Osobitosti imunosnih stanica odbijene prasadi obrađene izofluranom i dušikovim oksidulom

Lerotić, Ivan

Doctoral thesis / Disertacija

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:429211

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

Ivan Lerotić

OSOBITOSTI IMUNOSNIH STANICA ODBIJENE PRASADI OBRAĐENE IZOFLURANOM I DUŠIKOVIM OKSIDULOM

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2015.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

DIVISION OF BIOLOGY

Ivan Lerotić

CHARACTERISTICS OF IMMUNE CELLS OF WEANED PIGS TREATED WITH ISOFLURANE AND NITROUS OXIDE

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2015.

Ovaj doktorski rad izrađen je na Klinici za kirurgiju, ortopediju i oftamologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr.sc. Dražena Vnuka, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Posebno zahvaljujem mentoru izv. prof. dr. sc. Draženu Vnuku na iskazanom povjerenju, podršsci, savjetovanju te velikoj stručnoj pomoći koju mi je nesebično pružio tijekom izrade doktorske disertacije.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Maji Popović i doc. dr.sc.Gordanu Mršiću na savjetima i stručnoj pomoći.

Doc. dr. sc. Andreji Gudan-Kurilj zahvaljujem na susretljivosti i pomoći pri histopatološkim pretragama tkiva.

Izrada citometrijskih rezultata ne bi bila moguća bez pomoći dr. sc. Dubravka Kezića i dr. sc. Daniela Špoljarića, kojima se također posebno zahvaljujem.

Također bih se zahvalio obitelji Milaković i gđi. Katarini Keser.

Isto tako, izrada ove doktorske disertacije bila je lakša uz svekoliku pomoć i podršku moje obitelji kojoj se posebno zahvaljujem.

Posebno se zahvaljujem svom kumu Mateju.

Na kraju, posebno se zahvaljujem svojoj supruzi Sanji.

Ovaj rad posvećujem Mateju Matejičeku.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorski rad

OSOBITOSTI IMUNOSNIH STANICA ODBIJENE PRASADI OBRAĐENE IZOFLURANOM I DUŠIKOVIM OKSIDULOM

IVAN LEROTIĆ

Opća bolnica "Dr. Ivo Pedišić", Sisak

U ovom doktorskom radu svinja je uzeta kao svjetski priznati model u biomedicinskim istraživanjima u cilju utvrđivanja mogućih štetnih učinaka anestetika izoflurana i permanentnog plina dušikovog oksidula na staničnu imunost nakon njihove višednevne ponovljene primjene. Provedeno je prospektivno, randomizirano, kontrolirano istraživanje koje je uključilo 28 prasadi dobrog općeg stanja. Ispitivane životinje, ovisno o tretmanu izofluranom samostalno ili u kombinaciji s dušikovim oksidulom, podijeljene su u skupine. Uzorci krvi za određivanje hematoloških, biokemijskih i imunosnih pokazatelja uzeti su 0., 4., 8., 16. i 24 dana istraživanja. Na kraju istraživanja uzeti su uzorci koštane moždine, slezene, pluća i limfnog čvora te je načinjena histopatološka pretraga. Dobiveni rezultati ovih istraživanja pokazuju da izofluran te njegova kombinacija s dušikovim oksidulom, u prasadi anestezirane tijekom 24 dana, imaju imunosupresijski učinak, odnosno smanjuju udjele subpopulacija (CD4+, CD8+, CD21+ i CD45+) limfocita u svinja. Međutim, u prasadi anestezirane dušikovim oksidulom i kisikom bez dodatka izoflurana tijekom 24 dana, na kraju istraživanja nije zabilježen njihov štetni učinak na stanični imunosni sustav. Dobiveni rezultati predstavljaju znanstveno utemeljenu preporuku da izofluran te njegovu kombinaciju s dušikovim oksidulom treba s oprezom upotrebljavati za potrebe višednevne anestezije na modelu domaće svinje kao i u humanoj medicini prilikom opetovanih anestezija s istim protokolom osobito u pacijenata gdje je primarna bolest već narušila imunosni sustav.

(70 stranica, 30 slika, 7 tablica, 73 navoda iz literature, jezik izvornika hrvatski)

Rad je pohranjen u

Ključne riječi: imunosne stanice, izofluran, dušikov oksidul, domaća svinja

Mentor: izv. prof. dr. sc. Dražen Vnuk
Ocjenjivači: izv. prof. dr. sc. Vesna Benković
prof. dr. sc. Maja Popović
prof. dr. sc. Dražen Matičić

Rad prihvaćen:

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral Thesis

CHARACTERISTICS OF IMMUNE CELLS OF WEANED PIGS TREATED WITH ISOFLURANE AND NITROUS OXIDE

IVAN LEROTIĆ

General hospital "Dr. Ivo Pedišić", Sisak

In this doctoral thesis pig is taken as a globally recognized model in biomedical research in order to identify potential adverse effects of anesthetics isoflurane and nitrous oxide permanent gas on cellular immunity after their multi-day repeated administration. This prospective, randomized, controlled trial involved 28 piglets in good general condition. Tested animals, depending on the treatment with isoflurane alone or in combination with the nitrogen oxide, were divided into groups. Blood samples for determination of hematologic, biochemical and immune parameters were taken at days 0, 4, 8, 16 and 24 of study. At the end of the study samples were taken from bone marrow, spleen, lung and lymph node and underwent histopathological examination. The results of these studies suggest that isoflurane and its combination with nitrogen oxide in pigs anesthetized for 24 days, have immunosuppressive effect or reduce stakes cell populations cellular immunity pigs (CD4+, CD8+, CD21+ and CD45+). However, in anesthetized piglets with nitrogen oxide and oxygen without addition of isoflurane for 24 days, at the end of the study was not recorded their harmful effect on the cellular immune system of animals. The results confirmed the initial hypothesis. The resulting immune indicators are a scientifically based recommendation that isoflurane and its combination with nitrogen oxide for the purpose of chronic anesthesia on a model of domestic pigs should be used with caution, especially if there is already a compromised immunity.

(70 pages, 30 figures, 7 tables, 73 references, original in Croatian)

Thesis deposited in

Keywords: immune cells, isoflurane, nitrous oxide, domestic pig

Supervisor: Associate Professor Dražen Vnuk, PhD
Reviewers: Associate Professor Vesna Benković, PhD
Professor Maja Popović, PhD
Professor Dražen Matičić, PhD

Thesis accepted:

SADRŽAJ

1. UVOD ... 1
2. PREGLED LITERATURE ... 3
2.1. Osobitosti imunosnih stanica u svinja ... 3
2.2. Inhalacijski anestetici ... 6
2.2.1. Izofluran ... 7
2.3. Permanentni plinovi ... 8
2.3.1. Dušikov oksidul ... 8
2.4. Znakovitosti primjene inhalacijske anestezije u svinje ... 9
3. MATERIJALI I METODE ... 10
3.1. Materijali ... 10
3.1.1. Tehnološki uvjeti u štali ... 10
3.2. Životinje ... 10
3.2.1. Protokol istraživanja ... 10
3.2.2. Monoklonska, poliklonska protutijela i konjugati ... 11
3.3. Metode ... 12
3.3.1. Prikupljanje bioloških uzoraka ... 12
3.3.1.1. Uzorci periferne krvi ... 12
3.3.1.2. Uzorci slezene, perifernog limfnog čvora, koštane moždine i pluća ... 13
3.3.2. Eutanazija ... 13
3.3.3. Imunosni pokazatelji ... 14
3.3.3.1. Metoda imunofenotipizacije ... 14
3.3.4. Hematološki pokazatelji ... 14
3.3.5. Biokemijski pokazatelji ... 15
3.3.6. Patoanatomska i histopatološka pretraga ... 15
3.3.7. Statistička obrada ... 15
4. REZULTATI ... 17
4.1. Vrijednosti hematoloških pokazatelja ... 17
4.2. Vrijednosti biokemijskih pokazatelja ... 28
4.3. Vrijednosti imunosnih pokazatelja ... 36
4.4. Patoanatomski nalaz ... 42
4.5. Histopatološki nalaz ... 42
5. RASPRAVA ... 52
6. ZAKLJUČCI ... 57

7. LITERATURA 59
8. KRATICE I SIMBOLI 67
9. ŽIVOTOPIS 69

1. UVOD

U veterinarskoj medicini najčešće korišteni pripravci za održavanje opće anestezije su inhalacijski anestetici sevofluran, dezfluran i izofluran. Glavni metaboliti izoflurana su fluorooctena kiselina i anorganski fluor, a njihova količina je minimalna pa su netoksični za anestezirane svinje, ali i stručno osoblje u operacijskoj dvorani. Visoka hlapljivost izoflurana, uz njegovu slabu topivost u krvi omogućuju brzu indukciju anestezije te laganu regulaciju i kontrolu dubine anestezije. Izofluran se često koristi u kombinaciji s dušikovim oksidulom (1). Uz prethodno navedene prednosti, poznato je da izofluran, ovisno o primjenjenoj dozi *in vivo,* na stanice djeluje kao impuls koji izaziva mnoge reakcije, uključujući prilagodbu, oštećenje, proliferaciju, apoptozu i nekrozu (2). U pokusu na miševima, opisuju se citotoksični i genotoksični učinak izoflurana, posebice na stanice jetre, bubrega i mozga. Mehanizmi toksičnosti izoflurana mogu biti izravni i neizravni, prouzročeni prisutnošću toksičnih metabolita i njihovim kovaletnim vezivanjem na stanične makromolekule (proteine i lipide) i/ili pojavnošću imunosnog odgovora na "modificirane" izmijenjene jetrene proteine prouzročene reaktivnošću metabolita i posljedičnim stvaranjem imunokompleksa i autoprotutijela na vlastite tkivne komponente (3). Na modelu stanica porijeklom iz srca zamorčića, u *in vitro* uvjetima uočeno je da izofluran smanjuje adheziju neutrofila za stanice endotela koronarnih krvnih žila nakon inducirane ishemije. Mehanizam tog djelovanja nije razjašnjen, ali kako u procesu adhezije sudjeluju membranski proteini, pretpostavlja se da izofluran interferira sa sintezom proteina koji sudjeluju u procesu adhezije neutrofila (4). Nalaz oštećene deoksiribonukleinske molekule (DNK) limfocita periferne krvi, u anesteziologa i anesteziloških tehničara svakodnevno izloženih malim dozama izoflurana, halotana i dušikovog oksidula u operacijskim dvoranama, upućuje na njihovu genotoksičnost, ali posljedično tomu i na imunosupresijski učinak (5). Naime, u *in vitro* uvjetima izofluran izaziva apoptozu limfocita, a postotak stanica zahvaćenih apoptozom povećava se produžavanjem vremena izlaganja i povećanjem doze izlaganja (6). Literaturni podatci u okviru biomedicinskih istraživanja oskudni su informacijama o učincima inhalacijskih anestetika na staničnu imunost životinja. Međutim, na osnovi dosadašnjih spoznaja vezanih uz višednevnu primjenu dušikovog oksidula ustanovljeno je da dušikov oksidul (70%) u kombinaciji s izofluranom može promijeniti imunosni odgovor smanjenjem kemotaktične aktivnosti neutrofila i monocita (7). Naime, u literaturi su opisani imunosupresijski učinci, odnosno utvrđeni sniženi udjeli $CD4^+$, $CD8^+$, $CD21^+$ i $CD45^+$ limfocita nakon ponovljive inhalacijske anestezije sevofluranom ili kombinacijom sevoflurana i dušikovog oksidula kroz

21 dan u kunića (8). Također sličan nalaz imunofenotipizacije limfocitarnih staničnih subopulacija svinje, opisan je nakon primjene sevoflurana pojedinačno ili u kombinaciji s kisikom i dušikovim oksidulom (9).

U recentnoj literaturi nema opisanih sličnih istraživanja na modelu životinja nakon primjene izoflurana pojedinačno ili u kombinaciji s dušikovim oksidulom. Stoga je od interesa za unapređenje dosadašnjih saznanja iz područja anestezije ispitati izofluran na životinjskom modelu i to s ciljem da se prouče njegovi učinci na staničnu imunost nakon višednevne primjene te unaprijede dosadašnja saznanja na području anesteziologije i imunologije. Kako bi to dokazali, glavni ciljevi našeg istraživanja su bili sljedeći:

- istražiti utjecaj izoflurana primjenjenog samostalno ili u kombinaciji s dušikovim oksidulom na staničnu imunost u svinje nakon njegove primjene kroz 24 dana gdje očekujemo imunosupresiju stanične imunosti koja se prati određivanjem $CD4^+$, $CD8^+$, $CD21^+$ i $CD45^+$ limfocita u životinja tretiranih različitim kombinacijama primijenjenih pripravaka;
- istražiti vrijednosti hematoloških pokazatelja svinja nakon primijene izoflurana samostalno ili u kombinaciji s dušikovim oksidulom;
- istražiti vrijednosti biokemijskih pokazatelja svinja nakon primijene izoflurana samostalno ili u kombinaciji s dušikovim oksidulom;
- analizirati imunohistološke i histomorfometričke promjene koštane moždine i slezene te pokazatelje histopatoloških promjena koštane moždine, slezene, pluća i limfnog čvora nakon primijene izoflurana samostalno ili u kombinaciji s dušikovim oksidulom.

U okviru našeg istraživanja proučavajući utjecaj izoflurana pojedinačno ili u kombinaciji s dušikovim oksidulom na staničnu imunost, prasad smo ovisno o primjenjenoj inhalaciji podijelili u četiri skupine sa po sedam prasadi. Krvne uzorke za određivanje hematoloških i biokemijskih pokazatelja te subpopulacije $CD4^+$, $CD8^+$, $CD21^+$ i $CD45^+$ limfocita uzimali smo 0., 4., 8., 16. i 24. dana istraživanja. Na kraju istraživanja eutanizirali smo iz svake skupine po dvoje prasadi te na uzorcima tkiva pluća, slezene, perifernog limfnog čvora i koštane moždine pratili smo patoanatomske i histopatološke promjene.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Osobitosti imunosnih stanica u svinja

Razvitak i sazrijevanje imunosnog sustava te njegovih staničnih i molekularnih sastavnica, započinje u ranom embrionalnom razvitku svinje pa sve do otprilike 7. tjedna života (10). Općeniti zaključak malog broja radova koji opisuju razvitak imunosti u svinje upućuje na pojavu umanjenog broja imunosnih efektorskih stanica i njihovu oslabljenu reaktivnost te posljedičnu imunodeficijenciju u mlade prasadi. Primjerice, u prasadi bez specifičnog patogena (engl. specific-pathogen free = SPF) utvrđen je znatan broj nezrelih B-limfocita u slezeni, limfnim čvorovima, Peyerovim pločama (PP) i timusu 2 dana prije rođenja (11). Odmah po prasenju, raste broj B-limfocita, napose broj IgM^+ stanica, a potom se povećava broj IgG^+ i IgA^+ stanica, ovisno o istraživanom limfatičkom tkivu. Za razliku od B-limfocita, različite subpopulacije T-limfocita su dobro razvijene već prije rođenja u većini limfatičkih tkiva, a njihov je porast brojnosti primijećen u slezeni i lamini propriji (LP) tankog crijeva (12). Poznato je da, u limfatičkim tkivima i organima, pri rođenju prasadi, u potpunosti je razvijen T-stanični odjeljak (13), dok glavni dotok T stanica u sluznici crijeva počinje nakon rođenja i traje do približno 7. tjedna života (14). Isto tako, opisana je raspodjela T stanica u sluznici tankog crijeva (LP) šestomjesečne svinje (15). Općenito se smatra da su imunosne efektorske stanice prisutne u limfatičkim organima prije razvitka aktivne imunosti, odnosno prije dodira s egzogenim antigenima. Slijed topografskog i funkcijskog razvitka imunosnih organa i tkiva te pojava limfoidnih i mijeloidnih stanica tijekom prenatalnog i ranog postnatalnog razdoblja, prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. Embrionalni i postnatalni slijed u razvitku i sazrijevanju imunosnih organa, tkiva, stanica i molekula svinje (izvor. Valpotić, I., 2001).

Dan embrionalnog/ postnatalnog života	**Zbivanje u razvitku/sazrijevanju limfatičkih organa i tkiva, odnosno limfoidnih i mijeloidnih stanica te imunosnih molekula svinje**
21	Rudiment timusa
22	Rudiment slezene
24	Pojava prekursora makrofaga u žumanjčanoj vreći
25	Makrofagi u jetri
28	Limfoidne stanice i mijeloblasti u jetri, limfoidne stanice u području timusa
32	Limfne žile u slezeni
40	γδ T stanice i pre-B- stanice u jetri, limfociti u omentumu
44	$CD4^+$ i $CD8^+$ T stanice u timusu, $sIgM^+$ B stanice u jetri, limfociti u slezeni i LČ
50	Spontano lučenje IgM od jetrenih B stanica, T stanice u slezeni i koži, kori i srži timusa, limfociti u koštanoj moždini i crijevu
60	FcR za vezanje komplementa na površini splenocita
67	Timusne B stanice luče neznatne količine IgM, IgG i IgA
77	Formiranje folikularne građe PP
01	Limfociti i makrofagi u ispirku alveola bronha
26	Zametni centri u LČ i PP
49	Adultne vrijednosti staničnih i humoralnih imunosnih pokazatelja

Po mnogim osobitostima, molekularni fenotipovi svinjskih leukocita i njihovih subpopulacija, više su slični ljudskim nego onima u laboratorijskih glodavaca. Međutim, subpopulacije limfoidnih stanica u adultnih svinja imaju nekoliko posebnosti (16). Primjerice, dok u ostalih istraživanih sisavaca T-limfociti ispoljavaju ili CD4 (pomoćnička funkcija) ili CD8 (citolitička funkcija) molekule, u svinje postoje značajne subpopulacije dvostruko pozitivnih ($CD4^+$, $CD8^+$) i dvostruko negativnih ($CD4^-$, $CD8^-$) stanica (17). Osim toga, razmjerno veliki postotak svinjskih $CD8^+$ stanica ispoljava visoku razinu molekula razreda II glavnog sustava tkivne snošljivosti (engl. Major histocompatibility complex = MHC). Pored nelimfoidnih stanica (neutrofila, eozinofila, bazofila, monocita, makrofaga i dendritičkih stanica) koje sudjeluju u staničnom imunosnom odgovoru, napose u prikazivanju antigena, glavnu ulogu imaju 4 porodice limfocita, odnosno B stanice, $CD3^+CD2^+$ αβ T stanice, $CD3^+$γδ T stanice i $CD3^+$ stanice. Najintrigantnije i najistraživanije među njima su $CD3^+CD2^+$ αβ ili γδ T stanice, poznatije kao nulte T stanice (18). Ove prethodne zbog svojih neuobičajenih dvostruko pozitivnih ili negativnih subpopulacija i nekonvencionalnih funkcija (19), a potonje zbog svoje pojavnosti i apsolutnih brojeva u krvi nekih svinja (~ 50% i < 10^7/mL) te nekoliko

novih molekula koje definiraju nekoliko subpopulacija γδ T stanica potpuno nepoznate funkcije (20). Mnoge stanice imaju sposobnost prikazivanja antigena, (engl. Antigen-presenting cells= APC) koje uključuju makrofage/monocite, dendritičke stanice i B limfocite. Jedini pravi mijeloidni marker je SWC3 molekula prisutna na svinjskim makrofagima/monocitima i granulocitima. Osim nje na mononuklearnim fagocitima nalaze se CD18, CD21 (na B stanicama i folikularnim dendritičkim stanicama) i CD25 (IL-2 receptor) funkcijske molekule (21). Svinjski T-limfociti mogu se pak karakterizirati kao stanice (kojih u perifernoj krvi ima oko 55%), porijeklom iz timusa (22). Temeljem imunofenotipske karakterizacije membranskih diferencijacijskih (CD/SWC) antigena do danas je identificirano 37 subpopulacija leukocita (23). CD3 molekula koja je uvijek udružena s TCR (T stanični receptor) najpouzdaniji je biljeg T stanica (24).

U perifernoj krvi odraslih svinja su prema The Merck Manual (1998.) uobičajene sljedeće vrijednosti: leukociti 11-22 $x10^9$/L, limfociti 35-75%, segmentirani neutrofili 20-70%, nesegmentirani neutrofili 0-4%, monociti 0-10%, eozinofili 0-15%, bazofili 0-3% (25).

U perifernoj krvi svinja T- limfociti čine 45-57%, B- limfociti 26-38%, a oko 5% svrstani su u 0-limfocite (26). U stanju "mirovanja", odnosno imunosnog neaktiviranja, u perifernoj krvi odraslih svinja, biljezi subpopulacija T- limfocita zastupljeni su u različitim udjelima: TCRαβ (14-34%), TCRγδ (31-39%), CD2 (58-72%), CD4 (23-43%) i CD8 (17-39%), što odražava i relativnu brojnost tih stanica. Podskupina dvostruko pozitivnih $CD4^+CD8^+$ s memorijsko-citolitičkom funkcijom prisutna je u izvantimusnim prostorima (27), a obzirom na druge vrste prisutna je samo u timusu tijekom razvoja i to više od 15% pa se smatra nezrelim T-limfocitima (28). U perifernoj krvi ima ih više od 60%, a također su prisutni i u odjeljcima crijevnog imunosnog sustava (29). Od ukupnog broja limfocita na B stanice otpada 13-38%. Tijekom sazrijevanja, na površini B- limfocita pojavljuju se i drugi diferencijacijski antigeni: CD1, SWC7 i CD21 (30), a njihova fenotipska ekspresija razlikuje se ovisno o tkivu/organu svinje (28, 31, 32). Prethodno opisano proizlazi na osnovi specifičnosti imunosnog sustava svinje vezane uz obrnutu građu limfnog čvora (u središtu im se nalazi limfni folikul) te velikog broja jejunalnih i ileocekalnih Peyerovih ploča. Jejunalne Peyerove ploče sadrže podjednake udjele B i T-limfocita cijelog života svinja za razliku od ileocekalnih Peyerovih ploča u kojih se udjeli B- limfocita smanjuje tijekom prve godine života (33, 12). Nadalje, u u kupolama Peyerovih ploča u blizini M stanica smještene su dendritičke stanice koje su vrlo važne za imunosni nadzor epitelnih površina sluznice crijeva (34). U svinja za obranu sluznice probavila od antigena iz okoliša od iznimne je važnosti sekrecijski IgA kojeg

proizvode plazmociti LP uz pomoć T stanica (35). Također i neutrofili imaju značajnu ulogu u lokalnoj, nespecifičnoj obrani sluznice probavnog sustava svinje koji potaknuti reakcijom kompleksa antigen-protutijelo, ovisno o sekrecijskom IgA protutijelu migriraju u lumen crijeva (36). Migracija neutrofila u lumen crijeva ovisi o prisustvu cirkulacijskih IgG te kolostromskih ili sekrecijskih IgA protutijela (37, 38, 39). Tijekom kemotaksijskog odgovora neutrofili vezući se specifičnim receptorima za adhezijske molekule endotela tkivnih kapilara, prolazeći kroz kapilare do inficiranih tkiva, aktiviraju se i izlučuju upalne medijatore ili citokine, kao i reaktivne metabolite kisika kojima uništavaju bakterijsku stanicu (40). Primjenom postupaka molekularnog kloniranja utvrđena je narav i uloga brojnih citokina, kao što su faktor nekrotiziranja tumora α (TNFα), interleukin-1 (IL-1), IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 i kemokini, transformacijski činitelj rasta β (TGFβ), IL-3, -5, -7 i 10 te činitelj stimulacije kolonija (CSF) u imunologiji svinje (41). U svinje je također otkrivena prisutnost tri tipa interferonske (IFN) podfamilije I (IFNα, β i ώ) i jedan tip (IFNγ) IFN podfamilije II (42).

2.2. Inhalacijski anestetici

Inhalacijski anestetici su lijekovi koji se u humanoj i veterinarskoj medicini najčešće koriste za održavanje opće anestezije, a povremeno se koriste i za uvod u opću anesteziju. Nespecifični mehanizam djelovanja inhalacijskih anestetika vezan je uz lipidni sloj stanične membrane (43). Lako se titriraju, pouzdani su u sprečavanju sjećanja, a dubina anestezije se može brzo prilagoditi na predvidiv način praćenjem koncentracije inhalacijskog anestetika na kraju udaha. Učinkoviti su bez obzira na dob i habitus. Posjeduju i svojstva korisna za vrijeme operacije, kao što su relaksacija skeletnih mišića, očuvanje srčanog izbačaja i moždanog protoka, relativno predvidiv profil buđenja i zaštitu organa od ishemijske ozljede. Isto tako, poznati su nedostaci inhalacijskih anestetika, a to su nedostatak analgetičkog učinka, povezanost s poslijeoperacijskom mučninom i povraćanjem, mogućnost nastanka ugljikova monoksida za vrijeme anestezije i posljedična intoksikacija i mogućnost nastanka hepatitisa (pri korištenju halotana). Danas se najčešće primjenjuju sevofluran, dezfluran i izofluran (43, 44). Apsorpcija inhalacijskih anestetika u krv i distribucija u druga tkiva određeni su njihovom topljivošću u krvi (koeficijent krv/plin), plućnim krvnim protokom, protokom krvi kroz pojedine organe, topljivošću anestetika u pojedinim tkivima (koeficijent tkivo/krv) i masnim tkivima. Stoga, inhalacijskom anestezijom treba postići i održati nužni i dovoljni parcijalni tlak inhalacijskog anestetika na mjestu djelovanja u moždanom tkivu (43). Isto tako, poznato je da će davanje visoke koncentracije permanentnog plina dušikovog oksidula (N_2O)

olakšati porast alveolarne koncentracije inhalacijskog anestetika (npr. izoflurana) te se taj fenomen naziva "učinak drugog plina" (44). U kliničkoj praksi teži se onoj alveolarnoj koncentraciji inhalacijskog anestetika kojom se održava anestezija, a to je ona minimalna alveolarna koncentracija (MAK) inhalacijskog anestetika pri jednoj atmosferi koja sprečava pokret u 50% pacijenata kao odgovor na bolnu stimulaciju (npr. kožni rez) (43). Idealni inhalacijski anestetik trebao bi brzo početi svoje djelovanje, ono bi moralo biti predvidivo, oporavak brz, a djelovanje na mozak i druge organe ne bi smjelo postojati nakon anestezije.

