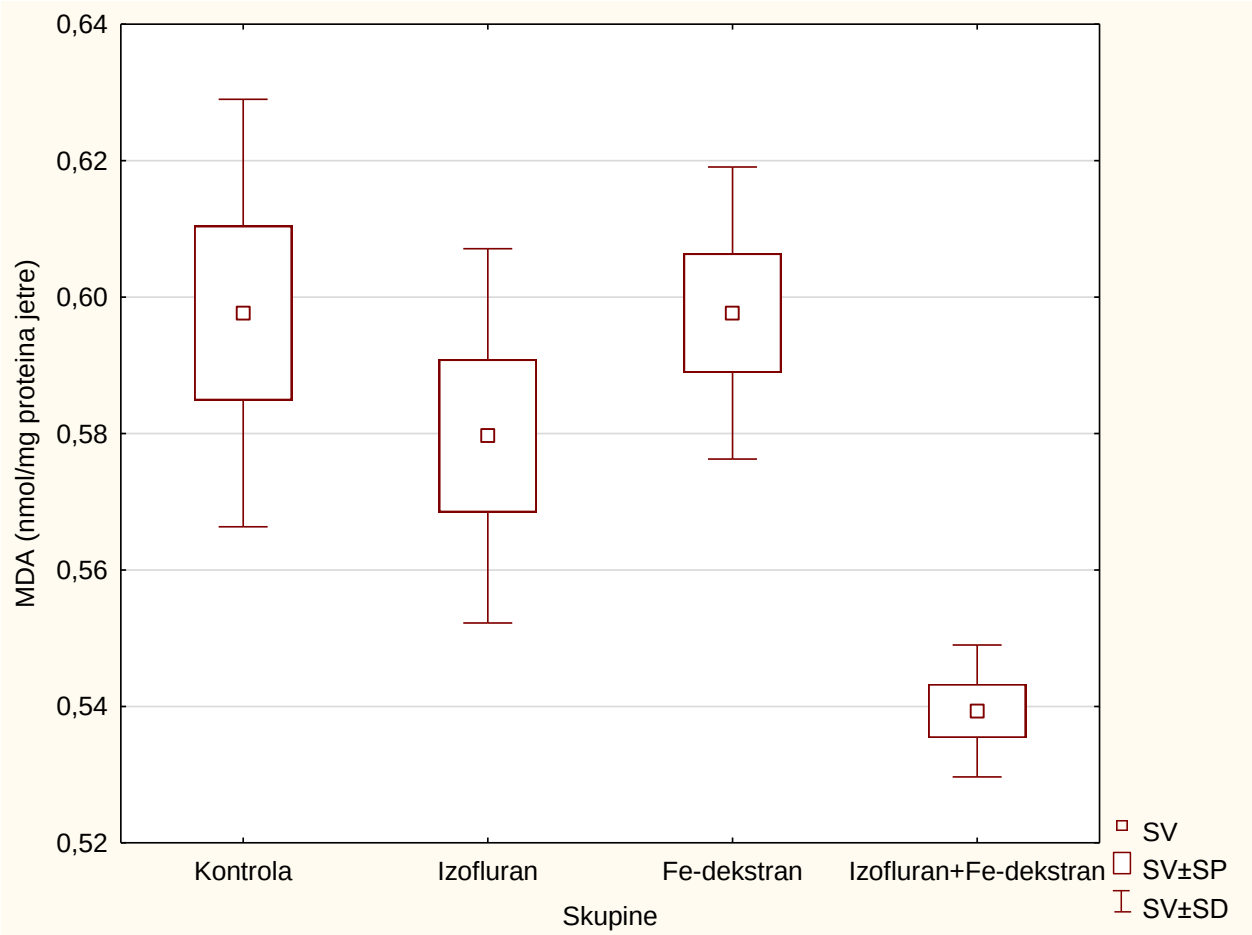
Rezultati mjerenja ukupnih proteina u jetri štakora (Slika 10) pokazuju statistički značajne razlike između sljedećih skupina: kontrola *vs* Fe-dekstran ($P < 0,05$); izofluran *vs* Fe-dekstran ($P < 0,01$); izofluran *vs* izofluran + Fe-dekstran ($P < 0,05$).



Slika 10. Ukupna koncentracija proteina u uzorcima organa jetre štakora obrađenih izofluranom, Fe-dekstranom i kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana. Štakori (N=6) obrađeni su izofluranom (1,5%), Fe-dekstranom (50 mg/kg) ili kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana (2 h nakon *ip* injiciranja Fe-dekstrana, štakori su izloženi 1,5% izofluranu kroz 2 h) svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP (SD). Statistički značajno različito: Kontrola *vs* Fe-dekstran ($P < 0,05$). Izofluran *vs* Fe-dekstran ($P < 0,01$); Izofluran *vs* Izofluran + Fe-dekstran ($P < 0,05$). Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija, Fe-dekstran – željezo dekstran.

3.4.2. Razina lipidne peroksidacije (MDA) u uzorcima organa jetre štakora

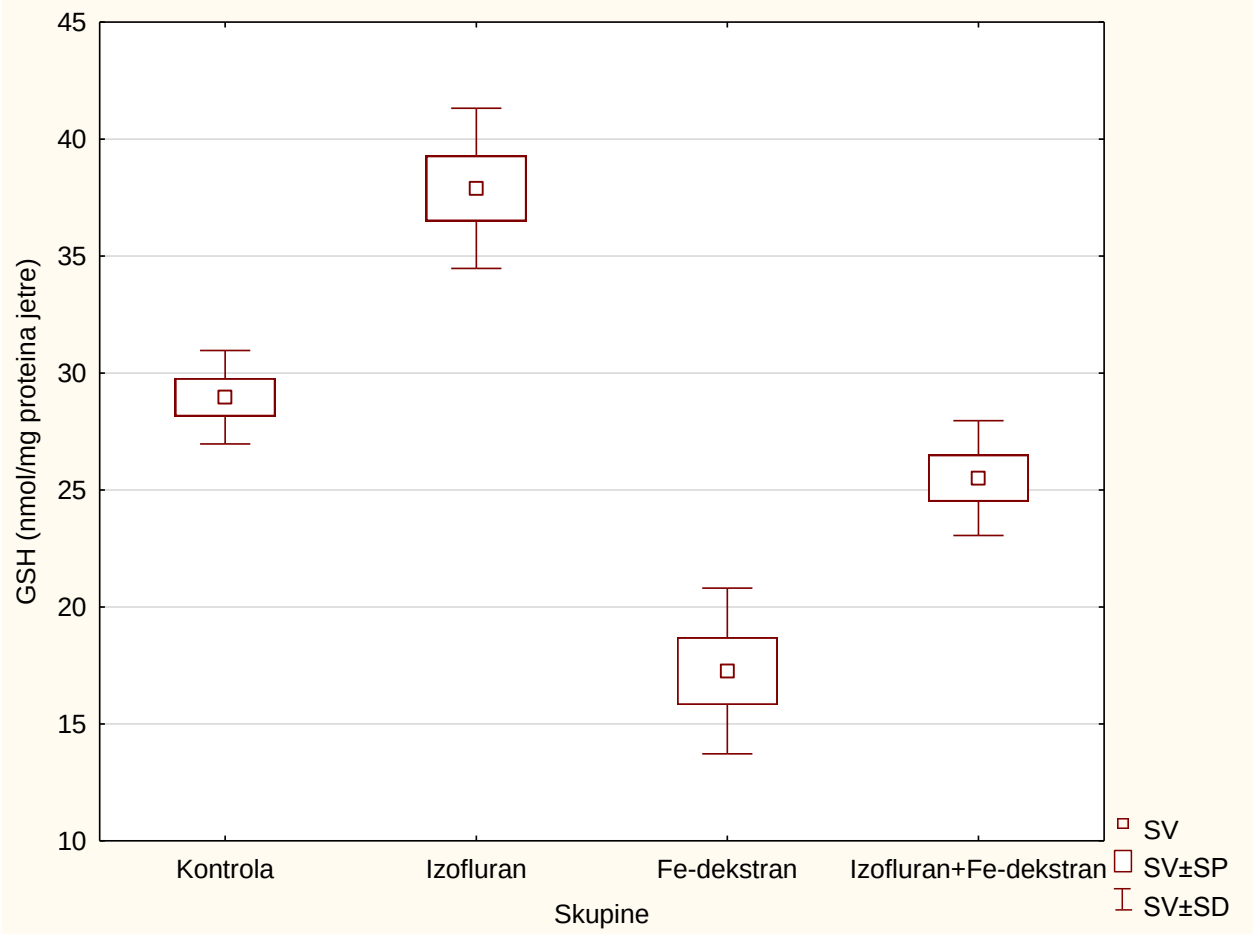
Rezultati mjerenja razine MDA u jetri štakora (Slika 11) pokazuju statistički značajnu razliku između kontrolne skupine i skupine obrađene kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana ($P < 0,05$), te skupine izložene Fe-dekstranu u odnosu na kombinaciju izoflurana i Fe-dekstrana ($P < 0,01$).



Slika 11. Razina lipidne peroksidacije u uzorcima organa jetre štakora obrađenih izofluranom, Fe-dekstranom i kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana. Štakori (N=6) obrađeni su izofluranom (1,5%), Fe-dekstranom (50 mg/kg) ili kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana (2 h nakon *ip* injiciranja Fe-dekstrana, štakori su izloženi 1,5% izofluranu kroz 2 h) svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP (SD). Statistički značajno različito: Kontrola *vs* Izofluran + Fe-dekstran ($P < 0,05$); Fe-dekstran *vs* Izofluran + Fe-dekstran ($P < 0,01$). Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija, Fe-dekstran – željezo dekstran.

3.4.3. Razina ukupnog glutationa (GSH) u uzorcima organa jetre štakora

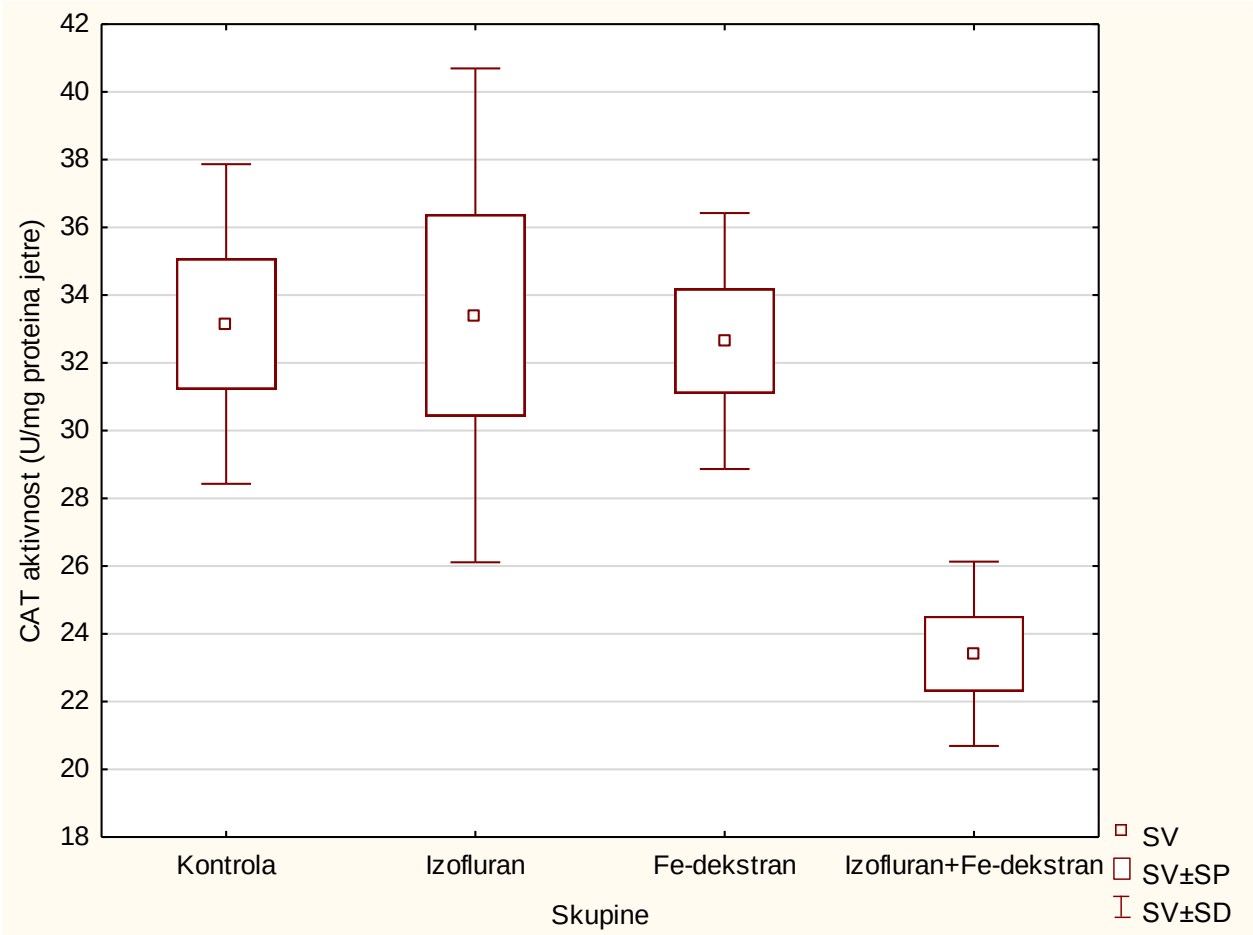
Mjerenjem razine GSH u jetri štakora (Slika 12) dobiveni rezultati pokazuju statistički značajnu razliku između sljedećih skupina: kontrola *vs* Fe-dekstran ($P < 0,05$); izofluran *vs* Fe-dekstran ($P < 0,01$); izofluran *vs* izofluran + Fe-dekstran ($P < 0,05$).



Slika 12. Razina ukupnog glutationa u uzorcima organa jetre štakora obrađenih izofluranom, Fe-dekstranom i kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana. Štakori (N=6) obrađeni su izofluranom (1,5%), Fe-dekstranom (50 mg/kg) ili kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana (2 h nakon *ip* injiciranja Fe-dekstrana, štakori su izloženi 1,5% izofluranu kroz 2 h) svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP (SD). Statistički značajno različito: Kontrola *vs* Fe-dekstran ($P < 0,05$). Izofluran *vs* Fe-dekstran ($P < 0,01$); Izofluran *vs* Izofluran + Fe-dekstran ($P < 0,05$). Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija, Fe-dekstran – željezo dekstran.

