

# Učinak anestetika izoflurana i ionizirajućeg zračenja na primarna oštećenja DNA u miša

---

Šikić, Dunja

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:545806>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-29**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Dunja Šikić

**Učinak anestetika izoflurana i ionizirajućeg zračenja na primarna oštećenja DNA u  
miša**

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

Ovaj rad, izrađen na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te u Jedinici za mutagenezu Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, pod vodstvom prof. dr. sc. Vesne Benković i dr. sc. Mirte Milić, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre eksperimentalne biologije.

## **Zahvale**

Veliko hvala divnoj mentorici, prof. dr. sc. Vesni Benković, na ukazanom povjerenju, silnoj podršci, neizmjernom strpljenju, velikom trudu, nesvakidašnjoj ažurnosti i na tome što nije samo "obična" mentorica, nego i životna. Hvala na svemu što ste me naučili i što ćete me, nadam se, još naučiti.

Veliko hvala dr. sc. Mirti Milić, kao i svim zaposlenicima Jedinice za mutagenezu pri Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada, na iznimno ugodnoj radnoj atmosferi (bez obzira koliko ima posla i stupnjeva/vlage u zraku!), profesionalnosti, strpljivosti, odgovorima na sva pitanja i svemu novonaučenome!

Veliko hvala dr. sc. Anici Horvat-Knežević, na njenoj iskrenosti, brizi, svim savjetima, na podršci te neopisivo toploj atmosferi koja je uvijek tamo gdje je i ona!

Ne postoji dovoljno veliko hvala za Nives, bez koje svega ovoga ne bi ni bilo. S takvim prijateljima je lijepo i kad je teško! Ne znam čime sam ju zaslužila, ali ne zahvaljujem na tome samo u diplomskom, nego svaki dan. I hvala joj što je našla Zvonu koji nas godinama trpi i pomaže kad ne znamo s kompjutorima (hvala Zvone!).

Jedno ogromno hvala mami i ostatku obitelji, kao i prijateljima, na podršci, brizi, čeličnim živcima i što me se nije/nisu odrekli u doba silnih ispitnih rokova. Službeno se ispričavam za sve nervoze i nedaće koje sam kroz godine studiranja priuštila, ali evo, ipak se isplatilo!

Veliko hvala doc. dr. sc. Sofiji Ani Blažević na tome što je nepresušan izvor inspiracije, na podršci i neumornom bodrenju, na svim prilikama i nadam se na još puno toga!

Hvala i onome tko je izmislio kavu te akutnom stresu, bez njih također ne bih bila tu gdje jesam.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Učinak anestetika izoflurana i ionizirajućeg zračenja na primarna oštećenja DNA u miša

Dunja Šikić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Izofluran je inhalacijski anestetik koji se koristiti za indukciju i održavanje opće anestezije. Neka istraživanja pokazuju da uzrokuje genotoksične učinke. Ionizirajuće zračenje (IR) je zračenje dovoljne energije za ioniziranje atoma, a niže doze mogu dovesti do promjena u staničnoj proliferaciji i oštećenja DNA. Izofluran i IR se koriste u kliničkoj praksi, a njihovo međudjelovanje još nije dovoljno istraženo. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi učinak anestetika izoflurana i IR na vrijednosti primarnih oštećenja DNA u leukocitima periferne krvi, stanicama mozga, jetre i bubrega u Swiss albino miševa. Miševi su anestezirani izofluranom (1,7 vol%) tijekom 2 sata nakon čega su ozračeni X- zračenjem (1 Gy). Metodom alkalnog komet testa analizirani su parametri: dužina repa kometa, postotak DNA u repu kometa i repni moment. U vremenskim intervalima 0, 2, 6 i 24 sata od izlaganja anesteziji i zračenju procijenjen je popravak nastalih oštećenja DNA. Rezultati ovog istraživanja pokazali su potencijalni zaštitni učinak izoflurana, naročito u stanicama jetre i mozga, a kao moguća posljedica tog učinka, kombinirani tretman pokazao je manja oštećenja DNA u odnosu na tretman samim zračenjem. Stanični indeks popravka pokazao se nešto manjim prilikom kombiniranog tretmana u leukocitima i stanicama bubrega, a višim u stanicama jetre. Iako su potrebna daljnja istraživanja, ovaj rad pokazao je potencijalni antagonistički utjecaj izoflurana na oštećenja DNA uzrokovana nakon izlaganja IR-u.

(55 stranica, 15 slika, 4 tablice, 56 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: izofluran, ionizirajuće zračenje, primarna oštećenja DNA, alkalni komet test, stanični indeks popravka primarnih oštećenja DNA

Voditelj 1: prof. dr. sc. Vesna Benković

Voditelj 2: dr. sc. Mirta Milić

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Vesna Benković

izv. prof. dr. sc. Renata Matoničkin Kepčija

izv. prof. dr. sc. Renata Šoštarić

Zamjena: doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević

Rad prihvaćen: 9. rujna 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

Effect of anaesthetic isoflurane and ionising radiation on primary DNA damage in mice

Dunja Šikić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Isoflurane is an inhalation anesthetic used for induction and maintenance of general anesthesia. Some researches suggest that it causes genotoxic effects. Ionizing radiation (IR) is radiation of energy high enough to cause atom ionization. IR can cause changes in cellular proliferation and DNA damage. Both isoflurane and IR are used in clinical practice, and their combined effects are not yet sufficiently studied. The goal of this study was to determine the effect of isoflurane and IR on primary DNA damage in peripheral blood leukocytes and kidney, liver, and brain cells in Swiss albino mice. The mice were anesthetized using isoflurane (1.7 vol%) for 2 hours, after which they were irradiated using X-rays (1Gy). Alkaline comet assay method was used to analyze following parameters: tail length, percentage of DNA in comet tail and tail moment. Cellular DNA repair was assessed 0, 2, 6, and 24 hours after anesthesia and irradiation exposure. The results demonstrated a potentially protective effect of isoflurane, especially in liver and brain cells. As a possible result of that protective effect, combined treatment showed less DNA damage in comparison to IR itself. Cellular DNA repair index was somewhat lower in combined treatment in leukocytes and kidney cells, and higher in liver cells. Although additional research is required, this study showed a potential antagonistic effect of isoflurane on DNA damage caused by IR.

(55 pages, 15 figures, 4 tables, 56 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: isoflurane, ionising radiation, primary DNA damage, alkaline comet assay, cellular DNA repair index

Supervisor 1: Dr. Vesna Benković, Prof.

Supervisor 2: Mirta Milić, Ph. D.

Rewievers: Dr. Vesna Benković, Prof.

Dr. Renata Matoničkin Kepčija, Assoc. Prof.

Dr. Renata Šoštarić, Assoc. Prof.

Substitute: Dr. Sofija Ana Blažević, Asst. Prof.

Thesis accepted: 9<sup>th</sup> September 2020

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Anesteziija</b> .....	1
<b>1.1.1. Inhalacijski anestetici</b> .....	1
<b>1.1.2. Izofluran</b> .....	2
<b>1.2. Biološki učinci ionizirajućeg zračenja</b> .....	3
<b>1.3. Popravak oštećenja DNA</b> .....	6
<b>1.4. Kombinirana upotreba anestetika i ionizirajućeg zračenja</b> .....	7
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	8
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	9
<b>3.1. Eksperimentalne životinje</b> .....	9
<b>3.1.1. Anesteziija i zračenje</b> .....	10
<b>3.1.2. Priprema uzoraka</b> .....	10
<b>3.2. Alkalni komet test</b> .....	10
<b>3.3. Stanični indeks popravka DNA</b> .....	12
<b>3.4. Statističke metode</b> .....	13
<b>4. REZULTATI</b> .....	14
<b>4.1. Leukociti periferne krvi</b> .....	14
<b>4.2. Stanice bubrega</b> .....	19
<b>4.3. Stanice jetre</b> .....	24
<b>4.4. Stanice mozga</b> .....	29
<b>4.5. Stanični indeks popravka primarnih oštećenja DNA u leukocitima periferne krvi te u stanicama bubrega, jetre i mozga</b> .....	34
<b>5. RASPRAVA</b> .....	42
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	46
<b>7. LITERATURA</b> .....	48
<b>8. ŽIVOTOPIS</b> .....	54

## 1. UVOD

### 1.1. Anestezija

Anestezija je smanjena osjetljivost cijelog ili pojedinih dijelova tijela koja se postiže sredstvima za depresiju središnjeg živčanog sustava u potpunosti ili lokalnog živčanog tkiva, a prema vrsti razlikujemo opću i lokalnu anesteziju te sedaciju. Sedacija podrazumijeva centralnu depresiju i pospanost te gubitak svijesti o okolini. Lokalnom anestezijom dolazi do gubitka osjeta samo u ograničenom dijelu tijela, dok je, za razliku od lokalne, opća anestezija farmakološki izazvano nesvjesno stanje karakterizirano kontroliranom, reverzibilnom depresijom centralnog živčanog sustava. Obzirom na način primjene anestetika, opća anestezija može biti još i inhalacijska (udisanje anestetičkih plinova ili para s kisikom) ili injekcijska (ubrizgavanje otopina anestetika intravenozno, intramuskularno ili subkutano) (Butterworth i sur., 2018; Flecknell, 2015; Grimm i sur., 2011).

#### 1.1.1. Inhalacijski anestetici

Inhalacijski anestetici, od kojih najpoznatiji enfluran, izofluran, sevofluran i desfluran, su lako hlapive tekućine koje omogućavaju sve značajke opće anestezije – amneziju, gubitak svijesti i imobilizaciju, kao rezultat specifičnog djelovanja na različite neuronske puteve u središnjem živčanom sustavu, stoga se u današnje vrijeme učestalo koriste u kliničkoj praksi (Hemmings i Egan, 2019).

Mehanizam djelovanja inhalacijskih anestetika može se podijeliti na makroskopski (mozak i leđnu moždinu), mikroskopski (sinapse i aksoni), te molekularni (presinaptičke i postsinaptičke membrane). Na razini leđne moždine, inhalacijski anestetici smanjuju prijenos aferentnih informacija od leđne moždine do moždane kore, a dolazi i do inhibicije eferentne živčane aktivnosti, odnosno inhibicije pokreta izazvanog bolnim podražajem. Djelovanjem na ionske kanale živčanog tkiva, inhalacijski anestetici mogu utjecati na presinaptičko oslobađanje neurotransmitera, mijenjati prag postsinaptičkog odgovora na neurotransmitere ili oboje (Khan i sur., 2014). Za razliku od intravenoznih, inhalacijski anestetici u klinički relevantnim koncentracijama mogu djelovati na brojne kanale i receptore vezane na membranu. Tako hlapljivi anestetici djeluju aktivacijski na inhibitorne GABA<sub>A</sub> i glicinske receptore te K<sup>+</sup> kanale,

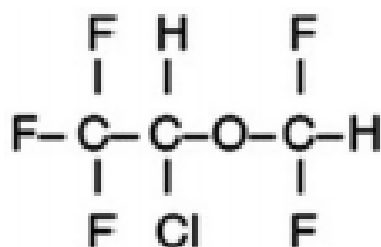


a inhibičijski na ekscitacijske  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  kanale, što rezultira smanjenim živčanim i sinaptičkim prijenosom signala, odnosno informacije (Hemmings i Egan, 2019; Khan i sur., 2014).

Inhalacijski anestetici pokazuju širok spektar klinički značajnih učinaka na više organskih sustava, kako korisnih, tako i potencijalno štetnih. Potencijalno korisni učinci uključuju zaštitu organa, odnosno organskih sustava, dok štetni učinci uključuju respiratornu i kardiovaskularnu depresiju (Hemmings i Egan, 2019).

### 1.1.2. Izofluran

Izofluran ( $\text{C}_3\text{H}_2\text{ClF}_5\text{O}$ ) hlapivi je halogeni spoj, nezapaljiv i karakteristična mirisa nalik eteru (Slika 1). Iako je izomer enflurana iste molarne mase, različitih su fizikalno-kemijskih svojstava. Kemijski je vrlo stabilan i može se koristiti za indukciju i održavanje opće anestezije. Prednost korištenja ovog anestetika jest mala pojavnost nuspojava, no njegov utjecaj na različite vrste stanica, kao i na DNA, još uvijek nije potpuno razjašnjen – neka istraživanja pokazuju genotoksične učinke dok druga govore da mu je posljedica viši antioksidativni status organizma (Brozović i sur., 2017; Butterworth i sur., 2018; Hemmings i Egan, 2019; Kim i sur., 2006; Ruxanda i sur. 2014).



**Slika 1.** Kemijska struktura izoflurana. (preuzeto iz: Khan i sur., 2014)

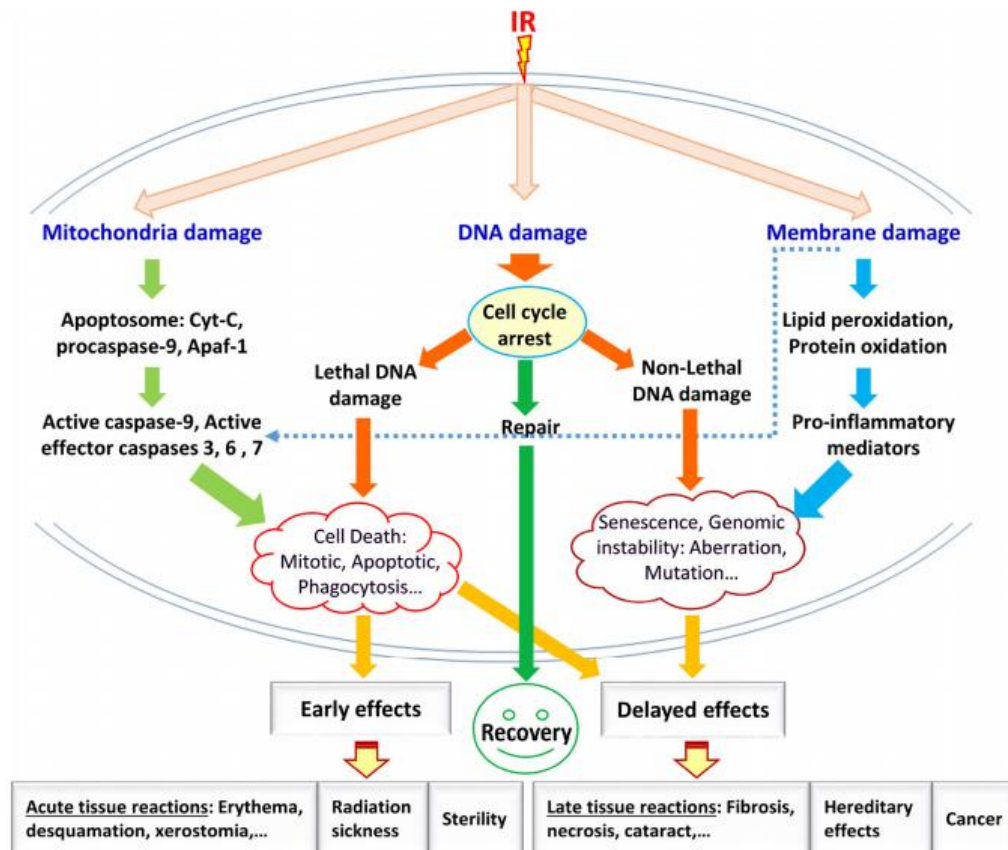
U koncentracijama većim od 1 MAC (minimalna alveolarna koncentracija; alveolarna koncentracija anestetika, pri 1 atm, koja sprječava pokret kao odgovor na bolnu stimulaciju u 50% bolesnika), povećava moždani protok krvi i intrakranijalni tlak, čime postiže blaži učinak od onog uzrokovanog halotanom. Izofluran smanjuje metaboličke potrebe mozga za kisikom, a na neuromuskulaturu utječe opuštanjem skeletnih mišića. Smanjuje protok krvi kroz bubrege, stopu glomerularne filtracije i lučenje mokraće. Također, može smanjiti ukupan protok krvi kroz jetru, a jetrena opskrba kisikom bolje je očuvana primjenom izoflurana nego primjenom halotana jer se održava prokrvljenost jetrene arterije. Jetrene probe nisu narušene upotrebom izoflurana (Butterworth i sur., 2018).

Izofluran se metabolizira u trifluoroctenu kiselinu. Iako se razine fluorida u serumu mogu povećati, nefrotoksičnost je malo vjerojatna, čak i u prisutnosti enzimskih induktora. Tako i produljena sedacija teških bolesnika (> 24 sata, 0,1 – 0,6% izoflurana) uzrokuje povećanu razinu fluorida u plazmi (15 – 50  $\mu\text{mol} / \text{L}$ ), ali bez dokaza o oštećenju bubrega. Ograničenim oksidativnim metabolizmom izofluran također smanjuje mogućnost značajne jetrene disfunkcije (Butterworth i sur., 2018).

## **1.2. Biološki učinci ionizirajućeg zračenja**

Zračenje ili radijacija jest prirodna pojava prijenosa energije elektromagnetskim valovima ili snopovima subatomske čestice koje se usmjereno gibaju kroz prostor (Bolf, 2018). Ionizirajućim zračenjem, ili skraćeno IR, nazivamo zračenje koje emitira dovoljno energije za izbijanje elektrone iz atoma tvari kroz koju prolazi, te ih pritom ionizira i stvara nabijene čestice. Fotonsko (X-zrake i  $\gamma$ -zrake) i čestično zračenje (elektroni, protoni, neutroni,  $\alpha$ -čestice i  $\beta$ -čestice) dvije su glavne vrste IR (McFadyen i sur., 2011). Primljeno zračenje može potjecati iz prirodnih radioaktivnih izvora (npr. kozmičko zračenje) ili umjetnih (medicinskih, npr. RTG i nemedicinskih, npr. nuklearnih elektrana), a rezultat izlaganja zračenju su mnogobrojni biološki učinci koji se kasnije mogu pojaviti u obliku kliničkih simptoma (Aggarwal, 2014). Izvedena jedinica doze IR u SI sustavu (Međunarodni sustav jedinica) je Gy (grej; J / kg), a izražena je kao omjer apsorbirane energije i mase ozračenoga tijela (Bolf, 2018).

Učinak IR ovisi o brojnim čimbenicima poput prirode i energije zračenja, ukupne doze i brzine, opsega i dijela tijela koji je izložen, dobi osobe izložene zračenju te radiosenzitivnosti ozračenog organa (Aggarwal, 2014). Izloženost IR na molekularnoj razini uzrokuje oštećenja organela i staničnih struktura, posebice DNA, proteina, mitohondrija i staničnih membrana (Slika 2), što može rezultirati popravkom oštećenja, genomskom nestabilnošću ili staničnom smrću (Mavragani i sur., 2017; Mishra, 2018). Na razini tkiva, organa i organizma posljedica izloženosti zračenju može biti ili oporavak ili stvaranje ranih/kasnih ozljeda (akutne i kasne tkivne reakcije, radijacijske bolesti, sterilnost, promjene u nasljednim čimbenicima i pojavnost tumora/raka (Mishra, 2018).



**Slika 2.** Shematski prikaz učinaka IR na stanice. (Preuzeto iz: Mishra i sur., 2018)

Štetni učinci zračenja mogu se podijeliti na determinističke i stohastičke. Deterministički učinci pojavljuju se iznad određenog praga doze zračenja, nisu slučajni i imaju predvidljiv odgovor na zračenje. Rezultat su odumiranja stanica ili gubitka stanične funkcije, a učinak im se povećava povećanjem doze. Neki od primjera determinističkih učinaka su eritemi, povraćanje, nekroza, krvarenje pa čak i smrt (Aggarwal, 2014; Elgazzar i Kazem, 2015). Za stohastičke učinke se ne može odrediti prag doze, a uobičajeni nastaju nakon kronične izloženosti niskoj dozi zračenja. Obuhvaćaju somatske bolesti (npr. rak, leukemiju), ali i genske mutacije koje se prenose na potomstvo (npr. mentalna zaostalost) (Aggarwal, 2014; Elgazzar i Kazem, 2015; Mishra, 2018). Somatski učinci zračenja mogu se primjetiti u osobe izložene zračenju u obliku oštećenja tkivnih stanica, te mogu biti vidljivi odmah nakon izloženosti (unutar nekoliko sati ili tjedana) ili godinama nakon njega. Rani učinci nastaju uslijed akutne izloženosti, odnosno izloženosti velikoj dozi primljenoj u kratkom vremenu (nekoliko sati ili manje), te se pripisuju drastičnom padu staničnih populacija uslijed stanične smrti. Kasne učinke karakterizira dugo razdoblje latencije (čak 30-40 god), te se mogu primjetiti kod osoba s dužim vremenskim razdobljem izloženosti niskim razinama zračenja ili kod osoba

koje su se već oporavile od ranijih učinaka izloženosti. Primjeri kasnih učinaka su pojavnost tumora, tkivne fibroze i katarakte. Za razliku od somatskih, genetski učinci očituju se na potomstvu osobe izložene zračenju uslijed oštećenja DNA njene germinativne linije. Ti učinci uključuju promjenu broja i strukture kromosoma, odnosno genske mutacije, te ovise o stupnju razvoja spolnih stanica, jačini i frakcioniranosti doze te vremenskom intervalu od izlaganja do začeca (Elgazzar i Kazem, 2015).

