Genotoksični i citotoksični učinak inhalacijskih anestetika i cisplatine na zdrave i stanice Ehrlich ascites tumora u Swiss albino miševa

Brozović, Gordana

Doctoral thesis / Disertacija

2007

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:542257

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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



Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Gordana Brozović

Genotoksični i citotoksični učinak inhalacijskih anestetika i cisplatine na zdrave i stanice Ehrlich ascites tumora u Swiss albino miševa

DISERTACIJA

Zagreb, 2007.

Disertacija je izrađena u Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i u Klinici za tumore u Zagrebu.

Voditelj rada: Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Zahvaljujem se svim suradnicima Zavoda za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, posebno mr. sc. Anici Horvat Knežević, dr. sc. Vesni Benković i tehničaru Nini Vukmaniću na prijateljstvu, stručnoj i moralnoj podršci.

Zahvalnost dugujem djelatnicima Službe kliničke patologije Klinike za tumore, a naročito voditelju Doc. dr. sc. Fabijanu Kneževiću na susretljivosti i razumijevanju prilikom mikroskopiranja.

Mr. sc. Rajki Petrinović, voditelju Službe kliničke kemije Klinike za tumore zahvaljujem na uloženom trudu pri hematološkoj i biokemijskoj analizi krvi.

Najiskrenije zahvaljujem dipl. ing. Kreši Bendelji koji je omogućio dio eksperimentalnog rada na protočnom citometru.

Iskreno zahvaljujem Prof dr. sc. Davorinu Đaniću i Ivi Lučiću, dr. med iz Opće bolnice "Dr Josip Benčević" u Slavonskom Brodu koji su pokazali razumijevanje i pomogli pri nabavi anesteziološkog aparata.ebnu zahvalnost dugujem mojoj obitelji, djeci Maji i Mislavu te suprugu Tomislavu na informatičkoj podršci, strpljenju i razumijevanju.

Na kraju zahvaljujem mojoj mentorici Prof. dr. sc. Nadi Oršolić na nesebičnoj pomoći, korisnim idejama, savjetima i strpljenju tijekom izrade rada.

S A D R Ž A J

1. UVOD **1**

1.1. Inhalacijski anestetici 1

1.1.1. Halotan 2

1.1.2. Izofluran 3

1.1.3. Sevofluran 3

1.2. Značajke tumorskog rasta 4

1.2.1. Osobitosti stanica tumora 7

1.3. Učinak inhalacijskih anestetika na zdrave i tumorske stanice 9

1.4. Citostatici 12

1.4.1. Cisplatina 16

1.5. Međudjelovanje anestetika i citostatika 19

1.6. Komet test 21

1.7. Mikronukleus test 24

1.7.1. Mikronukleus test u uvijetima *in vivo* 25

1.8. Stanična smrt prouzročena citostaticima 26

1.8.1. Apoptoza 27

1.8.2. Autofagija 31

1.8.3. Nekroza 32

2. CILJ I SVRHA RADA **35**

3. MATERIJALI I METODE **36**

3.1. Materijali korišteni u istraživanju 36

3.1.1. Pokusne životinje 36

3.1.2. Inhalacijski anestetici 36

3.1.3. Cisplatina 36

3.1.4. Ehrlichov ascitesni tumor (EAT) 36

3.2. Metode korištene u istraživanju 37

3.2.1. Izlaganje miševa inhalacijskim anesteticima i cisplatini 37

3.2.2. Komet test 40

3.2.2.1. Priprema uzoraka za elektroforezu 40

3.2.2.2. Liza staničnih struktura 40

3.2.2.3. Denaturacija 40

3.2.2.4. Elektroforeza 41

3.2.2.5. Neutralizacija 41

3.2.2.6. Bojanje preparata ……..... 41
3.2.2.7. Analiza preparata …….. 41
3.2.3. Mikronukleus test *in vivo* …… 41
3.2.4. Određivanje broja živih tumorskih stanica u peritonealnoj tekućini …….. 41
3.2.5. Apoptoza i nekroza tumorskih stanica …… 42
3.2.5.1. Obilježavanje stanica aneksinom V i propidijskim jodidom …….. 42
3.2.5.2. Analiza stanica na protočnom citometru …….. 42
3.2.6. Analiza hematoloških i biokemijskih parametara …… 42
3.3. Statistička obrada podataka 43
4. REZULTATI …….. **44**
4.1. Rezultati Komet testa ……... 44
4. 1.1. Rezultati Komet testa na limfocitima periferne krvi Swiss albino miševa …….. 47
4.1.2. Rezultati Komet testa stanica mozga Swiss albino miševa ……. 49
4.1.3. Rezultati Komet testa stanica jetre Swiss albino miševa ……. 51
4.1.4. Rezultati Komet testa stanica bubrega Swiss albino miševa ……... 53
4.1.5. Rezultati Komet testa stanica Ehrlich ascitesnog tumora ..…….. 55
4.2. Rezultati Mikronukleus testa …….. 56
4.3. Rezultati brojanja živih tumorskih stanica u peritonealnoj tekućini 58
4.4. Rezultati apoptoze, nekroze i ukupnog broja mrtvih stanica Ehrlich ascitesnog tumora ……... 60
4.4.1. Postotak apoptotičnih stanica tumora nakon obrade miševa inhalacijskim anesteticima i cisplatinom ……. 62
4.4.2. Postotak nekrotičnih stanica tumora nakon obrade miševa inhalacijskim anesteticima i cisplatinom ……. 63
4.4.3. Ukupni postotak mrtvih stanica nakon obrade miševa inhalacijskim anesteticima i cisplatinom ……. 64
4.5. Rezultati analize hematoloških parametara periferne krvi nakon obrade miševa inhalacijskim anesteticima i cisplatinom …….. 65
4.5.1. Broj eritrocita periferne krvi Swiss albino miševa nakon obrade inhalacijskim anesteticima i cisplatinom ……. 66
4.5.2. Koncentracija hemoglobina u perifernoj krvi miševa nakon obrade inhalacijskim anesteticima i cisplatinom ……..... 67
4.5.3. Broj leukocita u perifernoj krvi Swiss albino miševa nakon obrade inhalacijskim anesteticima i cisplatinom ……. 68
4.5.4. Postotak neutrofila od ukupnog broja leukocita periferne krvi Swiss albino miševa nakon obrade inhalacijskim anesteticima i cisplatinom ……... 70
4.5.5. Postotak limfocita od ukupnog broja leukocita periferne krvi Swiss albino miševa nakon obrade miševa inhalacijskim anesteticima i cisplatinom ……. 72

4.5.6. Postotak monocita od ukupnog broja leukocita periferne krvi Swiss albino miševa nakon obrade inhalacijskim anesteticima i cisplatinom …….. 74
4.6. Rezultati biokemijske analize periferne krvi miševa nakon obrade inhalacijskim anesteticima i cisplatinom 76
4.6.1. Alkalna fosfataza (AF) ……. 77
4.6.2. Aspartat aminotransferaza (AST) …… 79
4.6.3. Alanin aminotransferaza (ALT) ……... 81
4.6.4. Ukupni proteini ……..... 83
4.6.5. Urea ……..... 85
4.6.6. Kreatinin …….. 87
5. RASPRAVA ……. **89**
6. ZAKLJUČCI **102**
7. SAŽETAK **104**
8. SUMMARY …….. **106**
9. POPIS CITIRANE LITERATURE ……... **108**
10. ŽIVOTOPIS **121**
11. POPIS SLIKA …….. **124**
12. POPIS TABLICA …… **127**

1. UVOD

1.1. Inhalacijski anestetici

Moderna anestezija nudi veliki broj različitih vrsta anestetika i tehnika anestezije. Međutim, obzirom na brojne prednosti inhalacijskih anestetika oni se vrlo često koriste za uvod u anesteziju ili za održavanje anestezije, sami ili u kombinaciji s intravenskim anesteticima. Inhalacijski anestetici su osobito pogodni za anesteziju onkoloških bolesnika zato što se kod uvoda u anesteziju dužina i opseg operacijskog zahvata često ne mogu predvidjeti i ovise o intraoperacijskom kirurškom i patohistološkom nalazu, a nerijetko su potrebne ponavljane operacije zbog uklanjanja ili redukcije primarnog tumora, regionalnih metastaza, recidiva bolesti, udaljenih metastaza, patoloških fraktura ili zbog komplikacija same operacije. Donedavno jedini inhalacijski anestetik u našoj zemlji halotan, danas se koristi samo u slabije razvijenim zemljama zbog niske cijene, a u Hrvatskoj su danas najčešće korišteni inhalacijski anestetici izofluran i sevofluran.

Inhalacijski anestetici su lako hlapljive tekućine koje u organizam ulaze udisanjem, a zatim difuzijom kroz alveolokapilarnu membranu prelaze u krvotok, krvotokom se dopremaju do svih ostalih organa i do centralnog nervnog sustava. Fizikalno-kemijske osobitosti inhalacijskih anestetika ovise o ionizaciji, liposolubilnosti, molekulskoj težini, a one određuju raspodjelu i učinkovitost prolaza kroz staničnu membranu. Zbog načina isporuke putem isparivača na anesteziološkom aparatu omogućavaju brzi uvod u anesteziju i buđenje, a za vrijeme trajanja operacije lako je mijenjati dubinu anestezije. Posljednjih nekoliko godina počinju se primjenjivati i za sedaciju bolesnika na respiratoru u Jedinicama intenzivnog liječenja. Veći dio inhaliranih anestetika eliminira se iz organizma respiracijom, međutim jedan dio se metabolizira u jetri putem obitelji citokrom oksidaza P-450 i izlučuje putem bubrega, te je pitanje njihove toksičnosti oduvijek izazivalo veliki interes istraživača (1). Mogu se primjenjivati u smjesi plinova s kisikom i dušičnim oksidulom, sa samim kisikom, s kisikom i zrakom, ili kao dio opće anestezije u kombinaciji s intravenskim anesteticima. Koncentracija inhalacijskih anestetika se izražava putem MAC-a (minimalna alveolarna koncentracija). Jedan MAC je

koncentracija inhalacijskog anestetika koja kod 50% osoba sprječava pokrete za vrijeme kirurškog reza. Za kiruršku anesteziju koristi se koncentracija od 1,25-2 MAC-a inhalacijskih anestetika (2).

1.1.1. Halotan

Halotan (CF_3-CHBrCl) je bezbojna tekućina sa karakterističnim sladunjavim mirisom. Uveden je u kliničku praksu 1956. godine, međutim već su 1963.godine klinička istraživanja potvrdila njegovu hepatotoksičnosti. U velikom postotku se metabolizira (približno 50%) u jetri putem oksidacijskih i redukcijskih enzima citokroma P-450. Oba metabolička puta dovode do stvaranja reaktivnih metabolita. U uvjetima hipoksije više dolazi do izražaja reduktivni metabolizam preko CYP2A6 i CYP3A4, enzima citokroma P-450 u jetrenim mikrosomima. Stvaraju se nestabilni slobodni radikali, klorodifloroeten i klorotrifloroetan, te anorganski floridi. Smatra se da oni izazivaju lipidnu peroksidaciju. Radikali halotana mogu ući u reakcije sa tkivnim enzimima kao što su citokromi P-450 i dovesti do stvaranja katalitički inaktivnih enzimskih kompleksa ili s lipidima te stvoriti mnogobrojne nove spojeve. Lipidna peroksidacija je specifična za halotan i ne uočava se kod drugih inhalacijskih anestetika, a CYP2A6 je katalizator lipidne peroksidacije u jetrenim liposomima ljudi (3,4,5). Redukcijski metabolički put halotana smatra se odgovornim za izazivanje umjerenog halotanskog hepatitisa. U uvjetima kirurške anestezije prevladava oksidacijski metabolizam, međutim čak i u uvjetima disanja 100% kisika, dio jetre podliježe redukcijskom metabolizmu zahvaljujući tome što halotan smanjuje protok krvi kroz jetru. Glavni metabolit oksidacijskog puta kod ljudi i životinja je trifloroctena kiselina. Dva izozima citokroma P-450, 2E1 i 2B4 su odgovorna za oksidativni metabolizam halotana u trifloroctenu kiselinu. Konačni proizvodi oksidacije mogu se dokazati u urinu, a to su: natrijeva sol trifloroctene kiseline, ioni klora i ioni broma. U radovima na pokusnim životinjama i na ljudima, produženo izlaganje subanestetičkim koncentracijama halotana povećava metaboličku razgradnju halotana, te uzrokuje dva oblika oštećenja jetre. Prvi oblik, blagi hepatitis karakterizira prolazni porast aktivnosti serumskih transaminaza kao posljedica redukcijskog metabolizma. Drugi teški oblik halotanskog hepatitisa

rijedak je (1 na 3000 do 1 na 30000 anestezija), vodi centrolobularnoj nekrozi jetre te porastu aktivnosti serumskih transaminaza i nerijetko smrti prouzročenoj imunološkom reakcijom. Koncentracija anorganskih florida nakon anestezije halotanom niska je, te ne uzrokuje nefrotoksičnost. MAC halotana je 0,77 vol% (1). Klasični laboratorijski nalazi za testiranje funkcije jetre su serumski enzimi, proteini, bilirubin, alkalna fosfataza i aminotransferaze.

1.1.2. Izofluran

Izofluran (CHF_2-O-CHCl-CF_3) je izomer enflurana. Na sobnoj temperaturi brzo prelazi iz tekućeg u plinovito stanje. Metabolizira se oksidacijom oko 0,2% inhaliranog anestetika, najsporije od floriranih inhalacijskih anestetika i to uglavnom u jetri putem citokroma P-450 2E1 i 3A. Metaboliti izoflurana su trifloroctena kiselina i florid u koncentracijama koje ne izazivaju organska oštećenja. Liposolubilnost i topivost izoflurana u krvi je mala (koeficijent topivosti krv/plin je 1,41). MAC izoflurana je 1,17 vol%. Nije aritmogen, ne mijenja osjetljivost na kateholamine, ali izaziva jaču respiracijsku depresiju od halotana. Prema istraživanju Egera i sur. nije teratogen, niti karcinogen (6). Izofluran rijetko dovodi do hepatitisa i oštećenja funkcije bubrega zbog prisutnosti anorganskih florida, međutim prilikom dugotrajnih inhalacija može prouzročiti oštećenje bubrega (1).

Uvođenje izoflurana u kliničku upotrebu odgađano je zbog istraživanja Corbetta 1976. godine čiji rezultati ukazuju na mogućnost nastanka tumora jetre štakora nakon dužeg izlaganja štakora izofluranu. Rezultati dosadašnjih istraživanja su različiti i često proturiječni. Sardas i sur. (7) ukazuju da izofluran može prouzročiti oštećenje DNK, a potvrđena je i hepatotoksičnost izoflurana (8,9).

1.1.3. Sevofluran

Sevofluran (CH_2F-O-CH-$(CF_3)_2$) je snažan inhalacijski anestetik novije generacije. Uvod u anesteziju i oporavak iz anestezije su brzi, a kontrola dubine anestezije je laka. Metabolizira se oko 5% udahnutog sevoflurana,

uglavnom preko 2E1 odjeljka citokroma P-450 u jetri, a manji dio sevoflurana se deflorira u bubregu putem citokroma P-450. Metaboliti sevoflurana u urinu su heksafluoroizopropanol (HFIP) i anorganski floridi. Koncentracija HFIP-a u krvi je mala, brzo se glukurinizira i izlučuje urinom. Ne podliježe redukcijskom metabolizmu. MAC sevoflurana je 2,05 vol%. Sevofluran i njegovi metaboliti ne izazivaju oštećenja stanica jetre i bubrega (10). Povišena koncentracija HFIP-a može dovesti do depresije centralnog živčanog sustava u miševa *in vivo* te prouzročiti citotoksičnost stanica jetre *in vitro.* Oštećenja jetre posljedica su imunoalergijskog odgovora na reaktivne metabolite kovalentno vezane na proteine jetre (11). Kontrola dubine anestezije i indukcija su laki s brzim i odličnim oporavkom. Iako je sintetiziran 1970. nije ušao u kliničku praksu sve do kraja 1993. godine zbog metabolita koje čine 2-5% anorganskog florida i zbog opsežnog metabolizma u prisutnosti CO_2 apsorbera. Potencijalno toksični raspadni proizvod je fluorometil 2-2-difluoro-1-(trifluorometil) vinil eter (Komponenta A). Klinički podaci nisu pokazali da Komponenta A ima mutageno ili karcinogeno djelovanje, dok nalazi Eger-a i sur. (12) ukazuju na to da je raspadni proizvod vinil eter alkilirajući spoj koji povećava učestalost izmjena sestrinskih kromatida. Nema dokaza za hepatotoksičnost sevoflurana. Inhalacijski anestetici smanjuju bubrežnu funkciju smanjujući glomerularnu filtraciju, protok krvi kroz bubrege i izlučivanje elektrolita. Te promjene su uglavnom sekundarne, kao odgovor na krvnožilne, simpatičke i endokrine reakcije.

1.2. Značajke tumorskog rasta

Razvoj moderne molekularne biologije znatno je unaprijedio naše znanje u pogledu poznavanja tumorske bolesti na staničnoj razini. Willis definira tumor kao "abnormalnu nakupinu tkiva čiji rast nadmašuje i nije usklađen s rastom normalnih tkiva i traje u tom prekomjernom rastu i nakon što su uklonjeni utjecaji koji su uzrokovali promjenu" (13). Osnovno u nastanku svih tumora je gubitak odgovora na kontrolne mehanizme normalnog rasta, a diobom tih stanica stvaraju se potomci koji tvore tumorsku masu. Nedostatak

specifičnih razlika malignih i normalnih stanica glavna je prepreka uspješnoj terapiji oboljelih od tumora.

Glavna osobitost tumora je pretjerano i prekomjerno bujanje, odnosno umnažanje stanica koje nije uvjetovano potrebama tkiva ili organa zahvaćenim patološkim promjenama, a razlikuju se od normalnih stanica po tome što kontrolni mehanizmi rasta i diobe stanica na njih više nemaju utjecaja. Kontaktna inhibicija i humoralni inhibitori rasta koji inače djeluju na zdravo tkivo ne djeluju na tumorsko. Kontaktna inhibicija je inhibicija koja koči mitozu, a uzrokovana je neposrednim dodirom sa stanicama. Humoralne inhibitore proizvode zrele stanice. Oni su po kemijskom sastavu glikoproteini, a djeluju na nezrele stanice istog tkiva sprečavajući mitozu.

Postanak tumora ne može se objasniti samo jednim uzročnikom, jer se zna da je nastanak tumora posljedica djelovanja više čimbenika. Tu se ubrajaju način života (primjerice prehrana, stres, pušenje...), te razni čimbenici biološkog, kemijskog i fizičkog podrijetla. Postoji više teorija koje nastoje objasniti način nastanka tumora. Jedna od najstarijih teorija je teorija po kojoj su virusi uzročnici tumora. Takvi se virusi nazivaju onkogeni virusi. Po teoriji kroničnog podražaja, tumori mogu nastati kemijskim putem (policiklički ugljikovodici), radiobiološkim putem (zračenjem), mehaničkim putem (žučni ili bubrežni kamenci) ili biološkim putem (kronične upale). Jedna od teorija smatra da su žarišta tumora u organizmu zaostale embrionalne stanice ili normalne stanice koje su ušle u proces dediferencijacije te su po svojim svojstvima postale slične embrionalnim stanicama. Teorija imunološkog nadzora objašnjava važnost imunološkog sustava u uništavanju maligno promijenjenih stanica.

Osnovni poremećaj u nastanku tumora je gubitak kontrole normalnog rasta stanica zbog oštećenja staničnih gena koji reguliraju stanični rast i biološki ciklus: protoonkogeni koji potiču rast i antionkogeni koji koče rast stanica. To znači da se proces nastanka tumora događa već na molekularnoj razini. Oštećenje gena može nastati kao posljedica vanjskih kancerogenih čimbenika (kemijski, fizikalni, mehanički, virusni), te kao posljedica spontanih mutacija u organizmu.

Nastanak tumora je proces koji se sastoji od niza promjena na genotipskoj i na fenotipskoj razini. Promjene koje vode od zdravog stanja stanice do pojave tumora najčešće traju mjesecima i godinama.

Proces nastajanja tumora naziva se karcinogeneza. Karcinogeneza je stupnjeviti proces, a središnji događaj karcinogeneze je nesmrtno genetsko oštećenje. Genetsko oštećenje ili mutacija može biti stečena djelovanjem okolišnih čimbenika, ili može biti naslijeđena još u zametku. Genetska hipoteza zloćudnih tumora uključuje mišljenje da je tumorska masa posljedica klonalnog bujanja jedne jedine stanice prethodnice koja je pretrpjela genetsko oštećenje, tj. da su tumori monoklonalni. Iako je tumor u trenutku kliničkog dijagnosticiranja monoklonski, sadržava stanice koje su vrlo heterogene, što je rezultat brojnih mutacija koje se gomilaju.

Zloćudnu novotvorinu karakterizira prekomjerni rast, lokalna invazivnost i sposobnost stvaranja udaljenih metastaza. Obilježja se stječu postupno, a pojava je nazvana tumorsko napredovanje. Na molekularnoj razini napredovanje je posljedica nakupljanja genetskih promjena.

Postoje dvije vrste normalnih regulacijskih gena: protoonkogeni koji potiču rast i tumor supresorski geni ili antionkogeni koji koče odnosno prigušuju rast zloćudnih tumora. Oni su glavne mete genetskog oštećenja. Mutirani aleli protoonkogena smatraju se dominantnim onkogenima, jer pretvaraju normalne stanice u tumorske stanice unatoč postojanju njihova normalnog para. Nasuprot tome, oba normalna alela tumorskog gena prigušivača moraju biti uništena da bi došlo do pretvorbe normalne stanice u tumorsku, pa se ta obitelj gena katkada naziva recesivni onkogeni (14). Pretvorba protoonkogena u onkogene događa se na dva načina: promjenom strukturnih gena, što rezultira stvaranjem nenormalnog genskog proizvoda (onkobjelančevine) s promijenjenom zadaćom i promjenom u kontroli genske izražajnosti, što rezultira pojačanim ili nepovoljnim stvaranjem strukturno normalne pokretačke bjelančevine rasta. Protoonkogeni mogu postati onkogeni retrovirusnom pretvorbom (transdukcijom, *v-onci*) ili utjecajima koji mijenjaju njihovo ponašanje *in situ*, mijenjajući ih tako u stanične onkogene (celularni, *c-onci*). Stanični je rast potaknut povezivanjem čimbenika rasta ili liganda za specifične receptore na površini ili unutar stanice. Većina čimbenika rasta ima receptore na staničnoj membrani, međutim steroidni receptori se nalaze unutar stanica i vežu se s lipofilnim ligandima koji prolaze preko stanične membrane te djeluju uzajamno s receptorom u jezgri ili

citoplazmi. Nakon vezivanja liganda i receptora dolazi do aktivacije receptora čimbenika rasta.

Većina receptora čimbenika rasta povezana je s aktivnošću proteina tirozin kinaze, koja je aktivirana nakon vezanja liganda. Takvi receptori imaju veliko područje izvanstaničnog vezivanja, jednu hidrofobnu transmembransku regiju i citoplazmatsko područje koje sadrži aktivnu tirozin kinazu. Vezivanje liganda pokreće dimerizaciju receptora, što dovodi do aktivacije kinaze i aktivacije fosforilacijske kaskade koja stimulira mirne stanice da uđu u proces rasta. Pokazalo se da ta aktivacija korelira s inhibicijom, odnosno stimulacijom staničnog rasta. U normalnim oblicima tih receptora djelovanje je kinaze prolazno potaknuto vezivanjem njihovih specifičnih čimbenika rasta nakon čega slijedi tirozinska fosforilacija nekoliko supstrata koji su dio mitotičkog lanca. Onkogeni oblici tih receptora združeni su sa stalnim poticanjem djelovanja tirozin kinaze u citoplazmatskom području, ali bez vezivanja za čimbenik rasta. Zbog toga bjelančevine receptora mutanta stalno prenose mitogene poruke u stanicu. Pronađeno je nekoliko primjera onkobjelančevina koje oponašaju djelovanje normalnih citoplazmatskih bjelančevina koje prenose poruke, mnoge su vezane za unutrašnji sloj citoplazmatske membrane npr. proizvodi *c-src* i *ras* gena, ali neke se nalaze u citoplazmi, kao što su *raf* bjelančevine (15).

Specifični poremećaji koji uzrokuju promjene u građi i regulaciji, a štetno djeluju na protoonkogene su u prvom redu točkaste mutacije i kromosomske translokacije. *Ras* onkogen najbolji je primjer pokretanja točkastom mutacijom.

Posljedica pokretanja protoonkogena je umnožavanje i mnogostruko povećanje DNK nizova (nekoliko stotina kopija) u tumorskoj stanici. Povećani se geni mogu otkriti molekularnim metodama ili citogenetskim prepoznavanjem u obliku dvostrukih sitnih čestica i homogeno obojenih odsječaka.

Svi prijenosni putovi poruka ulaze u jezgru, zbog toga nije iznenađujuće da su mutacije gena koji upravljaju prepisivanje DNK združene sa zloćudnim pretvorbama. Cijela gomila onkobjelančevina, uključujući proizvode *myc, myb, jun, fos* i *rel* onkogena, lokalizirana je u jezgri. Točni

mehanizmi kojima te bjelančevine u jezgri remete rast stanica nisu sasvim jasni (16).

Nakon preobrazbe zdrave stanice u tumorsku, zbog nekih od navedenih čimbenika, nastaje stanica koja ulazi u fazu umnožavanja. Glavno svojstvo u toj fazi je nediferenciranost. Dalje slijedi faza u kojoj stanice postaju potpuno nediferencirane i kao takve predstavljalju tumorsko tkivo. Na taj način jedna maligna stanica stvara klon istih takvih stanica.

Tumori se prema svojim osobitostima mogu podijeliti u tri glavne grupe (17):

1. Dobroćudni ili benigni tumor čiji je rast ograničen na tkiva u kojima se razvija, a ne širi se, odnosno ne metastazira u druga tkiva i organe.
2. Tumor *in situ* se obično razvija u epitelu. Stanice su morfološki slične stanicama tumora, ali na razini epitela. One ne napadaju osnovnu membranu niti potporni mehanizam. Neki autori govore o nepravilnostima diplastičnog epitela koji ponekad može prethoditi tumoru *in situ*.
3. Zloćudni ili maligni tumori imaju sposobnost razaranja tkiva u kojem rastu, ali i sposobnost metastaziranja u druga tkiva i organe.

1.2.1. Osobitosti stanica tumora

Stanice zloćudnih tumora imaju sposobnost infiltracije, invazije ili metastaziranja u udaljena mjesta. Invazivnost je posljedica slabljenja međustaničnih veza i izlučivanja proteaza koje razgrađuju međustaničnu tvar i tako olakšavaju prodiranje u okolna tkiva. Zloćudni tumori se šire na tri načina: usađivanjem unutar tjelesnih šupljina, limfogeno ili hematogeno.

Mnogi tumori za vrijeme rasta pokazuju sve veći stupanj malignosti što se očituje porastom anaplazija i kromosomskih aberacija. Također opaženo je kako se stalnim presađivanjem tumora u životinja povećava brzina rasta stanica (18). Tumorske stanice su genetski nestabilne i stoga podložne mutacijama tijekom rasta. Neke su promjene letalne ili uzrokuju smanjen rast u odnosu na susjedne stanice, pa se takvi supklonovi izgube iz populacije stanica tumora dok druge mutacije pridonose većoj autonomiji i prednosti u

rastu te predstavljaju maligne supklonove koji postaju dominantni i vode progresiji tumora.

Invazivnost tumora predstavlja aktivnu migraciju tumorskih stanica iz tkiva njihova nastanka u druga, susjedna ili udaljena tkiva.

Stanice zloćudnih tumora kao i sve ostale stanice trebaju kisik i hranjive tvari iz krvi, te kod brzog uvećavanja mase tumora mogu imati problema s opskrbom krvi. Bez dostatne opskrbe povećavanje mase može se odvijati samo za nekoliko stotina stanica. Tumorske stanice izlučuju čimbenike koji potiču rast krvnog epitela i uraštanje krvnih žila u tumor. Brzina rasta tumora ovisna je o brzini rasta krvožilne mreže odnosno procesa angiogeneze (stvaranje nove krvožilne mreže od susjednih krvnih žila domaćina). Stanice karcinoma luče mnogobrojne čimbenike koji potiču rast novih krvnih žila, a posebice učinkovit stimulator angiogeneze je krvožilno endotelni čimbenik rasta (engl. vascular endothelial growth factor; VEGF).

Angiogeneza je proces stvaranja novih krvnih žila iz već postojećih kapilara. Postoji također i vaskulogeneza gdje krvne žile nastaju *de novo* iz matičnih stanica mezoderma. Rast tumora potiče angiogenezu izravnom stimulacijom endotelnih stanica. Time se stvaraju nove krvne žile u smjeru tumora odgovorne za njegovu opskrbu metabolitima i kisikom. To je dvosmjerna veza tumor-endotelne stanice.

Tumorska angiogeneza je važan proces za tumorski rast i metastaziranje (19). Angiogeneza je kontrolirana lokalnom ravnotežom između čimbenika koji stimuliraju rast novih krvnih žila među koje spadaju fibroblastični čimbenik rasta (engl. fibroblast growth factor; FGF)), krvožilni endotelni čimbenik rasta (engl. vascular endothelial growth factor; VEGF), angiogenin, interleukin-8 i transformirajući čimbenik rasta (engl. transforming growth factors; TGF), čimbenik nekroze tumora α (engl. tumor necrosis faktor- α ; TNF-α) te od onih koji je inhibiraju kao trombospondin-1, interferon-α i –β, angiostatin i endostatin (20,21,22,23,24). U većini normalnih tkiva inhibicijski utjecaji dominiraju i stanice ovih tkiva obično ne stimuliraju angiogenezu. Za razliku od ovog, tumorske stanice koje moraju stimulirati nastanak novih krvnih žila u procesu svog tumorskog napredovanja, su angiogenične, bilo da smanjuju produkciju inhibitornih ili pak povećavaju sekreciju stimulirajućih čimbenika.

Sam proces tumorske angiogeneze počinje hipoksijom ili ishemijom tumora. Tumorske stanice te makrofagi sintetiziraju VEGF (25). VEGF zatim inducira sintezu proteaza i receptora važnih za širenje tumora u lokalna tkiva. Nakon aktivacije endotelnih stanica, počinje razgradnja bazalne membrane kapilara, obično venule. Razgradnju potiču metaloproteinaze (MMPs) koje proizvode tumorske stanice. Endotelne stanice koje se ne dijele migriraju kroz razgrađeni vanstanični matriks prema tumoru. Kroz taj prolaz također izlaze angiogenični čimbenici prema organizmu. Endotelne stanice kapilara proliferiraju, pod utjecajem kiselog fibroblastičnog čimbenika rasta (engl. acidic fibroblast growth factor; aFGF), bazičnog fibroblastičnog čimbenika rasta (engl. basic fibroblast growth factor; bFGF), TGF i VEGF u smjeru tumora, tvoreći novu mrežu kapilara u tumoru.

Angiogeneza je jedan od ključnih koraka u transformaciji tumora iz male, bezazlene nakupine mutiranih stanica u malignu tvorevinu koja ima sposobnost širenja u druge organe tijela. Tumorske stanice oslobađaju angiogenične tvari koje izazivaju mitozu i proliferaciju stanica endotela domaćina u smjeru tumora. Prodiranje krvnih žila u tumor zbiva se kad tumor dosegne promjer od 1-2 mm. Poslije toga počinje eksponencijalni rast tumora. Ako se zaustavi angiogeneza tumora pri veličini od 2-3 mm, on onda ulazi u mirujuće stanje. Dakle, bez angiogeneze tumorski rast je zaustavljen ali tumor je još viabilan.

Slijedeća osobitost stanica tumora je metastaziranje. Ulazeći u kapilare, tumorske stanice mogu izaći van iz krvne žile na udaljenim dijelovima i formirati metastazu. Stanična proliferacija i rast regulirani su finom ravnotežom između čimbenika koji stimuliraju i čimbenika koji inhibiraju stanični rast; poremećaj ravnoteže u korist čimbenika stimulacije vodi nekontroliranom rastu stanica i malignosti (26).

1.3. Učinak inhalacijskih anestetika na zdrave i tumorske stanice

Inhalacijski anestetici nisu biokemijski inertni spojevi. Metaboliziraju se *in vivo* i njihovi metaboliti mogu izazvati akutnu ili kroničnu toksičnost. Glavni mehanizmi toksičnosti su unutarstanično nakupljanje metabolita u toksičnoj količini, zatim stvaranje haptena koji mogu dovesti do sistemske preosjetljivosti ili imunog odgovora, te stvaranje reaktivnih metabolita koji se

mogu kovalentno vezati za tkivne makromolekule ili stvoriti razarajuće slobodne radikale.

Oštećenja tkiva započinju s molekularnim ili morfološkim poremećajima stanica te su pokazatelji oštećenja vidljivi na staničnoj i substaničnoj razini. Poznato je da toksičnost djeluje na stanice kao signal koji izaziva mnoge odgovore, uključujući prilagodbu, oštećenje, proliferaciju, apoptozu i nekrozu. Odgovor stanica na prekomjerne fiziološke i patološke promjene može biti prilagodba (adaptacija) stanica; stanica poprima promjenjeno, ali stabilno stanje koje osigurava opstanak i zdravlje stanice usprkos neprestanom stresu. Ako prilagodba nije moguća ili sposobnost prilagođavanja stanica bude premašena, nastaje oštećenje stanice. Stanično oštećenje reverzibilno je do određene točke; teški ili trajni stres stanica vodi ireverzibilnom oštećenju stanica i umiranju stanica procesom apoptoze ili nekroze.

Vezanje reaktivnih metabolita inhalacijskih anestetika s tkivnim proteinima dovodi do stvaranja hapten-protein kompleksa. Ti kompleksi mogu dovesti do sinteze specifičnih protutijela i izazvati imuni odgovor te prouzročiti oštećenja normalnih stanica okolnog tkiva. Unutarstanični glutation i sulfhidrilni prroteini služe kao normalni stanični antioksidansi; održavaju homeostazu stanice. U normalnim uvjetima glutation može vezati slobodne radikale, ali kod nedostatka glutationa, razarajuća aktivnost radikala vodi oštećenju i smrti stanica.

Životni vijek nukleofilnih metabolita s nesparenim elektronima je kratak, reaktivnost velika kao i posljedična oštećenja stanica. Obzirom da su inhalacijski anestetici lipofilni, šteta od njihovih slobodnih radikala je najveća na lipidnim membranama; dolazi do peroksidacije membrana odvajanjem hidrogena od α-metilen ugljikovog atoma u masnim kiselinama (2).

O genotoksičnosti i citotoksičnosti inhalacijskih anestetika mišljenja su često proturječna. Dosadašnja istraživanja ukazuju na toksičnost anestetika na osoblje u operacijskim salama koje je kronično izloženo djelovanju inhalacijskih anestetika te učinak istih na reproduktivnu funkciju (27). Dokazan je statistički značajno veći broj kromosomskih aberacija i mikronukleusa, te povećan broj izmjena sestrinskih kromatida na limfocitima periferne krvi osoblja u operacijskim salama (28). Nadalje i izlaganje izofluranu i dušičnom

oksidulu u niskim koncentracijama povećava rizik od oštećenja genskog materijala, što dokazuje povećani broj mikronukleusa i povećana učestalost izmjena sestrinskih kromatida na limfocitima periferne krvi osoblja u operacijskim salama (29,30). Sardas i sur. (31) ukazuju na povezanost između oštećenja DNK limfocita periferne krvi i kronične izloženosti halotanu, dušičnom oksidulu i izofluranu. Halotan uzrokuje veća oštećenja DNK od izoflurana; a oštećenja DNK ovisna su o dozi.

Oštećenja zdravlja uzrokovana profesionalnim izlaganjem inhalacijskim anesteticima nisu još dovoljno istražena, ali neki radovi upućuju na to da su inhalacijski anestetici nefrotoksični, hepatotoksični i karcinogeni (32,33). Genotoksičnost halotana i izoflurana dokazana je *in vitro* komet testom na humanim limfocitima periferne krvi u studiji Jaloszyinskog i sur. (34). U tim pokusima halotan i izofluran pomiješani su s 1% dimetilsulfoksidom (DMSO) te su u otopinu uronjene stanice. Obzirom da je DMSO sam toksičan, a uvjeti izlaganja stanica djelovanju inhalacijskih anestetika ne odgovaraju uvjetima opće anestezije gdje se inhalacijski anestetici isporučuju putem isparivača na anesteziološkom aparatu, rezultati ovog istraživanja nisu pouzdani.

Szyfter i sur. (35) proveli su istraživanje na limfocitima periferne krvi osoblja u operacijskim salama koji rade sa sevofluranom i zaključili da sevofluran ne dovodi do oštećenja DNK limfocita periferne krvi osoblja u operacijskim salama. U ovom istraživanju stanice su, kao i u prethodnom inkubirane s 1% otopinom DMSO, pa se nameće pitanje objektivnosti rezultata. Matsuoka i sur. (36) dokazuju *in vitro* da sevofluran i izofluran potiču apoptozu u limfocitima periferne krvi ovisno o dozi i vremenu izloženosti istim anesteticima, a apoptotički signalni put pokrenut sevofluranom uključuje oštećenje membrane mitohondrija i otpuštanje citokroma c iz mitohondrija u citosol (37). Nasuprot tome, Tyther i sur. (38,39) ustanovili su da izofluran i sevofluran inhibiraju apoptozu polimorfonuklearnih neutrofila ovisno o dozi *in vivo* i *in vitro*.

Moudgil i sur. (40) pokazali su da ekvipotentne koncentracije izoflurana, enflurana, halotana i metoksiflurana u mješavini plina sa 70% dušičnim oksidulom, djeluju na kemotaksičnu aktivnost neutrofila i monocita.

Ustanovili su da uz izuzetak izoflurana ostali inhalacijski anestetici smanjuju kemotaksičnu migraciju istih stanica, a najviše dušični oksidul.

Postoje brojna *in vitro* istraživanja utjecaja inhalacijskih anestetika pretežito na limfocite periferne krvi, ali i na druge stanice, međutim *in vivo* istraživanja su vrlo rijetka, kako na životinjama tako i na ljudima. Morisaki i sur. (41) ustanovili su da se ukupan broj leukocita ne mijenja nakon anestezije sevofluranom, ali se smanjuje broj neutrofila, a povećava broj limfocita. Za razliku od njih, Puig i sur. (42) su nakon anestezije miševa s 3% sevofluranom dokazali da on mijenja ukupni broj leukocita u perifernoj krvi, broj B limfocita, CD4+ stanica, imunosni odziv na ovčje eritrocite, a nije uočen hepatotoksični niti nefrotoksični učinak. Uspoređujući genotoksični učinak sevoflurana i izoflurana komet testom na limfocite periferne krvi bolesnika prije i nakon anestezije, ustanovljeno je da oba imaju jak genotoksični učinak, da je učinak najjači nakon 120 minuta anestezije, da popravak oštećene DNK nastupa trećeg dana od anestezije, a do potpunog popravka dolazi peti dan (43). Aleva i sur. (44) su proučavali DNK oštećenja, enzimski popravak DNK i apoptozu na limfocitima bolesnika nakon anestezije sevofluranom. Ustanovili su da je oštećenje DNK najjače prvi poslijeoperacijski dan, popravak DNK događa se nakon 24 h, a kod stanica kod kojih ne uslijedi popravak pokreće se proces apoptoze.