3.4.4. Enzimska aktivnost katalaze (CAT) u uzorcima organa jetre štakora

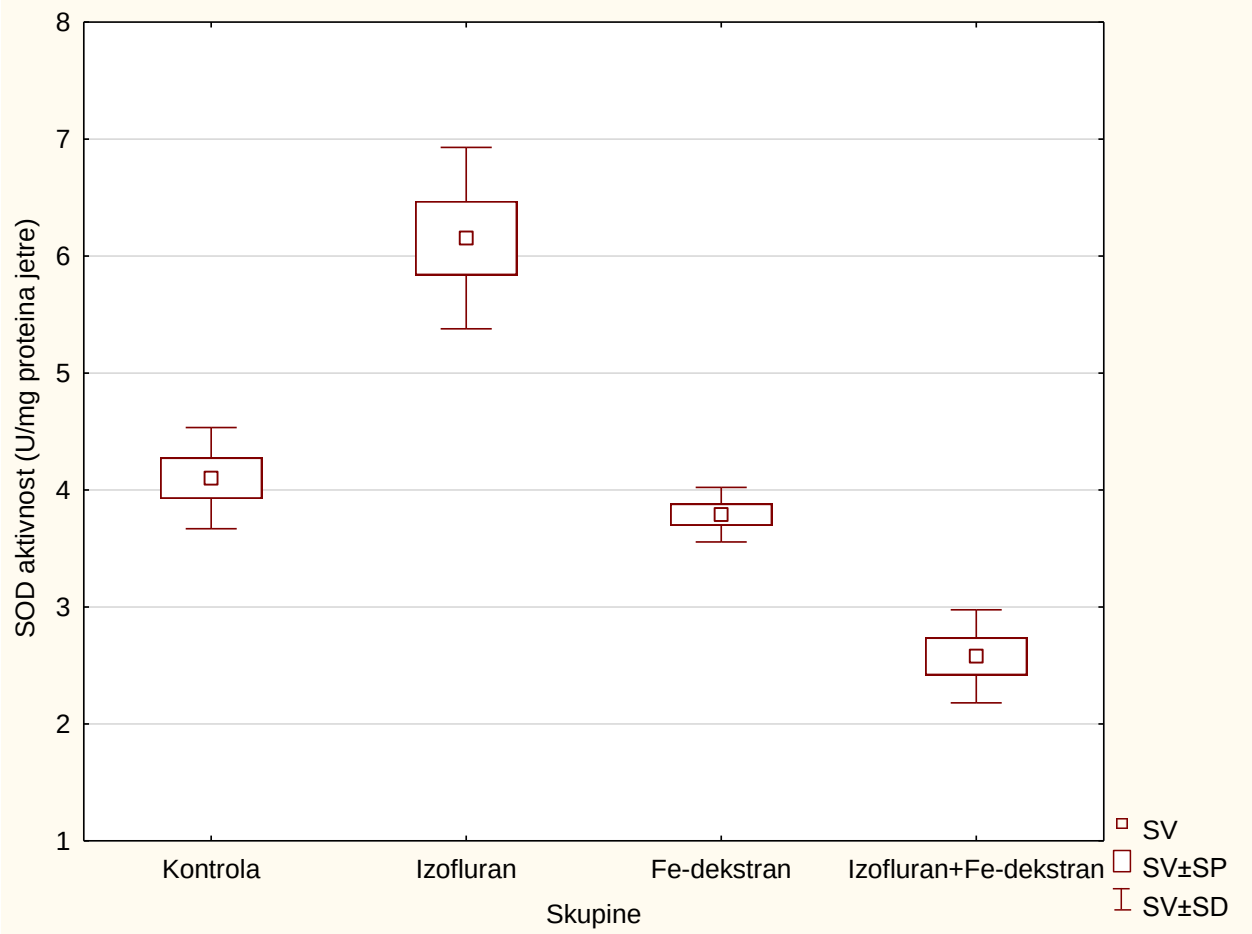
Rezultati mjerenja aktivnosti CAT u jetri štakora (Slika 13) pokazuju statistički značajnu razliku između skupine obrađene kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana u odnosu na kontrolnu skupinu ($P < 0,05$), te skupine izložene izofluranu u odnosu na kombinaciju izoflurana i Fe-dekstrana ($P < 0,05$).



Slika 13. Enzimska aktivnost katalaze u uzorcima organa jetre štakora obrađenih izofluranom, Fe-dekstranom i kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana. Štakori (N=6) obrađeni su izofluranom (1,5%), Fe-dekstranom (50 mg/kg) ili kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana (2 h nakon *ip* injiciranja Fe-dekstrana, štakori su izloženi 1,5% izofluranu kroz 2 h) svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP (SD). Statistički značajno različito: Kontrola *vs* Izofluran + Fe-dekstran ($P < 0,05$); Izofluran *vs* Izofluran + Fe-dekstran ($P < 0,05$). Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija, Fe-dekstran – željezo dekstran.

3.4.5. Enzimska aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u uzorcima organa jetre štakora

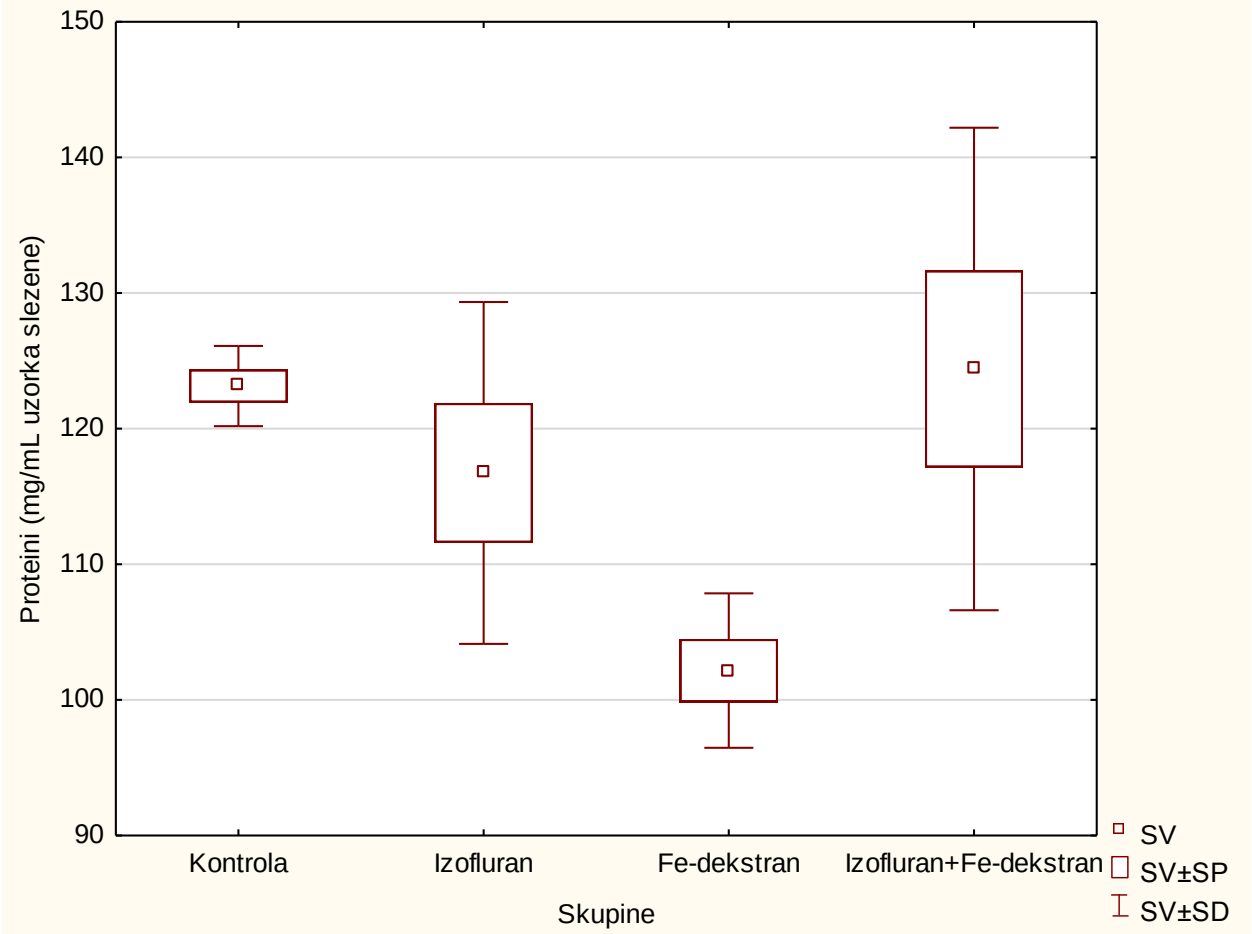
Mjerenje aktivnosti SOD u jetri štakora (Slika 14) pokazuje statistički značajnu razliku između skupine izložene izofluranu u odnosu na skupinu obrađenu kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana ($P < 0,01$).



Slika 14. Enzimska aktivnost superoksid dismutaze u uzorcima organa jetre štakora obrađenih izofluranom, Fe-dekstranom i kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana. Štakori (N=6) obrađeni su izofluranom (1,5%), Fe-dekstranom (50 mg/kg) ili kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana (2 h nakon *ip* injiciranja Fe-dekstrana, štakori su izloženi 1,5% izofluranu kroz 2 h) svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP (SD). Statistički značajno različito: Izofluran *vs* Izofluran + Fe-dekstran ($P < 0,01$). Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija, Fe-dekstran – željezo dekstran.

3.4.6. Ukupni proteini u uzorcima organa slezene štakora

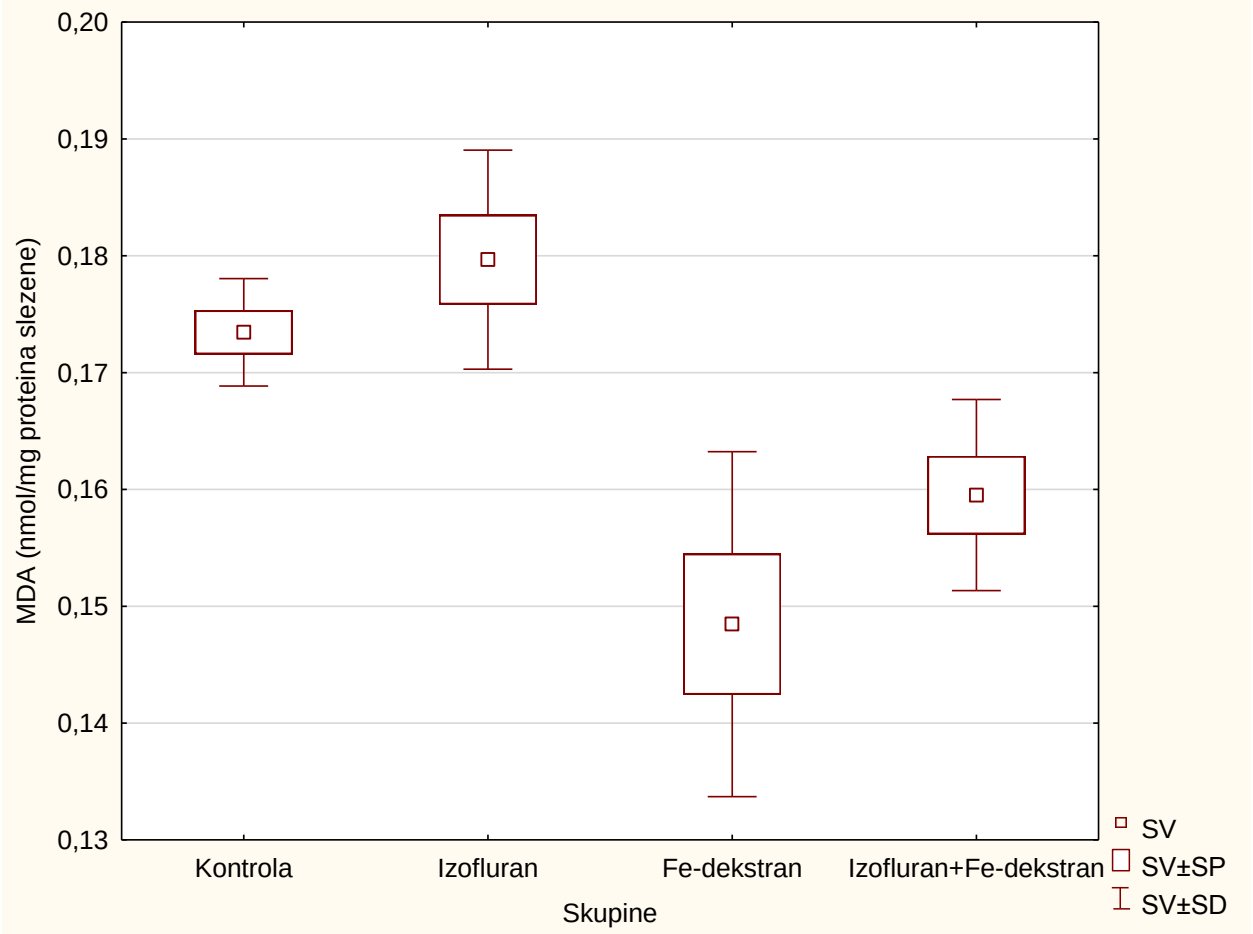
Rezultati mjerenja ukupnih proteina u slezeni štakora (Slika 15) pokazuju statistički značajnu razliku između skupine injicirane s Fe-dekstranom u odnosu na skupinu obrađenu kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana ($P < 0,05$).



Slika 15. Ukupna koncentracija proteina u uzorcima organa slezene štakora obrađenih izofluranom, Fe-dekstranom i kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana. Štakori (N=6) obrađeni su izofluranom (1,5%), Fe-dekstranom (50 mg/kg) ili kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana (2 h nakon *ip* injiciranja Fe-dekstrana, štakori su izloženi 1,5% izofluranu kroz 2 h) svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP (SD). Statistički značajno različito: Fe-dekstran *vs* Izofluran + Fe-dekstran ($P < 0,05$). Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija, Fe-dekstran – željezo dekstran.

3.4.7. Razina lipidne peroksidacije (MDA) u uzorcima organa slezene štakora

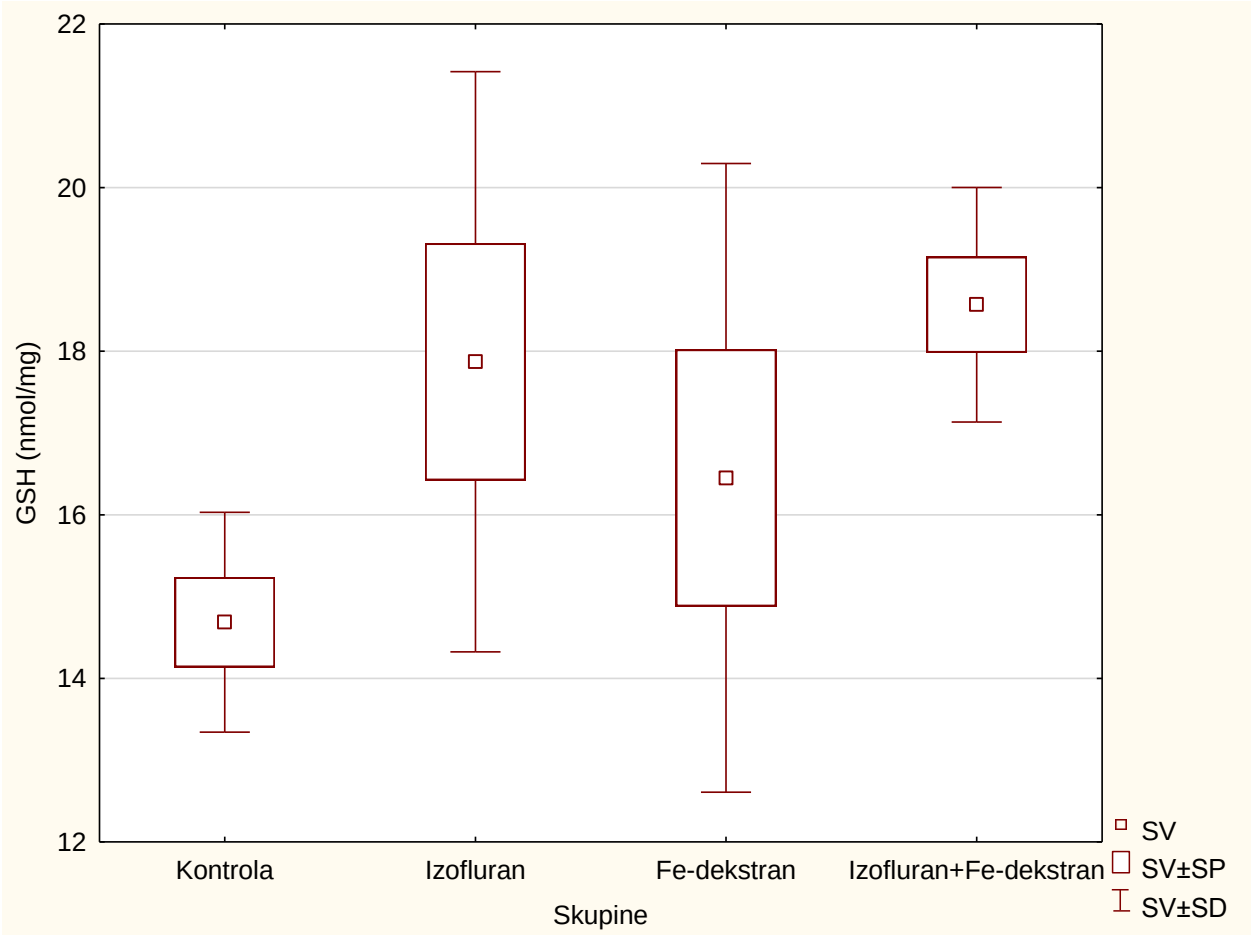
Rezultati mjerenja razine MDA u slezeni štakora (Slika 16) pokazuju statistički značajnu razliku između sljedećih skupina: kontrola *vs* Fe-dekstran ($P < 0,05$); izofluran *vs* Fe-dekstran ($P < 0,01$); izofluran *vs* izofluran + Fe-dekstran ($P < 0,05$).