Biološki učinci ionizirajućeg zračenja posljedica su prijenosa energije ionizacijom i ekscitacijom tjelesnih stanica, odnosno tkiva nakon zračenja, čime je narušena njihova normalna funkcija. Budući da udio vode u ljudskim tkivima prelazi 70%, većina primljene energije pogodit će, pobuditi i ionizirati molekule vode, a tek mali dio energije će se prenijeti izravno na ostale biomolekule. Zračenje u interakciji s vodom stvara radiolitičke produkte vode poput  $\bullet\text{H}$ ,  $\bullet\text{OH}$  i  $\bullet\text{H}_2\text{O}_2$ . Slobodni radikali lako reagiraju s biomolekulama u stanici i stvaraju oštećenja važnih biomolekula poput DNA i proteina. Oštećenja mogu dovesti do inhibicije stanične diobe, nastanka kromosomskih aberacija, genskih mutacija i stanične smrti. Iako apsorpcija energije zračenja u tkivima organa traje vrlo kratko (10-15 s), biološki učinci nastalih oštećenja mogu trajati od nekoliko sati do nekoliko godina. Ometanjem procesa stanične diobe, zračenje uzrokuje poremećaje funkcije tkiva i organa (Taylor, 2013).

Oštećenja DNA nastaju zbog direktnih ili indirektnih učinaka IR. Direktna su rezultat izravne IR interakcije s DNA, dok indirektna djeluju posredstvom nastalih slobodnih radikala uslijed radiolize vode i njihove interakcije s DNA (Hill, 2020; Mishra, 2018). Oštećenja DNA uslijed IR izlaganja mogu uključivati gubitak šećerne skupine, purinskih i pirimidinskih baza, odnosno promjene u slijedu nukleotida (supstitucije, insercije i delecije), jednostruke ili višestruke jednolančane i dvolančane lomove DNA, križno povezivanje DNA i proteina te disfunkciju telomera (Hill, 2020; Mavragani i sur., 2017; Mishra, 2018; Sisakht i sur., 2020). Količina i složenost oštećenja ovisi o dozi i linearnom prijenosu energije (LET - količina energije koju ionizirajuća valna čestica prenosi na materijal), odnosno povećava se s povećanjem linearnog prijenosa energije (Hill, 2020; Rodriguez-Ruiz i sur., 2019). Sama vrsta oštećenja ima velik utjecaj na preživljenje stanica, a staničnu smrt uglavnom uzrokuje više letalnih oštećenja koja onemogućuju oporavak stanice (Mishra, 2018). Oštećenjem DNA smanjuje se stopa replikacije, što dovodi do staničnog starenja i stanične smrti (Ni i sur., 2016).

Štetni učinci IR na molekulu DNA osnova su radioterapijskih postupaka u kojima se uzima u obzir samo ona djelovanja na tumorska tkiva koja mogu rezultirati staničnom smrću. Usmjeren prijenos energije na točno određenoj putanji IR (ovisno o svrsi terapije) uzrokuje

ciljano oštećenje DNA na željenom mjestu. Upravo su mjesta višestrukih oštećenja DNA nastala djelovanjem IR ključna za uništavanje tumorskih stanica jer su teško popravljiva (Lomax, 2013). Stoga je glavni cilj radioterapije povećati količinu zračenja koja se dovodi u tumorsko tkivo, kako bi se osigurala lokalna kontrola i smanjila količina zračenja u susjednim zdravim tkivima (Biau i sur., 2019). Ipak, uz poželjne učinke na tumorska tkiva, radioterapija utječe i na zdrave stanice, što ograničava primjenjivost iste (Deycmar i sur., 2019). Danas se najčešće koristi frakcionirana radioterapija, u kojoj je ukupna potrebna doza IR raspodijeljena u više manjih doza, svaka najčešće po 2 Gy. Time se smanjuje štetan učinak izlaganja na normalna tkiva koja okružuju tumor te se postiže bolja lokalna kontrola tumora u usporedbi s korištenjem jedne ili nekoliko većih doza (Stone i sur., 2003).

### **1.3. Popravak oštećenja DNA**

Mehanizmi su uključeni u popravak oštećenja nastalih djelovanjem IR su brojni – razlikujemo direktni popravak te popravak oštećenja nastalih replikacijom pomoću popravka krivo sparenih baza. Popravak izrezivanjem baza karakterističan je za oksidirane baze i jednolančane lomove, popravak izrezivanjem nukleotida za oštećenja nukleotida, homologna rekombinacija za dvolančane lomove u S/G2 fazi staničnog ciklusa, a nehomologno sparivanje krajeva za popravak dvolančanih lomova neovisno o staničnom ciklusu (Averback i sur., 2006). Dvolančani lomovi predstavljaju najcitotoksičniju vrstu oštećenja DNA, a povećanjem njihovog broja nehomologno sparivanje krajeva postaje sve sklonije pogreškama koje mogu dovesti do kromosomskih aberacija (Deycmar i Pruschy, 2018; Fu i sur., 2019). Procesi popravka DNA ključni su za održavanje genske stabilnosti u stanicama. U odgovoru na oštećenja DNA, mreže nadzornih sustava reagiraju te privremeno zaustavljaju progresiju staničnog ciklusa i promoviraju popravak. Regulacija popravka DNA obično je ovisna o, odnosno uzima u obzir, dva faktora – tip lezije DNA koja treba biti popravljena i fazu staničnog ciklusa u kojoj se DNA nalazi (Branzei i Foiani, 2008). Ukoliko se u određenim okolnostima ne poprave sva oštećenja DNA, aktivira se regulatorni odgovor. Regulatorni odgovor jest programirana stanična smrt ili apoptoza, koja uklanja genomski nestabilne stanice (Chatterjee i Walker, 2017).

#### **1.4. Kombinirana upotreba anestetika i ionizirajućeg zračenja**

Medicinsko osoblje, prisutno pri operacijskim zahvatima, u današnje je vrijeme sve češće izloženo genotoksičnim agensima kao što su anesteziološki plinovi i IR (Rajabi Pour i sur., 2020). Izlaganje malim količinama inhalacijskih anestetika zaostalih u zraku operacijskih sala i jedinica za intenzivnu njegu (tzv. otpadni anesteziološki plinovi) predstavlja rizik od razvoja profesionalnih bolesti u zdravstvenih djelatnika (Deng i sur., 2018; Lucio i sur., 2018). Brzi razvoj intervencijske radiologije (medicinska disciplina koja koristi minimalno invazivne perkutane metode umjesto kompliciranih klasičnih operacijskih zahvata) i radiološkog snimanja povećao je broj zahvata, a kao posljedica je i veća izloženost zračenju koja predstavlja potencijalni rizik u anesteziološkoj praksi (Leone, 2018; McFadyen i sur., 2011). Nedavna istraživanja genotoksičnosti inhalacijske anestezije u pacijenata podvrgnutih operacijama s općom anestezijom te u medicinskog osoblja izloženog anestheticima na svom radnom mjestu, pokazala su da i koncentracije u tragovima otpadnih anestezioloških plinova mogu dovesti do povećanja genetskih oštećenja (Kucharova i sur., 2020).

Inovativni pristupi i jedinstvene kombinacije različitih oblika liječenja obilježavaju nedavni napredak u terapiji raka, a kirurgija je sve češće uparena s kemoterapijom ili zračenjem (Arunkumar i sur., 2013). Tako utjecaj anestetika i ionizirajućeg zračenja nije ograničen samo na medicinsko osoblje već i na pacijente. Radioterapija kod mlađih pedijatrijskih pacijenata teško je provediva u budnom stanju jer pacijent tijekom cijelog postupka, koji je često dugotrajan, mora biti u potpunosti miran. Uz to, kod klasične radioterapije i protonske terapije, koriste se naprave za imobilizaciju i fiksaciju kao što je, primjerice, termoplastična maska. Takve naprave ne predstavljaju problem samo pedijatrijskim, već i odraslim pacijentima koji pate od klaustrofobije, stoga je u takvim slučajevima pacijente potrebno podvrgnuti općoj anesteziji inhalacijskim anestheticima u svrhu provedbe ciljane terapije zračenjem (Arunkumar i sur., 2013; Ntoukas i sur., 2020).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja bio je usporediti vrijednosti primarnih oštećenja DNA nastalih uslijed izloženosti ionizirajućem zračenju u dozi od 1 Gy i/ili inhalacijskog anestetika izoflurana (1,7 vol %), te brzinu popravka u leukocitima periferne krvi, stanicama mozga, jetre i bubrega u Swiss albino miševa. Primarna oštećenja mjerena su alkalnim komet testom, a brzina popravka procjenjivana je u vremenskim intervalima 0, 2, 6 i 24 sata od jednokratnog izlaganja navedenim uvjetima.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Eksperimentalne životinje

Za potrebe ovog istraživanja korišteni su miševi soja Swiss albino uzgojeni u Nastambi za uzgoj laboratorijskih životinja u Zavodu za animalnu fiziologiju na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Pokus je odobren od strane Etičkog povjerenstva Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu i proveden se u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja (NN 102/17.), te Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13; 39/17). Miševi starosti  $60 \pm 5$  dana uzgojeni su u standardnim uvjetima propisanim za uzgoj laboratorijskih životinja (temperatura od  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , dnevni ritam svjetla i tame 12/12 sati), te hranjeni standardnom hranom za laboratorijske životinje (Standard Diet GLP, 4RF 1, Mucedola, Settimo Milanese MI, Italija), uz dostupnost vode *ad libitum*.

Miševi su podijeljeni u trinaest skupina (4 životinje po svakoj skupini):

1. kontrolna skupina;
2. skupina žrtvovana neposredno nakon tretmana izofluranom (1,7 vol %)
3. skupina žrtvovana 2 sata nakon tretmana izofluranom (1,7 vol %)
4. skupina žrtvovana 6 sati nakon tretmana izofluranom (1,7 vol %)
5. skupina žrtvovana 24 sata nakon tretmana izofluranom (1,7 vol %)
6. skupina žrtvovana neposredno nakon izlaganja IR (1Gy)
7. skupina žrtvovana 2 sata nakon izlaganja IR (1Gy)
8. skupina žrtvovana 6 sati nakon izlaganja IR (1Gy)
9. skupina žrtvovana 24 sata nakon izlaganja IR (1Gy)
10. skupina žrtvovana neposredno nakon izlaganja izofluranu (1,7 vol %) i IR (1Gy)
11. skupina žrtvovana 2 sata nakon izlaganja izofluranu (1,7 vol %) i IR (1Gy)
12. skupina žrtvovana 6 sati nakon izlaganja izofluranu (1,7 vol %) i IR (1Gy)
13. skupina žrtvovana 24 sata nakon izlaganja izofluranu (1,7 vol %) i IR (1Gy)



### **3.1.1. Anestezija i zračenje**

Ovisno o skupini, miševi su anestezirani izofluranom (1,7 vol%) u kontinuiranom protoku mješavine kisika i zraka u omjeru 50:50 u indukcijskoj komori spojenoj s anestezijskim uređajem (Sulla 800, Dräger). Anestezija je provedena u periodu od dva sata, tijekom kojeg su miševi mirno spavali, spontano disali i nisu odgovarali na podražaje (pedalni refleks).

Također, miševi su ovisno o skupini ozračeni primjenom X- zračenja (KB Sveti Duh, Zagreb) u dijagnostički relevantnoj dozi od 1 Gy. Kao izvor IR-a korišten je kobalt (<sup>60</sup>Co-Theratron Phoenix teletherapy unit, Atomic Energy Ltd.), a brzina doze iznosila je 1,88 Gy/min.

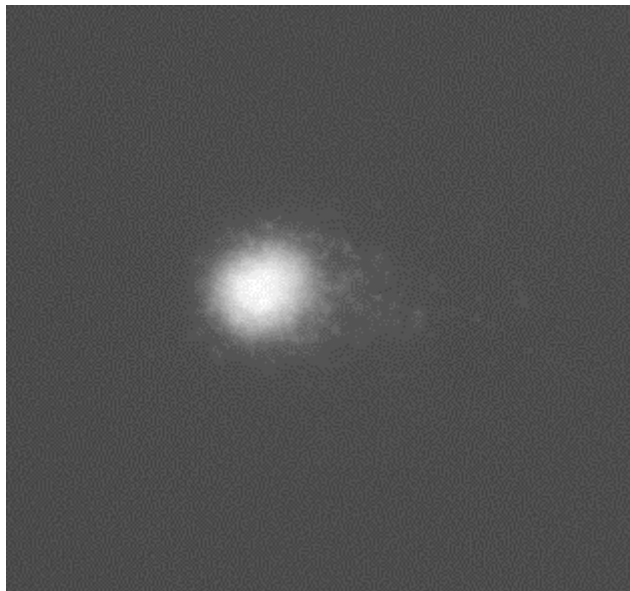
### **3.1.2. Priprema uzoraka**

Miševi su žrtvovani cervikalnom dislokacijom (dopuštena metoda za male glodavce prema Pravilniku o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13; 39/17). Iz svake skupine uzeti su uzorci leukocita periferne krvi, tkiva jetre, bubrega i mozga. Uzorci krvi (5 µL) skupljeni su iz repne vene. Uzorci tkiva mozga, jetre i bubrega priređeni su mehaničkim usitnjavanjem u puferu za homogenizaciju (0,075 M NaCl i 0,024 M Na<sub>2</sub>EDTA) u omjeru 1 g tkiva na 1 mL pufera. Pufer je držan u hladnjaku na 4° C. Za metodu komet testa u alkalnim uvjetima korišteno je 5 µL priređenih homogenata.

## **3.2. Alkalni komet test**

Komet test, odnosno tehnika pojedinačnih stanica u gelu, često je korištena brza, jednostavna i osjetljiva metoda kojom je moguće mjeriti primarna oštećenja DNA u pojedinačnim stanicama u svrhu određivanja nastalih oštećenja. Izolirane stanice u mješavini agaroznog gela nanose se na predmetno stakalce i pritom se rasprostru kroz gel, te se nakon solidifikacije stanice liziraju čime se njihova DNA oslobađa od staničnih komponenti (stanična membrana, citoplazma i jezgrina ovojnica). Nakon lize provodi se denaturacija za oslobađanje mjesta na DNA gdje su nastala oštećenja, a zatim slijedi elektroforeza, neutralizacije, te priprema preparata za analiziranje koje uključuje bojanje fluorescentnom bojom sa sposobnošću vezanja za DNA (Karahana i sur., 2017). Manji fragmenti DNA, nastali uslijed

oštećenja, gelom putuju dalje od neoštećenih dijelova DNA i od same jezgre DNA koja zbog manjeg promjera agaroznih pora od njenog promjera ostaje na svom uklopljenom agaroznom mjestu. Krajnji korak podrazumijeva analizu slike koja prikazuje glavu (sadrži neoštećenu DNA) i rep kometa (sadrži fragmente DNA) (Møller i sur., 2014). Uz bojanje fluorescentnim bojama, metoda zahtjeva i uporabu fluorescencijskog mikroskopa. Alkalni komet test najčešće se koristi za detekciju jednolančanih lomova, no različitim modifikacijama metode moguće je kvantificirati i dvolančane lomove, oksidaciju purinskih i primidinskih baza te male količine promjena u molekuli DNA (Collins, 2004; Kucharova i sur., 2020). Zahvaljujući osjetljivosti i mogućnosti kvantitativnih mjerenja, komet test je metoda koja se uobičajeno koristi u testovima genotoksičnosti, ispitivanjima kemijske sigurnosti, ekološkim i sličnim testovima (Collins, 2004; Singh 2018).



**Slika 3.** Karakterističan izgled kometa pod epifluorescencijskim mikroskopom nakon provedbe komet testa, povećanje 400x.

U istraživanju je korištena standardna metoda komet testa u alkalnim uvjetima (Singh i sur. 1988.; Collins 2004) na leukocitima periferne krvi, te stanicama tkiva mozga, jetre i bubrega.

Na brušena predmetna stakalca nanesen je sloj 1%-tne agaroze normalne točke tališta (NMP engl. *normal melting point*), potom su stakalca sušena na sobnoj temperaturi. Na tako

pripremljena stakalca dodano je 500  $\mu$ L 0,6%-tne agaroze NMP. Nakon 10 minuta inkubacije na ledu, dodan je sloj od 5  $\mu$ L uzorka pomiješanog sa 100  $\mu$ L 0,5%-tne agaroze niske točke tališta (LMP engl. *low melting point*). Preparati su zatim prekriveni novim slojem 0,5%-tne agaroze LMP (100  $\mu$ L). Tako pripremljeni mikrogelovi nakon solidifikacije na 4°C od 10 minuta, uronjeni su u hladni svježi pufer za liziranje staničnih membrana (pH=10; 2,5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1% Na-sarkozinata, 1% Triton X-100 i 10% DMSO) tijekom 2 sata na 4°C. Nakon lize stanica, preparati su prebačeni u pufer za denaturaciju (pH=13) na period od 20 minuta. Zatim je provedena elektroforeza u istom puferu na 25 V tijekom 20 minuta. Nakon elektroforeze, preparati su neutralizirani Tris-HCl-om (pH 7,5) tri puta po 5 minuta, dehidrirani u apsolutnom alkoholu te pohranjeni do analize na suhom i tamnom mjestu. Prije analize preparati su rehidrirani destiliranom vodom tijekom 10 minuta, obojeni etidij-bromidom (20  $\mu$ g/mL), te analizirani pod epifluorescencijskim mikroskopom pomoću računalnog sustava za analizu slike Comet assay IV (Perceptive Instruments Ltd., Instem, London, Velika Britanija). Izmjereni su parametri: dužina repa kometa (udaljenost fragmenata DNA u repu od glave kometa, engl. *tail length* ili TL), intenzitet repa kometa (postotak DNA u repu kometa, engl. *tail intensity* ili TI) i repni moment (umnožak dužine kometa i postotka DNA u repu kometa, engl. *tail moment* ili TM). Svi uzorci su pripremljeni u duplikatima, te je za jedan uzorak u grupi izmjereno ukupno 50 kometa, dakle za jednu mjerenu točku ukupno 200 kometa.

### 3.3. Stanični indeks popravka DNA

Stanični indeks popravka DNA (CRI; engl. *cellular DNA repair index*) koristili smo za kvantifikaciju učinkovitosti staničnog popravka. Stanični indeks popravka DNA izveden je na temelju parametara kometa, točnije, za svaki parametar definiran je kao postotak smanjenja oštećenja uslijed popravka, a definiran formulom (Nair i Nair, 2013):

$$CRI = \left[ 1 - \left( \frac{\text{vrijednost parametra kometa u vremenu } t}{\text{vrijednost parametra kometa u početnom vremenu } t_0} \right) \right] \times 100$$

### 3.4. Statističke metode

Promatrani parametri (dužina repa kometa, intenzitet repa kometa, repni moment) analizirani su pomoću deskriptivne statistike u programu Microsoft Office Excel. Dobivene su srednje vrijednosti sa standardnom pogreškom (SE), medijani (med) te minimalna (min) i maksimalna (maks) vrijednost svakog parametra, te interval u kojem se nalazi minimalno 25 i maksimalno 75% svih vrijednosti izmjerenih za svaku mjernu točku od 800 kometa. Pomoću računalnog programa STATISTICA 9.0 (StatSoft, Tulsa, SAD) obrađeni su rezultati, te je primijenjena Break Down Anova analiza varijance s post hoc Scheffè-vom modifikacijom u svrhu usporedbe razlika u oštećenju DNA.

## 4. REZULTATI

Primarna oštećenja DNA u leukocitima periferne krvi, stanicama bubrega, jetre i mozga promatrana su unutar 13 skupina - kontrolna (bez tretmana), neposredno nakon (0h), nakon 2 sata (2 h), nakon 6 sati (6 h) i 24 sata nakon (24 h) tretmana izofluranom, ionizirajućim zračenjem te kombiniranog tretmana izofluranom i ionizirajućim zračenjem, a svaku skupinu činila su po 4 miša. Za procjenu primarnih oštećenja DNA u navedenim stanicama korištena je metoda alkalnog komet testa, a korištena su tri parametra kometa – dužina repa (TL), intenzitet repa (TI) i repni moment (TM). Vrijednosti parametara analizirane su pomoću deskriptivne statistike, a kao prag statističke značajnosti korišten je  $p < 0,05$ . Učinkovitost staničnog popravka DNA za svaku vrstu stanica procijenjena je pomoću staničnog indeksa popravka (CRI).