Znatno manje istraživanja posvećeno je utjecaju inhalacijskih anestetika na stanice tumora. Kvolik i sur. (45) dokazuju da halotan, izofluran i sevofluran u anestezijskim dozama imaju *in vitro* citotoksični i antiproliferacijski učinak na stanice tumora. Moudgil i Singal (46) ustanovili su da halotan i izofluran povećavaju broj plućnih metastaza u C57B1 miševa, a Melamed i sur. (47) dokazuju imunosupresijski učinak halotana na štakorima kao posljedicu smanjenja aktivnosti NK stanica (natural killer cells). Hack i sur. (48,49) su u svojim radovima pokazali da su stanice Ehrlich ascitesnog tumora pogodne za istraživanja utjecaja inhalacijskih anestetika te ustanovili citostatsku aktivnost halotana, izoflurana i enflurana *in vitro* kod dugotrajnog izlaganja stanica. Istraživanje Badena i sur. (50) na Swiss/Webster miševima koji su bili izloženi niskim koncentracijama izoflurana u trajanju od nekoliko dana, nije potvrdilo karcinogeni učinak izoflurana.

1.4. Citostatici

Citostatici su kemijski spojevi koji interferiraju s metabolizmom stanice, sprječavaju njen rast inhibicijom enzimskih sustava, oštećuju staničnu jezgru i koče diobu stanice. Prema osnovnoj namjeni njihovo djelovanje usmjereno je na tumorske stanice i narušavanjem njihovog staničnog ciklusa spriječavaju rast ili izazvaju smrt tih stanica u fazi aktivnog rasta. U liječenju tumora i njegovih metastaza najčešće se primjenjuje združeno liječenje koje uključuje kirurško liječenje, terapiju citostaticima, radioterapiju i imunoterapiju, jer se potpuni terapijski učinak vrlo rijetko postiže primjenom samo jedne metode.

Kako bi se u što kraćem vremenu postigao najbolji terapijski učinak, primijenjuju se kombinacije citostatika različitog djelovanja; time se postiže sinergistički učinak i brže, selektivnije citotoksično djelovanje na stanice tumora, a smanjuje se mogućnost rezistencije tumora na pojedini citostatik. Međutim, dosadašnja istraživanja pokazala su da većina ovih lijekova nije dovoljno specifična za stanice tumora; djelovanje citostatika može oštetiti i zdrave stanice. Rezultat toksičnog djelovanja na zdrave stanice su značajne nuspojave u bolesnika i u osoba koje su profesionalno izložene tim lijekovima (51). U procjeni toksičnih učinaka antineoplastičnih lijekova značajnu ulogu imaju različiti citogenetički i molekularno-biološki testovi, pomoću kojih se u kratkom vremenskom razdoblju može otkriti i procijeniti razina oštećenja stanične DNK i pratiti dinamika njenog popravka. Posebnu važnost imaju tehnike poput komet testa koje omogućavaju osjetljivo otkrivanje primarnih oštećenja DNK u pojedinačnim stanicama, neovisno o fazi staničnog ciklusa (52).

Citotoksični lijekovi, poznati još pod nazivima antineoplastični i antitumorski lijekovi ili pak kemoterapija uključuju širok raspon kemijskih tvari. U suvremenoj terapiji zloćudnih tumorskih bolesti danas se upotrebljava više od pedeset vrsta citotoksičnih lijekova. Priroda osnovnog pristupa liječenju karcinoma se neprestano mijenja. Klinički protokoli sada uključuju gensku terapiju, djelovanje na imunosni sustav, stimulaciju elemenata normalne hematopoeze, indukciju diferencijacije u tumorskom tkivu i inhibiciju

angiogeneze. U isto vrijeme, neki od tih lijekova u svakodnevnoj upotrebi imaju mali terapijski indeks i veliku snagu da uzrokuju štetne nuspojave (53).

Dobro poznavanje farmakologije citostatika, interakcije s drugim lijekovima i kliničke farmakokinetike je neophodno za sigurnu i učinkovitu upotrebu citostatika kod bolesnika.

Citostatici su otkrivani kroz veliku skalu sintetskih kemikalija i prirodnih proizvoda. Lijekovi otkriveni u prva dva desetljeća liječenja citostaticima (1950.-1970. godine) dolaze u jaku interakciju s DNK ili njezinim prekursorima, inhibiraju sintezu novog genetskog materijala ili dovode do nepopravljivih oštećenja same DNK. Posljednjih godina, otkrivanjem novih lijekova koji potječu od prirodnih tvari ili semisintetskih spojeva otvaraju se nova istraživanja u području biologije karcinoma (54).

Citostatici se metaboliziraju uglavnom preko citokrom P-450 enzimskog sustava u jetri i u nekim drugim tkivima. Ukoliko ne dođe do bioaktivacije u jetri, ulazak citostatika u stanicu ne mora dovesti i do citotoksične aktivnosti. Aktivacijom citostatika, metaboliti citostatika izlučuju se putem urina te bubrežna funkcija mora biti očuvana, a istodobno davanje drugih nefrotoksičnih lijekova može pojačati toksičnost citostatika.

Među brojnim subspecijalnostima interne medicine, medicinska onkologija ima najveći utjecaj na promjene u liječenju u posljednje dvije dekade, na način da su mnoge do sada neizlječive bolesti postale dostupne liječenju. Novi lijekovi koji su uvedeni u kliničku upotrebu koriste se za bolesti koje su do sada smatrane neizlječivim ili su bile pristupačne samo liječenju kirurškim putem ili radioterapijom. Danas adjuvantna kemoterapija rutinski prati kirurško liječenje.

Osnovna podjela lijekova koji se koriste u liječenju zloćudnih tumora:

Alkilirajući spojevi

Alkilirajući spojevi obično prenose jednu ili više alkilnih skupina na biološke sustave i oštećuju molekulu DNK stvarajući mostove između lanaca. To su vrlo reaktivni spojevi koji mogu stvarati kovalentne veze s nukleinskim kiselinama i proteinima, vežući se na DNK, najčešće na N-7 gvanina ili rjeđe O-6 gvanina te dovode do stvaranja mostova (adukata); ukriženog povezivanja lanaca i nastanka mutacija. Oni imaju znatno veći učinak na brzo

rastuće stanice; zbog nastalih oštećenja stanica i nemogućnosti popravka odlaze u smrt apoptozom. Predstavnici ove skupine su: dušikovi plikavci (ciklofosfamid, klorambucil, melfalan), alkilsulfonati (busulfan), derivati nitrozureje (karmustin, lomustin), etilenimini (trietilenmelamin, heksametilmelamin, tiofosforamid). Spojevi koji sadrže platinu po mehanizmu djelovanja slični su alkilirajućim spojevima. Najpoznatiji su cisplatina i karbaplatina.

Antimetaboliti

Antimetaboliti interferiraju sa sintezom nukleinskih kiselina. Dijele se na slijedeće skupine:

-analozi folne kiseline koji inhibiraju pretvaranje folne kiseline u tetrahidrofolnu kiselinu vežući se na aktivno mjesto enzima dihidrofolat reduktaze, predstavnik je metotreksat

-analozi pirimidina: 5-flourouracil i citarabin

-analozi purina: 6-merkaptopurin kao sumporni derivat hipoksantina, tiogvanin, azatioprin-derivat 6-merkaptopurina, fludarabin fosfat, pentostatin i kladribin

Biljni alkaloidi i njihovi derivati

To su spojevi biljnog podrijetla koji imaju različite učinke na stanične procese. Neki od njih narušavaju funkciju diobenog vretena, izazivajući depolimerizaciju tubulina (vinka alkaloidi) ili njegovu pretjeranu stabilizaciju (paklitaksel), čime je spriječena mitoza. Neki od predstavnika ove skupine, primjerice etopozid, narušavaju funkciju kromatina, a drugi pak inhibiraju esencijalne enzime poput DNK topoizomeraza.

U ovu skupinu također pripadaju antimikotički spojevi: vinblastin, vinkristin, vinorelbin i paklitaksel, zatim epipodofilotoksini: etopozid i tenipozid, antibiotici kao daktinomicin, doksorubicin, idarubicin i daunorubicin te bleomicin, plicamicin i mitomicin, te L-asparginaza, enzim koji hidrolizira L-asparagin te na taj način remeti sintezu proteina koji sadrže ovu aminokiselinu. Na L-asparginazu posebno su osjetljive pojedine vrste tumorskih stanica koje imaju nisku razinu enzima asparagin sintetaze pa im za rast treba više L-asparagina nego zdravim stanicama.

Miješani spojevi:

Tu se nalaze spojevi s platinom, a predstavnici su cisplatina i karbaplatina. Mehanizam djelovanja i spektar kliničke aktivnosti su jednaki kod oba, međutim postoji značajna razlika u kemijskoj strukturi, farmakokinetici i u toksičnom učinku. Karbaplatina je manje potentan lijek od cisplatine i većinom se izlučuje urinom s poluvremenom života od 2-6 sati. U miješane spojeve ubrajaju se još hidroksiureja, prokarbazin i mitotan. Hidroksiureja inhibira sintezu DNK, a da pritom ne remeti sintezu RNK niti bjelančevina. Ona specifično inhibira enzim ribonukleotid-difosfat-reduktazu koja katalizira pretvorbu ribonukleotid-difosfata u odgovarajući 2-deoksiribonukleotid. Prokarbazin mora proći metaboličku aktivaciju da bi se stvorio citotoksični reaktant, koji metilira DNK. Metabolit prokarbazina može dovesti do kromosomskih oštećenja, uključujući kromatinske lomove i translokacije. Izlaganje prokarbazinu dovodi do inhibicije DNK, RNK i sinteze proteina *in vivo.* Mitotan se kemijski ponaša kao insekticidi DDT i DDD. Koristi se u liječenje neoplazmi kore nadbubrežne žlijezde.

Hormoni i srodni spojevi

Tu spadaju adrenokortikosteroidi, aminoaminoglutetimidi, progestini, estrogeni i androgeni, antiestrogeni, analozi gonadotropnog hormona i nesteroidni antiestrogeni. Nemaju izravno citotoksično i citostatičko djelovanje, ali obzirom da je za rast ovih tumora potrebna određena hormonalna aktivnost, korištenjem antagonističkih hormona može se inhibirati rast tih tumora. Najpoznatiji predstavnik antiestrogena je tamoksifen, a od nesteroidnih antiandrogena flutamid.

Modifikatori biološkog odgovora

To su tvari koje djeluju na biološki odgovor bolesnika na bolest, a onda indirektno imaju antitumorsku aktivnost. Rekombinantna DNK tehnologija je načinila veliki napredak u prepoznavanju brojnih humanih proteina s jakim djelovanjem na funkciju i rast normalnih i tumorskih stanica. Tu spadaju interferoni, interleukini, hematopoetski faktor rasta, eritropoetin, G-CSF (engl. Granulocyte colony-stimulating factor), GM-CSF (engl. Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor), TNF (engl. Tumor necrosis factor) i različita monoklonska protutijela i tumorska cjepiva (54).

Toksičnost citostatika

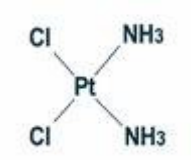
Niske koncentracije citostatika ne dovode do citotoksičnosti; povećanje koncentracije citostatika potiče smrt stanica ovisno o dozi i vremenu izlaganja kemoterapijskom lijeku. Citotoksičnost citostatika očituje se i na zdravim stanicama. Omjer između odgovora tumorskih stanica i normalnih stanica na dozu lijeka naziva se terapijski indeks. Smanjeni terapijski indeks ograničava upotrebljivost mnogih kemoterapijskih lijekova. Toksičnost za zdravo tkivo koje sprječava povećavanje doze naziva se toksičnost u vezi sa smanjenjem doze. Tkiva koja proliferiraju (koštane srži i sluznica probavnog trakta) najosjetljivija su na toksičnost citostatika.

Koristeći kombinaciju citostatika u kratkom vremenu također smanjujemo mogućnost rezistencije tumora na pojedini citostatik. Ovakav pristup se temelji na bržem oporavku zdravih stanica od citostatika u odnosu na maligne stanice. Brzo dijeljenje i sinteza DNK malignih stanica povećava učinkovitost citostatika (51).

1.4.1. Cisplatina

Cisplatina (cis-Diamindikloroplatinum) je divalentni anorganski, u vodi topivi kompleks s platinom sintetskog podrijetla. Uvođenje cisplatine u široku kliničku uporabu dovelo je do značajnog napretka u kemoterapijskom liječenju, te su rezultati liječenja kemoterapijom poboljšani i postali ujednačeni.

Cisplatina sadrži kompleks koji ulazi u stanice difuzijom i oštećuje heliks DNK. Atomi klora ulaze u reakciju s nukleofilima, te pozitivno nabijena molekula reagira sa nukleinskim kiselinama i proteinima. Cisplatina je pokazala *in vitro* i *in vivo* značajno sinergistično djelovanje s većinom drugih citostatika. Premda nije najučinkovitija među pojedinačno primijenjenim citostaticima, jedan je od najšire i najviše primijenjivanih citostatika u polikemoterapijskim protokolima.



Slika 1. Strukturna formula cisplatine

Cisplatina po kemijskom sastavu pripada u skupinu miješanih spojeva, ali po načinu djelovanja najsličnija je akilirajućim agensima; kovalentno povezuje uzvojnice DNK, inhibira sintezu DNK, te zaustavlja rast stanice, a učinci tog unakrsnog vezivanja najviše su izraženi u S fazi. Citotoksičnost je određena ravnotežom između enzimske stanične obnove oštećene DNK i opsega međusobnih veza DNK. Enzimski popravak mostova koji su nastali zbog djelovanja cisplatine uključuje isjecanje zahvaćene baze, ubacivanje nove baze i ponovno formiranje oštećene baze enzimima (52).

Cisplatina reagira prvenstveno na N-7 položaj gvanina i stvara različite jednostruke i dvostruke mostove. Prvi korak je stvaranje jednostrukih međuveza, koje mogu dalje reagirati i stvarati dvostruke unakrsne veze unutar lanca DNK ili između dva lanca. Najčešća dvostruka oštećenja koja izaziva cisplatina na lancu DNK *in vitro* su d(GpG)Pt, d(ApG)Pt i d(GpNpG)Pt, a međulančane veze između gvanina smještenih na suprotnim stranama lanaca nastaju u manje od 5% slučajeva. Ove međuveze spriječavaju stanične procese kod kojih dolazi do međusobnog odvajanja lanaca DNK, kao što su replikacija i transkripcija (55).

Strukturne analize unutarlančanih međuveza d(GpG)Pt učinjene su X zrakama i nuklearnom magnetskom rezonancom. Dokazano je da vezivanje platine na DNK izaziva različite poremećaje u dvostrukom heliksu DNK, uključujući uvijanje za 26 do 50 stupnjeva između povezanih gvaninskih baza, zakrivljivanje osi heliksa i odmotavanje DNK. Nadalje, proteini koji u normalnim uvjetima sudjeluju u popravku DNK kao npr. polimeraze, ne prepoznaju ove hidrofobne mostove; drugi proteini koji prepoznaju oštećenu DNK postaju aktivni i pokreću programiranu smrt stanica (56).

Redoslijed događaja koji vode staničnoj smrti nakon stvaranja platina-DNK međuveza nije još dovoljno istražen, međutim stanice obrađene s cisplatinom izražavaju biokemijska i morfološka obilježja apoptoze (57).

Osjetljivost stanica na cisplatinu ovisna je i o staničnom ciklusu; stanice u proliferaciji su osjetljivije za razliku od stanica u G_o ili G_1 fazi (58). U pokusima Sorensona i Eastmana dokazano je da nakon obrade stanica ovarija kineskog hrčka (engl. Chinese hamster ovary; CHO) s cisplatinom u niskoj dozi dolazi do oporavka stanica i nastavlja se stanični ciklus, a u visokoj dozi cisplatine stanice umiru apoptozom nakon produžene G_2 faze. Prije apoptoze zamjećena je aberantna mitoza, a prolaz kroz S fazu je neophodan za G_2 fazu; stanična smrt je rezultat nastalih oštećenja DNK (59).

Proapoptotički signal nije točno ustanovljen. Jedna skupina istraživača smatra da su proteini ili proteinski kompleksi odgovorni za pokretanje procesa apoptoze; međuveza proteinskih kompleksa i DNK pokreće signal stanične smrti. Nadalje, mutacija ili promjena tih proteina može rezultirati u razvijanju rezistencije stanice na cisplatinu. Otkriveno je nekoliko proteina i proteinskih skupina. Prva od njih je skupina proteina HMG1 i HMG2 (engl. high-mobility group proteins); proteini koji prepoznaju zakrivljenu DNK nastalu djelovanjem cisplatine. Interesantno je da HGM1 proteini imaju mogućnost vezanja na zavinutu DNK zbog djelovanja cisplatine, ali ne na zakrivljenu DNK nastalu zbog djelovanja inaktivnog trans izomera platine. HGM skupina proteina sastoji se od 80 bazičnih aminokiselina koje su uglavnom uključene u gensku ekspresiju. Iako glavna funkcija tih proteina u platinskoj osjetljivosti i rezistenciji nije dovoljno razjašnjena, smatra se da je HGM skupina proteina odgovorna za usmjeravanje prisutnog DNK oštećenja prema popravku DNK ili prema programiranoj staničnoj smrti stanice. Uloga ovih proteina zahtjeva dalja istraživanja (60,61,62).

Brojni drugi proteini koji prepoznaju cisplatinska oštećenja DNK također su otkriveni; važno je spomenuti histone H1, RNK transkripcijske polimeraze I, hUBF (engl. Upstream binding factor), TATA vezujući protein (engl. TATA binding protein; TBP) i MMR proteini (engl. Mismatch repair proteins). MMR proteini su izazvali veliko zanimanje jer je prepoznavanje platinskih DNK međuveza od strane MMR kompleksa povezano sa osjetljivošću na cisplatinu (63).

Prisutnost cisplatinskih oštećenja DNK rezultira u stalnom ciklusu popravaka DNK što posljedično vodi do nakupljanja oštećenja na razini DNK te staničnoj smrti.

Iako specifični proteini uključeni u prepoznavanje platinskih DNK međuveza još nisu potpuno prepoznati, brojni signalni događaji nakon djelovanja cisplatine na DNK se ipak znaju. Primjerice, ATM i njemu pridružen Rad3 protein (ATR) koji su uključeni u pokretanje staničnog ciklusa, aktiviraju se djelovanjem cisplatine. Te kinaze fosforiliraju i aktiviraju mnoge efektore koji reguliraju stanični ciklus, popravak DNK, preživljavanje stanica i apoptozu. Tu su uključeni p53, CHK2 i članovi MAPK (engl. Mitogen-activated protein kinase). Poznato je da je p53 potreban za aktivaciju proapoptotičnih proteina kao što je obitelj Bcl-2. Međutim, poremećaj funkcije p53 ne vodi uvijek do smanjenja osjetljivosti na cisplatinu. Dvije studije dokazuju da oštećenje p53 prije dovodi do povećane osjetljivosti stanica na cisplatinu nego do povećane rezistencije, također može doći do preuranjene mitoze u prisutnosti DNK oštećenja što rezultira staničnom smrću (64,65).

Svakodnevno se povećava naše znanje o broju molekula koje mogu djelovati na provođenje signala u stanici i dovesti do povećane osjetljivosti ili otpornosti stanice na djelovanje cisplatine. Lista je velika i uključuje citokine, čimbenike rasta, kinaze, fosfataze, sekundarne glasnike, čimbenike transkripcije, redoks proteine i proteine vanstaničnog matriksa. Važno je spomenuti da u nekim okolnostima ekspresija sigurnih protoonkogena; Ha-Ras, v-abl, Her2/neu potpomaže preživljavanje stanica nakon izlaganja cisplatini (66).

1.5. Međudjelovanje anestetika i citostatika

Farmakokinetske međureakcije nastaju kada jedan lijek mijenja djelovanje drugog, bilo da utiče na njegovu koncentraciju u krvi ili na receptoru. Promjenjena koncentracija lijeka na receptoru može uslijediti zbog promijenjene apsorpcije, raspodjele, metabolizma, uklanjanja ili izlučivanja lijeka. Citostatici su lijekovi koji se daju s ciljem da selektivno razore tumorske stanice uplićući se u njihov metabolizam na način koji nije prisutan u zdravim stanicama (67).

Svakodnevno se povećava broj onkoloških bolesnika koji se kratko vrijeme nakon kemoterapije upućuju na operacijske zahvate u općoj anesteziji; a nerijetko se citostatici daju intraoperativno. Kemoperfuzija je nova metoda kliničke onkologije, a postupak uključuje intraoperativnu infuziju citostatika intraperitonealno ili u organe, primjerice u jetru, slezenu ili u neka druga područja zahvaćena tumorom. Osim planiranih operacijskih zahvata onkološki bolesnici koji primaju citostatike podvrgavaju se i hitnim operacijskim zahvatima, bilo zbog komplikacija bolesti ili zbog nekog drugog razloga. Nažalost, s povećanjem broja ovih bolesnika povećava se i broj ozbiljnih komplikacija koje nastaju zbog međureakcije anestetika i citostatika. Dostupna literatura o ovoj problematici je vrlo oskudna te se čini da ova međureakcija ne predstavljaju veliki klinički problem, međutim nedovoljno poznavanje i razumijevanje problema ne umanjuje značaj međureakcije anestetika i citostatika (68). Vrlo je važno razumjeti farmakologiju citostatika, međureakcije sa anesteticima, farmakokinetiku i toksične reakcije. Inhalacijski anestetici smanjuju protok krvi kroz jetru, vezuju se na proteine plazme i djeluju na aktivnost metaboličkih enzima, te posljedično inhibiraju metabolizam velikog broja lijekova (67).

Svaka anestezija i operacija dovode do stresa, a sami anestetici mijenjaju staničnu imunost. Bolesnici koji primaju citostatike u perioperacijskom periodu mogu imati opće ili organ specifične nuspojave. Mogu se pojaviti na prvi pogled klinički nevidljivi simptomi i dovesti do komplikacija za vrijeme anestezije, u postoperacijskom periodu ili nakon dužeg vremenskog razdoblja kada se bolesnik oporavi od operacije i kemoterapije te se vrati uobičajenim aktivnostima (69). Najznačajnije rane nuspojave koje mogu uslijediti su oštećenja gastrointestinalnog sustava, oštećenje jetre, bubrega, centralnog nervnog sustava i mijelosupresija. Cisplatina može uzrokovati oštećenja proksimalnih tubula, povećano izlučivanje natrija i poremećaj elektrolita te neurotoksičnost ovisno o dozi (51).

Citostatici se metaboliziraju putem P450 enzimskog sustava u jetri i nekim drugim tkivima, a izlučuju se putem bubrega. Inhalacijski anestetici se uglavnom uklanjaju iz organizma putem pluća, međutim manji dio se metabolizira u jetri, također putem citokroma P450. Citokrom P450 sastoji se

od preko pedeset enzima koji su odgovorni za Fazu I metabolizma mnogih lijekova. Inhalacijski anestetici, naročito halotan smanjuju protok krvi kroz jetru i bubrege mijenjajući metabolizam citostatika. Osim toga što se inhalacijski anestetici upliću u metabolizam citostatika te mijenjaju njihovu toksičnost, oni također djeluju i na rast stanica tumora (45).

Genotoksičnost i citotoksičnost cisplatine nije upitna, ona predstavlja njen mehanizam djelovanja, međutim o genotoksičnom i citotoksičnom učinku inhalacijskih anestetika postoje različita mišljenja. Genotoksični i citotoksični učinak kombinacije inhalacijskih anestetika i citostatika na stanice periferne krvi, jetre, bubrega, mozga i tumora možemo samo pretpostavljati, a istražiti ga bilo bi vrlo korisno za svakodnevnu kliničku praksu. Saznanja koji anestetik ima prednost u primjeni kod onkoloških bolesnika, naročito ako ti bolesnici primaju citostatike od velikog su značaja. Klinička istraživanja ove vrste je vrlo teško provesti, pa su većina dostupnih podataka rezultat istraživanja *in vitro* na kulturama tumorskih stanica ili *in vivo* na životinjama (45,46). Primjerice, Moudgil i Singal (46) pokazuju da halotan i izofluran povećavaju broj metastaza u miševa s melanomom, dok O'Leary i sur. (70) dokazuju antiproliferativni učinak inhalacijskih anestetika.

Također je bitno utvrditi združeni učinak inhalacijskih anestetika i cisplatine na biokemijske parametre u krvi, s obzirom na toksičnost nastalih metabolita te njihov učinak na stanice jetre i bubrega. Istraživanje Topal i sur. (71) ukazuju na porast serumskih jetrenih enzima; aspartat aminotransferaze (AST), alanin aminotransferaze (ALT) i glutamiltransferaze (GGT) nakon anestezije halotanom, izofluranom i sevofluranom, a najjači porast jetrenih enzima je uzrokovan halotanom.

1.6. Komet test

Komet test ili mikrogel elektroforeza vrlo je djelotvorna tehnika za procjenu oštećenja i popravaka molekule DNK na razini pojedinačnih stanica (72). Prvu mikrogel elektroforezu u svrhu procjene oštećenja DNA u pojedinačnim stanicama uklopljenim u agarozni gel proveli su još 1984. godine Östling i Johanson. Metoda je dobila naziv prema obliku kometa koji

su poprimile oštećene flourescirajuće stanice. Bazira se na svojstvu polomljenih krajeva negativno nabijene molekule DNK koji su postali slobodni, da putuju u električnom polju od jezgre prema anodi. Mogućnost DNK da putuje je funkcija duljine ulomka molekule DNK. Bivša stanična jezgra i polomljeni ulomci razvučeni u električnom polju oblikuju „glavu“ i „rep“ komete (73).

To je osjetljiva tehnika za otkrivanje primarnih oštećenja DNK u pojedinačnim stanicama in *vitro* i *in vivo*, daje uvid u osjetljivost pojedinih stanica na djelovanje određenog spoja te omogućuje otkrivanje velikog broja različitih oštećenja genoma, primjerice jednolančane i dvolančane lomove DNK, adukte u molekuli DNK, te apurinska i apirimidinska mjesta i mjesta DNK-protein veza (52).

Za utvrđivanje genotoksičnosti neke tvari, potrebno je izložiti staničnu DNK djelovanju genotoksina, zatim ustanoviti da li postoji oštećenje DNK, a nakon toga kvantificirati to oštećenje. Ukoliko je oštećenje molekule DNK malo, ona se više isteže nego putuje. Porastom broja oštećenja, dijelovi DNK molekule slobodno putuju i tvore rep komete sve do krajnjeg slučaja (apoptotične stanice) u kojoj su glava i rep komete jasno razdvojeni. Za mikroskopski vidljiv pomak dovoljno je da molekula DNK putuje samo djelić milimetra. Jedan prekid molekule (uzrokovan genotoksinom) dovoljan je da se takva višestruka uzvojnica DNK raspe iz svoje čvrste strukture.

Komet metoda danas se smatra najosjetljivijom metodom za mjerenje lomova DNK molekule, a to je ujedno jedna od rijetkih metoda koja omogućava analizu pojedinačnih interfaznih stanica na vrlo malom uzorku s rezultatima dostupnim unutar nekoliko sati nakon izlaganja toksinu. Lezije molekule DNK koje se ovom metodom mogu uočiti nakon djelovanja kemijskih mutagena u najvećoj su mjeri apirimidinska/apurinska mjesta. Preparati se oboje flourescentnom bojom i vizualiziraju pomoću epiflourescencijskog mikroskopa.

U genotoksičnim istraživanjima poseban interes predstavljaju oni mutageni spojevi koji uz direktno oštećenje molekule DNK izazivaju i dodatne tzv. međuveze između lanaca DNK kao što su npr. neki citostatici, formaldehid, metali i sl. Jedna od velikih prednosti komet metode je ta da se

može koristiti za sve vrste biljnih i životinjskih tkiva, što otvara velike mogućnosti usporedbe rezultata dobivenih analizom genoma cirkulirajućih limfocita, drugih stanica u analizi mutagena i ciljnih tkiva za pojedine tkivne mutagene kao što su jetra, pluća, bubrezi i slično. Ispitivanja cjelovitosti genoma u spolnim stanicama, koji je od velike važnosti za pravilan prijenos informacija na buduće generacije, prijenos nasljednih bolesti i nastanak karcinoma uspješno se može analizirati ovom metodom (74).

U posljednjih desetak godina metoda je korištena kako u bazičnim, tako i primijenjenim istraživanjima, ali potrebno je upozoriti da je ograničena na praćenje lomova DNK koji su u najvećoj mjeri popravljivi staničnim mehanizmima popravka. Zbog toga je važno istovremeno korištenje drugih metoda kako bi se normirali uvjeti rada u metodi i reducirale varijabilnosti. Osim oštećenja DNK komet testom se može pratiti i popravak DNK (75).

Neke od osnovnih prednosti ove tehnike su: osjetljivost, ponovljivost rezultata, jednostavnost primjene, niski troškovi, brzina izvođenja i mala količina uzorka potrebnog za analizu. Analizirati se može bilo koja vrsta stanica biljnog, životinjskog ili ljudskog podrijetla. Stanice se mogu izolirati iz različitih tkiva ili staničnih kultura. Rezultati se mogu dobiti u roku od nekoliko sati, pa je metoda postala općeprihvaćena u istraživanjima učinaka različitih genotoksičnih tvari u uvjetima *in vitro* i *in vivo* (76,77). Danas se najviše koriste dvije izvedbe komet testa, jednu su predložili Olive i sur. (78), a drugu Singh i sur. (73). Prva izvedba testa je u neutralnim uvjetima i omogućuje specifično otkrivanje dvolančanih lomova u molekuli DNK. Drugi način izvedbe je komet test u alkalnim uvjetima (pH 13). Ta se izvedba smatra optimalnom za otkrivanje učinaka različitih genotoksičnih tvari, a omogućuje specifično otkrivanje jednolančanih lomova, mjesta osjetljivih na lužine te ukriženog povezivanja između molekula DNK-DNK i DNK-proteini. Mjesta osjetljiva na lužine nastaju u dijelovima molekule DNK gdje postoje apurinska i apirimidinska, tzv. AP mjesta. Ta su mjesta podložnija oštećenjima pa se u lužnatim uvjetima pretvaraju u lomove.

Osnovna ideja testa vrlo je jednostavna: pojedinačne stanice najprije se uklapaju u "agarozni sendvič" gel na brušenim predmetnim stakalcima, citoplazma se lizira pod neutralnim ili alkalnim uvjetima, a stanične jezgre

izlože se djelovanju električnog polja. Za liziranje stanica primjenjuje se otopina s visokom koncentracijom etilen-diamin-tetraoctene kiseline (EDTA) i detergenata. EDTA pospješuje destabiliziranje membrana tvoreći helate s ionima metala vezanim uz membranske strukture stanice. Detergenti pak djeluju na molekule lipida iz stanične membrane, izazivajući razaranje membranskih struktura stanice i oslobađanje ukupne DNK. Potom se DNK denaturira u lužnatom ili neutralnom puferu, ovisno o tome koju vrstu oštećenja namjeravamo pratiti (77). Pufer za denaturaciju, osim što denaturira DNK pospješuje uklanjanje soli oslobođenih razaranjem staničnih struktura, koje bi mogle neutralizirati negativne naboje fosfatnih skupina DNK i ometati pokretljivost DNK u gelu za vrijeme elektroforeze (79). Tijekom elektroforeze pod utjecajem električnog polja, ulomci DNK nastali jednolančanim ili dvolančanim lomovima izlaze iz jezgre i kroz pore agaroznog gela putuju prema anodi. Međutim, glavnina DNK zbog velike molekularne mase ne može putovati kroz pore gela prema anodi. Putovati mogu samo ulomci DNK nastali jednolančanim ili dvolančanim lomovima; kraći ulomci imaju bolju pokretljivost kroz gel. Zbog razlike u brzini kretanja, ulomci se razdvajaju prema veličini (80). Komet test može otkriti i stanice u apoptozi te nekrotične stanice. Kometi stanica u apoptozi imaju male "glave", a većina DNK raspršena im je u obliku "repa". Različite modifikacije komet testa omogućuju otkrivanje i drugih vrsta oštećenja, primjerice nepotpunog ekscizijskog popravka i unakrsnih veza između lanaca DNK (80,81).

Oštećenje DNK procjenjuje se na osnovi udjela DNK u "repu" kometa i udjela DNK u "glavi" kometa. Nakon elektroforeze i bojanja s fluorescencijskom bojom, u gelu se mogu uočiti kometi različitih veličina. Za bojanje se najčešće koristi etidij-bromid, a mogu se koristiti propidij-jodid i akridin oranž. Pod epifluorescencijskim mikroskopom analizira se 50-100 stanica. Stanice se razvrstavaju po dužini repa obično u pet kategorija od 0 do 4 (72,73). Za mjerenje kometa i procjenu oštećenja danas postoje sustavi za analizu slike, u kojima je epifluorescencijski mikroskop povezan s računalom, a pomoću posebnih računalnih programa za svaki pojedinačni komet istovremeno se mjeri više parametara (82).

1.7. Mikronukleus test

Mikronukleusi su male kromatinske strukture koje nalikuju jezgri, a smještene su unutar interfazne citoplazme (83,84). Nastaju uslijed lomova kromosoma i kondenzacije acentričnih kromosomskih ulomaka ili kromosoma zaostalih u anafazi (85). Prisutnost mikronukleusa pokazatelj je postojanja aberacija u prethodnoj diobi stanice (86) te se stoga učestalost mikronukleusa može koristiti kao kvantitativna mjera strukturnih i numeričkih aberacija kromosoma u stanicama, u uvjetima *in vitro* i *in vivo* pod utjecajem različitih genotoksičnih tvari (87,88).

Nastanak mikronukleusa mogu potaknuti genotoksične tvari u stanicama izloženog organizma na dva načina:

Aneugeni učinak – nakon što stanica uđe u diobu zbog oštećenja i nefunkcionalnosti mikrotubula diobenog vretena, onemogućeno je putovanje jednog ili više kromosoma na pol stanice. Nakon citokineze zaostali kromosomi u citoplazmi stanice kćeri tvore mikronukleuse.

Klastogeni učinak – mikronukleus nastaje od acentričnih ulomaka kromosoma (ulomci kromatida i kromosoma) nastalih uslijed loma kromosoma.

Spontanom nastanku mikronukleusa doprinose: a) mutacije kinetohornih proteina, centromera i diobenog vretena koje mogu izazvati nejednaku raspodjelu kromosoma ili gubitak čitavih kromosoma tijekom anafaze i b) nepopravljeni kromosomski lomovi koji dovode do stvaranja acentričnih ulomaka, a nastaju djelovanjem endogenih čimbenika ili pod vanjskim utjecajem (89). Povećani broj mikronukleusa može ukazivati i na općenitu genetičku nestabilnost. Stanice s nestabilnim kariotipom imaju sklonost uklanjanja kromosoma, što se barem djelomično zbiva putem stvaranja mikronukleusa. Dokazano je da oko 50% spontano nastalih mikronukleusa sadrži čitave kromosome, a ostali nastaju od acentričnih ulomaka. Mikronukleusi koji sadrže čitave kromosome češće se nalaze u starijih nego u mlađih ispitanika (90).

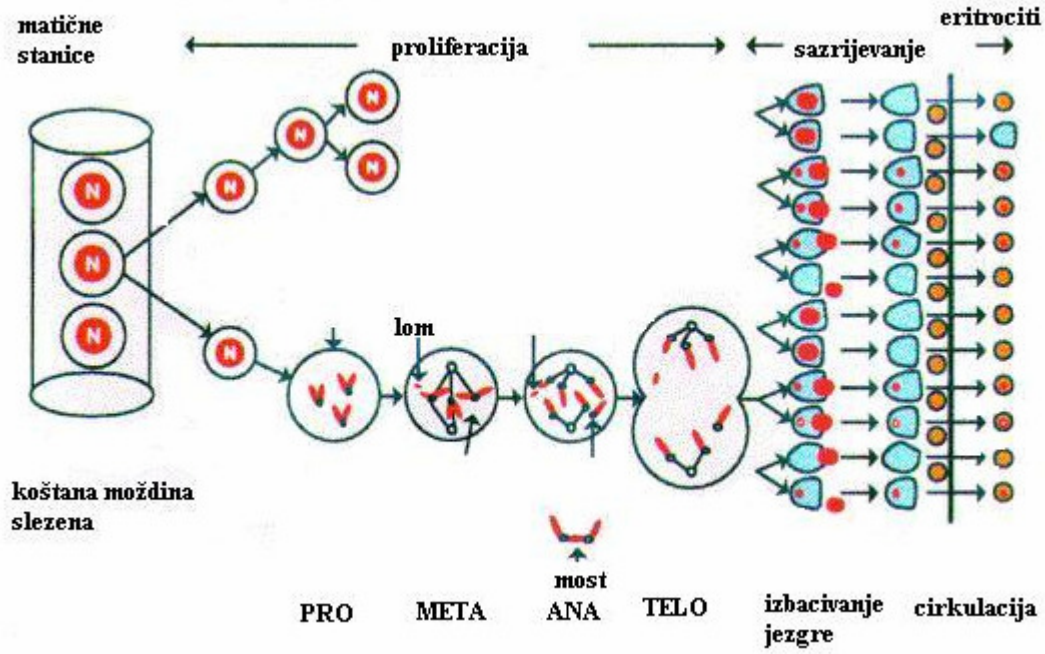
Mikronukleus test brži je i jednostavniji od analize strukturnih aberacija kromosoma, podjednako je osjetljiv u otkrivanju oštećenja diobenog vretena i aberacija kromosoma, te je uključen u standardnu "bateriju" testova genotoksičnosti (91).

Primjenom standardnog mikronukleus testa ne mogu se razlikovati mikronukleusi koji potječu od acentričnih ulomaka od mikronukleusa koji potječu od čitavih kromosoma. Da bi prevladali to ograničenje, brojni istraživači kombiniraju klasični mikronukleus test s raznim citološkim tehnikama, primjerice fluorescencijske *in situ* hibridizacije sa sondama koje specifično otkrivaju centromerna ili telomerna područja kromosoma (92). S obzirom da prisutnost ili odsutnost centromernih, telomernih ili nekih drugih specifično obilježenih dijelova kromosoma omogućuje utvrđivanje podrijetla mikronukleusa, navedene tehnike vrlo su korisne u istraživanjima klastogenih ili aneugenih mehanizama djelovanja različitih kemijskih ili fizikalnih čimbenika u uvjetima *in vitro* i *in vivo*.

1.7.1. Mikronukleus test u uvijetima *in vivo*

Prvobitno je mikronukleus test razvijen kao test na stanicama koštane srži i eritrocitima sisavaca, a kasnije je njegova primjena proširena na različite vrste stanica. Najčešće korišteni *in vivo* mikronukleus test u testiranju na laboratorijskim životinjama (glodavci) izvodi se na stanicama koštane moždine i na nezrelim eritrocitima periferne krvi (polikromatski i normokromatski eritrociti) (91).

U odraslih miševa koštana moždina i slezena su organi u kojima matične stanice proliferiraju i sazrijevaju u procesu hematopoeze. Za vrijeme proliferacije matične stanice se dijele i iznimno su osjetljive na genotoksične tvari koje mogu uzrokovati oštećenja kromosoma i nastanak mikronukleusa, a nastali mikronukleusi se tijekom diobe stanica ne ugrađuju u jezgre stanica kćeri već ostaju u citoplazmi. U procesu sazrijevanja eritrocita eritroblasti se razvijaju u polikromatske eritrocite (mladi eritrociti koji još sadrže RNK, a jezgra im je izbačena iz stanice) u kojima su vidljivi mikronukleusi (Slika 2). Veliki broj polikromatskih eritrocita u miševa ulazi u cirkulaciju te se njihova prisutnost može utvrditi primjenom različitih boja koje se specifično vežu na DNK. Broj mikronukleusa može se utvrditi mikroskopskom analizom ili pomoću protočnog citometra (93). U novije vrijeme za utvrđivanje broja mikronukleusa primjenjuje se i računalni sustav za analizu slike (94,95).