Slika 16. Razina lipidne peroksidacije u uzorcima organa slezene štakora obrađenih izofluranom, Fe-dekstranom i kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana. Štakori (N=6) obrađeni su izofluranom (1,5%), Fe-dekstranom (50 mg/kg) ili kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana (2 h nakon *ip* injiciranja Fe-dekstrana, štakori su izloženi 1,5% izofluranu kroz 2 h) svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP (SD). Statistički značajno različito: Kontrola *vs* Fe-dekstran ($P < 0,05$); Izofluran *vs* Fe-dekstran ($P < 0,01$); Izofluran *vs* Izofluran + Fe-dekstran ($P < 0,05$). Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija, Fe-dekstran – željezo dekstran.

3.4.8. Razina ukupnog glutationa (GSH) u uzorcima organa slezene štakora

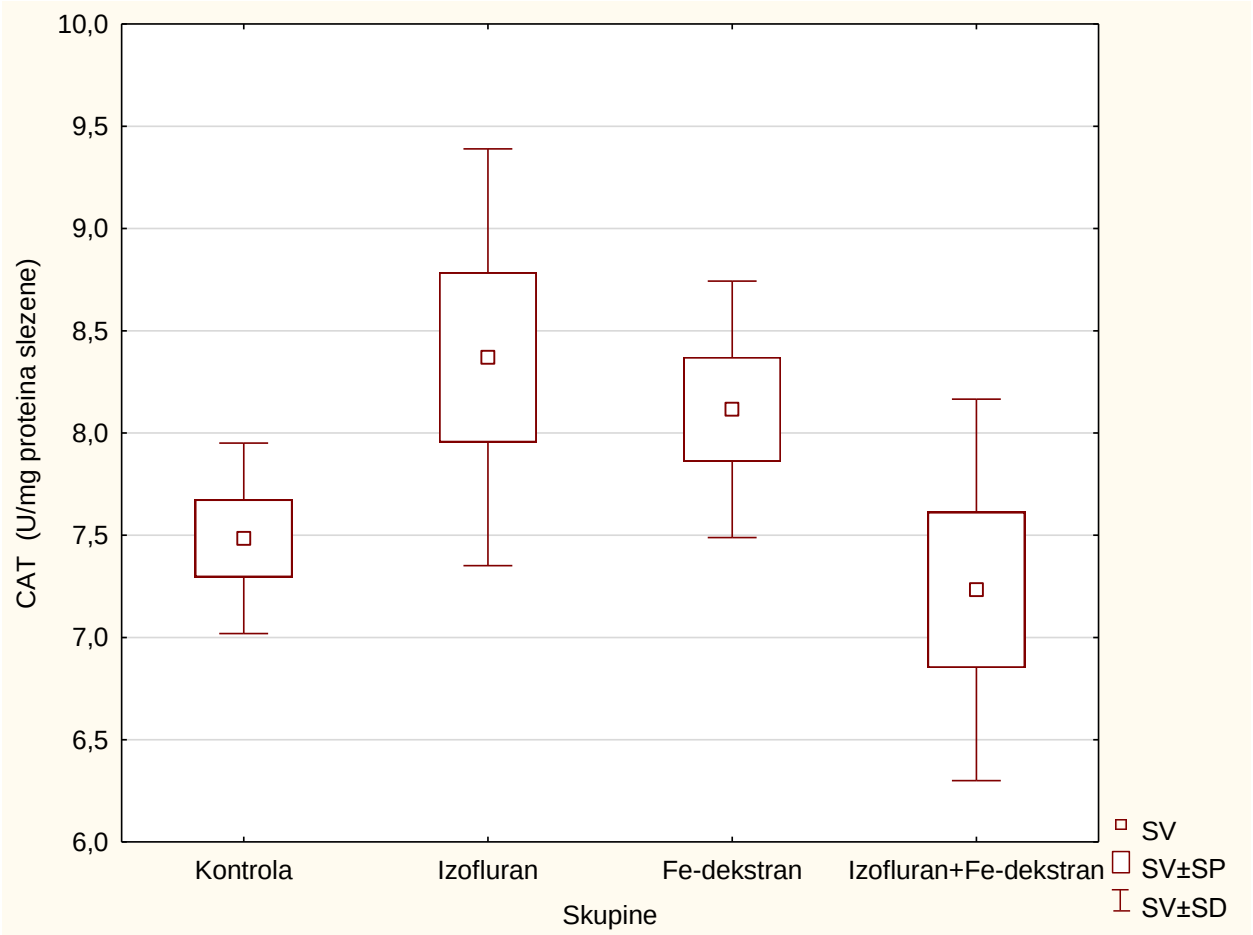
Mjerenja razine GSH u slezeni štakora (Slika 17) pokazuju odsutstvo statistički značajne razlike između svih skupina.



Slika 17. Razina ukupnog glutationa u uzorcima organa slezene štakora obrađenih izofluranom, Fe-dekstranom i kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana. Štakori (N=6) obrađeni su izofluranom (1,5%), Fe-dekstranom (50 mg/kg) ili kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana (2 h nakon *ip* injiciranja Fe-dekstrana, štakori su izloženi 1,5% izofluranu kroz 2 h) svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP (SD). Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija, Fe-dekstran – željezo dekstran.

3.4.9. Enzimska aktivnost katalaze (CAT) u uzorcima organa slezene štakora

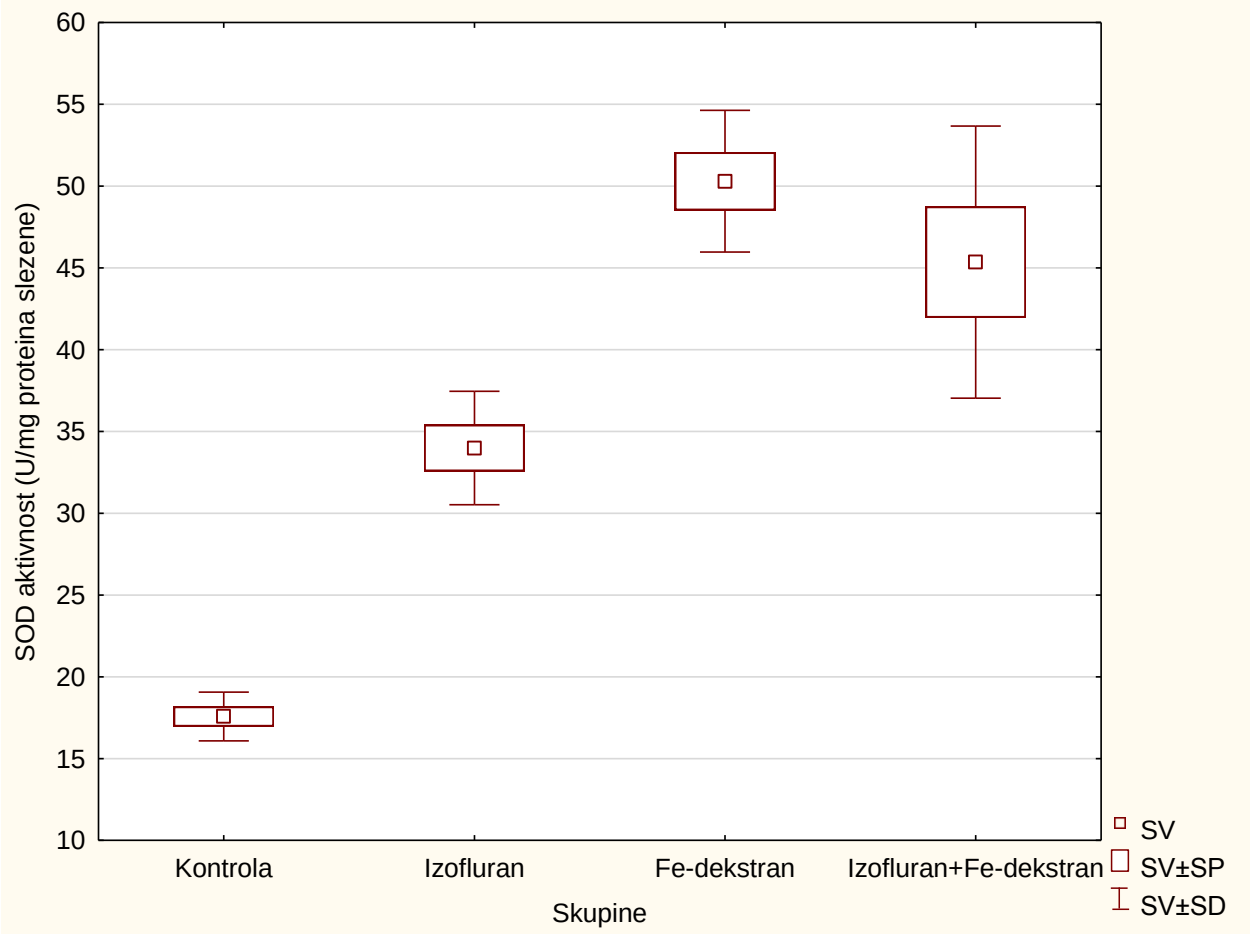
Rezultati mjerenja aktivnosti CAT u slezeni štakora (Slika 18) pokazuju odsutstvo statistički značajne razlike između svih skupina.



Slika 18. Enzimska aktivnost katalaze u uzorcima organa slezene štakora obrađenih izofluranom, Fe-dekstranom i kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana. Štakori (N=6) obrađeni su izofluranom (1,5%), Fe-dekstranom (50 mg/kg) ili kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana (2 h nakon *ip* injiciranja Fe-dekstrana, štakori su izloženi 1,5% izofluranu kroz 2 h) svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP (SD). Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija, Fe-dekstran – željezo dekstran.

3.4.10. Enzimska aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u uzorcima organa slezene štakora

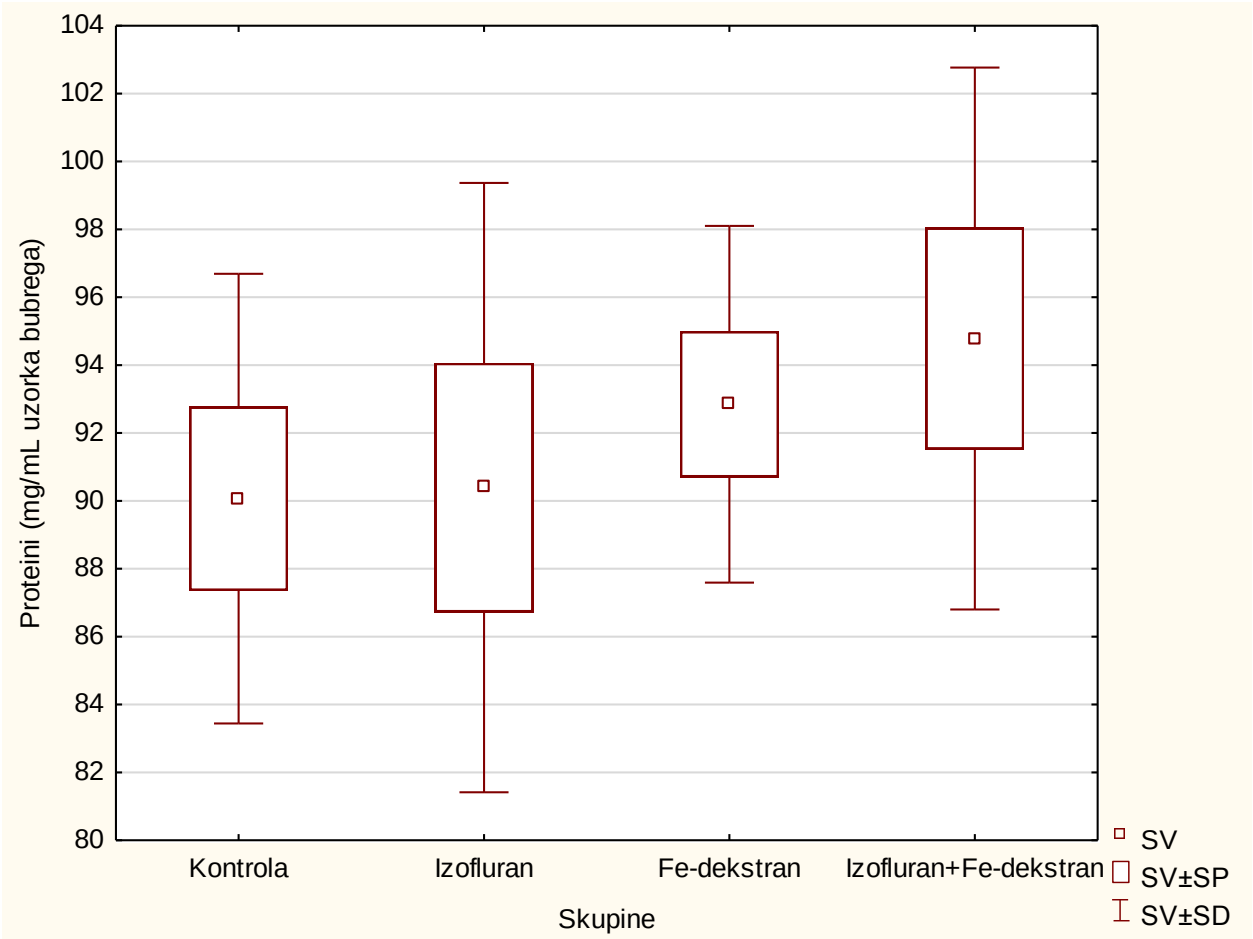
Rezultati mjerenja aktivnosti SOD u slezeni štakora (Slika 19) pokazuju statistički značajnu razliku između kontrolne skupine u odnosu na skupinu injiciranu s Fe-dekstranom ($P < 0,01$) i kontrolne skupine u odnosu na skupinu obrađenu kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana ($P < 0,01$).



Slika 19. Enzimska aktivnost superoksid dismutaze u uzorcima organa slezene štakora obrađenih izofluranom, Fe-dekstranom i kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana. Štakori (N=6) obrađeni su izofluranom (1,5%), Fe-dekstranom (50 mg/kg) ili kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana (2 h nakon *ip* injiciranja Fe-dekstrana, štakori su izloženi 1,5% izofluranu kroz 2 h) svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP (SD). Statistički značajno različito: Kontrola *vs* Fe-dekstran ($P < 0,01$); Kontrola *vs* Izofluran + Fe-dekstran ($P < 0,01$). Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija, Fe-dekstran – željezo dekstran.