2.2.1. Izofluran

Izofluran je halogenirani metil-etilni eter koji je bistra, nezapaljiva tekućina pri sobnoj temperaturi. Ima visoki stupanj nadražljivosti na dišne puteve. Najjači je od inhalacijskih anestetika te je u kliničku uporabu ušao 1970. godine. Ima veliku fizikalnu stabilnost i gotovo se ne razgrađuje (za vrijeme skladištenja do 5 godina ili pri izlaganju svijetlu pa je tako postao "zlatni standard" anestetika) (43). Izofluran u krvi ima slabi koeficijent topljivosti što rezultira brzim uvođenjem u opću anesteziju, a i sam oporavak iz anestezije je brz (44). U prasadi za vrijeme kastracije, uspoređujući učinke izofluranske i sevofluranske anestezije, nisu uočene značajne razlike osim što je prilikom izvođenja anestezijskog protokola izofluranom vrijeme uvoda u anesteziju bilo kraće, a vrijeme buđenja bilo duže (45). U ljudi se izofluran u organizmu metabolizira manje od 1%, a također se minimalno izlučuje preko bubrega. U većim koncentracijama opažene su vazodilatacija i hipotenzija. Većinom se nepromijenjen izdiše plućima, stoga je pogodan kod bolesti jetre i bubrega (43). Tako je uočeno da izofluran u miševa smanjuje ishemijsko reperfuzijsku ozljedu bubrega i modulira leukocitnu infiltraciju bubrega (46). Nije zapaženo povećanje koncentracije alanin-aminotransferaze u krvnim uzorcima svinja anesteziranih desfluranom i izofluranom odmah nakon anestezije te nakon 24 sata i 4-7 dana nakon završetka anestezije (47).

Poznato je imunosupresijsko djelovanje izoflurana na imunosne stanice. Za vrijeme kraniotomije u ljudi uočeno je da anestezija intravenskim anestetikom propofolom tijekom jednokratne izloženosti smanjuje kirurškim stresom potaknuti imunosni odgovor u usporedbi s izofluranskom anestezijom (48).

Isto tako, nisu uočene značajne razlike u imunosnom odgovoru prilikom anestezije provedene intravenskim anestetikom propofolom i inhalacijskim anestetikom izofluranom nakon učinejne histerektomije u ljudi (49). Ustanovljeno je da izofluran inducira apoptozu

polimorfonuklearnih neutrofila ovisno o primjenjenoj dozi *in vivo* i *in vitro* (2). Citotoksični i antiproliferacijski učinak na stanice tumora dokazan je na humanom modelu izofluranom primjenjenim *in vitro* (50).

Na oksidacijski odgovor neutrofila na infekciju, izofluran kao i drugi inhalacijski anestetici poput sevoflurana i dezflurana imaju minimalan učinak (51). Isto tako, u *in vitro* istraživanju, puna krv je inkubirana s 0,5 i 1 MAK izoflurana kroz 60 minuta. Uočeno je da izofluran utječe na aktivaciju 3 molekule zadužene za adheziju koje su bitne u procesu mobilizacije neutrofila (52).

2.3. Permanentni plinovi

Pod pojmom gore navedenog naslova u anesteziji koristimo plinove kisik i dušikov oksidul te zrak (43).

2.3.1. Dušikov oksidul

Dušikov oksidul je jedan od najstarijih i najrasprostranjenijih plinova korištenih pri inhalacijskoj anesteziji. U veterinarskoj i humanoj medicini najčešće se primjenjuje u kombinaciji s drugim inhalacijskim anesteticima. U veterinarskoj medicini uočeno je da dušikov oksidul ima slabo analgetsko djelovanje, za razliku od humane medicine gdje je dušikov oksidul u 50% koncentraciji u hitnih pacijenta bolji analgetik od konvencionalno korištenih analgetika (1, 53). Analgetska svojstva dušikova oksidula u ljudi manja su nego što se do sada mislilo (54). Uočeno je da dušikov oksidul potiče otpuštanje opioidnih peptida u mozgu čovjeka (55). Dušikov oksidul pokazuje svoje štetno djelovanje radi prelaska iz krvi u tjelesne šupljine i šuplje organe i na taj način povisuje njihov unutrašnji tlak, a to uključuje akutnu crijevnu opstrukciju, pneumotoraks, zračnu emboliju itd. (44, 56).

Od štetnih učinaka poznat je njegov nepovoljan učinak na koštanu moždinu i druga tkiva s posljedicom ubrzanog dijeljenja stanica. Ustanovljeno je da dušikov oksidul može promijeniti imunosni protuupalni odgovor pokretanjem aktivnosti polimorfonuklearnih leukocita (44). Isto tako, njegovo djelovanje (70% N_2O u kombinaciji s izofluranom) može promijeniti imunosni odgovor smanjenjem kemotaktične aktivnosti neutrofila i monocita (7). Supresija koštane moždine ovisna je o dozi dušikovog oksidula i vremenu njegove ekspozicije pa će se obzirom na to razviti anemija slična pernicioznoj jer dolazi do inhibicije enzima metionin-sintetaze koji je uključen u metabolizam vitamina B_{12} (57). U miševa višednevno izloženih

inhalacijskim anesteticima halotanu i enfluranu u kombinaciji s dušikovim oksidulom uočen je toksični učinak na reproduktivne organe (58). Isto tako, opaženo je da anestezija kombinacijom izoflurana i dušikova oksidula potiče neuroapoptozu u novorođene prasadi (59).

2.4. Znakovitosti primjene inhalacijske anestezije u svinje

U anesteziji pokusnih životinja, anestezija svinje se izvodi učestalo i potrebno je poznavanje specifičnosti anestezije u svinja. Postoji nekoliko problema pri anesteziji svinje. Jedan od problema je tjelesna masa svinje koja može biti u odojka manje od jednog kilograma pa do odraslog nerasta koji mogu biti teški do 400 kilograma. Ipak, u istraživanju i za većinu operacija koristimo svinje tjelesne mase od 10-30 kg. Intravenska primjena lijeka u svinje je problematična jer periferne vene nisu vidljive zbog pretilosti životinje. Najčešće se koriste vene na uškama, a ako je potrebna intramuskularna injekcija potrebno je koristiti iglu dugačku najmanje 3 cm, jer je debel sloj potkožnog masnog tkiva. Mjesta na kojima se svinjama daju intramuskularne injekcije su lateralna strana vrata neposredno kaudalno od uha te slabina ili područje stražnje noge. Kod intravenske primjene lijekova koriste se *v.saphena lateralis* i *medialis*, *v.jugularis* uz već spomenutu venu na ušci.

Kod pripreme svinje za anesteziju preporuča se period posta u trajanju od minimalno 12-24 sata kako bi se ispraznili trbušni organi i na taj način smanjio intrabadominalni tlak.

Endotrahealna intubacija svinje može biti problematična. Svinja ima vrlo dugačku gubicu pa je ponekad intubacija zahtjevna jer je vidljivost grkljana otežana. Ponekad je problem i laringospazma pa se preporuča koristiti lidokain u spreju. Ako intubacija nije moguća ponekad je potrebno učiniti traheotomiju svinje.

Za indukciju anestezije u svinje najčešće se koriste barbiturati, ali se koriste i disocijativni anestetici te inhalacijski anestetici. Barbiturati se često koriste i imaju svojih prednosti i nedostataka. Barbiturati su vrlo jeftini anestetici i izazivaju brzi uvod u anesteziju. Problem je što, ako se primjenjuju paravenski, mogu izazvati nekrozu kože na mjestu primjene, nemaju analgetsko djelovanje, doza za indukciju anestezije i doza koja izaziva apneju su gotovo jednake (60, 61, 62).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Tehnološki uvjeti u štali

Istraživanje smo proveli u štali Klinike za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

U štali su životinje bile smještene u kontroliranim mikroklimatskim uvjetima. Štala je imala prozore preko kojih je prozračivan prostor te su prozori također služili kao izvor prirodne svjetlosti. Na stropu štale nalazila su se i umjetna rasvjetna tijela. Pokusnu prasad smo smjestli u odjeljke koji su imali betonski pod, a na njemu je bila stelja u obliku slame i piljevine koju smo mijenjali jedanput dnevno. Prasad je hranjena standardnom krmnom smjesom za tovnu prasad, a napajana je putem pojilice. Istraživanja ovoga rada Povjerenstvo za etiku u veterinarstvu Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu ocijenilo je etički prihvatljivim i znanstveno opravdanim (Kl.: 640-01/12-17/26, ur. br.: 251/61-01/139-12-2).

3.2. Životinje

U istraživanje je bilo uključeno 28 prasadi pasmine križani landras, dobrog zdravstvenog stanja, tjelesne težine oko 12 kg. Životinje smo smjestili u odjeljke ograđene betonskim zidom i drvenom pregradom te smo ih nasumično podijelili u 4 skupine, koje su se sastojale od 7 prasadi, podjednakog broja muških kastrata i ženki odbijenih u dobi od 26 dana. Prasad je hranjena dvaput dnevno. Tijekom cijelog pokusa voda im je bila dostupna *ad libitum*.

3.2.1. Protokol istraživanja

Prasad smo podijelili u 4 pokusne skupine, a svaka skupina sastojala se od 7 prasadi (Tablica 2). Pokusne skupine obilježili smo kao: A, B, C, D. U pokusu smo koristli slijedeće pripravke:

1. izofluran (Forane, Abbott Laboratories Ltd, Velika Britanija);
2. dušikov oksidul (Messer, Hrvatska).

Tablica 2. Plan pokusa sukladno kronološkom uzimanju uzorka i slijedu mjerenja.

Skupina	A (n=7)	B (n=7)	C (n=7)	D (n=7)
Protokol pojedine skupine	Protok kisika 2 l/min,	Protok 0,8 l/min kisika i 1,2 l/min dušikova oksidula	izofluran (3% u prvih 5min. zatim 2%); protok kisika 2 l/min,	izofluran (2% u prvih 5 min. zatim 1,3%); protok kisika 0,8 l/min O_2 i 1,2 l/min dušikova oksidula
Dnevno trajanje protokola *	15 minuta	15 minuta	5+10 minuta	5+10 minuta
Vađenje krvi po danima pokusa	0., 4., 8., 16., 24.	0., 4., 8., 16., 24.	0., 4., 8., 16., 24.	0., 4., 8., 16., 24.
Žrtvovanje i uzorkovanje tkiva po danima pokusa **	0., 24.	0., 24.	0., 24.	0., 24.

* pokus je trajao 24 dana
** uzeti uzorci tkiva iz: slezene, perifernog limfnog čvora, koštane moždine i pluća za potrebe histopatološke pretrage.

U skupini A prasad smo tretirali 100% kisikom protokom 2 l/min (kontrolna skupina). U skupini B prasad smo tretirali kombinacijom kisika 40% protokom 0,8 l/min i dušikovog oksidula 60% protokom 1,2 l/min. U skupini C prasad smo tretirali kombinacijom kisika 100% protokom 2 l/min i izoflurana, a u skupini D prasad smo tretirali kombinacijom kisika 40% protokom 0,8 l/min, dušikovog oksidula 60% protokom 1,2 l/min i izoflurana. Pokusnu prasad inhalirali smo tijekom 15 minuta kroz 24 dana svaki dan. Prije početka pokusa žrtvovali smo jedno prase te smo na kraju pokusa dvadeset i četvrtog dana žrtvovali po dvoje prasadi iz svake skupine pri čemu smo uzeli uzorke tkiva slezene, perifernog limfnog čvora, koštane moždine i pluća.

3.2.2. Monoklonska, poliklonska protutijela i konjugati

Za potrebe citometrijskih istraživanja subpopulacije leukocita periferne krvi koristili smo monoklonska protutijela (mPt), (Abcam, Cambridge, Velika Britanija i AbD Serotec, Kidlington, Oxford, Velika Britanija), a mišja monoklonska protutijela konjugirali smo fluorescentnim bojama fluorescein-izotiocijanatom (FITC) ili fikoeritrinom (Pe) (Tablica 3).

Tablica 3. Korišteni konjugati za citometrijsku imunofenotipizaciju leukocita periferne krvi svinje i mišja monoklonska protutijela (mPt) specifična za svinjske leukocitne CD molekularne biljege.

mPt specifična za molekularni biljeg	CD45	CD21	CD8a	CD4
Izotip	IgG1	IgG1	IgG2a	IgG2b
Konjugat	FITC	FITC	Fikoeritrin	Pe/Cy5®
Stanična specifičnost	Leukociti	B-limfociti	Subpopulacija citolitičkih T stanica (T_c)	Subpopulacija pomoćničkihT-limfocita (T_h)
Izvor	AbD Serotec	Abcam	Abcam	Abcam

3.3. Metode

3.3.1. Prikupljanje bioloških uzoraka

Tijekom provedenog istraživanja uzimali smo uzorke periferne venske krvi 0., 4., 8., 16., 24. dana pokusa, dok smo za potrebe histopatološke pretrage, uzorke slezene, perifernog limfnog čvora, koštane moždine i pluća uzimali neposredno nakon žrtvovanja 0. i 24. dana pokusa.

3.3.1.1. Uzorci periferne krvi

Uzorke krvi uzimali smo iz *vena cephalica antebrachii* (Slika 1) u epruvete (Venosafe, Terumo, EU) s prethodno dodanim K-EDTA (etildiamintetriacetat) za određivanje hematoloških i imunosnih pokazatelja. Epruvete bez dodatka antikoagulansa s gelom (Venosafe, Terumo, EU) koristili smo radi odvajanja seruma, koji je korišten za određivanje biokemijskih pokazatelja. U laboratoriju Klinike za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu određivani su kompletna krvna slika (KKS) i biokemijski pokazatelji, dok su imunosni pokazatelji određivani na protočnom citometru Zavoda za biologiju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu.



Slika 1. Prikaz vađenja krvi iz *v.cephalica antebrachii* u pokusne prasadi.

3.3.1.2. Uzorci slezene, perifernog limfnog čvora, koštane moždine i pluća

Uzorke slezene, perifernog limfnog čvora (cervikalni superficijalni i sternalni limfni čvor), koštane moždine i pluća uzeli smo za vrijeme razudbe u sekcijskoj dvorani Zavoda za patologiju Veterinarskog fakulteta.

3.3.2. Eutanazija

U svrhu patoanatomskog pregleda 0. dana žrtvovali smo jedno prase te po dvoje prasadi iz svake skupine 24. dana pokusa. Neposredno prije eutanazije prasad smo anestezirali intramuskularnom primjenom ketamina (Narketan, Vetoquinol S.A., Lure Cedex, Francuska) u dozi 10 mg/kg i ksilazina (Xylapan, Vetoquinol, Belp Bern, Švicarska) u dozi 2 mg/kg. Nakon toga smo postavili intravensku kanilu u *v.auricularis* te je intravenski primijenjen preparat T-61 (Intervet International BV, Boxmeer, Kr. Nizozemska).

3.3.3. Imunosni pokazatelji

Imunosne pokazatelje odredili smo postupkom imunofenotipizacije i kvantifikacije svinjskih CD^+ subpopulacija T- i B-limfocita te ukupnih leukocita periferne krvi pomoću protočnog citometra Coulter EPICS-XL (Coulter, SAD).

3.3.3.1. Metoda imunofenotipizacije

Modificiranom metodom imunofenotipizacije membranskih CD biljega pomoću monoklonskih protutijela protiv svinjskih CD antigena odredili smo udio subpopulacija leukocita periferne krvi pokusne prasadi (63). Uzorke periferne krvi (100 μL) do obrade smo pohranili na 4˚C, a zatim razrijedili fosfatnim puferom (PBS; pH 7,4 – 7,6), a broj leukocita podesili smo na $2x10^6$/L. Suspenziji leukocita dodali smo 50 μL mPt specifičnog za pojedinu istraživanu subpopulaciju svinjskih CD^+ stanica (Tablica 3) i inkubirali na sobnoj temperaturi tijekom 20 minuta. Nakon inkubacije, stanice smo isprali u 2 mL PBS-a centrifugiranjem tijekom 5 minuta na 2000 okretaja/minuti. Supernatant smo odlili na talog dodali 50 μL kunićjeg i antimišjeg konjugata konjugiranog fluorescentnim bojama (FITC ili fikoeritrin) i inkubirali tijekom 20 minuta na sobnoj temperaturi. Stanice smo zatim isprali u 2 mL PBS-a centrifugiranjem 5 minuta na 2000 okretaja/minuti, talogu smo dodali 2 mL lizirajućeg reagensa (amonijevog klorida, NH_4Cl, pH 7,3) i inkubirali u mraku na sobnoj temperaturi 10 minuta. Supernatant smo odlili, a na talog dodali 1 mL PBS-a te u tako pripremljenim suspenzijama obilježenih leukocita, određivali smo udjele imunofenotipova svinjskih CD^+ stanica pomoću protočnog citometra Coulter EPICS-XL. Uzorke leukocita periferne krvi pripremili smo u triplikatu, a u svakom triplikatu je analizirano po 10.000 stanica (64, 65, 66).

3.3.4. Hematološki pokazatelji

Uzorke periferne krvi vadili smo u epruvete s dodanim K-EDTA (etildiaminintetriacetat). Zatim smo uzorke analizirali koristeći automatski elektronski brojač (Vet ABC, Animal Blood Counter, HORIBA ABX, Dyagnostic, Montpellier, Francuska), na kojem smo odredili sljedeće pokazatelje:

1. eritrocite (broj eritrocita, koncentracija hemoglobina, hematokrit, prosječni volumen eritrocita (MCV), prosječna masa hemoglobin po eritrocitu (MCH) i prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitima (MCHC);

2. trombocite (broj trombocita);

3. leukocite (broj leukocita, udjele neutrofila, limfocita i eozinofila).

Iz razmaza periferne krvi obojane po May Grünwald-Giemsi odredili smo diferencijalnu krvnu sliku.

3.3.5. Biokemijski pokazatelji

Glukozu, ukupne serumske bjelančevine, albumine, globuline i jetrene enzime (alanin aminotransferaza = ALT, aspartat aminotransferaza = AST, alkalna fosfataza = ALP, gama glutamil transferaza = GGT) uzimali smo iz seruma periferne krvi u serumske vakutanere (Venosafe, Terumo, EU) bez antikoagulansa s gelom. Zatim smo uzorke određivali pomoću automatskog analizatora (Olympus AU 600, Beckman, Coulter, SAD) u laboratoriju Klinike za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.3.6. Patoanatomska i histopatološka pretraga

Uzorke slezene, perifernog limfnog čvora, koštane moždine i pluća za patoanatomsku pretragu žrtvovane prasadi izradili smo u Zavodu za patologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Uzorke smo fiksirali u 10% puferiranoj otopini formalina, a zatim obradili za histopatološku pretragu i pregledali svjetlosnim mikroskopom s fotografskim uređajem (Nikon Microphot – FXA, Japan). Za potrebe histopatološke analize, fiksirani uzorci slezene, perifernog limfnog čvora, koštane moždine i pluća, procesuirani su u histokinetu (Thermo Scientific Shandom Citadel 2000) (dehidrirani u 75%, 96% i 100 %-tnom etanolu, zatim ksilenu te na kraju uklopljeni u smjesu parafina pri 56ºC). Pri sobnoj temperaturi, nakon hlađenja, blokove smo rezrezali mikrotomom (Microm HM 355S, Njemačka) na rezove debljine 4 μm i ravnali na površini vodene kupelji zagrijane na 50ºC. Tkivo smo zalijepili i izrezali na predmetna stakalca koja smo prethodno premazali s 2% APES-om (3-aminopropil-trietoksilen, Sigma, St. Louis, SAD). Uzorke smo bojali klasičnom hemalaun-eozin metodom u uređaju Microm autostainer HMS70. Nakon sušenja preparate smo histopatološki pretražili i snimili odabrana područja pojedinih preparata.

3.3.7. Statistička obrada

Statističkim programom STATISTICA, verzija 12 (Statsoft, SAD) napravili smo deskriptivnu analizu dobivenih rezultata. Kruskal-Wallis test smo koristili kao ne-parametrijski test, a

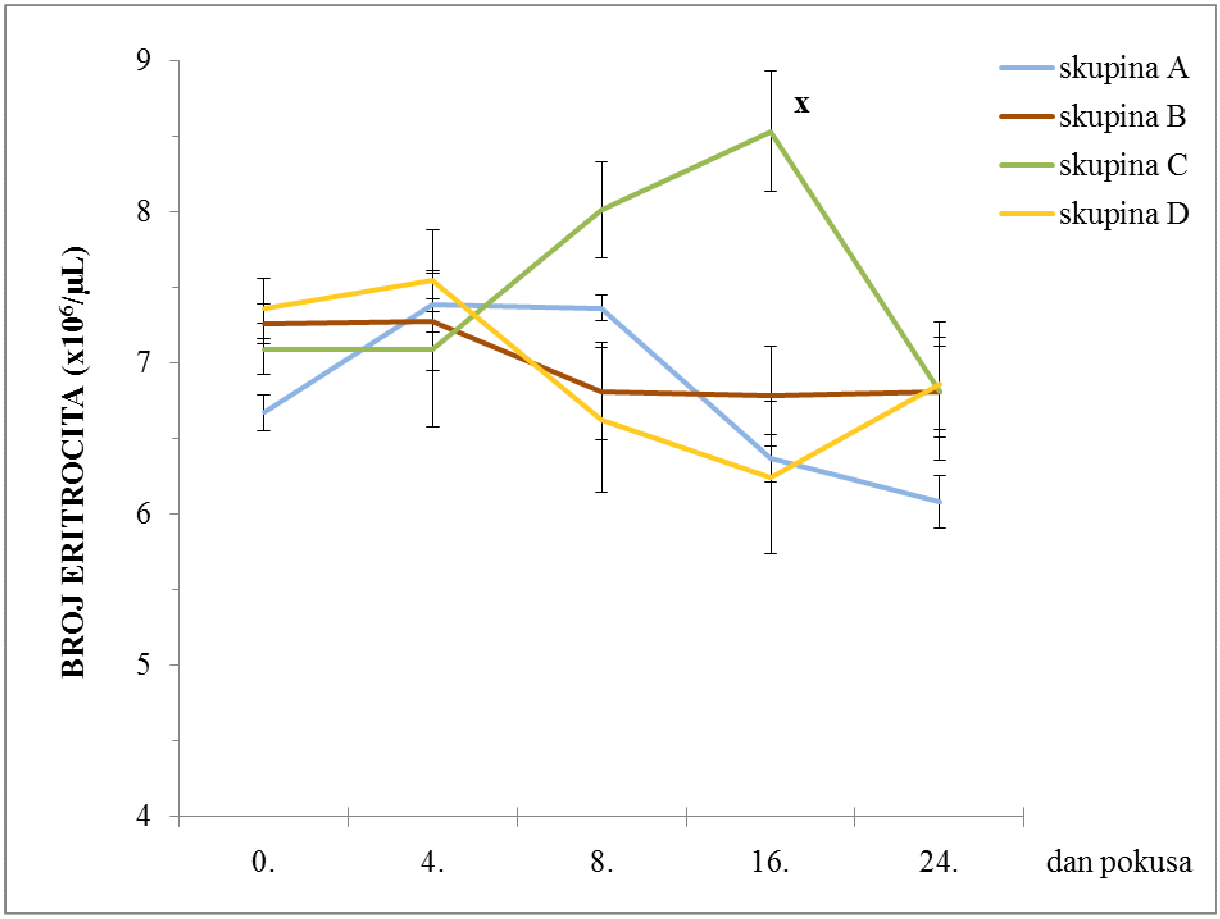
Kolmogorov-Smirnov test smo koristili za određivanje normalnosti distribucije podataka. Rezultate smo prikazali kao srednju vrijednost, a uz svaku prikazanu srednju vrijednost grafički smo označili kao vrijednost standardne devijacije. Pri tome smo međusobno označili statistički značajno različite skupine kod kojih je p vrijednost iznosila $\leq 0,05$.

4. REZULTATI

Tijekom istraživanja u trajanju od 24 dana dobivene rezultate smo prikazali u okviru 4 skupine pokazatelja: imunosni, biokemijski, hematološki i histopatološki, pri čemu smo bilježili promjenu njihovih vrijednosti.