Slika 2. Proces eritropoeze; mehanizam nastanka mikronukleusa u polikromatskim eritrocitima

1.8. Stanična smrt prouzročena citostaticima

Za vrijeme rasta i razvoja organa stanična smrt igra važnu ulogu u održavanju homeostaze. Homeostatska kontrola broja stanica rezultat je ravnoteže između proliferacije i smrti. Poznata su tri oblika stanične smrti; apoptoza (fiziološka, prirodna ili programirana smrt stanice), autofagija i nekroza (slučajna, sporedna ili toksična smrt stanice).

Stanična smrt može se podijeliti u tri funkcionalno različite faze:

a) faza indukcije; ovisna o okidaču koji pokreće staničnu smrt;
b) izvršna faza;
c) faza smrti stanice; dolazi do raspada jezgre i kromatinske fragmentacije.

Različiti pokretači stanične smrti kao što su TNF, šok, virusi, inhibicija sinteze proteina, oksidativni stres i hipoksija mogu dovesti do apoptoze i nekroze. Također, jednostavni signalni mehanizmi koji uključuju reaktivne radikale kisika (ROS), Ca^{++}, i brojni čimbenici (protutumorski lijekovi, gubitak faktora rasta, zračenje) povezani sa stresom mogu prouzročiti staničnu smrt. Reaktivni radikali kisika sudjeluju kao izravni ili neizravni pokretači apoptoze,

imaju značajnu ulogu za vrijeme indukcijske faze, povećavaju propusnost mitohondrijske membrane te vode konačnoj smrti stanice. Čini se da čak i proteini koji su visoko specifični za apoptozu (Bcl-2 i kaspaze) sudjeluju u nekrozi. Nedavna istraživanja govore u prilog tome da oblik stanične smrti ovisi o količini unutarstaničnog ATP-a; nizak nivo ATP-a pokreće apoptozu i započinje nekrozu.

U posljednja dva desetljeća uloga apoptoze u citotoksičnosti antitumorskih lijekova postala je jasnija. Upoznavanje proapoptotičkih gena kao što je Bax, ili inhibicija antiapoptotičkih gena primjerice Bcl-2, povećava učinak citostatika.

U solidnim tumorima hipoksija i nedostatak glukoze smanjuju progresiju tumora dok nedostatak adenozin 5´-trifosfata (ATP-a) dovodi do nekroze. Stvaranje laktatne kiseline u anaerobnim uvjetima najčešće rezultira autofagijom koju pokreće humani tumor supresorski gen Beclin 1.

1.8.1. Apoptoza

Apoptoza je homeopatski proces koji omogućava da stare, mutirane ili oštećene stanice umru. U stanicama karcinoma taj je mehanizam često oštećen, maligne stanice ne umiru, umjesto toga nastavljaju proliferaciju.

Apoptoza (grč. a*poptosis* znači opadanje) je kontrolirani oblik stanične smrti koja služi kao molekularna točka regulacije fizioloških procesa. Stanična selekcija apoptozom javlja se tijekom normalnih fizioloških funkcija, kao i u slučajevima toksičnosti i bolesti. Proces kontrolirane stanične smrti poznat je već jedno stoljeće i opisan kao "genima regulirana stanična smrt" jer predstavlja genetički reguliran proces samoubojstva. U kontrolu stanične sudbine uključen je kompleksni sustav staničnih signala i ekspresija specifičnih gena. Mehanizmi uključivanja stanica u apoptozu su različiti, kao i način aktivacije, ali nakon podvrgavanja stanica apogenu (tvari koje izazivaju apoptozu) apoptoza može imati konačni zajednički put. Ovaj put uključuje određeni receptor, sintezu proteina, ulazak Ca^{2+}, aktivaciju Ca^{2+}/Mg^{2+}-endonukleaza, fragmentaciju DNK i odbacivanje apoptotičkih tijela (96). Svi višestanični organizmi imaju mehanizam za ubijanje pojedinačnih stanica i

upotrebljavaju fiziološku smrt stanica za obranu, razvoj, homeostazu i starenje.

Morfološke osobitosti stanica u apoptozi

Apoptoza obično zahvaća pojedinačne stanice, dok veći broj stanica može podleći apoptozi u *in vitro* uvjetima i u patološkim uvjetima *in vivo*. Najranije promjene, vidljive elektronskim mikroskopom u procesu apoptoze su gubljenje konformacije plazmatske opne, gubitak mikrovila i veza između stanica. Volumen stanice se smanjuje zbog skupljanja citoplazme i jezgre. Promjene se javljaju brzo (unutar nekoliko sati), a većina morfoloških i biokemijskih promjena nastaje u jezgri. Kromatin formira guste polumjesečaste nakupine na unutrašnjoj stijenci jezgrine opne, nakon čega dolazi do segmentacije jezgre. Citoplazmatski volumen se i dalje smanjuje zbog gubitka unutarstanične tekućine (97). Plazmatska opna postaje spiralna, i dolazi do kidanja stanice u više opnom obavijenih apoptotičkih tjelešaca koja sadrže nedirnute citoplazmatske organele, a neka od njih i dijelove jezgre. Taj proces traje nekoliko minuta što predstavlja teškoću u proučavanju apoptoze. U apoptozi su stanične organele sačuvane i ne dolazi do izlijevanja staničnog sadržaja u okolno tkivo, tako da uklanjanje apoptotičkih stanica izaziva upalnu reakciju (96). Stanice mononuklearno-fagocitnog sustava, normalne epitelne stanice, kapilarne endotelne stanice, ali i druge mogu fagocitirati apoptotička tjelešca.

Biokemijske osobitosti tijekom apoptoze

Porast staničnog kalcija i izmjena ekspresije mRNK je najvjerojatnije unutarstanični signalni mehanizam u inicijaciji apoptoze. Porast Ca^{2+} u odgovoru na neke apogene javlja se naglo i prethodi oštećenju DNK i staničnoj smrti (98). Štetan učinak Ca^{2+} temelji se na aktivaciji Ca^{2+}-ovisnih endonukleaza, proteaza, fosfolipaza i protein kinaza. Aktivacijom endonukleaza dolazi do jednostrukog ili dvostrukog pucanja DNK što je značajno obilježje apoptoze. Cijepanje DNK u apoptozi je vrlo specifično i obilježeno nastajanjem dijelova DNK koji su cjelobrojni višekratnici 180-200 parova baza, što je duljina DNK omotane oko oktamerne histonske strukture. Mjesta cijepanja nalaze se u spojnoj regiji DNK, između dva nukleosoma, što

se vidi kao ljestvičasti uzorak nakon elektroforeze DNK na agaroznom gelu (96,99).

Protein kinaze, uključujući kalmodulin-kinaze, MAP-kinaze i druge, posebice su važne u aktiviranju "gena smrti" i to ranih gena *c-fos, c-myc, c-jun* koji djeluju kao čimbenici transkripcije (100). Povećanje Ca^{2+} aktivira fosfolipazu A_2 koja pojačava propusnost plazmatske, mitohondrijske i drugih opni, te aktivira latentne enzime (transglutaminazu i proteaze) koje vrše križno povezivanje proteina citoplazme i opne stvaranjem proteinskog matriksa unutar apoptotičkih tijela (101). Porastom Ca^{2+} dolazi do otvaranja K^+ kanala, gubljenja K^+ zajedno s Cl^-, te smanjenja volumena stanice zbog gubitka vode. Kromatinsko skupljanje posljedica je promjene unutarstaničnog pH zbog izmjene Ca^{2+} protona na staničnoj opni (102).

Apoptoza je aktivni energetski proces, ovisan o sintezi mRNA i proteina. Aktiviranjem "gena smrti" nakon 15-30 min dolazi do povećanja razine različitih mRNK i njihovih proizvoda. Brze promjene u ekspresiji gena govore da su proteini uključeni u proces apoptoze, što se podudara s morfološkim promjenama u stanici. Međutim, neki inhibitori sinteze mRNK i proteina ne djeluju ili čak potiču apoptozu drugih vrsta stanica (103), što navodi na zaključak da različite vrste stanica imaju vlastiti regulatorni sustav u sintezi mRNK i proteina.

Pokretači apoptoze

Apoptoza nastaje na dva načina. Prvi način je kaspaza ovisni put kod kojeg dolazi do aktivacije receptora smrti, primjerice Fas i TRAIL (engl. TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) receptora (DR4, DR5). Aktivacija receptora smrti je posredovana signalnim kompleksom nastalim vezanjem Fas liganda (FasL) na FADD protein (engl. Fas-associated DD) koji sa svojom «efektorskom domenom smrti» (engl. death effector domain) aktivira kaspazu 8, koja aktivira kaspazu 3, te vodi do apoptoze tipa I.

Drugi način pokretanja apoptoze uključuje mitohondrije. Mitohondrijski put stanične smrti posredovan je proteinima Bcl-2 obitelji. To je skupina antiapoptotičnih i proapoptotičnih proteina koji reguliraju prolaz malih molekula [citokrom c, Smac/Diablo, čimbenika pokretanja apoptoze (engl.-apoptosis inducing factor; AIF)] kroz mitohondrijske pore. Mitohondrijski-ovisni

put uključuje cijepanje proapoptotičkog proteina Bid stvarajući skraćeni tBid (engl. truncated Bid; tBid) pomoću kaspaze 8 unutar mitohondrija. Heterodimerizacija (tBid) and Bak rezultira nastankom citokroma c od mitohondrija te aktivacijom kaspaze 3 i 9 (Tip II stanične smrti). Nadalje, Bax/Bak proteini su također uključeni u oslobađanje citokroma c od mitohondrija. U prisutnosti oštećene DNK dolazi do disocijacije proteina Bax od proteina 14-3-3 koji veže Bax protein za citoplazmu. Homodimerizacija Bax proteina ili heterodimerizacija Bax i Bak izaziva prelazak Bax iz citoplazme u mitohondrije gdje Bax homodimeri i heterodimeri reagiraju s anionskim kanalima ovisnim o naponu (engl. voltage-dependent anion channel; VDAC) s vanjske strane membrane mitohondrija što rezultira otpuštanjem citokroma c te povećanjem propustljivosti membrane mitohondrija otvaranjem mitohondrijskih pora.

Način na koji će doći do apoptoze ovisi o tipu stanice. Mitohondrijske permeabilne pore (engl. mitochondial permeability transition pore; PTPC) povećavaju propusnost za vrijeme apoptoze, autodigestije i nekroze. Otpuštanje citokroma c dovodi do stvaranja apoptosoma koji se sastoji od apoptotičkog aktivacijskog čimbenika 1 i prokaspaze 9, nakon čega dATP aktivira kaspazu 9 koja konačno izaziva apoptozu. Aktivacija inicijatorske kaspaze 9 vodi aktivaciji efektorskih kaspaza, kaspaze 3 ili 7, koje cijepaju inhibitore kaspazom-aktiviranih DNaza stvarajući poli-(ADP-riboza) polimeraze (PARP) vodeći fragmentaciji DNK. Bcl-2 i Bcl-xl inhibiraju otpuštanje citokroma c i Smac/Diablo kompleksa kroz ionske kanale mitohondrija.

AIF (čimbenik pokretanja apoptoze) je flavoprotein unutar mitohondrijske membrane, koji dovodi do apoptoze preko kaspaza neovisnog puta; uzrokuje kondenzaciju kromatina jezgre i DNK fragmentaciju vodeći stanice u programiranu staničnu smrt. Na letalni signal AIF prelazi kroz citosol u jezgru gdje se veže za DNK i izaziva kaspaza neovisnu kondenzaciju kromatina.

Oksidativni stres kao pokretač apoptoze

Citotoksične tvari koje oštećuju DNK, antitumorske tvari, ceramidi, mikotoksini, UV zrake i oksidativni stres izazivaju programiranu smrt stanica.

Premda slobodni radikali kisika predstavljaju toksične nusproizvode staničnog metabolizma, njihova uloga je u reguliranju signalnih putova u životinjskim i biljnim stanicama. Funkcioniranje mnogih proteina ovisi o njihovom redoks stanju. Takvi proteini su receptori čimbenika rasta, protein kinaze, neke od MAP kinaza, protein fosfataze, G proteina, mnogi od brojnih transkripcijskih čimbenika, uključujući AP-1, NF-κB i p53, a neki od njih su uključeni u pokretanje apoptoze. Nedavna istraživanja oksidativnog stresa, s niskim dozama H_2O_2, O_2^-, -OH i lipidnim peroksidazama dokazuju da ROS (reaktivni radikali kisika) može pokrenuti proces stanične smrti. Također, pokretač za apoptozu može biti smanjena sposobnost stanice da izbaci ili na neki drugi način izvrši detoksifikaciju ROS-a. Antioksidansi kao što je BHA (butilatni hidroksianisol) te metalni kelati koji pojačavaju endogeni antioksidativni obrambeni sustav, mogu inhibirati ili odgoditi apoptozu. Na sličan način BHA i neki drugi antioksidansi zaštićuju stanicu od TNF-om uzrokovane citotoksičnosti i apoptoze ovisne o p53. Smrt stanice ovisi o količini ROS-a i o njezinim antioksidacijskim sposobnostima. Protoonkogen Bcl-2 je regulator stanične smrti stanica sisavaca; ekspresija Bcl-2 inhibira apoptozu različitih stanica. Odnos proapoptotičkih i antiapoptotičkih proteina Bcl-2 obitelji u stanici određuje ulazak stanica u apoptozu. Fosforilacija tih proteina djeluje kao dodatni regulatorni čimbenik. Obzirom na staničnu lokalizaciju Bcl-2 u jezgri, endoplazmatskom retikulumu ili na vanjskoj strani mitohondrijske membrane, smatra se da Bcl-2 inhibira staničnu smrt zaštitom od oksidativnog stresa. TNF uzrokuje apoptozu povećavajući proizvodnju ROS-a. Nekroza koja nastaje zbog nedostatka glutationa može biti inhibirana ekspresijom Bcl-2, što upućuje na neke zajedničke mehanizme apoptoze i nekroze. Funkcija i struktura mitohondrija znatno je promijenjena za vrijeme apoptotičkog procesa. Alkalizacija mitohondrijskog matriksa ravnomjerno povećava koncentraciju Ca^{++} ili nekog drugog dvovalentnog kationa u citosolu, a oksidacija nukleotida i aktivacija kaspaza podržava otvaranje mitohondrijskih pora. ROS, posebice H_2O_2 pokreće apoptozu mijenjajući redoks stanje stanice.

ROS je snažni pokretač apoptoze; potiče otvaranje pora mitohondrija, oslobađanje citokroma c u citosol te aktivaciju proteaza koje slično kao i

kaspaza 3 pokreću apoptozu. AIF (čimbenik pokretanja apoptoze) je apoptogeni protein koji izaziva kondenzaciju kromatina i DNK fragmentaciju, čak i u odsutnosti ostalih čimbenika. Aktivnost API i ostalih apoptogenih proteaza određuje vrstu stanične smrti stanice. Kaspaza 3 aktivira deoksiribonukleaze ovisne o kaspazi (engl. caspase-activated deoxiribonuclease; CAD) ili DNK fragmentacijski čimbenik (engl. DNA degradation factor; DFF) i vrši razgradnju inhibitornog proteina CAD (engl. inhibitor caspase-activated deoxiribonuclease; ICAD) te dolazi do završne faze apoptoze, DNK fragmentacije. Antioksidansi i antioksidativni enzimi mogu zaštititi stanicu u nekim uvjetima stanične smrti.

1.8.2. Autofagija

Autofagiju kao drugi oblik stanične smrti obilježava pojavljivanje velikog broja autofagnih vakuola u citoplazmi. Javlja se za vrijeme embriogeneze. Osobitost autofagije je pojačano oštećenje i gubljenje proteina koji su neophodni za normalnu aktivnost stanice i preživljavanje stanice pri nedostatku hranjivih tvari. Prvi korak je stvaranje vakuola s dvostrukom membranom, autofagosoma, koji nastaju od endoplazmatskog retikuluma ili od citoplazmatskih lipida. Autofagosomi se spajaju s lizosomima nakon čega se njihov sadržaj razgrađuje lizosomalnim hidrolitičkim proteazama. Molekularni mehanizam unatoč brojnim istraživanjima nije potpuno razjašnjen. Autofagija može prethoditi apoptozi, odgoditi ili spriječiti apoptozu, mogu jedna drugu isključivati, ali i inhibicija autofagije može dovesti do apoptoze. Ceramidi pokreću i apoptozu i autofagiju. Ukoliko lizosomalni enzimi pokrenu apoptozu, tada apoptozi prethodi autofagija. Nadavna istraživanja ukazuju na to da proizvodnja H_2O_2 kao odgovor na DNK oštećenje aktivira lizosomske enzime kao što su katepsin D i B. Katepsin B izravno ili neizravno dovodi do translokacije proapoptotičkih proteina, kao što su Bid i Bax, iz citoplazme u mitohondrije. To otvara pore mitohondrija i aktivira kaspaznu kaskadu.

Antitumorska aktivnost citostatika procjenjuje se po postotku apoptotičnih tumorskih stanica, međutim unatoč značajnoj redukciji tumorske

mase apoptoza se ne pojavljuje uvijek u visokom postotku stanica nakon kemoterapije što ukazuje da citostatici izazivaju i druge oblike stanične smrti; autofagiju i nekrozu. Uzajamna veza autofagije i apoptoze nije do kraja istražena. Poznato je da nekoliko proteina koji sudjeluju u autofagiji (Beclin 1, BNIP3, DAPK i HSpin1) mogu izazvati i apoptozu. Autofagija inhibira angiogenezu te na taj način smanjuje progresiju tumora i povećava učinkovitosti citostatske terapije.

1.8.3. Nekroza

Nekroza ili "slučajna" smrt stanice nastaje kao odgovor na široku skupinu štetnih čimbenika i toksičnih spojeva (104). Nekroza se nikada ne javlja unutar fizioloških uvjeta, ona je slijed letalnih patoloških oštećenja stanice, promjena u mitohondrijskom obliku i funkciji, kao i naglog nastanka nesposobnosti održavanja stanične homeostaze. Udružena je s masivnim tkivnim oštećenjima.

Morfološke i biokemijske osobitosti nekroze

Najranije promjene stanica u nekrozi su bubrenje citoplazme i organela, naročito mitohondrija, a uzrok tome je povećanje Ca^{2+} i Na^{+} što dovodi do Donnanovog učinka. Rano mitohondrijsko bubrenje je osobitost preletalne faze stanice, a nastaje aktivacijom mitohondrijskih fosfolipaza, što dovodi do promjena sastava i permeabilnosti stanične opne. Zbog promjenjene aktivnosti ionskih pumpi na plazmatskoj opni i izravnog oštećenja opne dolazi do prsnuća stanične opne, sekundarnog gubitka stanične energije i gubitka organela (105). Povećanje slobodnog Ca^{2+} u citosolu rezultira aktivacijom Ca^{2+}-ovisnih fosfolipaza vezanih na opnu, koje oštećuju fosfolipidne opne i tako uzrokuju daljnja oštećenja. Stanični sadržaj izlazi u okolno tkivo i izaziva upalni odgovor (96). Oslobađanje hidrolaza iz lizosoma uzrokuje ubrzani raspad stanice u kasnom stadiju nekroze. Tijekom procesa nekroze stanični kromatin formira male nakupine na jezgrinoj opni, te dolazi do smanjenja ukupne količine proteina, RNK i DNK. Oštećenje DNK je kasniji fenomen, kromatinski sadržaj je izložen proteolitičkom i nukleolitičkom djelovanju, te dolazi do cijepanja histona i izlaganja unutrašnjosti DNK

nukleazama iz lizosoma (98). Na agaroznom gelu umjesto ljestvičastog uzorka osebujnog za apoptozu, nastaju dijelovi DNK koji pokazuju "kontinuirani spektar veličina" što je osnovno obilježje nekroze na razini DNK (106). Nekroza obično traje satima do danima, i zahvaća veću skupinu stanica u tkivu.

Otkrivanje i mjerenje apoptoze i nekroze

Patolozi razlikuju apoptozu i nekrozu na osnovi morfoloških kriterija. Svjetlosnim mikroskopom apoptoza je prepoznatljiva po izrazitoj kromatinskoj marginizaciji, koja se javlja tijekom rane faze ili po prisutnosti apoptotičkih tijela. Elektronskim mikroskopom vidljive su promjene strukture plazmatske opne (gubitak mikrovila) te cjelovitost citoplazmatskih organela, posebice mitohondrija; za razliku od nekroze, gdje dolazi do bubrenja stanica i staničnih organela kao i pojave upalnog procesa u okolnom tkivu. Morfološke promjene mogu se pratiti i primjenom fluorescencijskog mikroskopa nakon obrade stanica s DNK-vezujućim ligandima (107). S obzirom na ograničenu mogućnost praćenja apoptoze pomoću morfoloških kriterija, istraživači najčešće koriste cijepanje DNK kao metodu za otkrivanje apoptoze primjenom agaroznog gela. Pozitivni nalaz se vidi u pojavi ljestvičastog uzorka na agaroznom gelu, tj. nastajanjem nizova dvolančanih oligonukleosomalnih dijelova DNK osebujnih duljina (180-200 parova baza), koji su sekundarno obilježeni etidij bromidom (96). Cijepanje DNK koje nastaje nekrozom stvara mrlje kod elektroforeze. Osim morfoloških i biokemijskih metoda, apoptoza i nekroza mogu se razlikovati i pomoću protočnog citometra i staničnog brojača.

Kidanje DNK može se pratiti na protočnom citometru nakon što se DNK obilježi fluorescentnim DNK-vezujućim spojevima kao što su propidijski jodid, etidijski bromid, 7-aminoaktinomicin, akridin oranž i dr. Apoptotičke stanice prepoznaju se na histogramu DNK, primjerice hipodiploidna populacija stanica (vršak A_0) smještena lijevo od G_0/G_1 regije staničnog ciklusa (107).

Najranije promjene plazmatske opne u apoptozi, primjerice gubitak asimetrije opne, također se prate protočnim citometrom. U apoptotičkim stanicama fosfolipid fosfatidilserin (vezan za staničnu opnu) premješten je s unutarnje na vanjsku stranu plazmatske opne, što se prati obilježavanjem stanica s aneksinom V. Aneksin V je fosfolipid-vezujući protein ovisan o Ca^{2+} s velikim afinitetom vezanja za fosfatidilserin, koji se konjugiran s

fluorokromom te koristi za određivanje apoptotičkih stanica protočnim citometrom. Obilježavanjem stanica aneksinom V i propidijskim jodidom može se odrediti broj stanica u apoptozi (aneksin V pozitivne, propidijski jodid negativne), kao i broj stanica u nekrozi (aneksin V pozitivne, propidijski jodid pozitivne) (108).

Najčešće korišteni fluorokromi za određivanje apoptoze osebujni su za određene parametre koji se javljaju tijekom procesa apoptoze, kao što su narušavanje potencijala opne mitohondrija, aktivacija proteaza, gubljenje asimetrije plazmatske opne, pojava superoksidnih aniona, lipidne oksidacije, kardiolipin oksidacije, redukcije glutationa, povećanje Ca^{2+}, fragmentacija DNK i gubitak DNK (109). Uporabom fluorokroma triju različitih boja može se istovremeno, na istoj stanici, odrediti fluorescencija svake od njih. Podaci o fluroscenciji mogu se analizirati u odnosu na odabrani tip stanica, koje se mogu omeđiti ogradom i time zanemariti signale koje emitiraju ostale stanice.

2. CILJ I SVRHA RADA

Cilj i svrha ovog rada je utvrditi :

1. postoji li genotoksični i cititoksični učinak inhalacijskih anestetika halotana, izoflurana i sevoflurana na limfocite periferne krvi, stanice jetre, bubrega, mozga i na stanice Ehrlich ascitesnog tumora Swiss albino miševa

2. da li inhalacijski anestetici združeni s citostatikom cisplatinom imaju aditivni, antagonistički ili sinergistički učinak na genotoksični i citotoksični učinak cisplatine na zdrave i tumorske stanice

3. koji od navedenih inhalacijskih anestetika kod opetovanih anestezija ima najmanju toksičnost na limfocite periferne krvi, zdrave stanice jetre, bubrega, mozga i na tumorske stanice

4. poželjnu kombinaciju inhalacijskog anestetika i citostatika cisplatine kod opetovanih anestezija miševa s tumorom

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali korišteni u istraživanju

3.1.1. Pokusne životinje

U istraživanju smo rabili miševe muškog spola visokosrodnog soja Swiss albino, starosti 2-3 mjeseca, mase 20-25 g iz uzgoja Zavoda za animalnu fiziologiju. Miševe smo držali u kavezima; najviše do pet životinja po kavezu, te ih hranili standardnom hranom za laboratorijske životinje (Standard Diet GLP, 4RF 1, Mucedola, Settimo Milanese MI, Italija), uz stalnu dostupnost vode *ad libitum.*

Istraživanje smo proveli po etičkim načelima važećim u Republici Hrvatskoj (Zakon o zaštiti laboratorijskih životinja, NN 19, 1999. i prema Vodiču za držanje i korištenje laboratorijskuh životinja (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals,* DHHS (NIH) Publ # 86-23).

3.1.2. Inhalacijski anestetici

U istraživanju smo koristili inhalacijske anestetike: sevofluran (Sevorane®, Abbott Laboratories Ltd, Queenborough, Velika Britanija), halotan (’Fluothane’, Zeneka Ltd. Macllesfield Cheshire, Velika Britanija) i izofluran (Forane®, Abbott Laboratories Ltd, Queenborough, Velika Britanija).

3.1.3. Cisplatina

U istraživanju je korišten citostatik cisplatina (Cisplatin, Pliva, Zagreb, Hrvatska).

3.1.4. Ehrlichov ascitesni tumor (EAT)

Stanice EAT dobivene su iz peritonealne šupljine Swiss albino miševima nositelja Ehrlichovog ascitesnog tumora iz uzgoja Zavoda za animalnu fiziologiju. Tumorske stanice održavali smo serijskim presađivanjem

stanica intraperitonealno u trbušnu šupljinu miša u periodu od 7-9 dana u obliku ascitesa.

3.2. Metode korištene u istraživanju

3.2.1. Izlaganje miševa inhalacijskim anesteticima i cisplatini

Miševe smo podijeliti u dvije skupine. Prvu skupinu čine zdravi miševi, a drugu, miševi kojima smo injicirati intraperitonealno (i.p.) 2 X 10^6 stanica Ehrlichova ascitesnog tumora (EAT). Obje skupine smo podijeliti u osam podskupina, ovisno o tome da li smo im injicirali intraperitonealno citostatik cisplatinu, te da li smo ih izložiti djelovanju inhalacijskog anestetika sevoflurana, halotana ili izoflurana, što je prikazano u **Tablici 1.**

Tablica 1. Plan pokusa

SKUPINA I (MIŠEVI BEZ TUMORA)	SKUPINA II (MIŠEVI NOSITELJI TUMORA)
Obrada životinja s:	Obrada životinja s:
—— (Kontrola)	—— (Kontrola miševi nositelji stanica EAT)
Cisplatinom[a]	Cisplatinom[a]
Sevofluranom[b]	Sevofluranom[b]
Cisplatinom i sevofluranom[c]	Cisplatinom i sevofluranom[c]
Halotanom[d]	Halotanom[d]
Cisplatinom i halotanom[e]	Cisplatinom i halotanom[e]
Izofluranom[f]	Izofluranom[f]
Cisplatinom i izofluranom[g]	Cisplatinom i izofluranom[g]

[a] Miševima smo injicirali cisplatinu i. p. u dozi od 5 mg/kg, tri dana u nizu

[b] Miševe smo izložili djelovanju inhalacijskog anestetika sevoflurana u dozi od 2,4 vol% tijekom dva sata, tri dana u nizu

[c] Miševe smo injicirali cisplatinom i.p. u dozi od 5 mg/kg, tri dana u nizu, te izložili djelovanju inhalacijskog anestetika sevoflurana u dozi od 2,4 vol% tijekom dva sata, tri dana u nizu.

[d] Miševe smo izložili djelovanju inhalacijskog anestetika halotana u dozi 1,5 vol% tijekom dva sata, tri dana u nizu

[e] Miševima smo injicirali cisplatinu i.p. u dozi od 5 mg/kg, tri dana u nizu, te ih izložili djelovanju inhalacijskog anestetika halotana u dozi od 1,5 vol% tijekom dva sata, tri dana u nizu

[f] Miševe smo izložili djelovanju inhalacijskog anestetika izoflurana u od dozi 1,7 vol% tijekom dva sata, tri dana u nizu

[g] Miševima smo injicirali cisplatinu i.p. u dozi od 5 mg/kg, tri dana u nizu, te izložili djelovanju inhalacijskog anestetika izoflurana u dozi od 1,7 vol% tijekom dva sata, tri dana u nizu.

Nakon tri dana od injiciranja tumorskih stanica miševe smo obradili prema Tablici 1. Dozu primijenjenih inhalacijskih anestetika smo utvrdili prema pilot pokusima. Uvjet za zadovoljavajuću dubinu anestezije je da miševi mirno spavaju, spontano dišu i ne miču repićima.

Miševe smo anestezirali inhalacijskim anesteticima u posebno izrađenom inkubatoru spojenom sa anestezijskim aparatom Sulla 800, firme Dräger, putem isparivača za inhalacijske anestetike. Respiracijskim monitorom PM 8050, firme Dräger monitorirali smo inspiratorne koncentracije inhalacijskih anestetika i kisika. Primijenili smo poluotvoreni način isporuke anestetika, što znači da smo struju plinova usmjerili u jednom smjeru, bez povratka plinova, a izdahnute plinove odvodili putem odvodne cijevi u atmosferu. S obzirom da smo željeli istražiti specifičan učinak inhalacijskih

anestetika i cisplatine, kao plin nosač koristili smo kisik 3 l/min, a ne smjesu kisika i dušičnog oksidula, jer dušični oksidul u niskim koncentracijama može prouzročiti poremećaje fizioloških funkcija, dovesti do hematoloških abnormalnosti te sam djelovati genotoksično (29). Treći dan nakon anestezije životinje smo žrtvovali cervikalnom dislokacijom (dopuštena metoda za male glodavce prema Zakonu o dobrobiti životinja, Narodne novine 19/99), te uzeli tkiva i krv za analizu.

3.2.2. Komet test

U istraživanju smo primijenili standardnu izvedbu komet testa koju su predložili Singh i sur. (73). Od svake životinje uzeli smo za analizu perifernu krv, stanice bubrega, jetre i mozga, a tumorske stanice od životinja iz skupine II kojima su injicirane stanice tumora.

3.2.2.1. Priprema uzoraka za elektroforezu

Uzorke krvi uzeli smo mikropipetom nakon presijecanja repne vene. Tkiva jetre, bubrega i mozga protisnuli smo kroz mrežicu u pufer za homogenizaciju pH 7,5 [0,075 M NaCl (Kemika) i 0,024 M Na_2EDTA (Sigma)] ohlađen na 4℃ i to u omjeru 1 gr tkiva na 1 ml pufera. Tumorske stanice za izradu preparata, dobili smo ispiranjem trbušne šupljine miša s 5 ml fiziološke otopine. Nakon lagane masaže trbuha, napravili smo rez i otvorili peritonealnu šupljinu miša, te Pasteurovom pipetom uzeli peritonealnu tekućinu.

Na brušena predmetna stakla (Surgipath, USA) nanijeli smo svježe priređenu otopinu 1% agaroze normalnog tališta (NMP) (Sigma) i pokrili pokrovnicom. Nakon polimerizacije agaroze na sobnoj temperaturi sa stakla smo uklonili pokrovnicu i taj sloj gela. Na osušeno staklo pomoću mikropipete nakapali smo 300 µl 0,6% agaroze normalnog tališta (NMP) koju smo pokrili pokrovnicom i ostavili na ledu 10 minuta.

Na stakalca smo zatim nanijeli slijedeći sloj koji se sastojao od 100 µl 0,5% agaroze niskog tališta (LMP) (Sigma) pomiješane s 5µl uzorka (krvi, stanica bubrega, jetre, mozga ili tumora), te ponovo pokrili pokrovnicom. Nakon 10 minuta polimeriziranja na ledu, taj sloj gela prekrili smo s 100 µl 0,5% agaroze niskog tališta i preparate ponovo držali na ledu 10 minuta. Nakon toga skinuli smo pokrovnicu i preparate staviti u otopinu za lizu.

3.2.2.2. Liza staničnih struktura

Nakon uklanjanja pokrovnice preparate smo uroniti u ohlađeni (4℃) pufer za lizu [1% natrijev sarkozinat (Sigma), 2,5 M NaCl (Kemika), 100 mM Na_2EDTA (Sigma), 10 mM Tris-Hcl (Sigma), 1% Triton X-100 (Sigma) i 10% dimetil sulfoksid (Sigma)] pH 10, i držali ih jedan sat na +4℃.

3.2.2.3. Denaturacija

Preparate smo iz pufera za lizu prebacili u pufer za denaturaciju [0,3 M NaOH (Kemika), 1 mM Na_2EDTA (Sigma)], pH 12 i držati 20 minuta na +4℃

3.2.2.4. Elektroforeza

Elektroforezu smo proveli u vodoravnoj kadici za elektroforezu (Life Technologies Ltd) u puferu za denaturaciju [0,3 M NaOH (Kemika), 1 mM Na_2EDTA (Sigma)], istosmjernom strujom stalne jakosti 300 mA i napona 25 V, tijekom 20 minuta.

3.2.2.5. Neutralizacija

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

3.2.2.6. Bojanje preparata

Nakon zadnjeg ispiranja preparate smo obojili sa 100 µl etidij-bromida (Sigma) koncentracije 20 µg/ml, u trajanju 10 minuta. Obojane preparate kratko smo ispirali u Tris-HCl puferu, pH 7,5.

3.2.2.7. Analiza preparata

Epifluorescencijskim mikroskopom Opton, West Germany s povećanjem 160x analizirali smo 100 stanica po preparatu, ukupno 400 stanica iste vrste iz svake skupine. Stanice smo razvrstavali po dužini repa u pet razreda, od 0 do 4. Ukoliko nema repa, stanicu smo svrstali u razred 0, a stanice sa maksimalnom dužinom repa kometa u razred 4 (72,110).

3.2.3. Mikronukleus test *in vivo*

Nakon 48 sati od posljednjeg injiciranja cisplatine i izlaganja životinja inhalacijskim anesteticima, uzeli smo uzorke krvi iz repne vene miševa i priredili razmaze na predmetnim stakalcima. Preparate smo obojiti s fluorescencijskom bojom akridin oranž koja se specifično veže na DNK, a broj mikronukleusa utvrdili smo brojanjem pod epifluorescencijskim mikroskopom s ekscitacijskim filterom 502-525 nm. U svakom pojedinačnom uzorku analizirali smo 2000 retikulocita u kojima smo ustanovili broj i raspodjelu mikronukleusa po svakom uzorku (111).

3.2.4. Određivanje broja živih tumorskih stanica u peritonealnoj tekućini

Nakon otvaranja kože i potrbušnice uzeli smo peritonealnu tekućinu i razrijedili ju s fiziološkom otopinom. Izbrojili smo ukupan broj tumorskih stanica u peritonealnoj tekućini u Bürker-Turk komorici; testom isključenja tripanskog modrila odredili smo broj živih stanica.

3.2.5. Apoptoza i nekroza tumorskih stanica

Apoptozu EAT stanica pokazali smo obilježavanjem stanica aneksinom V i propidijskim jodidom prema naputku proizvođača "Apoptosis Detection Kit" (R&D System, Weisbaden, Germany).

3.2.5.1. Obilježavanje stanica aneksinom V i propidijskim jodidom

Stanice smo isprali 2x u hladnom PBS (puferirana fiziološka otopina) prema uputstvu proizvođača. Stanični talog ($1x10^5$ stanica) resuspendirali smo u 100 µl vezujućeg pufera i dodali 10 µl FITC-konjugiranog aneksina V i 10 µl propidijskog jodida. Inkubirali smo 15 minuta na sobnoj temperaturi, dodali 400 µl vezujućeg pufera i propustili na protočnom citometru.

3.2.5.2. Analiza stanica na protočnom citometru

Sve uzroke analizirali smo protočnim citometrom (FasScan, Becton Dickinson, Mountain View, USA) koji je opremljen argonskim laserom, emisijom pogodne valne dužine od 488 nm i standardnim setom optičkih filtera: BP 530/30 (FL1), BP 585/44 (FL22), i Ip> 650 (FL3).

Sakupljali smo po 5000 stanica u svakom uzorku uz optimalnu brzinu propuštanja 400-600 stanica/sek. Zastupljenost pojedinih specifičnih biljega na stanicama analizirali smo postavljanjem aktivne ograde na dvoparametarskom histogramu raspodjele stanica prema veličini (engl. Forward scatter, FSC) i zrnatosti (engl. Side scatter, SSC). Rezultate smo analizirali programom "CellQuest" koji izračunava postotke stanica jednostruko i/ili dvostruko i/ili trostruko pozitivnih ili negativnih za određeni biljeg.

3.2.6. Analiza hematoloških i biokemijskih parametara

Hematološke i biokemijske parametre krvi analizirali smo zbog uvida u promjene sastavnica krvi te promjene biokemijskih parametara koje nastaju kao posljedica stvaranja toksičnih metabolita primjenom inhalacijskih anestetika i citostatika. Krv smo uzeli iz pazušnog spleta krvnih žila miševa, te stavili u heparinizirani vacuutainer. Od hematoloških parametara odredili smo broj eritrocita, koncentraciju hemoglobina, ukupni broj leukocita te postotak pojedinih leukocitnih stanica u perifernoj krvi; neutrofila, limfocita i bazofila. Od biokemijskih parametara odredili smo aspartat aminotransferazu (AST), alanin aminotransferazu (ALT), alkalnu fosfatazu (ALKP), ureu, kreatinin i ukupne proteine.

Krv smo analizirati standardnim laboratorijskim metodama; hematološke parametre brojačem krvnih stanica Cell-Dyn® 3200 (Abbott, USA), a biokemijske parametre aparatom Alcylon 300 (Abbott, USA).

3.3. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišten je softverski paket Statistica 6.0 (StatSoft, Inc; for Windows). Svi rezultati pokusa obrađeni su opisnim statističkim metodama, te slikovno prikazani. Nakon toga, rezultate mikronukleus testa analizirali smo χ^2 testom. Prikupljene rezultate ostalih metoda analizirali smo neparametrijskim Kruskal Wallis ANOVA & Median testom. Post hoc analizu razlika među pojedinim skupinama proveli smo upotrebom Mann-Whittney egzaktnog testa.

4. REZULTATI

4.1. Rezultati komet testa

Miševe smo podijeliti u 2 skupine. Prvu skupinu čine zdravi miševi, a drugu, miševi kojima smo injicirati intraperitonealno (i.p.) 2 X 10^6 stanica Ehrlichova ascitesnog tumora (EAT). Obje skupine smo podijelili u osam podskupina, ovisno o tome da li smo im injicirali intraperitonealno citostatik cisplatinu te da li smo ih izložiti djelovanju inhalacijskog anestetika sevoflurana, halotana ili izoflurana (Tablica 1). Koristili smo standardni alkalni komet test. Stanice smo razvrstavali po stupnju oštećenja DNK u pet razreda, od 0 do 4. Neoštećene stanice bez repa svrstali smo u razred 0, a stanice sa maksimalnom dužinom repa kometa u razred 4.

Rezultati komet testa nakon obrade s istraživanim tvarima prikazani su na Slikama 3-7., dok su rezultati statističke analize (neparametrijski Kruskal Wallis ANOVA & Median test te Mann-Whittney egzaktni test) vidljivi u Tablicama 2-6.