### 4.1. Leukociti periferne krvi

Korištenjem četiriju parametara deskriptivne statistike – srednja vrijednost sa standardnom pogreškom, medijan, minimum i maksimum, analizirani su parametri kometa, odnosno, dužina repa (TL), intenzitet repa (TI) i repni moment kometa (TM). Izmjerene vrijednosti parametra TL u svim skupinama tretiranim izofluranom statistički su značajno ( $p < 0,05$ ) više u odnosu na kontrolnu skupinu. Srednje vrijednosti parametra dužine repa kometa u skupinama tretiranim izofluranom su u odnosu  $2\text{ h} > 24\text{ h} > 6\text{ h} > 0\text{ h}$ . Vrijednost parametra TL 24 h nakon tretmana izofluranom je statistički značajno viša u odnosu na onu 0 h, a niža u odnosu na onu 2 h. Među skupinama tretiranim IR-em, sve su vrijednosti parametra TL statistički značajno više u odnosu na vrijednost izmjerenu u kontrolnoj skupini, izuzev one od 6 h. Unutar skupina tretiranih IR-em odnos srednjih vrijednosti parametra TL je  $0\text{ h} > 24\text{ h} > 2\text{ h} > 6\text{ h}$ . Vrijednost parametra TL izmjerena 2 h nakon tretmana statistički je značajno niža u odnosu na onu od 0 h. Vrijednost parametra TL izmjerena 6 h nakon tretmana statistički je značajno niža u odnosu na one izmjerene nakon 0 h i 2 h, a u skupini od 24 h je statistički značajno viša u odnosu na onu od 6 h. Vrijednosti parametra TL izmjerene pri kombiniranom tretmanu izofluranom i IR-em statistički su značajno više u odnosu na kontrolnu skupinu, a u međusobnom odnosu  $6\text{ h} > 24\text{ h} > 2\text{ h} > 0\text{ h}$ . Vrijednost parametra TL nakon 6 h statistički je značajno viša u odnosu na onu od 0 h (Tablica 1, Slika 4).

Sve su vrijednosti parametra TI, u svim skupinama tretiranim izofluranom, statistički značajno više u usporedbi s kontrolnom skupinom. Vrijednosti parametra TI promatrane u skupinama tretiranim izofluranom u međusobnom su odnosu  $6\text{ h} > 0\text{ h} > 24\text{ h} > 2\text{ h}$ . Vrijednosti TI izmjerene u skupinama tretiranim IR-em statistički su značajno više u odnosu na kontrolnu. Pri tretmanu IR-em, međusobni odnos izmjerenih srednjih vrijednosti parametra TI po skupinama je  $6\text{ h} > 0\text{ h} > 24\text{ h} > 2\text{ h}$ . U skupinama unutar kombiniranog tretmana, vrijednosti parametra TI statistički su značajno više od kontrolne, izuzev one od 0 h. Odnos srednjih vrijednosti TI unutar kombiniranog tretmana jest  $6\text{ h} > 24\text{ h} > 2\text{ h} > 0\text{ h}$  (Tablica 1, Slika 5).

Među skupinama tretiranim izofluranom, samo je vrijednost parametra TM 0 h statistički značajno viša od kontrolne. Unutar tretmana izofluranom, srednje vrijednosti TM u odnosu su  $24\text{ h} > 6\text{ h} > 0\text{ h} > 2\text{ h}$ . Za tretman IR-em sve su vrijednosti parametra TM, osim one nakon 2 h, statistički značajno veće u odnosu na kontrolnu. Odnos srednjih vrijednosti parametra TM, unutar skupina tretiranih IR-em je  $0\text{ h} > 6\text{ h} > 24\text{ h} > 2\text{ h}$ . U skupinama tretiranim kombinacijom izoflurana i IR-a, vrijednosti parametra TM nakon 6 h i 24 h statistički su značajno više od kontrolne. Za srednje vrijednosti istoga parametra izmjerenih u skupinama ovoga tretmana vrijedi odnos  $24\text{ h} > 2\text{ h} > 6\text{ h} > 0\text{ h}$  (Tablica 1).

Sve statističke značajnosti izmjerenih parametara komet testa između svih tretiranih grupa u leukocitima periferne krvi prikazane su u Tablici 1.

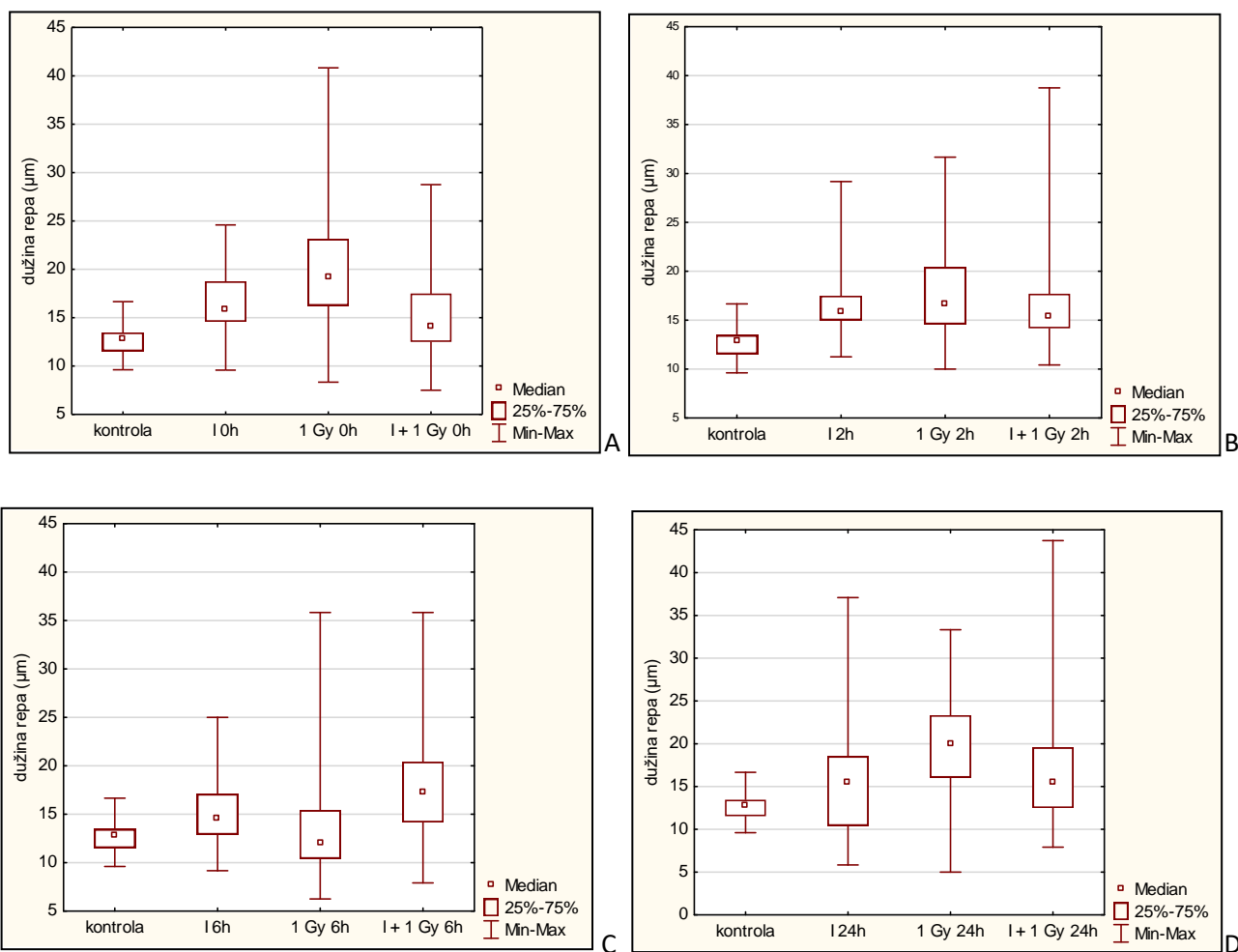
**Tablica 1.** Primarna oštećenja DNA u leukocitima periferne krvi izmjerena komet testom u periodima od 0/2/6/24 h nakon izlaganja: izofluranu (1,7 vol %); ionizirajućem zračenju (1 Gy); izofluranu i ionizirajućem zračenju, izražena parametrima: dužina repa ( $\mu\text{m}$ ), intenzitet repa (% DNA) i repni moment.

		DUŽINA REPA ( $\mu\text{m}$ )				INTENZITET REPA (% DNA)				REPNI MOMENT			
		SV $\pm$ SE	med	min	maks	SV $\pm$ SE	med	min	maks	SV $\pm$ SE	med	min	maks
<b>kontrola</b>		12,53 $\pm$ 0,10	12,82	9,61	16,67	1,13 $\pm$ 0,17	0,26	0,00	2,15	0,12 $\pm$ 0,02	0,03	0,00	2,15
<b>izofluran</b>	<b>0 h</b>	14,91 $\pm$ 0,15 a	15,00	9,58	24,58	3,80 $\pm$ 0,41 a	0,85	0,00	30,50	0,28 $\pm$ 0,03 a	0,06	0,00	2,73
	<b>2 h</b>	16,41 $\pm$ 0,16 a	15,83	11,25	29,17	3,13 $\pm$ 0,29 a	1,17	0,00	21,20	0,25 $\pm$ 0,02	0,10	0,00	1,68
	<b>6 h</b>	14,96 $\pm$ 0,22 a	14,58	9,17	25,00	3,98 $\pm$ 0,43 a	0,92	0,00	45,31	0,30 $\pm$ 0,03	0,07	0,00	3,57
	<b>24 h</b>	15,12 $\pm$ 0,39 a, b, c	15,42	5,83	37,08	3,73 $\pm$ 0,55 a	1,74	0,00	99,09	0,34 $\pm$ 0,10	0,10	0,00	19,65
<b>ionizirajuće zračenje (1 Gy)</b>	<b>0 h</b>	20,06 $\pm$ 0,38 a, b, c, d, e	19,17	8,33	40,83	6,11 $\pm$ 0,78 a	2,70	0,00	99,41	0,55 $\pm$ 0,09 a, c	0,23	0,00	16,17
	<b>2 h</b>	17,56 $\pm$ 0,30 a, d, e, f	16,67	10,00	31,67	3,95 $\pm$ 0,36 a	1,82	0,00	22,91	0,30 $\pm$ 0,03	0,13	0,00	1,97
	<b>6 h</b>	13,70 $\pm$ 0,37 b, c, d, f, g	12,08	6,25	35,83	6,19 $\pm$ 0,71 a	2,48	0,00	99,08	0,47 $\pm$ 0,08 a	0,19	0,00	14,79
	<b>24 h</b>	19,68 $\pm$ 0,39 a, b, c, d, e, h	20,00	5,00	33,33	3,99 $\pm$ 0,32 a	1,96	0,01	18,99	0,32 $\pm$ 0,02 a	0,21	0,00	1,52
<b>izofluran + ionizirajuće zračenje (1 Gy)</b>	<b>0 h</b>	15,34 $\pm$ 0,26 a, f, g, h, i	14,17	7,50	28,75	2,36 $\pm$ 0,26 f, h, i	0,38	0,00	17,33	0,17 $\pm$ 0,02 f, h	0,02	0,00	1,15
	<b>2 h</b>	16,58 $\pm$ 0,28 a, e, f, h, i	15,42	10,42	38,75	3,74 $\pm$ 0,59 a	0,71	0,00	99,64	0,35 $\pm$ 0,11 f	0,06	0,00	22,20
	<b>6 h</b>	17,70 $\pm$ 0,33 a, d, e, f, h, j	17,29	7,92	35,83	4,81 $\pm$ 0,46 a	1,66	0,00	29,91	0,34 $\pm$ 0,03 a	0,12	0,00	2,33
	<b>24 h</b>	17,00 $\pm$ 0,44 a, e, f, h, i	15,42	7,92	43,75	4,73 $\pm$ 0,44 a	1,66	0,00	27,17	0,37 $\pm$ 0,03 a	0,15	0,00	2,21

Mjerenja su provedena na ukupno 200 pojedinačnih kometa (50 po svakoj životinji).

SV – srednja vrijednost; SE – standardna pogreška; med – medijan; min – minimalna vrijednost; maks – maksimalna vrijednost

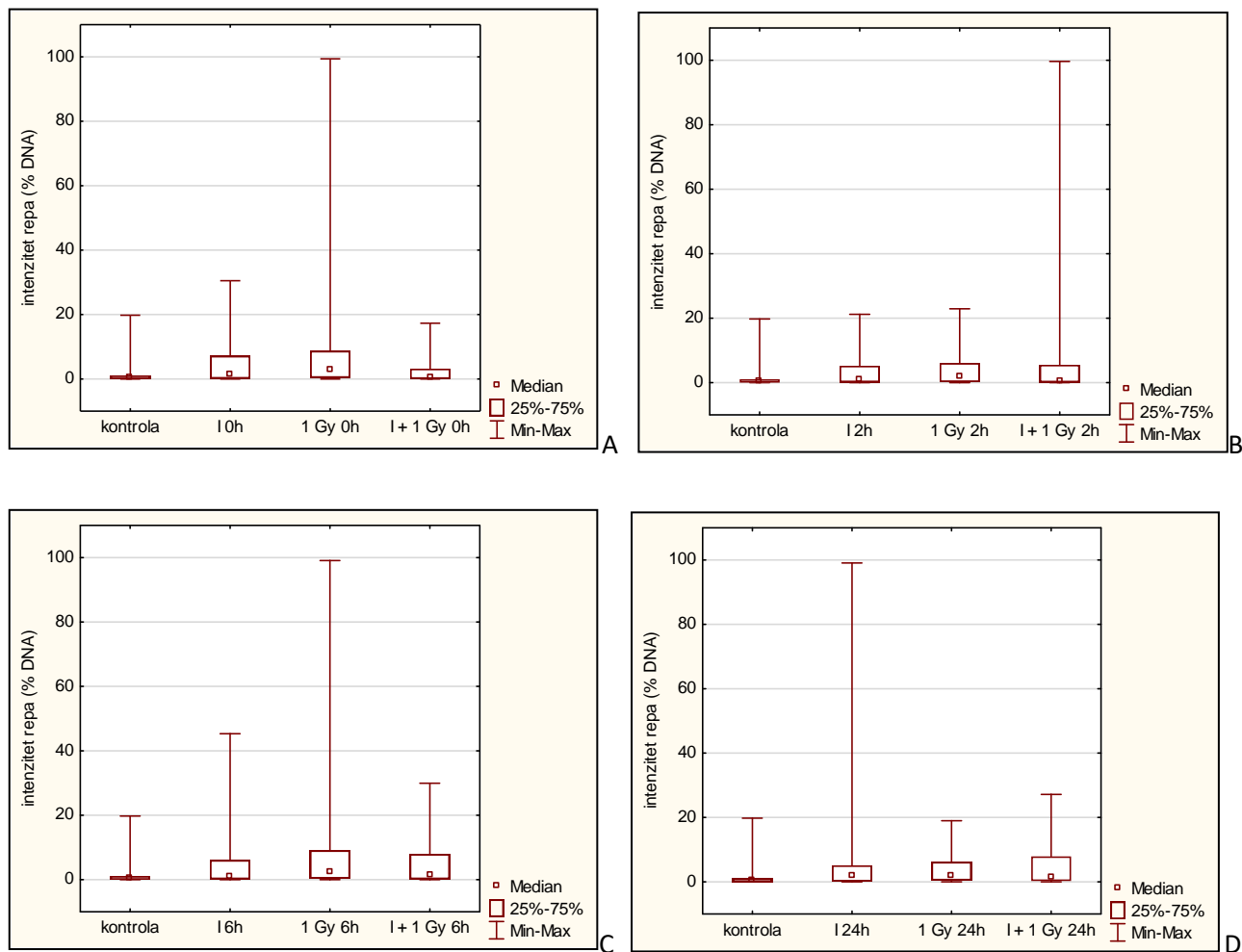
statistička značajnost ( $p < 0,05$ ): a – u odnosu na kontrolu; b – u odnosu na izofluran (0h); c – u odnosu na izofluran (2h); d – u odnosu na izofluran (6h); e – u odnosu na izofluran (24h); f – u odnosu na IR (0h); g – u odnosu na IR (2h); h – u odnosu na IR (6h); i – u odnosu na IR (24h); j – u odnosu na izofluran + IR (0h); k – u odnosu na izofluran + IR (2h); l – u odnosu na izofluran + IR (6h); m – u odnosu na izofluran + IR (24h); IR – ionizirajuće zračenje



**Slika 4.** Vrijednost dužine repa kometa ( $\mu\text{m}$ ) u leukocitima periferne krvi: neposredno nakon (A), nakon 2 sata (B), nakon 6 sati (C) i nakon 24 sata od izlaganja anestetiku izofluranu i/ili zračenju 1 Gy (D).

Mjerenja su provedena na ukupno 200 pojedinačnih kometa. Prikazani su rezultati deskriptivne statistike. Min-max – minimalna i maksimalna vrijednost; kontrola – bez tretmana; I – tretman izofluranom; 1 Gy – izlaganje ionizirajućem zračenju (1 Gy); I + 1 Gy – izlaganje izofluranu + ionizirajućem zračenju (1 Gy)





**Slika 5.** Vrijednost intenziteta repa kometa (% DNA) u leukocitima periferne krvi: neposredno nakon (A), nakon 2 sata (B), nakon 6 sati (C) i nakon 24 sata od izlaganja anestetiku izofluranu i/ili zračenju 1 Gy (D).

Mjerenja su provedena na ukupno 200 pojedinačnih kometa. Prikazani su rezultati deskriptivne statistike. Min-max – minimalna i maksimalna vrijednost; kontrola – bez tretmana; I – tretman izofluranom; 1 Gy – izlaganje ionizirajućem zračenju (1 Gy); I + 1 Gy – izlaganje izofluranu + ionizirajućem zračenju (1 Gy)

## 4.2. Stanice bubrega

U stanicama bubrega, parametri dužina repa (TL), intenzitet repa (TI) i repni moment (TM) kometa analizirani su pomoću deskriptivne statistike. Vrijednosti parametra TL izmjerene unutar skupina tretiranih izofluranom 2 h i 24 h nakon tretmana, statistički su značajno ( $p < 0,05$ ) više u odnosu na 0 h, a vrijednost 24 h nakon također je statistički značajno viša u odnosu na 6 h. U skupinama tretiranim izofluranom, izmjerene srednje vrijednosti parametra TL su u odnosu  $24\text{ h} > 2\text{ h} > 6\text{ h} > 0\text{ h}$ . Među skupinama tretiranim IR-em (1 Gy), vrijednost parametra TL statistički je značajno viša nakon 24 h u odnosu na kontrolnu skupinu. Odnos vrijednosti parametra TL unutar skupina za tretman IR-em jest  $24\text{ h} > 0\text{ h} > 2\text{ h} > 6\text{ h}$ . Vrijednost parametra TL izmjerena u skupini 24 h nakon ozračivanja, statistički je značajno viša u odnosu na one izmjerene u svim ostalim skupinama unutar istoga tretmana. Statistički je značajno viša i vrijednost parametra TL izmjerena 6 h nakon ozračivanja u usporedbi s 0 h. Vrijednosti parametra TL unutar skupine 24 h nakon kombiniranog tretmana, statistički je značajno viša od kontrolne skupine. Unutar kombiniranog tretmana, srednje vrijednosti parametra TL unutar skupina opisuje odnos  $24\text{ h} > 0\text{ h} > 6\text{ h} > 2\text{ h}$ . Vrijednost TL izmjerena 24 h po tretmanu, također je statistički značajno viša od one 2 h nakon (Tablica 2, Slika 6).

Vrijednosti parametra TI kometa izmjerene u skupinama 0 h i 24 h nakon tretmana izofluranom, statistički su značajno više u odnosu na kontrolnu, za razliku od onih izmjerenih u 2 h i 6 h, koje su statistički značajno niže. Vrijednosti parametra TI kometa unutar tretmana izofluranom, odnosno skupina, opisuje odnos  $24\text{ h} > 0\text{ h} > 2\text{ h} > 6\text{ h}$ . Među ozračenim skupinama, sve su vrijednosti parametra TI statistički značajno više od kontrolne. Srednje vrijednosti parametra TI unutar skupina tretiranih IR-em opisuje međuodnos  $6\text{ h} > 24\text{ h} > 0\text{ h} > 2\text{ h}$ . Vrijednost TI izmjerena nakon 6 h je statistički značajno viša u odnosu na 2 h. Sve su vrijednosti parametra TI unutar skupina podvrgnutih kombiniranom tretmanu statistički značajno više u odnosu na kontrolnu skupinu. Srednje vrijednosti parametra TI u skupinama tretiranim kombiniranim tretmanom u odnosu su  $2\text{ h} > 24\text{ h} > 6\text{ h} > 0\text{ h}$  (Tablica 2, Slika 7).

Vrijednosti parametra TM izmjerene u skupinama 0 h i 24 h nakon tretmana izofluranom, statistički su značajno više, dok su one izmjerene 2 h i 6 h nakon tretmana statistički značajno niže u odnosu na kontrolnu skupinu. Među uzorcima tretiranim izofluranom, odnosno skupinama, izmjerene vrijednosti parametra TM u odnosu su  $24\text{ h} > 0\text{ h} > 2\text{ h} > 6\text{ h}$ . Sve su vrijednosti parametra TM unutar ozračenih skupina, statistički značajno više u odnosu na kontrolnu. Srednje vrijednosti TM unutar skupina podvrgnutih IR-em u

međusobnom su odnosu  $6\text{ h} > 24\text{ h} > 0\text{ h} > 2\text{ h}$ . Vrijednost parametra TM izmjerena 6 h nakon ozračivanja, statistički je značajno viša od 2 h. Sve su vrijednosti parametra TM u skupinama tretiranim kombiniranim tretmanom, statistički su značajno više od kontrolne skupine. Odnos srednjih vrijednosti TM u skupinama kombiniranog tretmana jest  $6\text{ h} > 0\text{ h} > 2\text{ h} > 24\text{ h}$  (Tablica 2).

Sve statističke značajnosti izmjerenih parametara komet testa, između svih tretiranih skupina, prikazane su u Tablici 2.