3.4.11. Ukupni proteini u uzorcima organa bubrega štakora

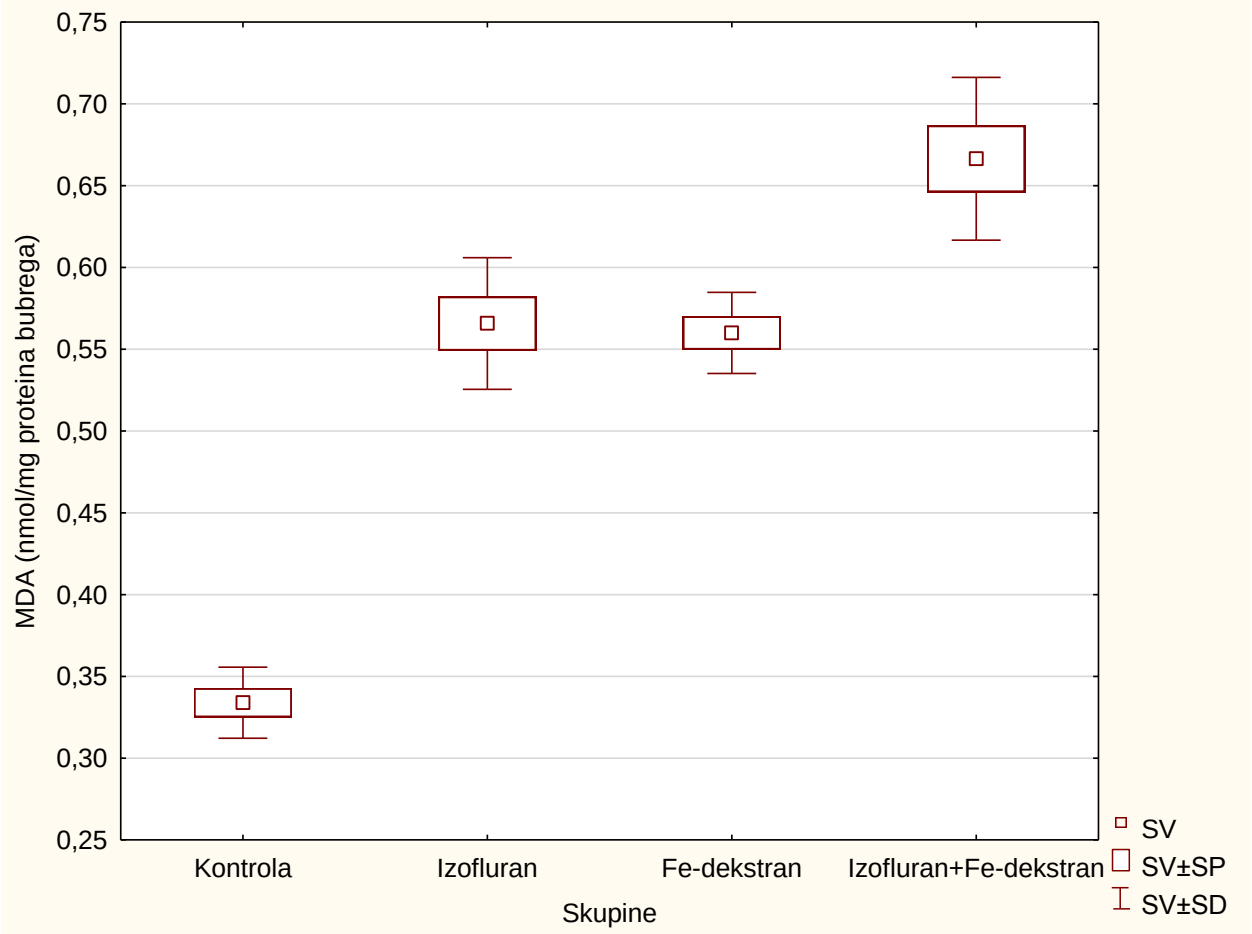
Rezultati mjerenja ukupnih proteina u bubregu štakora (Slika 20) pokazuju odsutstvo statistički značajne razlike između svih skupina.



Slika 20. Ukupna koncentracija proteina u uzorcima organa bubrega štakora obrađenih izofluranom, Fe-dekstranom i kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana. Štakori (N=6) obrađeni su izofluranom (1,5%), Fe-dekstranom (50 mg/kg) ili kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana (2 h nakon *ip* injiciranja Fe-dekstrana, štakori su izloženi 1,5% izofluranu kroz 2 h) svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP (SD). Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija, Fe-dekstran – željezo dekstran.

3.4.12. Razina lipidne peroksidacije (MDA) u uzorcima organa bubrega štakora

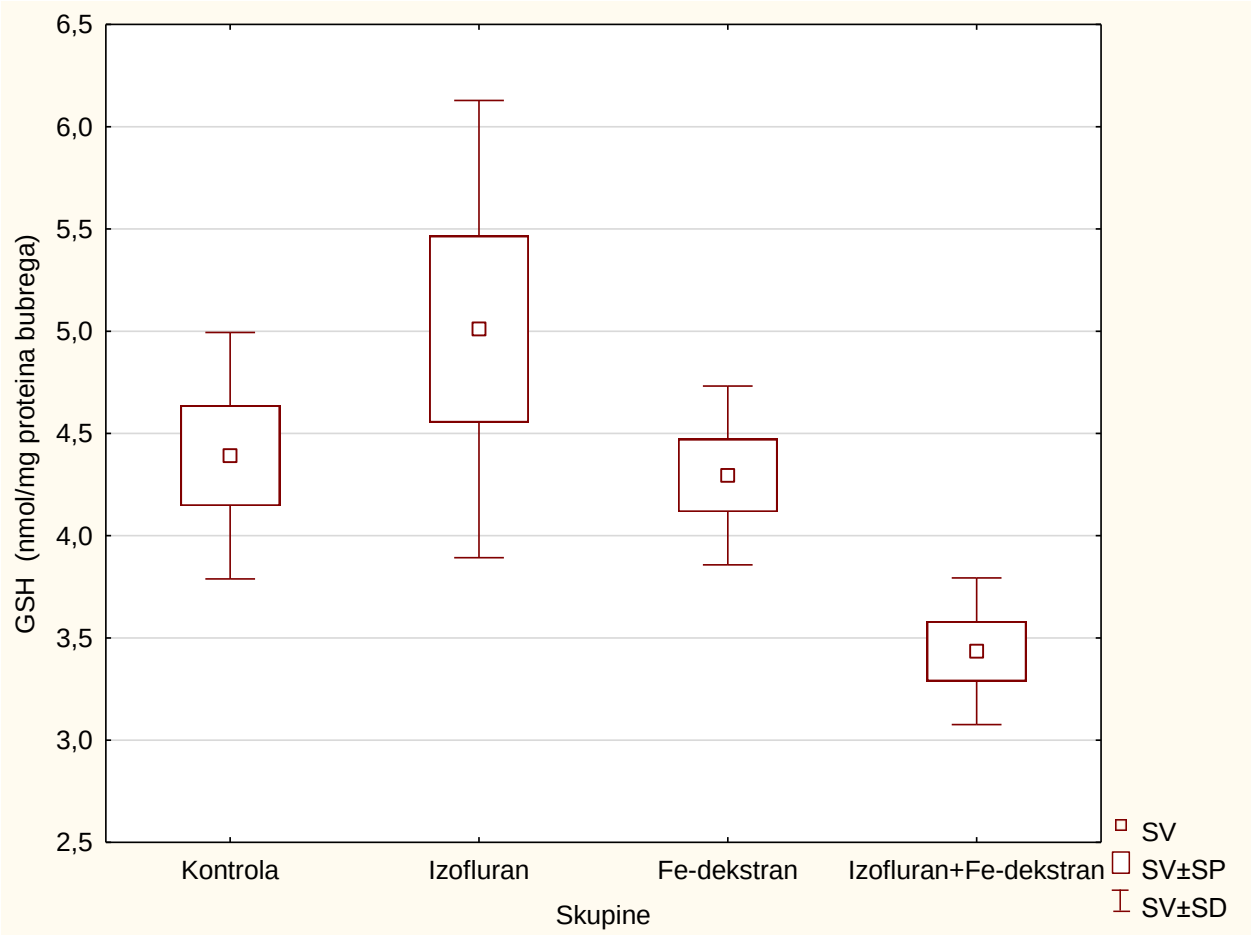
Rezultati mjerenja razine MDA u bubregu štakora (Slika 21) pokazuju statistički značajnu razliku između kontrolne skupine i skupine obrađene kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana ($P < 0,01$).



Slika 21. Razina lipidne peroksidacije u uzorcima organa bubrega štakora obrađenih izofluranom, Fe-dekstranom i kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana. Štakori (N=6) obrađeni su izofluranom (1,5%), Fe-dekstranom (50 mg/kg) ili kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana (2 h nakon *ip* injiciranja Fe-dekstrana, štakori su izloženi 1,5% izofluranu kroz 2 h) svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP (SD). Statistički značajno različito: Kontrola *vs* Izofluran + Fe-dekstran ($P < 0,01$). Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija, Fe-dekstran – željezo dekstran.

3.4.13. Razina ukupnog glutationa (GSH) u uzorcima organa bubrega štakora

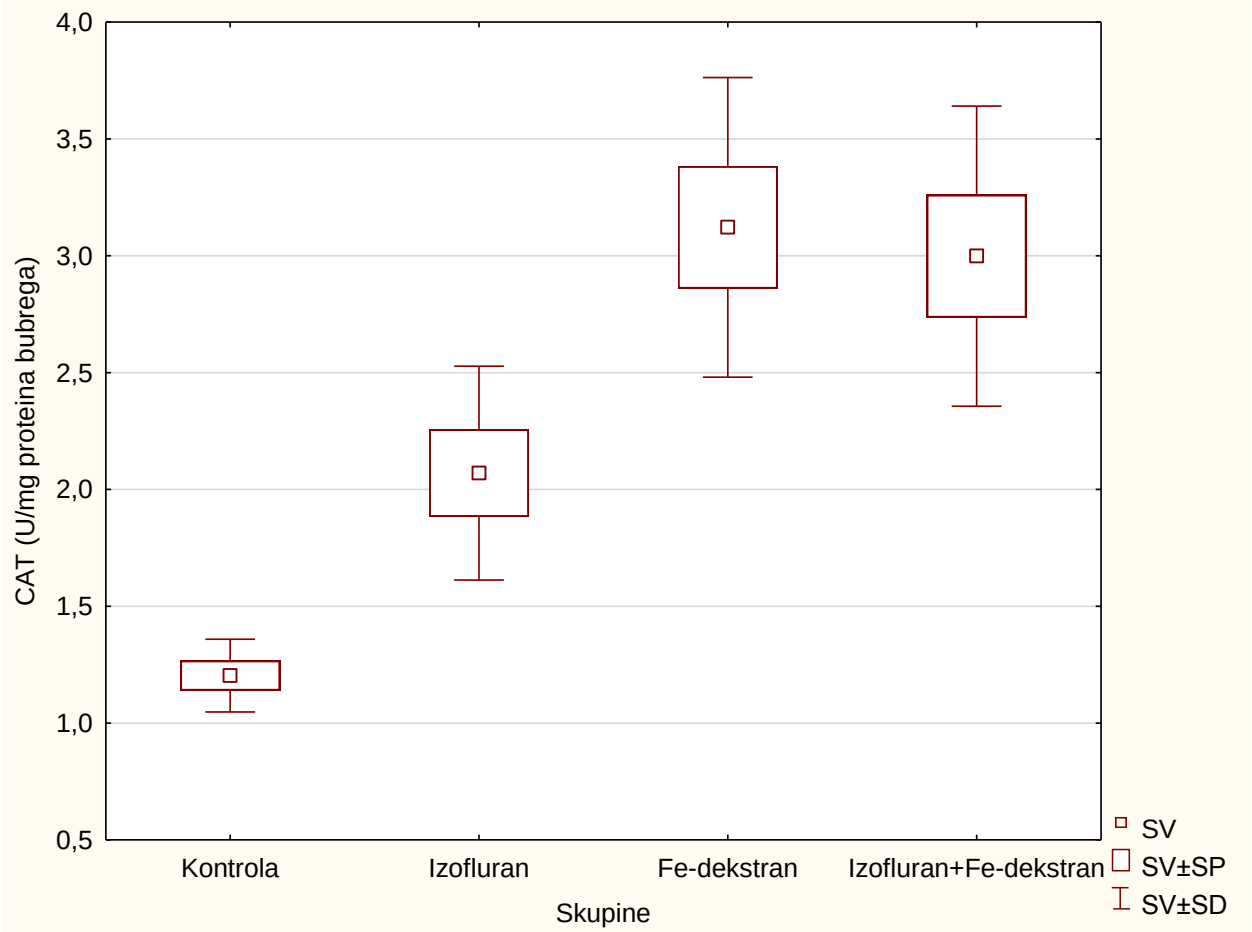
Mjerenjem razine GSH u bubregu štakora (Slika 22) dobiveni rezultati pokazuju statistički značajnu razliku između kontrolne skupine i skupine obrađene kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana ($P < 0,05$), te između skupine izložene izofluranu u odnosu na kombinaciju izoflurana i Fe-dekstrana ($P < 0,01$).



Slika 22. Razina ukupnog glutationa u uzorcima organa bubrega štakora obrađenih izofluranom, Fe-dekstranom i kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana. Štakori (N=6) obrađeni su izofluranom (1,5%), Fe-dekstranom (50 mg/kg) ili kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana (2 h nakon *ip* injiciranja Fe-dekstrana, štakori su izloženi 1,5% izofluranu kroz 2 h) svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP (SD). Statistički značajno različito: Kontrola *vs* Izofluran + Fe-dekstran ($P < 0,05$); Izofluran *vs* Izofluran + Fe-dekstran ($P < 0,01$). Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija, Fe-dekstran – željezo dekstran.

3.4.14. Enzimska aktivnost katalaze (CAT) u uzorcima organa bubrega štakora

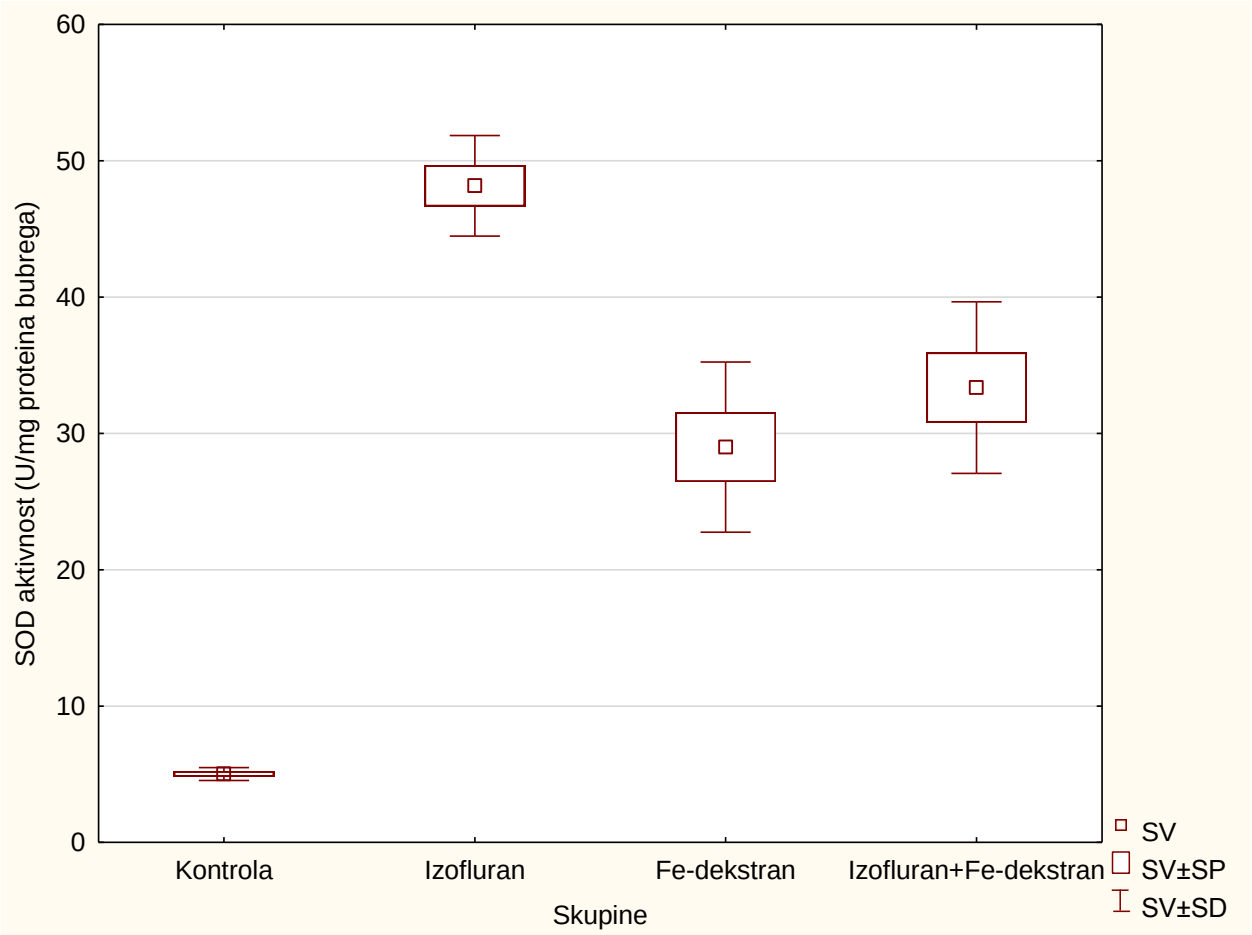
Rezultati mjerenja aktivnosti CAT u bubregu štakora (Slika 23) pokazuje statistički značajnu razliku između kontrolne skupine i skupine injicirane s Fe-dekstranom ($P < 0,01$), te između kontrolne skupine u odnosu na kombinaciju izoflurana i Fe-dekstrana ($P < 0,01$).