Rezultati ukazuju na to da limfociti periferne krvi (Slika 3., Tablica 2.) životinja nositelja EAT tumora imaju znatno veća oštećenja DNK nego limfociti životinja bez tumora ($p<0,001$). Sevofluran je pokazao najjači genotoksični učinak od korištenih inhalacijskih anestetika na limfocite periferne krvi u zdravih životinja i životinja s injiciranim EAT stanicama; skupina zdravih životinja izložena sevofluranu ima statistički značajno ($p<0,001$) veća oštećenja DNK limfocita periferne krvi od halotana i izoflurana. Združeni učinak inhalacijskih anestetika i cisplatine dovodi do znatno jačeg oštećenja DNK limfocita periferne krvi u obje skupine životinja u odnosu na primjenu samih inhalacijskih anestetika (cis+sevo $p<0,001$; cis+halo $p<0,001$). Najjači genotoksični učinak na limfocite periferne krvi izaziva kombinacija cisplatine i sevoflurana; učinak je statistički značajno jači u odnosu na zaseban učinak cisplatine i sevoflurana ($p<0,001$).

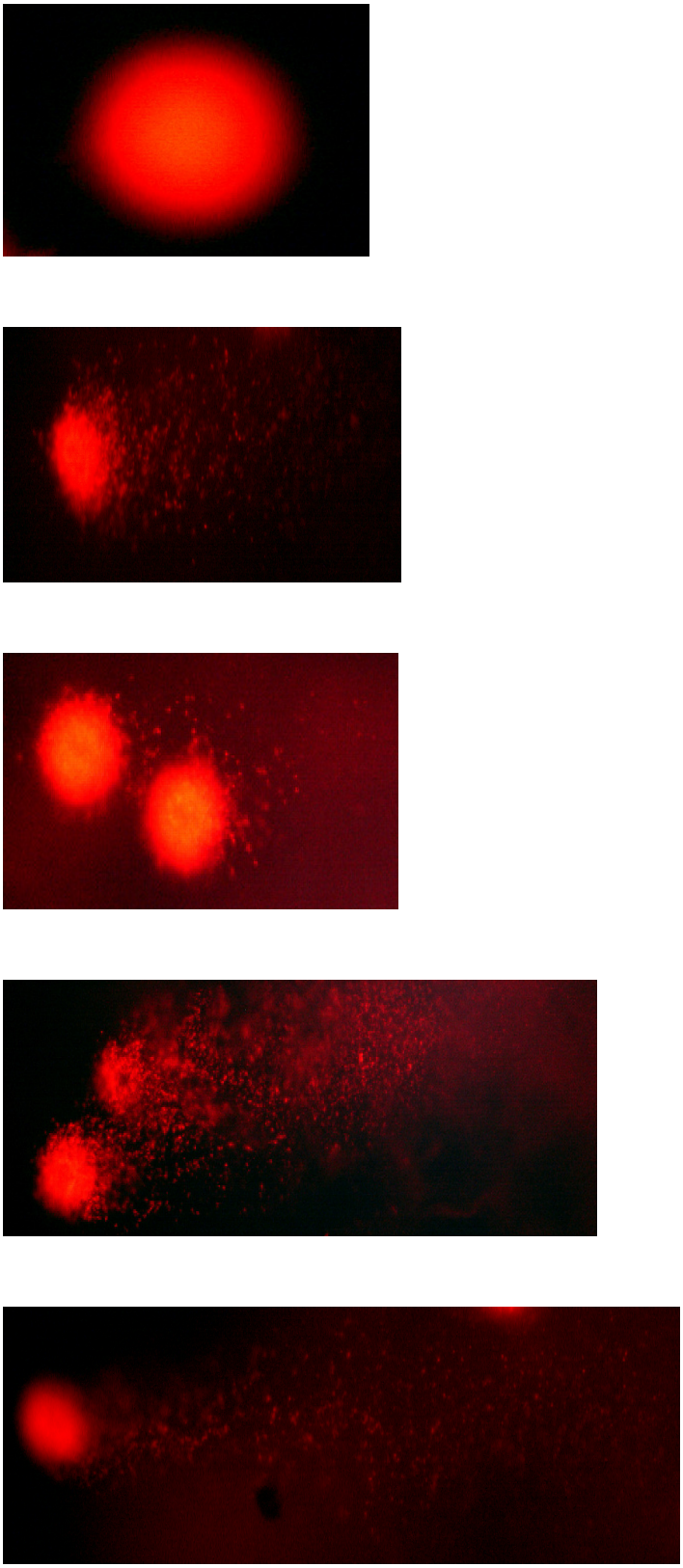
Stanice mozga pokazale su veliku osjetljivost na genotoksični učinak inhalacijskih anestetika i cisplatine (Slika 4., Tablica 3.). Analizirane stanice mozga životinja s EAT tumorom pokazale su znatno jača oštećenja DNK od stanica zdravih životinja. Od primijenjenih inhalacijskih anestetika najjači

genotoksični učinak na stanice mozga ima halotan u obje skupine životinja; statistički značajna ($p<0,001$) razlika postoji između zdravih životinja obrađenih halotanom i kontrolne skupine. Nakon halotana po jačini genotoksičnog učinka na stanice mozga redom slijede cisplatina, sevofluran, te izofluran. Cisplatina u kombinaciji s halotanom smanjuje učinak halotana na stanice mozga u zdravih životinja ($p<0,001$), a u skupini životinja s injiciranim EAT stanicama također se smanjuje genotoksični učinak, ali ne statistički značajno. Združeni učinak cisplatine sa sevofluranom i izofluranom povećava genotoksični učinak inhalacijskih anestetika na stanice mozga.

Stanice jetre miševa nositelja EAT stanica pokazuju nešto jača oštećenja DNK nego stanice zdravih miševa, ali ne statistički značajno (Slika 5., Tablica 4.). Od primijenjenih inhalacijskih anestetika najjači učinak na stanice jetre ima halotan, zatim izofluran pa sevofluran u obje skupine životinja. Kombinacija cisplatine i halotana najviše oštećuje DNK jetre.

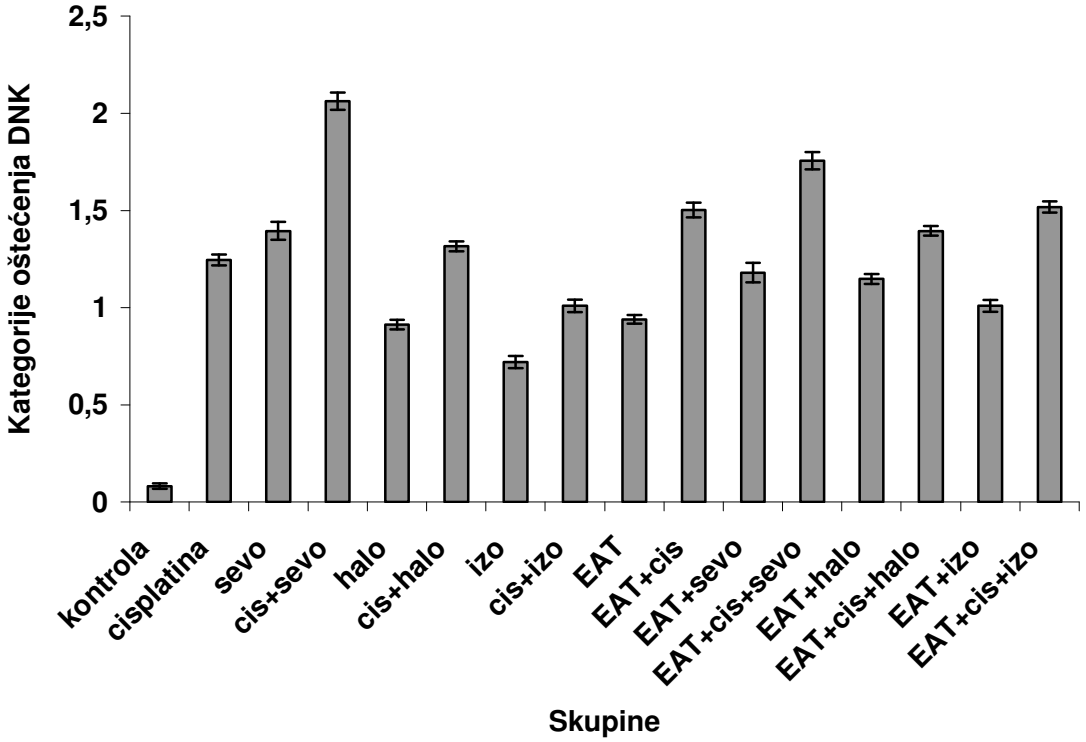
Stanice bubrega životinja s EAT stanicama pokazuju također jača genotoksična oštećenja nego stanice bubrega životinja bez tumora ($p<0,001$). Sevofluran i izofluran znatno jače oštećuju stanice bubrega nego halotan u obje skupine životinja (Slika 6., Tablica 5). Cisplatina je pokazala veća oštećenja stanica bubrega u zdravih životinja u usporedbi s životinjama nositeljima EAT tumora ($p<0,001$). Združeno djelovanje cisplatine i inhalacijskih anestetika povećava genotoksična oštećenja stanica bubrega u odnosu na same inhalacijske anestetike.

DNK stanica EAT tumora pokazuju najveću osjetljivost na ponavljane anestezije halotanom (Slika 7., Tablica 6.). Učinak halotana na EAT stanice jači je od cisplatine, a združeni učinak cisplatine i halotana je manji od učinka samog halotana na EAT stanice ($p<0,001$). Kombinacija cisplatine sa sevofluranom i izofluranom smanjuje ($p<0,05$) genotoksični učinak inhalacijskih anestetika na EAT stanice.



Slika 3. Kometi stanica prikazani prema stupnju oštećenja 0-4

4.1.1 Rezultati Komet testa na limfocitima periferne krvi Swiss albino miševa



Slika 4. Učinak inhalacijskih anestetika i cisplatine na oštećenje DNK limfocita periferne krvi Swiss albino miševa. Rezultati komet testa prikazani su kao prosječne vrijednosti dužine repa kometa ±SE.

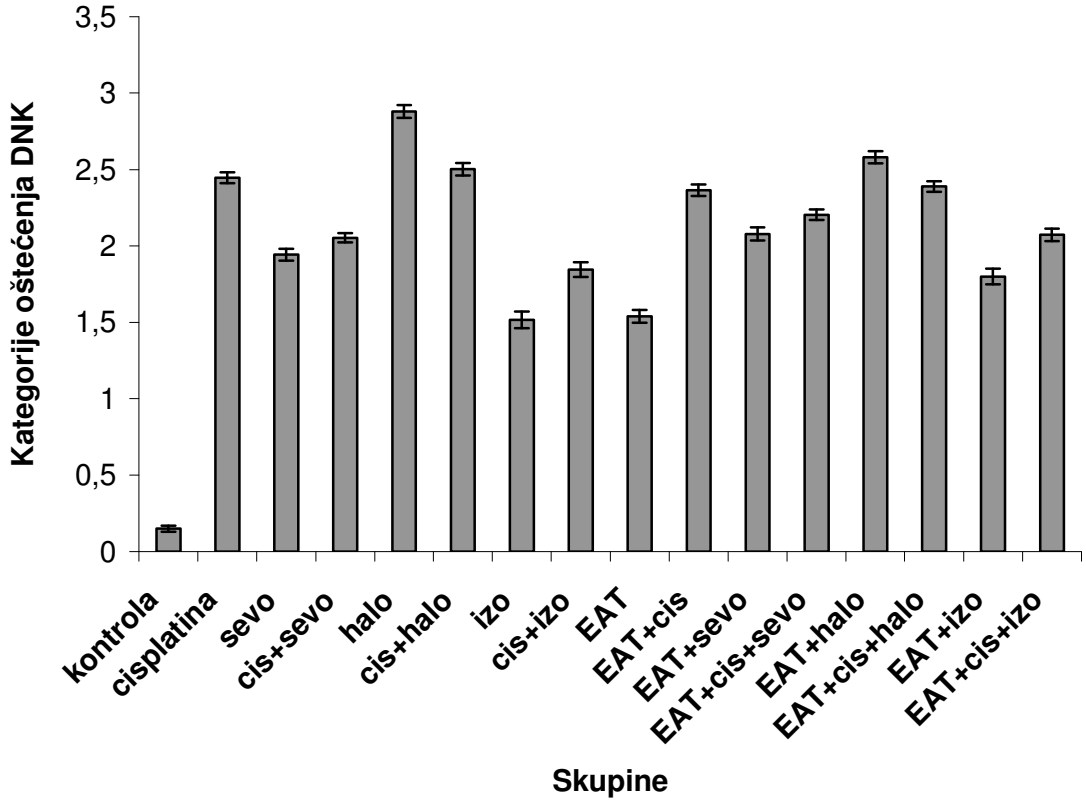
Legenda: EAT=stanice Ehrlichovog ascitesnog tumora, cis=cisplatina, sevo=sevofluran, halo=halotan, izo=izofluran

Tablica 2. Statistička analiza rezultata komet testa limfocita periferne krvi Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine.

	cis	sevo	cis+sevo	halo	cis+halo	izo	cis+izo	EAT	EAT+cis	EAT+sevo	EAT+cis+sevo	EAT+halo	EAT+cis+halo	EAT+izo	EAT+cis+izo
kontrola	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
cis		NZ	p<0,001	p<0,001	NZ	p<0,001	p<0,05	p<0,001	p<0,05	NZ	p<0,001	NZ	NZ	p<0,05	p<0,001
sevo			p<0,001	p<0,001	NZ	p<0,001	p<0,001	p<0,001	NZ	p<0,05	p<0,001	NZ	NZ	p<0,001	p<0,01
cis+sevo				p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,01	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
halo					p<0,001	NZ	NZ	NZ	p<0,001	NZ	p<0,001	p<0,01	p<0,001	NZ	p<0,001
cis+halo						p<0,001	p<0,001	p<0,001	NZ	p<0,05	p<0,001	NZ	NZ	p<0,001	p<0,01
izo							p<0,001	p<0,05	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
cis+izo								NZ	p<0,001	NZ	p<0,001	NZ	p<0,001	NZ	p<0,001
EAT									P<0,001	NZ	p<0,001	p<0,05	p<0,001	NZ	p<0,001
EAT+cis										p<0,001	p<0,05	p<0,001	NZ	p<0,001	NZ
EAT+sevo											p<0,001	NZ	p<0,001	NZ	p<0,001
EAT+cis+sevo												p<0,001	p<0,01	p<0,001	NZ
EAT+halo													p<0,001	NZ	p<0,001
EAT+cis+halo														p<0,001	NZ
EAT+izo															p<0,001
EAT+cis+izo															

NZ= nije statistički značajno

4.1.2. Rezultati Komet testa na stanicama mozga Swiss albino miševa



Slika 5. Učinak inhalacijskih anestetika i cisplatine na oštećenje DNK stanica mozga Swiss albino miševa. Rezultati komet testa prikazani su kao prosječne vrijednosti dužine repa kometa ±SE.

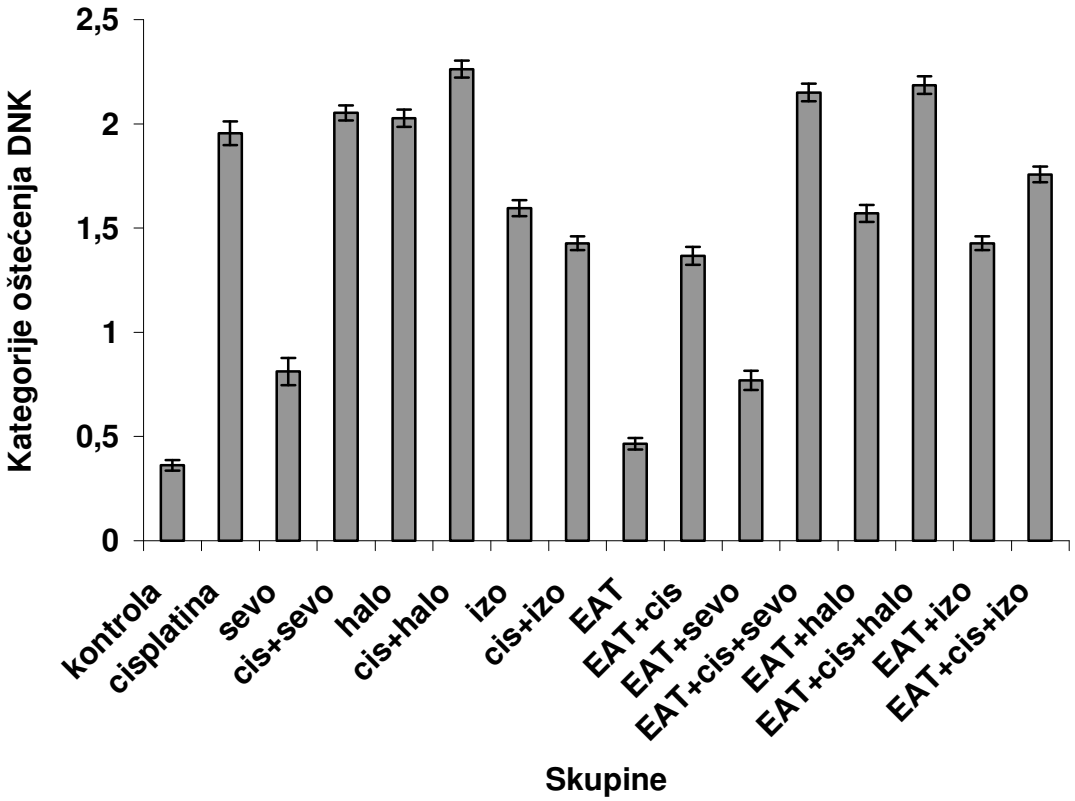
Legenda: EAT=stanice Ehrlichovog ascitesnog tumora, cis=cisplatina, sevo=sevofluran, halo=halotan, izo=izofluran

Tablica 3. Statistička analiza rezultata komet testa stanica mozga Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine.

	cis	sevo	cis+sevo	halo	cis+halo	izo	cis+izo	EAT	EAT+cis	EAT+sevo	EAT+cis+sevo	EAT+halo	EAT+cis+halo	EAT+izo	EAT+cis+izo
kontrola	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
cisplatina		p<0,001	p<0,001	p<0,001	NZ	p<0,001	P<0,001	p<0,001	NZ	p<0,001	p<0,01	NZ	NZ	NZ	p<0,001
sevo			NZ	p<0,001	P<0,001	p<0,001	NZ	p<0,001	p<0,001	NZ	NZ	p<0,001	p<0,001	NZ	NZ
cis+sevo				p<0,001	p<0,001	p<0,001	NZ	p<0,001	p<0,001	NZ	NZ	p<0,001	p<0,001	NZ	NZ
halo					p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
cis+halo						p<0,001	p<0,001	p<0,001	NZ	p<0,001	p<0,001	NZ	NZ	p<0,001	p<0,001
izo							p<0,01	NZ	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	P<0,05	p<0,001
cis+izo								p<0,01	p<0,001	NZ	P<0,01	p<0,001	p<0,001	NZ	NZ
EAT									p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,05	p<0,001
EAT+cis										p<0,01	NZ	NZ	NZ	p<0,001	p<0,001
EAT+sevo											NZ	p<0,001	p<0,01	p<0,05	NZ
EAT+cis+sevo												p<0,001	NZ	p<0,001	NZ
EAT+halo													NZ	p<0,001	p<0,001
EAT+cis+halo														p<0,001	p<0,001
EAT+izo															NZ
EAT+cis+izo															

NZ= nije statistički značajno

4.1.3. Rezultati Komet testa na stanicama jetre Swiss albino miševa



Slika 6. Učinak inhalacijskih anestetika i cisplatine na oštećenje DNK stanica jetre Swiss albino miševa. Rezultati komet testa prikazani su kao prosječne vrijednosti dužine repa kometa ±SE.

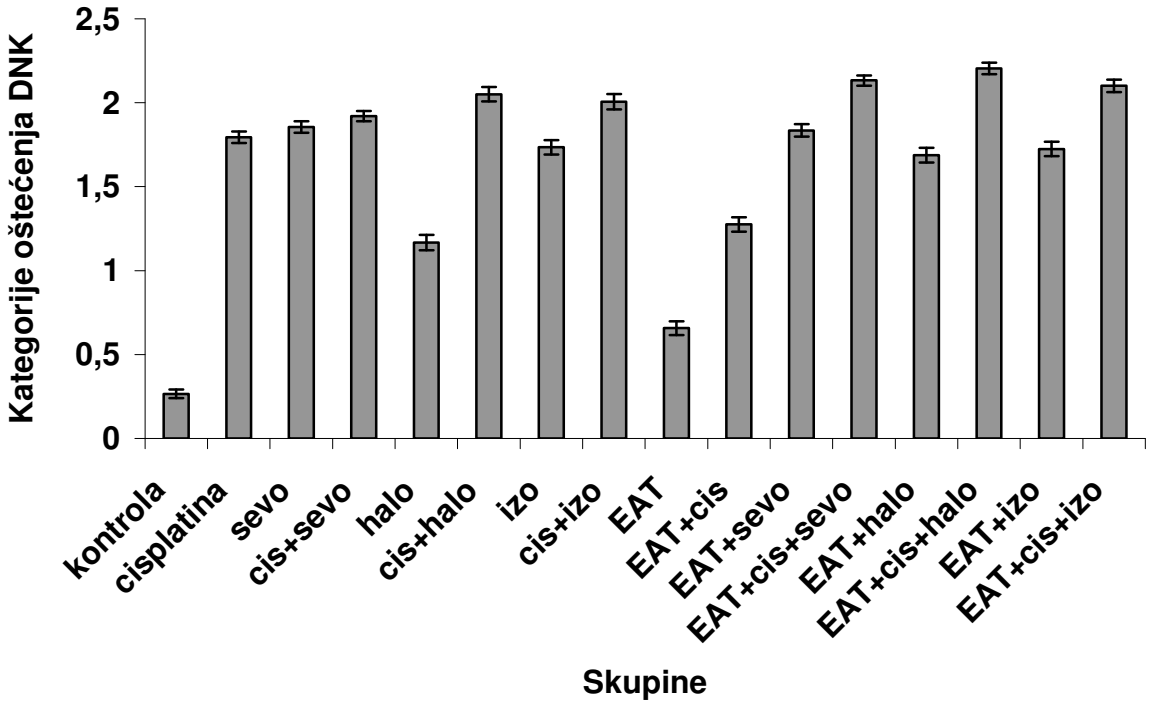
Legenda: EAT=stanice Ehrlichovog ascitesnog tumora, cis=cisplatina, sevo=sevofluran, halo=halotan, izo=izofluran

Tablica 4. Statistička analiza rezultata komet testa stanica jetre Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine

	cis	sevo	cis+sevo	halo	cis+halo	izo	cis+izo	EAT	EAT+cis	EAT+sevo	EAT+cis+sevo	EAT+halo	EAT+cis+halo	EAT+izo	EAT+cis+izo
kontrola	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	NZ	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
cisplatina		p<0,001	NZ	NZ	p<0,01	p<0,01	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	NZ	p<0,001	NZ	p<0,001	NZ
sevo			p<0,001	p<0,001	p<0,001	NZ	p<0,001	p<0,01	p<0,001	NZ	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
cis+sevo				NZ	NZ	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	NZ	p<0,001	NZ	p<0,001	p<0,01
halo					NZ	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	NZ	p<0,001	NZ	p<0,001	NZ
cis+halo						p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	NZ	p<0,001	NZ	p<0,001	p<0,001
izo							NZ	p<0,001	NZ	p<0,001	p<0,001	NZ	p<0,001	NZ	NZ
cis+izo								p<0,001	NZ	p<0,001	p<0,001	NZ	p<0,001	NZ	p<0,001
EAT									p<0,001	p<0,01	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
EAT+cis										p<0,001	p<0,001	NZ	p<0,001	NZ	p<0,001
EAT+sevo											p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
EAT+cis+sevo												p<0,001	NZ	p<0,001	p<0,001
EAT+halo													p<0,001	NZ	NZ
EAT+cis+halo														p<0,001	p<0,001
EAT+izo															p<0,001
EAT+cis+izo															

NZ= nije statistički značajno

4.1.4. Rezultati Komet testa na stanicama bubrega Swiss albino miševa



Slika 7. Učinak inhalacijskih anestetika i cisplatine na oštećenje DNK stanica bubrega Swiss albino miševa. Rezultati komet testa prikazani su kao prosječne vrijednosti dužine repa kometa ±SE.

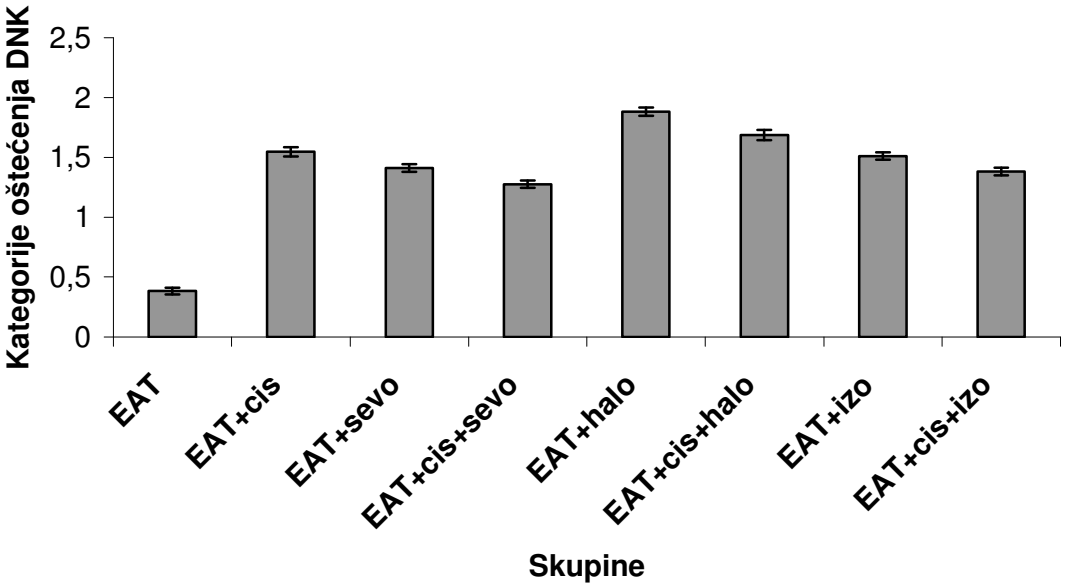
Legenda: EAT=stanice Ehrlichovog ascitesnog tumora, cis=cisplatina, sevo=sevofluran, halo=halotan, izo=izofluran

Tablica 5. Statistička analiza rezultata komet testa stanica bubrega Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine

	cis	sevo	cis+sevo	halo	cis+halo	izo	cis+izo	EAT	EAT+cis	EAT+sevo	EAT+cis+sevo	EAT+halo	EAT+cis+halo	EAT+izo	EAT+cis+izo
kontrola	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
cisplatina		NZ	NZ	p<0,001	NZ	NZ	NZ	p<0,001	p<0,001	NZ	p<0,001	NZ	p<0,001	NZ	p<0,01
sevo			NZ	p<0,001	NZ	NZ	NZ	p<0,001	p<0,001	NZ	p<0,01	NZ	p<0,001	NZ	p<0,05
cis+sevo				p<0,001	NZ	NZ	NZ	p<0,001	p<0,001	NZ	NZ	p<0,01	p<0,01	p<0,05	NZ
halo					p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	NZ	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
cis+halo						p<0,001	NZ	p<0,001	P<0,001	NZ	NZ	p<0,001	NZ	p<0,001	NZ
izo							p<0,05	p<0,001	p<0,001	NZ	p<0,001	NZ	p<0,001	NZ	p<0,001
cis+izo								p<0,001	p<0,001	NZ	NZ	p<0,001	p<0,05	p<0,01	NZ
EAT									p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
EAT+cis										p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
EAT+sevo											p<0,001	NZ	p<0,001	NZ	p<0,01
EAT+cis+sevo												p<0,001	NZ	p<0,001	NZ
EAT+halo													p<0,001	NZ	p<0,001
EAT+cis+halo														p<0,001	NZ
EAT+izo															p<0,001
EAT+cis+izo															

NZ= nije statistički značajno

4.1.5. Rezultati Komet testa na stanicama Ehrlich ascitesnog tumora



Slika 8 Učinak inhalacijskih anestetika i cisplatine na oštećenje DNK stanica Ehrlichovog ascitesnog tumora Swiss albino miševa. Rezultati komet testa prikazani su kao prosječne vrijednosti dužine repa kometa ±SE.
Legenda: EAT=stanice Ehrlichovog ascitesnog tumora, cis=cisplatina, sevo=sevofluran, halo=halotan, izo=izofluran

Tablica 6. Statistička analiza rezultata komet testa stanica Ehrlichovog ascitesnog tumora Swiss albino miševa po skupinama izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine

	EAT+cis	EAT+sevo	EAT+cis+sevo	EAT+halo	EAT+cis+halo	EAT+izo	EAT+cis+izo
EAT	**p<0,001**	**p<0,001**	**p<0,001**	**p<0,001**	**p<0,001**	**p<0,001**	**p<0,001**
EAT+cis		**NZ**	**p<0,001**	**p<0,001**	**NZ**	**NZ**	**p<0,01**
EAT+sevo			**NZ**	**p<0,001**	**p<0,01**	**NZ**	**NZ**
EAT+cis+sevo				**p<0,001**	**p<0,001**	**p<0,001**	**NZ**
EAT+halo					**p<0,01**	**p<0,001**	**p<0,001**
EAT+cis+halo						**NZ**	**p<0,001**

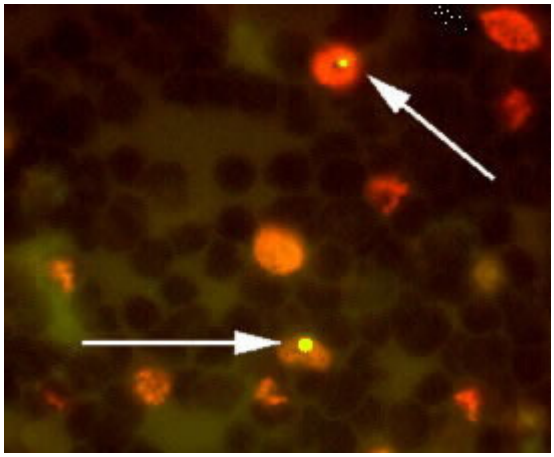
EAT+izo			**p<0,05**
EAT+cis+izo			

4.2. Rezultati Mikronukleus testa

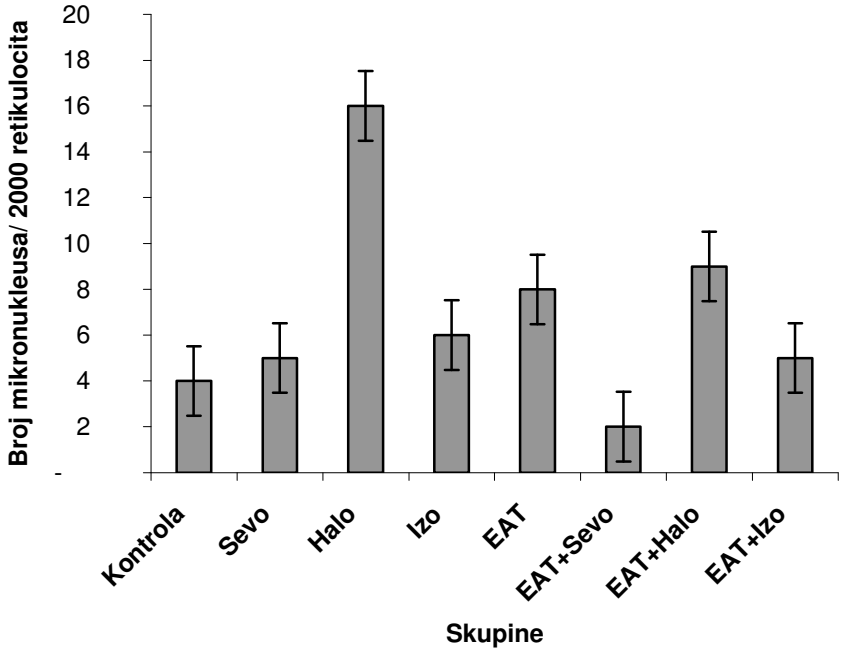
Preparate krvi obojane akridin oranž fluorescencijskom bojom analizirali smo na fluorescencijskom mikroskopu s filterom 502-525 nm. U svakom pojedinačnom uzorku analizirali smo 2000 retikulocita u kojima smo utvrdili ukupni broj i raspodjelu mikronukleusa (MN).

Uzorke krvi za mikronukleus test uzimali smo 48 sati nakon obrade životinja s cisplatinom i inhalacijskim anesteticima prema Tablici 1. Na priređenim razmazima periferne krvi miševa kojima smo injicirali intraperitonealno cisplatinu iz obje skupine (zdravi miševi, miševi s EAT stanicama) nije bio dovoljan broj retikulocita za analizu, uslijed toga što je cisplatina uništila retikulocite u perifernoj cirkulaciji tako da su te skupine izbačene iz daljnje analize. Rezultate mikronukleus testa i statističku analizu razlika između preostalih skupina pokazuje Slika 9. i Tablica 7.

Istraživani inhalacijski anestetici povećavaju broj mikronukleusa u retikulocitima periferne krvi; najjači učinak ima halotan ($p<0,01$) u usporedbi s kontrolnom skupinom te u usporedbi sa sevofluranom ($p<0,05$) i izofluranom ($p<0,05$). Miševi s injiciranim EAT stanicama imaju veći broj mikronukleusa u retikulocitima periferne krvi nego zdravi miševi, ali ne statistički značajno veći. Sva tri istraživana inhalacijska anestetika uzdravih miševa izazivaju veći broj mikronukleusa u retikulocitima periferne krvi u odnosu na miševe s s injiciranim EAT stanicama.



Slika 9. Retikulociti nakon obrade s jednim mikronukleusom



Slika 10. Broj retikulocita s mikronukleusima u perifernoj krvi Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika. Rezultati su prikazani kao prosječne vrijednosti broja mikronukleusa na 2000 retikulocita±SE.

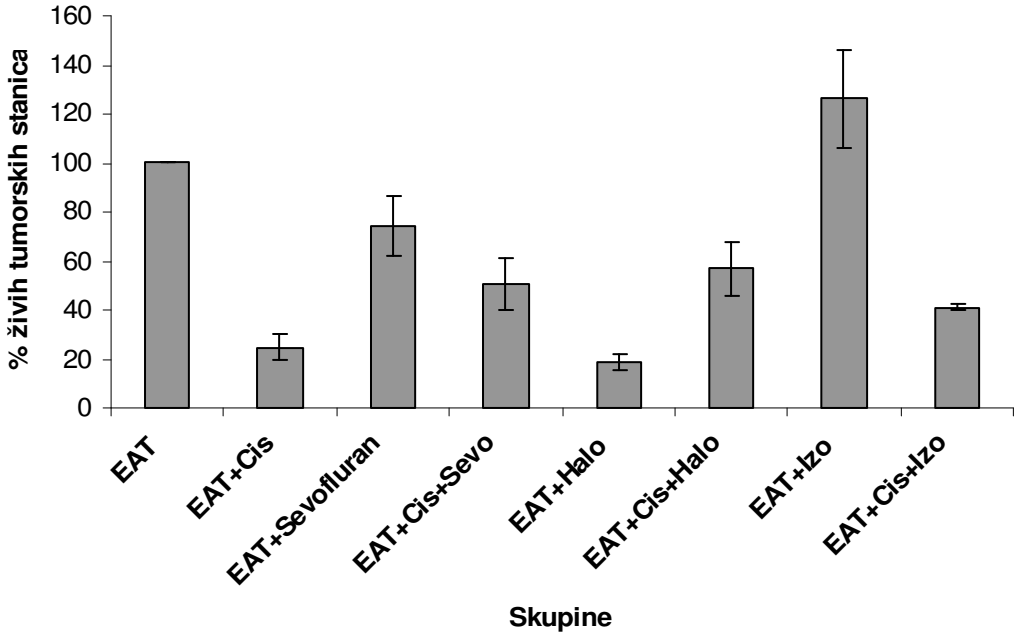
Tablica 7. Statistička analiza rezultata mikronukleus testa retikulocita periferne krvi Swiss albino miševa *in vivo* izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika

	kontrola	sevo	halo	izo	EAT	EAT+sevo	EAT+halo	EAT+izo
kontrola		**NZ**	**p<0,01**	**NZ**	**NZ**	**NZ**	**NZ**	**NZ**
sevo			**p<0,05**	**NZ**	**NZ**	**NZ**	**NZ**	**NZ**
halo				**p<0,05**	**NZ**	**p<0,001**	**NZ**	**p<0,05**
izo					**NZ**	**NZ**	**NZ**	**NZ**
EAT						**NZ**	**NZ**	**NZ**
EAT+sevo							**p<0,05**	**NZ**
EAT+halo								**NZ**
EAT+izo								

4.3. Rezultati brojanja živih stanica Ehrlichovog ascitesnog tumora u peritonealnoj šupljini Swiss albino miševa

Nakon obrade životinja prema Tablici 1. napravili smo kožnu inciziju i uzeli peritonealnu tekućinu te izbrojali ukupan broj tumorskih stanica u peritonealnoj tekućini u Bürker-Turk komorici; testom isključenja tripanskog modrila odredili smo broj živih stanica. Rezultati brojanja živih tumorskih stanica prikazani su na Slici 10., a statistička analiza razlika između pojedinih skupina prikazana je u Tablici 8.

Najmanji broj živih tumorskih stanica uočen je u skupini životinja koje su ponavljano anestezirane halotanom ($p<0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu. Nešto slabiji citotoksični učinak ima sevofluran ($p<0,05$) kod ponavljanih anestezija miševa, a prema dobivenim rezultatima izofluran nema citotoksični učinak, nego čak povećava ($p<0,05$) rast tumorskih stanica uspoređujući s kontrolnom skupinom. Združeni učinak cisplatine i sevoflurana, te cisplatine i izoflurana pojačava citotoksični učinak pojedinačno primijenjenih inhalacijskih anestetika. U skupini miševa obrađenih s cisplatinom te izlaganih halotanu, uočen je veći broj tumorskih stanica u ascitesu u odnosu na pojedinačnu obradu cisplatinom ili halotanom.



Slika 11. Učinak inhalacijskih anestetika i cisplatine na broj tumorskih stanica u peritonealnoj tekućini Swiss albino miševa. Rezultati su prikazani kao prosječne vrijednosti±SE postotaka živih stanica tumora u odnosu na broj živih stanica tumora u kontroli.

Tablica 8. Statistička analiza rezultata broj stanica Ehrlichovog ascitesnog tumora u peritonealnoj tekućini Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine

	EAT+Cis	EAT+Sevo	EAT+Cis+Sevo	EAT+Halo	EAT+Cis+Halo	EAT+Izo	EAT+Cis+Izo
EAT	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
EAT+Cis		p<0,05	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ
EAT+Sevo			NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
EAT+Cis+Sevo				NZ	NZ	NZ	NZ
EAT+Halo					NZ	NZ	NZ
EAT+Cis+Halo						NZ	NZ
EAT+Izo							NZ
EAT+Cis+Izo							

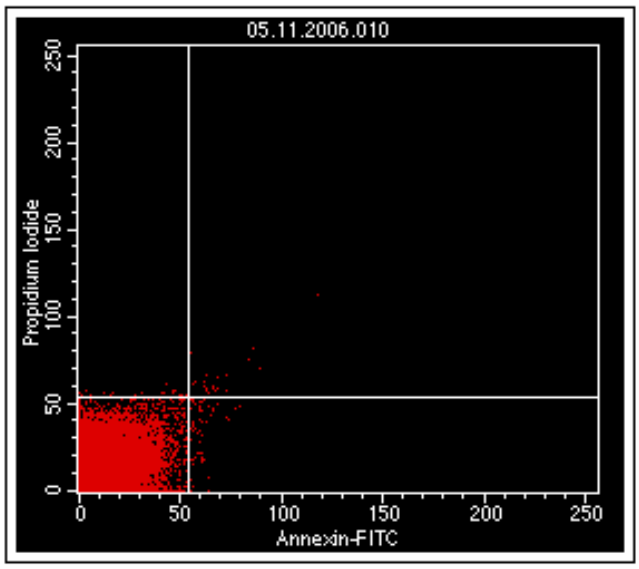
4.4. Rezultati apoptoze, nekroze i ukupnog broja mrtvih stanica Ehrlich ascitesnog tumora

Apoptozu, nekrozu i ukupan broj mrtvih EAT stanica odredili smo obilježavanjem stanica aneksinom V i propidijskim jodidom. Sve uzroke analizirali smo protočnim citometrom. Rezultati analize apoptotičnih i nekrotičnih EAT stanica te ukupnog broja mrtvih EAT stanica nakon obrade cisplatinom i inhalacijskim anesteticima prema Tablici 1. prikazani su na Slikama 12-14., a statistička analiza rezultata između pojedinih skupina vidljiva je na Tablicama 9-11.