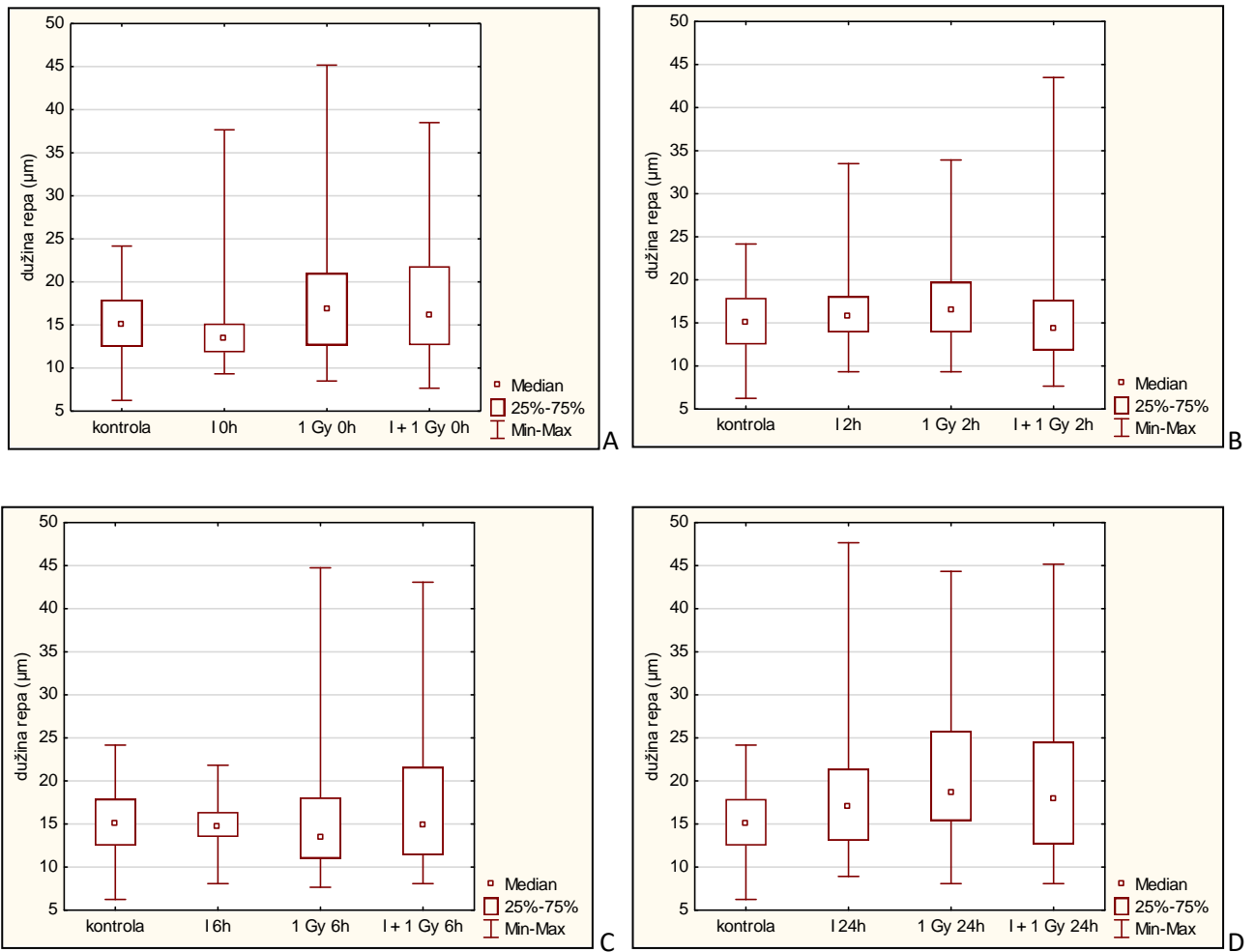
**Tablica 2.** Primarna oštećenja DNA u stanicama bubrega izmjerena komet testom u periodima od 0/2/6/24 h nakon izlaganja: izofluranu (1,7 vol %); ionizirajućem zračenju (1 Gy); izofluranu i ionizirajućem zračenju, izražena parametrima: dužina repa ( $\mu\text{m}$ ), intenzitet repa (% DNA) i repni moment.

		DUŽINA REPA ( $\mu\text{m}$ )				INTENZITET REPA (% DNA)				REPNI MOMENT			
		SV $\pm$ SE	med	min	maks	SV $\pm$ SE	med	min	maks	SV $\pm$ SE	med	min	maks
<b>kontrola</b>		15,43 $\pm$ 0,28	15,00	6,25	24,17	4,85 $\pm$ 0,57	0,41	0,00	39,81	0,35 $\pm$ 0,04	0,02	0,00	2,90
<b>izofluran</b>	<b>0 h</b>	13,14 $\pm$ 0,25	12,50	8,33	36,67	7,13 $\pm$ 0,83 a	2,57	0,00	99,80	0,52 $\pm$ 0,07 a	0,18	0,00	11,58
	<b>2 h</b>	15,44 $\pm$ 0,27 b	14,79	8,33	32,50	4,24 $\pm$ 0,41 a	1,17	0,00	24,76	0,35 $\pm$ 0,04 a	0,09	0,00	3,17
	<b>6 h</b>	13,80 $\pm$ 0,16	13,75	7,08	20,83	3,95 $\pm$ 0,42 a	1,82	0,00	43,11	0,30 $\pm$ 0,03 a	0,15	0,00	3,22
	<b>24 h</b>	17,06 $\pm$ 0,46 b, d	16,04	7,92	46,67	7,23 $\pm$ 0,62 a	3,32	0,00	46,01	0,58 $\pm$ 0,05 a	0,30	0,00	3,83
<b>ionizirajuće zračenje (1 Gy)</b>	<b>0 h</b>	16,90 $\pm$ 0,48 b	15,83	7,50	44,17	6,77 $\pm$ 0,59 a	3,02	0,00	35,82	0,53 $\pm$ 0,05 a	0,22	0,00	4,04
	<b>2 h</b>	16,03 $\pm$ 0,31 b	15,42	8,33	32,92	4,88 $\pm$ 0,48 a	2,32	0,00	42,89	0,39 $\pm$ 0,04 a	0,17	0,00	3,62
	<b>6 h</b>	14,63 $\pm$ 0,49 e, f	12,50	6,67	43,75	11,86 $\pm$ 0,92 a, c, d, g	7,23	0,00	61,85	0,91 $\pm$ 0,08 a, b, c, d, g	0,50	0,00	6,86
	<b>24 h</b>	19,78 $\pm$ 0,52 a, b, c, d, f, g, h	17,71	7,08	43,33	8,66 $\pm$ 0,68 a, c, d	5,20	0,01	38,38	0,73 $\pm$ 0,06 a, c, d	0,42	0,00	3,59
<b>izofluran + ionizirajuće zračenje (1 Gy)</b>	<b>0 h</b>	16,86 $\pm$ 0,47 b, h, i	15,21	6,67	37,50	8,88 $\pm$ 0,78 a	4,02	0,00	51,32	0,69 $\pm$ 0,06 a, d	0,28	0,00	4,69
	<b>2 h</b>	15,05 $\pm$ 0,45 i	13,33	6,67	42,50	6,09 $\pm$ 0,85 a, h	1,66	0,00	99,25	0,59 $\pm$ 0,13 a, h	0,12	0,00	20,62
	<b>6 h</b>	16,13 $\pm$ 0,49 b, i	13,96	7,08	42,08	9,65 $\pm$ 0,95 a, c, d	5,08	0,00	67,23	0,74 $\pm$ 0,08 a, d	0,33	0,00	6,26
	<b>24 h</b>	18,62 $\pm$ 0,58 a, b, d, h, k	16,88	7,08	44,17	6,68 $\pm$ 0,66 a, h	2,40	0,00	38,05	0,59 $\pm$ 0,07 a	0,18	0,00	5,27

Mjerenja su provedena na ukupno 200 pojedinačnih kometa ( 50 po svakoj životinji).

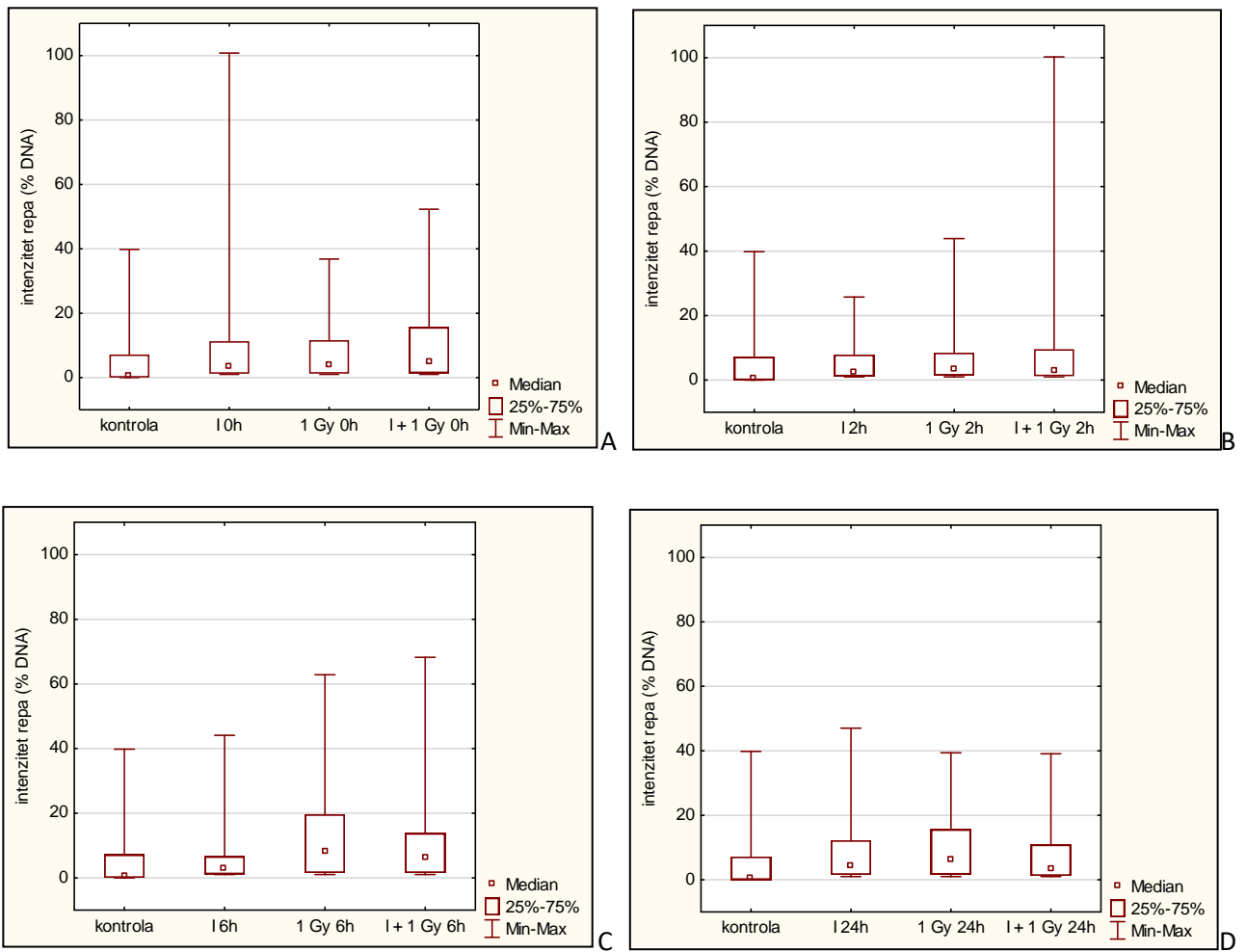
SV – srednja vrijednost; SE – standardna pogreška; med – medijan; min – minimalna vrijednost; maks – maksimalna vrijednost

statistička značajnost ( $p < 0,05$ ): a – u odnosu na kontrolu; b – u odnosu na izofluran (0h); c – u odnosu na izofluran (2h); d – u odnosu na izofluran (6h); e – u odnosu na izofluran (24h); f – u odnosu na IR (0h); g – u odnosu na IR (2h); h – u odnosu na IR (6h); i – u odnosu na IR (24h); j – u odnosu na izofluran + IR (0h); k – u odnosu na izofluran + IR (2h); l – u odnosu na izofluran + IR (6h); m – u odnosu na izofluran + IR (24h); IR – ionizirajuće zračenje



**Slika 6.** Vrijednost dužine repa kometa ( $\mu\text{m}$ ) u stanicama bubrega: neposredno nakon (A), nakon 2 sata (B), nakon 6 sati (C) i nakon 24 sata od izlaganja izofluranu i/ili zračenju 1 Gy (D).

Mjerenja su provedena na ukupno 200 pojedinačnih kometa. Prikazani su rezultati deskriptivne statistike. Min-max – minimalna i maksimalna vrijednost; kontrola – bez tretmana; I – tretman izofluranom; 1 Gy – izlaganje ionizirajućem zračenju (1 Gy); I + 1 Gy – izlaganje izofluranu + ionizirajućem zračenju (1 Gy)



**Slika 7.** Vrijednost intenziteta repa kometa (% DNA) u stanicama bubrega: neposredno nakon (A), nakon 2 sata (B), nakon 6 sati (C) i nakon 24 sata od izlaganja izofluranu i/ili zračenju 1 Gy (D).

Mjerenja su provedena na ukupno 200 pojedinačnih kometa. Prikazani su rezultati deskriptivne statistike. Min-max – minimalna i maksimalna vrijednost; kontrola – bez tretmana; I – tretman izofluranom; 1 Gy – izlaganje ionizirajućem zračenju (1 Gy); I + 1 Gy – izlaganje izofluranu + ionizirajućem zračenju (1 Gy)

### 4.3. Stanice jetre

U stanicama jetre tri su parametra kometa – dužina repa (TL), intenzitet repa (TI) i repni moment (TM), analizirana pomoću deskriptivne statistike. Izmjerene vrijednosti parametra TL u svim skupinama tretiranim izofluranom nisu pokazale statistički značajne ( $p < 0,05$ ) razlike u odnosu na kontrolnu skupinu, niti unutar samih skupina. Međusobni odnos srednjih vrijednosti parametra TL unutar skupina tretmana izofluranom jest  $2\text{ h} > 24\text{ h} > 0\text{ h} > 6\text{ h}$ . Sve su se vrijednosti parametra TL, izmjerene u skupinama podvrgnutima IR-u (1 Gy), pokazale statistički značajno višima u odnosu na kontrolnu skupinu. Izmjerene vrijednosti parametra TL unutar ozračenih skupina pokazale su međusobni odnos  $0\text{ h} > 2\text{ h} > 6\text{ h} > 24\text{ h}$ . Vrijednosti parametra TL izmjerene u skupinama 6 h i 24 h nakon tretmana zračenjem, statistički su značajno niže od 0 h i 2 h. Za vrijednosti parametra TL unutar skupina kombiniranog tretmana vrijedi, da su one 0 h i 2 h nakon tretmana statistički značajno više od onih u kontrolnoj skupini. Vrijednosti parametra TL izmjerene unutar skupina kombiniranog tretmana izofluranom i IR-em u odnosu su  $0\text{ h} > 2\text{ h} > 6\text{ h} > 24\text{ h}$ . Vrijednosti parametra TL 6 h i 24 h nakon tretmana, statistički su značajno niže od 0 h i 2 h (Tablica 3, Slika 8).

Vrijednosti parametra TI izmjerene u svim skupinama tretiranim izofluranom nisu pokazale statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu skupinu, a u međusobnom su odnosu  $24\text{ h} > 2\text{ h} > 0\text{ h} > 6\text{ h}$ . Vrijednosti parametra TI izmjerene u svim skupinama tretiranim IR-em statistički su značajno više u odnosu na kontrolnu skupinu. Unutar ozračenih skupina, srednje vrijednosti TI se odnose  $6\text{ h} > 0\text{ h} > 2\text{ h} > 24\text{ h}$ . Sve su vrijednosti parametra TI unutar skupina tretiranih kombiniranim tretmanom izofluranom i ionizirajućim zračenjem statistički značajno više u odnosu na kontrolne, osim one izmjerene 2 h nakon. Izmjerene vrijednosti parametra TI unutar kombiniranog tretmana, odnosno skupina, u odnosu su  $24\text{ h} > 0\text{ h} > 6\text{ h} > 2\text{ h}$  (Tablica 3, Slika 9).

Među skupinama tretiranima izofluranom, vrijednosti parametra TM kometa nisu pokazale statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu skupinu, niti unutar samog tretmana. Odnos vrijednosti parametra TM među skupinama tretiranima izofluranom je  $24\text{ h} > 2\text{ h} > 0\text{ h} > 6\text{ h}$ . Za skupine unutar tretmana IR-em vrijedi da su, vrijednosti parametra TM izmjerene 0 h, 2 h i 6 h nakon ozračivanja, statistički značajno više u odnosu na kontrolnu. Srednje vrijednosti TM među ozračenim skupinama opisuje odnos  $6\text{ h} > 0\text{ h} > 2\text{ h} > 24\text{ h}$ . Također, vrijednost TM 24 h nakon tretmana statistički je značajno niža u odnosu na 6 h. Sve vrijednosti parametra TM unutar kombiniranog tretmana, osim one izmjerene u skupini 2 h nakon

tretmana, statistički su značajno više u odnosu na kontrolnu skupinu. Za parametar TM u skupinama kombiniranog tretmana izofluranom i IR-em, vrijedi odnos  $0\text{ h} > 6\text{ h} > 24\text{ h} > 2\text{ h}$  (Tablica 3).

Statičke značajnosti svih izmjerenih parametara komet testa u stanicama jetre, među svim tretiranim grupama, prikazane su u Tablici 3.



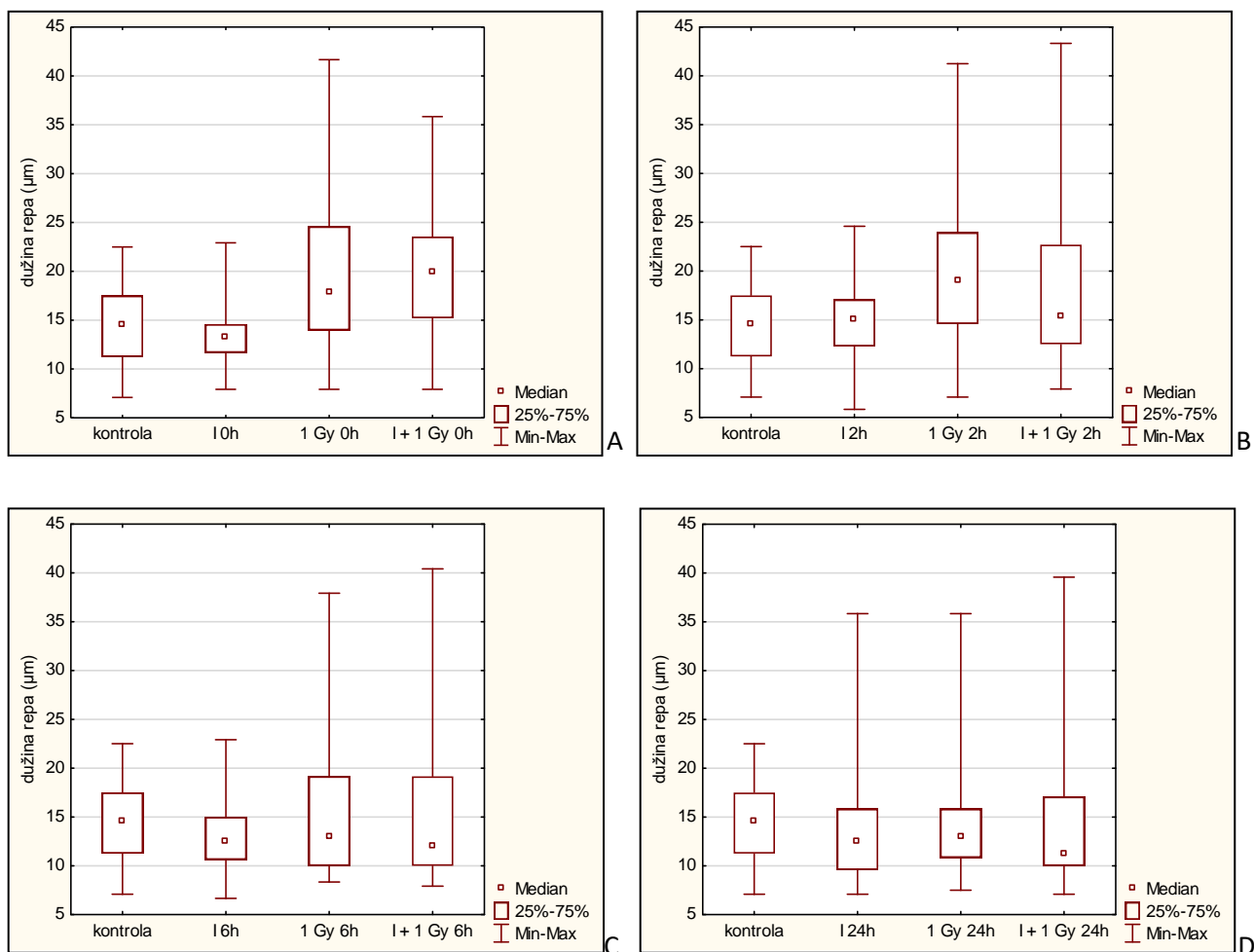
**Tablica 3.** Primarna oštećenja DNA u stanicama jetre izmjerena komet testom u periodima od 0/2/6/24 h nakon izlaganja: izofluranu (1,7 vol %); ionizirajućem zračenju (1 Gy); izofluranu i ionizirajućem zračenju, izražena parametrima: dužina repa ( $\mu\text{m}$ ), intenzitet repa (% DNA) i repni moment.