Slika 23. Enzimska aktivnost katalaze u uzorcima organa bubrega štakora obrađenih izofluranom, Fe-dekstranom i kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana. Štakori (N=6) obrađeni su izofluranom (1,5%), Fe-dekstranom (50 mg/kg) ili kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana (2 h nakon *ip* injiciranja Fe-dekstrana, štakori su izloženi 1,5% izofluranu kroz 2 h) svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP (SD). Statistički značajno različito: Kontrola *vs* Fe-dekstran ($P < 0,01$); Kontrola *vs* Izofluran + Fe-dekstran ($P < 0,01$). Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija, Fe-dekstran – željezo dekstran.

3.4.15. Enzimska aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u uzorcima organa bubrega štakora

Rezultati mjerenja aktivnosti SOD u bubregu štakora (Slika 24) pokazuju statistički značajnu razliku između sljedećih skupina: kontrola *vs* izofluran ($P < 0,01$); kontrola *vs* izofluran + Fe-dekstran ($P < 0,05$); izofluran *vs* Fe-dekstran ($P < 0,05$).



Slika 24. Enzimska aktivnost superoksid dismutaze u uzorcima organa bubrega štakora obrađenih izofluranom, Fe-dekstranom i kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana. Štakori (N=6) obrađeni su izofluranom (1,5%), Fe-dekstranom (50 mg/kg) ili kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana (2 h nakon *ip* injiciranja Fe-dekstrana, štakori su izloženi 1,5% izofluranu kroz 2 h) svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP (SD). Statistički značajno različito: Kontrola *vs* Izofluran ($P < 0,01$); Kontrola *vs* Izofluran + Fe-dekstran ($P < 0,05$); Izofluran *vs* Fe-dekstran ($P < 0,05$). Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija, Fe-dekstran – željezo dekstran.

3.5. Analiza biokemijskih parametara

Analiza biokemijskih parametara seruma iz krvi štakora pokazuje značajne razlike u koncentraciji enzima i proteina obrađenih skupina (Tablica 5) u odnosu na skupinu izloženu kombinaciji izoflurana i Fe-dekstrana, te razlike između kontrolne skupine i skupine izložene izofluranu u odnosu na skupinu injiciranu s Fe-dekstranom. Vrijednosti metabolita i supstrata (Tablica 6) pokazuju značajne promjene u skupinama izloženih izofluranu i kombinaciji izoflurana i Fe-dekstrana u odnosu na kontrolnu skupinu i skupinu injiciranu s Fe-dekstranom.

Tablica 5. Vrijednosti analize enzima i proteina u serumu štakora obrađenih izofluranom, Fe-dekstranom i kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana.

ANALIZA BIOKEMIJSKIH PARAMETARA – ENZIMI I PROTEINI (X ± SP)						
OBRADA	ALP (U/L)	ALT (U/L)	AMY (U/L)	ALB (g/L)	TP (g/L)	GLOB (g/L)
Kontrola	226,00 ± 4,38 *****	43,00 ± 0,73 ***•**	593,33 ± 21,12	54,33 ± 0,42	68,33 ± 0,84	13,33 ± 0,55
Izofluran	154,67 ± 4,42	41,33 ± 1,52	671,00 ± 0,97 ***/*•**	56,33 ± 0,76 *****	72,67 ± 1,11 *****	16,00 ± 0,97
Fe-dextran	164,33 ± 9,12	33,00 ± 2,03	538,67 ± 10,70	54,67 ± 0,42	72,33 ± 1,11 ******	17,33 ± 1,38
Izofluran + Fe-dextran	118,00 ± 7,96	37,67 ± 1,52	561,00 ± 28,21	50,33 ± 0,21	65,33 ± 0,92	15,00 ± 0,97

Štakori (N=6) obrađeni su izofluranom (1,5%), Fe-dekstranom (50 mg/kg) ili kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana (2 h nakon *ip* injiciranja Fe-dekstrana, štakori su izloženi 1,5% izofluranu kroz 2 h) svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP (SD).

***** Statistički značajno različito u usporedbi sa skupinom izloženom kombinaciji izoflurana i Fe-dekstrana (***** $P < 0,01$, ****** $P < 0,05$); Statistički značajno različito u usporedbi sa skupinom izloženom Fe-dekstranu (***•** $P < 0,01$). Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija, Fe-dekstran – željezo dekstran, ALP – alkalna fosfataza, ALT – alanin aminotransferaza, AMY – amilaza, ALB – albumin, TP – ukupni proteini, GLOB – globulin.

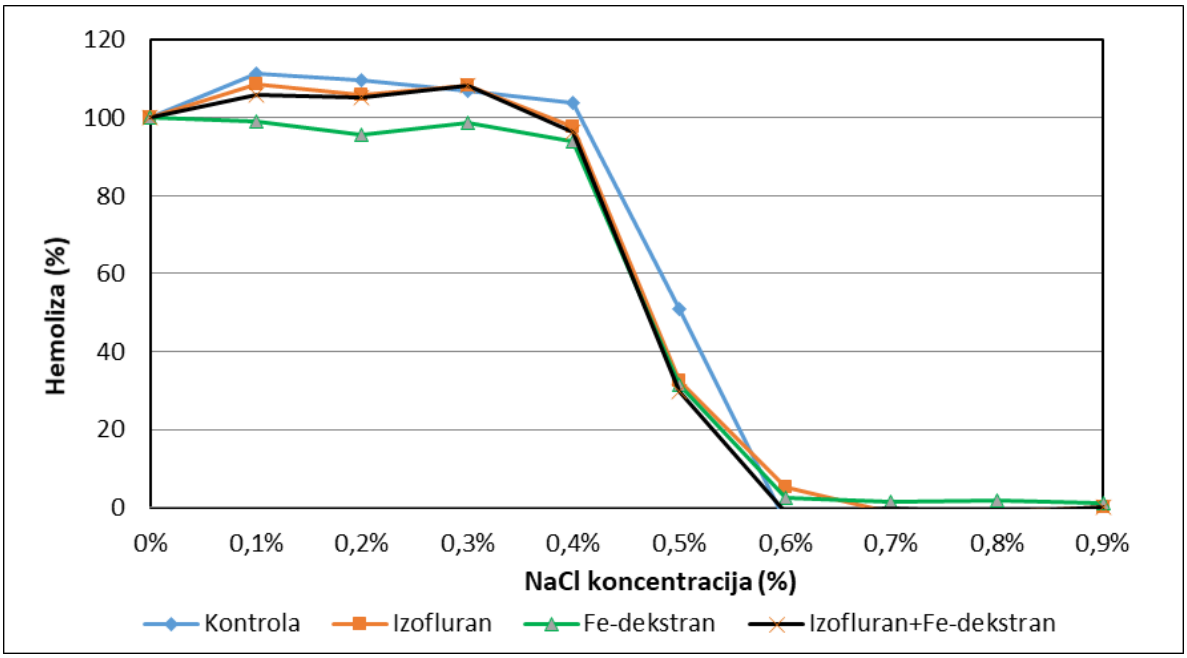
Tablica 6. Vrijednosti analize metabolita i supstrata u serumu štakora obrađenih izofluranom, Fe-dekstranom i kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana.

ANALIZA BIOKEMIJSKIH PARAMETARA – METABOLITI I SUPSTRATI (X ± SP)								
OBRADA	GLU (mmol/L)	TBIL (umol/L)	BUN (mmol/L)	PHOS (mmol/L)	CRE (umol/L)	Na^+ (mmol/L)	K^+ (mmol/L)	Ca^{2+} (mmol/L)
Kontrola	15,4 ± 0,27 *****	4,67 ± 0,21	7,03 ± 0,27 ******	2,75 ± 0,03 ***•**	38,00 ± 3,52	138,33 ± 1,72	5,77 ± 0,13	2,59± 0,03 ***•**
Izofluran	16,17 ± 0,39	4,67 ± 0,21	6,1 ± 0,33	2,11 ± 0,15	38,67 ± 4,00	139,67 ± 0,76	6,67 ± 0,35	2,46 ± 0,01
Fe-dextran	14,97 ± 0,44 *****	5,00 ± 0,00	6,07 ± 0,43	2,34 ± 0,14	33,33 ± 4,97	136,33 ± 0,76	4,8±0,1 ***/*•**	2,56 ± 0,04
Izofluran + Fe-dextran	19,37 ± 0,31	5,00 ± 0,00	5,33 ± 0,33	2,53 ± 0,08	40,33 ± 2,08	136,67 ± 0,56	6,33 ± 0,02	2,53 ± 0,02

Štakori (N=6) obrađeni su izofluranom (1,5%), Fe-dekstranom (50 mg/kg) ili kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana (2 h nakon *ip* injiciranja Fe-dekstrana, štakori su izloženi 1,5% izofluranu kroz 2 h) svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP (SD).
***** Statistički značajno različito u usporedbi sa skupinom izloženom kombinaciji izoflurana i Fe-dekstrana (***** $P < 0,01$, ****** $P < 0,05$); Statistički značajno različito u usporedbi sa skupinom izloženom izofluranu (***•** $P < 0,01$). Kratice: SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška, SD – standardna devijacija, Fe-dekstran – željezo dekstran, GLU – glukoza, TBIL – ukupni bilirubin, BUN – dušik uree u krvi, PHOS – fosfati, CRE – kreatinin.

3.6. Osmotska fragilnost eritrocita

Analiza rezultata hemolize eritrocita (Slika 25) pokazuje pojavu 100%-tne hemolize eritrocita kod svih skupina pri koncentraciji NaCl 0,1%. U kontrolnoj je skupini do 50%-tne hemolize eritrocita došlo pri koncentraciji NaCl 0,5%, međutim kod ostalih je skupina uočeno malo odstupanje, te je 50%-tna hemoliza nastupila pri nešto manjoj koncentraciji NaCl.



Slika 25. Analiza % hemolize eritrocita štakora obrađenih izofluranom, Fe-dekstranom i kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana. Štakori (N=6) obrađeni su izofluranom (1,5%), Fe-dekstranom (50 mg/kg) ili kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana (2 h nakon *ip* injiciranja Fe-dekstrana, štakori su izloženi 1,5% izofluranu kroz 2 h) svaki drugi dan tijekom 28 dana. Dobiveni rezultati prikazani su kao SV ± SP (SD). Kratica: Fe-dekstran – željezo dekstran.

4. RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je istražiti učinak primjene anestetika izoflurana i Fe-dekstrana samog i/ili združenog na oksidacijsko-redukcijske promjene, upalu i toksičnost u stanicama jetre, slezene i bubrega. Učinak je istražen mjerenjem odrednica oksidacijskog stresa i upale, te procjene toksičnosti pomoću hemolize eritrocita. Oksidacijsko-redukcijske promjene pratili smo mjerenjem: a) razine malondialdehida, krajnjeg produkta lipidne peroksidacije; b) glutationa kao staničnog neenzimskog antioksidansa; c) aktivnosti superoksid dismutaze, metaloenzima koji katalizira redukciju i oksidaciju superoksidnog aniona u molekularni kisik i vodikov peroksid; te d) aktivnosti enzima katalaze, ključne u razgradnji vodikovog peroksida na kisik i vodu. Upalne promjene pratili smo mjerenjem: a) relativne težine organa jetre, slezene i bubrega u odnosu na kontrolnu skupinu; b) analizom promjena biokemijskih odrednica krvi mjerenjem alanin aminotransferaze (ALT), albumina (ALB), alkalne fosfataze (ALP), amilaze (AMY), dušik uree u krvi (BUN), kreatinina (CRE), glukoze u krvi, ukupnih bilirubina (TBIL), ukupnih proteina (TP) i globulina (GLOB), te promjene razine važnih elektrolita kao što je natrij, fosfor, kalcij i kalij. Eritrocite, stanice posebice osjetljive na oksidacijska oštećenja, upotrijebili smo za procjenu toksičnosti anestetika i željezo dekstrana. Eritrociti su pogodan model za procjenu oksidacijskih oštećenja, budući da djeluju kao nosioci kisika, nemaju sposobnost samoobnavljanja, eritrocitna membrana podložna je peroksidaciji lipida, dok je hemoglobin sklon autooksidaciji. Osjetljivost eritrocita na peroksidaciju lipida povezana je s nazočnošću visokog sadržaja polinezasićenih masnih kiselina u membrani eritrocita te stalnoj izloženosti stanica kisiku uz nazočnost reaktivnog željeza u hemoglobinu što posljedično vodi stvaranju slobodnih radikala i slabljenju antioksidativne obrane eritrocita, te gubitka cjelovitosti eritrocitne membrane.

Naši rezultati analize relativnog indeksa težine jetre (Slika 7) pokazali su povećanu težinu jetre u skupini obrađenoj Fe-dekstranom u odnosu na težinu jetre u skupini obrađenoj izofluranom ($P < 0,01$), te u odnosu na skupinu obrađenu kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana ($P < 0,05$).

Analiza relativnog indeksa težine slezene (Slika 8) ukazala je na smanjenu težinu u skupini izloženoj izofluranu u odnosu na težinu slezene u skupini izloženoj Fe-dekstranu ($P < 0,05$) te u odnosu na kombinaciju izoflurana i Fe-dekstrana ($P < 0,05$). Relativni indeks težine bubrega (Slika 9) pokazao je smanjenjenu težinu u skupini izloženoj izofluranu u odnosu na težinu u skupini izloženenoj Fe-dekstranu; rezultati ukazuju na statistički značajnu razliku od

$P < 0,01$. Nadalje, smanjena težina bubrega vidljiva je i u skupini izloženoj kombinaciji izoflurana i Fe-dekstrana u odnosu na obradu Fe-dekstranom.