4.1. Vrijednosti hematoloških pokazatelja

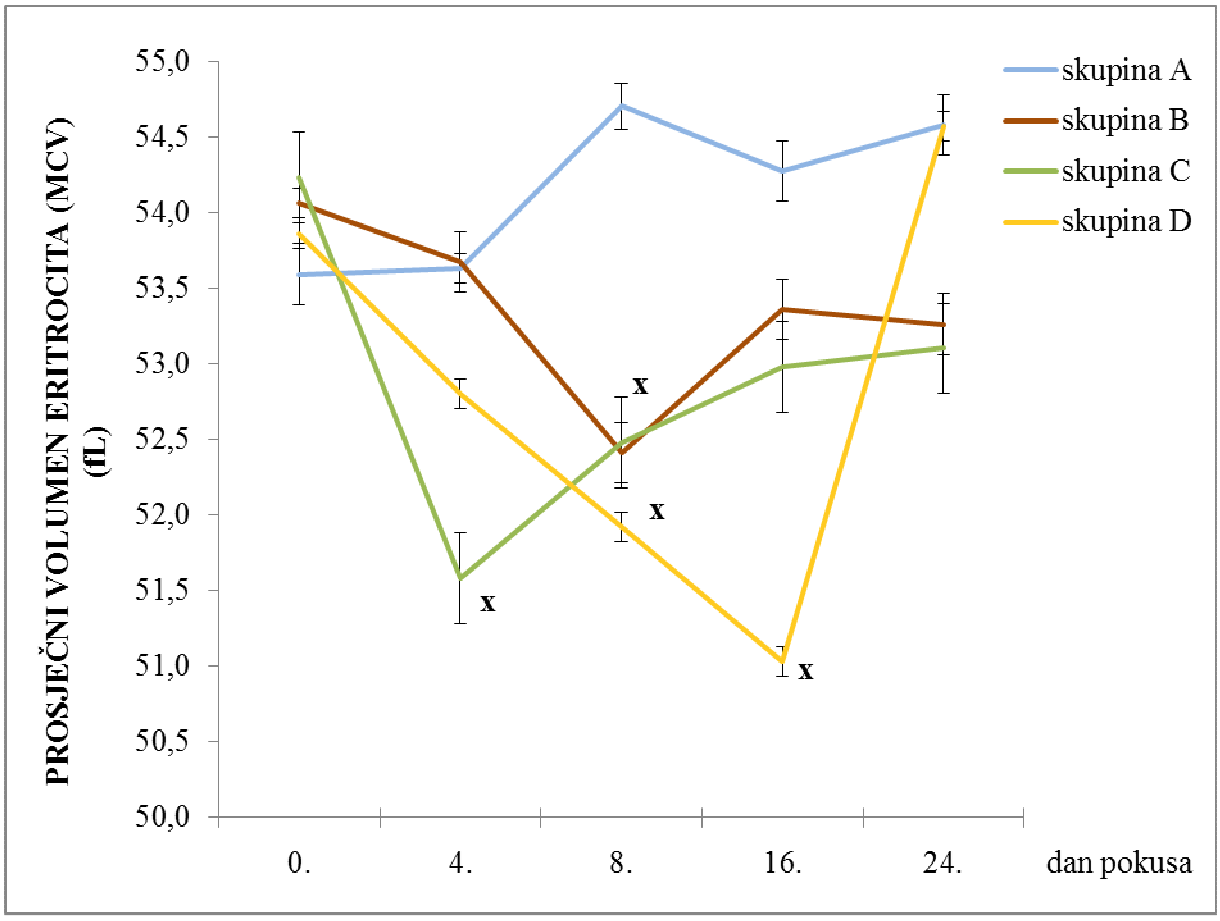
Analizom broja eritrocita u perifernoj krvi pokusne prasadi zabilježili smo 16. dana pokusa statistički značajno više vrijednosti u skupini C (prasad tretirana kombinacijom kisika i izoflurana) u odnosu na kontrolnu skupinu A (prasad tretirana kisikom) (Slika 2).



Slika 2. Broj eritrocita u perifernoj krvi pokusne prasadi tijekom 24 dana trajanja pokusa.

- I - na krivulji je označena standardna devijacija za svaku skupinu;
- x - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu $p \leq 0,05$;
- skupina A (kontrolna skupina- prasad tretirana 100% kisikom), skupina B (prasad tretirana kombinacijom kisika 40% i dušikovog oksidula 60%), skupina C (prasad tretirana kombinacijom 100% kisika i izoflurana), skupina D (prasad tretirana kombinacijom kisika 40%, dušikovog oksidula 60% i izoflurana).

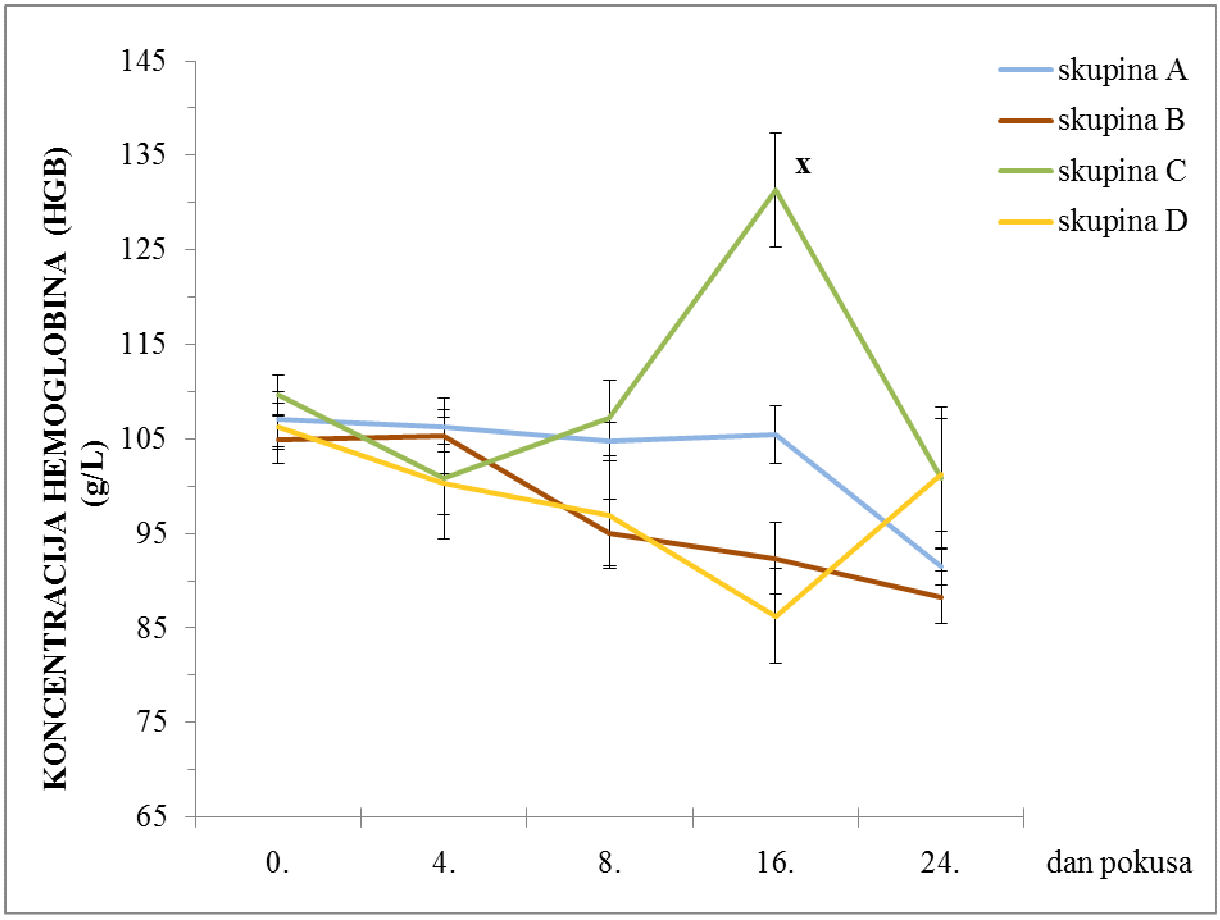
U perifernoj krvi prasadi tretirane dušikovim oksidulom uočili smo 8. dana istraživanja statistički značajno nižu vrijednost u odnosu na kontrolnu skupinu, dok smo u prasadi tretirane kombinacijom kisika i izoflurana 4. i 8. dana pokusa uočili statistički značajno niže vrijednosti za prosječni volumen eritrocita (MCV) u odnosu na prasad tretiranu 100 % kisikom. Isti nalaz zabilježili smo u prasadi tretirane kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana 8. i 16. dana pokusa u odnosu na kontrolne životinje (Slika 3).



Slika 3. Prosječni volumena eritrocita (MCV) u perifernoj krvi pokusne prasadi tijekom 24 dana trajanja pokusa.

- I - na krivulji je označena standardna devijacija za svaku skupinu;
- x - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu $p \leq 0,05$;
- skupina A (kontrolna skupina- prasad tretirana 100% kisikom), skupina B (prasad tretirana kombinacijom kisika 40% i dušikovog oksidula 60%), skupina C (prasad tretirana kombinacijom 100% kisika i izoflurana), skupina D (prasad tretirana kombinacijom kisika 40%, dušikovog oksidula 60% i izoflurana).

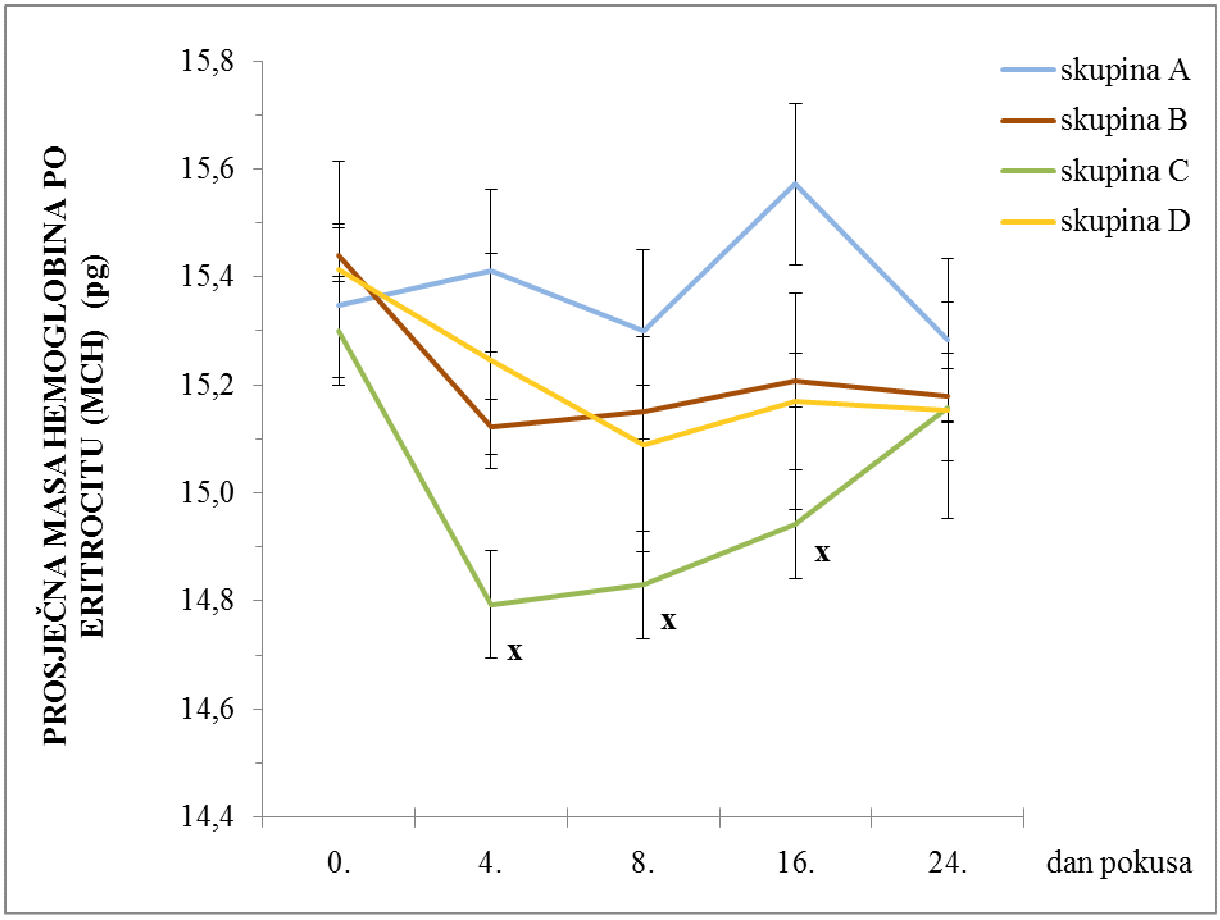
Statistički značajno više vrijednosti koncentracije hemoglobina (HGB) u perifernoj krvi prasadi skupine C (tretirana kombinacijom kisika i izoflurana) zabilježili smo 16. dana pokusa u odnosu na kontrolnu skupinu A (prasad tretirana 100% kisikom) (Slika 4).



Slika 4. Koncentracija hemoglobina (HGB) u perifernoj krvi pokusne prasadi tijekom 24 dana trajanja pokusa.

- I - na krivulji je označena standardna devijacija za svaku skupinu;
- x - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu $p \leq 0,05$;
- skupina A (kontrolna skupina- prasad tretirana 100% kisikom), skupina B (prasad tretirana kombinacijom kisika 40% i dušikovog oksidula 60%), skupina C (prasad tretirana kombinacijom 100% kisika i izoflurana), skupina D (prasad tretirana kombinacijom kisika 40%, dušikovog oksidula 60% i izoflurana).

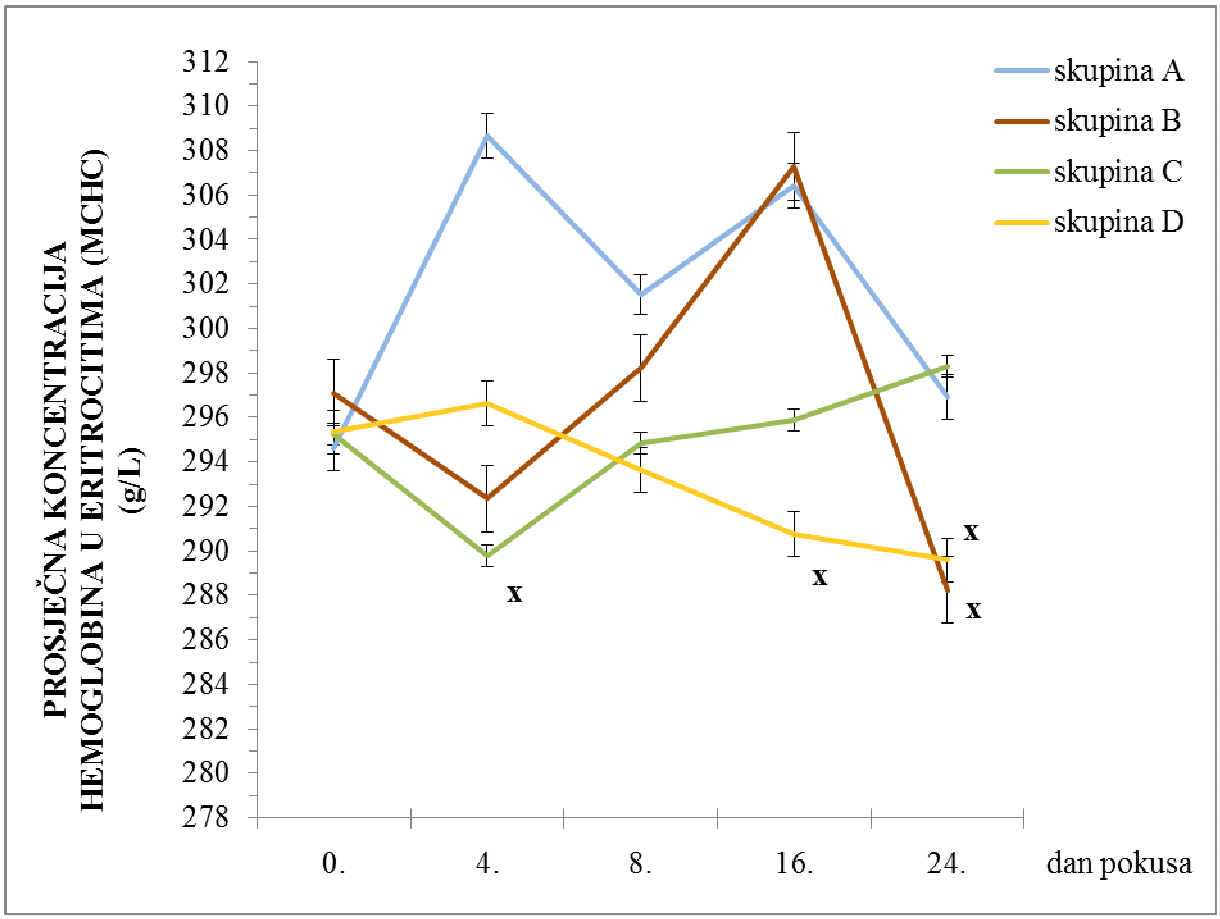
Analizom prosječne mase hemoglobina po eritrocitu (MCH) u perifernoj krvi pokusne prasadi uočili smo statistički značajno niže vrijednosti 4., 8. i 16. dana pokusa u prasadi tretirane kombinacijom kisika i izoflurana u odnosu na prasad tretiranu 100% kisikom (Slika 5).



Slika 5. Prosječna mase hemoglobina po eritrocitu (MCH) u perifernoj krvi pokusne prasadi tijekom 24 dana trajanja pokusa.

- I - na krivulji je označena standardna devijacija za svaku skupinu;
- x - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu $p \leq 0,05$;
- skupina A (kontrolna skupina- prasad tretirana 100% kisikom), skupina B (prasad tretirana kombinacijom kisika 40% i dušikovog oksidula 60%), skupina C (prasad tretirana kombinacijom 100% kisika i izoflurana), skupina D (prasad tretirana kombinacijom kisika 40%, dušikovog oksidula 60% i izoflurana).

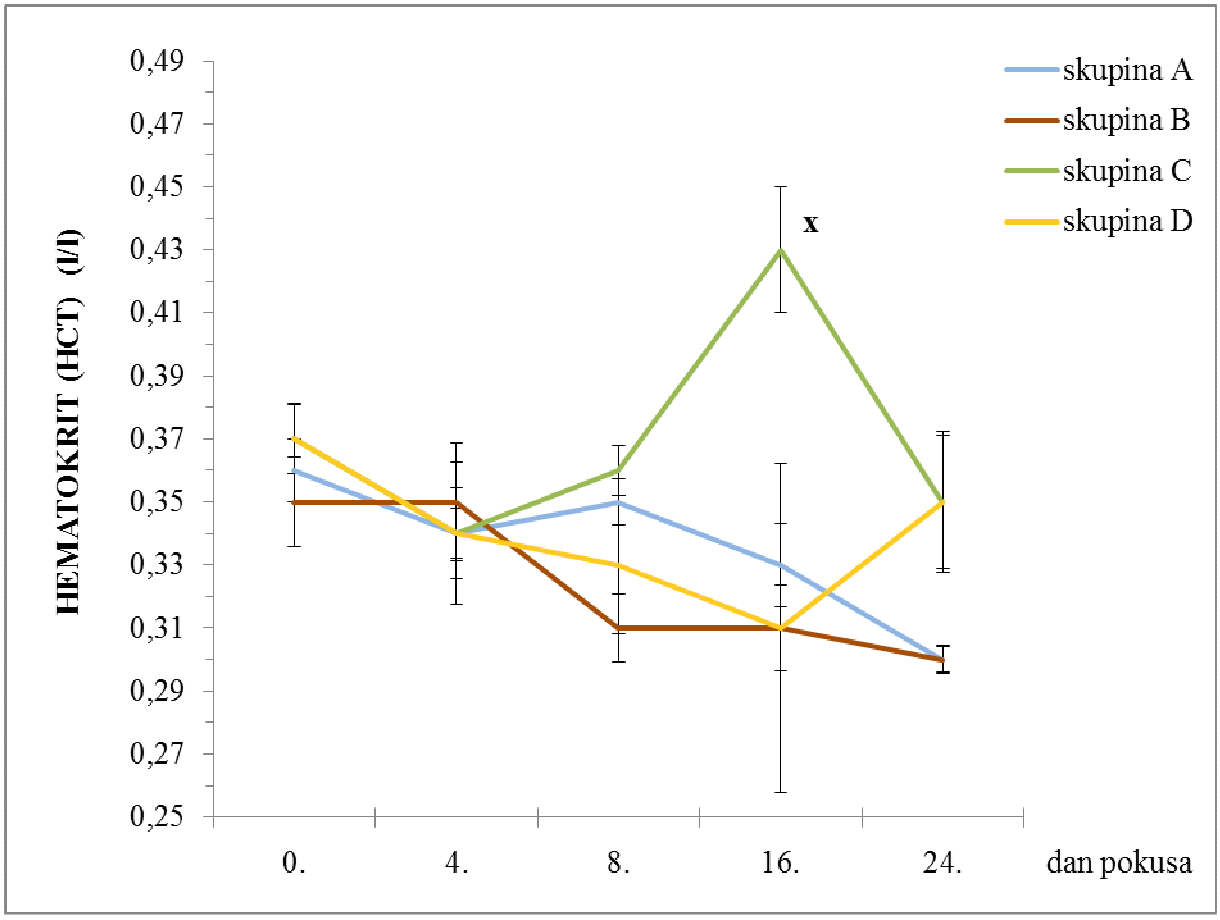
Tijekom trajanja cijelog pokusa u perifernoj krvi u prasadi skupine B (prasad tretirana kombinacijom kisika i dušikovog oksidula), C (prasad tretirana kombinacijom kisika i izoflurana) i D (prasad tretirana kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana) u odnosu na kontrolnu prasad zabilježili smo niže vrijednosti prosječne koncentracije hemoglobina u eritrocitima (MCHC), izuzev 16. dana pokusa kad je izmjerena vrijednost MCHC prasadi skupine B (prasad tretirana kombinacijom kisika i dušikovog oksidula) bila podjednake vrijednosti kao u kontrolne prasadi. Statistički značajno niže vrijednosti MCHC-a zabilježili smo 4. dana pokusa u skupini C (prasad tretirana kombinacijom kisika i izoflurana), 16. dana u skupini D (prasad tretirana kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana) te 24. dana u prasadi skupine C (prasad tretirana kombinacijom kisika i izoflurana) i D (prasad tretirana kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana) (Slika 6).



Slika 6. Prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitima (MCHC) u perifernoj krvi pokusne prasadi tijekom 24 dana trajanja pokusa.

- I - na krivulji je označena standardna devijacija za svaku skupinu;
- x - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu $p \leq 0,05$;
- skupina A (kontrolna skupina- prasad tretirana 100% kisikom), skupina B (prasad tretirana kombinacijom kisika 40% i dušikovog oksidula 60%), skupina C (prasad tretirana kombinacijom 100% kisika i izoflurana), skupina D (prasad tretirana kombinacijom kisika 40%, dušikovog oksidula 60% i izoflurana).

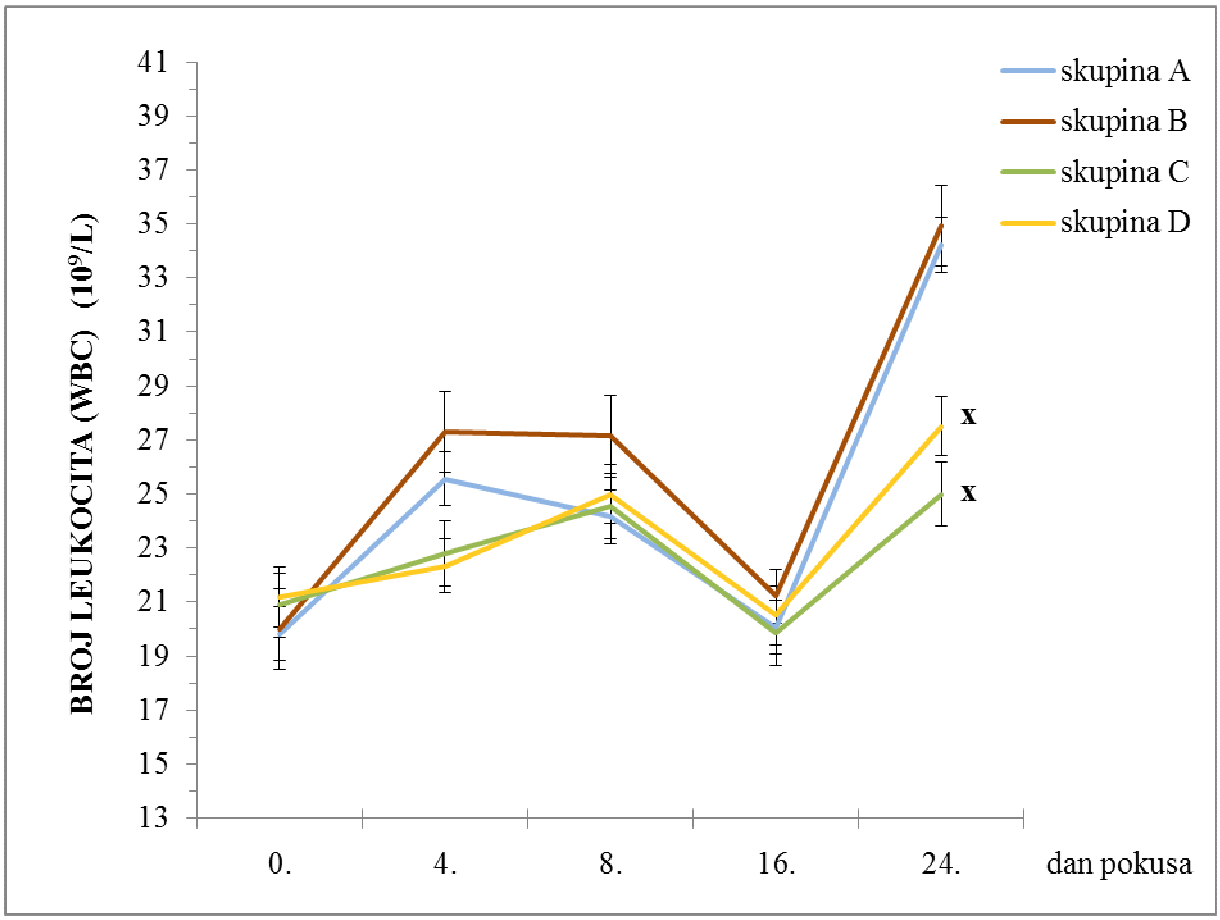
Pri analizi hematokrita (HCT) u perifernoj krvi pokusne prasadi uočili smo statistički značajno više vrijednosti 16. dana pokusa u prasadi tretirane kombinacijom kisika i izoflurana u odnosu na prasad tretiranu 100% kisikom (Slika 7).



Slika 7. Hematokrit (HCT) u perifernoj krvi pokusne prasadi tijekom 24 dana trajanja pokusa.

- I - na krivulji je označena standardna devijacija za svaku skupinu;
- x - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu $p \leq 0,05$;
- skupina A (kontrolna skupina- prasad tretirana 100% kisikom), skupina B (prasad tretirana kombinacijom kisika 40% i dušikovog oksidula 60%), skupina C (prasad tretirana kombinacijom 100% kisika i izoflurana), skupina D (prasad tretirana kombinacijom kisika 40%, dušikovog oksidula 60% i izoflurana).