U skupini miševa kojima je intraperitonealno injicirana cisplatina te u skupini miševa koji su nakon injiciranja cisplatine anestezirani izofluranom najveći je postotak EAT stanica u apoptozi u odnosu na kontrolu ($p<0,05$). Nakon ponavljanih anestezija sevofluranom i halotanom postotak apoptotičnih EAT stanica je oko 10% kao i u skupini neobrađenih EAT miševa. Nakon ponavljanih anestezija s izofluranom postotak apoptotičnih EAT stanica se značajno smanjuje ($p<0,05$) u odnosu na kontrolu. Kombinacija inhalacijskih anestetika i cisplatine statistički značajno povećava broj tumorskih stanica u apoptozi (cis+sevo $p<0,05$; cis+halo $p<0,05$; cis+izo $p<0,05$) u usporedbi s samim inhalacijskim anesteticima.

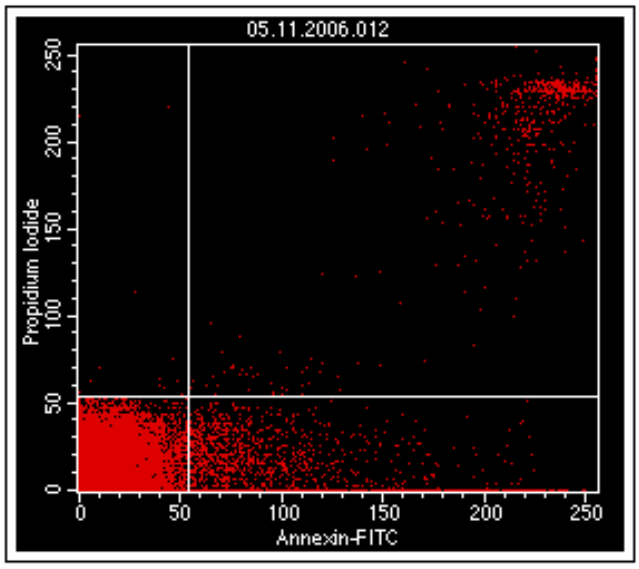
Najveći broj nekrotičnih tumorskih stanica nakon obrade nalazi se u skupini miševa koji su intraperitonealno dobivali cispatinu; broj stanica u nekrozi kod obrađenih miševa cisplatinom je statistički značajan ($p<0,05$) u usporedbi s kontrolom. U odnosu na kontrolu zapažen je smanjeni broj nekrotičnih stanica EAT u miševa višekratno izloženim sevofluranu ($p<0,05$) i izofluranu ($p<0,05$), dok višekratna anestezija halotanom također smanjuju broj nekrotičnih stanica tumora, ali ne statistički značajno. Združeni učinak cisplatine i inhalacijskih anestetika povećava broj nekrotičnih tumorskih stanica u odnosu na pojedinačni učinak sevoflurana, halotana i izoflurana ($p<0,05$).

Uspoređujući s kontrolom broj ukupno mrtvih EAT stanica je najveći u ascitesu miševa injiciranih s cisplatinom i anesteziranih izofluranom ($p<0,005$), a nešto manji broj je u skupini obrađenoj samo s cisplatinom ($p<0,05$). Ponavljane anestezije sevofluranom i halotanom neznačajno smanjuju ukupni broj mrtvih tumorskih stanica u ascitesu, dok ponavljane anestezije izofluranom statistički značajno ($p<0,05$) smanjuju broj ukupno mrtvih EAT stanica u odnosu na kontrolu. Združeni učinak cisplatine i inhalacijskih anestetika statistički značajno povećava broj ukupno mrtvih tumorskih stanica (sevo+cis $p<0,05$; halo+cis $p<0,05$; izo+cis $p<0,05$) u usporedbi sa pojedinačnim učinkom inhalacijskih anestetika.



File: 05.11.2006.010
Sample ID: neobiljezeno 6.1
Acquisition Date: 11-May-06
Gate: G1
Gated Events: 29693

Quad	Events	% Gated
UL	25	0.08
UR	22	0.07
LL	29594	99.67
LR	52	0.18

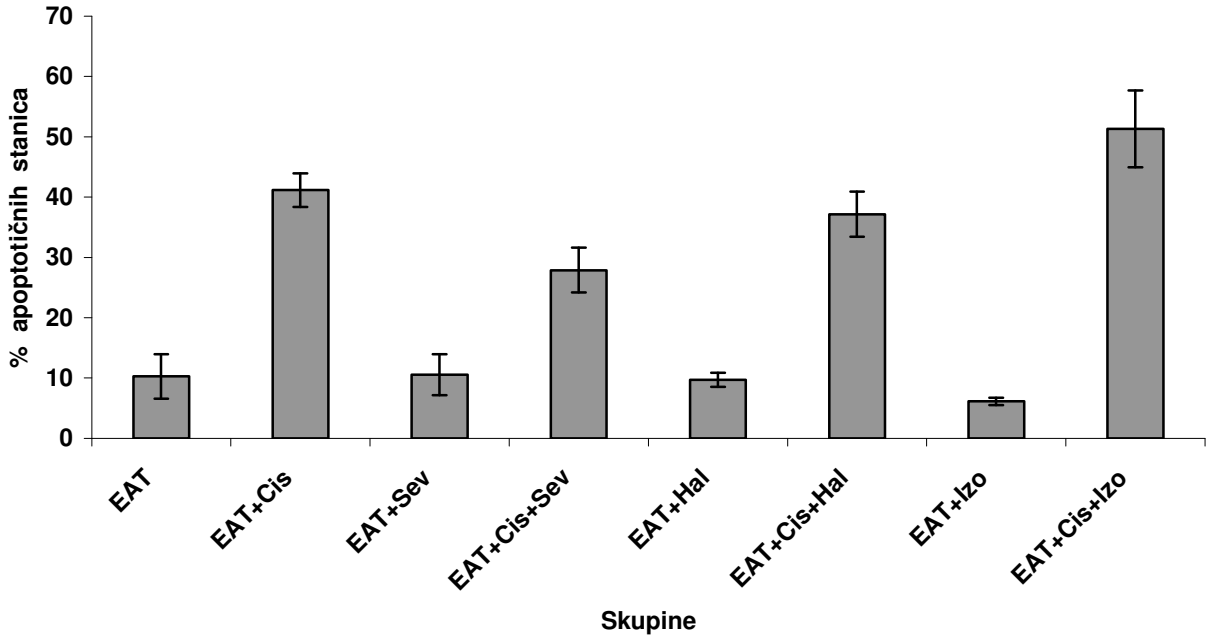


File: 05.11.2006.012
Sample ID: obiljezeno 6.3
Acquisition Date: 11-May-06
Gate: G1
Gated Events: 28288

Quad	Events	% Gated
UL	21	0.07
UR	582	2.06
LL	26064	92.14
LR	1621	5.73

Slika 12. Prikaz rezultata postotaka apoptotičnih i nekrotičnih stanica te ukupnog broja mrtvih stanica dobivenih protočnim citometrom

4.4.1. Postotak apoptotičnih stanica tumora nakon obrade miševa inhalacijskim anesteticima i cisplatinom

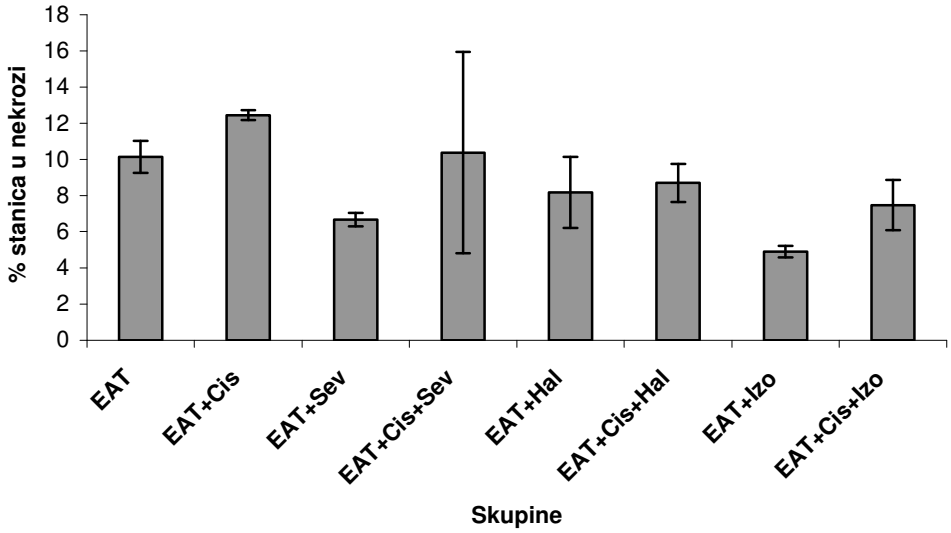


Slika 13. Postotak apoptotičnih stanica tumora u peritonealnoj tekućini Swiss albino miševa izloženih po skupinama djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine. Rezultati su prikazani kao prosječne vrijednosti±SE postotaka apoptotičnih stanica tumora u odnosu na ukupan broj tumorskih stanica u kontrolnoj skupini miševa nositelja tumora.

Tablica 9. Statistička analiza rezultata apoptoze stanica Ehrlichovog ascitesnog tumora u peritonealnoj tekućini Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine

	EAT+Cis	EAT+Sevo	EAT+Cis+Sevo	EAT+Halo	EAT+Cis+Halo	EAT+Izo	EAT+Cis+Izo
EAT	p<0,05	NZ	p<0,05	NZ	p<0,05	NZ	p<0,05
EAT+Cis		NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ
EAT+Sevo			p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ
EAT+Cis+Sevo				NZ	NZ	NZ	p<0,05
EAT+Halo					p<0,05	NZ	NZ
EAT+Cis+Halo						NZ	NZ
EAT+Izo							p<0,05
EAT+Cis+Izo							

4.4.2. Postotak nekrotičnih stanica tumora nakon obrade miševa inhalacijskim anesteticima i cisplatinom

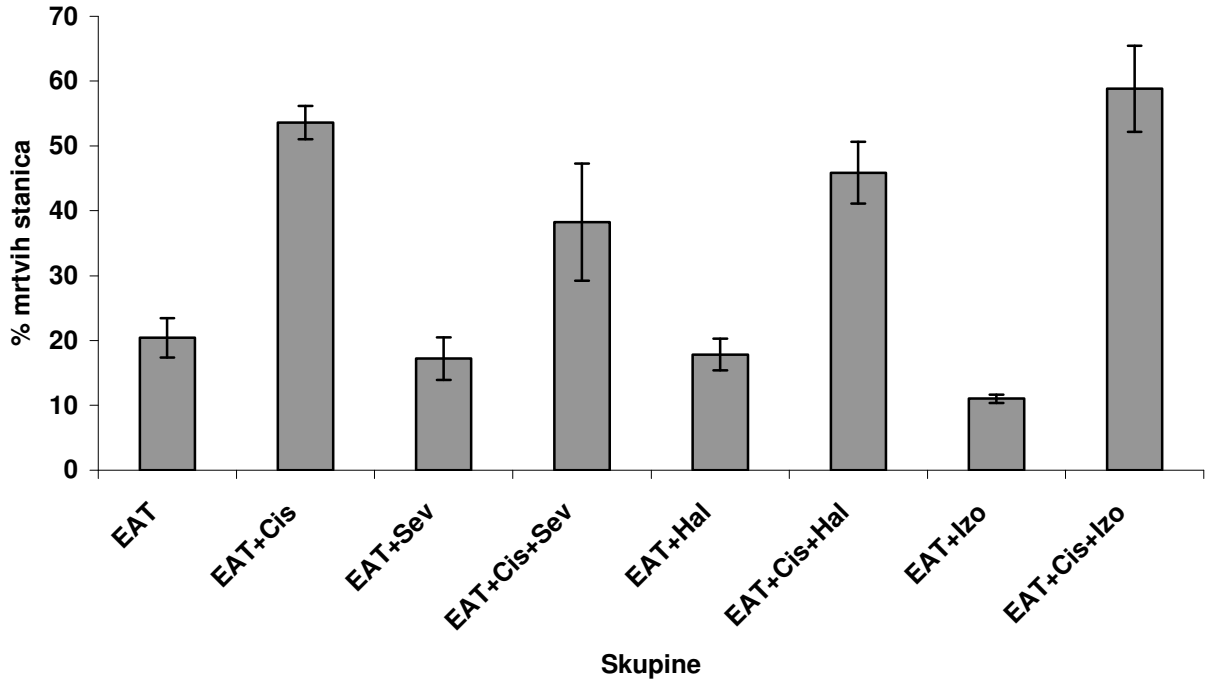


Slika 14. Postotak nekrotičnih stanica tumora u peritonealnoj tekućini Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine. Rezultati su prikazani kao prosječne vrijednosti±SE postotaka nekrotičnih stanica tumora u odnosu na ukupan broj tumorskih stanica u peritonealnoj tekućini miševa nositelja tumora.

Tablica 10. Statistička analiza rezultata nekrotičnih stanica Ehrlichovog ascitesnog tumora u peritonealnoj tekućini Swiss albino miševa izloženih djelovanju cisplatine i inhalacijskih anestetika

	EAT+Cis	EAT+Sev	EAT+Cis+Sev	EAT+Hal	EAT+Cis+Hal	EAT+Izo	EAT+Cis+Izo
EAT	p<0,05	p<0,05	NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ
EAT+Cis		p<0,05	NZ	NZ	p<0,05	p<0,05	p<0,05
EAT+Sev			NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ
EAT+Cis+Sev				NZ	NZ	NZ	NZ
EAT+Hal					NZ	NZ	NZ
EAT+Cis+Hal						p<0,05	NZ
EAT+Izo							p<0,05
EAT+Cis+Izo							

4.4.3. Ukupni postotak mrtvih stanica tumora nakon obrade miševa inhalacijskim anesteticima i cisplatinom



Slika 15. Postotak mrtvih stanica tumora u peritonealnoj tekućini Swiss albino

miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine. Rezultati su prikazani kao prosječne vrijednosti±SE postotaka mrtvih stanica tumora u odnosu na ukupan broj tumorskih stanica u peritonealnoj tekućini miševa nositelja tumora.

Tablica 11. Statistička analiza rezultata ukupnog postotka mrtvih stanica Ehrlichovog ascitesnog tumora u peritonealnoj tekućini Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine

	EAT+Cis	EAT+Sev	EAT+Cis+Sev	EAT+Hal	EAT+Cis+Hal	EAT+Izo	EAT+Cis+Izo
EAT	p<0,05	NZ	NZ	NZ	p<0,05	p<0,05	p<0,05
EAT+Cis		p<0,05	NZ	p<0,05	NZ	p<0,05	NZ
EAT+Sev			p<0,05	NZ	p<0,05	NZ	p<0,05
EAT+Cis+Sev				p<0,05	NZ	p<0,05	NZ
EAT+Hal					p<0,05	p<0,05	p<0,05
EAT+Cis+Hal						p<0,05	NZ
EAT+Izo							p<0,05
EAT+Cis+Izo							

4.5. Rezultati analize hematoloških parametara periferne krvi nakon obrade miševa inhalacijskim anesteticima i cisplatinom

Nakon obrade životinja prema Tablici 1. uzeli smo krv iz pazušnog spleta krvnih žila miševa i stavili u heparinizirani vacuutainer za određivanje hematoloških parametara. Krv smo analizirali brojačem krvnih stanica Cell-Dyn® 3200 (Abbott, USA).

Analizom rezultata ustanovili smo da cisplatina, sevofluran, halotan i izofluran ne dovode do promjena u broju eritrocita u perifernoj krvi miševa, niti do značajnih promjena koncentracije hemoglobina u krvi (Slika 15. i Slika 16.). Broj eritrocita i koncentracija hemoglobina u svim skupinama miševa nalaze se u granicama normalnih vrijednosti.

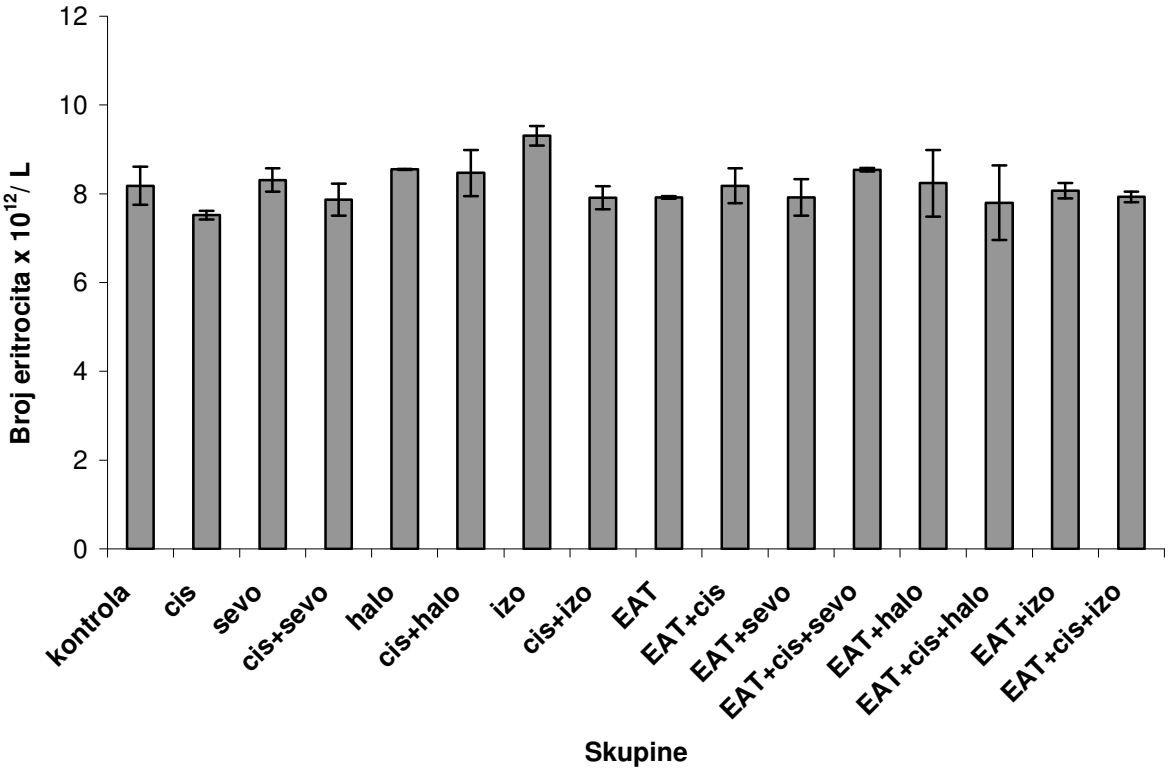
Ukupni broj leukocita u skupini miševa s injiciranim EAT stanicama viši je nego u kontrolnoj skupini (Slika 17.). Miševi koji su primali cisplatinu imaju snižen broj leukocita u obje promatrane skupine (zdravi miševi, miševi s tumorskim stanicama). Od ispitivanih inhalacijskih anestetika, halotan i izofluran smanjuju broj

leukocita u perifernoj krvi miševa, a kombinacija cisplatine i halotana dovodi do najjače leukopenije kod zdravih miševa i u miševa s injiciranim tumorskim stanicama ($p<0,05$) u odnosu na kontrolu. Cisplatina u skupini zdravih miševa smanjuje postotak neutrofilnih leukocita. Od promatranih inhalacijskih anestetika halotan najviše smanjuje postotak neutrofila u obje skupine miševa, izofluran nešto manje, a sevofluran ne mijenja postotak neutrofila. Združeni učinak cisplatine i halotana izaziva najjaču neutropeniju kod miševa s injiciranim tumorskim stanicama (Slika 18.).

Nakon ponavljanih injiciranja cisplatine prema Tablici 1. smanjuje se postotak limfocita u odnosu na ukupni broj leukocita u obje skupine miševa; zdravi i miševi s EAT stanicama. Ponavljane anestezije sevofluranom, halotanom i izofluranom ne mijenjaju značajno postotak limfocita u perifernoj krvi, ali združeni učinak inhalacijskih anestetika i cisplatine značajno snižava postotak limfocita u perifernoj krvi miševa (Slika 19.).

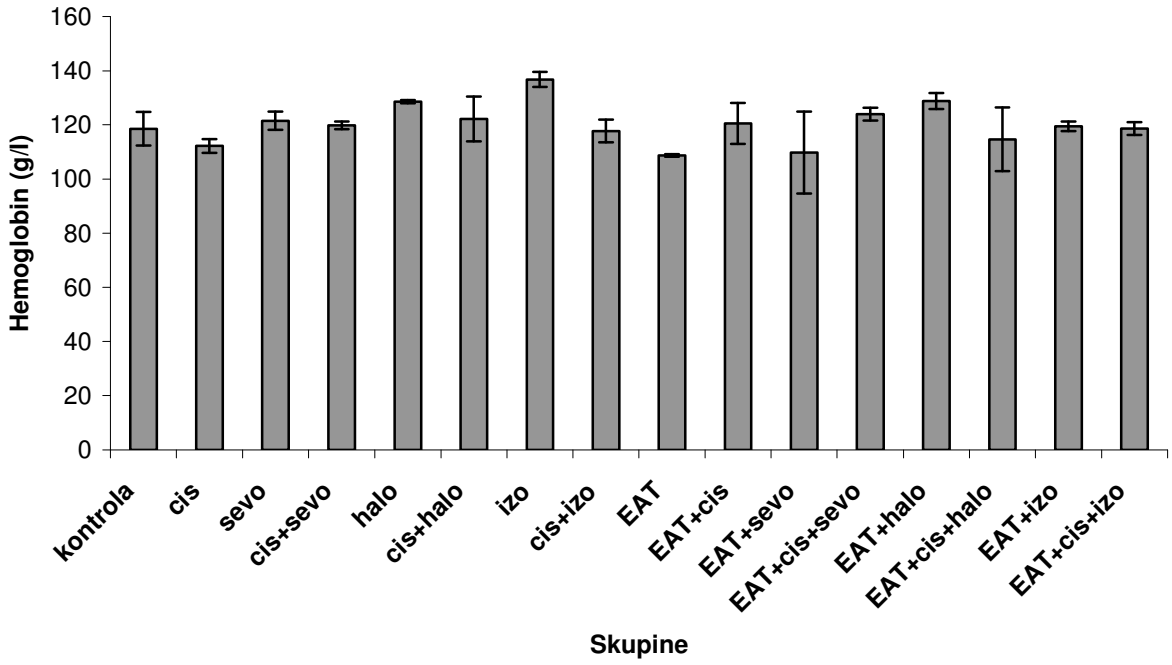
Postotak monocita je nešto veći u skupini miševa s injiciranim EAT stanicama u odnosu na kontrolu. U skupinama miševa injiciranih cisplatinom, broj monocita je povećan. U odnosu na kontrolu smanjeni broj monocita u perifernoj krvi miševa vidljiv je u skupina izloženih sevofluranu ($p<0,05$), halotanu ($p<0,05$) i izofluranu ($p<0,05$), a kombinirani učinak cisplatine s inhalacijskim anesteticima povećava broj monocita u obje skupine miševa, s izuzetkom halotana i cisplatine u miševa s EAT stanicama.

4.5.1. Broj eritrocita periferne krvi Swiss albino miševa nakon obrade inhalacijskim anesteticima i cisplatinom



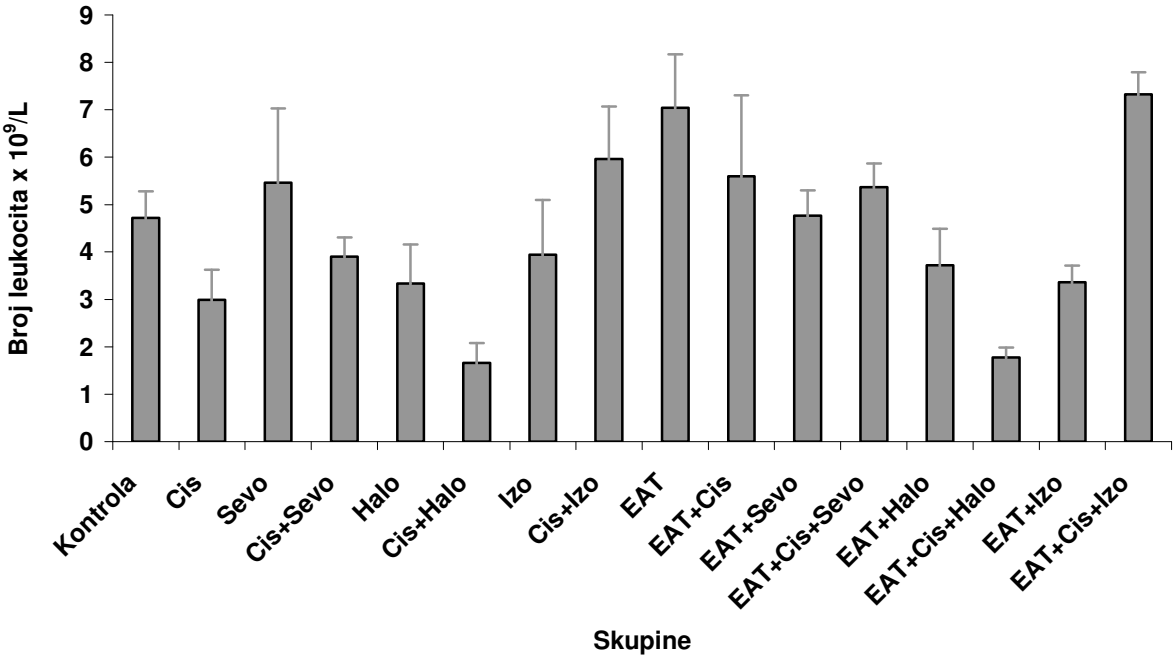
Slika 16. Broj eritrocita Swiss albino miševa po skupinama izloženih djelovanju cisplatine i inhalacijskih anestetika. Rezultati su prikazani kao prosječni broj eritrocita±SE

4.5.2. Koncentracija hemoglobina u perifernoj krvi miševa nakon obrade inhalacijskim anesteticima i cisplatinom



Slika 17. Koncentracija hemoglobina Swiss albino miševa po skupinama izloženih djelovanju cisplatine i inhalacijskih anestetika. Rezultati su prikazani kao prosječne koncentracije hemoglobinaa±SE

4.5.3. Broj leukocita u perifernoj krvi Swiss albino miševa nakon obrade inhalacijskim anesteticima i cisplatinom

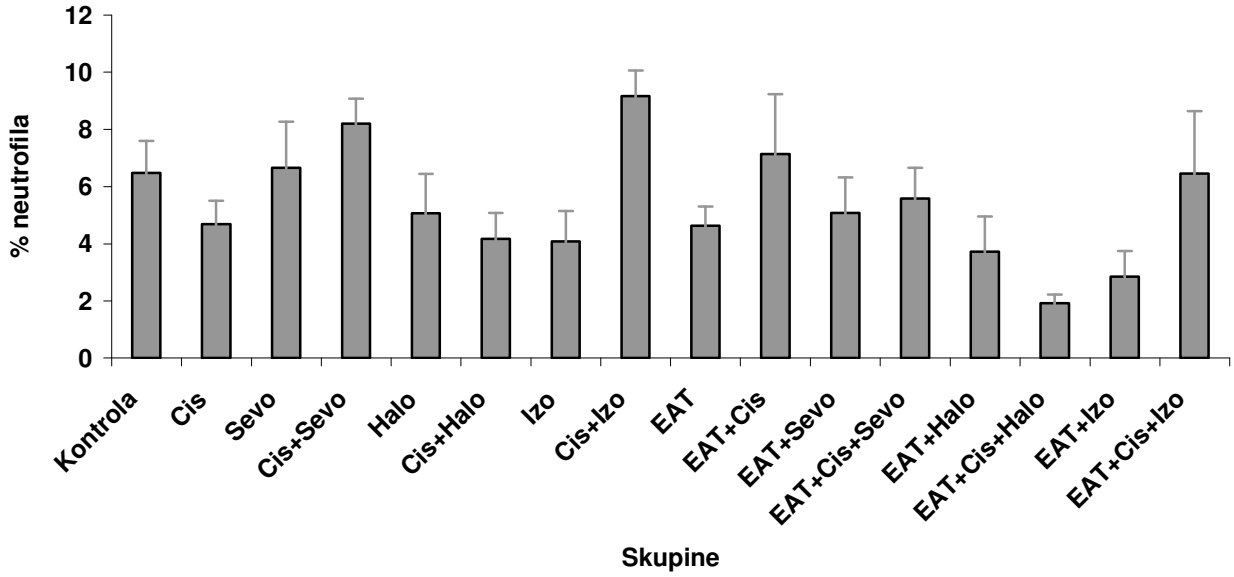


Slika 18. Ukupni broj leukocita periferne krvi Swiss albino miševa izloženih djelovanju cisplatine i inhalacijskih anestetika. Rezultati su prikazani po skupinama kao prosječni broj lekocita±SE.

Tablica 12. Statistička analiza rezultata ukupnog broja leukocita periferne krvi Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine

	Kontrola	Cis	Sevo	Cis+Sevo	Halo	Cis+Halo	Izo	Cis+Izo	EAT	EAT+Cis	EAT+Sevo	EAT+Cis+Sevo	EAT+Halo	EAT+Cis+Halo	EAT+Izo	EAT+Cis+Izo
Kontrola		NZ	NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Cis			NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Sevo				NZ	NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Cis+Sevo					NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Halo						NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Cis+Halo							NZ	p<0,05	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	p<0,05
Izo								NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Cis+Izo									NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
EAT										NZ	NZ	NZ	p<0,05	p<0,05	p<0,05	NZ
EAT+Cis											NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ	NZ
EAT+Sevo												NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
EAT+Cis+Sevo													NZ	p<0,05	p<0,05	p<0,05
EAT+Halo														p<0,05	NZ	p<0,05
EAT+Cis+Halo															p<0,05	p<0,05
EAT+Izo																p<0,05
EAT+Cis+Izo																

4.5.4. Postotak neutrofila od ukupnog broja leukocita periferne krvi Swiss albino miševa nakon obrade inhalacijskim anesteticima i cisplatinom

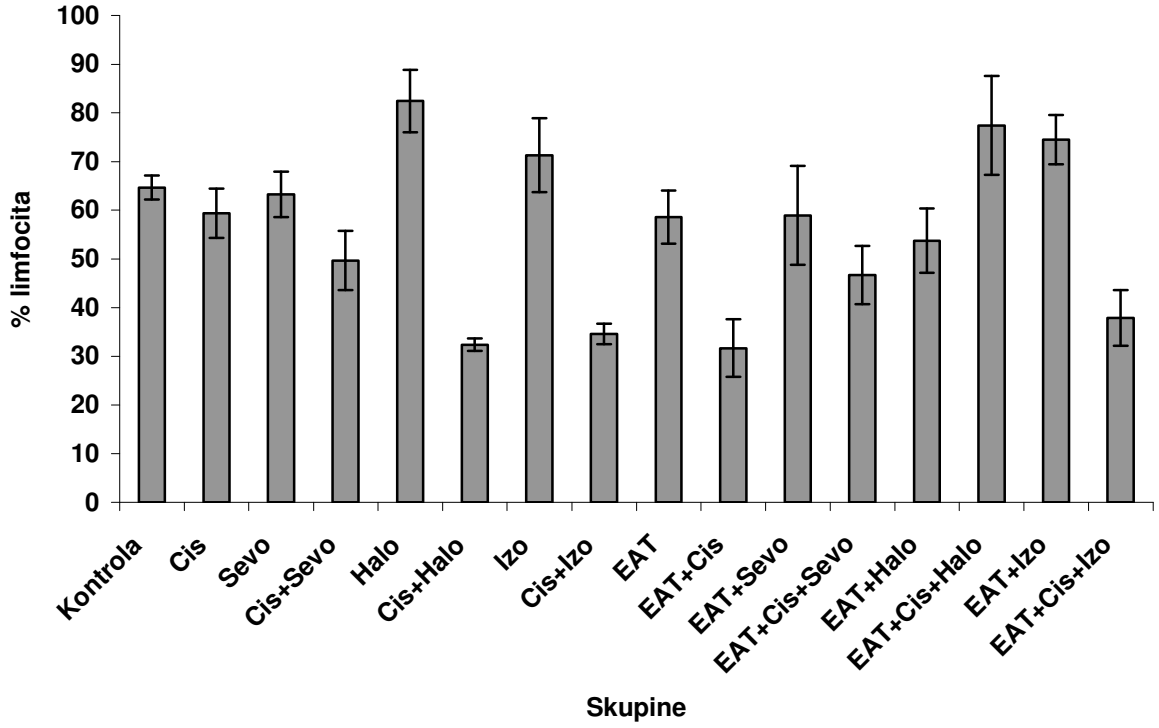


Slika 19. Postotak neutrofila od ukupnog broja leukocita u perifernoj krvi Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine. Rezultati su prikazani kao prosječne vrijednosti±SE.

Tablica 13. Statistička analiza rezultata postotaka neutrofila u perifernoj krvi Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine

	Kontrola	Cis	Sevo	Cis+Sevo	Halo	Cis+Halo	Izo	Cis+Izo	EAT	EAT+Cis	EAT+Sevo	EAT+Cis+Sevo	EAT+Halo	EAT+Cis+Halo	EAT+Izo	EAT+Cis+Izo
Kontrola		NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Cis			NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Sevo				NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Cis+Sevo					NZ	p<0,05	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Halo						NZ	NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Cis+Halo							NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Izo								p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Cis+Izo									NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ	NZ
EAT										NZ	NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ	NZ
EAT+Cis											NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ	NZ
EAT+Sevo												NZ	NZ	p<0,05	NZ	NZ
EAT+Cis+Sevo													NZ	p<0,05	NZ	NZ
EAT+Halo														NZ	NZ	NZ
EAT+Cis+Halo															NZ	NZ
EAT+Izo																NZ
EAT+Cis+Izo																

4.5.5. Postotak limfocita od ukupnog broja leukocita periferne krvi Swiss albino miševa nakon obrade miševa inhalacijskim anesteticima i cisplatinom

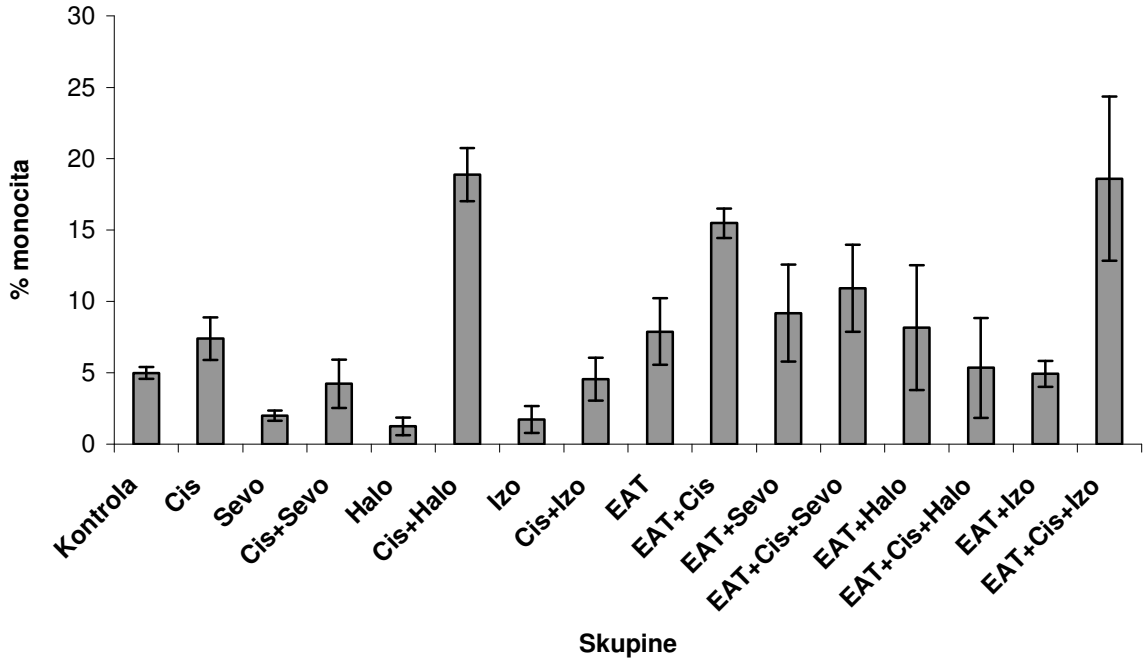


Slika 20. Postotak limfocita od ukupnog broja leukocita u perifernoj krvi Swiss albino miševa izloženih po skupinama djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine. Rezultati su prikazani kao prosječne vrijednosti±SE.

Tablica 14. Statistička analiza rezultata postotaka limfocita u perifernoj krvi Swiss albino miševa izloženih po skupinama djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine

	Kontrola	Cis	Sevo	Cis+Sevo	Halo	Cis+Halo	Izo	Cis+Izo	EAT	EAT+Cis	EAT+Sevo	EAT+Cis+Sevo	EAT+Halo	EAT+Cis+Halo	EAT+Izo	EAT+Cis+Izo
Kontrola		NZ	NZ	p<0,05	NZ	p<0,05	NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Cis			NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Sevo				p<0,05	p<0,05	p<0,05	NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Cis+Sevo					p<0,05	NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Halo						p<0,05	NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Cis+Halo							p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ
Izo								p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Cis+Izo									NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
EAT										p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	p<0,05
EAT+Cis											NZ	NZ	NZ	p<0,05	p<0,05	NZ
EAT+Sevo												NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
EAT+Cis+Sevo													NZ	p<0,05	p<0,05	NZ
EAT+Halo														NZ	NZ	NZ
EAT+Cis+Halo															NZ	p<0,05
EAT+Izo																p<0,05
EAT+Cis+Izo																

4.5.6. Postotak monocita od ukupnog broja leukocita periferne krvi Swiss albino miševa nakon obrade inhalacijskim anesteticima i cisplatinom



Slika 21. Postotak monocita od ukupnog broja leukocita u perifernoj krvi Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine. Rezultati su prikazani kao prosječne vrijednosti±SE.