Moguće objašnjenje smanjenje težine organa jetre i slezene, u slučaju izlaganja izofluranu, jest njihovo oštećenje te pojavnost nekroze i apoptoze stanica u navedenim tkivima kako sugerira Zhu i sur. (2017), dok je kod bubrega nejasno zašto je došlo do smanjenja težine jer izofluran sprječava oštećenja bubrežnih tubula, što se očituje smanjenjem otpuštanja laktat dehidrogenaze i održavanjem koncentracije ATP-a, te inhibira apoptozu u bubrežnoj moždini smanjujući ekspresiju 85 do 96 gena povezanih s apoptozom (Aravindan i sur., 2006). Međutim, smatramo da dugotrajno izlaganje izofluranu može dovesti do nastanka imunokompleksa, te prouzročiti oštećenje bubrega kroz nakupljanje upalnih stanica, posebice makrofaga i neutrofila koji su uključeni u fagocitozu takvih imunokompleksa kroz porast potrošnje kisika, te pojavnost "oksidacijskog, respiracijskog ili metaboličkog praska". Ovi oksidacijski mehanizmi mogu biti odgovorni za oštećenja bubrega na što ukazuju rezultati povećane razine MDA i glutationa (Slika 16 i 17). Potvrdu navedenog trebalo bi dokazati histološkom analizom.

Povećanje težine svih organa uslijed izlaganja Fe-dekstranu može se objasniti njihovom dobrom prokrvljenošću, tj. tijekom prekomjernog izlaganja željezu, jetra povećava skladištenje željeza kako bi zaštitila ostala tkiva od oštećenja (Easo i Mohanan, 2016). Drugo objašnjenje moglo bi se temeljiti na povećanoj razini ROS-a i oksidacijskog stresa koja dovodi do oštećenja brojnih stanica uključujući eritrocite koje hvataju makrofagi jetre (Kupferove stanice) kao i makrofagi slezene vodeći njihovoj razgradnji te ponovnom iskorištenju aminokiselina i Fe u sintezi hema i molekule hemoglobina. Nadalje, jetra koristi aminokiseline kao gradivni materijal za sintezu vlastitih proteina i proteina plazme, koji imaju različite vitalne funkcije u organizmu. Svakako treba istaknuti njenu ulogu u pojačanoj sintezi proteina plazme povezanih s upalom te sintezi prijenosnih proteina, primjerice transferina, haptoglobina, ceruloplazmina zaduženih za prijenos željeza, bakra, te nekih drugih tvari unutar organizma.

Rezultati analize ukupnih proteina u uzorcima organa jetre (Slika 10) pokazali su statistički značajan porast koncentracije proteina u skupini obrađenoj Fe-dekstranom u odnosu na kontrolnu skupinu ($P < 0,05$). Uočen je pad koncentracije proteina u skupini obrađenoj izofluranom u odnosu na skupinu obrađenu Fe-dekstranom sa statistički značajnom razlikom ($P < 0,01$). Slični podaci u smanjenoj koncentraciji proteina jetre vidljivi su između skupine obrađene izofluranom u odnosu na kombinaciju izoflurana i Fe-dekstrana ($P < 0,05$). Razlozi smanjenja koncentracije proteina u skupini obrađenoj izofluranom mogu biti nekroza i

apoptoza stanica jetre što posljedično vodi smanjenoj sintezi inzulinu sličnog čimbenika rasta 1 (IGF-1, engl. *Insulin-like growth factor*) čija je uloga zaštita jetre (Zhu i sur., 2017). Međutim, proces biotransformacije brojnih spojeva, uključujući toksine odvija se najviše u jetri što izaziva dodatne posljedice na jetri. Tijekom samog procesa biotransformacije u većini slučajeva nastaju toksični metaboliti, najčešće slobodni radikali (O_2^{-}, HOO^{-}) koji su izuzetno reaktivni i brzo uzrokuju peroksidaciju lipida, najčešće lipida stanične membrane, što uzrokuje oštećenje i odumiranje jetrenih stanica.

MDA je jedan od proizvoda lančane reakcije slobodnih radikala i lipidne peroksidacije, te promjene u razini MDA tkiva pokazatelj su oksidacije polinezasićenih masnih kiselina stanične membrane, te se promjene u oksidacijsko-redukcijskim procesima procijenjuje pomoću koncentracije MDA, GSH te aktivnosti SOD i CAT (Quin i sur., 2014). Visoko kompleksan antioksidacijski obrambeni sustav sastoji se od brojnih enzima kao što su SOD, CAT i GPx, te endogenih i prehrambenih antioksidacijskih spojeva, međutim neravnoteža između stvaranja ROS-a i antioksidacijskog kapaciteta vodi pojavnosti oksidacijskog stresa (Lim i Vaziri, 2004a). SOD ubrzava konverziju superoksida u H_2O_2, dok CAT i GPx pretvaraju H_2O_2 u vodu (Finkel i Holbrook, 2000).

Lipidna peroksidacija, važan biljeg oksidacijskog stresa, javlja se u biološkim membranama u kojima dolazi do gubitka fluidnosti, opadanja vrijednosti membranskoga potencijala, povećanja permeabilnosti prema H^{+} i drugim ionima, oštećenja stanice i otpuštanja njenog sadržaja. Brojni patološki poremećaji posljedica su lipidne peroksidacije nastale inaktivacijom ili manjkom antioksidacijskih mehanizama, otpuštanjem metalnih iona (npr. željeza) iz mjesta skladištenja, te metaloproteina koji su hidrolizirani enzimima otpuštenih iz oštećenih lizosoma (Štefan i sur., 2007).

Rezultati analize razine lipidne peroksidacije jetre (Slika 11) ukazuju da izofluran izaziva oksidacijske promjene u stanicama jetre i vodi njihovom brzom propadanju na što ukazuje smanjena razina proteina, povećana razina glutationa, SOD i CAT aktivnosti (Slike 10-14). Ovi podaci su u sukladu s podacima Wei i sur. (2005) koji su pokazali da izofluran inhibira sintezu proteina, te inducira citotoksičnost u ljudskim i štakorskim hepatocitima, te apoptozu kod humanih limfocita kroz smanjenje omjera Bcl-2/Bax proteina ključnih za apoptozu.

Fe-dekstran u stanicama jetre vodi povećanju MDA i izrazitom smanjenju razine glutationa dok izofluran u kombinaciji s Fe-dekstranom vodi zaštitnom učinku; vidljiva je smanjena razina MDA i povećanje razine GSH. Smanjena aktivnost SOD i CAT u skupini obrađenoj izofluranom u kombinaciji s Fe-dekstranom je rezultat prilagodbe na okolišne

uvjete. Aktivnosti katalaze u stanicama jetre (Slika 13) u skupini obrađenoj kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana statistički je značajno manja u odnosu na kontrolnu skupinu ($P < 0,05$) i skupinu izloženu izofluranu ($P < 0,05$).

SOD je jedan od najvažnijih antioksidanasa koji uklanja ROS i štiti mitohondrije od oštećenja uzrokovanih potencijalno citotoksičnim reakcijama (Quin i sur., 2014), te predstavlja primarnu antioksidacijsku obranu (Remya i sur., 2016). Građen je kao heterodimer koji u svojem središtu sadrži molekulu mangana. Točnije, SOD je metaloenzim te zahtijeva metalni kofaktor za svoju aktivnost, primjerice željezo (Fe), cink (Zn), bakar (Cu) i mangan (Mn). Temeljem navedenog razlikujemo tri SOD oblika: (1) Fe-SOD, koji se obično nalazi u prokariotima i kloroplastima nekih biljaka, (2) Cu/Zn-SOD prevladava u eukariotima i raspodijeljen je u osnovi u citosolu, ali se također nalazi u kloroplastima i peroksisomima, te (3) Mn-SOD prisutan u prokariotima i mitohondrijima eukariota (Ighodaro i Akinloye, 2017). Katalaza je enzim, tetramer koji sadrži četiri iste podjedinice, a svaka od njih posjeduje hem skupinu i nikotinamid adenin dinukleotid (NADPH, engl. *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*), te u svom središtu ima molekulu željeza, a glavna uloga joj je kataliza reakcije H_2O_2 u vodu i molekularni kisik.

Iz rezultata mjerenja enzimske aktivnosti SOD u stanicama jetre (Slika 14) uočljiv je pad enzimske aktivnosti u skupini izloženoj kombinaciji izoflurana i Fe-dekstrana u odnosu na porast enzimske aktivnosti u skupini izloženoj izofluranu, te između njih postoji statistički značajna razlika ($P < 0,01$). Također je vidljiv i blagi pad enzimske aktivnosti u skupini izloženoj Fe-dekstranu u odnosu na kontrolnu skupinu. Pad SOD u slučaju kombinacije izoflurana i Fe-dekstrana, te Fe-dektrana moguć je zbog toksičnog djelovanja željeza, dok je za porast aktivnosti kod izoflurana zaslužna zaštitnička uloga anestetika na tkivo jetre.

Tioli su organski spojevi, sumporni analogni alkoholi, čije redoks stanje ima ulogu u kontroli apoptoze, a GSH, kao jedan od tiola, kontrolira redoks regulirane signalne putove, te njegova razina korelira s osjetljivosti stanica na apoptozu (Kehrer, 2000). Glutation je glavni antioksidans u stanici koji pruža otpor oksidacijskom stresu neutralizirajući ROS i druge slobodne radikale i u zdravih se stanica više od 90% ukupnog glutationa nalazi u sulfhidrilnom obliku (GSH), a 10% u disulfidnom obliku (GSSG), te se povećanje omjera GSSG prema GSH smatra pokazateljem toksičnosti oksidacijskog stresa (Remya i sur., 2016).

Prema rezultatima ukupne koncentracije GSH jetre (Slika 12) vidljivo je povećanje koncentracije GSH kod skupine izložene izofluranu u odnosu na skupinu izloženu Fe-dekstranu i skupinu izloženu kombinaciji izoflurana i Fe-dekstrana. Statistički značajna razlika postoji između kontrolne skupine u odnosu na skupinu izloženu Fe-dekstranu ($P <$

0,05), te skupine izložene izofluranu u odnosu na skupinu izloženu Fe-dekstranu ($P < 0,01$) i u odnosu na skupinu obrađenu kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana ($P < 0,05$).

Porast GSH nakon izlaganja izofluranu može se objasniti obranom od oksidativnog stresa i ROS-a, njegovim zaštitničkim djelovanjem na tkivo jetre (Karadža i sur., 2004), te protutumorskim i antioksidacijskim djelovanjem (Lee i sur., 2015). Pad GSH pod djelovanjem Fe-dekstrana moguć je zbog njegovog nakupljanja i preopterećenjem jetre, te težom redukcijom H_2O_2 (Lim i Vaziri, 2004a, Easo i Mohanan, 2016).

Prema rezultatima mjerenja ukupnih proteina slezene (Slika 15) vidljiva je snižena koncentracija proteina u skupini izloženoj Fe-dekstranu u odnosu na sve ostale skupine; statistički značajna razlika vidljiva je između Fe-dekstrana i skupine izložene kombinaciji izoflurana i Fe-dekstrana ($P < 0,05$). Smanjena koncentracija proteina znak je njihove lize proteolitičkim enzimima te oslobađanja slobodnog željeza iz veznih proteina (Lim i Vaziri, 2004a) što vodi povećanju oksidacijskog stresa u nazočnosti metala i do tisuću puta.

U odnosu na kontrolnu skupinu, mjerenja razine MDA slezene (Slika 16), pokazala su pad razine u skupini obrađenoj Fe-dekstranom i skupini obrađenoj kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana, te blagi porast u skupini obrađenoj izofluranom. Do statistički značajne razlike došlo je između kontrolne skupine u odnosu na skupinu obrađenu Fe-dekstranom ($P < 0,05$), skupine obrađene izofluranom u odnosu na skupinu obrađenu Fe-dekstranom ($P < 0,01$), te između skupine obrađene izofluranom u odnosu na skupinu obrađenu kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana ($P < 0,05$). Blagi porast razine MDA u skupini izloženoj izofluranom može ukazivati na smanjenu fluidnost membrane i oštećenje normalne membranske strukture mitohondrija (Quin i sur., 2014). Pad razine MDA u slučaju Fe-dekstrana nije u potpunosti u sukladu s prethodnim istraživanjem (Halliwell, 1992) u kojem željezni ioni pridonose peroksidaciji lipida stimulirajući peroksidaciju reakcijom s lipidnim hidroperoksidima, razgrađujući ih peroksilnim i alkoksilnim radikalima koji mogu izdvojiti H^+, te dovesti do daljnje peroksidacije. Međutim, Remya i sur. (2016) pokazali su smanjenu koncentraciju MDA koja se poklapa s dobivenim rezultatima. Sažimajući sve dobivene rezultate vezane s biljezima oksidacijskog stresa i s obzirom na dugotrajno izlaganje Fe-dekstranu, može se izvesti zaključak da je povećani oksidacijski stres doveo do propadanja osjetljivih stanica i sačuvao stanice otpornije na oksidacijski stres; točnije sačuvane su stanice s većom sposobnošću stvaranja GSH, te pojačane sinteze enzima CAT i SOD (Slike 16-19). Povećana aktivnost SOD ukazuje na brzo i rano povećanje razine superoksid aniona (Easo i Mohanan, 2016), te ulogu SOD enzima da u nazočnosti povećane razine ROS-a djeluju kao primarna antioksidacijska obrana od oksidacijskog stresa. SOD neutralizira superoksidni

radikal pretvarajući ga u H_2O_2 koji je manje reaktivan. Iz rezultata aktivnosti SOD u slezeni (Slika 19) vidljiva je statistički značajna razlika između kontrolne skupine u odnosu na skupinu obrađenu Fe-dekstranom ($P < 0,01$), te između kontrolne skupine i skupine obrađene kombinacijom izoflurana i Fe-dekstrana ($P < 0,01$). Nadalje, dobiveni rezultati jasno ukazuju na kooperativnost aktivnosti CAT i GSH u rješavanju visokih koncentracija H_2O_2, jer oboje kataliziraju istu redukcijsku reakciju, te se CAT s niskim afinitetom za H_2O_2 novači pri visokim koncentracijama, a GSH s većim afinitetom djeluje pri niskim koncentracijama (Easo i Mohanan, 2016).

Mjerenje ukupnih proteina bubrega (Slika 20) pokazalo je podjednake vrijednosti koncentracije proteina kod svih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu bez statistički značajnih razlika između skupina. Razlog podjednake vrijednosti u slučaju izoflurana može se objasniti njegovim pozitivnim djelovanjem na stimulaciju fosforilacije signalnih proteina i aktivaciju Akt signalnog puta koji potiče preživljavanje stanica inducirajući proizvodnju raznih antiapoptotičkih proteina (Aravindan i sur., 2006).

Mjerenjem razine MDA bubrega (Slika 21) uočen je porast razine MDA u svim skupinama u odnosu na kontrolnu skupinu; statistički značajna razlika MDA utvrđena je između kontrolne skupine u odnosu na skupinu izloženu kombinaciji izoflurana i Fe-dekstrana ($P < 0,01$). Povećanu razinu MDA prati snižena razina GSH ($P < 0,05$), te povećanje SOD ($P < 0,05$) i CAT aktivnosti ($P < 0,01$) (Slike 22-24). Temeljem navedenog, upala i utjecaj ROS-a dovode do povećanja lipidne peroksidacije i povećane proizvodnje MDA, toksičnog produkta koji djeluje kao biljeg oksidacijskog stresa u skupini izloženoj kombinaciji izoflurana i Fe-dekstrana, dok je koncentracija GSH usko povezana sa stupnjem zatajenja bubrega zbog povećanja ROS-a i oksidacijskog stresa (Toblii i sur., 2010). U slučaju porasta GSH pod djelovanjem izoflurana, moguće objašnjenje je pokušaj uklanjanja ROS-ova nastalih kao nusprodukt oksidacijskog stresa (Turkan i sur., 2004).