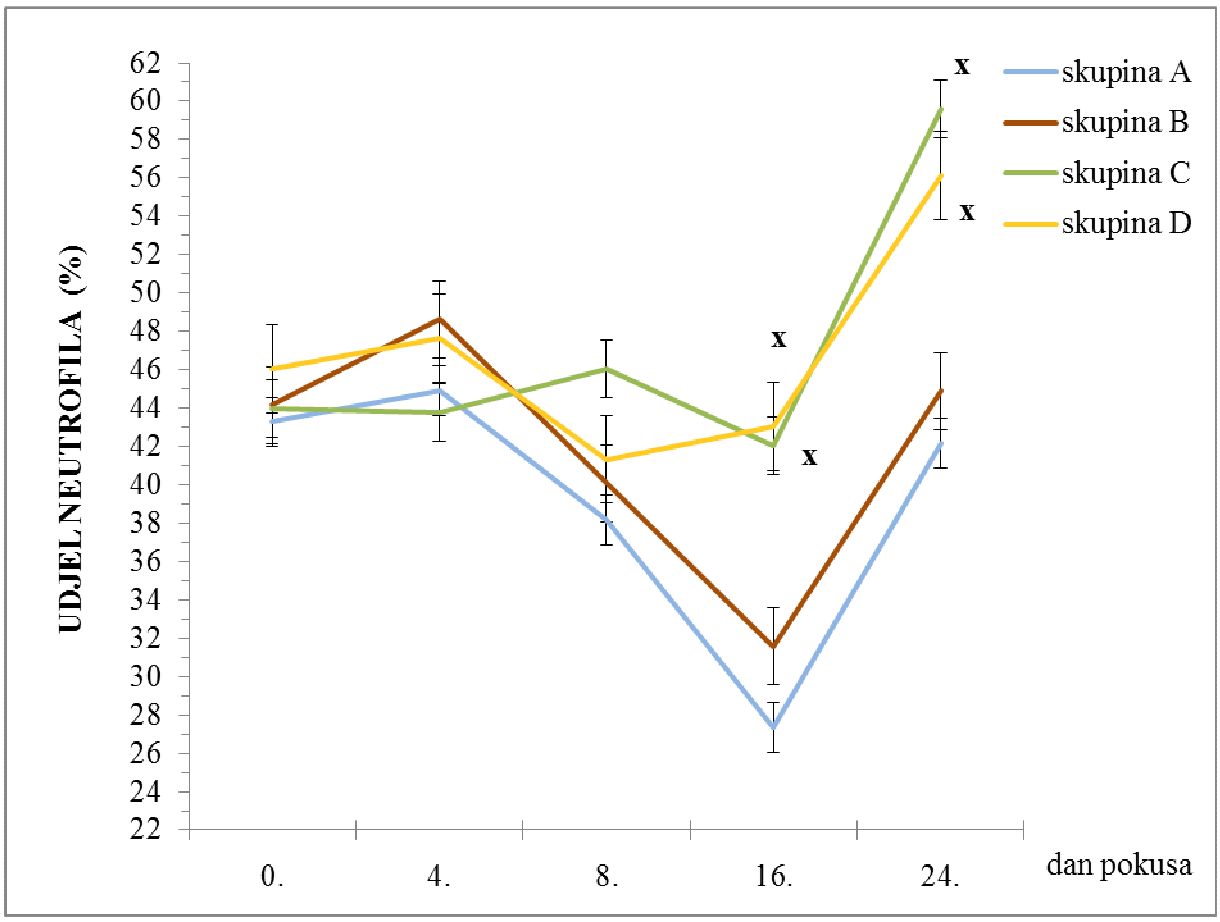
Analizom broja leukocita (WBC) u perifernoj krvi pokusne prasadi zabilježili smo statistički značajno niže vrijednosti 24. dana pokusa u skupini C (prasad tretirana kombinacijom kisika i izoflurana) i skupini D (prasad tretirana kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana) u odnosu na kontrolnu skupinu A (prasad tretirana 100% kisikom) (Slika 8).



Slika 8. Broj leukocita (WBC) u perifernoj krvi pokusne prasadi tijekom 24 dana trajanja pokusa.

- I - na krivulji je označena standardna devijacija za svaku skupinu;
- x - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu $p \leq 0,05$;
- skupina A (kontrolna skupina- prasad tretirana 100% kisikom), skupina B (prasad tretirana kombinacijom kisika 40% i dušikovog oksidula 60%), skupina C (prasad tretirana kombinacijom 100% kisika i izoflurana), skupina D (prasad tretirana kombinacijom kisika 40%, dušikovog oksidula 60% i izoflurana).

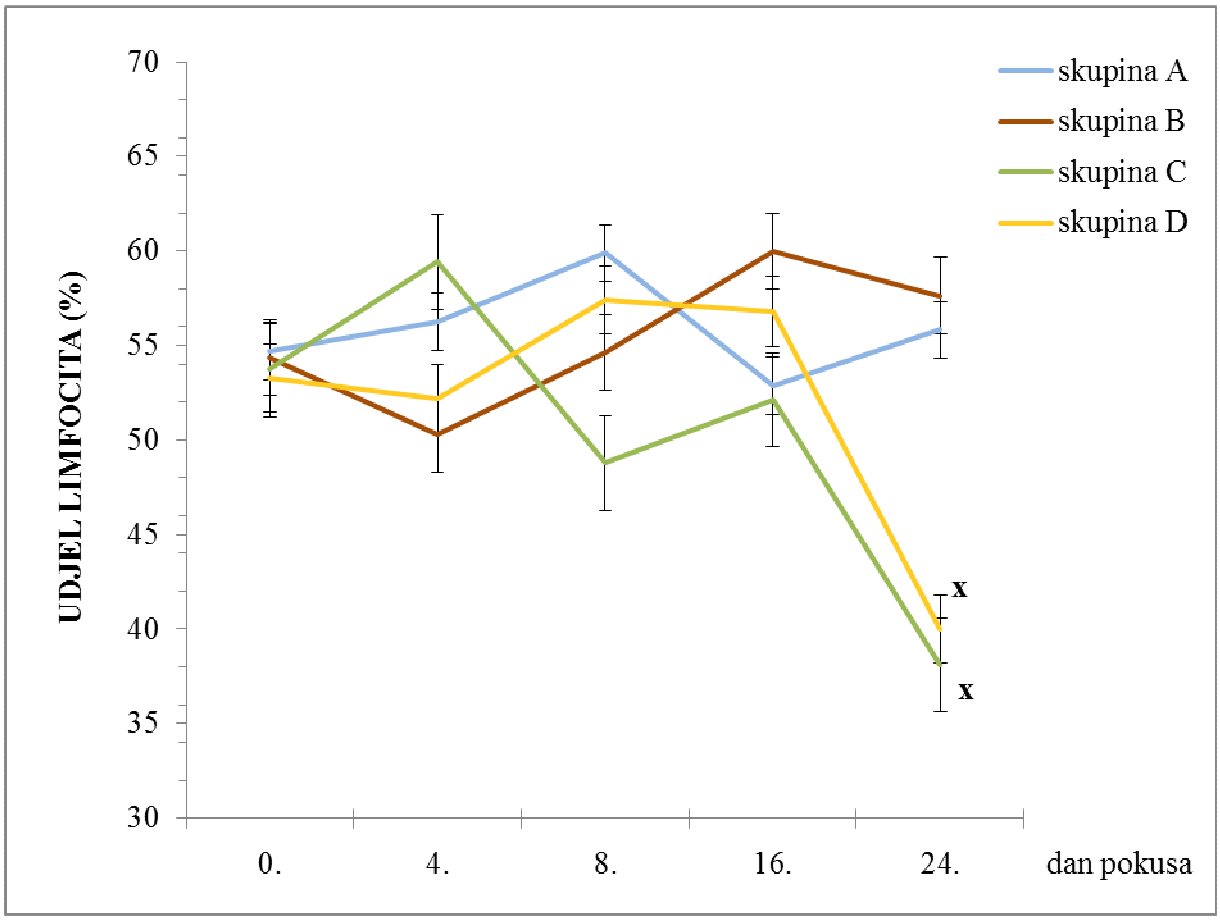
Sve pokusne skupine prasadi imaju više vrijednosti udjela neutrofila u odnosu na kontrolnu skupinu tijekom cijelog istraživanja. Statistički smo značajno više vrijednosti uočili 16. i 24. dana pokusa u prasadi tretirane kombinacijom kisika i izoflurana i prasadi tretirane kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana u odnosu na prasad iz kontrolne skupine (Slika 9).



Slika 9. Udjel neutrofila u perifernoj krvi pokusne prasadi tijekom 24 dana trajanja pokusa.

- I - na krivulji je označena standardna devijacija za svaku skupinu;
- x - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu $p \leq 0,05$;
- skupina A (kontrolna skupina- prasad tretirana 100% kisikom), skupina B (prasad tretirana kombinacijom kisika 40% i dušikovog oksidula 60%), skupina C (prasad tretirana kombinacijom 100% kisika i izoflurana), skupina D (prasad tretirana kombinacijom kisika 40%, dušikovog oksidula 60% i izoflurana).

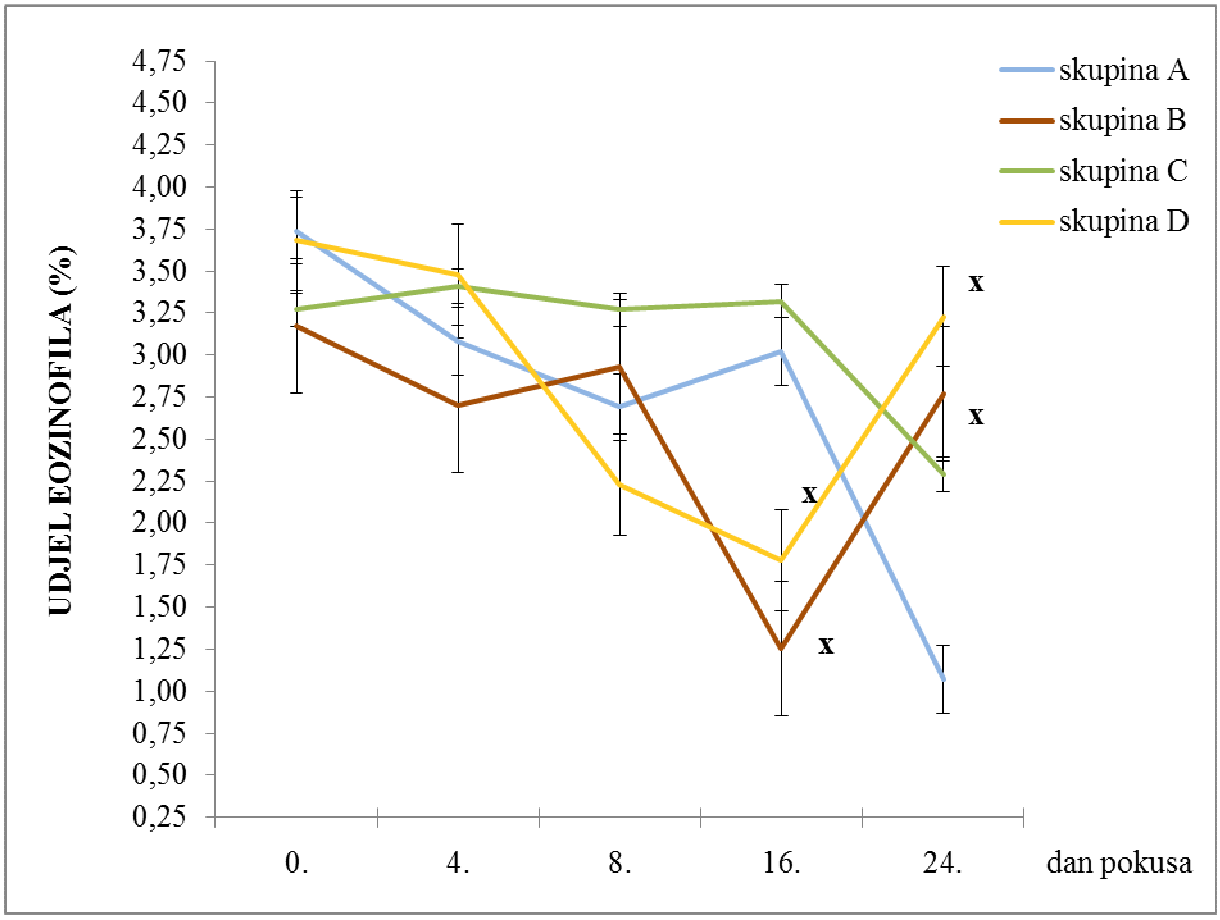
Analizom udjela limfocita u perifernoj krvi pokusne prasadi zabilježili smo statistički značajno niže vrijednosti 24. dana pokusa u skupini C (prasad tretirana kombinacijom kisika i izoflurana) i skupini D (prasad tretirana kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana) u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 10).



Slika 10. Udjel limfocita u perifernoj krvi pokusne prasadi tijekom 24 dana trajanja pokusa.

- I - na krivulji je označena standardna devijacija za svaku skupinu;
- x - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu $p \leq 0,05$;
- skupina A (kontrolna skupina- prasad tretirana 100% kisikom), skupina B (prasad tretirana kombinacijom kisika 40% i dušikovog oksidula 60%), skupina C (prasad tretirana kombinacijom 100% kisika i izoflurana), skupina D (prasad tretirana kombinacijom kisika 40%, dušikovog oksidula 60% i izoflurana).

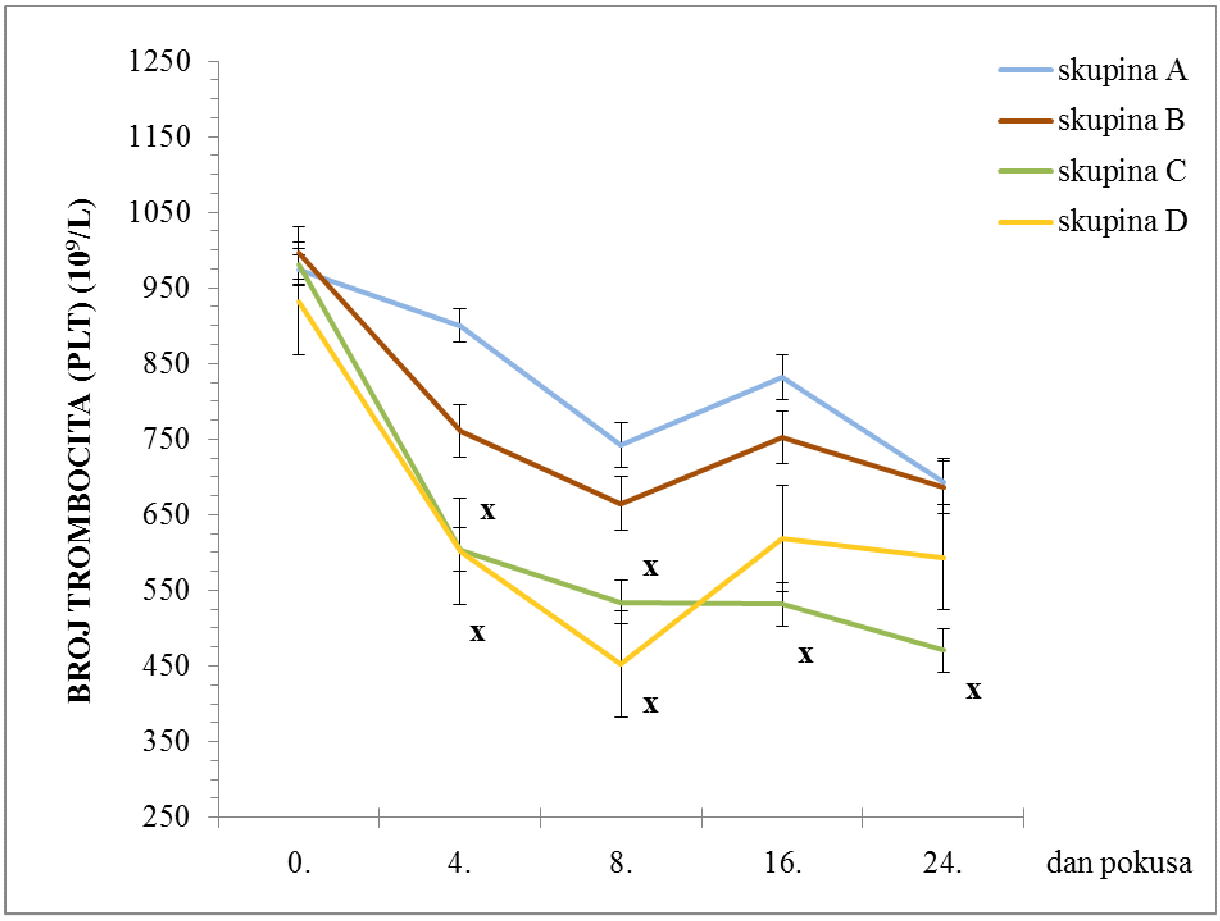
U perifernoj krvi pokusne prasadi analizom udjela eozinofila uočili smo statistički značajno niže vrijednosti 16. dana pokusa u prasadi tretirane kombinacijom kisika i dušikovog oksidula i prasadi tretirane kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana u odnosu na prasad iz kontrolne skupine, dok smo 24. dana pokusa zabilježili statistički značajno više vrijednosti navedenih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 11).



Slika 11. Udjel eozinofila u perifernoj krvi pokusne prasadi tijekom 24 dana trajanja pokusa.

- I - na krivulji je označena standardna devijacija za svaku skupinu;
- x - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu $p \leq 0,05$;
- skupina A (kontrolna skupina- prasad tretirana 100% kisikom), skupina B (prasad tretirana kombinacijom kisika 40% i dušikovog oksidula 60%), skupina C (prasad tretirana kombinacijom 100% kisika i izoflurana), skupina D (prasad tretirana kombinacijom kisika 40%, dušikovog oksidula 60% i izoflurana).

Sve skupine prasadi imaju niže vrijednosti broja trombocita u odnosu na kontrolnu skupinu tijekom cijelog istraživanja. Bilježimo statistički značajno niže vrijednosti 4., 8., 16. i 24. dana pokusa u skupini C (prasad tretirana kombinacijom kisika i izoflurana) u odnosu na kontrolnu skupinu. Isto tako, zabilježili smo statistički značajno niže vrijednosti 4. i 8. dana pokusa u skupini D (prasad tretirana kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana) u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 12).

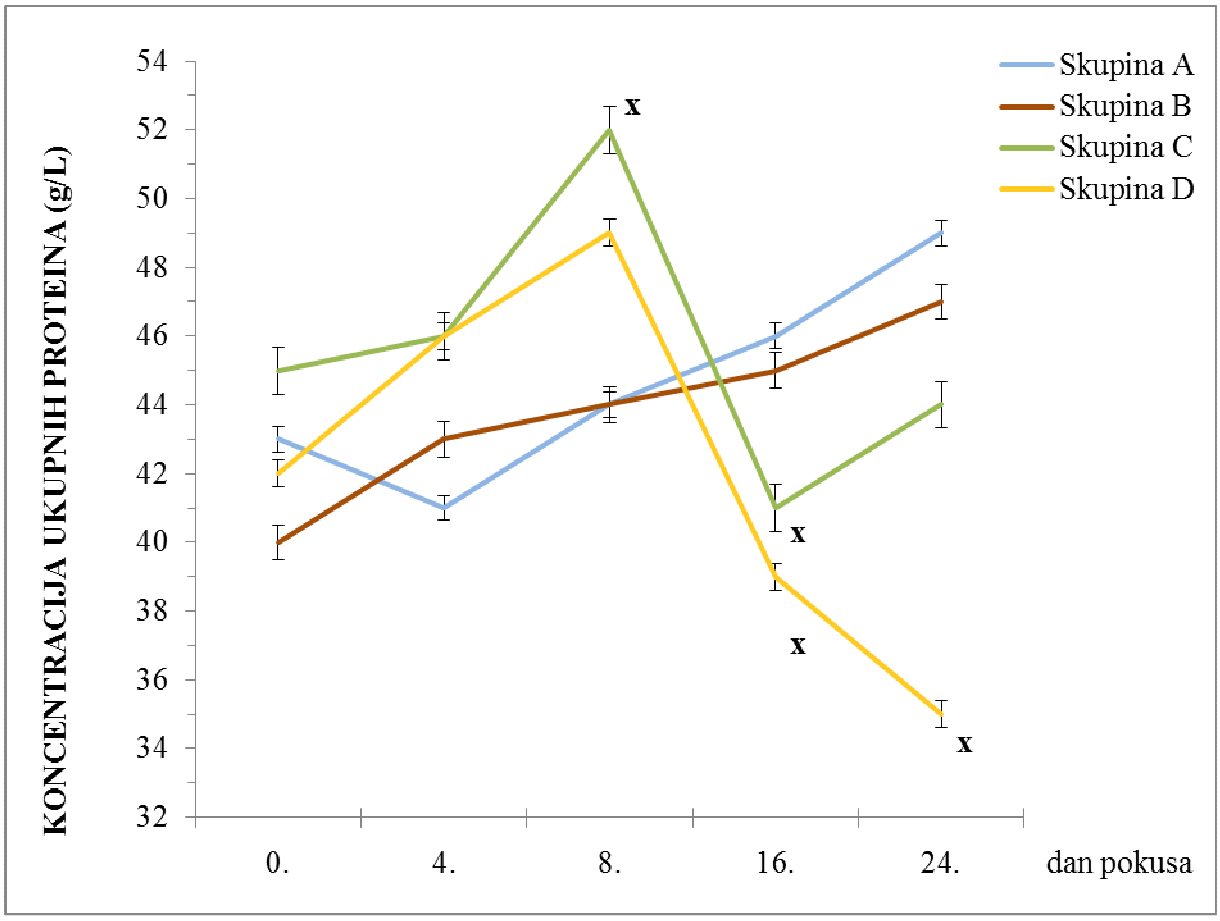


Slika 12. Broj trombocita (PLT) u perifernoj krvi pokusne prasadi tijekom 24 dana trajanja pokusa.

- I - na krivulji je označena standardna devijacija za svaku skupinu;
- x - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu $p \leq 0,05$;
- skupina A (kontrolna skupina- prasad tretirana 100% kisikom), skupina B (prasad tretirana kombinacijom kisika 40% i dušikovog oksidula 60%), skupina C (prasad tretirana kombinacijom 100% kisika i izoflurana), skupina D (prasad tretirana kombinacijom kisika 40%, dušikovog oksidula 60% i izoflurana).

4.2. Vrijednosti biokemijskih pokazatelja

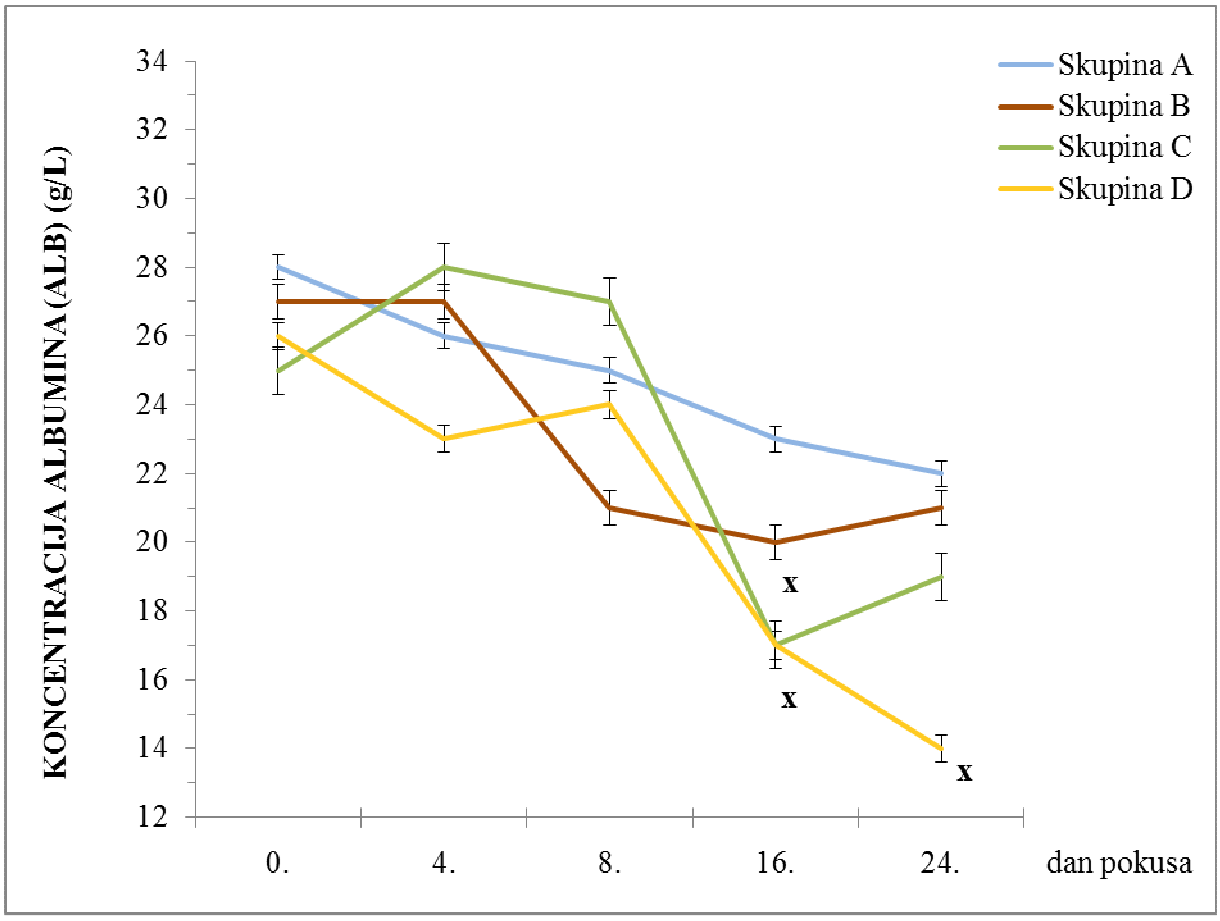
Analizom koncentracije ukupnih proteina u serumu pokusne prasadi zabilježili smo statistički značajno više vrijednosti 8. dana pokusa u odnosu na 16. dan pokusa kada bilježimo statistički značajno niže vrijednosti istog u prasadi tretirane kombinacijom kisika i izoflurana u odnosu na prasad tretiranu 100% kisikom. Također, zabilježili smo 16. i 24. dana pokusa statistički značajno niže vrijednosti u prasadi tretirane kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana u odnosu na kontrolnu prasad (Slika 13).