Tablica 15. Statistička analiza rezultata postotaka monocita od ukupnog broja leukocita u perifernoj krvi Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine

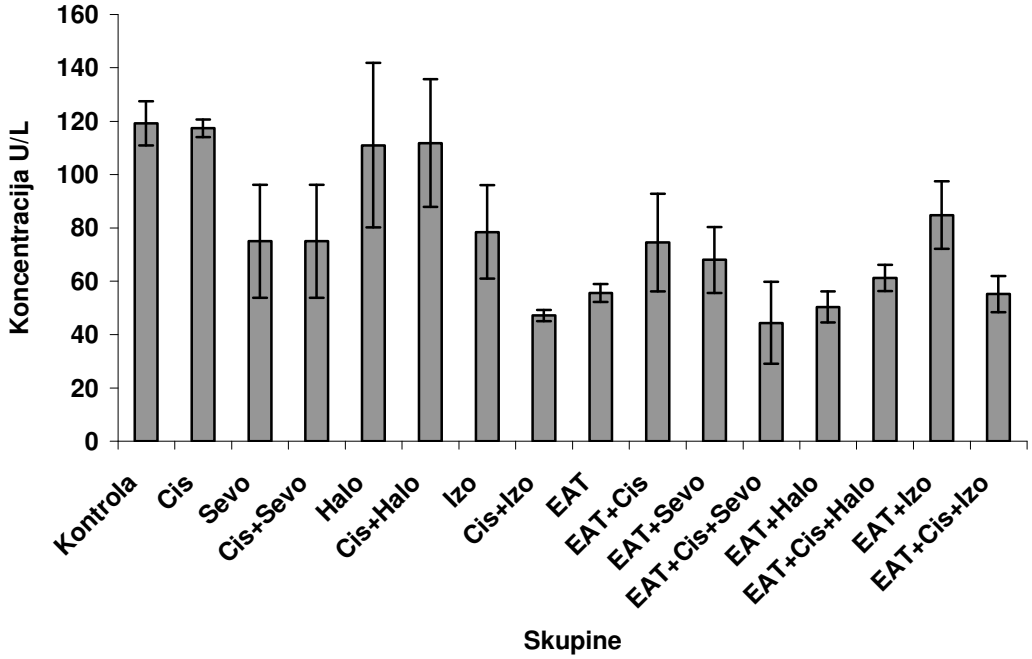
	Kontrola	Cis	Sevo	Cis+Sevo	Halo	Cis+Halo	Izo	Cis+Izo	EAT	EAT+Cis	EAT+Sevo	EAT+Cis+Sevo	EAT+Halo	EAT+Cis+Halo	EAT+Izo	EAT+Cis+Izo
Kontrola		NZ	p<0,05	NZ	p<0,05	p<0,05	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Cis			p<0,05	NZ	p<0,05	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Sevo				NZ	NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Cis+Sevo					NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Halo						p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Cis+Halo							p<0,05	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Izo								NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Cis+Izo									NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
EAT										p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
EAT+Cis											NZ	NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ
EAT+Sevo												NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
EAT+Cis+Sevo													NZ	NZ	NZ	NZ
EAT+Halo														NZ	NZ	NZ
EAT+Cis+Halo															NZ	NZ
EAT+Izo																p<0,05
EAT+Cis+Izo																

4.6. Rezultati biokemijske analize periferne krvi miševa nakon obrade inhalacijskim anesteticima i cisplatinom

Nakon obrade životinja prema Tablici 1., uzeli smo krv iz pazušnog spleta krvnih žila miševa te odredili koncentraciju alkalne fosfataze (AF), aspartat-aminotransferaze (AST), alanin-aminotransferaze (ALT), ukupne proteine, ureu i kreatinin aparatom Acylon 300 (Abbott, USA).

Miševi s injiciranim EAT stanicama imaju manje vrijednosti AF u krvi nego zdravi miševi. Uočili smo da ponavljane anestezije sevofluranom i izofluranom smanjuju, a cisplatina i halotan ne mijenjaju koncentraciju AF u krvi. Najveće koncentracije AST-a zapažene su kod združenog djelovanja cisplatine i halotana, dok cisplatina i halotan pojedinačno imaju slabiji učinak. Ostali inhalacijski anestetici ne mijenjaju koncentraciju AST-a u krvi miševa. Cisplatina povećava koncentraciju ALT-a u krvi zdravih kao i u miševa s injiciranim tumorskim stanicama ($p<0,05$). Najviše vrijednosti ALT-a zapažene su u miševa obrađenih cisplatinom i halotanom zajedno. Sevofluran i izofluran ne dovode do promjena u koncentraciji ALT-a (Slika 23.). Skupina miševa s injiciranim tumorskim stanicama ima neznatno nižu koncentraciju ukupnih proteina u odnosu na zdrave miševe (Slika 24.), a ponavljane anestezije halotanom još više snižavaju ukupne proteine kod životinja s tumorom ($p<0,05$) u odnosu na kontrolu. Koncentraciju ureje u krvi najviše podižu ponavljane anestezije izofluranom, a nismo uočili da cisplatina i istraživani inhalacijski anestetici podižu koncentraciju kreatinina u perifernoj krvi miševa (Slika 25. i Slika 26.).

4.6.1. Alkalna fosfataza (AF)

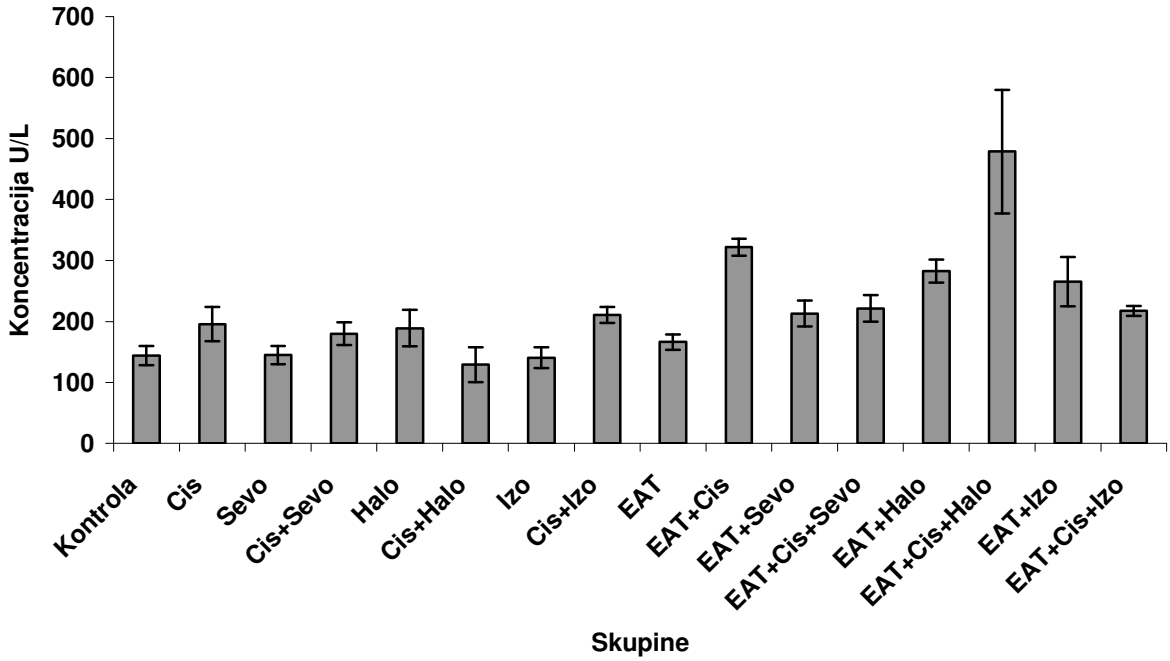


Slika 22. Koncentracija alkalne fosfataze u perifernoj krvi Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine. Rezultati su prikazani kao prosječne vrijednosti±SE.

Tablica 16. Statistička analiza rezultata koncentracije alkalne fosfataze u perifernoj krvi Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine

	Kontrola	Cis	Sevo	Cis+Sevo	Halo	Cis+Halo	Izo	Cis+Izo	EAT	EAT+Cis	EAT+Sevo	EAT+Cis+Sevo	EAT+Halo	EAT+Cis+Halo	EAT+Izo	EAT+Cis+Izo
Kontrola		NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Cis			NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Sevo				NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Cis+Sevo					NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Halo						NZ	NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Cis+Halo							NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Izo								NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Cis+Izo									NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
EAT										NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
EAT+Cis											NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
EAT+Sevo												NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
EAT+Cis+Sevo													NZ	NZ	p<0,05	NZ
EAT+Halo														NZ	p<0,05	NZ
EAT+Cis+Halo															NZ	NZ
EAT+Izo																NZ
EAT+Cis+Izo																

4.6.2. Aspartat aminotransferaza (AST)

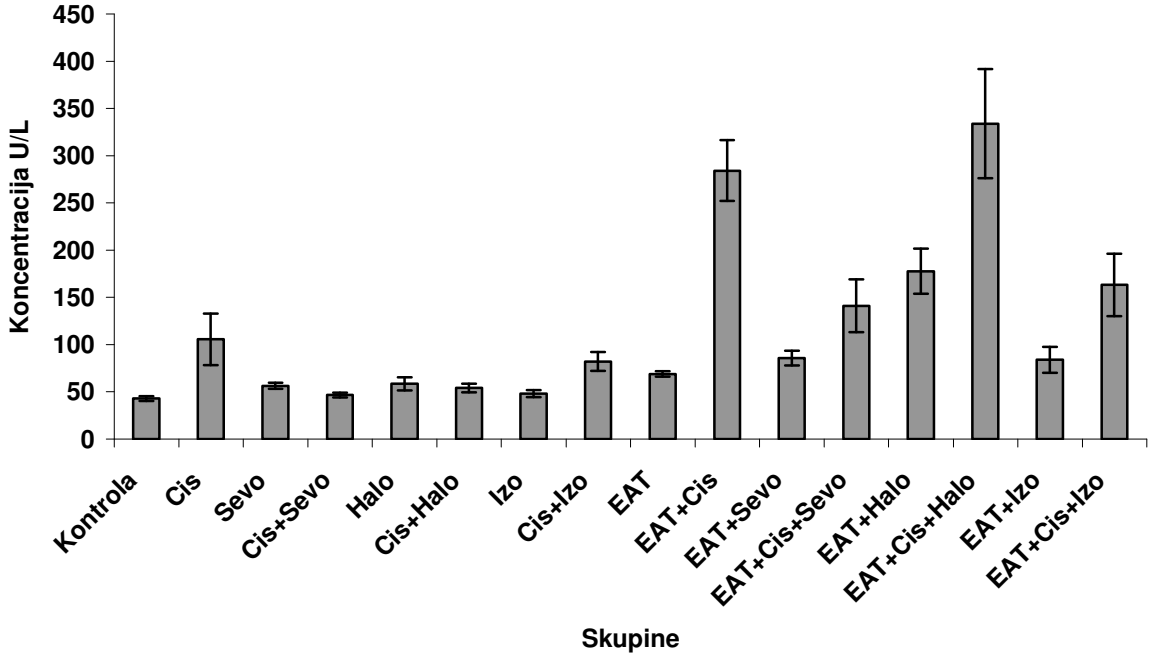


Slika 23. Koncentracija aspartat aminotransferaze u perifernoj krvi Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine. Rezultati su prikazani kao prosječne vrijednosti±SE.

Tablica 17. Statistička analiza rezultata vrijednosti aspartat aminotransferaze u perifernoj krvi Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine

	Kontrola	Cis	Sevo	Cis+Sevo	Halo	Cis+Halo	Izo	Cis+Izo	EAT	EAT+Cis	EAT+Sevo	EAT+Cis+Sevo	EAT+Halo	EAT+Cis+Halo	EAT+Izo	EAT+Cis+Izo
Kontrola		NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ	NZ
Cis			NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Sevo				NZ	NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Cis+Sevo					NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Halo						NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Cis+Halo							NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Izo								p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Cis+Izo									NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
EAT										p<0,05	NZ	NZ	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
EAT+Cis											p<0,05	p<0,05	NZ	NZ	NZ	p<0,05
EAT+Sevo												NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ
EAT+Cis+Sevo													p<0,05	NZ	NZ	NZ
EAT+Halo														NZ	NZ	NZ
EAT+Cis+Halo															NZ	p<0,05
EAT+Izo																NZ
EAT+Cis+Izo																

4.6.3. Alanin aminotransferaza (ALT)

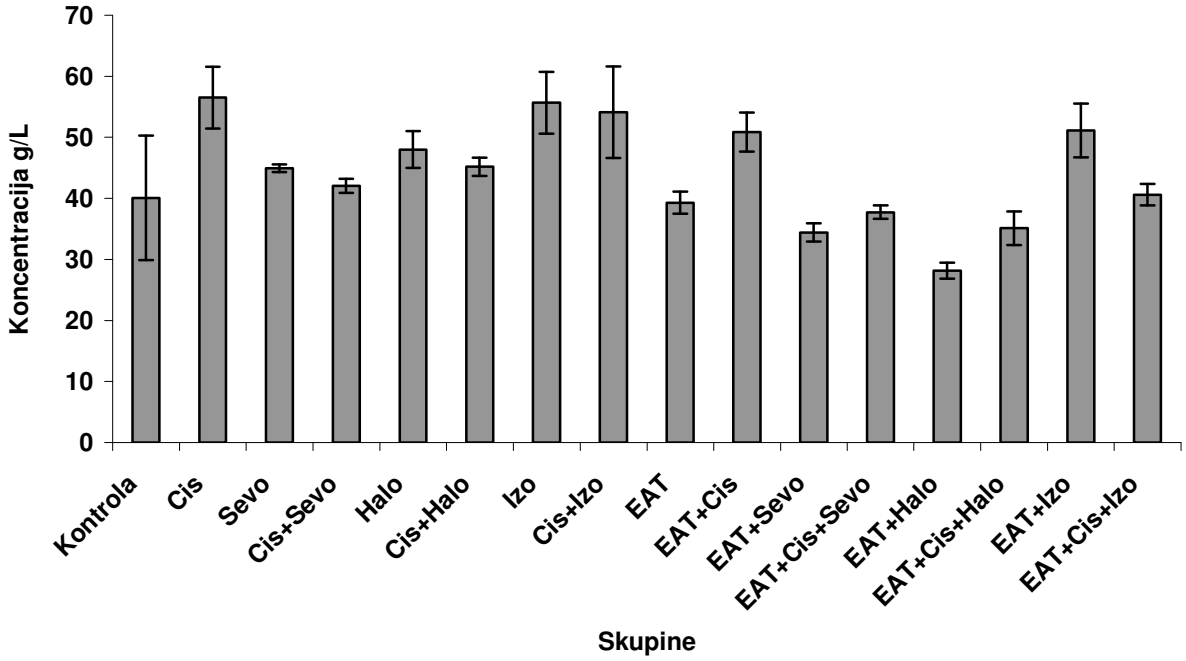


Slika 24. Koncentracija alanin aminotransferaze u perifernoj krvi Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine. Rezultati su prikazani kao prosječne vrijednosti±SE postotaka.

Tablica 18. Statistička analiza rezultata vrijednosti aspartat aminotransferaze u perifernoj krvi Swiss albino miševa po skupinama izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine

	Kontrola	Cis	Sevo	Cis+Sevo	Halo	Cis+Halo	Izo	Cis+Izo	EAT	EAT+Cis	EAT+Sevo	EAT+Cis+Sevo	EAT+Halo	EAT+Cis+Halo	EAT+Izo	EAT+Cis+Izo
Kontrola		NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ	p<0,05	NZ	NZ	p<0,05	p<0,05	NZ	NZ
Cis			NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Sevo				NZ	NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Cis+Sevo					NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ	NZ
Halo						NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Cis+Halo							NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Izo								p<0,05	NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ	NZ
Cis+Izo									NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
EAT										p<0,05	NZ	p<0,05	p<0,05	p<0,05	NZ	p<0,05
EAT+Cis											p<0,05	p<0,05	NZ	NZ	p<0,05	NZ
EAT+Sevo												p<0,05	p<0,05	p<0,05	NZ	NZ
EAT+Cis+Sevo													NZ	p<0,05	NZ	NZ
EAT+Halo														NZ	p<0,05	NZ
EAT+Cis+Halo															p<0,05	p<0,05
EAT+Izo																NZ
EAT+Cis+Izo																

4.6.4. Ukupni proteini

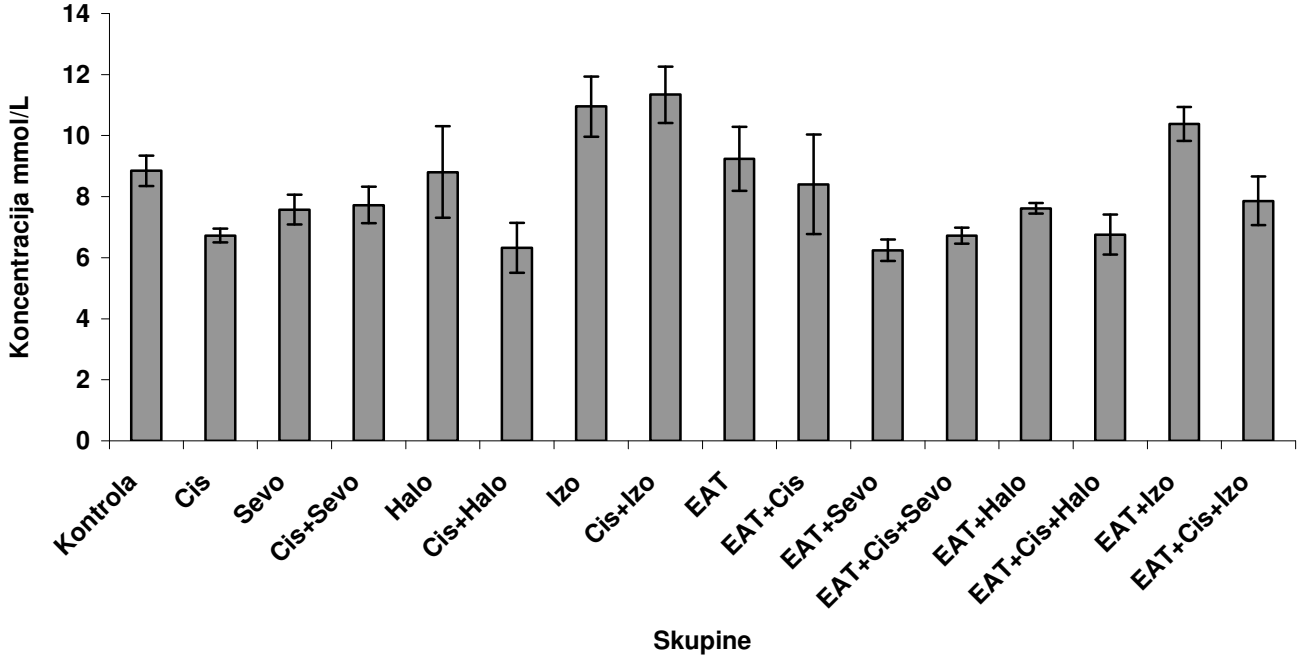


Slika 25. Koncentracija ukupnih proteina u perifernoj krvi Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine. Rezultati su prikazani kao prosječne vrijednosti±SE.

Tablica 19. Statistička analiza rezultata koncentracije ukupnih proteina u perifernoj krvi Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine

	cis	sevo	cis+sevo	halo	cis+halo	izo	cis+izo	EAT	EAT+cis	EAT+sevo	EAT+cis+sevo	EAT+halo	EAT+cis+halo	EAT+izo	EAT+cis+izo
kontrola	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
cis		NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ
sevo			NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
cis+sevo				NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
halo					NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
cis+halo						NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
izo							NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ
cis+izo								NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
EAT									NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
EAT+cis										NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
EAT+sevo											NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
EAT+cis+sevo												NZ	NZ	NZ	NZ
EAT+halo													NZ	p<0,05	NZ
EAT+cis+halo														NZ	NZ
EAT+izo															NZ
EAT+cis+izo															

4.6.5. Urea

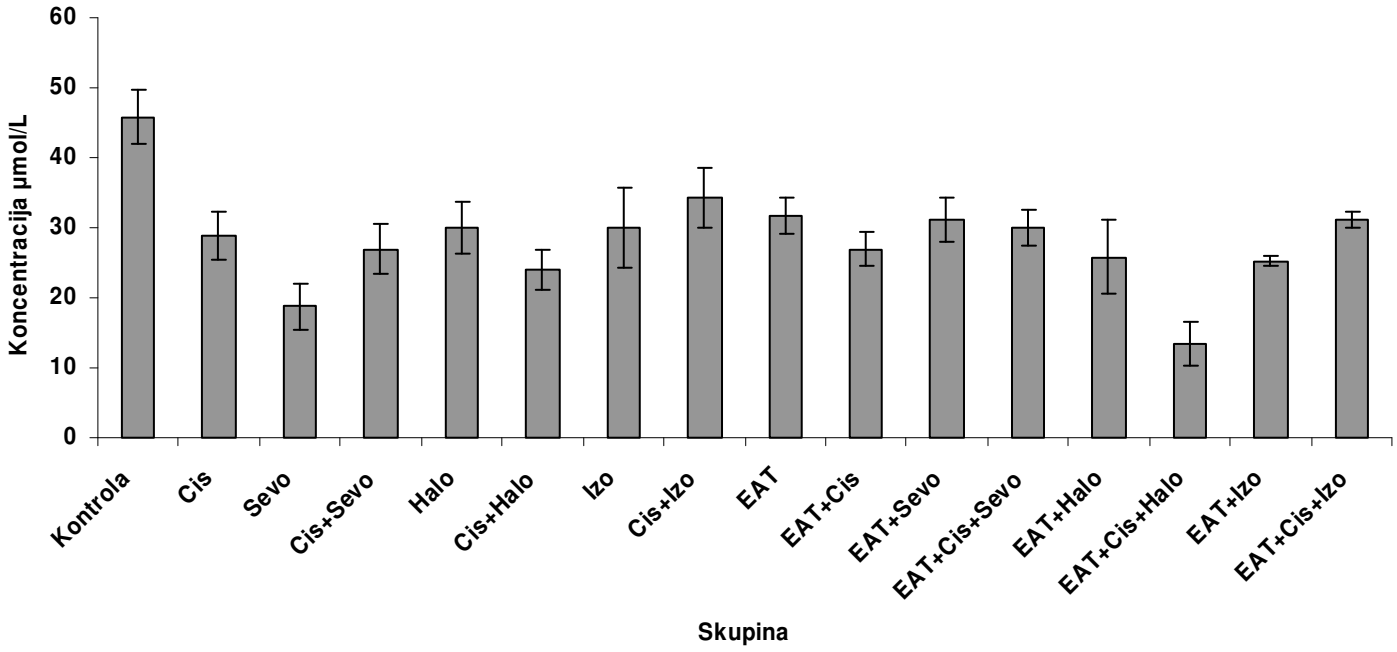


Slika 26. Koncentracija ureje u perifernoj krvi Swiss albino miševa po skupinama izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine. Rezultati su prikazani kao prosječne vrijednosti±SE.

Tablica 20. Statistička analiza rezultata koncentracije ureje u perifernoj krvi Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine

	Kontrola	Cis	Sevo	Cis+Sevo	Halo	Cis+Halo	Izo	Cis+Izo	EAT	EAT+Cis	EAT+Sevo	EAT+Cis+Sevo	EAT+Halo	EAT+Cis+Halo	EAT+Izo	EAT+Cis+Izo
Kontrola		p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Cis			NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Sevo				NZ	NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	Z	NZ	NZ	NZ	NZ
Cis+Sevo					NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Halo						NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Cis+Halo							NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Izo								NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Cis+Izo									NZ	NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
EAT										NZ	NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ	NZ
EAT+Cis											NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ	NZ
EAT+Sevo												NZ	NZ	p<0,05	p<0,05	NZ
EAT+Cis+Sevo													NZ	p<0,05	NZ	NZ
EAT+Halo														NZ	NZ	NZ
EAT+Cis+Halo															p<0,05	p<0,05
EAT+Izo																p<0,05
EAT+Cis+Izo																

4.6.6. Kreatinin



Slika 27. Koncentracija kreatinina u perifernoj krvi Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine. Rezultati su prikazani po skupinama kao prosječne vrijednosti±SE.

Tablica 21. Statistička analiza rezultata koncentracije kreatinina u perifernoj krvi Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine

	Kontrola	Cis	Sevo	Cis+Sevo	Halo	Cis+Halo	Izo	Cis+Izo	EAT	EAT+Cis	EAT+Sevo	EAT+Cis+Sevo	EAT+Halo	EAT+Cis+Halo	EAT+Izo	EAT+Cis+Izo
Kontrola		NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ	NZ
Cis			p<0,05	p<0,05	NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Sevo				NZ	NZ	NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Cis+Sevo					NZ	NZ	p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Halo						NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Cis+Halo							p<0,05	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Izo								NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Cis+Izo									NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
EAT										p<0,05	p<0,05	NZ	p<0,05	NZ	p<0,05	NZ
EAT+Cis											p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	NZ	p<0,05
EAT+Sevo												NZ	p<0,05	NZ	p<0,05	p<0,05
EAT+Cis+Sevo													p<0,05	NZ	p<0,05	NZ
EAT+Halo														NZ	p<0,05	p<0,05
EAT+Cis+Halo															NZ	NZ
EAT+Izo																NZ
EAT+Cis+Izo																

5. RASPRAVA

Inhalacijski anestetici nisu biološki i kemijski inertne tvari. Njihova svakodnevna uporaba u anesteziji bolesnika nameće pitanje njihove toksičnosti prvenstveno za anesteziologe i ostalo osoblje u operacijskim salama, a zatim za bolesnike koji se podvrgavaju anesteziji zbog različitih bolesti. Dosadašnja istraživanja nastojala su ustanoviti genotoksičnost i citotoksičnost inhalacijskih anestetika, međutim rezultati različitih studija često su u suprotnosti. Obzirom na sigurnost rada u operacijskim salama većina istraživanja provedena je na limfocitima periferne krvi osoblja (52,112,113). Dokazan je povećani broj kromosomskih aberacija te povećana izmjena sestrinskih kromatida (28,114,115) zbog djelovanja inhalacijskih anestetika na osoblje u operacijskim salama. Weisner i sur (116) zaključuju da visoka koncentracija inahalacijskih anestetika u operacijskoj sali dovodi do stvaranja mikronukleusa u limfocitima osoblja, dok niska razina zagađenja operacijske sale inhalacijskim anesteticima ne djeluje genotoksično. Da bi se umanjio rizik rada s inhalacijskim anesteticima učinjeni su određeni pomaci te se višak plinova odvodi van iz operacijske sale. Međutim, važno je ustanoviti kako anestetici djeluju na stanice bolesnika koji se često opetovano izlažu djelovanju inhalacijskih anestetika, te da li oštećuju DNK njihovih stanica. Studije na ljudima su teško provodive, uz izuzetak istraživanja na stanicama periferne krvi bolesnika, pa se *in vivo* istraživanja uglavnom provode na životinjama.

Oštećenja prouzročena djelovanjem inhalacijskih anestetika nastaju stvaranjem i djelovanjem slobodnih radikala kisika, drugih slobodnih radikala i vodikovog peroksida. Stanice posjeduju vlastite obrambene mehanizme protiv oksidativnog stresa koji se sastoje od antioksidativnih enzima (glutation, melatonin, Cu_2, Zn_2 i Mn superoksid dizmutaza, katalaza i dr.) i neenzimatskih antioksidansa koji mogu biti uneseni ili sintetizirani u organizmu. Sardas i sur. (117) su alkalnim komet testom dokazali da inhalacijski anestetici izazivaju oksidativni stres i oštećenje DNK. U cilju smanjenja oštećenja DNK osoblje operacijske sale dvanaest tjedana je

uzimalo vitamin E i vitamin C te je nakon toga komet testom ustanovljeno statistički značajno smanjenje duljine repa kometa na limfocitima periferne krvi osoblja.

Genotoksični učinak inhalacijskih anestetika možemo dokazati alkalnim komet testom koji otkriva jednostruke lomove DNK u stanicama koje su izložene djelovanju inhalacijskih anestetika. Jednostavna, brza, relativno jeftina metoda, pokazala se vrlo korisnom za otkrivanje jednostrukih lomova DNK te ukriženih veza uslijed djelovanja neke genotoksične tvari i za utvrđivanje oporavka nakon djelovanja genotoksina. Kretanje DNK u električnom polju je proporcionalno jačini lomova DNK i predstavlja kvantitativnu mjeru jačine genotoksina (118). Metoda je često korištena za dokazivanje genotoksičnog učinka inhalacijskih anestetika (7,31,34,35,43). Istraživanja genotoksičnog učinka inhalacijskih anestetika na životinjama znatno su rjeđa. Citogenetske promjene u stanicama bubrega štakora nakon *in vivo* i *in vitro* izlaganja različitim inhalacijskim anesteticima istraživali su Robbiano i sur. (119) te dokazali genotoksičnost inhalacijskih anestetika.

Obzirom na nedostatak literaturnih podataka o genotoksičnosti i citotoksičnosti inhalacijskih anestetika te kombinacije inhalacijskih anestetika i citostatika cisplatine na različite stanice tkiva i organa koji su u izravnom doticaju s toksičnim metabolitima i nastalim radikalima inhalacijskih anestetika i citostatika naša istraživanja ovog učinka na modelu miša zasigurno su opravdana. Istraživanja na staničnim kulturama i/ili limfociima ljudi ne pokazuju pravu sliku učinka inhalacijskih anestetika i citostatika s obzirom na razlike ljudi po dobi, spolu, životnim uvjetima, životnim navikama i izloženosti stresnim čimbenicima, uzimanju lijekova, po dužini izloženosti i dozi inhalacijskih anestetika. Istraživanje genotoksičnog i citotoksičnog učinka inhalacijskih anestetika i citostatika cisplatine na visokosrodnim miševima u strogo kontroliranim uvjetima; iste starosti, spola, životnih uvjeta, načina prehrane, stalne temperature, jednake doze i dužine izlaganja inhalacijskim anesteticima, te jednake doze injicirane cisplatine, daje potpunu sliku, posebice što dosadašnja istraživanja na staničnim tumorskim kulturama govore da anestetici mogu imati potpuno drugačiji učinak u *in vivo* uvjetima (120).

Naše istraživanje genotoksičnog učinka inhalacijskih anestetika na Swiss albino miševima metodom alkalnog komet testa ukazuje da sva tri inhalacijska anestetika; sevofluran, halotan i izofluran izazivaju oštećenja DNK limfocita periferne krvi, stanica mozga, jetre, bubrega te stanica Ehrlichovog ascitesnog tumora; obrađene stanice pokazuju veću dužinu repa kometa u usporedbi s kontrolom. Stupanj DNK oštećenja ovisan je o istraživanom anestetiku i o vrsti promatranih stanica.

Najjača genotoksična oštećenja pruzročena inhalacijskim anesteticima nastala su na stanicama mozga, posebice nakon ponavljanih anestezija halotanom, nešto manje nakon anestezija sevofluranom, a najmanja oštećenja DNK stanica mozga miševa izaziva izofluran u obje skupine miševa (zdravih i/ili nositelja tumora). Združeni učinak cisplatine i inhalacijskih anestetika pojačava genotoksični učinak sevoflurana i izoflurana, međutim oštećenja stanica mozga zbog združenog učinka cisplatine i halotana su manja nego uslijed djelovanja samog halotana u obje skupine miševa. Genotoksični učinak inhalacijskih anestetika na stanice mozga nije dovoljno istražen. Mozak ima najbrži metabolizam od svih organa u tijelu i prvenstveno ovisi o oksidativnom metabolizmu kao izvoru energije. Oksidativni metabolizam proizvodi reaktivne radikale kisika koji mogu oštetiti mnoge stanične sastojke, uključujući proteine, lipide i nukleinske kiseline. Mehanizam staničnog popravka DNK uobičajeno je vrlo učinkovit u uklanjanju spontano nastalih genetskih oštećenja, ali u oksidativnom stresu ili kod promjenjenih obrambenih sposobnosti organizma dolazi do oštećenja DNK u stanicama mozga (121). Poznato je da sevofluran izaziva epileptiformne poremećaje na elektroencefalogramu mozga djece, uglavnom bez kliničkih manifestacija (122) Marval i sur. (123) dokazali su transkranijalnim Dopplerom da sevofluran smanjuje cerebralni protok krvi. Inhalacijski anestetici smanjuju pobuđivanje sinaptičkog prijenosa signala u stanicama sisavaca. Glutamat je važan ekscitatorni transmiter u mozgu, a prekomjerno nakupljanje vanstaničnog glutamata može dovesti do ozljede živčanih stanica i smrti stanica; primjerice kod cerebralne ishemije. Inhalacijski anestetici

djeluju na mozak sisavaca tako da smanjuju pobuđenost mozga i pojačavaju inhibitorne mehanizme na provodljivost živaca. Izofluran smanjuje kalcijum ovisno otpuštanje glutamata u hipokampusu i u izoliranim živčanim završetcima te povećava ulazak glutamata u sinaptosome. Halotan, izofluran i sevofluran povećavaju ulazak glutamata u astrocite što smanjuje količinu neurotransmitera u sinaptičkoj pukotini i na taj način smanjuje podražljivost živčanih stanica. Moe i sur. (124) dokazali su da sevofluran u ljudskom mozgu smanjuje Ca^{++} ovisno otpuštanje glutamata. Rodier i sur. (125) navode da dušični oksidul i halotan imaju antimitotičku ulogu na tkiva u razvoju, međutim nisu uspjeli dokazati da halotan i dušični oksidul smanjuju proliferaciju stanica mozga miševa, nego samo da smanjuju težinu fetusa in utero. Nekoliko istraživača opisalo je postoperacijske promjene ponašanja nakon anestezije sevofluranom. Keaney i sur. (126) zamjećuju da djeca nakon inhalacijske anestezije sevofluranom imaju jače izražene poremećaje ponašanja nego nakon anestezije halotanom, te da su promjene izraženije kod mlađe djece. Nasuprot njima, Kain i sur. (127) nisu našli povećanu pojavnost poremećaja ponašanja, deliriuma ili poremećaja spavanja nakon anestezije sevofluranom u odnosu na anesteziju halotanom.

Prema ovim podatcima moguće je da su nakupljanje vanstaničnog glutamata te oštećenje živčanih stanica kao i smrt stanica jedan od izvorišta genotoksičnog učinka inhalacijskih anestetika što posljedično vode promjenama u ponašanju jedinki. Štetni učinak glutamata, hipoksije ili moguću nazočnost drugih toksičnih tvari kao i razinu antioksidativnih enzima trebalo bi istražiti da bi mogli potvrditi njihovu ulogu u genotoksičnosti.

Limfociti periferne krvi, stanice mozga, jetre i bubrega (Slike 3-6.) životinja nositelja EAT tumora, imaju znatno veća bazalna oštećenja DNK nego istovrsne stanice životinja bez tumora ($p<0,001$). To je sukladno nalazu Kopjar i sur. (52) koji navode da bolesnici s karcinomom često imaju povećanu kromosomsku nestabilnost u usporedbi sa zdravim ljudima. U njihovom radu zamijećena su veća citogenetska oštećenja limfocita periferne krvi bolesnika koji boluju od neke vrste tumora; uzrok

može biti u oštećenoj sposobnosti oporavka DNK, sama tumorska bolest povezana s većim oštećenjem DNK ili je osjetljivost DNK nositelja tumora veća u odnosu na zdrave ljude.

Od istraživanih inhalacijskih anestetika na limfocite periferne krvi sevofluran je pokazao najjači genotoksični učinak, a na stanice jetre halotan u obje skupine životinja; zdravih i životinja s injiciranim EAT stanicama. Sevofluran i izofluran znatno jače oštećuju stanice bubrega nego halotan u obje skupine životinja (Slika 6., Tablica 5). Združeni učinak cisplatine i inhalacijskih anestetika dovodi do znatno jačeg oštećenja DNK na limfocitima periferne krvi, stanicama jetre i bubrega u obje skupine životinja u odnosu na učinak samih inhalacijskih anestetika. Dobiveni učinak cisplatine s inhalacijskim anesteticima je očekivan zbog citotoksičnosti cisplatine; naši rezultati su potvrda nefrotoksičnog i neurotoksičnog učinka cisplatine. Izravno citotoksično djelovanje cisplatine je očito pojačano s nazočnošću radikala nastalih u međudjelovanju s inhalacijskim anesteticima; nastala oštećenja potvrda su sinergističkog toksičnog djelovanju cisplatine i inhalacijskih anestetika. Naime, poznato je da se antitumorska aktivnost cisplatine temelji na opuštanju dvaju iona Cl^- u vodenoj otopini; otpuštanjem klora u stanici preostaje pozitivno nabijen platina kompleks koji se veže na negativno nabijene molekule u stanici, posebice DNK i RNK, tvoreći bifunkcionalne kovalentne veze što rezultira inhibicijom replikacije i transkripcije DNK. Ujedno dolazi do svaranja monofunkcionalnih adukata na gvaninu, bifunkcionalnih adukata između dva gvanina na jednom lancu DNK, zatim između gvanina i bilo kojeg drugog nukleotida. Također se svaraju adukti između gvanina na komplementarnim lancima te križne veze između DNK, proteina i glutationa. Takve strukturne promjene u uzvojnici DNK uzrokuju blok u G_2 fazi staničnog ciklusa. Sve takve promjene lako se mogu potvrditi komet testom na što ukazuju i naši rezultati, a nastala oštećenja vidljiva su i na tumorskim i na normalnim stanicama koje su u izravnom doticaju s nastalim toksičnim metabolitima cisplatine.

DNK stanica Ehrlich ascitesnog tumora pokazuje najveću osjetljivost na ponavljane anestezije halotanom (Slika 7., Tablica 6.). To je u sukladu sa

istraživanjem Topouzova-Hristova i sur. (128) koji su *in vitro* izlagali halotanu stanice karcinoma pluća A549 te zamijetili jak genotoksični učinak halotana i prisutnost velikog broja mikrokometa nakon elektroforeze što ukazuje na to da se veliki broj oštećenih stanica nakon izlaganja nije oporavio i da podliježe apoptozi. U radu Kvolik i sur. (45) halotan je također pokazao najjači citotoksični i antiproliferacijski *in vitro* učinak na tumorske stanice od svih promatranih inhalacijskih anestetika. Izofluran izaziva manja oštećenja DNK tumorskih stanica od halotana, a najjmanji genotoksični učinak na tumorske stanice ima sevofluran. Baden i sur. (50) u radu na Swiss/Webster miševima zaključuju da izofluran nema karcinogeni učinak i da je netoksičan. Rezultati te studije ne čine se pouzdani obzirom da su miševe izlagali subanestetičkim dozama inhalacijskih anestetika 4 sata dnevno kroz pet tjedana. Vjerojatno su pokušali oponašati uvjete rada osoblja operacijske sale u atmosferi koja sadrži izofluran, ali je ukupno vrijeme izlaganja prekratko da bi se moglo zaključiti da izofluran nema karcinogeni učinak i da nije toksičan.

Zasigurno neki od mogućih uzroka citogenetskih oštećenja tumorskih stanica nakon obrade inhalacijskim anesteticima su smanjena sposobnost popravka DNK, biokemijske i metaboličke osobitosti tumorskih stanica, smanjena razina sinteze glutationa i njemu pridruženih enzima (129).

Združeni genotoksični učinak cisplatine i inhalacijskih anestetika na EAT stanice je manji od pojedinačnog genotoksičnog učinka inhalacijskih anestetika. Otpornost tumorskih stanica do koje dolazi u kombinaciji cisplatine i inhalacijskih anestetika može biti posredovana brojnim čimbenicima; detoksikacijom cisplatine, stvaranjem nekog trećeg spoja koji ima slabiji genotoksični učinak, poremećajem u regulaciji enzima, prejako izraženim antiapoptotičkim proteinima poput bcl-2 ili detoksifikacijskih enzima, primjerice glutation S-Transferaza GST-π. GST-π je smještena na kromosomu 11q13 i član je obitelji izozima koji igraju važnu ulogu u detoksikaciji mnogih ksenobiotika konjugacijom glutationa (130,131). Glutation i neki drugi posrednici glutation ovisnog metaboličkog puta imaju važnu ulogu u određivanju stanične osjetljivosti na terapiju cisplatinom. Možda je viša razina

glutationa ili neki drugi mehanizam otpornosti tumorskih stanica glavni razlog za manje oštećenje EAT stanica pri kombiniranom učinku cisplatine i inhalacijskih anestetika. Glutation također ima važnu ulogu u zaštiti stanica i od drugih potencijalno toksičnih molekula, kao što su slobodni radikali kisika koji se stvaraju pri izlaganju inhalacijskim anesteticima. Točan mehanizam otpornosti EAT stanica na združeno djelovanje cisplatine i inhalacijskih anestetika potrebno je bolje istražiti, posebice razinu glutationa i popratnih enzima obzirom da je moguće da su nakon višekratne obrade stanica EAT tumora s cisplatinom preživjele stanice otporne na cisplatinu odnosno stanice s povećanom sintezom glutationa.