		DUŽINA REPA ( $\mu\text{m}$ )				INTENZITET REPA (% DNA)				REPNI MOMENT			
		SV $\pm$ SE	med	min	maks	SV $\pm$ SE	med	min	maks	SV $\pm$ SE	med	min	maks
<b>kontrola</b>		14,68 $\pm$ 0,26	14,58	7,08	22,50	2,43 $\pm$ 0,33	0,21	0,00	28,53	0,17 $\pm$ 0,02	0,01	0,00	2,09
<b>izofluran</b>	<b>0 h</b>	13,31 $\pm$ 0,18	13,33	7,92	22,92	3,19 $\pm$ 0,34	0,66	0,00	26,13	0,22 $\pm$ 0,02	0,04	0,00	2,05
	<b>2 h</b>	14,87 $\pm$ 0,23	15,00	5,83	24,58	3,61 $\pm$ 0,37	0,98	0,00	25,10	0,28 $\pm$ 0,03	0,09	0,00	2,16
	<b>6 h</b>	13,09 $\pm$ 0,24	12,50	6,67	22,92	2,89 $\pm$ 0,36	0,98	0,00	32,41	0,21 $\pm$ 0,02	0,07	0,00	2,34
	<b>24 h</b>	13,63 $\pm$ 0,37	12,50	7,08	35,83	4,58 $\pm$ 0,47	1,09	0,00	34,05	0,33 $\pm$ 0,04	0,08	0,00	3,85
<b>ionizirajuće zračenje (1 Gy)</b>	<b>0 h</b>	19,66 $\pm$ 0,51 <i>a, b, c, d, e</i>	17,92	7,92	41,67	6,09 $\pm$ 0,59 <i>a</i>	1,95	0,00	39,66	0,62 $\pm$ 0,08 <i>a, b, d</i>	0,19	0,00	6,84
	<b>2 h</b>	19,64 $\pm$ 0,50 <i>a, b, c, d, e</i>	18,96	7,08	41,25	5,24 $\pm$ 0,48 <i>a</i>	2,26	0,00	31,21	0,50 $\pm$ 0,05 <i>a, b, d</i>	0,21	0,00	5,67
	<b>6 h</b>	15,00 $\pm$ 0,45 <i>f, g</i>	12,92	8,33	37,92	9,41 $\pm$ 0,78 <i>a, b, c, d, e</i>	5,46	0,00	59,45	0,70 $\pm$ 0,06 <i>a, b, c, d, e</i>	0,41	0,00	5,68
	<b>24 h</b>	14,16 $\pm$ 0,38 <i>f, g</i>	12,92	7,50	35,83	5,17 $\pm$ 0,49 <i>a, h</i>	1,78	0,00	34,05	0,38 $\pm$ 0,04 <i>h</i>	0,12	0,00	3,36
<b>izofluran + ionizirajuće zračenje (1 Gy)</b>	<b>0 h</b>	19,72 $\pm$ 0,41 <i>a, b, c, d, e, h, i</i>	20,00	7,92	35,83	5,67 $\pm$ 0,50 <i>a</i>	3,00	0,00	37,80	0,49 $\pm$ 0,05 <i>a, b, d</i>	0,27	0,00	4,46
	<b>2 h</b>	17,99 $\pm$ 0,53 <i>a, b, d, e, h, i</i>	15,42	7,92	43,33	4,42 $\pm$ 0,46 <i>h</i>	0,99	0,00	32,52	0,38 $\pm$ 0,04 <i>h</i>	0,09	0,00	3,27
	<b>6 h</b>	14,71 $\pm$ 0,46 <i>f, g, j, k</i>	12,08	7,92	40,42	5,31 $\pm$ 0,51 <i>a</i>	2,29	0,01	37,81	0,41 $\pm$ 0,05 <i>a, h</i>	0,15	0,00	4,86
	<b>24 h</b>	14,03 $\pm$ 0,44 <i>f, g, j, k</i>	11,25	7,08	39,58	5,71 $\pm$ 0,52 <i>a</i>	2,52	0,01	33,95	0,40 $\pm$ 0,04 <i>a, h</i>	0,14	0,00	2,62

Mjerenja su provedena na ukupno 200 pojedinačnih kometa (50 po svakoj životinji).

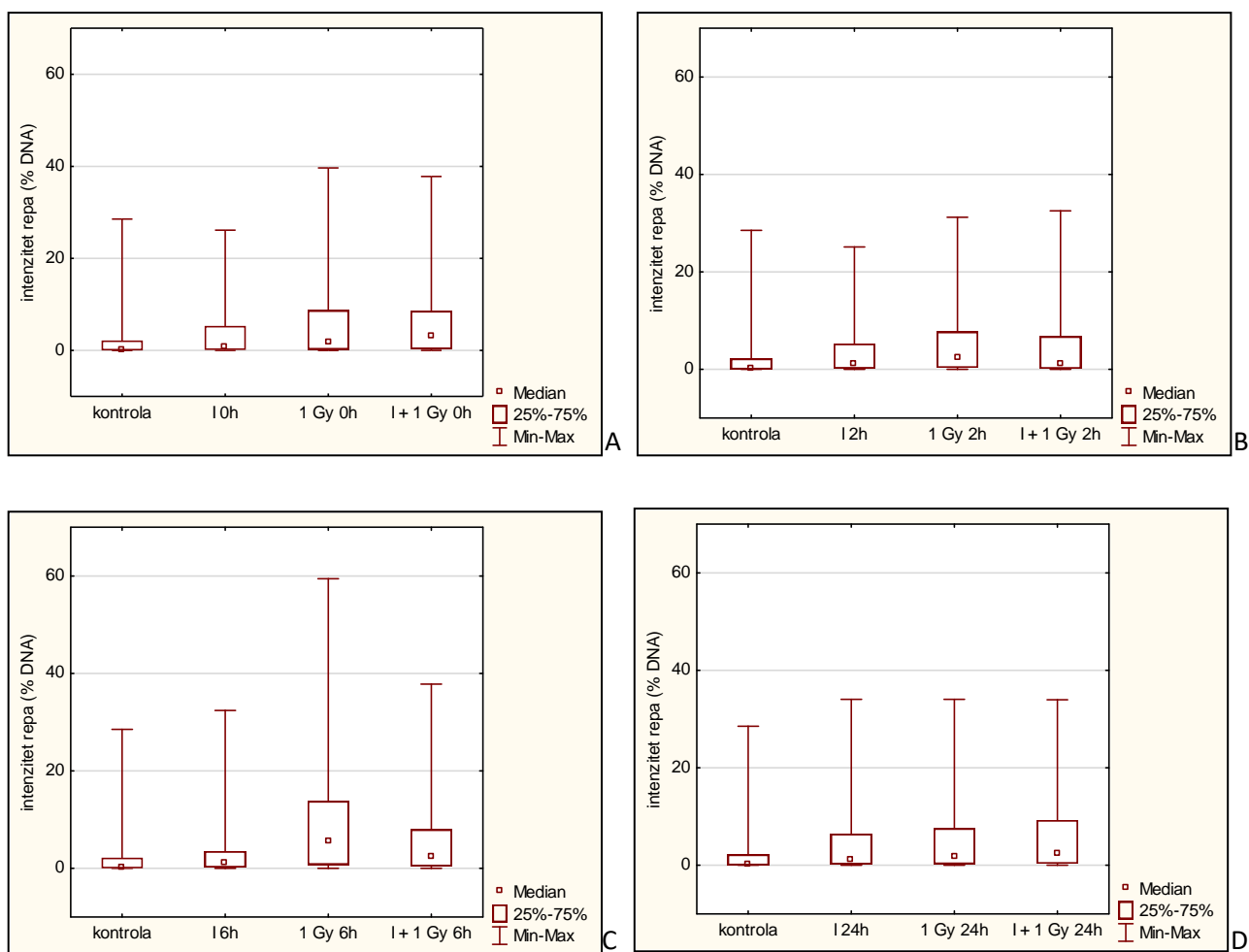
SV – srednja vrijednost; SE – standardna pogreška; med – medijan; min – minimalna vrijednost; maks – maksimalna vrijednost

statistička značajnost ( $p < 0,05$ ): a – u odnosu na kontrolu; b – u odnosu na izofluran (0h); c – u odnosu na izofluran (2h); d – u odnosu na izofluran (6h); e – u odnosu na izofluran (24h); f – u odnosu na IR (0h); g – u odnosu na IR (2h); h – u odnosu na IR (6h); i – u odnosu na IR (24h); j – u odnosu na izofluran + IR (0h); k – u odnosu na izofluran + IR (2h); l – u odnosu na izofluran + IR (6h); m – u odnosu na izofluran + IR (24h); IR – ionizirajuće zračenje



**Slika 8.** Vrijednost dužine repa kometa ( $\mu\text{m}$ ) u stanicama jetre: neposredno nakon (A), nakon 2 sata (B), nakon 6 sati (C) i nakon 24 sata od izlaganja izofluranu i/ili zračenju 1 Gy (D).

Mjerenja su provedena na ukupno 200 pojedinačnih kometa. Prikazani su rezultati deskriptivne statistike. Min-max – minimalna i maksimalna vrijednost; kontrola – bez tretmana; I – tretman izofluranom; 1 Gy – izlaganje ionizirajućem zračenju (1 Gy); I + 1 Gy – izlaganje izofluranu + ionizirajućem zračenju (1 Gy)



**Slika 9.** Vrijednost intenziteta repa kometa (% DNA) u stanicama jetre: neposredno nakon (A), nakon 2 sata (B), nakon 6 sati (C) i nakon 24 sata od izlaganja izofluranu i/ili zračenju 1 Gy (D).

Mjerenja su provedena na ukupno 200 pojedinačnih kometa. Prikazani su rezultati deskriptivne statistike. Min-max – minimalna i maksimalna vrijednost; kontrola – bez tretmana; I – tretman izofluranom; 1 Gy – izlaganje ionizirajućem zračenju (1 Gy); I + 1 Gy – izlaganje izofluranu + ionizirajućem zračenju (1 Gy)

#### 4.4. Stanice mozga

U stanicama mozga parametri kometa – dužina repa (TL), intenzitet repa (TI) i repni moment (TM), analizirani pomoću četiri parametra deskriptivne statistike. Za parametar TL vrijedi da je vrijednost izmjerena 0 h nakon tretmana, statistički značajno niža ( $p < 0,05$ ) u odnosu na kontrolnu. Izmjerene srednje vrijednosti parametra TL unutar skupina tretiranih izofluranom odnose se  $6\text{ h} > 2\text{ h} > 24\text{ h} > 0\text{ h}$ . Vrijednosti parametra TL unutar tretmana izofluranom izmjerene u skupinama 6 h i 2 h, statistički su značajno više u odnosu na vrijednost 0 h. Vrijednosti parametra TL kometa izmjerene u skupinama 0 h i 2 h nakon tretmana IR-em (1 Gy), statistički su značajno više u odnosu na kontrolnu. Odnos vrijednosti parametra TL unutar skupina za tretman IR-em jest  $2\text{ h} > 0\text{ h} > 24\text{ h} > 6\text{ h}$ . Također, one izmjerene u skupinama 6 h i 24 h nakon ozračivanja statistički su značajno niže u odnosu na 0 h i 2 h. Izuzev vrijednosti parametra TL izmjerene 0 h nakon kombiniranog tretmana, sve su ostale statistički značajno više u odnosu na kontrolnu. U skupinama unutar kombiniranog tretmana, vrijednosti parametra TL su u odnosu  $6\text{ h} > 2\text{ h} > 24\text{ h} > 0\text{ h}$  (Tablica 4, Slika 10).

Među skupinama tretiranim izofluranom, vrijednosti parametra TI ne pokazuju statistički značajne razlike, a odnose se  $24\text{ h} > 6\text{ h} > 0\text{ h} > 2\text{ h}$ . Vrijednosti parametra TI izmjerene u skupinama 0 h, 2 h i 24 h nakon ozračivanja, statistički su značajno više od one u kontrolnoj skupini. Odnos srednjih vrijednosti parametra TI pri tretmanu IR-em je  $2\text{ h} > 0\text{ h} > 24\text{ h} > 6\text{ h}$ . Vrijednosti TI u skupinama 6 h i 24 h nakon ozračivanja, statistički su značajno niže u odnosu na 2 h, dok je 6 h također statistički značajno niža od 0 h. Vrijednosti parametra TI u skupinama tretiranim kombiniranim tretmanom, statistički su značajno više u odnosu na kontrolnu. Međusobni odnos srednjih vrijednosti TI izmjerenih nakon kombiniranog tretmana izofluranom i IR-em je  $2\text{ h} > 6\text{ h} > 24\text{ h} > 0\text{ h}$  (Tablica 4, Slika 11).

Za vrijednosti parametra TM unutar skupina tretiranih izofluranom nisu uočene statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu skupinu, a međusobno ih opisuje odnos  $24\text{ h} > 6\text{ h} > 0\text{ h} > 2\text{ h}$ . Pri tretmanu IR-em, vrijednosti parametra TM izmjerene po skupinama statistički su značajno više u odnosu na kontrolnu, izuzev skupine od 6 h. Također, srednje vrijednosti parametra TM ozračenih skupina odnose se  $2\text{ h} > 0\text{ h} > 24\text{ h} > 6\text{ h}$ . Vrijednost TM izmjerena u skupini 2 h nakon ozračivanja, statistički je značajno viša od 0 h, dok su vrijednosti 24 h i 6 h statistički značajno niže od 2 h. Unutar kombiniranog tretmana izofluranom i IR-em, vrijednosti parametra TM u skupinama 2 h i 6 h, statistički su značajno više u odnosu na kontrolnu. Srednje vrijednosti parametra TM izmjerene unutar kombiniranog tretmana

pokazuju odnos  $2\text{ h} > 6\text{ h} > 24\text{ h} > 0\text{ h}$ . Vrijednosti parametra TM u skupinama 2 h i 6 h, statistički su značajno više u odnosu na 0 h. Vrijednost istog parametra u skupini 24 h, statistički je značajno niža od 2 h (Tablica 4).

U Tablici 4 prikazane su statičke značajnosti svih izmjerenih parametara komet testa u stanicama mozga, među svim tretiranim skupinama.

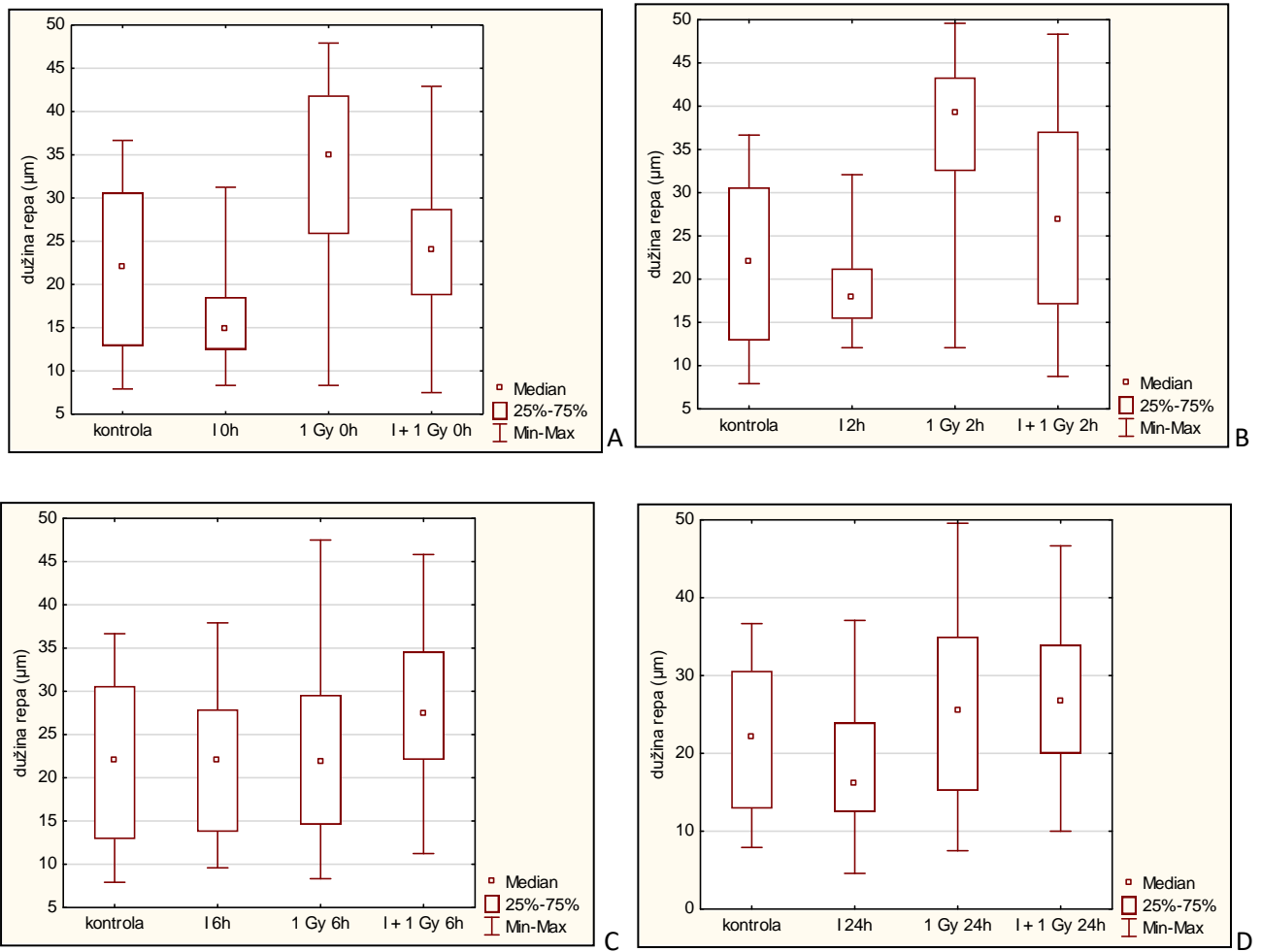
**Tablica 4.** Primarna oštećenja DNA u stanicama mozga izmjerena komet testom u periodima od 0/2/6/24 h nakon izlaganja: izofluranu (1,7 vol %); ionizirajućem zračenju (1 Gy); izofluranu i ionizirajućem zračenju, izražena parametrima: dužina repa ( $\mu\text{m}$ ), intenzitet repa (% DNA) i repni moment.

		DUŽINA REPA ( $\mu\text{m}$ )				INTENZITET REPA (% DNA)				REPNI MOMENT			
		SV $\pm$ SE	med	min	maks	SV $\pm$ SE	med	min	maks	SV $\pm$ SE	med	min	maks
<b>kontrola</b>		22,16 $\pm$ 0,63	22,08	7,92	36,67	8,96 $\pm$ 0,71	5,42	0,00	38,61	0,93 $\pm$ 0,08	0,59	0,00	4,62
<b>izofluran</b>	<b>0 h</b>	15,91 $\pm$ 0,35 a	14,79	8,33	31,25	9,97 $\pm$ 0,83	5,21	0,01	56,00	0,79 $\pm$ 0,07	0,43	0,00	4,61
	<b>2 h</b>	18,60 $\pm$ 0,29 b	17,92	12,08	32,08	8,03 $\pm$ 0,64	4,96	0,01	57,84	0,76 $\pm$ 0,06	0,45	0,00	6,73
	<b>6 h</b>	21,34 $\pm$ 0,54 b	22,08	9,58	37,92	9,98 $\pm$ 0,78	5,15	0,00	41,78	1,04 $\pm$ 0,09	0,40	0,00	4,66
	<b>24 h</b>	18,39 $\pm$ 0,50	16,25	4,58	37,08	13,08 $\pm$ 0,88	9,18	0,04	78,61	1,24 $\pm$ 0,10	0,76	0,00	7,21
<b>ionizirajuće zračenje (1 Gy)</b>	<b>0 h</b>	33,04 $\pm$ 0,76 a, b, c, d, e	35,00	8,33	47,92	18,11 $\pm$ 0,80 a, b, c, d, e	17,94	0,02	39,72	2,87 $\pm$ 0,15 a, b, c, d, e	2,66	0,00	7,80
	<b>2 h</b>	37,00 $\pm$ 0,60 a, b, c, d, e	39,17	12,08	49,58	24,83 $\pm$ 0,79 a, b, c, d, e	26,91	0,02	51,43	4,28 $\pm$ 0,16 a, b, c, d, e, f	4,52	0,00	8,93
	<b>6 h</b>	23,15 $\pm$ 0,69 b, c, e, f, g	21,88	8,33	47,50	10,81 $\pm$ 0,70 f, g	7,57	0,00	47,85	1,16 $\pm$ 0,08 f, g	0,82	0,00	6,31
	<b>24 h</b>	25,95 $\pm$ 0,78 b, c, e, f, g	25,42	7,50	49,58	15,95 $\pm$ 0,81 a, b, c, d, g	14,85	0,01	39,73	1,81 $\pm$ 0,10 a, b, c, d, f, g	1,59	0,00	7,03
<b>izofluran + ionizirajuće zračenje (1 Gy)</b>	<b>0 h</b>	23,75 $\pm$ 0,48 b, c, e, f, g	23,96	7,50	42,92	9,32 $\pm$ 0,66 f, g, i	6,45	0,00	37,80	0,94 $\pm$ 0,07 f, g, i	0,65	0,00	4,38
	<b>2 h</b>	27,42 $\pm$ 0,81 a, b, c, d, e, f, g	26,88	8,75	48,33	17,19 $\pm$ 1,04 a, b, c, g	17,40	0,00	43,86	2,70 $\pm$ 0,19 a, b, c, d, e, g, h, j	1,53	0,00	8,60
	<b>6 h</b>	27,61 $\pm$ 0,55 a, b, c, d, e, g, h	27,50	11,25	45,83	14,32 $\pm$ 0,80 a, b, c, g	13,07	0,04	48,49	1,77 $\pm$ 0,11 a, b, c, d, f, g, j	1,55	0,00	5,35
	<b>24 h</b>	27,19 $\pm$ 0,61 a, b, c, d, e, f, g, h	26,67	10,00	46,67	11,11 $\pm$ 0,68 f, g	9,24	0,02	39,75	1,30 $\pm$ 0,09 f, g, k	1,04	0,00	5,93

Mjerenja su provedena na ukupno 200 pojedinačnih kometa (50 po svakoj životinji).