Slika 13. Koncentracija ukupnih proteina u serumu pokusne prasadi tijekom 24 dana trajanja pokusa.

- I -na krivulji je označena standardna devijacija za svaku skupinu;
- x - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu $p \leq 0,05$;
- skupina A (kontrolna skupina- prasad tretirana 100% kisikom), skupina B (prasad tretirana kombinacijom kisika 40% i dušikovog oksidula 60%), skupina C (prasad tretirana kombinacijom 100% kisika i izoflurana), skupina D (prasad tretirana kombinacijom kisika 40%, dušikovog oksidula 60% i izoflurana).

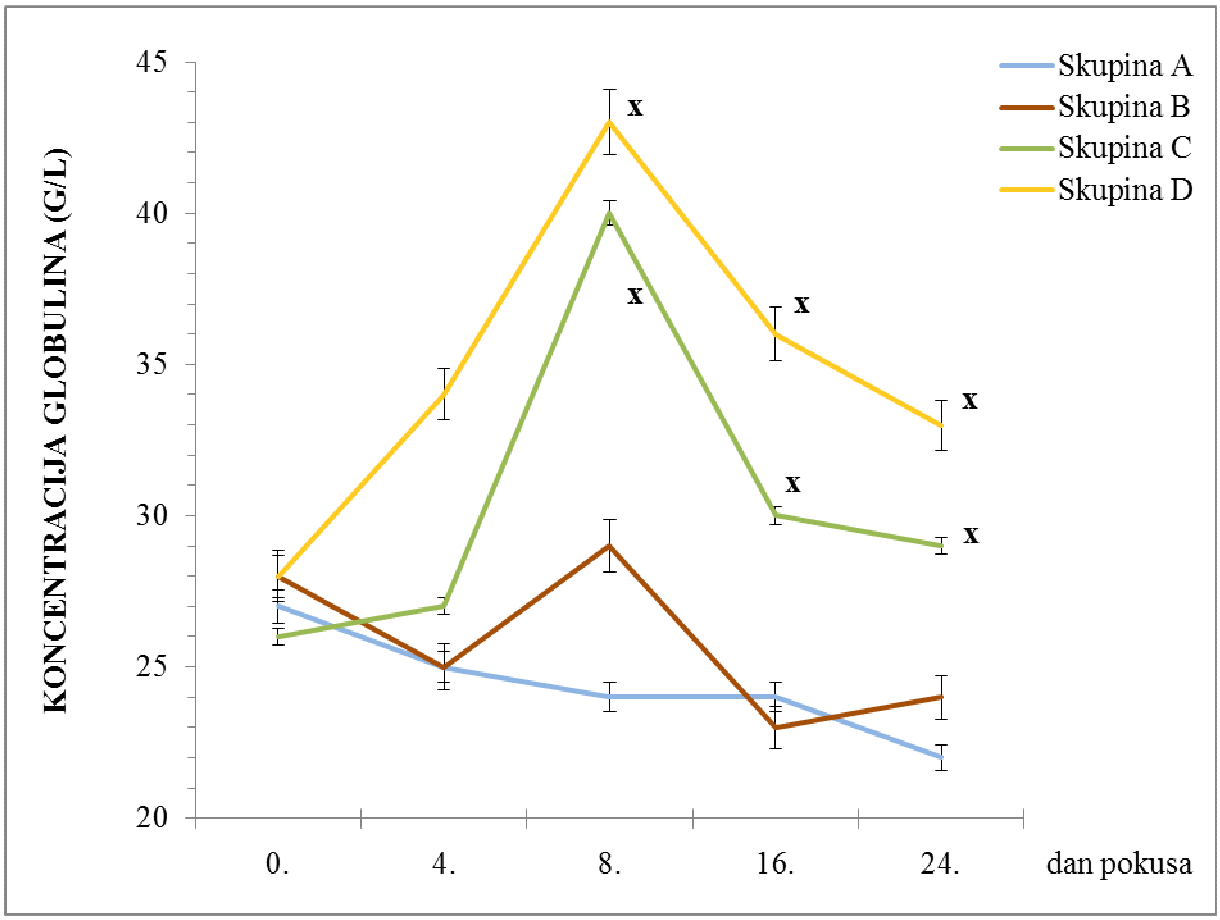
U serumu pokusne prasadi analizom koncentracije albumina uočili smo statistički značajno niže vrijednosti 16. dana pokusa u skupini C (prasad tretirana kombinacijom kisika i izoflurana) u odnosu na kontrolnu skupinu A (prasad tretirana 100% kisikom), dok 16. i 24. dana pokusa uočili smo statistički značajno niže vrijednosti u skupini D (prasad tretirana kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana) u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 14).



Slika 14. Koncentracija albumina (ALB) u serumu pokusne prasadi tijekom 24 dana trajanja pokusa.

- I - na krivulji je označena standardna devijacija za svaku skupinu;
- x - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu $p \leq 0,05$;
- skupina A (kontrolna skupina- prasad tretirana 100% kisikom), skupina B (prasad tretirana kombinacijom kisika 40% i dušikovog oksidula 60%), skupina C (prasad tretirana kombinacijom 100% kisika i izoflurana), skupina D (prasad tretirana kombinacijom kisika 40%, dušikovog oksidula 60% i izoflurana).

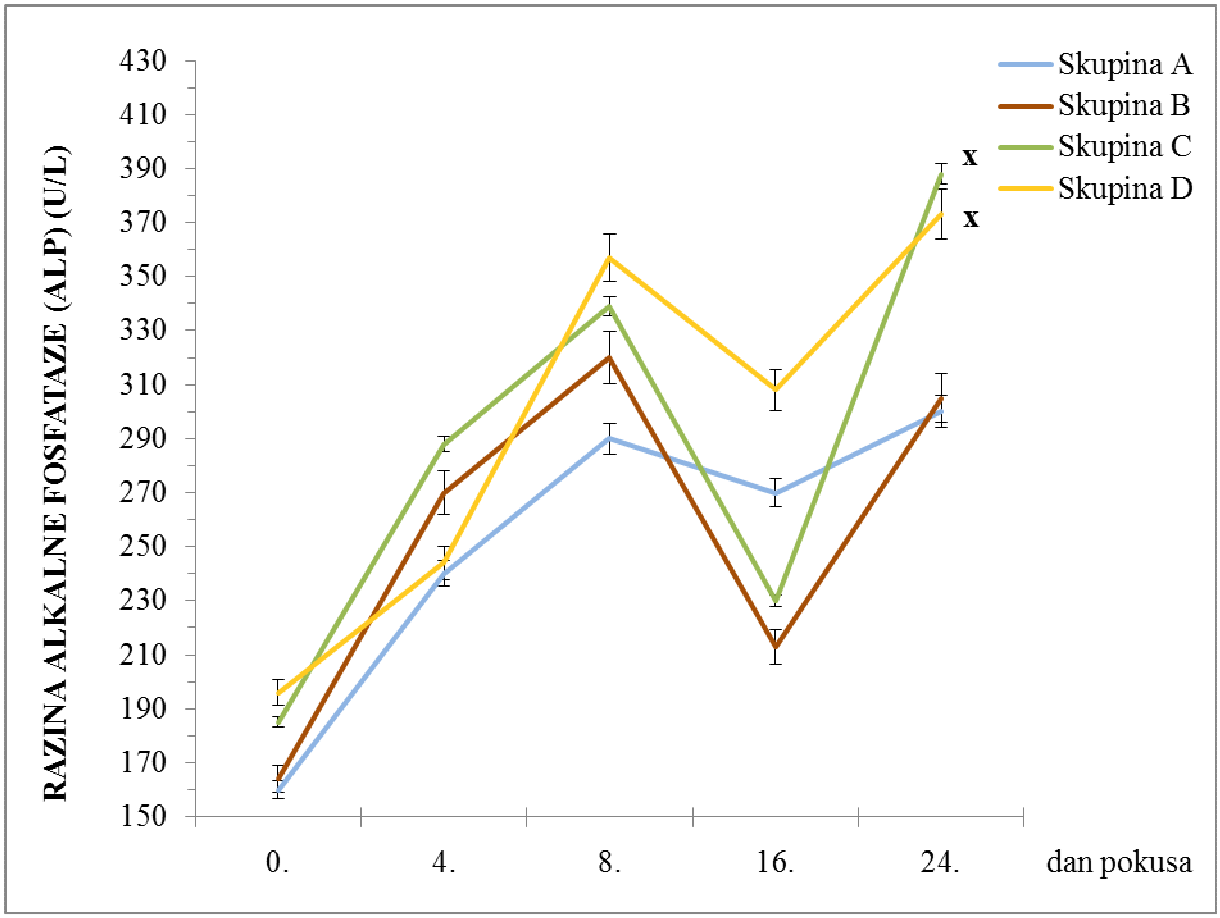
Pri analizi koncentracije globulina u serumu pokusne prasadi zabilježili smo statistički značajno više vrijednosti 8., 16. i 24. dana pokusa u prasadi tretirane kombinacijom kisika i izoflurana i prasadi tretirane kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana u odnosu na prasad tretiranu 100% kisikom (Slika 15).



Slika 15. Koncentracija globulina u serumu pokusne prasadi tijekom 24 dana trajanja pokusa.

- I - na krivulji je označena standardna devijacija za svaku skupinu;
- x - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu $p \leq 0,05$;
- skupina A (kontrolna skupina- prasad tretirana 100% kisikom), skupina B (prasad tretirana kombinacijom kisika 40% i dušikovog oksidula 60%), skupina C (prasad tretirana kombinacijom 100% kisika i izoflurana), skupina D (prasad tretirana kombinacijom kisika 40%, dušikovog oksidula 60% i izoflurana).

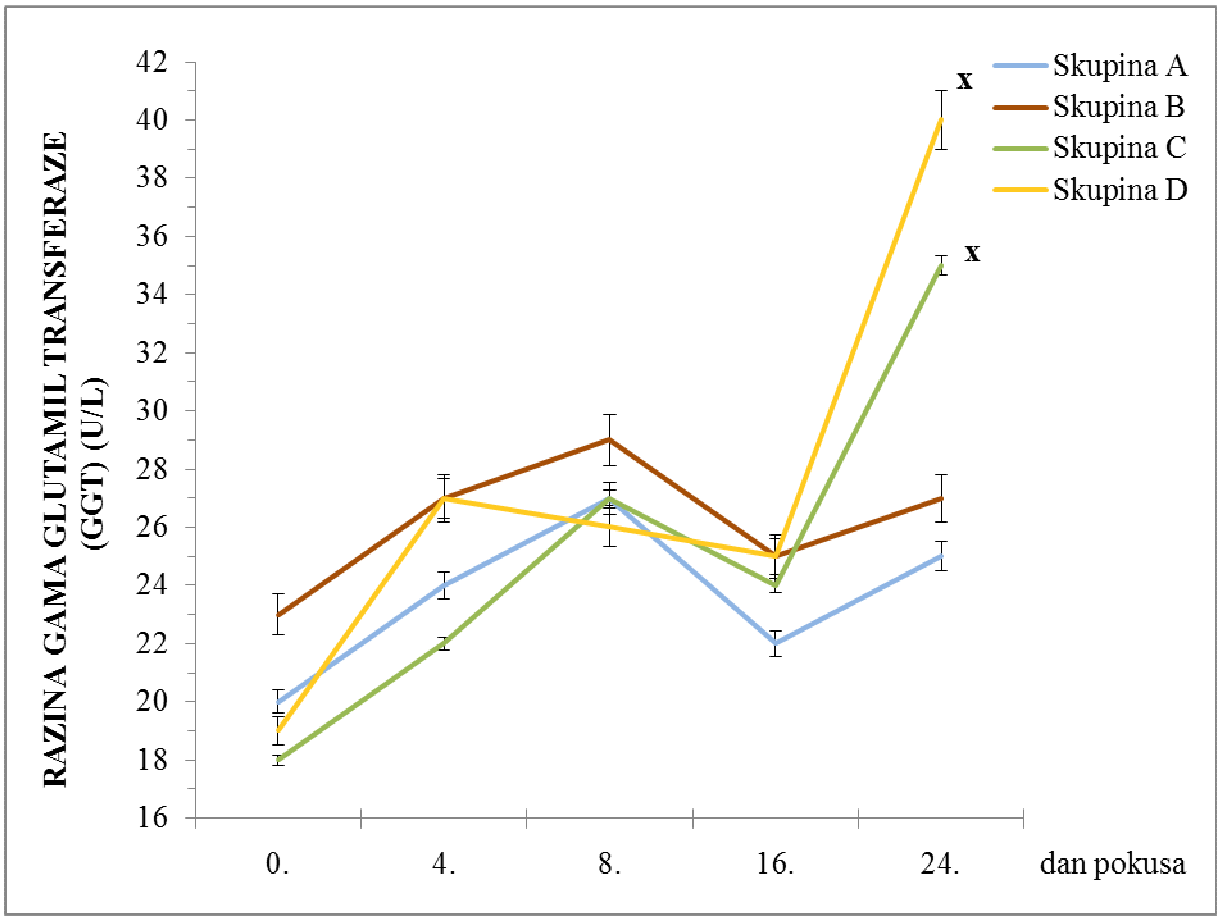
U serumu prasadi skupine B (prasad tretirana kombinacijom kisika i dušikovog oksidula), C (prasad tretirana kombinacijom kisika i izoflurana) i D (prasad tretirana kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana) do 8. dana pokusa zabilježili smo statistički neznačajni porast razine alkalne fosfataze (ALP) u odnosu na kontrolne životinje. U svih je skupina životinja 16. dana pokusa uočen statistički neznačajan pad razine alkalne fosfataze (ALP). Na kraju pokusa prasad skupine B (prasad tretirana kombinacijom kisika i dušikovog oksidula) imala je podjednaku vrijednost ALP-a kao i kontrolna prasad, dok je vrijednost ALP-a u prasadi skupine C (prasad tretirana kombinacijom kisika i izoflurana) i D (prasad tretirana kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana) bila statistički značajno viša u odnosnu na kontrolnu prasad (Slika 16).



Slika 16. Razina alkalne fosfataze (ALP) u serumu pokusne prasadi tijekom 24 dana trajanja pokusa.

- I - na krivulji je označena standardna devijacija za svaku skupinu;
- x - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu $p \leq 0,05$;
- skupina A (kontrolna skupina- prasad tretirana 100% kisikom), skupina B (prasad tretirana kombinacijom kisika 40% i dušikovog oksidula 60%), skupina C (prasad tretirana kombinacijom 100% kisika i izoflurana), skupina D (prasad tretirana kombinacijom kisika 40%, dušikovog oksidula 60% i izoflurana).

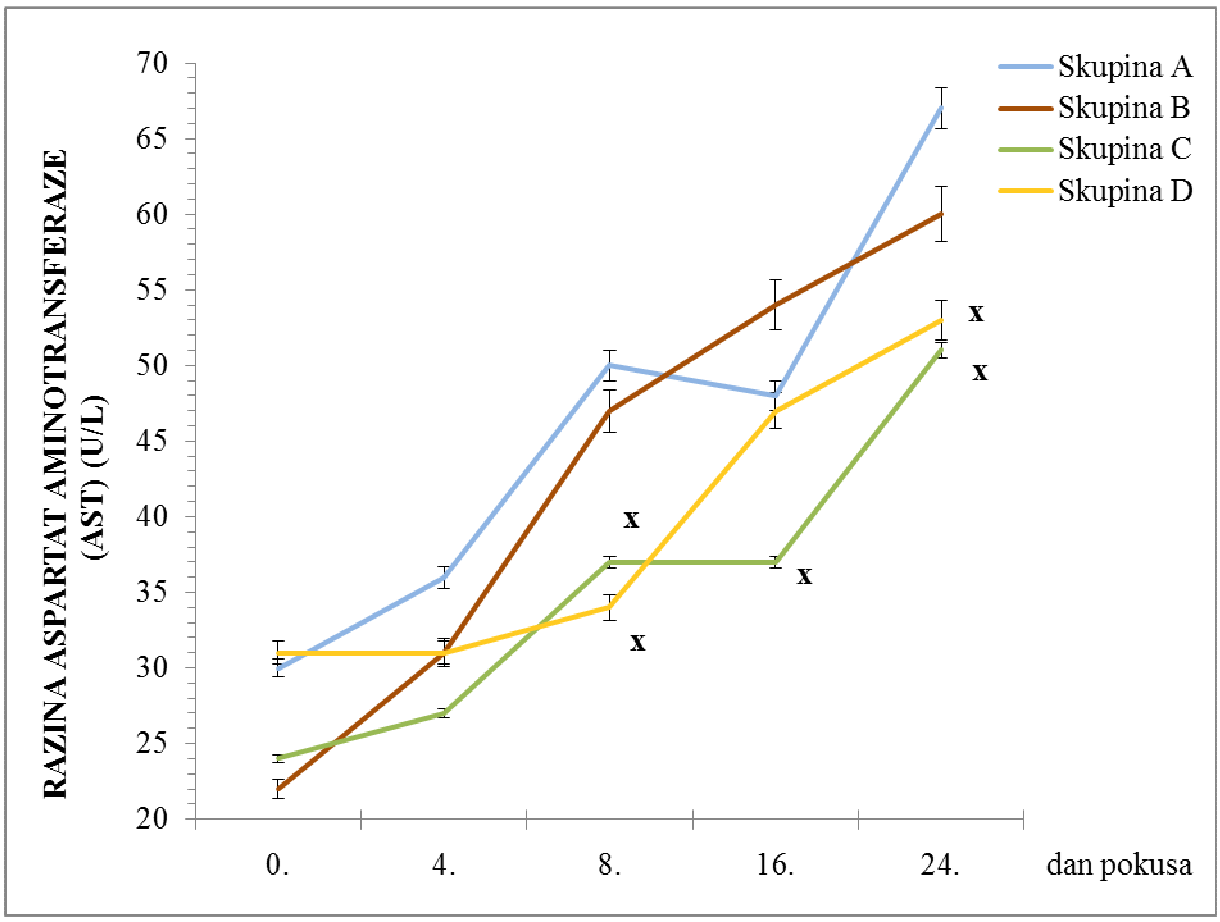
U serumu prasadi pri analizi razine gama glutamil transferaze (GGT) zabilježili smo statistički značajno više vrijednosti 24. dana pokusa u prasadi tretirane kombinacijom kisika i izoflurana i prasadi tretirane kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana u odnosu na prasad tretiranu 100% kisikom (Slika 17).



Slika 17. Razina gama glutamil transferaze (GGT) u serumu pokusne prasadi tijekom 24 dana trajanja pokusa.

- I - na krivulji je označena standardna devijacija za svaku skupinu;
- x - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu $p \leq 0,05$;
- skupina A (kontrolna skupina- prasad tretirana 100% kisikom), skupina B (prasad tretirana kombinacijom kisika 40% i dušikovog oksidula 60%), skupina C (prasad tretirana kombinacijom 100% kisika i izoflurana), skupina D (prasad tretirana kombinacijom kisika 40%, dušikovog oksidula 60% i izoflurana).

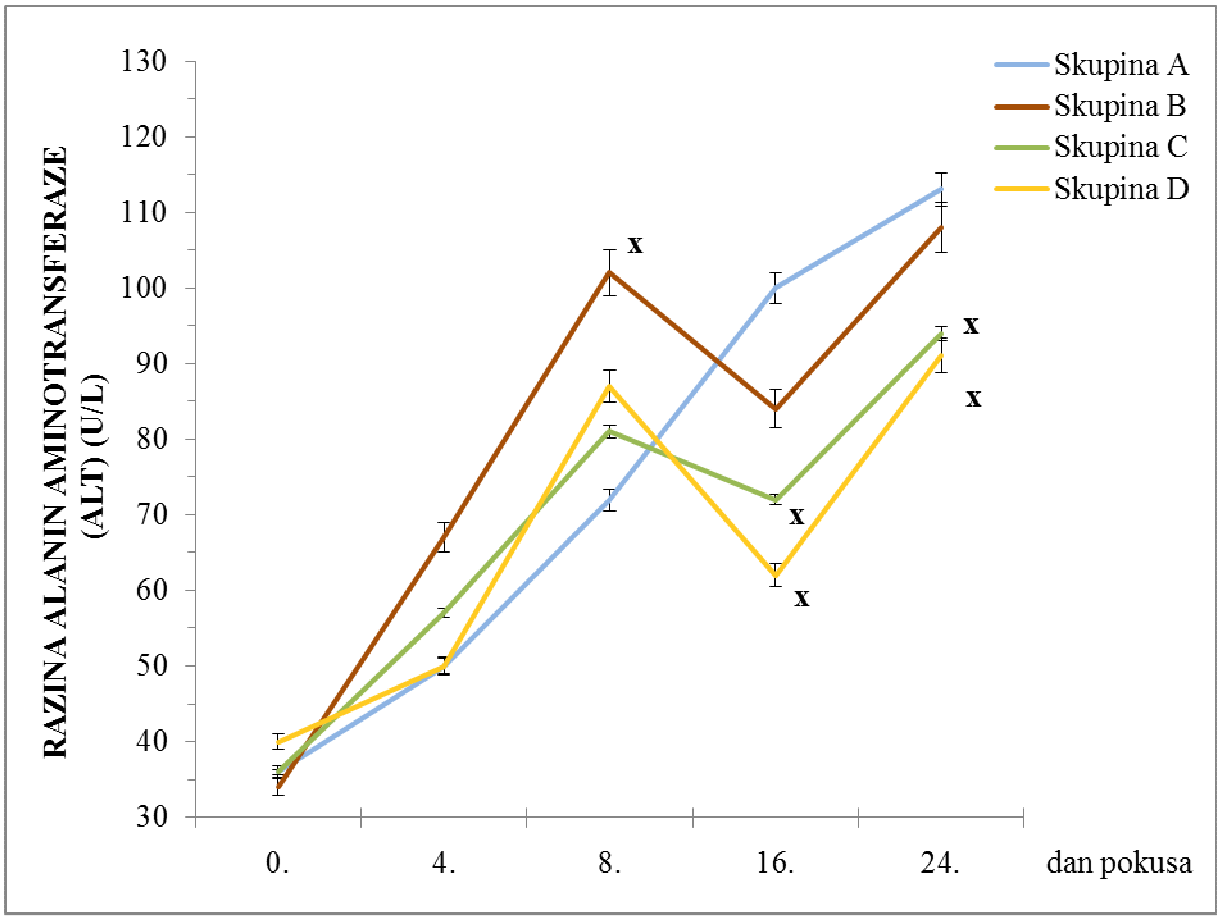
Analizom razine aspartat aminotransferaze (AST) u serumu pokusne prasadi uočiili smo statistički značajno niže vrijednosti 8., 16. i 24. dana pokusa u skupini C (prasad tretirana kombinacijom kisika i izoflurana) u odnosu na kontrolnu skupinu. Također bilježimo 8. i 24. dana pokusa statistički značajno niže vrijednosti u skupini D (prasad tretirana kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana) u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 18).



Slika 18. Razina aspartat aminotransferaze (AST) u serumu pokusne prasadi tijekom 24 dana trajanja pokusa.

- I - na krivulji je označena standardna devijacija za svaku skupinu;
- x - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu $p \leq 0,05$;
- skupina A (kontrolna skupina- prasad tretirana 100% kisikom), skupina B (prasad tretirana kombinacijom kisika 40% i dušikovog oksidula 60%), skupina C (prasad tretirana kombinacijom 100% kisika i izoflurana), skupina D (prasad tretirana kombinacijom kisika 40%, dušikovog oksidula 60% i izoflurana).