Povećana enzimska aktivnost katalaze (Slika 23) i superoksid dismutaze bubrega (Slika 24) vidljiva je kod svih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu. Povećane ativnosti oba enzima mogu se objasniti njihovim antioksidacijskim djelovanjem i uklanjanjem ROS-a (Türkan i sur., 2014), te je općenito uočeno nakon izlaganja izofluranu blago povećanje antioksidacijskog kapapciteta u plazmi (Brozović i sur., 2017).

Analizom biokemijskih parametara, iz seruma štakora, dobivene su statistički značajne razlike u koncentracijama enzima i proteina (Tablica 5), te metabolita i supstrata (Tablica 6). Obrada izofluranom pokazala je statistički značajnu razliku u slučaju AMY ($P < 0,01$), ALB ($P < 0,01$) i TP ($P < 0,01$) u odnosu na skupinu izloženu kombinaciji izoflurana i Fe-

dekstrana, AMY ($P < 0,01$) i K^+ ($P < 0,01$) u odnosu na skupinu izloženu samo Fe-dekstranu, te u slučaju PHOS ($P < 0,01$) i Ca^{2+} ($P < 0,01$) u odnosu na kontrolnu skupinu. Obrada Fe-dekstranom pokazala je statistički značajnu razliku kod ALT ($P < 0,01$) u odnosu na kontrolnu skupinu, te kod TP ($P < 0,05$), GLU ($P < 0,01$) i K^+ ($P < 0,01$) u odnosu na skupinu izloženu kombinaciji izoflurana i Fe-dekstrana. Kombinacija izoflurana i Fe-dekstrana pokazala je statistički značajnu razliku pri ALP ($P < 0,01$), GLU ($P < 0,01$) i BUN ($P < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu. Statistički značajna razlika nije zamijećena u razinama globulina, ukupnog bilirubina, kreatinina i koncentracije Na^+. Ipak, razina globulina je povećana kod svih obrađenih skupina u odnosu na kontrolu što ukazuje na pojačanu sintezu globulina koji služe kao prijenosnici brojnih molekula nastalih kao posljedica različitih metaboličkih procesa, posebice: α_1 globulina, služe u prijenosu masti, lipida, vitamina A, D, E, K, B_{12}, tiroksina, kortizola, bilirubina; α_2 globulina, sudjeluju u prijenosu lipida, triglicerida, bakra, hemoglobina; β globulina, u prijenosu hema, željeza, vitamina, hormona, kolesterola, glicerida; te γ globulina čija je sinteza najveća, a sudjeluju u nastanku imunokompleksa s oštećenim proteinima i drugim promijenjenim sastavnicama oštećenih stanica. Promjene u AMY, ALB, TP, PHOS i K^+ kod izoflurana mogu se objasniti njegovim nepovoljnim djelovanjem na proučavane organe, a posebice na jetru (Brozović i sur., 2011). Fe-dekstran je uzrokovao promjene u slučaju ALT, TP, GLU i K^+ čime se može potvrditi djelovanje toksične koncentracije željeza u krvi (Juluri i sur., 2013). Do promjena je došlo kod ravnoteže i na K^+ u slučaju izoflurana i Fe-dekstrana, što ukazuje na pojačana oštećenja staničnih membrana te pretjerani izlazak iona K^+ koji je sastavni dio unutarstanične tekućine i nazočan u stanicama u daleko većem % u odnosu na međustaničnu tekućinu i plazmu (77% : 2,5% : 3%).

Rezultati mjerenja osmotske fragilnosti eritrocita i pojave hemolize (Slika 25) pokazali su zanemariv postotak hemolize pri koncentraciji 0,7% NaCl, međutim do značajne je hemolize došlo pri 0,5% NaCl u kontrolnoj skupini. U odnosu na kontrolu, 50%-tna hemoliza ostalih skupina nastupila je pri nešto manjoj koncentraciji od 0,5% NaCl. Čini se da su izofluran i Fe-dekstran uzrok povećanom oksidacijskom stresu što je dovelo do povećane osjetljivosti eritrocitnih stanica te bržeg propadanja stanica; točnije do hemolize pri nižim koncentracijama NaCl. Poznato je da se hemoglobin transportira u eritrocitima, a oni su opskrbljeni antioksidacijskim enzimima koji imaju obrambena svojstva, te se manja odstupanja uočena u radu mogu objasniti njihovim djelovanjima (Juluri i sur., 2013). Odstupanje u slučaju Fe-dekstrana može se objasniti oslobađanjem željeza iz kompleksa

uslijed kojeg hemoglobin biva razgrađen od strane H_2O_2 (koji nastaje kao posljedica oksidacijskog stresa) koji katalizira reakcije ROS-a iz prstena hema, međutim hemoglobin može reagirati s H_2O_2 formirajući protein vezujuću oksidirajuću molekulu, sposobnu da stimulira lipidnu peroksidaciju (Halliwell, 1992). Povećana liza eritocita rezultat je oksidacijskog oštećenja eritrocitne membrane te prouzrokuje smanjenu fluidnost membrane i smanjuje njenu sposobnost otpora osmotskim promjenama (osmotskoj rezistenciji). Unutarstanični glutation u eritrocitima oksidira se u većoj mjeri, povećanje GSSG i MDA u eritrocitima, te nedostatak GSH, aktivira proteolitičke mehanizme na membrani i uzrokuje otpuštanje sijaloglikopeptida i promjene površine eritrocita koje omogućuju lakše odstranjivanje takvih stanica iz krvotoka, posebice u makrofagima jetre i slezene.

Dobiveni podaci ukazuju na nove spoznaje o dugotrajnom djelovanju izoflurana, Fe-dekstrana te njihovom združenom učinku na stanice jetre, slezene i bubrega. Združeno djelovanje izoflurana i Fe-dekstrana potrebno je istražiti primjenom dodatnih imunohistoloških i molekularnih metoda kao i procjenom njihove funkcije kako bi potvrdili dobivene rezultate. Izofluran je halogenirani hlapljivi anestetik, koji se općenito smatra nehepatotoksičnim, iako je zabilježen veliki broj slučajeva poremećaja rada jetre nakon njegove primjene, pa tako razlikujemo umjerena oštećenja povezana s blago povećanim razinama aminotransferaznih enzima, te fulminantne hepatotoksičnosti karakterizirane značajnim povećanjem razine jetrenih enzima i bilirubina koje rezultiraju masnom hepatičkom nekrozom (Zhu i sur., 2017). Kanali za otpuštanje kalcija kontroliraju otpuštanje Ca^{2+} iz unutarstaničnih organela, te svako djelovanje anestetika na te unutarstanične kanale može potencirati ili ublažiti anestetičke učinke na unutarnju koncentraciju kalcija posredovanu izvanstaničnim kalcij-prijenosnim kanalima kao što su NMDA receptorski kanali ili izlazni naponski kalcijevi kanali (Urban i sur., 2006). Sung i sur. (2013) pokazali su kako hlapljivi anestetici induciraju oksidacijski stres smanjenjem antioksidacijkog obrambenog mehanizma ili stvaranjem reaktivnih slobodnih radikala (npr. superoksidni anion), što potvrđuju i naši podaci mjerenja biljega oksidacijskog stresa.

Xie i sur. (2007) pokazali su kako povećana aktivnost BACE i γ-sekretaze, uzrokovane djelovanjem izoflurana, povećavaju proizvodnju/akumulaciju Aβ putem APP-a koja dovodi do aktivacije kaspaze i potenciranja apoptoze koja je početno izazvana izofluranom stvarajući tako ponavljajući ciklus apoptoze koja u konačnici može dovesti do pojave Alzheimerove bolesti. Također, stanična smrt inducirana izofluranom može biti karakterizirana nuklearnom kondenzacijom, fragmentacijom i aktivacijom kaspaze 3 i kaspaze 9, koje predstavljaju svojstva apoptoze (Wei i sur., 2005). Važno je napomenuti kako

fosforilacija proteazne kaspaze 9 ili indukcija transkripcijskih čimbenika od strane Akt, blokira indukciju apoptoze od strane istih čimbenika (Aravindan i sur., 2006). ROS radikali jesu posrednici apoptoze; točnije niske doze mogu potaknuti proliferaciju, srednje apoptozu, a izrazito visoke nekrozu. Temeljem navedenog primjena antioksidanasa mogla bi sprječiti većinu oblika apoptoze bili oni inducirani od strane ROS-a ili ne. Pokazano je da antioksidacijski enzimi (GPx i SOD) mogu zamijeniti antiapoptotički gen B – staničnog limfoma (bcl-2, engl. *B-cell lymphoma*) i spriječiti apoptozu posredovanu disregulacijom mitohondrija kao glavnog izvora ROS-a i pokretača procesa apoptoze (Kehrer, 2000).

Željezo dekstran je kompleks čije se središte ili jezgra sastoji od željeza u Fe^{3+} stanju, okruženog lancima dekstrana (sintetski polimeri glukoze) (Fishbane i sur., 1996) što vodi prooksidacijskom učinku i povećanju lipidne peroksidacije (Pai i sur., 2007; Lim i Vaziri, 2004a) stvaranjem visoko citotoksičnih $OH^{\bullet}$ iz H_2O_2 putem Fentonove ili Haber-Weissove reakcije (Lim i Vaziri, 2004a). Povećana pohrana željeza u jetri rezultira povećanom proizvodnjom ROS-a te oštećenjem jetre (Easo i Mohanan, 2016). Dokazano je kako su toksični i kancerogeni metali sposobni za međureakciju s nukleinskim proteinima i DNA uzrokujući oštećenja na tom specifičnom mjestu, gdje razlikujemo: 'izravno' oštećenje koje uključuje konformacijske promjene biomolekula, te 'neizravno' oštećenje koje je posljedica stvaranja metalnih formacija ROS-a i reaktivnih dušikovih vrsta (NOS, engl. *Reactive nitrogen species*) uključujući superoksidne i hidroksilne radikale, N_2O, H_2O_2 i/ili druge endogene oksidanse (Valko i sur., 2005).

Pokazano je da mutacije u enzimima superoksid dismutaze i regulatori unosa željeza mogu dovesti do povišenih razina superoksidnog aniona i preopterećenja željezom, što dovodi do sudjelovanja redoks aktivnog željeza u organskim i anorganskim reakcijama koje uključuju stimulaciju lipidne peroksidacije i kataliziranje stvaranja štetnih $OH^{\bullet}$ oštećujući tkiva (Jomova i Valko, 2011). Nadalje, H_2O_2 zajedno s ionima željeza vezanim na/ili blizu DNA stvara $OH^{\bullet}$ koji može velikom brzinom reagirati s DNA, membranskim lipidima i ugljikohidratima djelujući citotoksično i stvarajući oštećenja (Halliwell, 1992).

Razni enzimski i neenzimski antioksidansi osiguravaju zaštitu od štetnih metalima posredovanih slobodnih radikala na način da: keliraju željezne ione i sprječavaju reakcije sa O_2 ili peroksidima, keliraju željezo i održavaju ga u redoks stanju u kojem ono ne može reducirati O_2, te blokiranjem stvorenih radikala (Valko i sur., 2005). Jedna od najučinkovitijih klasa antioksidansa su tiolni spojevi, naročito GSH, koji osiguravaju zaštitu hvatanjem radikala, smanjenjem peroksida i održavanjem redoks stanja stanice (Valko i sur., 2004b). Posebna klasa antioksidacijske enzimske obitelji je GPx koja ima aktivnost peroksidaze, a

djeluje tako da smanjuje stvorene hidrogen perokside u vodi i lipidne hidroperoksidaze na njihove odgovarajuće alkohole, čime ograničava toksičnost stanica vezanih uz oksidativni stres (Remya i sur., 2016). U konačnici, polimorfizmi jednog nukleotida antioksidacijskih enzima uključujući SOD, GPx i CAT mogu pridonijeti bolestima povezanim s oksidacijskim stresom kao što su Alzheimerova bolest i druge neurodegenerativne bolesti, rak, dijabetes, kardiovaskularne bolesti i CRF (Sung i sur., 2013). Zbog raznih oštećenja i promjena na tkivima nastalih djelovanjem izoflurana, Fe-dekstrana te smanjenja antioksidacijskog obrambenog mehanizma prema našim rezultatima i prethodnim radovima, te nedostatka određenih podataka i mjerenja, potrebno je provesti nova, usmjerenija i detaljnija istraživanja koja bi mogla objasniti razlike u dobivenim podacima, popuniti nedostatke prethodnih istraživanja, te pronaći moguće načine prevencije i rješenja nastalih oštećenja i bolesti.

5. ZAKLJUČAK

Rezultati ovog rada doveli su do sljedećih zaključaka:

1. Dugotrajno izlaganje štakora izofluranu vodi smanjenju relativne težine jetre, slezene i bubrega što može biti pokazatelj gubitka stanica.
2. Izlaganje Fe-dekstranu vodi povećanju relativne težine jetre, slezene i bubrega ukazujući na prisutnost upalnih procesa u navedenim tkivima.
3. Izofluran u kombinaciji s Fe-dekstranom smanjuje relativnu težinu jetre i bubrega dok je relativna težina slezene povećana moguće zbog njene uloge kao hematopoetskog i limfatičkog organa.
4. Izlaganje izofluranu vodi inhibiciji sinteze proteina u jetri, Fe-dekstran povećava sintezu proteina dok njihov združeni učinak vodi prema normalnim vrijednostima.
5. Fe-dekstran vodi padu razine proteina u slezeni dok izofluran i kombinacija izoflurana i Fe-dekstrana ne izazivaju velike promjene u razini proteina.
6. Istraživani pripravci kod bubrega ne remete sintezu proteina.
7. Istraživani pripravci vode povećanom oksidacijskom stresu, izazivajući smrt stanica ili povećanu upalnu reakciju što prati povećana i/ili smanjena razina GSH, te aktivnost SOD i CAT.
8. Nastala oštećenja jetre, bubrega i slezene nakon izlaganja izofluranu, Fe-dekstranu ili njihovom združenom učinku potvrđuje povećanje razine biokemijskih odrednica u serumu u odnosu na kontrolnu skupinu
9. Vidljiva je povećana koncentracija ALP, GLU i BUN u skupini izloženoj kombinaciji izoflurana i Fe-dekstrana u odnosu na kontrolnu skupinu; obrada Fe-dekstranom inducirala je promjene koncentracija ALT u odnosu na kontrolnu skupinu, te TP, GLU i K^+ u odnosu na skupinu izloženu kombinaciji izoflurana i Fe-dekstrana; a najveći je utjecaj imala obrada izofluranom koja je potakla promjene u koncentracijama AMY, ALB i TP u odnosu na obradu kombinacije izoflurana i Fe-dekstrana, AMY i K^+ u odnosu na obradu Fe-dekstranom, te u slučaju PHOS i Ca^{2+} u odnosu na kontrolnu skupinu.
10. Izofluran i Fe-dekstran uzrok su povećanom oksidacijskom stresu te povećanoj osjetljivosti eritrocitnih stanica na hemolizu; točnije do hemolize dolazi pri nižim koncentracijama NaCl.
11. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da izlaganje izofluranu te primjena Fe-dekstrana mogu u jetri, bubregu i slezeni izazvati oštećenja što ukazuje na dodatni oprez tijekom primjene navedenih spojeva.