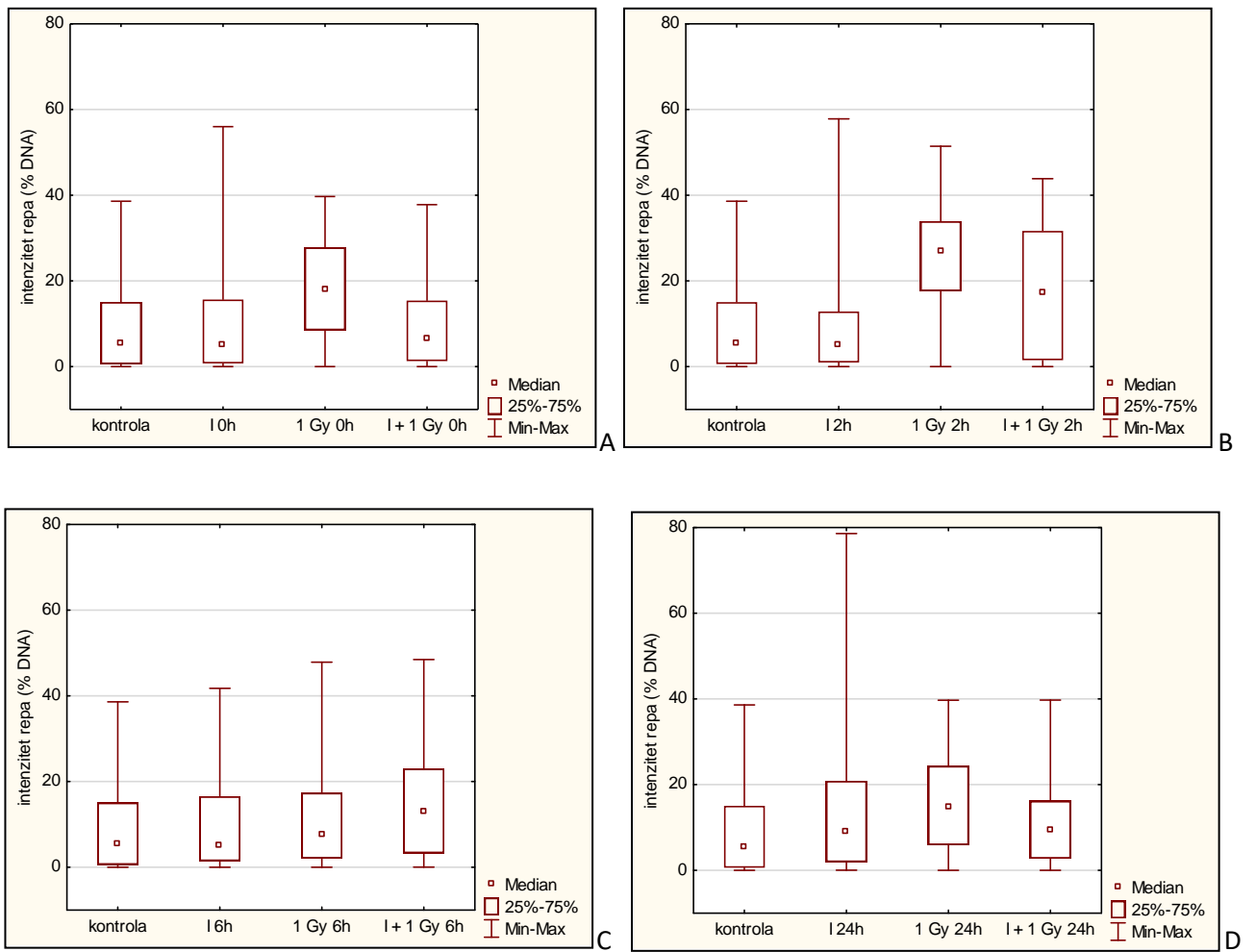
SV – srednja vrijednost; SE – standardna pogreška; med – medijan; min – minimalna vrijednost; maks – maksimalna vrijednost

statistička značajnost ( $p < 0,05$ ): a – u odnosu na kontrolu; b – u odnosu na izofluran (0h); c – u odnosu na izofluran (2h); d – u odnosu na izofluran (6h); e – u odnosu na izofluran (24h); f – u odnosu na IR (0h); g – u odnosu na IR (2h); h – u odnosu na IR (6h); i – u odnosu na IR (24h); j – u odnosu na izofluran + IR (0h); k – u odnosu na izofluran + IR (2h); l – u odnosu na izofluran + IR (6h); m – u odnosu na izofluran + IR (24h); IR – ionizirajuće zračenje



**Slika 10.** Vrijednost dužine repa kometa ( $\mu\text{m}$ ) u stanicama mozga: neposredno nakon (A), nakon 2 sata (B), nakon 6 sati (C) i nakon 24 sata od izlaganja anestetiku izofluranu i/ili zračenju 1 Gy (D).

Mjerenja su provedena na ukupno 200 pojedinačnih kometa. Prikazani su rezultati deskriptivne statistike. Min-max – minimalna i maksimalna vrijednost; kontrola – bez tretmana; I – tretman izofluranom; 1 Gy – izlaganje ionizirajućem zračenju (1 Gy); I + 1 Gy – izlaganje izofluranu + ionizirajućem zračenju (1 Gy)



**Slika 11.** Vrijednost intenziteta repa kometa (% DNA) u stanicama mozga neposredno nakon (A), nakon 2 sata (B), nakon 6 sati (C) i nakon 24 sata od izlaganja anestetiku izofluranu i/ili zračenju 1 Gy (D).

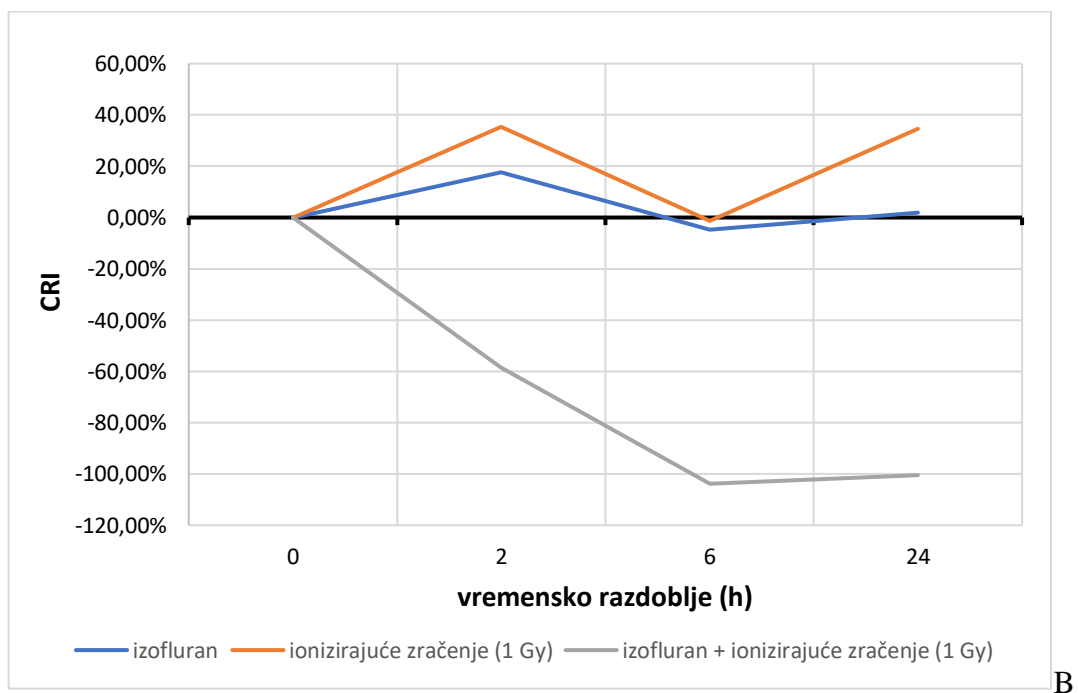
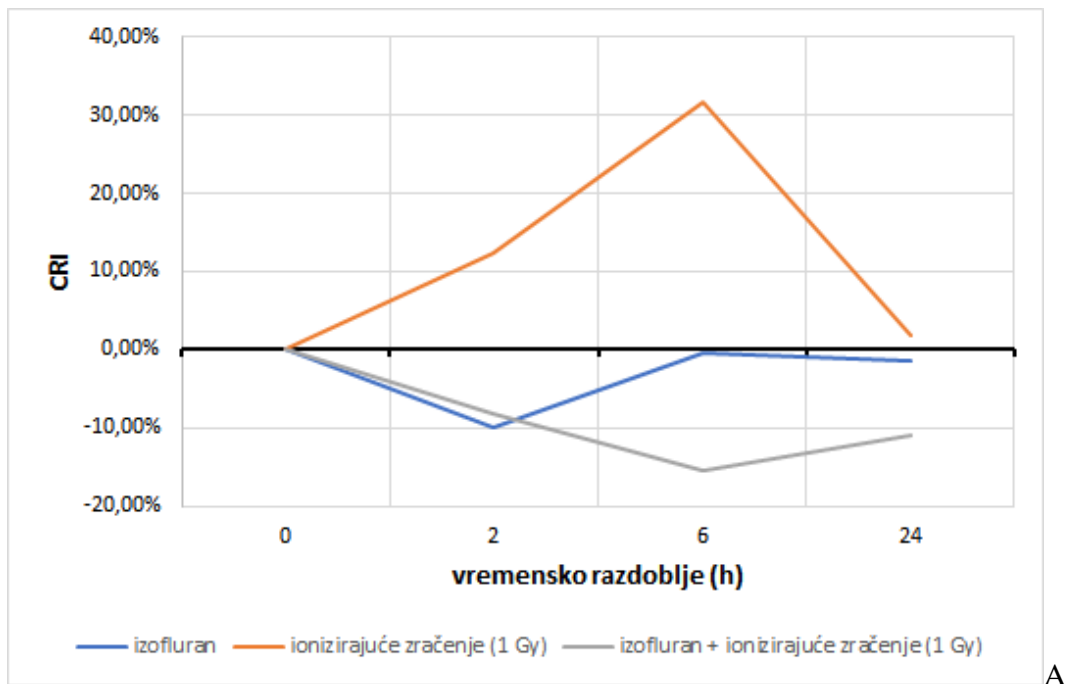
Mjerenja su provedena na ukupno 200 pojedinačnih kometa. Prikazani su rezultati deskriptivne statistike. Min-max – minimalna i maksimalna vrijednost; kontrola – bez tretmana; I – tretman izofluranom; 1 Gy – izlaganje ionizirajućem zračenju (1 Gy); I + 1 Gy – izlaganje izofluranu + ionizirajućem zračenju (1 Gy)



#### **4.5. Stanični indeks popravka primarnih oštećenja DNA u leukocitima periferne krvi te u stanicama bubrega, jetre i mozga**

Stanični indeks popravka (CRI) za parametar dužine repa kometa u leukocitima periferne krvi neposredno nakon, 2 sata, 6 sati i 24 sata nakon tretmana izofluranom, IR-em (1 Gy) te kombiniranim tretmanom izofluranom i IR-em, prikazan je na Slici 12A. Najviši postotak popravka (31,70%) vidljiv je 6 sati nakon tretmana ionizirajućim zračenjem, a najviši postotak nepopravljenih primarnih oštećenja (15,38%) vidljiv je 6 sati nakon tretmana izofluranom. Tretmani izofluranom te kombinirani tretman u svim vremenskim razdobljima pokazuju povećanje primarnih oštećenja u odnosu na početne vrijednosti, dok za tretman IR-em vrijedi obratno.

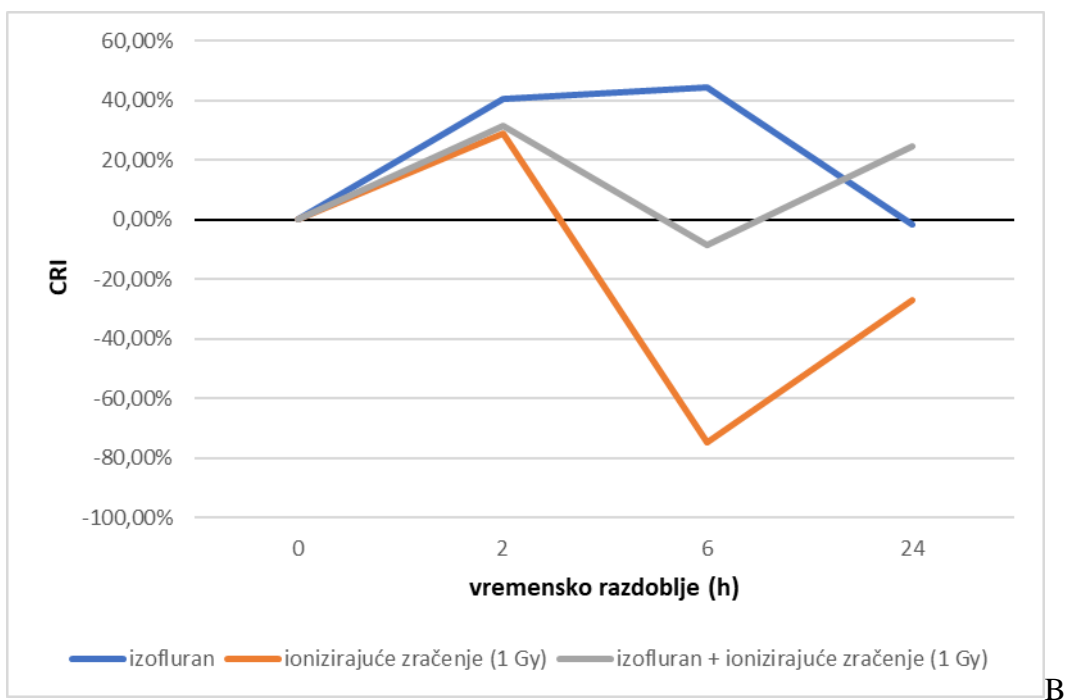
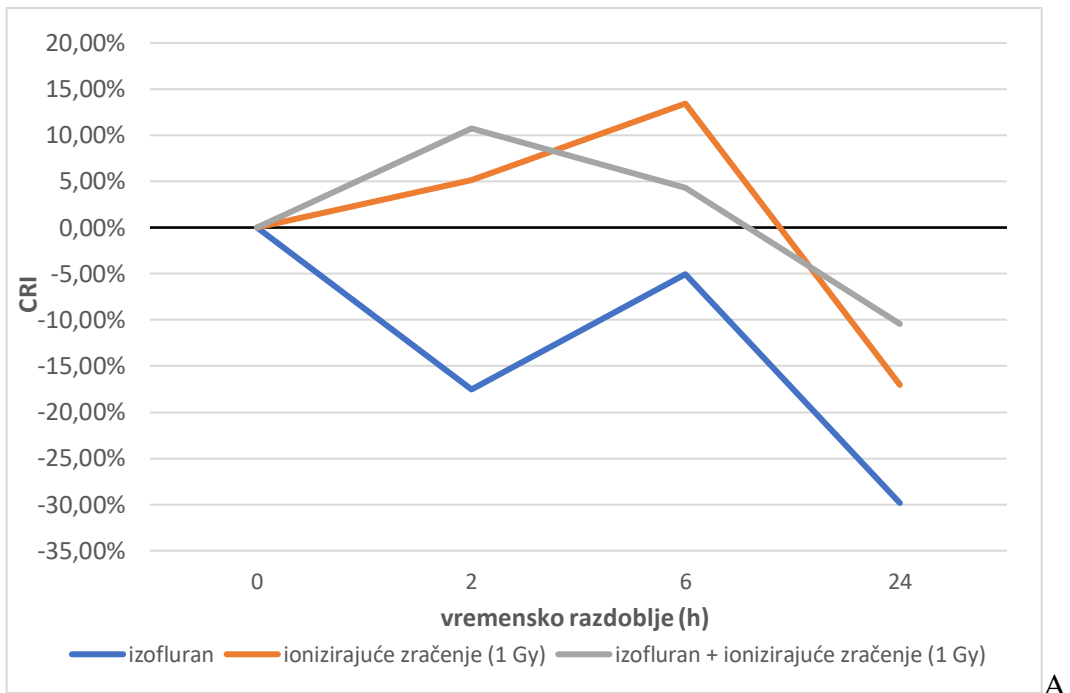
Stanični indeks popravka (CRI) za parametar intenziteta repa kometa u leukocitima periferne krvi neposredno nakon, 2 sata, 6 sati i 24 sata nakon tretmana izofluranom, IR-em te kombiniranim tretmanom izofluranom i IR-em, prikazan je na Slici 12B. Najviši postotak popravka (35,35 %) vidljiv je 2 sata nakon tretmana ionizirajućim zračenjem, a najviši postotak nepopravljenih primarnih oštećenja (103,81%) 6 sati nakon kombiniranog tretmana. Svi vremenski intervali unutar kombiniranog tretmana ukazuju na povećanje primarnih oštećenja u odnosu na početnu vrijednost, dok u preostala dva tretmana sve vrijednosti osim onih 6 sati nakon tretmana ukazuju na povećanje popravka u usporedbi s početnom vrijednošću.



**Slika 12.** Stanični indeks popravka (CRI) za parametre dužine repa (A) te intenziteta repa kometa (B) neposredno nakon, 2 sata, 6 sati i 24 sata nakon tretmana izofluranom, ionizirajućim zračenjem (1 Gy) te izofluranom i ionizirajućim zračenjem (1 Gy) u leukocitima periferne krvi.

Stanični indeks popravka (CRI) za parametar dužine repa kometa u stanicama bubrega neposredno nakon, 2 sata, 6 sati i 24 sata nakon tretmana izofluranom, IR-em (1 Gy) te kombiniranim tretmanom izofluranom i IR-em prikazan je na Slici 13A. Najviši postotak popravka (13,43%) vidljiv je 6 sati nakon tretmana IR-em. Tretman izofluranom u svim vremenskim periodima pokazuje povećanje primarnih oštećenja u odnosu na početne vrijednosti. Najviši postotak primarnih oštećenja u odnosu na početne vrijednosti, odnosno postotak oštećenja koja se nisu popravila, vidljiv je 24 sata nakon tretmana izofluranom (29,83%), a povećanje oštećenja je vidljivo i 24 sata nakon drugih tretmana.