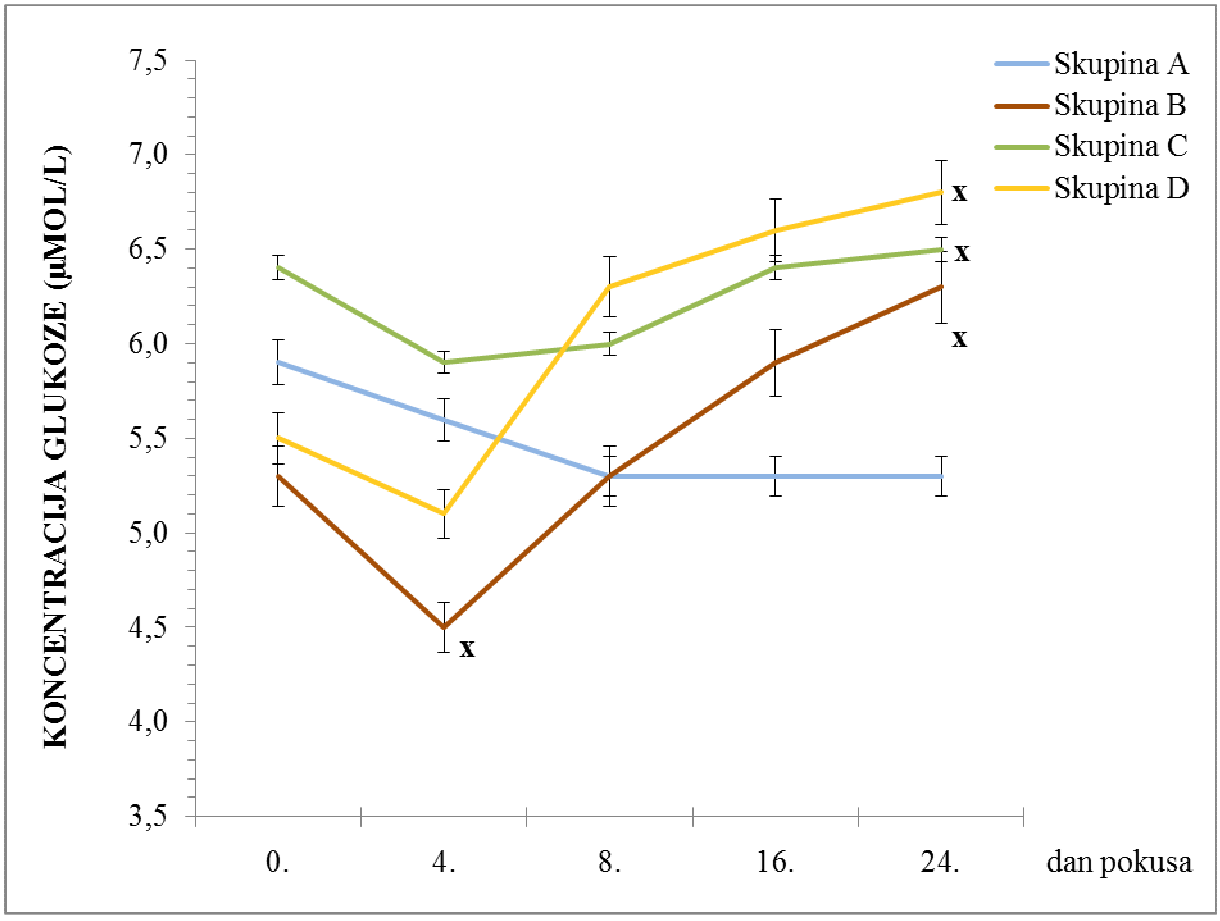
Pri analizi razine alanin aminotransferaze (ALT) u serumu prasadi zabilježili smo statistički značajno više vrijednosti 8. dana pokusa u prasadi tretirane kombinacijom kisika i dušikovog oksidula u odnosu na prasad tretiranu 100% kisikom. Također smo zabilježili 16. i 24. dana pokusa statistički značajno niže vrijednosti u prasadi tretirane kombinacijom kisika i izoflurana i prasadi tretirane kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana u odnosu na prasad tretiranu 100% kisikom (Slika 19).



Slika 19. Razina alanin aminotransferaze (ALT) u serumu pokusne prasadi tijekom 24 dana trajanja pokusa.

- I - na krivulji je označena standardna devijacija za svaku skupinu;
- x - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu $p \leq 0,05$;
- skupina A (kontrolna skupina- prasad tretirana 100% kisikom), skupina B (prasad tretirana kombinacijom kisika 40% i dušikovog oksidula 60%), skupina C (prasad tretirana kombinacijom 100% kisika i izoflurana), skupina D (prasad tretirana kombinacijom kisika 40%, dušikovog oksidula 60% i izoflurana).

U serumu pokusne prasadi skupine B (prasad tretirana kombinacijom kisika i dušikovog oksidula) i C (prasad tretirana kombinacijom kisika i izoflurana) 4. dana pokusa uočili smo niže vrijednosti koncentracije glukoze u odnosu na kontrolnu skupinu, pri čemu je vrijednost zabilježena u prasadi tretirane kombinacijom kisika 40% i dušikovog oksidula 60% bila statistički značajna. Statistički značajno više vrijednosti koncentracije glukoza zabilježili smo 24. dana pokusa u skupini B (prasad tretirana kombinacijom kisika i dušikovog oksidula), skupini C (prasad tretirana kombinacijom kisika i izoflurana) te skupini D (prasad tretirana kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana) u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 20).



Slika 20. Koncentracija glukoze u serumu pokusne prasadi tijekom 24 dana trajanja pokusa.

- I - na krivulji je označena standardna devijacija za svaku skupinu;
- x - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu $p \leq 0,05$;
- skupina A (kontrolna skupina- prasad tretirana 100% kisikom), skupina B (prasad tretirana kombinacijom kisika 40% i dušikovog oksidula 60%), skupina C (prasad tretirana kombinacijom 100% kisika i izoflurana), skupina D (prasad tretirana kombinacijom kisika 40%, dušikovog oksidula 60% i izoflurana).

4.3. Vrijednosti imunosnih pokazatelja

Analizom rezultata udjela $CD4^+$ limfocita u perifernoj krvi pokusne prasadi zabilježili smo statistički značajno niže vrijednosti slijedom po danima pokusa: 4. dana pokusa u prasadi tretirane kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana u odnosu na prasad tretiranu 100% kisikom, 8. dana u prasadi tretirane kombinacijom kisika i izoflurana i prasadi tretirane kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana u odnosu na prasad tretiranu 100% kisikom, 16. dana pokusa u prasadi tretirane kombinacijom kisika i dušikovog oksidula, prasadi tretirane kombinacijom kisika i izoflurana i prasadi tretirane kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana u odnosu na prasad tretiranu 100% kisikom te 24. dana pokusa u prasadi tretirane kombinacijom kisika i izoflurana i prasadi tretirane kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana u odnosu na prasad tretiranu 100% kisikom (Tablica 4).

U perifernoj krvi pokusne prasadi analizom udjela $CD8^+$ limfocita uočili smo statistički značajno niže vrijednosti slijedom po danima pokusa: 4. dana pokusa u skupinama B (prasad tretirana kombinacijom kisika i dušikovog oksidula) i D (prasad tretirana kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana) u odnosu na kontrolnu skupinu, 8. dana pokusa u skupinama C (prasad tretirana kombinacijom kisika i izoflurana) i D (prasad tretirana kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana) u odnosu na kontrolnu skupinu, 16. dana pokusa u skupinama C (prasad tretirana kombinacijom kisika i izoflurana) i D (prasad tretirana kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana) u odnosu na kontrolnu skupinu te 24. dana pokusa u skupinama B (prasad tretirana kombinacijom kisika i dušikovog oksidula), C (prasad tretirana kombinacijom kisika i izoflurana) i D (prasad tretirana kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana) u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 5).

Pri analizi udjela $CD21^+$ limfocita u perifernoj krvi pokusne prasadi zabilježili smo statistički značajno niže vrijednosti slijedom po danima pokusa: 4. i 8. dana pokusa u prasadi tretirane kombinacijom kisika i izoflurana i prasadi tretirane kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana u odnosu na prasad tretiranu 100% kisikom, 16. dana pokusa u prasadi tretirane kombinacijom kisika i dušikovog oksidula, prasadi tretirane kombinacijom kisika i izoflurana i prasadi tretirane kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana u odnosu na prasad tretiranu 100% kisikom te 24. dana pokusa u prasadi tretirane kombinacijom kisika i

dušikovog oksidula, prasadi tretirane kombinacijom kisika i izoflurana i prasadi tretirane kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana u odnosu na prasad tretiranu 100% kisikom (Tablica 6).

U perifernoj krvi pokusne prasadi analizom udjela $CD45^+$ limfocita uočili smo statistički značajno niže vrijednosti slijedom po danima pokusa: 4. i 8. dana pokusa u skupinama C (prasad tretirana kombinacijom kisika i izoflurana) i D (prasad tretirana kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana) u odnosu na kontrolnu skupinu, 16. dana pokusa u skupinama B (prasad tretirana kombinacijom kisika i dušikovog oksidula), C (prasad tretirana kombinacijom kisika i izoflurana) i D (prasad tretirana kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana) u odnosu na kontrolnu skupinu te 24. dana pokusa u skupinama C (prasad tretirana kombinacijom kisika i izoflurana) i D (prasad tretirana kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana) u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 7).

Tablica 4. Vrijednosti kinetike udjela $CD4^+$ limfocita u perifernoj krvi četiri skupine pokusne prasadi tijekom 24 dana trajanja pokusa.

Skupina	Statistički pokazatelj	Dan 0	4	8	16	24
A	Sred. vr. ± St. dev.	17,84 ± 0,74	17,73 ± 0,58	18,60 ± 0,50	19,02 ± 0,63	20,03 ± 0,49
	Min. – Maks.	17,11 - 18,67	17,15 - 18,50	18,20 - 19,36	18,38 - 19,72	19,47 - 20,75
	Medijan	17,74	17,92	18,34	18,76	19,84
B	Sred. vr. ± St. dev.	16,06 ± 0,68	17,98 ± 0,69	18,61 ± 0,71	**19,69 ± 0,45**	19,38 ± 0,96
	Min. – Maks.	15,33 - 16,95	17,11 - 18,71	17,87 - 19,46	18,92 - 20,00	18,59 - 21,00
	Medijan	15,99	17,79	18,31	19,82	19,00
	p - u odn. na kont. skup.	0,056	0,841	0,841	0,032 **x**	0,222
C	Sred. vr. ± St. dev.	17,31 ± 0,25	17,01 ± 0,60	**15,81 ± 0,47**	**14,05 ± 0,65**	**14,56 ± 0,35**
	Min. – Maks.	17,06 - 17,66	16,17 - 17,59	15,41 - 16,61	13,10 - 14,74	14,00 - 14,90
	Medijan	17,33	17,06	15,60	14,08	14,60
	p - u odn. na kont. skup.	0,222	0,095	0,008 **x**	0,008 **x**	0,008 **x**
D	Sred. vr. ± St. dev.	17,85 ± 0,80	**14,77 ± 0,16**	**14,16 ± 0,34**	**13,93 ± 0,57**	**12,26 ± 0,11**
	Min. – Maks.	16,91 - 18,86	14,50 - 14,93	13,59 - 14,47	13,35 - 14,57	12,10 - 12,40
	Medijan	17,86	14,81	14,22	13,61	12,30
	p - u odn. na kont. skup.	1,000	0,008 **x**	0,008 **x**	0,008 **x**	0,008 **x**

- x - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu $p \leq 0,05$;
- skupina A (kontrolna skupina- prasad tretirana 100% kisikom), skupina B (prasad tretirana kombinacijom kisika 40% i dušikovog oksidula 60%), skupina C (prasad tretirana kombinacijom 100% kisika i izoflurana), skupina D (prasad tretirana kombinacijom kisika 40%, dušikovog oksidula 60% i izoflurana).

Tablica 5. Vrijednosti kinetike udjela $CD8^+$ limfocita u perifernoj krvi četiri skupine pokusne prasadi tijekom 24 dana trajanja pokusa.

Skupina	Statistički pokazatelj	Dan 0	4	8	16	24
A	Sred. vr. ± St. dev.	10,07 ± 0,23	11,41 ± 0,33	12,04 ± 0,21	11,08 ± 0,12	11,74 ± 0,32
	Min. – Maks.	9,79 - 10,34	10,99 - 11,79	11,78 - 12,35	10,93 - 11,23	11,35 - 12,05
	Medijan	10,11	11,34	12,03	11,09	11,84
B	Sred. vr. ± St. dev.	10,96 ± 0,16	**10,76 ± 0,20**	11,96 ± 0,15	10,71 ± 0,32	**10,10 ± 0,22**
	Min. – Maks.	10,78 - 11,18	10,56 - 11,09	11,77 - 12,17	10,39 - 11,20	9,79 - 10,37
	Medijan	10,94	10,73	11,95	10,73	10,13
	p - u odn. na kont. skup.	0,056	0,016 **x**	0,421	0,095	0,008 **x**
C	Sred. vr. ± St. dev.	11,00 ± 0,33	11,08 ± 0,39	**9,91 ± 0,34**	**7,91 ± 0,19**	**7,86 ± 0,28**
	Min. – Maks.	10,58 - 11,47	10,59 - 11,59	9,37 - 10,19	7,59 - 8,06	7,47 - 8,20
	Medijan	10,93	10,96	10,06	7,95	7,95
	p - u odn. na kont. skup.	0,056	0,222	0,008 **x**	0,008 **x**	0,008 **x**
D	Sred. vr. ± St. dev.	10,87 ± 0,33	**9,57 ± 0,35**	**8,30 ± 0,30**	**7,52 ± 0,31**	**7,47 ± 0,13**
	Min. – Maks.	10,48 - 11,27	9,04 - 10,01	7,96 - 8,69	7,25 – 8,00	7,29 - 7,61
	Medijan	10,94	9,59	8,36	7,39	7,53
	p - u odn. na kont. skup.	0,096	0,008 **x**	0,008 **x**	0,008 **x**	0,008 **x**

- x - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu $p \leq 0,05$;
- skupina A (kontrolna skupina- prasad tretirana 100% kisikom), skupina B (prasad tretirana kombinacijom kisika 40% i dušikovog oksidula 60%), skupina C (prasad tretirana kombinacijom 100% kisika i izoflurana), skupina D (prasad tretirana kombinacijom kisika 40%, dušikovog oksidula 60% i izoflurana).

Tablica 6. Vrijednosti kinetike udjela $CD21^+$ limfocita u perifernoj krvi četiri skupine pokusne prasadi tijekom 24 dana trajanja pokusa.

Skupina	Statistički pokazatelj	Dan 0	4	8	16	24
A	Sred. vr. ± St. dev.	29,47 ± 1,33	29,44 ± 0,33	28,94 ± 1,00	29,91 ± 1,02	26,25 ± 0,65
	Min. – Maks.	27,33 - 30,75	28,90 - 29,80	27,53 - 30,21	28,41 - 31,19	25,24 - 27,01
	Medijan	29,83	29,50	28,84	30,00	26,42
B	Sred. vr. ± St. dev.	30,09 ± 0,48	30,02 ± 1,01	28,17 ± 0,36	**27,08 ± 0,56**	**28,41 ± 0,88**
	Min. – Maks.	29,40 - 30,63	28,70 - 31,17	27,8 - 28,68	26,29 - 27,58	27,09 - 29,34
	Medijan	30,13	30,20	28,15	27,3	28,75
	p - u odn. na kont. skup.	0,548	0,548	0,222	0,008 **x**	0,008 **x**
C	Sred. vr. ± St. dev.	29,42 ± 0,66	**23,44 ± 1,05**	**24,35 ± 1,01**	**24,58 ± 0,64**	**22,83 ± 0,77**
	Min. – Maks.	28,90 - 30,42	22,23 - 24,93	22,84 - 25,27	23,90 - 25,51	21,66 - 23,70
	Medijan	29,10	23,52	24,58	24,55	23,00
	p - u odn. na kont. skup.	0,548	0,008 **x**	0,008 **x**	0,008 **x**	0,008 **x**
D	Sred. vr. ± St. dev.	30,96 ± 1,25	**27,81 ± 1,27**	**25,13 ± 1,11**	**24,95 ± 1,06**	**21,94 ± 0,59**
	Min. – Maks.	28,93 - 32,17	26,40 - 29,17	24,21 - 26,50	24,01 - 26,57	21,24 - 22,81
	Medijan	31,20	28,48	24,40	24,38	21,88
	p - u odn. na kont. skup.	0,095	0,016 **x**	0,008 **x**	0,008 **x**	0,008 **x**

- x - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu $p \leq 0,05$;
- skupina A (kontrolna skupina- prasad tretirana 100% kisikom), skupina B (prasad tretirana kombinacijom kisika 40% i dušikovog oksidula 60%), skupina C (prasad tretirana kombinacijom 100% kisika i izoflurana), skupina D (prasad tretirana kombinacijom kisika 40%, dušikovog oksidula 60% i izoflurana).

Tablica 7. Vrijednosti kinetike udjela $CD45^+$ limfocita u perifernoj krvi četiri skupine pokusne prasadi tijekom 24 dana trajanja pokusa.

Skupina	Statistički pokazatelj	Dan 0	4	8	16	24
A	Sred. vr. ± St. dev.	60,02 ± 0,97	60,33 ± 0,39	60,20 ± 1,14	61,15 ± 0,54	60,52 ± 0,78
	Min. – Maks.	58,91 - 61,25	59,89 - 60,74	58,97 - 61,58	60,63 – 62,00	59,85 - 61,81
	Medijan	59,78	60,40	60,23	60,97	60,30
B	Sred. vr. ± St. dev.	59,88 ± 1,10	61,04 ± 1,34	59,34 ± 1,51	**58,84 ± 0,80**	59,02 ± 1,19
	Min. – Maks.	58,90 - 61,66	59,79 - 63,07	57,81 - 61,29	58,03 - 60,05	57,92 - 60,95
	Medijan	59,35	60,62	59,50	58,55	58,81
	p - u odn. na kont. skup.	0,690	0,690	0,548	0,008 **x**	0,095
C	Sred. vr. ± St. dev.	58,36 ± 0,42	**53,09 ± 0,47**	**53,05 ± 0,53**	**49,78 ± 1,86**	**47,93 ± 1,21**
	Min. – Maks.	57,75 - 58,90	52,69 - 53,91	52,37 - 53,59	47,22 - 52,20	46,84 - 49,88
	Medijan	58,41	52,97	53,07	49,44	47,47
	p - u odn. na kont. skup.	0,056	0,008 **x**	0,008 **x**	0,008 **x**	0,008 **x**
D	Sred. vr. ± St. dev.	60,52 ± 1,03	**53,14 ± 1,46**	**48,16 ± 1,21**	**46,33 ± 1,45**	**43,13 ± 0,69**
	Min. – Maks.	59,77 - 62,24	51,62 - 55,55	47,11 - 50,10	45,12 - 48,82	42,31 - 44,17
	Medijan	60,14	52,88	48,12	45,83	43,08
	p - u odn. na kont. skup.	0,690	0,008 **x**	0,008 **x**	0,008 **x**	0,008 **x**

- x - statistička značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu $p \leq 0,05$;
- skupina A (kontrolna skupina- prasad tretirana 100% kisikom), skupina B (prasad tretirana kombinacijom kisika 40% i dušikovog oksidula 60%), skupina C (prasad tretirana kombinacijom 100% kisika i izoflurana), skupina D (prasad tretirana kombinacijom kisika 40%, dušikovog oksidula 60% i izoflurana).

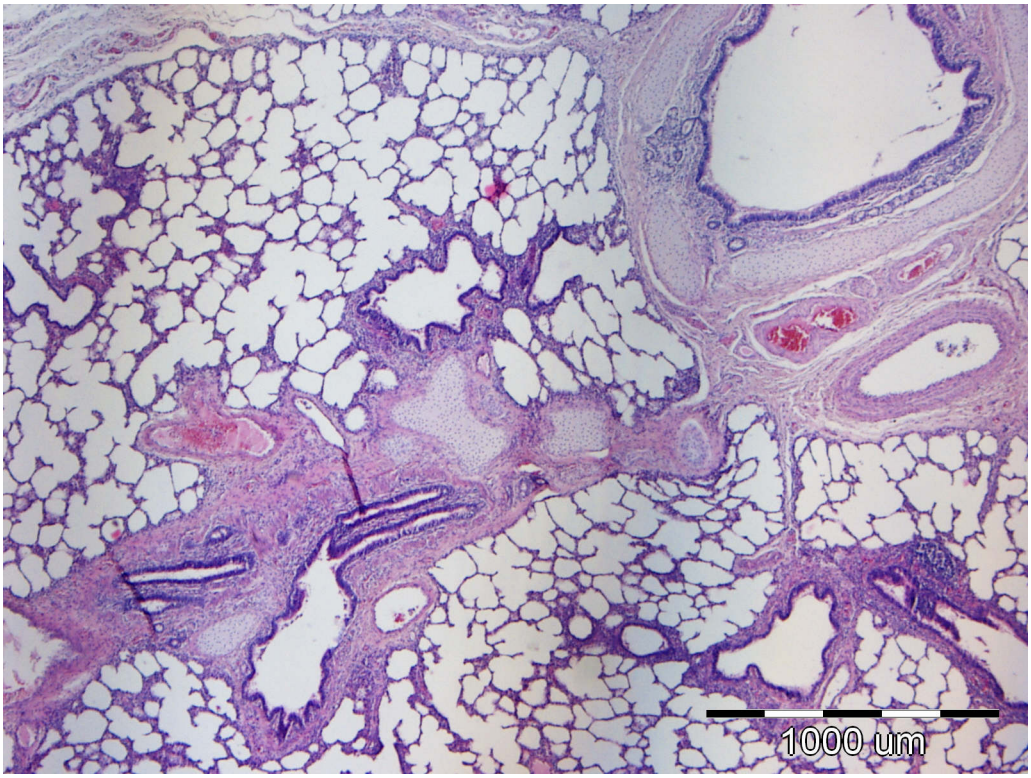
4.4. Patoanatomski nalaz

Tijekom istraživanja, analizom patoanatomskih nalaza pri razudbi po dva praseta iz skupine B (prasad tretirana kombinacijom kisika i dušikovog oksidula), C (prasad tretirana kombinacijom kisika i izoflurana) i D (prasad tretirana kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana) nismo zabilježili makroskopski vidljive patološke promjene u odnosu na kontrolnu skupinu.

4.5. Histopatološki nalaz

Histopatološke promjene u tkivima slezene, perifernog limfnog čvora, koštane moždine i pluća prasadi u pokusu prikazali smo na Slika 21-30.

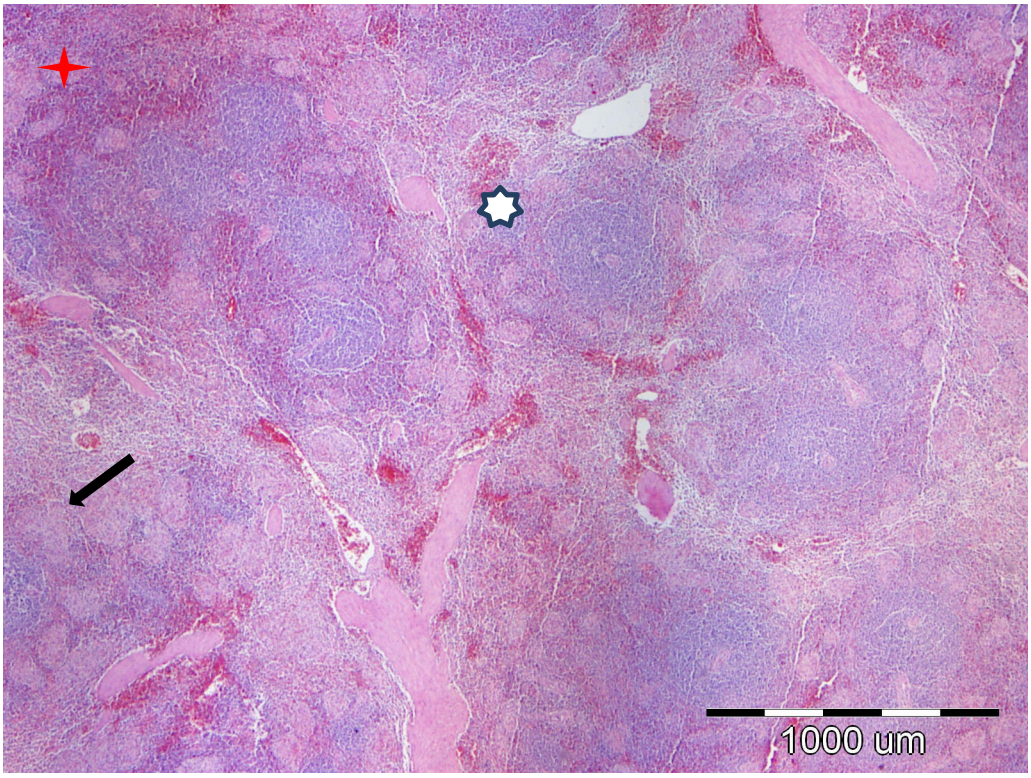
U uzorku pluća prasadi tretirane 100% kisikom, 24. dana pokusa uočili smo tanke interalveolarne septe s praznim alveolama bez patoloških promjena (Slika 21).



Slika 21. Pluća praseta tretiranog 100% kisikom, 24. dana pokusa; HE x 4.

U prasadi tretirane 100% kisikom u uzorku slezene, 24. dana pokusa uočili smo da 55-60% parenhima čini bijela pulpa (folikuli i periarteriolarne limfoidne plahte) u kojoj prevladavaju srednje veliki, okrugli limfociti (jezgre veličine 1,0-1,5 eritrocita) s oskudnim prstenom

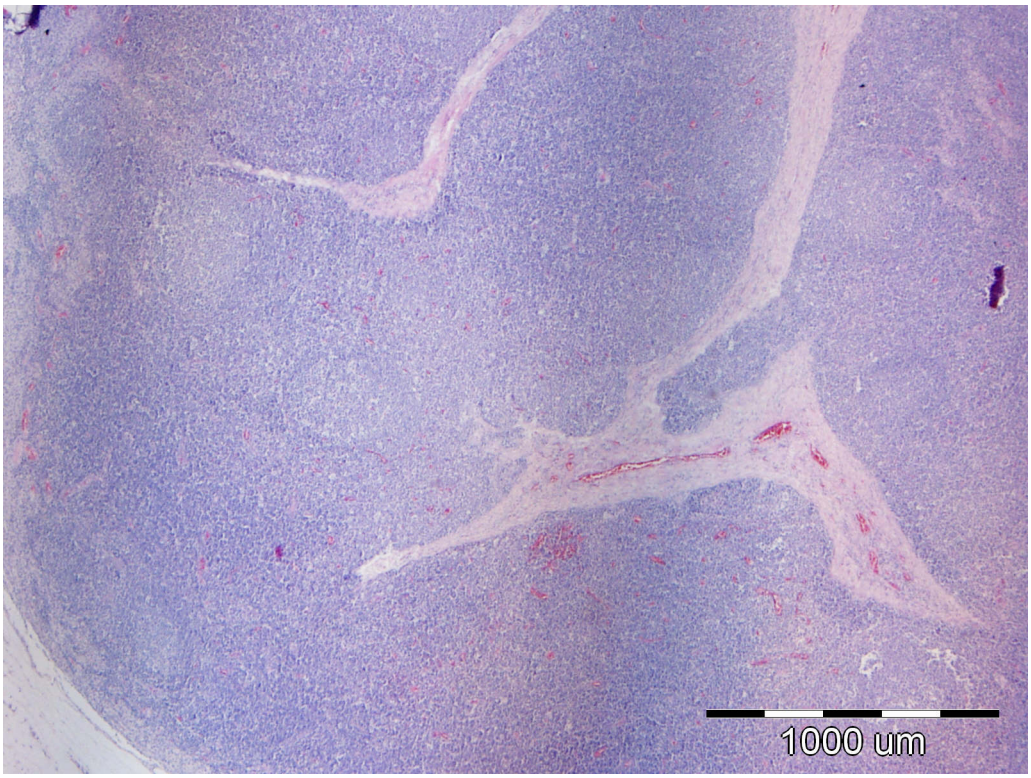
eozinofilne citoplazme te da je u pojedinim folikulima prisutan vrlo malen broj makrofaga. Crvenu pulpu čini 30-35% parenhima s multifokalnim područjima umjerene punokrvnosti te malim do umjerenim brojem limfocita, odnosno malim brojem plazma stanica i makrofaga. Preostalih 5-15% parenhima slezene čine prominentne periarteriolarne plahte makrofaga (Slika 22).