Mikronukleus test također omogućuje osjetljivu procjenu oštećenja molekule DNK uslijed djelovanja inhalacijskih anestetika i cisplatine. Eritrociti su stanice pogodne za procjenu oštećenja DNK obzirom da su njihove preteče brzo proliferirajuća populacija stanica. Mikronukleusi stvoreni u eritroblastima u koštanoj moždini mogu se naći u perifernoj krvi miševa. Oni nastaju uslijed lomova kromosoma i kondenzacije acentričnih kromosomskih ulomaka ili kromosoma zaostalih u anafazi (85). Prisutnost mikronukleusa pokazatelj je postojanja aberacija u prethodnoj diobi stanice, te se stoga učestalost mikronukleusa može koristiti kao kvantitativna mjera strukturnih i numeričkih aberacija kromosoma u stanicama pod utjecajem različitih genotoksičnih tvari (84,89). Mikronukleus test brži je i jednostavniji od analize strukturnih aberacija kromosoma, podjednako je osjetljiv u otkrivanju oštećenja diobenog vretena i aberacija kromosoma, te je uključen u standardnu "bateriju" testova genotoksičnosti.

Mikronukleus testom uočili smo da je injiciranje cisplatine uzrokovalo oštećenja eritroblasta i retikulocita, uslijed čega na preparatima periferne krvi životinja koje su obrađene cisplatinom nije bio dovoljan broj retikulocita za analizu. Od primijenjenih inhalacijskih anestetika halotan je pokazao najjači genotoksični učinak na retikulocite periferne krvi obzirom da retikulociti miševa koji su opetovano anestezirani halotanom imaju najveći broj mikronukleusa u obje skupine miševa (Slika 9.). To je u sukladu s nalazom Robbiana i sur. (119) koji su dokazali povećani broj mikronukleusa na stanicama bubrega štakora nakon izlaganja halotanu,

sevofluranu i izofluranu. Halotan je potaknuo stvaranje najvećeg broja mikronukleusa kao i u našem istraživanju, te je doveo do inhibicije stanične proliferacije. U skupini Swiss albino miševa s injiciranim tumorskim stanicama mikroskopskom analizom našli smo veći broj mikronukleusa u retikulocitima periferne krvi u odnosu na kontrolnu skupinu, ali ne statistički značajno (Tablica 7.). Ovi podatci ukazuju da nazočnost tumora te nazočnost brojnih čimbenika koje luče stanice tumora narušava čitavu hematopoezu i vodi svaranju oštećenih hematopoetskih stanica.

Brojanjem živih tumorskih stanica u ascitesu Swiss albino miševa ustanovili smo citotoksičnost cisplatine, sevoflurana, halotana, izoflurana, te združenog učinka cisplatine i pomenutih inhalacijskih anestetika. Osim toga, obilježavanjem tumorskih stanica aneksinom V i propidijskim jodidom te analizom protočnim citometrom utvrdili smo postotak apoptotičkih i nekrotičnih EAT stanica, te ukupan broj mrtvih tumorskih stanica u ascitesu trbušne šupljine miševa po skupinama nakon obrade (Slike 10,12,13,14).

Aravindan i sur. (132) dokazuju da anestetici mijenjaju prijenos apoptotičkog signala u različitim tkivama. Sevofluran i izofluran izazivaju *in vitro* apoptozu limfocita periferne krvi ovisno o dozi i vremenu izlaganja. Iako se rezultati studije *in vitro* teško mogu prenijeti na kliničke uvjete, čini se da bi to mogao biti razlog smanjenja broja limfocita (36). Loop i sur. uočili su da sevofluran i izofluran uzrokuju apoptozu T limfocita ovisno o dozi. Signalni put aktivacije apoptoze stanica T temelji se na poremećaju potencijala mitohondrijske membrane i otpuštanju citokroma c iz mitohondrija u citosol. Nakon toga, dolazi do proteolitičke aktivacije inaktivne prokaspaze 3 u aktivni oblik. Porast aktivnosti kaspaze 3 vodi apoptozi stanica T (37). Delogu i sur. (133) zamijetili su povećanu pojavnost apoptoze u kulturi $CD4^+$ i $CD8^+$ limfocita uzetih od bolesnika 24 h nakon anestezije izofluranom i fentanilom. U ovom pokusu nejasno je koliko apoptozi limfocita T pridonosi stres zbog same operacije i kirurški zahvat te se čini da pokusi na životinjama koje su anesteziranе bez operacije mogu dati pravi odgovor na ovo važno pitanje. Thyler i sur. (38) su na

neurofilima štakora uočili da izofluran u kliničkim koncentracijama inhibira apoptozu neutrofila. Za razliku od njih Eckenhoff i sur. (134) dokazuju da izofluran povećava oligomerizaciju amiloid β proteina (engl. Amyloid β protein; Aβ) i citotoksičnost u stanicama feokromocitoma. Xie i sur. (135) nalaze da izofluran izaziva apoptozu, mijenja protein prekursor amiloida (engl. Amyloid precursor protein; APP) i povećava stvaranje Aβ u H4 ljudskim neuroglioma stanicama što se može povezati s poslijeoperacijskim poremećajima ponašanja. Obzirom da promijenjeno stvaranje APP-a dovodi do nakupljanja Aβ proteina, što predstavlja glavni poremećaj u Alzheimerovoj bolesti, to ukazuje na potrebu pravilnog odabira kao i primjene inhalacijskih anestetika kod tih bolesnika te kod starijih bolesnika kod kojih postoji povećan rizik od poslijeoperacijskih poremećaja ponašanja.

Raznolikost rezultata pojedinih istraživanja vjerojatno proizilazi iz različitih doza i vremena izlaganja izofluranu te vrsta stanica koje su izložene djelovanju inhalacijskih anestetika. Wei i sur. (136) uočili su da izofluran, ali ne i sevofluran, izaziva apoptozu otpuštanjem kalcijuma iz endoplazmatskog retikuluma neurona. Stanice PC12 feokromocitoma štakora i primarni kortikalni neuroni su izlagani ekvipotentnim dozama izoflurana i sevoflurana. Nakon 24-satnog izlaganja izofluran je djelovao citotoksično na oba tipa stanica, pojavila se nuklearna fragmentacija i aktivacija kaspaze 3 i kaspaze 9, a odnos Bcl-2/Bax smanjio se za 36%.

Citotoksičnost inhalacijskih anestetika na stanice tumora proučavali su Kvolik i sur. (45). Dokazali su da sevofluran, izofluran i halotan djeluju citotoksično na stanice ljudskog karcinoma kolona (Caco-2), karcinoma larinksa (Hep-2), karcinoma gušterače (MIA, PaCa-2), na slabo diferencirane stanice iz metastaza karcinoma kolona u limfnim čvorovima (SW-620) i na normalne fibroblaste. Halotan od svih inhalacijskih anestetika najviše usporava rast stanica i dovodi do apoptoze stanica. Ovaj podatak podudara se s rezultatima našeg istraživanja.

Brojanjem živih tumorskih stanica u ascitesu trbušne šupljine miševa nađen je najmanji broj živih EAT stanica u ascitesu miševa opetovano anesteziranih halotanom, nešto veći broj živih stanica nalazi se u ascitesu nakon ponavljanog

izlaganja sevofluranu, a izofluran statistički značajno ($p<0,05$) povećava rast tumorskih stanica u odnosu na kontrolnu skupinu. Najmanji broj živih stanica tumora uočen je u skupinama životinja injiciranih intraperitonealno s cisplatina ($p<0,05$) u odnosu na kontrolu, kao i u skupini životinja anesteziranih halotanom ($p<0,05$). Kombinacije cisplatine i inhalacijskih anestetika pojačavaju citotoksičnost sevoflurana, halotana i izoflurana. Promatrajući učinak sevoflurana, halotana i izoflurana obzirom na mehanizam stanične smrti možemo zaključiti da sevofluran i halotan izazivaju apoptozu u oko 10% tumorskih stanica, dok se u skupini miševa koje smo izlagali ponavljanim anestezijama izofluranom apoptoza javlja u nešto manjem postotku stanica. Halotan dovodi do nekroze nešto većeg broja EAT stanica nego sevofluran, a izofluran izaziva najmanji postotak nekrotičnih stanica od svih inhalacijskih anestetika. U skupinama miševa koji su opetovano anestezirani sevofluranom i halotanom ima oko 18% ukupno mrtvih tumorskih stanica, a u skupini miševa anesteziranih izofluranom oko 10% ukupno mrtvih stanica.

Združeni učinak cisplatine s inhalacijskim anesteticima statistički značajno povećava citotoksičnost inhalacijskih anestetika na stanice tumora (cis+sevo $p<0,05$; cis+halo $p<0,05$; cis+izo $p<0,05$) u odnosu na pojedinačne anestetike (Slika 14). Najjači citotoksični učinak na EAT stanice prema očekivanju ima ciplatina. Cisplatina izaziva staničnu smrt tumorskih stanica uglavnom mehanizmom apoptoze; nakon obrade cisplatinom oko 40% tumorskih stanica je apoptotično, a 12% nekrotično. Podaci ukazuju da je obzirom na citotoksičnost inhalacijskih anestetika na stanice EAT tumora najbolji inhalacijski anestetik halotan; halotan primijenjen u kliničkim dozama izaziva smrt najvećeg broja tumorskih stanica.

Citotoksičnosti halotana zasigurno doprinose metabolički putevi halotana putem oksidacijskih i redukcijskih enzima citokroma P-450 (CYP2A6 i CYP3A4) koji dovode do stvaranja reaktivnih metabolita kao što su nestabilni slobodni radikali, klorodifloroeten i klorotrifloroetan, te anorganski floridi koji uzrokuju lipidnu peroksidaciju stanica. Lipidna peroksidacija je specifična za halotan i ne uočava se kod enflurana, izoflurana ili desflurana, a CYP2A6 je katalizator lipidne peroksidacije u jetrenim liposomima ljudi (4). Reduktivni

metabolički put halotana neki autori smatraju odgovornim za izazivanje umjerenog halotanskog hepatitisa. Primjenom kirurške anestezije prevladava oksidacijski metabolizam u kojem su dva izozima citokroma P-450, 2E1 i 2B4 odgovorna za oksidativni metabolizam halotana u trifloroctenu kiselinu. Konačni proizvodi oksidacije mogu se dokazati u urinu, a to su: natrijeva sol trifloroctene kiseline, ioni klora i ioni broma. Metaboličku razgradnja halotana uzrokuje oštećenja jetre, a zasigurno i tumorskih stanica koje zbog svojih biokemijskih i metaboličkih osobitosti kao i smanjene sinteze glutationa mogu biti osjetljivije na toksični učinak halotana.

Nadalje, višekratna primjena cisplatine, sevoflurana, halotana i izoflurana nije prouzročila promjene u broju eritrocita u perifernoj krvi miševa, kao ni promjene u koncentraciji hemoglobina u krvi (Slika 15. i Slika 16.).

Leukociti su najvažnije stanice upalnog i imunosnog odgovora; uključuju neutrofile, monocite, eozinofile, bazofile, T i B limfocite. Sve vrste leukocita potječu iz zajedničke matične stanice koštane srži. Sazrijevanje leukocita u koštanoj srži je pod kontrolom i regulacijom brojnih čimbenika koji potiču rast i diferencijaciju stanica. Poremećaj na bilo kojem mjestu leukocitnog životnog ciklusa može dovesti do disfunkcije i ugrožavanja obrane domaćina. Uzroci neutropenije su mnogostruki; u svezi su s potisnutom proizvodnjom leukocita, oštećenjem neutrofilnih stanica i perifernim nakupljanjem neutrofila. Najčešće su jatrogene neutropenije koje nastaju zbog uporabe citotoksičnih i imunosupresijskih lijekova. Citotoksični lijekovi dovode do smanjene proizvodnje brzo rastućih matičnih stanica koštane srži, ili metaboliti lijekova služe kao imunološki hapteni koji vezujući se na neutrofile potiču imunološki posredovano oštećenje neutrofila. Citostatici nespecifično inhibiraju razvoj svih diobeno aktivnih stanica pa tako i leukocita vodeći leukopeniji što posljedično vodi smanjenoj otpornosti domaćina na infekcije te vodi razvoju brojnih bolesti.

Inhalacijski anestetici djeluju na imunosni sustav bolesnika te su opisane limfocitopenije nakon inhalacijske anestezije, koje posljedično mogu uzrokovati kliničke probleme i odgođeni oporavak nakon operacije. Oka i sur. (137) izvještavaju

da je broj limfocita kod bolesnika prvi i četvrti dan nakon anestezije izofluranom i dušičnim oksidulom smanjen za oko 60-70% u odnosu na početne vrijednosti. Morisaki i sur. (41) uočili su da ukupan broj leukocita bolesnika nakon anestezije sevofluranom ostaje isti, dok se broj cirkulirajućih limfocita značajno povećava, a broj neutrofila smanjuje.

Rezultati našeg istraživanja upućuju na to da je ukupni broj leukocita u skupini miševa s injiciranim EAT stanicama viši nego u kontrolnoj skupini životinja bez nazočnosti tumora (Slika 17.); što ukazuje na stvaranje imunosnog odgovora na antigene stanica tumora. Cisplatina kod zdravih miševa snižava ukupni broj leukocita; postotak neutrofilnih leukocita i limfocita u perifernoj krvi. Halotan i izofluran smanjuju broj leukocita u perifernoj krvi miševa, a kombinacija cisplatine i halotana dovodi do najjače leukopenije i neutropenije (Slika 17. i 18.) kod zdravih miševa i miševa s injiciranim tumorskim stanicama ($p<0,05$) u odnosu na kontrolu. Halotan najviše smanjuje postotak neutrofila od promatranih inhalacijskih anestetika u obje skupine miševa, izofluran nešto manje, a sevofluran ne mijenja postotak neutrofila.

Nakon ponavljanih injiciranja cisplatine prema Tablici 1. smanjuje se postotak limfocita u odnosu na ukupni broj leukocita u obje skupine miševa; zdravi i miševi s EAT stanicama. Ponavljane anestezije sevofluranom, halotanom i izofluranom ne mijenjaju značajno postotak limfocita u perifernoj krvi, ali združeni učinak inhalacijskih anestetika i cisplatine značajno smanjuje postotak limfocita u perifernoj krvi miševa (Slika 19.).

U skupinama miševa injiciranih cisplatinom postotak monocita je povećan na račun već prije pomenutog smanjenja broja neutrofilnih leukocita i limfocita. U usporedbi s kontrolom ponavljane anestezije sevofluranom ($p<0,05$), halotanom ($p<0,05$) i izofluranom ($p<0,05$) smanjuju postotak monocita u perifernoj krvi miševa, a združeni učinak cisplatine s halotanom kod zdravih miševa te cisplatina i izofluran kod miševa s EAT stanicama povećavaju broj monocita. Rezultati ukazuju da makrofagi kao prva i zadnja linija obrane domaćina uspješnije preživljavaju u

nastalim upalnim uvjetima nakon oštećenja tkiva i stanica prouzročenim reaktivnim radikalima citostatika i inhalacijskih anestetika. Nakon tkivne upale započinje snažan povratni mehanizam u kojem se stvaraju obrambeni leukociti, a aktivirani monocitno-makrofagni sustav konačno uklanja posljedice upale.

U literaturi se često navodi da velike operacije u općoj anesteziji mijenjaju imunosni odgovor bolesnika; mijenja se broj i funkcija leukocita, limfocita i neutrofila Zbog promijenjenog imunosnog odgovora povećava se mogućnost komplikacija u perioperacijskom periodu; mogućnost nastanka infekcije, neadektvatni odgovor na stres, hiperkatabolizam, povećani tumorski rast i sl. Bolesnik u dobroj općoj kondiciji koji se podvrgava elektivnoj operaciji obično se brzo opravlja u ovom kritičnom periodu, međutim bolesnik koji otprije ima neki imunosni poremećaj, malignu bolest ili neku drugu bolest može imati ozbiljne kliničke probleme, naročito ako u perioperacijskom periodu prima lijekove koji suprimiraju imunosni odgovor, primjerice citostatike. Schneemilch i sur. (138) navode da je učinak inhalacijskih anestetika na imunosne funkcije prolazan i ovisan o dozi inhalacijskog anestetika, da inhalacijski anestetici inhibiraju funkciju neutrofila, suprimiraju proliferaciju limfocita te povećavaju proupalne citokine. Našim istraživanjem dokazali smo da inhalacijski anestetici mijenjaju broj leukocita i postotak neutrofila, limfocita i monocita u krvi miševa, a združeni učinak inhalacijskih anestetika i cisplatine još više mijenja hematološke parametre te slabi imunosni odgovor. Pravi uvid u imunosupresiju i oporavak hematoloških i imunoloških parametara zahtjeva praćenje ovih odrednica kroz duži vremenski period praćenjem njihove funkcionalne sposobnosti u stvaranju imunosnog odgovora.

Poremećaj funkcije jetre nakon anestezije inhalacijskim anesteticima ovisan je o protoku krvi kroz jetru za vrijeme anestezije, o povećanoj koncentraciji kalcija te o količini metabolita koji nastaju metabolizmom inhalacijskih anestetika. Halotan izaziva gubitak autoregulacije protoka krvi kroz hepatalnu arteriju te protok postaje ovisan o sistemskom arterijskom tlaku. Na taj način smanjuje se protok krvi kroz jetru i posljedično tome opskrba kisikom. Neki istraživači nalaze da anestezija

sevofluranom i izofluranom ne dovodi do promjena u protoku krvi kroz jetru kod ljudi, ne nalaze povišenu koncentraciju kalcija u krvi kod anestezije sevofluranom, dok je koncentracija kalcija nakon anestezije izofluranom niža nego kod anestezije halotanom (139). Crawford i sur. (140) u svom istraživanju na štakorima zamijetili su da se protok krvi kroz hepatalnu arteriju povećava za oko 70% za vrijeme anestezije sevofluranom, bez značajnog smanjenja protoka krvi u portalnom krvotoku, dok se protok krvi kroz jetru za vrijeme anestezije halotanom smanjuje za 16%. Serumske koncentracije AST-a i ALT-a osjetljivi su marker i predstavljaju "zlatni standard" za analizu oštećenja jetre koje je uzrokovano inhalacijskim anesteticima. Topal i sur. (71) zaključuju da visoke vrijednosti jetrenih enzima upućuju na centrolobularnu nekrozu jetre. Oni su u svom istraživanju na psima anesteziranim halotanom, sevofluranom i izofluranom našli povećane koncentracije AST-a, ALT-a i GGT-a nakon sve tri vrste anestezije. Najviše vrijednosti jetrenih enzima nađene su nakon anestezije halotanom, znatno niže vrijednosti nakon sevoflurana i izoflurana. Ipak, kliničkih znakova hepatitisa nije bilo ni u jednoj skupini pasa. Slične rezultate našli su Nishiyama i sur. (141) kod bolesnika anesteziranih sevofluranom i izofluranom; u izofluranskoj skupini nađene su povišene vrijednosti AST-a, ALT-a i glutamil transpeptidaze (GTP); koncentracije ureje i kreatinina ostale su nepromijenjene. U našem istraživanju ponavljane anestezije sevofluranom, halotanom i izofluranom nisu značajno utjecale na koncentraciju AST-a i ALT-a u krvi zdravih miševa što nas navodi na zaključak da u primijenjenim pokusnim uvjetima sevofluran, halotan i izofluran nisu hepatotoksični. Od promatranih inhalacijskih anestetika ponavljane anestezije izofluranom povećale su koncentraciju ureje u krvi, ali nismo uočili povišenje koncentracije kreatinina u krvi uslijed djelovanja inhalacijskih anestetika (Slika 25. i Slika 26.).

Hepatotoksičnost cisplatine javlja se kod primjene visokih doza. U istraživanju Lu i sur. (142) doza cisplatine 45mg/kg dovela je do oštećenja jetre miševa. Zamijetili su da se zbog djelovanja cisplatine pokreću mnogi stanični putevi koji igraju važnu ulogu u indukciji oksidativnog stresa, koji onda preko CYP2E1 (poznati

bioaktivator mnogih hepatotoksina) izaziva oštećenje jetre. Nefrotoksičnost cisplatine je češća komplikacija od hepatotoksičnosti kod kliničke uporabe cisplatine. Niže doze cisplatine (10 mg/kg) uzrokuju nefrotoksičnost, ali ne hepatotoksičnost kod miševa. Smatra se da cisplatina izaziva otpuštanje željeza iz molekule hema stanica bubrega, stvaraju se slobodni radikali kisika koji oštećuju stanice bubrega. Mnoga istraživanja dokazala su posredovanje CYP2E1 u nefrotoksičnosti cisplatine (143). Visoke doze cisplatine djeluju hepatotoksično i povećavaju lipidnu peroksidaciju, međutim čini se da oštećenje jetre koje se javlja kod primjene visokih doza cisplatine ne nastaje zbog povećane koncentracije željeza podrijetlom iz hema hepatocita, nego zbog povećane ekspresije CYP2E1. Uobičajeno se kod terapije cisplatinom kontrolira funkcija bubrega, međutim na poremećaj funkcije jetre se obraća mnogo manje pažnje.

Analizom rezultata našeg istraživanja uočili smo da miševi s injiciranim tumorskim stanicama imaju više vrijednosti AST-a i ALT-a u krvi. Cisplatina kod zdravih miševa neznatno povećava AST i ALT, dok kod miševa s EAT stanicama značajnije povećava AST i ALT ($p<0,05$) u odnosu na kontrolu. Ponavljane anestezije halotanom djeluju hepatotoksično na miševe s EAT stanicama, a združeni učinak cisplatine i halotana najviše oštećuje stanice jetre ($p<0,05$) kod obje skupine miševa (zdravi i miševi s tumorom); vrijednosti AST-a i ALT-a u krvi miševa više su nego nakon pojedinačnog učinka cisplatine i halotana. Sevofluran i izofluran nemaju hepatotoksični učinak na zdrave miševe, niti na miševe s injiciranim tumorskim stanicama (Slika 22. i Slika 23.). Cisplatina nije dovela do promjena u koncentraciji uree i kreatinina u krvi miševa. Obzirom da su primjenjene doze cisplatine u našem istraživanju (5 mg/kg) znatno niže od doza koje su primjenili Lu i sur. (142), cisplatina nije uzrokovala oštećenje bubrega u zdravih miševa. Kod miševa s injiciranim EAT stanicama cisplatina također nije dovela do poremećaja funkcije bubrega, međutim povišen AST i ALT ukazuju na oštećenje jetre nakon injiciranja cisplatine. Združeni učinak cisplatine i halotana oštećuje funkciju jetre te bi daljnja istraživanja trebalo usmjeriti na pronalaženje mehanizma na koji cisplatina i

inhalacijski anestetici djeluju na stanice jetre i međusobno pojačavaju djelovanje. Od promatranih inhalacijskih anestetika jedino ponavljane anestezije izofluranom podižu koncentraciju ureje u krvi kod obje skupine miševa, a koncentracija kreatinina niti u jednoj promatranoj skupini nije povišena.

Miševi s injiciranim EAT stanicama imaju manje vrijednosti AF u krvi nego zdravi miševi. Ponavljane anestezije sevofluranom i izofluranom smanjuju, a cisplatina i halotan ne mijenjaju koncentraciju AF u krvi. Uočene promjene nisu od kliničkog značaja.

U plazmi postoje tri glavne vrste proteina; albumini, globulini i fibrinogen. Najvažnija uloga albumina je održavanje koloidno-osmotskog tlaka, globulini vrše mnoge enzimske funkcije u samoj plazmi i sudjeluju u imunološkim procesima, a fibrinogen ima važnu ulogu u zgrušavanju krvi. Albumini i fibrinogen, kao i 50% globulina sintetiziraju se u jetri tako da koncentracija proteina u krvi odražava i funkciju jetre. Određivanje koncentracije ukupnih proteina u plazmi vrlo je važno za procjenu metabolizma, jer proteini sudjeluju u svim važnim fiziološkim funkcijama; smanjena koncentracija ukupnih proteina u plazmi povećava mogućnost infekcije, usporava cijeljenje rane, dovodi do stvaranja edema i izaziva poremećaje zgrušavanja krvi. Analizom dobivenih rezultata uvidjeli smo da miševi s injiciranim tumorskim stanicama imaju nižu koncentraciju ukupnih proteina od zdravih miševa (Slika 24.), a ponavljane anestezije halotanom još više snižavaju ukupne proteine kod životinja s tumorom ($p<0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu. Sevofluran i izofluran ne dovode do klinički značajnih promjena koncentracije ukupnih proteina.

Ovim istraživanjem nastojali smo razjasniti neka važna pitanja vezana uz toksičnost inhalacijskih anestetika i njihove međureakcije s cisplatinom. Ustanovili smo da inhalacijski anestetici imaju genotoksični i citotoksični učinak na normalne i tumorske stanice te da potiču proces apoptoze u tumorskim stanicama. Združeni učinak inhalacijskih anestetika i citostatika proizvodi oštećenja ovisna o vrsti stanica i o inhalacijskom anestetiku. Naši rezultati upućuju na potrebu daljnjih istraživanja vezano uz genotoksičnost i citotoksičnost inhalacijskih anestetika, kao i njihove

međureakcije s nekim drugim citostaticima koji su u svakodnevnoj upotrebi kod bolesnika s malignim bolestima. Također je potrebno bolje proučiti mehanizam na koji dolazi do pojačavanja ili slabljenja učinka citostatika na tumorske stanice zbog međureakcije s anesteticima.

Buduća istraživanja bilo bi korisno usmjeriti na analizu popravaka DNK nakon ponavljanih anestezija inhalacijskim anesteticima i združenog djelovanja s citostaticima metodama komet testa i nekim drugim citogenetičkim testovima (strukturne aberacije kromosoma, izmjene sestrinskih kromatida, mikronukleus test i dr.) kao i pratiti mogućnost nastanka posljedica vidljivih tek kroz duži vremenski period.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovi *in vivo* istraživanja genotoksičnog i citotoksičnog učinka inhalacijskih anestetika sevoflurana, halotana i izoflurana, citostatika cisplatine, te združenog učinka inhalacijskih anestetika i cispatine možemo zaključiti slijedeće:

1. Sevofluran, halotan i izofluran izazivaju oštećenja DNK limfocita periferne krvi, stanica mozga, jetre, bubrega te stanica Ehrlichovog ascitesnog tumora.
2. Najjača genotoksična oštećenja prouzročena inhalacijskim anesteticima nastala su na stanicama mozga, posebice nakon ponavljanih anestezija halotanom, nešto manja nakon ponavljanih anestezija sevofluranom, a najmanja nakon ponavljanih anestezija izofluranom.
3. Od istraživanih inhalacijskih anestetika na limfocite periferne krvi sevofluran je pokazao najjači genotoksični učinak, a na stanice jetre halotan. Sevofluran i izofluran znatno jače oštećuju DNK stanica bubrega od halotana.
4. Limfociti periferne krvi, stanice mozga, jetre i bubrega miševa s injiciranim tumorskim stanicama imaju znatno veća bazalna oštećenja DNK nego istovrsne stanice životinja bez tumora.
5. Združeni učinak cisplatine i inhalacijskih anestetika dovodi do znatno jačeg oštećenja DNK limfocita periferne krvi, stanica jetre i bubrega u odnosu na učinak samih inhalacijskih anestetika.
6. DNK stanica Ehrlichovog ascitesnog tumora pokazuje najveću osjetljivost na ponavljane anestezije halotanom.
7. Kombinacija cisplatine i inhalacijskih anestetika ima manji genotoksični učinak na stanice tumora u odnosu na pojedinačni učinak inhalacijskih anestetika.

8. Od istraživanih inhalacijskih anestetika anestezije halotanom uzrokovale su stvaranje najvećeg broja mikronukleusa u retikulocitima periferne krvi miševa.
9. Anestezija halotanom i sevofluranom smanjuje broj živih EAT stanica u ascitesu miševa u odnosu na kontrolu dok anestezija izofluranom povećava rast stanica tumora
10. Cisplatina izaziva apoptozu u oko 40% tumorskih stanica, a halotan i sevofluran u 10% tumorskih stanica. Združeni učinak cisplatine i inhalacijskih anestetika povećava broj ukupno mrtvih stanica u ascitesu miševa.
11. Ukupni broj leukocita u skupini miševa s injiciranim EAT stanicama viši je nego kod zdravih miševa. Cisplatina snižava ukupni broj leukocita te postotak neutrofilnih leukocita i limfocita u perifernoj krvi. Halotan i izofluran smanjuju broj leukocita u perifernoj krvi, a kombinacija halotana i cisplatine dovodi do najjače leukopenije i neutropenije.
12. Halotan sam i/ili združen s cisplatinom djeluju hepatotoksično.

7. SAŽETAK

Genotoksični i citotoksični učinak inhalacijskih anestetika i cisplatine na zdrave i stanice Ehrlich ascites tumora u Swiss albino miševa

Istražili smo genotoksični i citotoksični učinak inhalacijskih anestetika sevoflurana, halotana i izoflurana, citostatika cisplatine te združeni učinak inhalacijskih anestetika i cisplatine na zdrave stanice Swiss albino miševa te zdrave i tumorske stanice miševa nositelja Ehrlich ascitesnog tumora (EAT) na temelju kvantitativnih pokazatelja molekularnih i staničnih oštećenja kao i kliničkih biokemijskih i hematoloških pokazatelja. Cilj istraživanja bio je ustanoviti da li združeno djelovanje inhalacijskih anestetika i cisplatine pojačava ili slabi njihov pojedinačni učinak na limfocite periferne krvi, stanice jetre, bubrega, mozga te stanice Ehrlich ascitesnog tumora i koji od navedenih inhalacijskih anestetika kod višekratnih anestezija ima najmanju toksičnost na zdrave stanice te povećanu toksičnost na stanice tumora.

Miševe smo podijelili u dvije skupine; zdrave miševe te miševe nositelje tumora (injicirane intraperitonealno (i.p.) s 2 X 10^6 stanica EAT). Stanice EAT održavali smo u Swiss albino miševima serijskim presađivanjem stanica i.p. u trbušnu šupljinu miša u periodu od 7-9 dana u obliku ascitesa. Obje skupine miševa podijelili smo u osam podskupina ovisno o tome da li smo ih opetovano anestezirali sevofluranom, halotanom ili izofluranom, te da li smo im injicirali intraperitonealno cisplatinu.

Upite na postavljene ciljeve razjasnili smo rabeći slijedeće metode: komet test, mikronukleus test, analizu postotka tumorskih stanica u apoptozi i nekrozi, određivanje broja živih i mrtvih tumorskih stanica u peritonealnoj tekućini, te određivanje hematoloških i biokemijskih odrednica krvi pokusnih životinja.

Rezultati komet testa pokazuju da sva tri inhalacijska anestetika izazivaju oštećenja DNK limfocita periferne krvi, stanica mozga, jetre, bubrega te Ehrlich ascitesnih tumorskih stanica. Najjača genotoksična oštećenja prouzročena inhalacijskim anesteticima vidljiva su na stanicama mozga, posebice nakon ponavljanih anestezija halotanom. Sevofluran ima najjači genotoksični učinak na limfocite periferne krvi, a halotan na stanice jetre. Sevofluran i izofluran znatno jače oštećuju DNK stanica bubrega od halotana. Limfociti periferne krvi, stanice mozga, jetre i bubrega miševa s injiciranim tumorskim stanicama imaju znatno veća bazalna oštećenja DNK nego istovrsne stanice životinja bez tumora. DNK stanica Ehrlich ascitesnog tumora pokazuje najveću osjetljivost na ponavljane anestezije halotanom.

Kombinacija cisplatine i inhalacijskih anestetika ima znatno jači genotoksični učinak na limfocite periferne krvi, stanice jetre i bubrega u odnosu na učinak samih inhalacijskih anestetika, međutim kombinacija cisplatine i inhalacijskih anestetika ima manji genotoksični učinak na EAT stanice u odnosu na pojedinačni učinak sevoflurana, halotana ($p<0,01$) i izoflurana ($p<0,05$). Nadalje, anestezije halotanom prouzročile su najveći broj mikronukleusa u retikulocitima periferne krvi miševa. Višekratna anestezija halotanom i sevofluranom smanjuju broj živih EAT stanica u ascitesu miševa u odnosu na kontrolu, dok anestezija izofluranom pospješuje rast stanica tumora. Smrt stanica prouzročena cisplatinom temelji se na procesu apoptoze u oko 40% stanica tumora, dok anestezija halotanom i sevofluranom potiče apoptozu u 10% stanica tumora. Združeni učinak cisplatine i inhalacijskih anestetika povećava broj ukupno mrtvih stanica u ascitesu miševa. Halotan i izofluran smanjuju broj leukocita u perifernoj krvi, a kombinacija halotana i cisplatine dovodi do najjače leukopenije i neutropenije te djeluje hepatotoksično. Sukladno rezultatima našeg istraživanja halotan ima najjači genotoksični i citotoksični učinak na tumorske stanice, međutim obzirom na njegovu toksičnost na zdrave stanice prikladniji anestetik za anesteziju miševa s tumorom je sevofluran, dok ponavljane anestezije izofluranom povećavaju rast tumorskih stanica.

Dobiveni rezultati upućuju na potrebu daljnjih istraživanja vezano uz genotoksičnost i citotoksičnost inhalacijskih anestetika, kao i njihove međureakcije s nekim drugim citostaticima koji su u svakodnevnoj upotrebi kod bolesnika s malignim bolestima. Također je potrebno bolje proučiti mehanizam na koji dolazi do pojačavanja ili slabljenja učinka citostatika na tumorske stanice zbog međureakcije s anesteticima.

Buduća istraživanja bilo bi korisno usmjeriti na analizu popravaka DNK zdravih stanica nakon ponavljanih anestezija inhalacijskim anesteticima i združenog djelovanja s citostaticima metodama komet testa i nekim drugim citogenetičkim testovima (strukturne aberacije kromosoma, izmjene sestrinskih kromatida, mikronukleus test i dr.) kao i pratiti mogućnost nastanka posljedica vidljivih tek kroz duži vremenski period.

8. SUMMARY

Genotoxic and cytotoxic effects of inhalation anaesthetic and cisplatin on healthy and Ehrlich ascites tumour cells of Swiss albino mice

In this study the genotoxic and cytotoxic effects of inhalation anaesthetic isoflurane, sevoflurane and halothane, with/or without cytostatic cisplatine were investigated on healthy Swiss albino mice cells and tumour cells of Ehrlich ascites tumour (EAT) carrier mice using quantitative analysis of molecular and cell structure damage and clinical biochemical and haematological assays. The goal of this study was to explore whether inhalation anaesthetics together with cisplatine enhance or decrease their effects on peripheral blood lymphocytes, hepatocytes, renal cells, neurons and Ehrlich ascites tumour cells. Additional goal was to determine which of those anaesthetics induced the least toxicity on healthy cells and which one increased toxic effect of cisplatine on tumour cells.

The mice were divided in two groups: healthy control mice and mice carriers of tumours (i.p. injection with 2 X 10^6 EAT cells). EAT cell line were kept alive in albino mice by serial passages intraperitoneally every 7-9 days in ascites fluid. Those two groups were subdivided into 8 subgroups each, based on repeated anaesthesia with sevoflurane, halothane or isoflurane, or i.p. injection of cisplatine. Cells were collected and analyzed by comet test, micronucleus test, determination of percent of tumour cells in apoptosis and necrosis, by counting alive and dead tumour cells in peritoneal fluid and by haematological and biochemical tests from blood of experimental animals.

The results of comet test showed that all three inhalation anaesthetics damaged DNA of lymphocytes, neurons, hepatocyte, kidney and EAT cells. The strongest genotoxic damage is seen in neurons after repeated treatment with halothane. Sevoflurane exhibited the strongest genotoxic effect on lymphocytes and halothane had the most deleterious effect on hepatocytes. Sevoflurane and

isoflurane damage DNA of kidney cells more that halothane. Lymphocytes, neurons, hepatocytes and kidney cells from mice with tumour had much higher basal DNA damage that same type cells from control animals without tumour. Combination of cisplatine and inhalation anaesthetics had much stronger genotoxic effects on lymphocytes, renal and liver cells than inhalation anaesthetics *per se.* However, combination of cisplatine and inhalation anaesthetics has less genotoxic effect on EAT cells than individual effect of sevoflurane, halothane ($p<0.01$) and isoflurane ($p<0.05$). Furthermore, anaesthesia with halotane induced the highest number of micronuclei in reticulocytes of peripheral blood. Repeated anaesthesia with halothane and sevoflurane decreased number of living EAT cells in ascites compared to control, while anaesthesia with isoflurane increased the tumour cells growth. Cisplatine induced apoptosis in 40% of tumour cells, while anaesthesia with halothane and sevoflurane induce apoptosis in 10% of tumour cells. Cisplatine and inhalation anaesthetics together increased the number of dead cells in ascites of mice. Halothane and isoflurane decreased the number of leucocytes in blood and combination of halothane and cisplatine induced leucopoenia and neutropaenia and had hepatotoxic effects. The strongest genotoxic and cytotoxic effects on tumour cells has halothane, however due to its toxicity on healthy cells more appropriate anaesthetic for mice with tumour is sevoflurane, while repeated anaesthesia with isoflurane increased the growth of tumour cells.

The results of this study emphasize the needs for further studies exploring genotoxicity and cytotoxicity of inhalation anaesthetics, and their interactions with other cytostatics which are commonly used in routine clinical practice in patients with malignant disease. It is necessary to investigate in greater details the mechanisms of increased or decreased effects of cytostatics on tumour cells due to interaction with inhalation anaesthetics.

9. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Kenna JG, Jones RM. The organ toxicity of inhalation anaesthetics. Anaesth Analg 1995; 81: S51-66.
2. Baden JR, Rice S. Metabolism and toxicity of inhaled anaesthetics. U: Miller RD (urednik): Anesthesia, peto izd. Churchill Livingstone, Philadelphia, USA, 2000;147-73.
3. Minoda Y, Kharasch MD. Halothane-dependent Lipid Peroxidation in Human Liver Microsomes Is Catalyzed by Cytochrome P4502A6 (CYP2A6). Anesthesiology 2001; 95 :509-14.
4. Spracklin DK, Thummel KE, Kharasch ED. Human reductive halothane metabolism in vitro is catalyzed by cytochrome P450 2A6 and 3A4. Drug Metab Dispos. 1996; 24(9): 976-83.
5. Kharasch ED, Hankins DC, Fenstamaker K, Cox K. Human halothane metabolism, lipid peroxidation, and cytochromes P(450)2A6 and P(450)3A4. Eur J Clin Pharmacol. 2000; 55(11-12): 853-9.
6. Eger EI 2th, White AE, Brown CL, Biava CG, Corbett TH, Stevens WC. A test of the carcinogenicity of enflurane, isoflurane, halothane, methoxyflurane, and nitrous oxide in mice. Anest analg 1978; 57: 678-94.
7. Sardas S, Karabiyik L, Aygun N, Karakaya AE. DNA damage evaluated by the alkaline comet assay in lymphocytes of humans anaesthetized with isoflurane. Mutat Res. 1998;418(1):1-6.
8. Ihtiyar E, Algin C, Haciolu A, Isiksoy S. Fatal isoflurane hepatotoxicity without re-exposure. Indian J Gastroenterol. 2006; 25(1):41-2.
9. Njoku D, Laster MJ, Gong DH, Eger EI 2nd, Reed GF, Martin JL. Biotransformation of halothane, enflurane, isoflurane, and desflurane totrifluoroacetylated liver proteins: association between protein acylation and hepatic injury. Anesth Analg. 1997; 84(1): 173-8.