6. LITERATURA

1. Aebi H. (1984): Catalase in vitro. Methods in Enzymology 105: 121-126.
2. Aisen P., Listowsky I. (1980): Iron transport and storage proteins. Annual Review of Biochemistry 49: 357-393.
3. Andreis I., Batinić D., Čulo F., Grčević D., Marušić M., Taradi M., Višnjić D (2010): Imunologija: Upalne zaprjeke. Zagreb, Medicinska naklada, str: 169-170.
4. Aravindan N., Cata J. P., Hoffman L., Dougherty P. M., Riedel B. J., Price K. J., Shaw A. D. (2006): Effects of isoflurane, pentobarbital, and urethane on apoptosis and apoptotic signal transduction in rat kidney. Acta Anaesthesiologica Scandinavica 50: 1229-1237.
5. Blum F. E., Zuo Z. (2013): Volatile anesthetics-induced neuroinflammatory and anti-inflammatory responses. Medical Gas Research 3 (16): 1-4.
6. Brozović G., Oršolić N., Knežević F., Knežević A. H., Benković V., Šakić K., Borojević N., Đikić D. (2011): The in vivo genotoxicity of cisplatin, isoflurane and halothane evaluated by alkaline comet assay in Swiss albino mice. Journal of Applied Genetics 52: 355-361.
7. Brozović G., Oršolić N., Rozgaj R., Knežević F., Knežević A. H., Maričić M., Krsnik D., Benković V. (2017): Sevoflurane and isoflurane genotoxicity in kidney cells of mice. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju 68: 228-235.
8. Burchell S. R., Dixon B. J., Tang J., Zhang J. H. (2013): Isoflurane Provides Neuroprotection in Neonatal Hypoxic Ischemic Brain Injury. Journal of Investigative Medicine 61 (7): 1078-1083.
9. Burns D. L., Pomposelli J. J. (1999): Toxicity of parenteral iron dextran therapy. Kidney International 55 (69): S-119-S-124.
10. Campkin T. V. (1984): Isoflurane and cranial extradural pressure: *A study in Neurosurgical Patients*. British Journal of Anaesthesia 56: 1083-1087.
11. Carrier J., Aghdassi E., Platt I., Cullen J., Allard J. P. (2001): Effect of oral iron supplementation on oxidative stress and colonic inflammation in rats with induced colitis. Alimentary Pharmacology & Therapeutics 15: 1989-1999.
12. Cheignon C., Tomas M., Bonnefont-Rousselot D., Faller P., Hureau C., Collin F. (2018): Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. Redox Biology 14: 450-464.
13. Coe E. M., Bereman R. D., Monte W. T. (1995): An Investigation into the Size of an Iron Dextran Complex. Journal of Inorganic Biochemistry 60: 149-153.

14. Dean C., Chapman E. (2018): Introduction of anaesthesia. Anaesthesia and intensive care medicine; doi: https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2018.05.008.
15. Doyle E (ed.) (2007): Paediatric Anaesthesia. Oxford, Oxford Univerity Press.
16. Easo S. L., Mohanan P. V. (2016): Hepatotoxicity evaluation of dextran stabilized iron oxide nanoparticles in Wistar rats. International Journal of Pharmaceutics 509: 28-34.
17. Finkel T., Holbrook N. J. (2000): Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature 408: 239-248.
18. Fishbane S., Ungureanu V. D., Maesaka J. K., Kaupke C. J., Lim V., Wish J. (1996): The Safety of Intravenous Iron Dextran in Hemodialysis Patients. American Journal of Kidney Diseases 28 (4): 529-534.
19. Flohé L., Ötting F. (1971): Superoxide dismutase assays. Methods in Enzymology 105: 70–76.
20. Graczykowski B., Dobek A. (2011): Iron-dextran complex: Geometrical structure and magneto-optical features. Journal of Colloid and Interface Science 363: 551-556.
21. Greenbaum L. A., Pan C. G., Caley C., Nelson T., Seth K. J. (2000): Intravenous iron dextran and erythropoietin use in pediatric hemodialysis patients. Pediatric Nephrology 14: 908-911.
22. Halliwell B. (1992): Reactive Oxygen Species and the Central Nervous System. Journal of Neurochemistry 59 (5): 1609-1623.
23. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. (1986): Oxygen Free Radicals and Iron in Relation to Biology and Medicine: Some Problems and Concepts. Archives of Biochemistry and Biophysics 246 (2): 501-514.
24. Hemmings Jr. H. C. (2009): Sodium channels and the synaptic mechanisms of inhaled anaesthetics. British Journal od Anaesthesia 103 (1): 61-69.
25. Hutton M., Brull R., Macfarlane A. J. R. (2018): Regional anaesthesia and outcomes. British Journal of Anaesthesia 18 (2): 52-56.
26. Ighodaro O. M., Akinloye O. A. (2017): First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. Alexandria Journal of Medicine 54: 287-293.
27. Jamnicki-Abegg M., Welhrauch D., Pagel P. S., Kersten J. R., Bošnjak Ž. J., Warltier D. C., Bienengraeber M. W. (2005): Isoflurane Inhibits Cardiac Myocyte Apoptosis during Oxidative and Inflammatory Stress by Activating Akt and Enhancing Bcl-2 Expression. Anesthesiology 103: 1006-1014.

28. Jayakumar T., Thomas P. A., Geraldine P. (2007): Protective effect of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on antioxidants of major organs of aged rats. Experimental Gerontology 42: 183-191.
29. Jomova K., Valko M. (2011): Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. Toxicology 283: 65-87.
30. Jukić M., Carev M., Karanović N., Lojpur M. (2015): Anestezija i intenzivna medicina za studente. Dostupno na adresi: http://neuron.mefst.hr/docs/katedre/anesteziologija/Skripta%20anesteziologija%20i%20intenziva.pdf (Datum pristupa: 2. Srpnja 2017.). Split: Medicinski fakultet.
31. Juluri A., Modepalli N., Jo S., Repka M. A., Shivakumar H. N., Murthy S. N. (2013): Minimally Invasive Transdermal Delivery of Iron-Dextran. Journal of Pharmaceutical Sciences 102 (3): 987-993.
32. Karadža V., Majerić-Kogler V., Perić M., Popović L. J., Šakić K., Vegar-Brozović V. (2004): Klinička anesteziologija i reanimatologija. Zagreb, Katedra za anesteziologiju i reanimatologiju.
33. Kawaguchi M., Furuya H., Patel P. M. (2005): Neuroprotective effects of anesthetic agents. Journal of Anesthesia 19: 150-156.
34. Kehlet H., Dahl J. B. (2003): Anaesthesia, surgery, and challenges in postoperative recovery. The Lancet 362: 1921-1928.
35. Kehrer J. P. (2000): Cause-Effect of Oxidative Stress and Apoptosis. Teratology 62: 235-236.
36. Khan K. S., Hayes I., Buggy D. J. (2014): Pharmacology of anaesthetic agents II: inhalation anaesthetic agents. Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain 14 (3): 106-111.
37. Lazaro F. J., Larrea A., Abadia A. R. (2003): Magnetostructural study of iron-dextran. Journal of Magnetism and Magnetic Materials 257: 346-354.
38. Lee D., Barsky D., Hughes R., Driggers J., Poupard N., Mascarenhas M. (2017): Evaluation of the safety of iron dextran with parenteral nutrition in the paediatric inpatient setting. Nutrition & Dietetics: 1-5.
39. Lee Y. M., Song B. C., Yeum K. J. (2015): Impact of Volatile Anesthetics on Oxidative Stress and Inflammation. BioMed Research International. 242709. doi: 10.1155/2015/242709.
40. Leonard S. S., Harris G. K., Shi X. (2004): Metal-induced oxidative stress and signal transduction. Free Radical Biology & Medicine 37 (12): 1921-1942.
41. Lim C. S., Vaziri N. D. (2004a): Iron and Oxidative Stress in Renal Insufficiency. American Journal of Nephrology 24: 569-575.

42. Lim C. S., Vaziri N. D. (2004b): The effects of iron dextran on the oxidative stress in cardiovascular tissues of rats with chronic renal failure. Kidney International 65: 1802-1809.
43. Lipscomb D. C., Gorman L. G., Traystman R. J., Hurn P. D. (1998): Low Molecular Weight Iron in Cerebral Ischemic Acidosis In Vivo. Stroke 29: 487-493.
44. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. The Journal of Biological Chemistry 193: 265-275.
45. Markesbery W. R. (1997): Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. Free Radical Biology & Medicine 23 (1): 134-147.
46. Masini A., Ceccarelli D., Giovannini F., Montosi G., Garuti C., Pietrangelo A. (2000): Iron-Induced Oxidant Stress Leads to Irreversible Mitochondrial Dysfunctions and Fibrosis in the Liver of Chronic Iron-Dosed Gerbils. The Effect of Silybin. Journal of Bioenergetics and Biomembranes 32 (2): 175-182.
47. Montgomery Jr. E. B. (1995): Heavy metals and the etiology of Parkinson's disease and other movement disorders. Toxicology 97: 3-9.
48. Naidu N. R., Bhat S., Dsouza U. (2013): Effect of long term administration of aluminium chloride on oxidative stress and acetylcholinesterase activity in rat brains. International Journal of Pharmacy and Biological Sciences 3 (1): 616-622.
49. Nellgard B., Mackensen B., Massey G., Pearlstein R. D., Warner D. S. (2000): The Effects of Anesthetics on Stress Responses to Forebrain Ischemia and Reperfusion in the Rat. Anesthesia & Analgesia 91: 145-151.
50. Nunn J. F. (1985): Isoflurane as a Routine Anaesthetic in General Surgical Practice. British Journal of Anaesthesia 57: 461-475.
51. Ologunde R., Ma D. (2011): Do inhalation anesthetics cause cognitive dysfunction?. Acta Anaesthesiologica Taiwanica 49: 149-153.
52. Oshtrakh M. I., Kopelyan E. A., Semionkin V. A., Livshits A. B., Krylova V. E., Prostakova T. M., Kozlov A. A. (1994): An Analysis of Iron-Dextran Complexes by Mossbauer Spectroscopy and Positron Annihilation Technique. Journal of Inorganic Biochemistry 54: 285-295.
53. Pai A. B., Boyd A. V., McQuade C. R., Harford A., Norenberg J. P., Zager P. G. (2007): Comparison of Oxidative Stress Markers After Intravenous Administration of Iron Dextran, Sodium Ferric Gluconate, and Iron Sucrose in Patients Undergoing Hemodialysis. Pharmacotherapy 27 (3): 343-350.

54. Peyton P. J., Chao I., Weinberg L., Robinson G. J. B., Thompson B. R. (2011): Nitrous Oxide Diffusion and the Second Gas Effect on Emergence from Anesthesia. Anesthesiology 114 (3): 596-602.
55. Pihlainen K., Ojanpera I. (1998): Analytical toxicology of fluorinated inhalation anaesthetics. Forensic Science International 97: 117-133.
56. Piloni N. E., Perazzo J. C., Fernandez V., Videla L. A., Puntarulo S. (2016): Sub-chronic iron overload triggers oxidative stress development in rat brain: implications for cell protection. Biometals 29: 119-130.
57. Quin Z., Lv E., Zhan L., Xing X., Jiang J., Zhang M. (2014): Intravenous pretreatment with emulsified isoflurane preconditioning protects kidneys against ischemia/reperfusion injury in rats. BioMed Central Anesthesiology 14 (1): 28-35.
58. Remya N. S., Syama S., Sabareeswaran A., Mohanan P. V. (2016): Toxicity, toxicokinetics and biodistribution of dextran stabilized Iron oxide Nanoparticles for biomedical applications. International Journal of Pharmaceutics 511 (1): 586-598.
59. Sharma H. S., Kutala V. K. (2013): Special Issue on Oxidative Stress in Health and Didease. Cell Biochemistry and Biophysics 67: 215-218.
60. Sies H. (1997): Physiological Society Symposium: Impaired Endothelial and Smooth Muscle Cell Function in Oxidative stress. Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. Experimental Physiology 82: 291-295.
61. Sleigh J., Warnaby C., Tracey I. (2018): General anaesthesia as fragmentation of selfhood: insights from eletroencephalography and neuroimaging. British Journal of Anaesthesia 121 (1): 233-240.
62. Spence J., Belley-Cote E., Ma H. K., Donald S., Centofanti J., Hussain S., Gupta S., Devereaux P. J., Whitlock R. (2017): Efficacy and safety of inhaled anaesthetic for postoperative sedation during mechanical ventilation in adult cardiac surgery patients: a systematic review and meta-analysis. British Journal of Anaesthesia 118 (5): 658-669.
63. Stohs S. J., Bagchi D. (1995): Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. Free Radical Biology & Medicine 18 (2): 321-336.
64. Sung C. C., Hsu Y. C., Chen C. C., Lin Y. F., Wu C. C. (2013): Oxidative Stress and Nucleic Acid Oxidation in Patients with Chronic Kidney Disease. Oxidative Medicineand Cellular Longevity 301982. doi 10.1155/2013/301982.
65. Szczesny G., Veihelmann A., Massberg S., Nolte D., Messmer K. (2004): Long-term anaesthesia using inhalatory isoflurane in different strains of mice – the haemodynamic effects. Laboratory Animals 38: 64-69.

66. Štefan L., Tepšić T., Zavidić T., Urukalo M., Tota D., Domitrović R. (2007): Lipidna peroksidacija - uzroci i posljedice. Medicina 43: 84-93.
67. Tedore T. (2015): Regional anaesthesia and analgesia: relationship to cancer recurrence and survival. British Journal of Anaesthesia 115 (S2): ii34-ii45.
68. Tietze F. (1969): Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. Analytical Biochemistry 27 (3): 502-522.
69. Toblii J. E., Cao G., Olivieri L., Angerosa M. (2010): Comparison of the renal, cardiovascular and hepatic toxicity data of original intravenous iron compounds. Nephrology Dialysis Transplantation 25: 3631-3640.
70. Türkan H., Bukan N., Sayal A., Aydin A., Bukan M H. (2004): Effects of Halothane, Enflurane, and Isoflurane on Plasma and Erythrocyte Antioxidant Enzymes and Trace Elements. Biological Trace Element Research 102; 105-112.
71. Urban B. W., Bleckwenn M., Barann M. (2006): Interactions of anesthetics with their targets: Non-specific, specific or both?. Pharmacology and Therapeutics 111: 729-770.
72. Valko M., Morris H., Cronin M. T. D. (2005): Metals, Toxiciy and Oxidative Stress. Current Medicinal Chemistry 12: 1161-1208.
73. 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.
74. Weitner T., Inić S., Jablan J., Gabričević M., Domijan A. M. (2016): Spectrophotometric Determination of Malondialdehyde in Urine Suitable for Epidemiological Studies. Croatica Chemica Acta 89 (1): 133-139.
75. Xie Z., Dong Y., Maeda U., Moir R. D., Xia W., Culley D. J., Crosby G., Tanzi R. E. (2007): The Inhalation Anesthetic Isoflurane Induces a Vicious Cycle of Apoptosis and Amyloid β-Protein Accumulation. The Journal of Neuroscience 27 (6): 1247-1254.
76. Zhao D. A., Bi L. Y., Huang Q., Zhang F. M., Han Z. M. (2016): Isoflurane provides neuroprotection in neonatal hypoxic ischemic brain injury by suppressing apoptosis. Revista Brasileira de Anesthesiologia 66 (6): 613-621.
77. Zhu Y., Xiao X., Li G., Bu J., Zhou W., Zhou S. (2017): Isoflurane anesthesia induces liver injury by regulating the expression of insulin-like growth factor 1. Experimental and Therapeutic Medicine 13: 1608-1613.

ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Elizabeta Paparić

Obrazovanje:

- 2016. – 2018. Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu – Biološki odsjek, diplomski studij Eksperimentalna biologija, smjer: Fiziologija i imunobiologija
- 2013. – 2016. Sveučilišni odjel za studije mora u Splitu, preddiplomski studij Biologija i ekologija mora
- 2009. – 2013. Srednja škola Markantuna de Dominisa Rab, smjer Opća gimnazija

Laboratorijska stručna praksa:

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

Sažeci u zbornicima radova:

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

Noć biologije: 07. travnja 2017.

Radno iskustvo:

- Ljeto 2012. i 2013. Sezonski radnik u trgovini 'Diona d.o.o.' – Rab