Slika 22. Slezena praseta tretiranog 100% kisikom 24. dana pokusa: bijela pulpa (✿); crvena pulpa (✦); plahte makrofaga (✓); HE x 4.

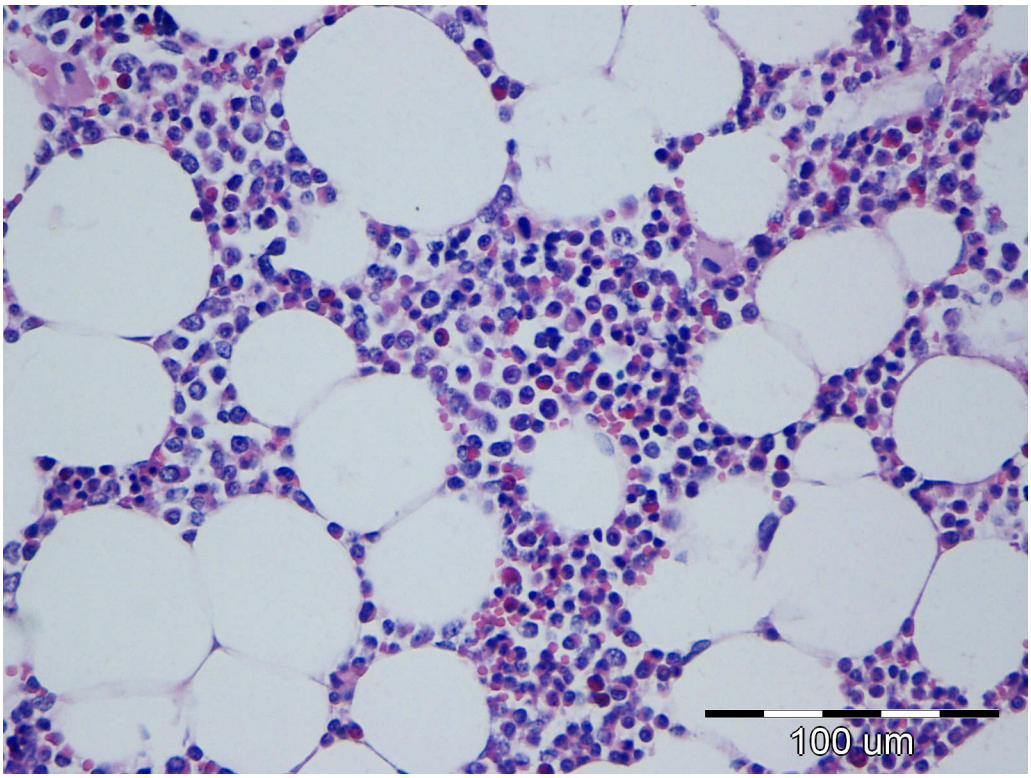
U uzorku cervikalnog superficijalnog kranijalnog i kaudalnog limfnog čvora prasadi tretirane 100% kisikom, 24. dana pokusa, zabilježili smo arhitekturu limfnih čvorova bez patoloških osobitosti. U uzorku superficijalnog kranijalnog limfnog čvora uočili smo slabije prominentnu perifernu zonu marginalnog sinusa praćenu manjim brojem folikula te smanjenu subkortikalnu zonu.

U prasadi tretirane 100% kisikom u uzorku sternalnog limfnog čvora, 24. dana pokusa, uočili smo očuvanu arhitekturu samog čvora s umjereno prominentnom perifernom zonom marginalnog sinusa praćenom manjim brojem folikula te smanjenom subkortikalnom zonom (Slika 23).



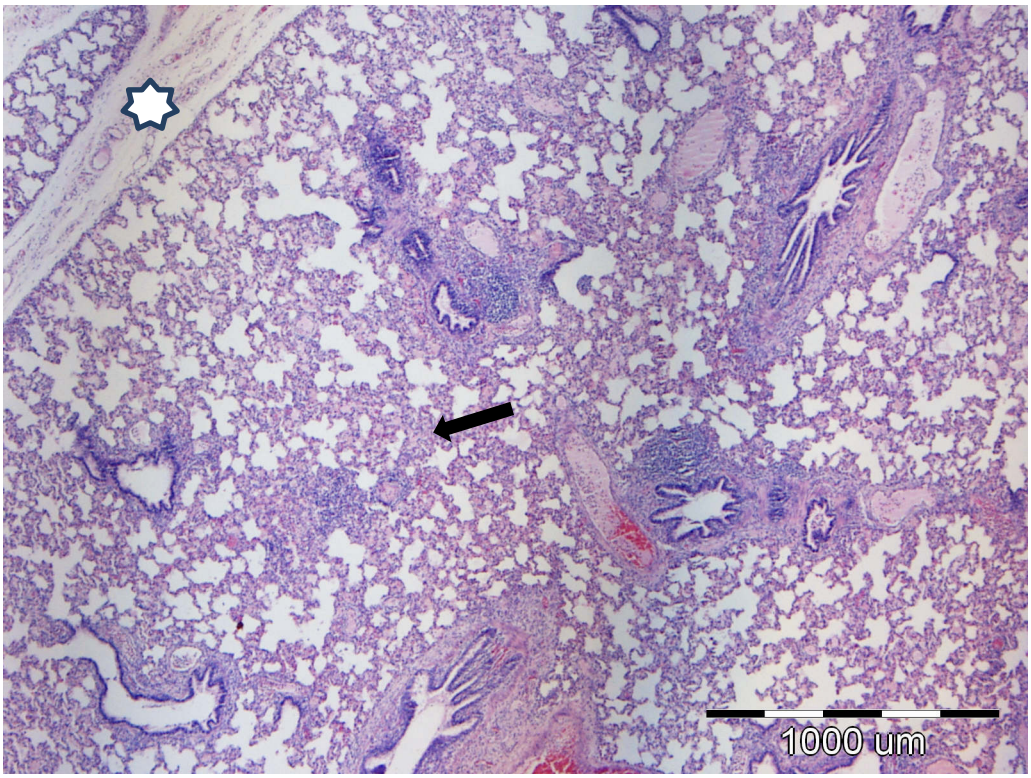
Slika 23. Visoko celularni sternalni limfni čvor praseta tretiranog 100% kisikom 24. dana pokusa; HE x 4.

U uzorku koštane moždine prasadi tretirane 100% kisikom, 24. dana pokusa, zapazili smo područja umjerene do visoke celularnosti. Zabilježili smo da 40-45% stanica čini mijeloidnu staničnu lozu (s dominacijom stanica ranog mijeloidnog stadija, manjim brojem monocita i segmentiranih neutrofila te većim brojem eozinofila), 20-25% stanica eritroidnu staničnu lozu te 15-20% megakariocita. Također smo zabilježili nalaz vrlo malog broja limfocita i plazma stanica (Slika 24).



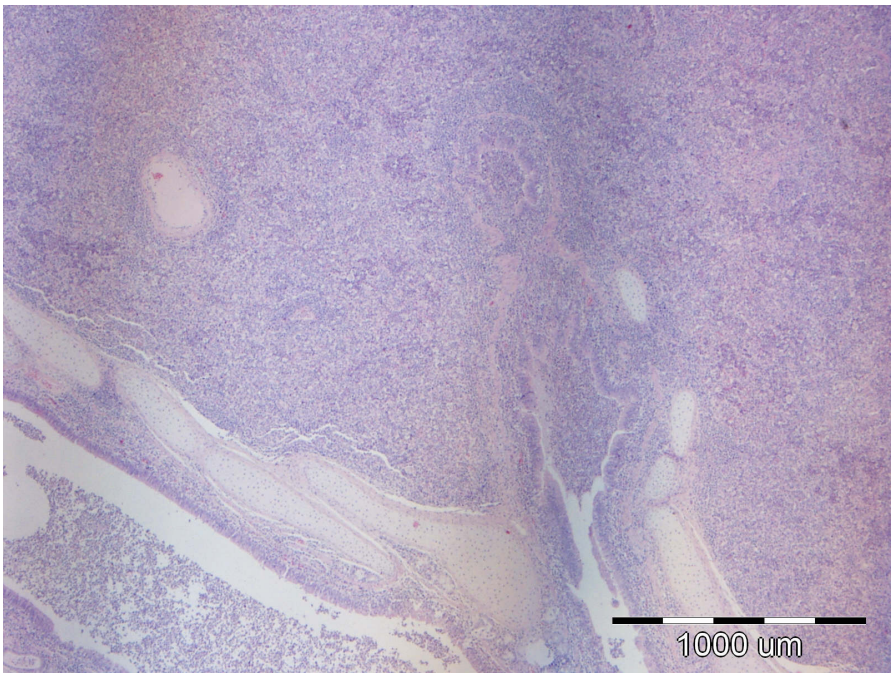
Slika 24. Koštana moždina praseta tretiranog 100% kisikom 24. dana pokusa; HE x 40.

U uzorku pluća 24. dana pokusa u prasadi tretirane kombinacijom kisika i izoflurana u odnosu na prasad tretiranu 100% kisikom, uočili smo multifokalno vrlo slabu hiperplaziju limfatičnog tkiva pridruženog bronhima/bronhiolima (engl. *Bronchial associated lymphoid tissue*, BALT) sa slabom infiltracijom limfocita u laminu propriju bronhiola te multifokalno umjereni intersticijski edem. Također smo zapazili multifokalno vidljive proširene alveolarne septe uslijed nakupljanja manjeg broja limfocita, plazma stanica i makrofaga mjestimice pomiješanih s oskudnom proteinskom tekućinom što upućuje na intersticijsku pneumoniju (limfohistiocitna, multifokalna do konfluentna, kronična, slabog stupnja) (Slika 25).



Slika 25. Pluća praseta tretiranog kombinacijom kisika i izoflurana, 24. dana pokusa; intersticijski edem (✡), proširene interalveolarne septe (➘); HE x 4.

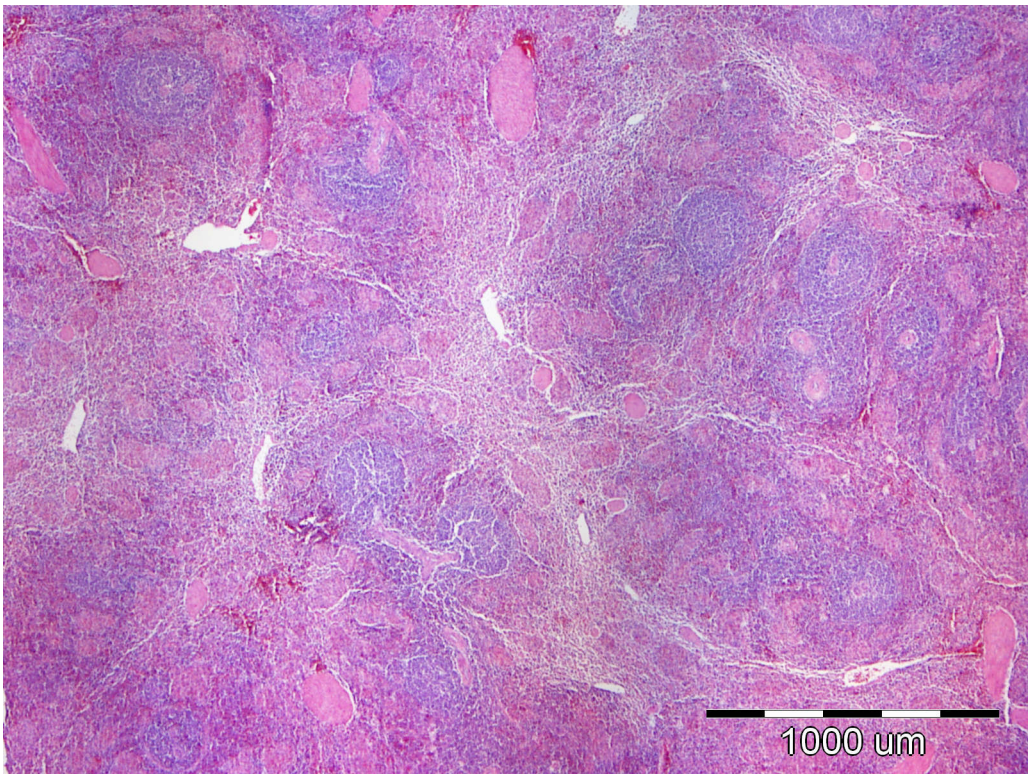
Također, u drugom uzorku pluća u prasadi tretirane kombinacijom kisika i izoflurana zapazili smo alveole multifokalno ispunjene s mješovitim upalnim staničnim infiltratom s dominacijom limfocita te manjim brojem neutrofila, plazma stanica i makrofaga uz mjestimičnu eksudaciju proteinske tekućine (bronhopneumonija, gnojna i limfocitna, lobularna, multifokalna s hiperplazijom BALT-a, kronična, umjerenog stupnja) (Slika 26).



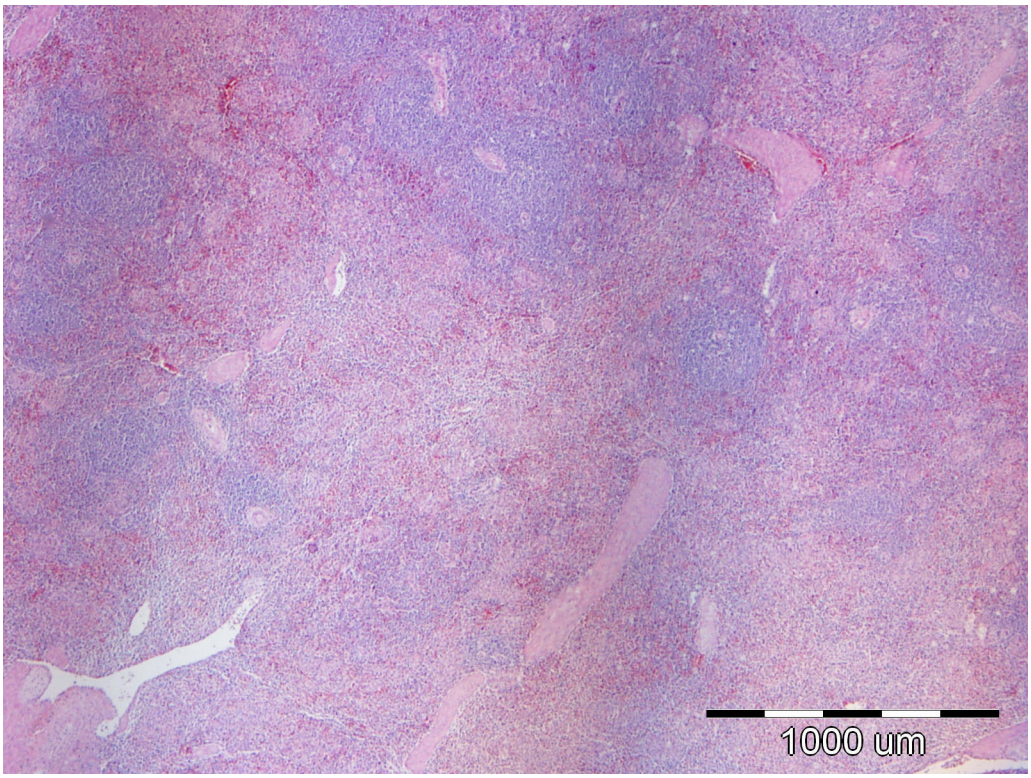
Slika 26. Pluća praseta tretiranog kombinacijom kisika i izoflurana 24. dana pokusa; lobularna gnojna bronhopneumonija; HE x 4.

Sličan smo nalaz 24. dana pokusa zabilježili i u uzorku pluća prasadi iz skupine D (višednevno anesteziranih kombinacijom kisika i dušikovog oksidula i izoflurana). Tako smo u bronhima i bronhiolima opazili slabiji intraluminalni mješoviti upalni infiltrat sastavljen od degeneriranih i vitalnih neutrofila i makrofaga pomiješanih s nešto sluzi, što upućuje na razvoj bronhitisa (gnojni subakutni, multifokalni, slabijeg stupnja).

U prasadi tretirane kombinacijom kisika i izoflurana, u uzorku slezene 24. dana pokusa, u odnosu na netretiranu prasad kao i u prasadi tretirane kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana u odnosu na prasad tretiranu 100% kisikom zabilježili smo da 35-45% parenhima čini bijelu pulpu (periartetriolarne limfoidne plahte i folikuli) u kojoj prevladavaju mali okrugli limfociti (jezgre veličine 1-1,5 eritrocita) s oskudnim prstenom eozinofilne citoplazme (slabija limfocitna deplecija). Crvenu pulpu čini 35% parenhima s umjerenim brojem limfocita i plazma stanica te malim brojem makrofaga. Preostalih 15% parenhima čine prominentne periarteriolarne plahte makrofaga (slaba do umjerena deplecija) (Slika 27 i Slika 28).

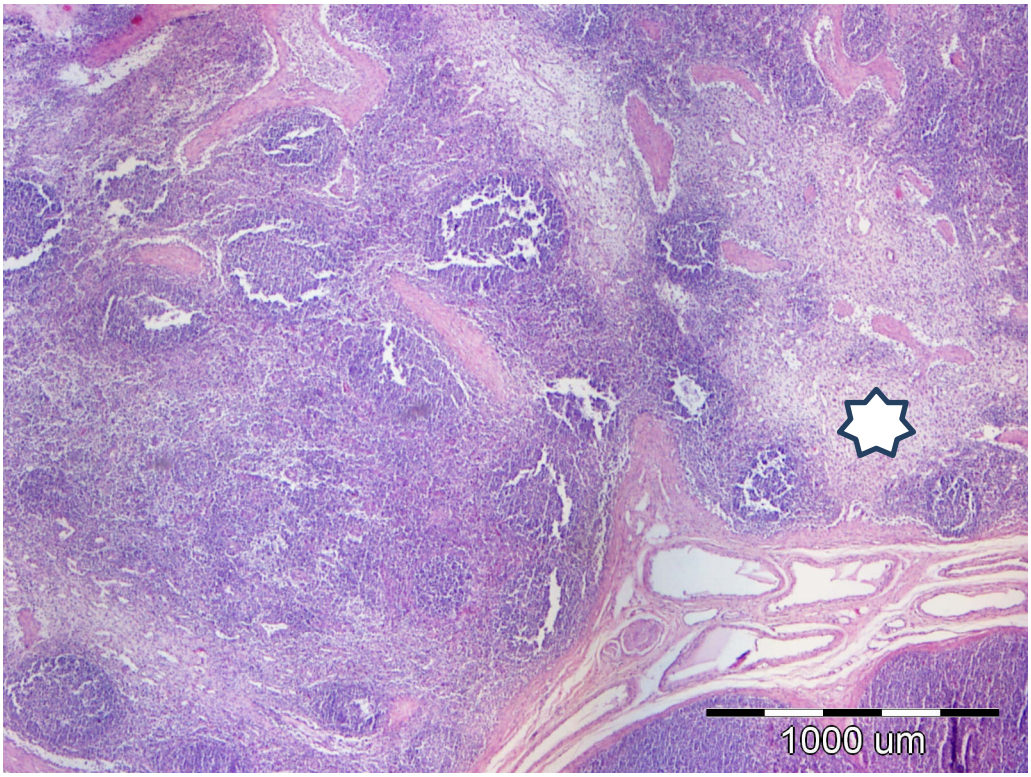


Slika 27. Slezena praseta tretiranog kombinacijom kisika i izoflurana 24. dana pokusa; HE x 4.



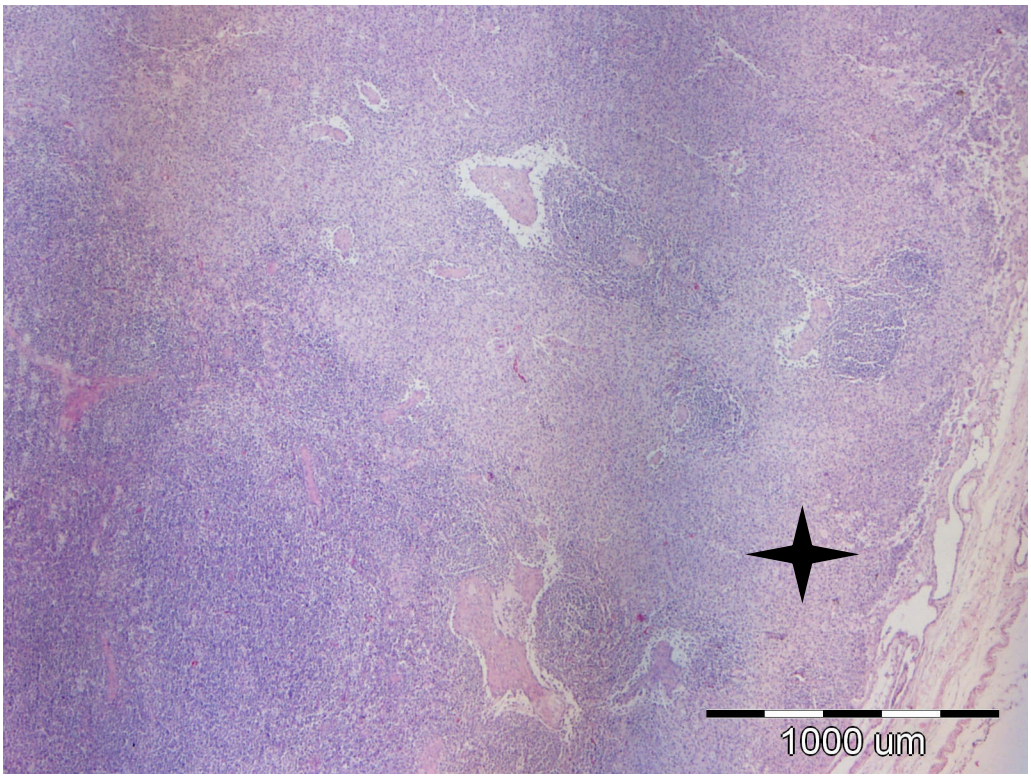
Slika 28. Slezena praseta tretiranog kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana 24. dana pokusa; HE x 4.

U uzorku cervikalnog superficijalnog kranijalnog i kaudalnog limfnog čvora prasadi iz skupine C (prasad tretirana kombinacijom kisika i izoflurana) u odnosu na skupinu A (prasad tretirana 100% kisikom), 24. dana pokusa uočili smo očuvanu arhitekturu limfnih čvorova sa slabije izraženom perifernom zonom marginalnog sinusa uz minimalno smanjen broj folikula i smanjenom subkortikalnom zonom (slabija deplecija) (Slika 29).



Slika 29. Cervikalni superficijalni limfni čvor praseta tretiranog kombinacijom kisika i izoflurana 24. dana pokusa; slabija limfocitna deplecija i prominentno parakortikalno područje slabije infiltrirano limfocitima (✡); HE x 4.

U drugom smo uzorku cervikalnog superficijalnog kranijalnog i kaudalnog limfnog čvora prasadi tretirane kombinacijom kisika i izoflurana u odnosu na prasad tretiranu 100% kisikom 24 dana pokusa uočili sličan histopatološki nalaz uz jaču depleciju u opisanom tkivu (Slika 30).



Slika 30. Cervikalni superficijalni limfni čvor praseta tretiranog kombinacijom kisika i izoflurana 24. dana pokusa; izrazito prominentna zona marginalnog sinusa (✦) praćena jačom limfocitnom deplecijom; HE x 4.

U uzorku sternalnog limfnog čvora 24. dana pokusa u prasadi tretirane kombinacijom kisika i izoflurana u odnosu na netretiranu prasad, uočili smo očuvanu arhitekturu samog čvora s izrazito prominentnom perifernom zonom marginalnog sinusa sa smanjenim brojem folikula i smanjenom subkortikalnom zonom (jača deplecija).

Sličan nalaz 24. dana pokusa zabilježili smo u drugom uzorku cervikalnog superficijalnog kranijalnog i kaudalnog limfnog čvora prasadi tretirane kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana, pri čemu smo zamjetili umjerena deplecija u opisanom tkivu.

Tijekom razudbe 24. dana pokusa nismo pronašli sternalni limfni čvor prasadi tretirane kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana, već smo na njegovom mjestu zabilježili histološki ektopično tkivo štitne žlijezde.

U prasadi tretirane kombinacijom kisika i izoflurana u uzorku koštane moždine 24. dana pokusa u odnosu na netretiranu prasad nismo uočili bitnije promjene u histopatološkom nalazu. Sličan nalaz uočili smo i u prasadi tretirane kombinacijom kisika, dušikovog oksidula i izoflurana. Pri tome smo uočili područja umjerene do visoke celularnosti. Zabilježili smo da

40-45% stanica čini mijeloidnu staničnu lozu (s dominacijom stanica ranog mijeloidnog stadija, manjim brojem monocita neutrofila te većim brojem eozinofila), 20-25% stanica eritroidnu staničnu lozu te 15-20% megakariocita. Također smo zabilježili nalaz vrlo malog broja limfocita i plazma stanica.