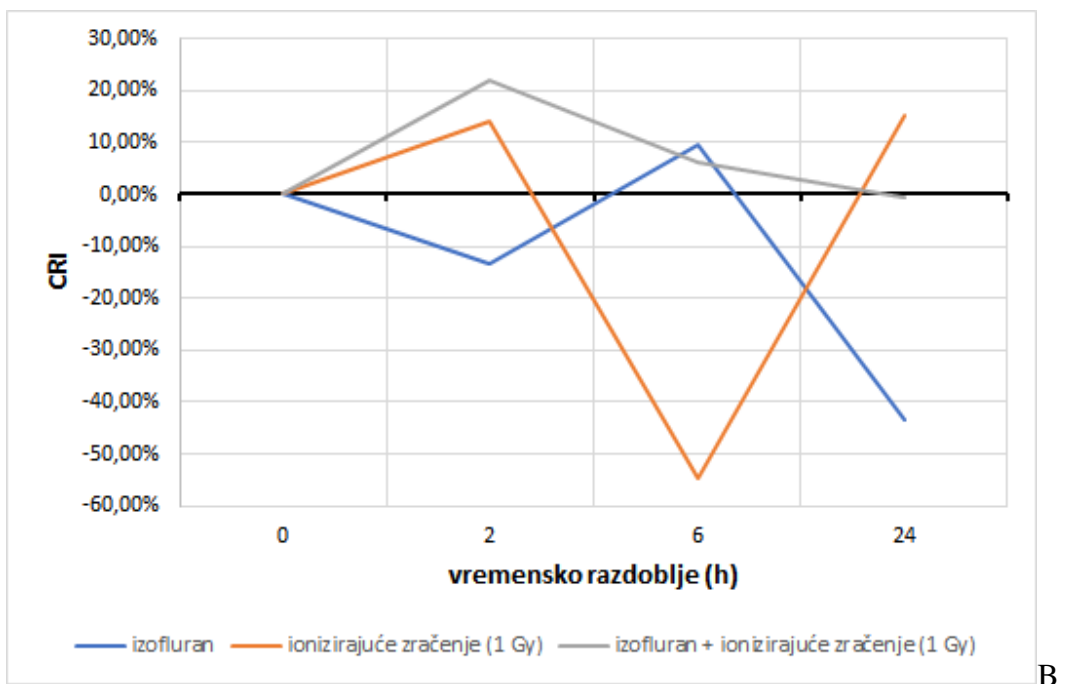
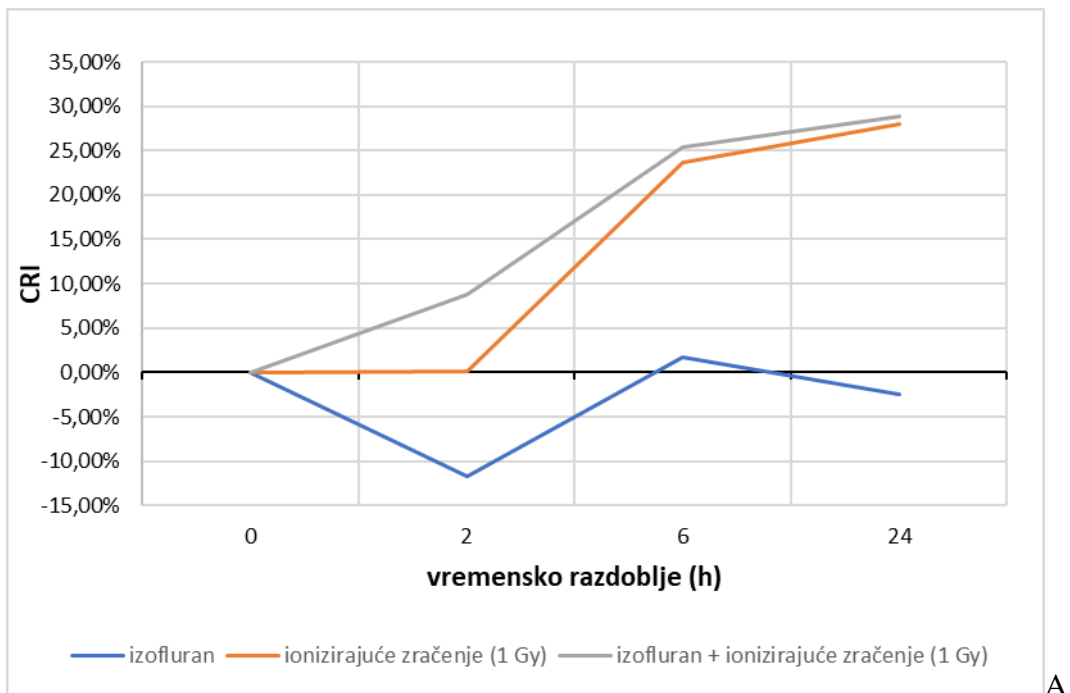
Stanični indeks popravka (CRI) za parametar intenziteta repa kometa u stanicama bubrega neposredno nakon, 2 sata, 6 sati i 24 sata nakon tretmana izofluranom, IR-em, te kombiniranim tretmanom prikazan je na Slici 13B. Najviši postotak popravka (44,60%) vidljiv je 6 sati nakon tretmana izofluranom. Kod svih tretmana nakon 2 sata vidljivo je smanjenje primarnih oštećenja. Najviši postotak primarnih oštećenja koja nisu popravljena vidljiv je 6 sati nakon tretmana IR-em (74,74%).



**Slika 13.** Stanični indeks popravka (CRI) za parametre dužine repa (A) te intenziteta repa kometa (B) neposredno nakon, 2 sata, 6 sati i 24 sata nakon tretmana izofluranom, ionizirajućim zračenjem (1 Gy) te izofluranom i ionizirajućim zračenjem (1 Gy) u stanicama bubrega.

Stanični indeks popravka (CRI) za parametar dužine repa kometa u stanicama jetre neposredno nakon, 2 sata, 6 sati i 24 sata nakon tretmana izofluranom, IR-em, te izofluranom i IR-em prikazan je na Slici 14A. Najviši postotak popravka (28,85%) vidljiv je 24 sata nakon kombiniranog tretmana. Tretmani IR-em, te kombinirani tretman u svim vremenskim razdobljima pokazuju smanjenje primarnih oštećenja u odnosu na početnu vrijednost. Najviši postotak primarnih oštećenja koja nisu popravljena vidljiv je 2 sata nakon tretmana izofluranom (11,72%).

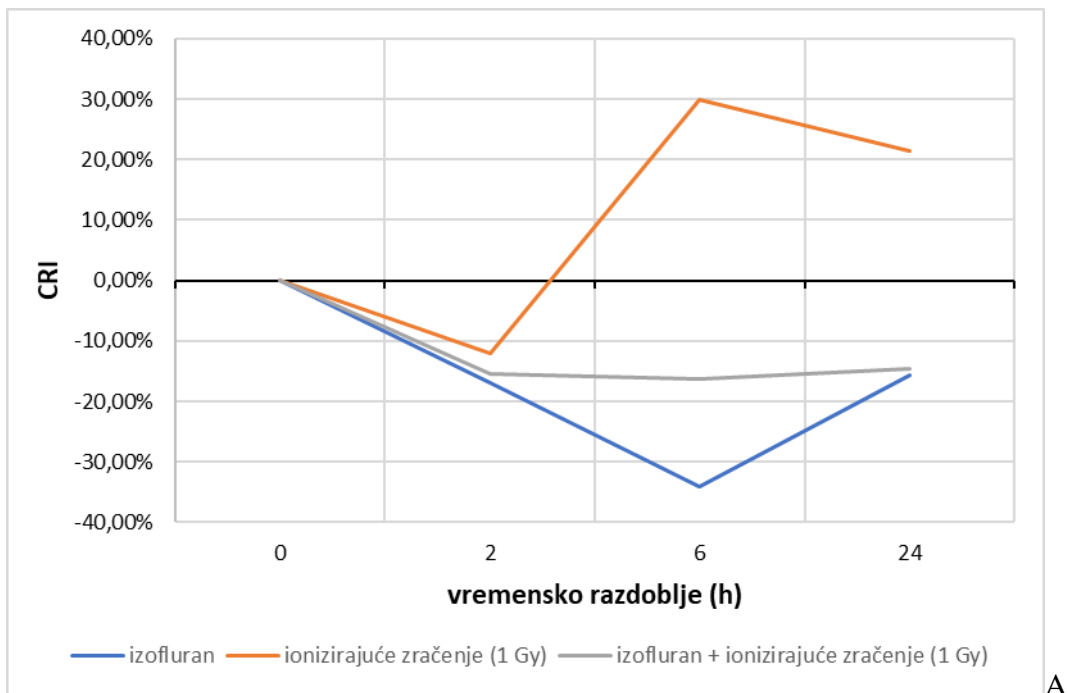
Stanični indeks popravka (CRI) za parametar intenziteta repa kometa u stanicama jetre neposredno nakon, 2 sata, 6 sati i 24 sata nakon tretmana izofluranom, IR-em, te izofluranom i IR-em prikazan je na Slici 14B. Najviši postotak popravka (22,05%) vidljiv je 2 sata nakon kombiniranog tretmana. Najviši postotak primarnih oštećenja koja nisu popravljena vidljiv je 6 sati nakon tretmana IR-em (54,52%), ali je nakon 24 sata to jedini tretman koji pokazuje smanjenje oštećenja u odnosu na početnu vrijednost.



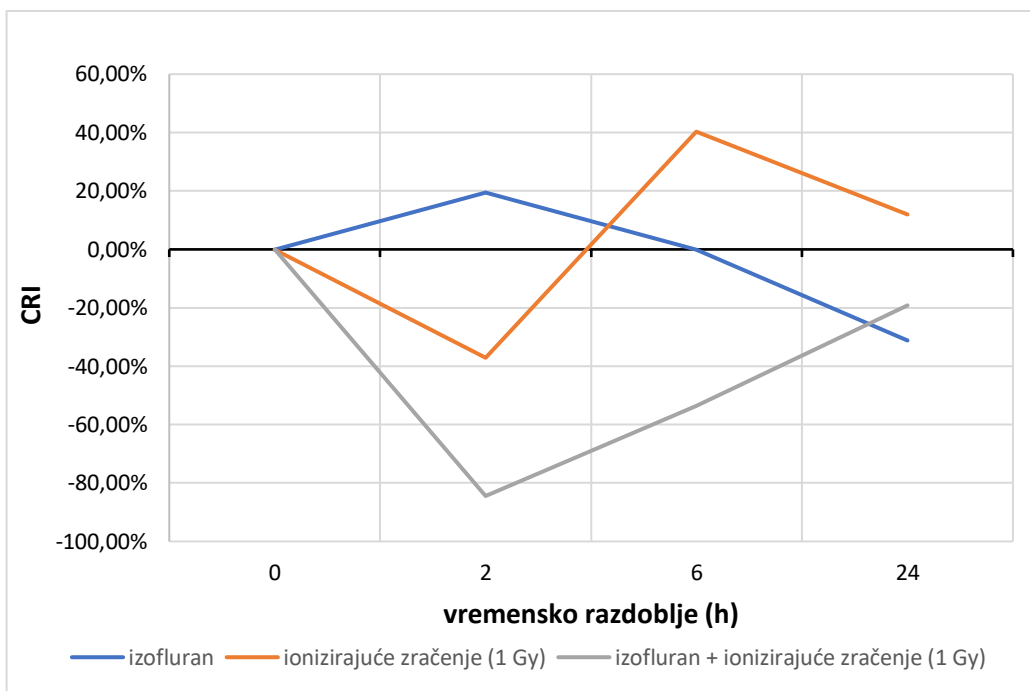
**Slika 14.** Stanični indeks popravka (CRI) za parametre dužine repa (A) te intenziteta repa kometa (B) neposredno nakon, 2 sata, 6 sati i 24 sata nakon tretmana izofluranom, ionizirajućim zračenjem (1 Gy) te izofluranom i ionizirajućim zračenjem (1 Gy) u stanicama jetre.

Stanični indeks popravka (CRI) za parametar dužine repa kometa u stanicama mozga neposredno nakon, 2 sata, 6 sati i 24 sata nakon tretmana izofluranom, IR-em, te kombiniranim tretmanom izofluranom i ionizirajućim zračenjem prikazan je na Slici 15A. Najviši postotak popravka (29,93%) vidljiv je 6 sati nakon tretmana IR-em, a smanjenje primarnih oštećenja u odnosu na početnu vrijednost vidljivo je i nakon 24 sata. Najviši postotak primarnih oštećenja koja nisu popravljena (34,13%) vidljiv je 6 sati nakon tretmana izofluranom. Tretmani izofluranom te kombiniranim tretmanom u svim vremenskim razdobljima pokazuju povećanje primarnih oštećenja u odnosu na početne vrijednosti.

Stanični indeks popravka (CRI) za parametar intenziteta repa kometa u stanicama mozga neposredno nakon, 2 sata, 6 sati i 24 sata nakon tretmana izofluranom, IR-em, te izofluranom i IR-em prikazan je na Slici 15B. Najviši postotak popravka (40,31%) vidljiv je 6 sati nakon tretmana IR-em. Smanjenje primarnih oštećenja u odnosu na početnu vrijednost također je vidljivo 2 sata nakon tretmana izofluranom te 24 sata nakon tretmana IR-em. Najviši postotak primarnih oštećenja koja nisu popravljena (84,44%) vidljiv je 2 sata nakon tretmana izofluranom i IR-em, unutar kojeg je i u drugim vremenskim razdobljima vidljivo povećanje oštećenja u odnosu na početnu vrijednost.



A



B

**Slika 15.** Stanični indeks popravka (CRI) za parametre dužine repa (A) te intenziteta repa kometa (B) neposredno nakon, 2 sata, 6 sati i 24 sata nakon tretmana izofluranom, ionizirajućim zračenjem (1 Gy) te izofluranom i ionizirajućim zračenjem (1 Gy) u stanicama mozga.



## 5. RASPRAVA

Izofluran je jedan od najčešće korištenih inhalacijskih anestetika za induciranje opće anestezije, stoga je važno istražiti njegov utjecaj na različite organe i tkiva, kako bi se procijenila sigurnost njegova korištenja u kliničkoj praksi (Brozović i sur., 2017; Kim i sur., 2006). Dosadašnja istraživanja pokazala su da izofluran u nekim aspektima uzrokuje manje štetnih nuspojava od drugih inhalacijskih anestetika, dok se u drugima pokazao podjednako štetan ili štetniji. Smanjena štetnost izoflurana u, primjerice, jetri ili u dišnom sustavu, može se objasniti manjom razinom metabolizma izoflurana u odnosu na druge inhalacijske anestetike (Hudson i Hemmings, 2019; Khan i sur., 2014). Fokus ovog istraživanja bila su primarna oštećenja DNA nastala djelovanjem izoflurana te učinkovitost njihova popravka u različitim vrstama stanica. Dosadašnja istraživanja djelovanja izoflurana na DNA i ostale stanične komponente, kao i procjene njegove genotoksičnosti i citotoksičnosti, pokazala su se kontradiktornima. S jedne strane, postoje istraživanja koja su pokazala značajna oštećenja DNA nakon izlaganja različitih vrsta stanica miševa, štakora, ali i ljudi izofluranu, uglavnom u ovisnosti o trajanju anestezije i vremenu nakon tretmana (limfociti, jetra, bubreg, mozak, pluća, itd.). Količina oštećenja DNA povećava se produljenjem trajanja anestezije izofluranom, ali se smanjuje nakon završetka tretmana zahvaljujući mehanizmima popravka DNA te se pri jednokratnom izlaganju vrijednosti oštećenja DNA stanica u krvi pacijenata vraćaju na normalnu razinu otprilike 3 dana nakon izlaganja izofluranu (Brozović i sur., 2017; Brozović i sur., 2011; Karabiyik i sur., 2001; Kim i sur., 2006; Kucharova i sur., 2020; Ni i sur., 2017). Nasuprot tome, neka istraživanja nisu pokazala značajna oštećenja stanica, odnosno DNA pri korištenju izoflurana u kliničkoj praksi (Braz i sur., 2011; Kargar Shouroki i sur., 2018; Ruxanda i sur., 2014). Treća skupina istraživanja ukazuje na potencijalne antioksidativne i protuupalne učinke izoflurana na životinjskim modelima, ali i kod ljudi, čime se otvara mogućnost protektivnog djelovanja izoflurana na različite vrste stanica (Lee i sur., 2015; Rocha i sur., 2015). U ovom istraživanju, pomoću alkalnog komet testa, mjerena su primarna oštećenja DNA u leukocitima periferne krvi te stanicama bubrega, jetre i mozga 0, 2, 6 i 24 sata nakon izlaganja miševa izofluranu. Rezultati istraživanja upućuju na različit utjecaj izoflurana na različite vrste stanica. U stanicama mozga i jetre, vrijednosti parametra dužine repa kometa pokazale su se nižima u odnosu na kontrolnu skupinu u svim skupinama nakon izlaganja izofluranu, dok druga dva parametra (intenzitet repa i repni moment kometa) u jetri također pokazuju niže vrijednosti u odnosu na kontrolnu skupinu, dok u mozgu ne pokazuju takve

vrijednosti u svim vremenskim intervalima. Najviše vrijednosti staničnog indeksa popravka DNA u mozgu vidljive su nakon 2 sata, a u jetri 6 sati nakon izlaganja. Ovi rezultati ukazuju na potencijalno zaštitno djelovanje izoflurana na stanice jetre i mozga u miševa, što je u skladu s rezultatima istraživanja koja govore o povećanom antioksidativnom statusu stanica prilikom anestezije izofluranom (Rocha i sur., 2015). U leukocitima periferne krvi vrijednosti svih parametara u svim vremenskim intervalima nakon tretmana izofluranom pokazuju veće vrijednosti u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je indeks staničnog popravka najveći 6 sati nakon tretmana za parametar dužine repa kometa, a 2 sata nakon tretmana za parametar intenziteta repa kometa. Ovi rezultati upućuju na genotoksični učinak izlaganja leukocita periferne krvi izofluranu, ali i na potencijal popravka nastalih oštećenja ovisno o vremenu nakon tretmana, iako se 24 sata nije pokazalo dovoljno dugim periodom za popravak svih oštećenja. Stanice bubrega pokazuju vrijednosti niže u odnosu na kontrolu 0 i 6 sati nakon tretmana za parametar dužine repa, 2 i 6 sati nakon tretmana za parametar intenziteta repa te 6 sati nakon tretmana izofluranom za parametar repnog momenta kometa, dok je stanični indeks popravka najveći 6 sati nakon tretmana. Ovi rezultati upućuju na potrebu za dodatnim istraživanjima djelovanja izoflurana na stanice bubrega, ali s obzirom da nema statistički značajnih razlika u odnosu na kontrolnu skupinu može se reći, u skladu s nekim od dosadašnjih istraživanja, da ne uzrokuje njihova značajna oštećenja DNA (Ruxanda i sur., 2014).

Ionizirajuće zračenje pokazuje dobro dokumentirana oštećenja DNA pri svim dozama, međutim, prilikom korištenja niskih doza ta su oštećenja uglavnom popravljiva, a citotoksični učinak raste s povećanjem doze. Zračenje uzrokuje oštećenja DNA u svim vrstama stanica svih organa. Učinak ovisi o vrsti stanica pa su tako, primjerice, limfociti i druge hematopoetske stanice relativno osjetljiviji na zračenje od živčanih stanica, kao i o vrsti ozračenog organizma. S obzirom da se zračenje može koristiti za terapijske i dijagnostičke svrhe, važno je istražiti njegovu interakciju s drugim agensima koji se potencijalno mogu primjenjivati tijekom terapije, odnosno dijagnostike, te načine za eventualno smanjenje štetnih učinaka zračenja na normalna tkiva (Abdelrazzak i sur., 2019; Dobrzynska, 2007; Mavragani i sur., 2017; McBride i Schae, 2020; Ueno i sur., 2007; Wang i sur., 2013). U ovom istraživanju, vrijednosti parametara kometa nakon ozračivanja miševa ionizirajućim zračenjem u dozi od 1 Gy sukladne su dosadašnjim istraživanjima te pokazuju oštećenja DNA svih ispitivanih vrsta stanica (leukociti periferne krvi, bubreg, jetra i mozak). Ipak, 6 sati nakon tretmana, može se primijetiti smanjenje vrijednosti parametara u odnosu na kraće vremenske intervale, koje ostaje primjetno i nakon 24 sata u svim stanicama, osim u stanicama bubrega. Ovakvi rezultati potencijalno su posljedica

aktivacije mehanizama popravka DNA, koja je prema staničnom indeksu popravka najefikasnije popravljena upravo 6 sati nakon tretmana zračenjem. Popravak DNA je složen proces koji uključuje brojne mehanizme i intermedijere te mu je za potpunu aktivaciju potrebno određeno vrijeme. Pri malim dozama koje se koriste u terapijske ili dijagnostičke svrhe može biti izrazito efikasan, iako se u ovom istraživanju sva oštećenja uzrokovana zračenjem nisu popravila niti nakon 24 sata (Biau, 2019; Santivasi i Xia, 2014; Sisakht i sur., 2020).

Anesteziolozi koji rade u operacijskim salama ili na hitnim intervencijama često su istovremeno izloženi inhalacijskim anestheticima, kao i niskim dozama ionizirajućeg zračenja. Isto tako, pacijenti koji se podlažu nekoj vrsti radioterapije ili dijagnostičkih postupaka koji koriste ionizirajuće zračenje, posebno pedijatrijski pacijenti, često zbog obuzdavanja budu podvrgnuti općoj anesteziji ili sedaciji. Opravdanost istovremenog korištenja anestetika i ionizirajućeg zračenja uvelike je diskutirana u literaturi. Anestezija se smatra opravdano korištenom uz ionizirajuće zračenje samo ukoliko ne postoji drugi način za smirivanje pacijenta. Anesteziolozi koji su zbog svog posla izloženi ionizirajućem zračenju svakako bi trebali biti pod monitoringom utjecaja zračenja na organizam te koristiti prikladnu zaštitnu opremu tijekom takvih zahvata (Anastasian i sur., 2011; Leone, 2018; Ntoukas i sur., 2020; Rajabi Pour i sur., 2020; Taylor i sur., 2013). Utjecaj kombinirane upotrebe anestetika na staničnoj razini do sada nije značajno istražen, stoga se u ovom radu promatrao utjecaj kombinirane upotrebe anestetika izoflurana i ionizirajućeg zračenja u dozi od 1 Gy, u usporedbi s pojedinačnim tretmanima. Rezultati ovog istraživanja pokazali su veća oštećenja DNA pri kombiniranoj upotrebi zračenja i izoflurana u odnosu na kontrolne skupine u svim promatranim stanicama, kao i u svim vremenskim intervalima. Ipak oštećenja DNA su se pokazala manjima od onih pri tretmanu samim ionizirajućim zračenjem u istim vremenskim intervalima, posebno u stanicama jetre i mozga. Razlog tome moglo bi biti antagonističko djelovanje izoflurana, koji je u samostalnom tretmanu pokazao potencijal za citoprotektivni učinak, na štetu nastalu uslijed tretmana ionizirajućim zračenjem. Benković i sur. (2015) su u sličnom istraživanju pokazali sinergistički učinak anestetika izoflurana i ionizirajućeg zračenja na primarna oštećenja DNA u istih stanica kao i u ovom istraživanju. Stanični indeks popravka pokazao se manjim u odnosu na ostale tretmane u leukocitima periferne krvi i stanicama mozga, u stanicama bubrega popravak je bio podjednako efikasan, dok je u stanicama jetre stanični indeks popravka viši prilikom kombiniranog tretmana.