10. Kharasch ED. Metabolism and toxicity of the new anesthetic agents. Acta Anaesthesiol Belg 1996;47(1):7-14.
11. Kharasch ED. Biotransformation of Sevoflurane. Anesth Analg 1995; 81(6 Suppl):S27-38.
12. Eger EI 2nd, Ionescu P, Gong D. Circuit absorption of halothane, isoflurane, and sevoflurane. Anesth Analg. 1998;86(5):1070-4.
13. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Novotvorina (Neoplasia) U: Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Osnove patologije, prema petom američkom izdanju, Zagreb: Školska knjiga, 1994: 171-215.
14. Lehman TA, Reddel R, Peiifer AM i sur. Oncogenes and tumor-suppressor genes. Environ Health Perspect. 1991; 93: 133-4.
15. Aaronson SA. Growth factors and cancer. Science 1991; 254: 1146-53.
16. Gavine PR, Neil JC, Crouch DH. Protein stabilization: a common consequence of mutations in independently derived v-Myc alleles. Oncogene. 1999; 18(52): 7552-8.
17. Francks LM. What is cancer? In: Franks LM, Teich NM, editors. Introduction to the Cellular and Mollecular Biology of Cancer. Oxford University Press. 1999: 1-19.
18. Ban J, Osmak M. Načela proliferacije tumora. U: Turić M, Kolarić K, Eljuga D,ur. Klinička onkologija. Zagreb: Nakladni zavod Globus, 1996: 37-55.
19. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? J. Natl Cancer Inst. 1990; 82(1):4-6.
20. Rastinejad F, Polverini P J, Bouck N P. Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. Cell 1989; 56(3): 345-55.
21. Kandal J, Bossy-Wetzel E, Radvany F, Klagsburn M, Folkman J, Hanahan D. Neovascularization is associated with a switch to the

export of bFGF in the multistep devlopment of fibrosarcoma. Cell 1991; 66: 1095-1104.

22. Chen C, Parangi S, Tolentino M J, Folkman J. A strategy to discover circulating angiogenesis inhibitor generated by human tumors. Cancer Res. 1995; 55: 4230-4233.
23. O'Reilly M S. Angiostatin. A novel angiogenesis inhibitor that mediate the
suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. Cell 1994;79: 315-328.
24. Good D J, Polverini P J, Rastinajad F, Le Beau M M, Lemons R S, Frazier W A, Bouck N P. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990; 87(17): 6624-8.
25. Brown LF, Detmar M, Claffey K, Nagy J A, Feng D, Dvorak A M, Dvorak H.F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: A multi-fonctional angiogenic cytokine.EXS 1997; 79: 233-269.
26. Ban J, Matulić M, Osmak M. Molekularna biologija proliferacije zloćudnih tumora. U: Mršić-Krmpotić Z, Roth A i sur, ur. Internistička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada, 2004: 3-37.
27. Boivin JF. Risk of spontaneous abortion in women occupationally exposed to anaesthetics gases: a meta-analysis. Occup Environ Med 1997; 54(8): 542-8.
28. Rozgaj R, Kašuba V, Jazbec A. Preliminary study of cytogenetic damage in personnel exposed to anesthetic gases. Mutagenesis 2001;16(2):139-143.
29. Hoerauf K, Wiesner G, Funk W, Schroegendorfer K, Hobbhahn J. Biological monitoring during exposure to the anesthetics isoflurane and sevoflurane. Zentralbl Hyg Umweltmed. 1998; 200(5-6): 521-9.

30. Hoerauf K, Lierz M, Wiesner G i sur. Genetic damage in operating room personnel exposed to isoflurane and nitrous oxide. Occup Environ Med 1999;56:433-437.
31. Sardas S,Aygun N, Gamli M, Unal Y, Unal N, Berk N, Karakaya AE. Use of alkaline comet assay (single cell gel electrophoresis technique) to detect DNA damages in lymphocytes of operating room personnel occupationally exposed to anaesthetic gases. Mutat Res 1998; 418 (2-3):93-100.
32. Guirguis M A, Vancura V. The oxidation of pipecolic acid in preincubated soils. Folia Microbiol 1970; 15(6): 459-67.
33. Lucchini R, Placidi D, Toffoletto F, Alessio L. Neurotoxicity in operating room personnel working with gaseous and nongaseous anesthesia. Int Arch Occup Environ Health. 1996; 68(3):188-92.
34. Jaloszynski P, Kujawski M, Wasowicz M, Szulc R, Szyfter K. Genotoxicity of inhalation anesthetics halothane and isoflurane in human lymphocytes studied in vitro using the comet assay. Mutat Res 1999; 439: 199-206.
35. Szyfter K, Szulc R, Mikstacki A, Stachecki I, Rydzanicz M, Jaloszyński P. Genotoxicity of inhalation anaesthetics: DNA lesions generated by sevoflurane *in vitro* and *in vivo* J Appl Genet 2004; 45(3): 369-374.
36. Matsuoka H, Kurosawa S, Horinuochi T, Kato M, Hashimoto Y. Inhalation Anesthetics Induce apoptosis in Normal Peripheral Lymphocytes In Vitro. Anesthesiology 2001; 95:1467-72.
37. Loop T, Dovi-Akue D, Frick M i sur.Volatile Anesthetics Induce Caspase-dependent Mitochondria-mediated Apoptosis in Human T Lymphocytes In Vitro. Anesthesiology 2005;102:1147-57.
38. Tyther R, Fanning N, Halligan M, Wang J, Redmond HP, Shorten G. The effect of the anaesthetic agent isoflurane on the rate of neutrophil apoptosis in vitro. Ir J Med Sci 2001;170(1):41-4.

39. Tyther R, O'Brien J, Wang J, redmond HP, Shorten G. Effect of sevoflurane on human neutrophil apoptosis. Eur J Anaesthesiol 2003;20(2):111-5.
40. Moudgil GC, Gordon J, Forrest JB. Comparative effects of volatile anaesthetic agents and nitrous oxide on human leucocyte chemotaxis in vitro. Can Anaesth Soc J 1984; 31:631-7.
41. Morisaki H, Aoyama Y, Shimada M, Ochiai R, Takeda J. Leucocyte distribution during sevoflurane anaesthesia. Br J Anaesth 1998.; 80:502-3.
42. Puig NR, Ferrero P, Bay ML, Hidalgo G, Valenti J, Amerio N, Elena G. Effects of sevoflurane general anesthesia: immunological studies in mice. Int Immunopharmacol. 2002; 2(1): 95-104.
43. Karabiyik L, Şardaş S, Polat U, KocabaŞ NA, Karakaya AE.Comparison of genotoxicity of sevoflurane and isoflurane in human lymphocytes studied in vivo using the comet assay. Mutat Res 2001; 492: 99-107.
44. Aleva R, Tomasetti M, Solenghi MD i sur. Lymphocyte DNA damage precedes DNA repair or cell death after orthopaedic surgery under general anaesthesia. Mutagenesis 2003; 18(5): 423-8.
45. Kvolik S, Glavas-Obrovac L, Bares V, Karner I. Effects of inhalation anesthetics halothane, sevoflurane, and isoflurane on human cell lines. Life Sci 2005; 77(19):2369-83.
46. Moudgil GC, Singal DP. Halothane and isoflurane enhance melanoma tumour metastasis in mice. Can J Anaesth 1997;44(1):90-4.
47. Melamed R, Bar-Yosef S, Shakhar G, Shakhar K, Ben-Eliyahu. Suppression of Natural Killer Cell Activity and Promotion of Tumor Metastasis by Ketamine, Thiopental, and Halothane, but Not by Propofol: Mediating Mechanisms and Prophylactic Measures. Anesth Analg 2003; 97:1331-9.

48. Hack G, Karzel K. Suspension cultures of Ehrlich ascites tumor cells test system for the study of cytotoxic effects of anaesthetics. Anaesthesist. 1981; 30(2): 80-94.
49. Hack G, Karzel K, Panthong A, Stein P. In vitro studies on the influence of volatile anaesthetics on cell number, cell volume, and cellular protein, DNA, and RNA content. Anaesthesist 1981; 30:134-43.
50. Baden JM, Kundomal YR, Mazze RI, Kosek JC. Carcinogen bioassay of isoflurane in mice. Anaesthesiology 1988; 69 (5): 750-3.
51. Hegarty M, Chisholm D. Chemotherapy and Anaesthesia. Current Anaesthesia& Critical Care 2002; 13: 168-174.
52. Kopjar N., Garaj-Vrhovac V., Milas I. Assesment of chemotherapy-induced DNA damage in peripheral blood leukocytes of cancer pateints using the alkaline comet assay. Teratog Carcinog Mutagen. 2002; 22(1):13-30.
53. Slapak CA, Kufe DW. Načela terapije raka. U: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL, ur. Harrison's Principles of Internal Medicine. 13th ed., 1. hrv. izdanje. Split: Placebo d.o.o., 1997:1600-1611.
54. Chabner BA, Amrein PC, Druker B i sur. Antineoplastic Agents. U: Goodman & Gillman'S The pharmacological basis of therapeutics, jedanaesto izdanje. Mc Graw-Hill, New York, SAD. 2006: 1315-1403.
55. Eastman A. The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. Pharmacol Ther 1987;34:155.
56. Zamble D, Lippard S. The response of cellular proteins to cisplatin-damaged DNA. In: Lippert B, ed. Cisplatin: chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug. Zurich: Verlag Helvetica Chimica Acta, 1999:73.

57. Sorenson C, Eastman A. Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum (II)-induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA double-strand breaks. Cancer Res 1988; 48:4484
58. Evans D, Dive C. Effects of cisplatin on the induction of apoptosis in proliferating hepatoma cells and nonproliferating immature thymocytes. Cancer Res 1993; 53:2133
59. Sorenson C, Barry M, Eastman A. Analysis of events associated with cell cycle arrest at G2 phase and cell death induced by cisplatin. J Natl Cancer Inst 1990; 82:749
60. Toney J, Donahue B, Kellett P, et al. Isolation of cDNAs encoding a human protein that binds selectively to DNA modified by the anticancer drug cis-diamminedichloroplatinum. Proc Natl Acad Sci U S A 1989; 86:8328.
61. Bruhn S, Pil P, Essigmann J, et al. Isolation and characterization of human cDNA clones encoding a high mobility group box protein that recognizes structural distortions to DNA caused by binding of the anticancer agent cisplatin. Proc Natl Acad Sci U S A 1989; 89: 8328-32.
62. Hughes EN, Engelsberg BN, Billings PC. Purification of nuclear proteins that bind to cisplatin-damaged DNA. Identity with high mobility group proteins 1 and 2. J Biol Chem 1992; 267:13520-7.
63. Fink D, Zheng H, Nebel S, et al. In vitro and in vivo resistance to cisplatin in cells that have lost DNA mismatch repair. Cancer Res 1997; 57:1841.
64. Fan S, Smith ML, Rivet DJ, et al. Disruption of p53 function sensitizes breast cancer MCF-7 cells to cisplatin and pentoxifylline. Cancer Res 1995; 55:1649.

65. Hawkins DS, Demers GW, Galloway DA. Inactivation of p53 enhances sensitivity to multiple chemotherapeutic agents. Cancer Res 1996;56:892.
66. Sklar M. Increased resistance to cis-diamminedichloro platinum (II) in NIH3T3 cells transformed by RAS oncogenes. Cancer Res 1988; 48:793.
67. Wood M. Pharmacokinetic drug interactions in anaesthetic practice. Clin Pharmacokinet 1991; 21(4): 285-307.
68. Zaniboni A, Prabhu S, Audisio RA. Chemotherapy and anaesthetic drugs: too little is known. Lancet Oncol 2005; 6: 176-81.
69. Kvolik S, Glavas-Obrovac Lj, Sakić K, Margareti D, Karner I. Anaesthetic implication of anticancer chemotherapy. Eur J Anaesth 2003; 20:859-671.
70. O'Leary G, Bacon CL, Odumeru O, et al. Antiproliferative actions of inhalational anesthetics: comparisons to the valproate teratogen. Int J Dev Neurosci 2000; 18(1):39-45.
71. Topal A, Gull N, Ilcol Y, Gorgul OS. Hepatic effect of halothane, isoflurane or sevoflurane anaesthesia in dogs. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med 2003; 50(10):530-3.
72. Collins AR, Dobson VL, Dušinská M, Kennedy G, Štětina R. The comet assay: what can it really tell us? Mutation Res 1997; 375:183-193.
73. Singh NP, Mc Coy MT, Tice RR, Schneider EL. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. Exp Cell Res 1988; 175: 184-191.
74. Brendler-Schwaab S, Hartmann A, Pfuhler S, Speit G. The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. Mutagenesis 2005; 20(4): 245-254.

75. Müller WU, bauch T, Streffer C, niedereichholz F, Böcker W. Comet assay studies of radiation-induced DNA damage and repair in various tumor cell lines. Int J Radiat Biol 1994; 65(3): 315-319.
76. Betti C, Davini T, Gianessi L, Loprieno N, Barale R. Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. Mutat Res 1994; 307: 323-333.
77. Tice RR, Agerell E, Anderson D i sur. The single cell gel / comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. Environ Mol Mutagen 2000; 35:206-221.
78. Olive P, Banáth JP, Durand RE. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the "comet assay". Radiat Res 1990; 122: 86-94.
79. Fairbairn DW; Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. Mutat Res 1995; 566: 209-29.
80. Plappert U, Raddatz K, Roth S, Fliedner TM. DNA damage detection in man after radiation exposure-the comet assay-its possible application for human monitoring Stem Cells 1995; 13(1): 215-222.
81. Olive Pl. DNA damage and repair in individual cells: aplication of the comet assay in radiobiology. Int J Radiat Biol 1999; 75(4): 395-405.
82. Garaj-Vrhovac V, Kopjar N. The comet assay-a new technique for detection of DNA damage in genetic toxicology studies and human biomonitoring. Period Biol 1998; 100(3); 361-366.
83. Bombail V, Aw D, Gordon E, Batty J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (Pholis gunnellus) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. Chemosphere. 200; 44(3):383-92.
84. Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. Mutat Res 1993; 285(1): 35-44.

85. Grisolia CK, Starling FL. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoa, under influence of sewage treatment plant discharges. Mutat Res. 2001; 491(1-2):39-44.
86. Channarayappa, Ong T, Nath J. Cytogenetic effects of vincristine sulfate and ethylene dibromide in human peripheral lymphocytes: micronucleus analysis. Environ Mol Mutagen. 1992; 20(2):117-26.
87. Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. Human Micronucleus project. "HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures." Mutat Res 2003; 534(1-2):65-75.
88. Baatour S, Derradji H. Cytometric methods to analyse radiation effects. J Biol Regul Homeost Agents 2004;18(2):101-5.
89. Natarajan AT. Chromosome aberrations: past, present and future. Mutat Res 2002; 504 (1-2):3-16.
90. Norppa H, Luomahaara S, Heikanen H, Roth S, Sorsa M, Renzi L, Lindholm C. Micronucleus assay in lymphocytes as a tool to biomonitor human exposure to aneuploidogens and clastogens. Environ Health Perspect. 1993; 101 Suppl 3:139-43.
91. Asano N, Hagiwara T. The mouse peripheral blood micronucleus test with 2-acetylaminofluorene using the acridine orange supravital staining method. Mutat Res. 1992; 278(2-3): 153-7.
92. Miller B, Potter-Locher F, Seelbach A, Stopper H, Utesch D, Madle S. Evaluation of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosomal aberration assay: position of the GUM working group on the in vitro micronucleus test. Mutat Res 1998; 410: 81-116.
93. Surralles J, Puerto S, Ramirez MJ, Creus A, Marcos R, Mullenders LH, Natarajan AT. Links between chromatin structure, DNA repair and chromosome fragility. Mutat Res. 1998; 404(1-2): 39-44.

94. Asano N, Katsuma Y, Tamura H, Higashikuni N, Hayashi M. An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravitally stained peripheral blood cells. Mutat Res 1998; 404: 149-154.
95. Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T, Ishidate M Jr. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. Mutat Res 1990; 254(4): 245-9.
96. Willie A. H. Apoptosis: an overview. Br Med Bull. 1997; 53(3):451-65.
97. Lockshin R. A., Beaulaton J. Cell death: questions for histochemists concerning the causes of the various cytological changes. Histochem J. 1981; 13(4): 659-666.
98. Ueda N, Shah S. V., Apoptosis. J Lab Clin Med 1994; 124(2):169-77.
99. McConkey DJ, Hartzell P, Nicotera P, Orrenius S. Calcium-activated DNA fragmentation kills immature thymocytes. FASEB J. 1989; 3(7):1843-9.
100. Yamamoto N, Maki A, Swann JD, Berezesky IK, Trump BF. Induction of immediate early and stress genes in rat proximal tubule epithelium following injury: the significance of cytosolic ionized calcium. Ren Fail. 1993;15(2):163-71.
101. Piacentini M, Fesus L, Farrace MG, Ghibelli L, Piredda L, Melino G. The expression of "tissue" transglutaminase in two human cancer cell lines is related with the programmed cell death (apoptosis).Eur J Cell Biol. 1991; 54(2): 246-54.
102. Trump BF, Berezesky IK. The role of altered [Ca2+]i regulation in apoptosis, oncosis, and necrosis.Biochim Biophys Acta. 1996; 1313(3):173-8.
103. Vaux DL, Weissman IL. Neither macromolecular synthesis nor myc is required for cell death via the mechanism that can be controlled by Bcl-2. Mol Cell Biol. 1993; 13(11): 7000-5.

104. Curran T, Franza BR Jr. Fos and Jun: the AP-1 connection. Cell. 1988; 55(3): 395-7.
105. Jennings RB, Reimer KA. Lethal myocardial ischemic injury.Am J Pathol. 1981; 102(2): 241-55.
106. Afanas'ev VN, Korol BA, Mantsygin YuA, Nelipovich PA, Pechatnikov VA, Umansky SR. Flow cytometry and biochemical analysis of DNA degradation characteristic of two types of cell death. FEBS Lett. 1986; 194(2): 347-50.
107. Telford WG, King LE, Fraker PJ. Rapid quantitation of apoptosis in pure and heterogeneous cell populations using flow cytometry. J Immunol Methods. 1994; 172(1):1-16.
108. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. J Immunol Methods. 1995; 184(1): 39-51.
109. Zamzami N, Larochette N, Kroemer G. Mitochondrial permeability transition in apoptosis and necrosis. Cell Death Differ. 2005; Suppl 2:1478-80.
110. Heuser VD, da Silva J, Moriske, Dias JF, Yoneama ML, de Freitas Tro. Genotoxicity Biomonitoring in Regions Exposed to Vehicle Emissions Using the Comet Assay and the Micronucleus Test in Native Rodent *Ctenomyc minutus.* Enviromental and Molecular Mutagenesis 2002; 40:227-235.
111. Krishna G, Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. Mutation Research 2000;455:155-166.
112. Nilsson R, Bjordal C, Andersson M, Bjordal J, Nyberg A, Welin A, Willman A. Health risks and occupational exposure to volatile

anaesthetics- a review with a systematic approach. J Clin Nurs 2005; 14(2):173-86.

113. Hoerauf K H, Wiesner G, Schroegendorfer K F, Jobst B P, Spacek A, Harth M,Sator-Katzenschlager S, Rudiger H W. Waste anaesthetic gases induce sister chromatid exchanges in lymphocytes of operating room personnel.Br J Anaesth. 1999; 82(5):764-6.
114. Karelova J, Jablonicka A, Gavora J, Hano L. Chromosome and sister-chromatid exchange analysis in peripheral lymphocytes, and mutagenicity of urine in anesthesiology personnel. Int Arch Occup Environ Health. 1992; 64(4):303-6.
115. Lamberti L, Bigatti P, Ardito G, Armellino F.Chromosome analysis in operating room personnel. Mutagenesis 1989; 4(2):95-7.
116. Weisner G, Hoerauf K, Schroegendorfer K, Sobczynski P, Harth M, Ruediger H W. High-level, but not low-level, occupational exposure to inhaled anesthetics is associated with genotoxicity in the micronucleus assay. Anesth Analg 2001; 92(1): 118-22.
117. Sardas S, Izdes S, Ozcagli E, Kanbak O, Kardioglu E. The role of antioxidant supplementation in occupational exposure to waste anaesthetic gases. Int Arch Occup Envir Health 2006; 80: 154-159.
118. Karpinski T M, Kostrzewska M, Stachecki I, Mikstacki A, Szyfter K. Genotoxicity of the volatile anaesthetic desflurane in human lymphocytes in vitro, established by comet assay.J Appl Genet 2005; 46(3):319-324.
119. Robbiano L, Mereto E, Migliazzi Morando A, Pastore P, Brambilla G. Increased frequency of micronucleated kidney cells in rats exposed to halogenated anaesthetics. Mutat Res. 1998; 413(1):1-6.
120. Bazin JE, Constantin JM, Gindre G. Laboratory animal anaesthesia: influence of anaesthetic protocols on experimental models. Ann Fr Anesth Reanim 2004; 23(8):811-8.

121. Cemeli E, Smith I F, Peers C, Urenjak J, Godukhin O V, Obrenovitch T P, Anderson D. Oxygen-Induced DNA Damage in Freshly Isolated Brain Cells Compared With Cultured Astrocytes in the Comet Assay. Teratog Carcinog Mutagen. 2003; 2:43-52.
122. Constant I, Seeman R, Murat I. Sevoflurane and epileptiform EEG changes. Paediatr Anaesth 2005; 15(4): 266-74.
123. Marval P D, Perrin M E, Hancock S M, Mahajan PR. The effect of propofol or sevoflurane on the estimated cerebral perfusion pressure and zero flow pressure. Anesth Analg 2005; 100(3): 835-40.
124. Moe M C, Berg-Johnsen J, Larsen G A, Roste G K, Vinje M L. Sevoflurane Reduces Synaptic Glutamate Release in Human Synaptosomes. J Neurosurg Anesthesiol. 2002; 14(3):180-6.
125. Rodier P M, Aschner M, Lewis L S, Koeter H B. Cell proliferation in developing brain after brief exposure to nitrous oxide or halothane. Anesthesiology 1986; 64(6): 680-7.
126. Keaney A, Diviney D, Harte S, Lyons B. Postoperative behavioral changes following anesthesia with sevoflurane. Paediatr Anaesth 2004; 14(10): 866-70.
127. Kain Z N, Caldwell-Andrews A A,Weinberg M E, Mayes L C, Wang S M, Gaal D, Saadat H, Maranets I. Sevoflurane versus halothane: Postoperative Maladaptive Behavioral Changes. Anesthesiology. 2005; 102(4):720-6.
128. Topouzova-Hristova T, Daza P, Garcia-Herdugo G, Stephanova E. Volatile anaesthetic halothane causes DNA damage in A549 lung cells. Toxicol In Vitro. 2006; 20(5):585-93.
129. Vinje ML, Moe MC, Valo ET, Berg-Johnsen J. The effect of sevoflurane on glutamate release and uptake in rat cerebrocortical presynaptic terminals. Acta Anaesthesiol Scand. 2002; 46(1):103-8.

130. Mannervik B. The enzymes of glutathione metabolism: an overview. Biochem Soc Trans. 1987; 15(4):717-8.
131. Tew K D. Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance.Cancer Res. 1994; 54(16):4313-20.
132. Aravindan N, Cata JP, Hoffman L, Dougherty PM, Riedel BJ, Price KJ, Shaw AD. Effects of isoflurane, pentobarbital, and urethane on apoptosis and apoptotic signal transduction in rat kidney. Acta Anaesthesiol Scand. 2006; 50(10):1229-37.
133. Delogu G, Moretti S, Antonucci A, Marcellini S, Masciangelo R, Fumularo G, Signore L, De Simone C. Apoptosis ans surgical trauma: Dysregulated expression of death and survival factors on peripheral lymphocytes. Arch Surg 2000; 135: 1141-7.
134. Eckenhoff RG, Johansson JS, Wei H, Camini A, Kang B, Wei W, Pidikiti R, Keller JM, Eckenhoff MF. Inhaled anesthetic enhancement of amyloid-beta oligomerization and cytotoxicity. Anesthesiology 2004; 101: 703- 9.
135. Xie Z, Dong Y, Maeda U, Alfille P, Deborah J C, Crosby G, Tanzi R E. The common Inhalation Anesthetic Isoflurane Induces Apoptosis and Increases Amyloid β protein Levels. Anesthesiology 2006; 104: 988-94.
136. Wein H, Kang B, Wei W, Liang G, Meng Q C, Li Y, Eckenhoff R G. Isoflurane and Sevoflurane affect cell survival and BCL-2/BAX ratio differently. Brain Research 2005; 1037:139-147.
137. Oka M, Hirazawa K, Yamamoto K, Iizuka N, Hazama S, Suzuki T, Kobayashi N. Induction of Fas-mediated apoptosis on circulating lymphocytes by surgical stress. Ann Surg 1996; 223:434-40.
138. Schneemilch CE, Schilling T, Bank U. Effects of general anaesthesia on inflammation. Best Pract Res Clin Anaesthesiol. 2004;18(3):493-507.

139. Kanaya N, Nakayama M, Fujita S, Namiki A. Comparison of the effects of sevoflurane, isoflurane and halothane on indocyanine green clearance. Br J Anaesth 1995; 74: 164-167.
140. Crawford MW, Lerman J, Saldivia V, Carmichael FJ. Henodynamic and organ blood flow responses to halothane and sevoflurane anesthesia during spontaneous ventilation. Anesth Analg 1992; 75: 1000-1006.
141. Nishiyama T, Yokoyama T, Hanaoka K. Liver and renal function after repeated sevoflurane or isoflurane anaesthesia. Can J Anaesth 1998; 45(8): 789-93.
142. Lu Y, Cederbaum AI. Cisplatin-Induced Hepatotoxicity Is Enhanced by Elevated Expression of Cytochrome P450 2E1. Toxicological Science 2006; 89(2): 515-523.
143. Liu H, Baliga R. Cytochrome P450 2E1 null mice provide novel protection against cisplatin-induced nephrotoxicity and apoptosis. Kidney Int. 2003; 63:1687-1696.

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 3. 10. 1960. godine u Slavonskom Brodu, gdje sam završila Osnovnu školu i Gimnaziju. Studij medicine upisala sam 1979. godine na Studiju medicine u Osijeku, Medicinski fakultet u Zagrebu. Diplomirala sam 1985. godine u Zagrebu.

Pripravnički staž odradila sam u tadašnjem Medicinskom centru u Slavonskom Brodu. Nakon položenog pripravničkog ispita radila sam u Domu zdravlja "Đuro Đaković" kao liječnik opće prakse. 1989. godine započela sam specijalizaciju u Službi za anesteziju i reanimaciju u Općoj bolnici u Slavonskom Brodu. Specijalistički ispit iz anesteziologije, reanimatologije i intenzivnog liječenja položila sam 1995. godine u Zagrebu, te stekla zvanje specijaliste anesteziologa.

Za vrijeme Domovinskog rata kao dragovoljac od 1991. u više sam navrata radila u Ratnoj bolnici Županja i Ratnoj bolnici Stari Mikanovci, gdje je bila izmještena Opća bolnica Vinkovci.

U Klinici za tumore u Zagrebu radim od 2001. u Službi za anesteziju i intenzivno liječenje. Predsjednik sam Povjerenstva za bolničke infekcije Klinike za tumore od 2003.

Doktorski poslijediplomski studij iz područja biomedicine i zdravstva upisala sam školske godine 2001/2002.

Član sam European Society of Anaesthesiologists, član Upravnog odbora Hrvatskog društva za regionalnu anesteziju i analgeziju. Također sam član Hrvatskog društva za anesteziologiju i intenzivno liječenje, Hrvatskog društva za intenzivnu medicinu, te Hrvatske liječničke komore i Hrvatskog liječničkog zbora.

Za vrijeme svog rada u okviru anestezije i intenzivne medicine, aktivno sam sudjelovala na mnogim simpozijima i sastancima društava u Hrvatskoj i u inozemstvu, te objavljivala radove u znanstvenim i stručnim časopisima. Od 2005. godine priznaje mi se naziv primarius.

POPIS RADOVA:

1. Brozovic G, Kvolik S. Anaphylactic reaction after rocuronium. Eur J Anaesthesiol. 2005;22:72-73.

2. Benkovic V, Knezevic Horvat A, Brozovic G, Knezevic F, Djikic D, Bevanda M, Basic I, Orsolic N. Enhanced antitumor activity of irinotecan combined with propolis and its polyphenolic compounds on Ehrlich ascites tumor in mice. Biomedicine & Pharmacotherapy (2007) 1-6. (prihvaćen rad za objavu)

3. Brozovic G, Kvolik S, Krleža D. Neuromuscular function monitoring. Neurol. Croat.2003;52(3):105-111.

4. Brozovic G, Kvolik S, Lucic I. Inhalation anestetics-new modality of sedation in ICU. Neurol. Croat.2004;53(2):113-118.

5. Brozovic G, Kvolik S, Nagy A, Dumenčić B, Marjanović K, Rakipović-Stojanović A. Fat embolism as the cause of respiratory failure. Neurol. Croat. 2005;54(2):49-54.

6. Brozovic G, Velimir-Vrdoljak D, Ramljak V. Analgesia after surgery for breast tumor. Libri Onkol.2003;31:75-79.

7. Velimir-Vrdoljak D, Ramljak V, Mužina D, Lesar M, Banović M, Roth A, Brozovic G. Analysis tumor marker CA 15-3 and hormone receptor status related to metastatic involvement of interpectoral (Rotter's) lymph nodes. Libri Oncol.2003;31:21-25.

8. Velimir-Vrdoljak D, Ramljak V, Mužina D, Stanec M, Lesar M, Vrdoljak M, Roth A, Brozovic G. Relation between metastatic involvement of interpectoral (Rotter's) lymph nodes and location, size and grade of breast cancer. Libri Oncol.2003;31:27-32.

9. Velimir-Vrdoljak D, Juzbašić S, Mužina D. Nola N, Brozovic G. Local recurrence following conservative surgery for breast cancer-true recurrence or a new primary tumor. Libri Oncol. 2003; 31:33-40.

10. Brozovic G, Orsolic N, Knezevic F, Horvat Knezevic A, Sakic K, Benkovic V, Velimir-Vrdoljak D. Genotoxic effects of irinotecan and cisplatin on mice evaluated by Alkaline comet assay. Libri Oncol. 2005; 33: 1-5.

11. Nola N, Vrdoljak D.V, Zupanc D, Ramljak V, Knezevic F, Brozovic G. Asymptomatic mimicking splenic metastases in a breast cancer patient- a case report. Libri Oncol. 2005;33: 33-36.

12. Nola N, Vrdoljak D.V, Ramljak V, Knezevic F, Stanec M, Brozovic G, Lesar M, Roth A, Oresic T. Primary leiomyosarcoma of the breast in a male patient- a case report. Libri Oncol. 2005;33: 37-340.

13. Brozović G, Kvolik S. Poremećaji zgrušavanja krvi u bolesnika s karcinomom. Acta Anaesthesiologica Croatica 2004;1(7):21-24.

14. Brozović G, Kvolik S. Alergijska reakcija na rokuronij. Acta Anaesthesiologica Croatica 2003;1(6):27-30.

15. Brozović G, Kvolik S, Krleža D. Nervni stimulator-da ili ne? Acta Anaesthesiologica Croatica 2004;1(7):39-42.

16. Kvolik S, Brozović G. Poremećaji koagulacije kod bolesnika na kemoterapiji. Acta Anaesthesiologica Croatica 2004;1(7):33-36.

17. Kvolik S, Radoš I, Brozović G, Takač I. Naša znanja i predrasude o low flow anesteziji. Acta Anaesthesiologica Croatica 2003;2(6):47-48.

Sažetci:

18. Kvolik S, Brozovic G, Drenjancevic-Harsanji I, Prlic L, Kovacic D, Sakic K, Azenic-Venzera D, Kondza G, Đapić D, Kovacic B. Haemodynamic changes during general anesthesia in hypertensive and normotensive patients, a randomised clinical study. Period Biol 2006; Vol 108, Suppl 1: Page 50.

19. Ratković S, Matić I, Šakić K, Šarčević Z, Lučić I, Brozović G. Preemptive analgesia for the orthopaedic hip and knee surgery. Liječ Vjesn 2005; Suppl 2(127): 135.

11. POPIS SLIKA:

Slika 1. Strukturna formula cisplatine

Slika 2. Proces eritropoeze; mehanizam nastanka mikronukleusa u polikromatskim eritrocitima

Slika 3. Kometi stanica prikazani prema stupnju oštećenja 0-4

Slika 4. Učinak inhalacijskih anestetika i cisplatine na oštećenje DNK limfocita periferne krvi Swiss albino miševa. Rezultati komet testa prikazani su kao prosječne vrijednosti dužine repa kometa ±SE.

Slika 5. Učinak inhalacijskih anestetika i cisplatine na oštećenje DNK stanica mozga Swiss albino miševa. Rezultati komet testa prikazani su kao prosječne vrijednosti dužine repa kometa ±SE.

Slika 6. Učinak inhalacijskih anestetika i cisplatine na oštećenje DNK stanica jetre Swiss albino miševa. Rezultati komet testa prikazani su kao prosječne vrijednosti dužine repa kometa ±SE.

Slika 7. Učinak inhalacijskih anestetika i cisplatine na oštećenje DNK stanica bubrega Swiss albino miševa. Rezultati komet testa prikazani su kao prosječne vrijednosti dužine repa kometa ±SE.

Slika 8 Učinak inhalacijskih anestetika i cisplatine na oštećenje DNK stanica Ehrlichovog ascitesnog tumora Swiss albino miševa. Rezultati komet testa prikazani su kao prosječne vrijednosti dužine repa kometa ±SE.

Slika 9. Retikulociti nakon obrade s jednim mikronukleusom

Slika 10. Broj retikulocita s mikronukleusima u perifernoj krvi Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika. Rezultati su prikazani kao prosječne vrijednosti broja mikronukleusa na 2000 retikulocita±SE.

Slika 11. Učinak inhalacijskih anestetika i cisplatine na broj tumorskih stanica u peritonealnoj tekućini Swiss albino miševa. Rezultati su prikazani kao prosječne

vrijednosti±SE postotaka živih stanica tumora u odnosu na broj živih stanica tumora u kontroli.

Slika 12. Prikaz rezultata postotaka apoptotičnih i nekrotičnih stanica te ukupnog broja mrtvih stanica dobivenih protočnim citometrom

Slika 13. Postotak apoptotičnih stanica tumora u peritonealnoj tekućini Swiss albino miševa izloženih po skupinama djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine. Rezultati su prikazani kao prosječne vrijednosti±SE postotaka apoptotičnih stanica tumora u odnosu na ukupan broj tumorskih stanica u kontrolnoj skupini miševa nositelja tumora.

Slika 14. Postotak nekrotičnih stanica tumora u peritonealnoj tekućini Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine. Rezultati su prikazani kao prosječne vrijednosti±SE postotaka nekrotičnih stanica tumora u odnosu na ukupan broj tumorskih stanica u peritonealnoj tekućini miševa nositelja tumora.

Slika 15. Postotak mrtvih stanica tumora u peritonealnoj tekućini Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine. Rezultati su prikazani kao prosječne vrijednosti±SE postotaka mrtvih stanica tumora u odnosu na ukupan broj tumorskih stanica u peritonealnoj tekućini miševa nositelja tumora.

Slika 16. Broj eritrocita Swiss albino miševa po skupinama izloženih djelovanju cisplatine i inhalacijskih anestetika. Rezultati su prikazani kao prosječni broj eritrocita±SE

Slika 17. Koncentracija hemoglobina Swiss albino miševa po skupinama izloženih djelovanju cisplatine i inhalacijskih anestetika. Rezultati su prikazani kao prosječne koncentracije hemoglobinaa±SE

Slika 18. Ukupni broj leukocita periferne krvi Swiss albino miševa izloženih djelovanju cisplatine i inhalacijskih anestetika. Rezultati su prikazani po skupinama kao prosječni broj lekocita±SE.

Slika 19. Postotak neutrofila od ukupnog broja leukocita u perifernoj krvi Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine. Rezultati su prikazani kao prosječne vrijednosti±SE.

Slika 20. Postotak limfocita od ukupnog broja leukocita u perifernoj krvi Swiss albino miševa izloženih po skupinama djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine. Rezultati su prikazani kao prosječne vrijednosti±SE.

Slika 21. Postotak monocita od ukupnog broja leukocita u perifernoj krvi Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine. Rezultati su prikazani kao prosječne vrijednosti±SE.

Slika 22. Koncentracija alkalne fosfataze u perifernoj krvi Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine. Rezultati su prikazani kao prosječne vrijednosti±SE.

Slika 23. Koncentracija aspartat aminotransferaze u perifernoj krvi Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine. Rezultati su prikazani kao prosječne vrijednosti±SE.

Slika 24. Koncentracija alanin aminotransferaze u perifernoj krvi Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine. Rezultati su prikazani kao prosječne vrijednosti±SE postotaka.

Slika 25. Koncentracija ukupnih proteina u perifernoj krvi Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine. Rezultati su prikazani kao prosječne vrijednosti±SE.

Slika 26. Koncentracija ureje u perifernoj krvi Swiss albino miševa po skupinama izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine. Rezultati su prikazani kao prosječne vrijednosti±SE.

Slika 27. Koncentracija kreatinina u perifernoj krvi Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine. Rezultati su prikazani po skupinama kao prosječne vrijednosti±SE.

12. POPIS TABLICA:

Tablica 1. Plan pokusa

Tablica 2. Statistička analiza rezultata komet testa limfocita periferne krvi Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine.

Tablica 3. Statistička analiza rezultata komet testa stanica mozga Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine.

Tablica 4. Statistička analiza rezultata komet testa stanica jetre Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine

Tablica 5. Statistička analiza rezultata komet testa stanica bubrega Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine

Tablica 6. Statistička analiza rezultata komet testa stanica Ehrlichovog ascitesnog tumora Swiss albino miševa po skupinama izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine

Tablica 7. Statistička analiza rezultata mikronukleus testa retikulocita periferne krvi Swiss albino miševa *in vivo* izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika

Tablica 8. Statistička analiza rezultata broj stanica Ehrlichovog ascitesnog tumora u peritonealnoj tekućini Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine

Tablica 9. Statistička analiza rezultata apoptoze stanica Ehrlichovog ascitesnog tumora u peritonealnoj tekućini Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine

Tablica 10. Statistička analiza rezultata nekrotičnih stanica Ehrlichovog ascitesnog tumora u peritonealnoj tekućini Swiss albino miševa izloženih djelovanju cisplatine i inhalacijskih anestetika

Tablica 11. Statistička analiza rezultata ukupnog postotka mrtvih stanica Ehrlichovog ascitesnog tumora u peritonealnoj tekućini Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine

Tablica 12. Statistička analiza rezultata ukupnog broja leukocita periferne krvi Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine

Tablica 13. Statistička analiza rezultata postotaka neutrofila u perifernoj krvi Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine
Tablica 14. Statistička analiza rezultata postotaka limfocita u perifernoj krvi Swiss albino miševa izloženih po skupinama djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine
Tablica 15. Statistička analiza rezultata postotaka monocita od ukupnog broja leukocita u perifernoj krvi Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine
Tablica 16. Statistička analiza rezultata koncentracije alkalne fosfataze u perifernoj krvi Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine
Tablica 17. Statistička analiza rezultata vrijednosti aspartat aminotransferaze u perifernoj krvi Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine
Tablica 18. Statistička analiza rezultata vrijednosti aspartat aminotransferaze u perifernoj krvi Swiss albino miševa po skupinama izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine
Tablica 19. Statistička analiza rezultata koncentracije ukupnih proteina u perifernoj krvi Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine
Tablica 20. Statistička analiza rezultata koncentracije ureje u perifernoj krvi Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine
Tablica 21. Statistička analiza rezultata koncentracije kreatinina u perifernoj krvi Swiss albino miševa izloženih djelovanju inhalacijskih anestetika i cisplatine