S obzirom na nedostatak dostupne literature za utjecaj kombinirane upotrebe anestetika i ionizirajućeg zračenja na oštećenja DNA, potrebno je provesti dodatna istraživanja kako bi se

utvrdila priroda međusobne interakcije inhalacijskih anestetika i ionizirajućeg zračenja te njihov utjecaj na mehanizme popravka DNA. Također, učinak samog izoflurana mogao bi se dodatno proučiti kako bi se donio konačan zaključak o njegovom djelovanju na DNA.

## 6. ZAKLJUČAK

- Alkalni komet test osjetljiva je metoda korištena za utvrđivanje primarnih oštećenja DNA u leukocitima periferne krvi te stanicama bubrega, jetre i mozga Swiss albino miševa tretiranih izofluranom (1,7 vol%), ionizirajućim zračenjem (1 Gy), te kombinacijom navedenih dvaju agensa. U svakoj skupini tretirane su po 4 životinje, a uzorci su skupljeni neposredno, 2 sata, 6 sati i 24 sata nakon izlaganja. Učinak anesthetika izoflurana, ionizirajućeg zračenja te njegove kombinacije na primarna oštećenja DNA procjenjivan je analizom triju parametara kometa – dužine repa (TL), intenziteta repa (TI) i repnog momenta (TM).
- Tretman izofluranom pokazao je manje primarnih oštećenja DNA u odnosu na kontrolu, tretman ionizirajućim zračenjem u dozi od 1 Gy te na kombinirani tretman izofluranom i ionizirajućim zračenjem u svim vremenskim intervalima kod stanica jetre i mozga, što ukazuje na njegov potencijalno protektivni učinak na ove vrste stanica. U leukocitima periferne krvi pokazao je više primarnih oštećenja DNA u odnosu na kontrolu, ali manje u odnosu na ostale skupine u odgovarajućim vremenskim intervalima što može ukazivati na njegov genotoksični učinak na leukocite, koji je manje izražen pri primjeni samog izoflurana nego u kombinaciji sa zračenjem. U stanicama bubrega vrijednosti parametara su niže u odnosu na kontrolu neposredno i 6 sati nakon tretmana, dok su u odnosu na ostale tretmane vrijednosti niže, što ponovno ukazuje na manji genotoksični učinak izoflurana u usporedbi s ostalim tretmanima, dok je utjecaj samog izoflurana na stanice bubrega kontradiktoran. Objašnjenje pokazane kontradiktornosti moglo bi ležati u interakciji izoflurana s mehanizmima staničnog popravka DNA, koji su se pokazali najučinkovitijima 6 sati nakon tretmana.
- Stanični indeks popravka DNA pri tretmanu izofluranom za parametar dužine repa kometa ukazuje na neučinkovitost mehanizama popravka, osim u stanicama jetre 6 sati nakon tretmana, dok vrijednosti za parametar intenziteta repa pokazuju najveću učinkovitost popravka u leukocitima periferne krvi i stanicama bubrega.
- Tretman ionizirajućim zračenjem u dozi od 1 Gy očekivano je pokazao najveća oštećenja DNA, a primjetan je pad vrijednosti parametara 6 sati nakon izlaganja ionizirajućem zračenju, što se može objasniti efikasnom aktivacijom mehanizama popravka DNA, a vidljivo je i iz vrijednosti staničnog indeksa popravka.

- Kombinirani tretman izofluranom i ionizirajućim zračenjem pokazao je više primarnih oštećenja DNA u odnosu na kontrolu i tretman izofluranom u svim stanicama, ali nešto manje u odnosu na tretman samim ionizirajućim zračenjem, posebno u stanicama jetre i mozga. Takvi rezultati upućuju na antagonistički učinak potencijalno citoprotektivnog izoflurana na štetu nastalu uslijed zračenja.
- Stanični indeks popravka za kombinirani tretman pokazao je manju učinkovitost popravka u odnosu na ostale tretmane u leukocitima periferne krvi i stanicama bubrega, u stanicama mozga učinkovitost je podjednaka, a u stanicama jetre popravak je učinkovitiji u odnosu na ostale tretmane, što ukazuje na različit utjecaj kombiniranoga tretmana na mehanizme staničnog popravka DNA u različitim vrstama stanica.
- Potrebno je provesti dodatna istraživanja kako bi se utvrdila priroda međusobne interakcije inhalacijskih anestetika i ionizirajućeg zračenja na primarna oštećenja DNA u različitim tipovima stanica te njihov utjecaj na mehanizme popravka DNA. Također, učinak samog izoflurana trebao bi se dodatno proučiti kako bi se donio konačan zaključak o njegovom djelovanju na DNA.

## 7. LITERATURA

- Abdelrazzak A. B., El-Missiry M. A., Ahmed M. T., Elnady B. F (2019) Effect of low-dose X-rays on the liver of whole-body irradiated rats. *International Journal of Radiation Biology* 95(3), 264-273
- Aggarwal L. M. (2014) Biological Effects of Ionising Radiation. *Shodh Prerak Journal* 4(1), 342-348
- Anastasian Z. H., Strozyk D., Meyers P. M., Wang S., Berman M. F.(2011) Radiation exposure of the anesthesiologist in the neurointerventional suite. *Anesthesiology* 114(3), 512-520
- Arunkumar R., Rebello E., Owusu-Agyemang P. (2013) Anaesthetic techniques for unique cancer surgery procedures. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology* 27(4), 513-526
- Averbeck D., Testard I., Boucher D. (2006): Changing views on ionising radiation-induced cellular effects. *International Journal of Low Radiation* 3 (2/3), 117-134
- Benković V., Milić M., Horvat Knežević A., Halovanović S., Borojević N., Oršolić N. (2015) The role of sevoflurane and ionising radiation on the level of primary DNA damage measured in blood and different organs of swiss albino mice by the alkaline comet assay. *Zbornik radova desetog simpozija Hrvatskog društva za zaštitu od zračenja, Zagreb*, 126-130
- Biau J., Chautard E., Verrelle P., Dutreix M. (2019) Altering DNA Repair to Improve Radiation Therapy: Specific and Multiple Pathway Targeting. *Frontiers in Oncology* (9), 1009
- Bolf N. (2018) Ionizirajuće zračenje. *Kemija u industriji* 67(7-8), 331–332
- Branzei D., Foiani M. (2008) Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9(4), 297-308
- Braz M. G., Mazoti M. A., Giacobino J., Braz L. G., de Asis Golim M., Ferrasi A. M., de Carvalho L. R., Braz J. R. C., Salvadoti D. M. F. (2011) Genotoxicity, cytotoxicity and gene expression in patients undergoing elective surgery under isoflurane anaesthesia. *Mutagenesis* 26(3), 415-420
- Brozović G., Oršolić N., Knežević F., Horvat Knežević A, Benković V., Sakić 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

- Brozović G., Oršolić N., Rozgaj R., Knežević F., Horvat Knežević A., Maričić M., Krsnik D., Benković V. (2017) Sevoflurane and isoflurane genotoxicity in kidney cells of mice. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 68, 228-235
- Butterworth J. F., Mackey D. C., Wasnick J. D. (2018) *Morgan and Mikhail's Clinical Anesthesiology*. McGraw Hill, New York
- Chatterjee N., Walker G. C. (2017) Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and molecular mutagenesis* 58(5), 235–263
- Collins A. R. (2004) The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. *Molecular Biotechnology* 26, 249-261
- Deng H. B., Li F. X., Cai Y. H., Xu S. Y. (2018) Waste anesthetic gas exposure and strategies for solution. *Journal of Anesthesia* 32(2), 269-282
- Deycmar S., Faccin E., Kazimova T., Knobel P. A. , Telarovic I., Tschanz F., Waller V., Winkler R., Young C., Zingariello D., Pruschy M. (2019) The relative biological effectiveness of proton irradiation in dependence of DNA damage repair. *The British Journal of Radiology* 92, 20190494
- Deycmar S., Pruschy M. (2018) Combined Treatment Modalities for High-Energy Proton Irradiation: Exploiting Specific DNA Repair Dependencies. *International Journal of Particle Therapy* 5(1), 133-139
- Dobrzyńska M. M. (2007) Assessment of DNA damage in multiple organs from mice exposed to X-rays or acrylamide or a combination of both using the comet assay. *In Vivo* 21(4), 657-662.
- Elgazzar A. H., Kazem N. (2015) Biological effects of ionizing radiation U: Elgazzar A. H. (ur.) *The pathophysiologic basis of nuclear medicine*. Berlin, Springer-Verlag, 369-370
- Flecknell P. (2015) *Basic Principles of Anaesthesia Laboratory Animal Anaesthesia U: Flecknell P. (ur.) Laboratory Animal Anaesthesia*. London, Academic Press 1- 75
- Fu S., Li Z., Xiao L., Hu W., Zhang L., Xie B., Zhou Q., He J., Qiu Y., Wen M., Peng Y, Gao J., Tan R., Deng Y., Weng L., Sun L. Q. (2019) Glutamine Synthetase Promotes Radiation Resistance via Facilitating Nucleotide Metabolism and Subsequent DNA Damage Repair. *Cell Reports* 28(5), 1136-1143



- Grimm K. A., Tranquilli W. J., Lamont L. A. (2011) *Essentials of Small Animal Anesthesia and Analgesia*. Iowa, Wiley-Blackwell
- Hemmings H., Egan T. (2019) *Pharmacology and Physiology for Anesthesia: Foundations and Clinical Application*. Elsevier, Philadelphia
- Hill M. A. (2020) Radiation Track Structure: How the Spatial Distribution of Energy Deposition Drives Biological Response. *Clinical Oncology* 32(2), 75–83
- Hudson A. E., Hemmings, H. C. (2019) *Pharmacology and Physiology for Anesthesia*. Philadelphia, Elsevier
- Karabiyik L., Sardas S., Polat U., Kocabas N. A., Karakaya A. E. (2001) Comparison of genotoxicity of sevoflurane and isoflurane in human lymphocytes studied in vivo using the comet assay. *Mutation Research* 492, 99-107
- Karahan E. G., Tomatir A. G., Acikbas I., Er A. B., Evyapan F., Akdag B., Arslan P. E. (2017) Determination of Genotoxic Damage by Comet Assay in Smokers. *International Journal of Human Genetics* 17(2), 64-71
- Kargar Shouroki F., Neghab M., Mozdarani H., Alipour H., Yousefinejad S., Fardid R. (2018) Genotoxicity of inhalational anesthetics and its relationship with the polymorphisms of GSTT1, GSTM1, and GSTP1 genes. *Environmental Science and Pollution Research* 26, 3530-3541
- 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
- Kim H., Oh E., Im H., Mun J., Yang M., Khim J. Y., Lee E., Lim S. H., Kong M. H., Lee M., Sul D. (2006) Oxidative damages in the DNA, lipids, and proteins of rats exposed to isofluranes and alcohols. *Toxicology* 220(2-3), 169-178
- Kucharova M., Astapenko D., Zubanova V., Koscakova M., Stetina R., Zadak Z., Hronek M. (2020) Does Neuraxial Anesthesia as General Anesthesia Damage DNA? A Pilot Study in Patients Undergoing Orthopedic Traumatological Surgery. *International journal of molecular sciences* 21(1), 84
- Lee Y. M., Song B. C., Yeum K.-Y. (2015): Impact of Volatile Anesthetics on Oxidative Stress and Inflammation. *BioMed Research International* 2015:242709

- Leone B. J. (2018) Radiation exposure risk: backscatter and anesthesia teams. *Conferencias Magistrales* 41(1), 135 - 138
- Lomax M. E., Folkes L. K., O'Neill P. (2013) Biological Consequences of Radiation-induced DNA Damage: Relevance to Radiotherapy. *Clinical Oncology* 25(10), 578-585
- Lucio L. M. C., Braz M. G., do Nascimento Jr P., Braz J. R. C. , Braz L. G. (2018) Occupational hazards, DNA damage, and oxidative stress on exposure to waste anesthetic gases. *Brazilian Journal of Anesthesiology* 68(1), 33-41
- Mavragani I. V., Nikitaki Z., Souli M. P., Aziz A., Newsheen S., Aziz K., Rogakou E., Georgakilas A. G. (2017) Complex DNA Damage: A Route to Radiation-Induced Genomic Instability and Carcinogenesis. *Cancers* 9(7), 1-21
- McBride W. H., Schae D. (2020) Radiation-induced tissue damage and response. *Journal of Pathology* 250, 647-655
- McFadyen J. G., Pelly N., Orr R. J. (2011) Sedation and anesthesia for the pediatric patient undergoing radiation therapy. *Current Opinion in Anaesthesiology* 24(4),433-438
- Mishra K.N., Moftah B.A., Alsbeih G.A. (2018) Appraisal of mechanisms of radioprotection and therapeutic approaches of radiation countermeasures. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 106, 610-617
- Møller P., Loft S., Ersson C., Koppen G., Dusinska M., Collins A. (2014) On the search for an intelligible comet assay descriptor. *Frontiers in Genetics* 5, 217
- Nair G. G., Nair C. K. K. (2013) Radioprotective Effects of Gallic Acid in Mice. *BioMed Research International* 2013, 95307
- Ni C., Li C., Dong Y., Guo X., Zhang Y., Xie Z. (2017) Anesthetic Isoflurane Induces DNA Damage Through Oxidative Stress and p53 Pathway. *Molecular Neurobiology* 54(5), 3591–3605
- Ntoukas S. M., Ritchie T., Awrey S., Hodgson D. C., Laperriere N., Yee R., Ramaswamy V., Millar B. A., Becker N., Tsang D. S. (2020) Minimizing General Anesthetic Use in Pediatric Radiation Therapy. *Practical Radiation Oncology* 10(3), 159-165
- Santivasi W. L., Xia F. (2014) Ionizing radiation-induced DNA damage, response, and repair. *Antioxidants & Redox Signaling* 21(2), 251-259

- Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R., Schneider E. L. (1988) A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Experimental Cell research* 175, 184-191
- Singh Z. (2018) Comet assay as a sensitive technique in occupational health studies; A literaturere view. *Journal of Occupational Health and Epidemiology* 7(4), 240-245
- Sisakht M., Darabian M., Mahmoodzadeh A., Bazi A., Shafiee S. M., Mokarram P., Khoshdel Z. (2020) The role of radiation induced oxidative stress as a regulator of radio-adaptive responses. *International Journal of Radiation Biology* 96(5), 561-576
- Stone H. B., Coleman C. N., Anscher, M.S., Mcbride W. H. (2003): Effects of radiation on normal tissue : consequences and mechanisms. *The Lancet Oncology* 4, 529-536
- Rajabi Pour M., Fardid R., Zare T., Kargar Shouroki F., Mosleh-Shirazi M. A., Behzad Behbahani A.(2020) Assessment of Adaptive Response of Gamma Radiation in the Operating Room Personnel Exposed to Anesthetic Gases by Measuring the Relative Gene Expression Changes Ku80, Ligase1 and P53. *Journal of Biomedical Physics and Engineering* 10(2), 225-234
- Rocha T. L. A., Dias-Junior C. A., Possomato-Vieira J. S., Gonçalves-Rizzi V. H., Nogueira F. R., de Souza K. M., Braz L. G., Braz M. G. (2015) Sevoflurane Induces DNA Damage Whereas Isoflurane Leads to Higher Antioxidative Status in Anesthetized Rats. *BioMed Research International*, 2015:264971
- Rodriguez-Ruiz M. E., Vitale I., Harrington K. J., Melero I., Galluzz L. (2019) Immunological impact of cell death signaling driven by radiation on the tumor microenvironment. *Nature immunology* 21(12), 1-15
- Ruxanda F., Miclus V., Rus V., Gal A. F., Oana L. (2014) Impact of Isoflurane and Sevoflurane Anesthesia on Kidney Structure and Function in Rats. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture* 71(2), 343-348
- Taylor J., Chandramohan M., Simpson K. H. (2013) Radiation safety for anaesthetists. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain* 13(2), 59–62
- Ueno S., Kashimoto T., Susa N., Natsume H., Toya M., Ito N., Takeda-Homma S., Nishimura Y., Sasaki Y. F., Sugiyama M. (2007) Assessment of DNA damage in multiple organs of

mice after whole body X-irradiation using the comet assay. *Mutation Research* 634(1-2), 135-145

Wang Y., Xu C., Du L. Q., Cao J., Liu J. X., Su X., Zhao H., Fan F. Y., Wang B., Katsube T., Fan S. J., Liu Q. (2013) Evaluation of the comet assay for assessing the dose-response relationship of DNA damage induced by ionizing radiation. *International Journal of Molecular Sciences* 14(11), 22449-22461

## 8. ŽIVOTOPIS

### Osobni podaci

Ime i prezime: Dunja Šikić

e-mail: dsikic@stud.biol.pmf.hr

### Obrazovanje

2018.– danas Diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija  
Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

2014. – 2018. Preddiplomski studij Znanosti o okolišu  
Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

2013. – 2014. Preddiplomski studij Geologije  
Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

2009. – 2013. V. gimnazija, Zagreb

### Radno iskustvo

Ak. godina 2019./20. Demonstrator na kolegiju Laboratorijske životinje u biološkim istraživanjima

Ak. godina 2019./20. Demonstrator na kolegiju Laboratorijske životinje u znanosti

Ak. godina 2016./17. Demonstrator na kolegiju Kralježnjaci

2015. – danas igraonice.hr

- animator na dječjim rođendanima, rad u call centru, mentor mlađim kolegama

### Dodatne aktivnosti

Veljača – lipanj 2020. Organizacija događaja "Meet The Biologists – HRZZ izdanje"

Lipanj 2019. Laboratorijska praksa pri Klinici za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević",  
Odjel za imunološku i molekularnu dijagnostiku

- upoznavanje s molekularnim metodama u dijagnostici infektivnih bolesti

Lipanj 2019. Izrada diplomskog rada pri Institutu za medicinska istraživanja,  
Jedinica za mutagenezu

- korištenje metoda za procjenu genotoksičnih utjecaja na ljudskim limfocitima (indukcija mikronukleusa, strukturne aberacije kromosoma, mikrogel elektroforeza – komet test)

Travanj 2019./2018./2017. Aktivno sudjelovanje na manifestaciji "Noć biologije"  
Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

Listopad 2018. – veljača 2019. Tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama

Laboratory Animal Science Course (60 sati)

- certifikat za A kategoriju (FELASA 2 ekvivalent)

- Lipanj 2018. Aktivno sudjelovanje na Simpoziju studenata bioloških usmjerenja– SiSB4  
(Tema: *Istraživanje primjene hladnog atmosferskog plazmenog mlaza u dezinfekciji drvenih umjetnina kontaminiranih gljivama*)
2017. – danas Sudjelovanje na projektu PlasmaArt
- razvoj nove metode uzgoja gljivica *Serpula lacrymans* i *Coniophora puteana* na simuliranim drvenim umjetninama, uzgoj na hranjivim podlogama, tretman hladnim atmosferskim plazmenim mlazom, analiza i usporedba rezultata
2016. -2017. Laboratorijska praksa pri Prehrambeno – biotehnološkom fakultetu  
Zavod za biokemijsko inženjerstvo; Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama
- rad s uskoškarim rakom (*Astacus leptodactylus*) – hranjenje, čišćenje vode u akvarijima, uzimanje briseva i uzoraka hemolimfe, priprema uzoraka za PCR, brojanje stanica hemolimfe
  - analiza sastava prehrane sivog vuka (*Canis lupus*) – priprema uzoraka neprobavljene dlake iz fecesa, mikroskopska analiza, analiza rezultata

### Poznavanje jezika

Materinski jezik Hrvatski

Strani jezici:

jezik	slušanje	čitanje	govorna interakcija	govorna produkcija	pisanje
Engleski	B2	B2	B2	B2	B2
Njemački	A1	A1	A1	A1	A1

### Komunikacijske vještine

- vrlo razvijene komunikacijske vještine stečene u dugogodišnjem radu s ljudima iz pozicije pružatelja usluge, ali i člana velikog tima zaposlenika te tijekom dugogodišnjeg obrazovanja, izlaganja na skupovima i rada s kolegama studentima

### Ostale vještine

- vladanje alatima Microsoft Office (Word, Excell, PowerPoint)
- vozačka dozvola: B kategorija
- osnovna znanja programiranja u programu DevPascal
- završena osnovna glazbena škola