5. RASPRAVA

Imunosni sustav svinje funkcionira kao dinamički integriragni sustav mjesta specijaliziranih za otkrivanje antigena u početnim stadijima lokalnih infekcija ili neoplastičkih promjena s pomoću molekularnih i staničnih mehanizama koji provode, po prepoznavanju antigena, slijed odgovarajućih indukcijskih, efektorskih i regulacijskih reakcija (67). Pri tome, od presudnog je značenja funkcijska zrelost imunosnog sustava, ali i niz fizioloških (laktacija, partus) i tehnoloških (uzimanje sperme, pregrupiranje, način držanja i ishrane) čimbenika, koji uz uvjete okoliša, izravno ili neizravno utječu na imunosnu reaktivnost u odraslih životinja. Danas su još uvijek nedostatni literaturni podatci o mogućem učinku inhalacijskih anestetika na imunosni sustav svinja. Naime, imunofenotipizacijom limfocitnih staničnih subopulacija na modelu svinje, primjenjujući sevofluran pojedinačno ili u kombinaciji s dušikovim oksidulom, dokazan je njegov statistički značajan imunosupresijski učinak na $CD4^+$, $CD8^+$, $CD21^+$ i $CD45^+$ limfocite i to već sedmi dan nakon početka primjene (9). Obzirom, da je u Republici Hrvatskoj u okviru veterinarske medicine kao inhalacijski anestetik najčešće korišten izofluran, u ovom radu je na modelu svinje ispitan njegov učinak na staničnu imunost anestezirane životinje. Tako, u prasadi tretirane izofluranom, već četvrtog dana primjene zabilježili smo izofluranov statistički značajan imunosupresijski učinak na $CD4^+$ (za 5%) i $CD8^+$ stanice (za 8 %), $CD21^+$ stanice (za 21%) te $CD45^+$ stanice (za 12%) u odnosu na netretiranu prasad. U istom periodu, jedino u prasadi tretirane kombinacijom izoflurana s dušikovim oksidulom, dodatno su za 11% sniženi udjeli $CD4^+$ limfocita u odnosu na prasad tretiranu izofluranom što upućuje na činjenicu da izofluran neovisno o kombinaciji primjene, potiskuje pomočnićke funkcije T-limfocita, odnosno suzbija imunološke reakcije predočavanja antigena od strane regulacijskih T-limfocita. Na osnovi istraživanja Berić-Lerotić u sličnim uvjetima pokusa, u našem istraživanju imunosupresijski učinak izoflurana na $CD4^+$ limfocite svinja je za 5% jači u odnosu na imunosupresijski učinak sevoflurana (9). Isto tako, na modelu svinje primjenom dušikovog oksidula svakodnevno tijekom cijelog pokusa nismo zabilježili statistički značajne promjene vrijednosti $CD4^+$, $CD8^+$, $CD21^+$, $CD45^+$ stanica u odnosu na kontrolnu prasad. Isto je uočeno i tijekom istraživanja na svinjama u kojem je zaključeno da dušikov oksidul nakon višednevne primjene nema imunosupresijski učinak (9). Međutim, u prasadi tretirane izofluranom, u odnosu na prethodno spomenuti četvrti dan tretmana, nakon daljnjih 20 tretmana (24. dana pokusa) zabilježili smo također izrazito jak imunosupresijski učinak na leukocitnu populaciju periferne krvi tretirane prasadi u odnosu na kontrolnu prasad (dodatni pad vrijednosti $CD4^+$ za 23%, $CD8^+$ za 22%, $CD21^+$ za

5%). Također, na kraju pokusa, u prasadi tretirane kombinacijom izoflurana i dušikovog oksidula zabilježili smo dodatni imunosupresijski učinak izoflurana na $CD8^+$ (za 3% više) i $CD21^+$ (za 9% više). Zabilježeni sniženi udjeli $CD8^+$ limfocita periferne krvi prasadi višednevno tretirane izofluranom ili njegovom kombinacijom s dušikovim oksidulom upućuje na njegov učinak potiskivanja citolitičke funkcije, odnosno suzbijanje imunološke reakcije prepoznavanja antigena od strane efektorskih T-limfocita. Na kraju naših istraživanja, dobiveni sniženi udjeli $CD21^+$ limfocita periferne krvi prasadi višednevno tretirane izofluranom ili njegovom kombinacijom s dušikovim oksidulom pokazuju da izofluran potiskuje aktivaciju i proliferaciju B-limfocita. Spoznaju imunosupresijskog učinka izoflurana u ovom radu dodatno potvrđuju zabilježeni jaki upalni procesi u tkivima pluća, slezene i pretraživanih limfnih čvorova u svinja tretiranih izofluranom te njegovom kombinacijom s dušikovim oksidulom u odnosu na netretiranu prasad nakon 24 dana pokusa. Slične promjene na modelu svinja na istim organima opisane su i pri korištenju sevoflurana i njegove kombinacije s dušikovim oksidulom nakon višednevne primjene (9). Isto tako, opisano je da inhalacijski anestetik, sevofluran već nakon jednokratne primjene uzrokuje histološka oštećenja plućnog tkiva u štakora (68).

Poznato je da inhalacijska anestezija ima stresni učinak na anestezirani organizam, što može izazvati dodatnu imunosupresiju (69). Promjene u hemogramu se mogu razviti već dvije minute nakon izazivanja stresa vađenjem krvi u svinje, a promjene se ponajviše opažaju na leukogramu u obliku povećanja ukupnog broja leukocita za 10-20%, smanjenja limfocita za 15% i povećanja broja neutrofila za 36% te u obliku povećanja hematokrita za 26% i hemoglobina za 18% (70). Stoga, nalaz sniženog broja leukocita (na kraju pokusa za oko 30%) u svinja tretiranih izofluranom ili njegovom kombinacijom s dušikovim oksidulom u odnosu na netretirane svinje upućuju da se nalaze i u stanju stresa. Također, nalazimo statistički značajno smanjenje udjela limfocita u prasadi tretirane izofluranom i njegovom kombinacijom s dušikovim oksidulom 24. dana istraživanja (za 35%) u odnosu na netretiranu prasad.To nas upućuje da izofluran kao vanjski čimbenik stresa u životinja uzrokuje i štetne patofiziološke reakcije, izazivajući odgovarajuće promjene u vladanju, fiziologiji i prijemljivosti za bolesti pa stoga može poremetiti njezinu dobrobit, a potom umanjiti njezine proizvodne potencijale i konačno ugroziti njezin život (69). Međutim, u odnosu na kontrolnu prasad, u skupinama životinja tretiranih izofluranom, samostalno ili u kombinaciji s dušikovim oksidulom uočeno je statistički značajno povećanje udjela neutrofila 16. dana i 24. dana istraživanja. Sličan nalaz zabilježen je i u svinja višednevno tretiranih sevofluranom (9).

U pokusu nakon trodnevnog izlaganja miševa sevofluranom zabilježen je snižen broj leukocita (71). U našem istraživanju je uočeno četvrti dan nakon početka istraživanja blagi porast broja leukocita u svih skupina prasadi, iako najmanji u skupinama izloženih izofluranu i kombinaciji izoflurana i dušikovog oksidula. Tijekom istraživanja uočili smo i statistički značajno višu koncentraciju hemoglobina u krvi u skupini tretiranoj izofluranom u odnosu na kontrolnu skupinu 16. dana istraživanja. Također, u odnosu na kontrolnu skupinu uočili smo i statistički značajno više vrijednosti hematokrita u prasadi skupine tretirane izofluranom 16. dan istraživanja (12%), ali uz naznaku da je opisano povišenje u okviru fizioloških vrijednosti ovisno o dobi prasadi (72). Stoga, iz svih ovih hematoloških pokazatelja možemo zaključiti da su prasad ponajviše u skupina tretiranih izofluranom te kombinacijom izoflurana i dušikovog oksidula bila izložena stresu koji se najviše očitovao 16. i 24. dan istraživanja. Isto tako, u našem istraživanju 16. dana izlaganja, u skupini tretiranoj izofluranom kao i u skupini tretiranoj izofluranom i dušikovim oksidulom uočene su statistički značajno niže vrijednosti ukupnih proteina i albumina u serumu u odnosu na kontrolnu skupinu. Također su u našem istraživanju i 24. dana uočene statistički značajno niže vrijednosti ukupnih proteina i albumina u serumu skupine tretirane izofluranom i dušikovim oksidulom u odnosu na kontrolnu skupinu. Ovdje treba napomenuti da je u isto vrijeme došlo do porasta koncentracije globulina u serumu (čak 30-40%) ponajviše u skupinama anesteziranih izofluranom te izofluranom i dušikovim oksidulom što može bit posljedica sinteze imunoglobulina kao reakcije organizma na stres. Premda se zbog sniženih albumina može sumnjati na višednevno krvarenje što je moglo nastati zbog sniženja fibrinogena, kojeg je jetra smanjeno sintetizirala, ipak nema nikakvih dokaza koji govore u prilog krvarenja, odnosno tijekom razudbe, krvarenje, unutarnje (želučani vrijed kao posljedica višednevnog stresa) ili vanjsko nije uočeno. To možemo vidjeti i po pokazateljima koji se odnose na crvenu krvnu sliku gdje se ne uočava pad broja eritrocita ili pad hematokrita u skupinama anesteziranim izofluranom te dušikovim oksidulom i izofluranom, nego, nasuprot porast.

Uočeno je da stres prouzročen vađenjem krvi može znatno utjecati na vrijednosti biokemijskih pokazatelja u svinje, uzrokujući povećanje vrijednosti ukupnih proteina, albumina, globulina, aspartat aminotransferaze, gama glutamil transferaze, ukupnog bilirubina i kreatin kinaze neposredno nakon vađenja krvi (73).

Iz dobivenih rezultata može se pokušati analizirati utjecaj izoflurana na jetrenu funkciju. Alkalna fosfataza polako se povećavala u svih skupina prasadi u odnosu na vrijednosti prije tretiranja. Povećanje alkalne fosfataze može imati veze s aktivnošću kosti za vrijeme rasta u prasadi. Također treba napomenuti da za vrijeme istraživanja nijedno prase nije šepalo pa

moguća fraktura kosti ili drugi upalni ili neoplastični procesi na kosti nisu uočeni. Budući je u skupinama anesteziranim izofluranom i kombinacijom izoflurana i dušikova oksidula 24. dan istraživanja statistički značajno viša koncentracija alkalne fosfataze u serumu u odnosu na kontrolnu skupinu, može se zaključiti da se radi o utjecaju izoflurana na hepatobilijarnu funkciju jetre što je slično zabilježeno na kraju pokusa i u istraživanju Berić-Lerotić (9). U pasa je kod povećanog lučenja kortizona kod npr. Cushingove bolesti pa i kod stresa povećana vrijednost kortikosteroidima inducirane alkalne fosfataze. Međutim, u svinja postojanje takve izoforme ovog jetrenog enzima nije dokazano, odnosno prethodno opisano povećanje vrijednosti kinetike alkalne fosfataze još uvijek je unutar fizioloških vrijednosti ovisno o dobi domaće svinje (72). Ovom idu u prilog i dobivene vrijednosti gama glutamil transferaze, koje su slične vrijednostima alkalne fosfataze. Naime, također su uočene statistički značajno više vrijednosti gama glutamil transferaze u skupini anesteziranoj izofluranom te u skupini anesteziranoj dušikovim oksidulom i izofluranom, nego u kontrolnoj skupini 24. dana od početka istraživanja što je slično zabilježeno i u istraživanju Berić-Lerotić (9). Vrijednosti alanin aminotransferaze i aspartat aminotransferaze bile su statistički značajno niže u skupinama anesteziranim izofluranom te izofluranom i dušikovim oksidulom 16. i 24. dan istraživanja u odnosu na kontrolnu skupinu. Stoga povišene vrijednosti alkalne fosfataze i gama glutamil transferaze 24. dana uz smanjenje koncentracije albumina u serumu isti dan istraživanja u skupini tretiranoj i izofluranom i u skupini tretiranoj dušikovim oksidulom i izofluranom mogu nam govoriti o utjecaju izoflurana na metabolizam jetre koja ima središnju ulogu pri održanju stalne razine glukoze u krvi. Tako u našim istraživanjima zabilježene su statistički značajno više vrijednosti glukoze 24. dana pokusa u prasadi tretirane izofluranom te prasadi tretirane kombinacijom dušikovog oksidula i izoflurana u odnosu na netretiranu prasad. Isto tako, u literaturi je opisano da pri dugotrajnoj izloženosti stresu na modelu svinje dolazi do povećanja koncentracije glukoze u krvi (70).

Dokaz imunosupresijskog djelovanja izoflurana u ovom istraživanju dobra je osnovica za buduća istraživanja u kojima bi se pratio intenzitet imunosupresije, njeno trajanje, ali i u kojima bi se proučavala imunosupresijska djelovanja drugih kombinacija inhalacijskih i intravenskih anestetika. Kod dugotrajne primjene dušikova oksidula nisu uočeni znanstveno utemeljeni znaci imunosupresije pa možemo zaključiti da bez višednevne primjene izoflurana nema ni imunosupresije. Prema tome, dugotrajna primjena izoflurana u svinja izaziva imunosupresiju pa je za pretpostaviti da je u oboljelih životinja i ljudi koji imaju već narušenu imunost, potreban oprez pri višednevnoj izloženosti izofluranu jer postoji mogućnost dodatne

imunosupresije, što može dovesti do pogoršanja zdravstvenog stanja bolesnika pa čak i do smrtnog ishoda.

6. ZAKLJUČCI

Temeljem dobivenih rezultata istraživanja utjeca višednevne primjene izoflurana i dušikovog oksidula kao i njihove kombinacije na modelu domaće svinje možemo zaključiti sljedeće:

- U svinja tretiranih dušikovim oksidulom nakon 24 dana nismo zabilježili statistički značajno različite vrijednosti $CD4^+$, $CD8^+$, $CD21^+$ i $CD45^+$ stanica u odnosu na netretirane svinje što nas upućuje da dušikov oksidul samostalno ne djeluje imunosupresivno na staničnu imunost nakon višednevne primjene;

- U svinja tretiranih izofluranom nakon 24 dana zabilježili smo statistički značajno niže vrijednosti $CD4^+$, $CD8^+$, $CD21^+$ i $CD45^+$ stanica u odnosu na netretirane svinje što nas upućuje da izofluran djeluje imunosupresivno na staničnu imunost nakon višednevne primjene;

- U svinja tretiranih kombinacijom izoflurana i dušikova oksidula nakon 24 dana zabilježili smo statistički značajno niže vrijednosti $CD4^+$, $CD8^+$, $CD21^+$, $CD45^+$ stanica u odnosu na netretirane svinje. Pri tom treba napomenuti da su vrijednosti $CD4^+$, $CD8^+$, $CD21^+$ i $CD45^+$ stanica svinja tretiranih kombinacijom izoflurana i dušikova oksidula i svinja tretiranih izofluranom bile podjednake nakon 24 dana, što nas upućuje da dušikov oksidul u kombinaciji s izofluranom dodatno ne pojačava imunosupresivno djelovanje izoflurana;

- U svinja tretiranih izofluranom ili njegovom kombinacijom s dušikovim oksidulom nakon 24 dana zabilježili smo statistički značajno više vrijednosti udjela neutrofila te statistički značajno niže vrijednosti udjela limfocita u odnosu na kontrolnu skupinu što možemo povezati s višednevnom izloženošću životinja stresu;

- U svinja tretiranih izofluranom ili njegovom kombinacijom s dušikovim oksidulom nakon 24 dana zabilježili smo statistički značajno više vrijednosti koncentracije glukoze u odnosu na kontrolnu skupinu što možemo povezati s višednevnom izloženošću životinja stresu;

- U svinja tretiranih izofluranom ili njegovom kombinacijom s dušikovim oksidulom nakon 24 dana pokusa nalaz povišenih vrijednosti jetrenih enzima alkalne fosfataze i gama glutamil transferaze u odnosu na kontrolnu skupinu govori nam o narušenoj hepatobilijarnoj funkciji posljedično kojoj su i razvidne statistički značajno niže vrijednosti ukupnih proteina i albumina u tretiranih životinja;

- Pri histopatološkoj analizi tkiva svinja tretiranih izofluranom ili njegovom kombinacijom dušikovim oksidulom nakon 24 dana pokusa, u odnosu na netretiranu prasad, zabilježili smo upalne promjene u uzorku pluća, slezene i perifernog limfnog čvora što možemo povezati kao posljedicu imunosupresivnog djelovanja izoflurana ili njegove kombinacije dušikovim oksidulom na staničnu imunost;

- Pri histopatološkoj analizi tkiva svinja tretiranih dušikovim oksidulom nakon 24 dana pokusa nismo zabilježili patološki nalaz u tkivima pluća, slezene i perifernog limfnog čvora što upućuje da dušikov oksidul kao samostalni pripravak ne uzrokuje imunosupresiju, posljedično tome niti promjene na tkivima pluća, slezene i perifernog limfnog čvora.

7. LITERATURA

1. Matičić D., Vnuk D. (2010) Veterinarska kirurgija i anesteziologija, Zagreb, Medicinska naklada.

2. Tyther R., O'brien J., Wang J., Redmond H. P., Shorten G. (2003) Effect of sevoflurane on human neutrophil apoptosis. Eur. J. Anaesthesiol. 20, 111-115.

3. Oršolić N. (2014) Povijest Zavoda za animalnu fiziologiju. Arh. Hig. Rada. Toksikol. 65, 237-249.

4. Kowalski C., Zahler S., Becker B., Flaucher A., Conzen P., Gerlach E., Klaus P. (1997) Halothane, isoflurane, and sevoflurane reduce postischemic adhesion of neutrophils in the coronary system. Anesthesiology. 86, 188-195.

5. Sardas S., Aygun N., Gamli M., Unal Y., Unal N., Berk N., Karakaya A. E. (1998) 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. 418, 93-100.

6. Matsuoka H., Kurosawa S., Horinuochi T., Kato M., Hashimoto Y. (2001) Inhalation Anesthetics Induce apoptosis in Normal Peripheral Lymphocytes *In Vitro*. Anesthesiology. 95, 1467-1472.

7. Moudgil G. C., Gordon J., Forrest J. B. (1984) Comparative effects of volatile anaesthetic agents and nitrous oxide on human leucocyte chemotaxis in vitro. Can. Anaesth. Soc. J. 31, 631-637.

8. Berić-Lerotić S. (2010) Utjecaj ketamina, sevoflurana i dušikovog oksidula na staničnu imunost, Magistarski rad, Sveučilište u Zagrebu.

9. Berić-Lerotić S. (2014) Kinetika stanične imunosti i koncentracije kortizola u krvi svinje nakon inhalacijske anestezije sevofluranom i dušikovim oksidulom. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

10. Žubčić D., Kovšca Janjatović A., Kezić D., Špoljarić D., Valpotić H., Lacković G., Anđelinović D., Mršić G., Popović M. (2014) Identification, localization and quantification of porcine intestinal immune cell subsets during the first seven weeks of postnatal ontogeny. Vet. arhiv 84, 265-278.

11. Bianchi A. T. J., Zwart R. J., Jeurissen H. M., Monnen-Leusen H. W. M. (1992) Development of the B- and T cells compartsments in porcine lymphoid organs from birth to adult life; an immunohistological approach. Vet. Immunol. Immunopathol. 43, 63-68.

12. Pabst R., Rothkötter H. J. (1999) Postnatal development of lymphocyte subsets in different compartments of the small intestine of piglets. Vet. Immunol. Immunopathol. 72, 167-173.

13. Brown D. C., Maxwell C. V., Erf G. F., Davis M. E., Singh S., Johnson Z. B. (2006) Ontogeny of T- lymphocites and intestinal morphological characteristics in neonatal pigs at different ages in postnatal period. J. Anim. Sci. 84, 567-578.

14. Kovšca Janjatović A., Lacković G., Božić F., Špoljarić D., Popović M., Valpotić H., Vijtiuk N., Pavičić Ž., Valpotić I. (2009) Histomorphometric characteristics of immune cells in small intestine of pigs perorally immunized with F18ac+ nonenterotoxigenic E. coli vaccinal strain. Eur. J. Histochem. 53, 189-198.

15. Vega-Lopez M. A., Telemo E., Bailey M., Stevens K., Stokes C. R. (1993) Immune cell distribution in the small-intestine of the pig – Immunohistological evidence for an organized compartmentalization in the lamina propria. Vet. Immunol. Immunopathol. 37, 49-60.

16. Lunney J. K., Pescovitz M. D. (1987) Phenotypic and functional characterization of pig lymphocyte populations. Vet. Immunol. Immunopathol. 17, 135-144.

17. Hirt W., Saalmüller A., Reddehase M. J. (1990) Distinct γ/δ T cell receptors define two subsets of circulating porcine $CD2^-$, $CD4^-$, $CD8^-$ T lymphocites. Eur. J. Immunol. 20, 265-269.

18. Binns R. M. (1994) The null/γδTCR+ T cell family in the pig. Vet. Immunol. Immunopathol. 43, 69-77.

19. Pescovitz M. D., Aasted B., Canals A., Dominguez J., Vizcaino JS., Pospisil R., Sinkora J., Salmon H., Valpotic I., Davis W. C. (1994) Analysis of monoclonal antibodies reactive with the porcine CD2 antigen. Vet. Immunol. Immunopathol. 43, 229-232.

20. Hirt W., Saalmuller A., Reedhase M. J. (1993) Expression of γ/δ T cell receptors in porcine thymus. Immunobiol. 20, 70-81.

21. Bianchi, A. T. J., van der Heijden, P. J. (1994) Antigen presenting cells and B- cells in the pig. Vet. Immunol. Immunopathol. 43, 63-68.

22. Saalmuler A., Bryant J. (1994) Characteristics of porcine T lymphocytes and T- cell lines. Vet. Immunol. Immunopathol. 43, 45-52.

23. Haverson K., Saalmuller A., Alvarez B., Alonso F., Bailey M., Bianchi A. T. J., Boersma W. J. A., Chen Z., Davis W. C. (2001) Overview of the third international workshop on swine leukocyte differentiation antigens. Vet. Immunol. Immunopathol. 80, 5-23.

24. Pescovitz M. D., Book B. D., Aasted B., Dominguez J., Ezquerra A., Trebichavsky I., Novikov B., Valpotić I. (1998) Analyses of monoclonal antibodies reacting with porcine CD3: results from the second international swine CD workshop. Vet. Immunol. Immunopathol. 60, 261-268.

25. The Merck veterinary manual. 8th ed. (1998) U: Aiello S., Mays A. Merck & Co., Inc., Whitehouse Station New Jersey, USA, 1677.

26. Naglić T., Hajsig D. (1993): Veterinarska imunologija. Školska knjiga, Zagreb.

27. Zuckermann F. A., Husmann R. J. (1996): Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double positive T cells. Immunol. 87, 500-512.

28. Tomašković M. (1997): Diferencijacijski antigeni i tkivna raspodjela imunokompetentnih stanica u svinja. Doktorska disertacija. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

29. Pescovitz M. D., Sakopoulos A. G., GADDY J. A., Husmann R. J., Zuckermann F. A. (1994): Porcine peripheral blood CD4+/CD8+ dual expressing T cells. Vet. Immunol. Immunopathol. 43, 53-62.

30. Denham S., Shmitzu M., Bianchi A. T. J., Zwart R. J., Carr M. M., Parkhouse R. M. E. (1994): Monoclonal antibodies recognising differentiation antigens on porcine B cells. Vet. Immunol. Immunopathol. 43, 259-267.

31. Šver, L. (2001): Poticanje i moduliranje crijevne imunosti prasadi antigenima bakterije *Escerichia coli* i modifikatorima imunosnog odgovora. Doktorska disertacija. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

32. Kovšca-Janjatović A. (2009): Imunohistokemijska i morfometrijska analiza crijevnog imunosnog sustava svinje tijekom perinatalne ontogeneze i nakon egzogene imunomodulacije. Doktorska disertacija. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

33. Binns R. M., Pabst R. (1994) Lymphoid tissue structure and lymphocite trafficking in the pig. Vet. Immunol. Immunopathol. 43, 79-87.

34. Mršić G., Godić V., Kovšca Janjatović A., Špiranec K., Špoljarić D., Gršković B., Crnjac J., Mihelić D., Popović M. (2014) Imunmunophenotyping of dendritic cells of the residing porcine gut-associated lymphoid tissues. Vet. arhiv 84, 637-648.

35. Roth J. A. (1999) The immune System. U: Diseases of Swine, 8 edn., Straw B. E., D'Allaire, W. L., Mengeling, D. J., Taylor, (ur.), Blackwell Science, Ltd., pp.799-820.

36. Husband A. J. (1993) Novel vaccination strategies for the control of the mucosal infections. Vaccine. 11, 107-112.

37. Bellamy J. E., Nielsen N. O. (1974) Immune-mediated emigration of neutrophils into the lumen oft he small intestine. Infect. Immun. 9, 615-619.

38. Sellwood R., Hall G., Anger H. (1986) Emigration of polymorphonuclear leukocytes into the intestinal lumen of the neonatal piglet in response to challenge with K88- positive *Escherichia coli.* Res. Vet. Sci. 40, 128-135.

39. Bhogal B. S., Nagy L. K., Walker P. D. (1987) Neutrophil mediated and IgA dependent antibacterial immunity against enteropathogenic *Escherichia coli* in the porcine intestinal mucosa. Vet. Immunol. Immunopathol. 14, 23-44.

40. Osborn L. (1990) Leukocyte adhesion to endothelium in inflamation. Cell. 62, 3-6.

41. Murtaugh M. P. (1994) Porcine cytokines. Vet. Immunol. Immunopathol. 43, 37-44.

42. La Bonnardiere C., Lefevre F., Charley B. (1994) Interferon response in pigs: molecular and biological aspects. Vet. Immunol. Immunopathol. 43, 29-36.

43. Jukić M., Husedžinović I., Kvolik S., Majerić Kogler V., Perić M., Žunić J. (2013) Klinička anesteziologija, Drugo dopunjeno i izmjenjeno izdanje. Medicinska naklada, Zagreb.

44. Morgan E. G., Mikhail M. S., Murray M. J. (2013) Clinical Anesthesiology, peto izdanje, Lange medical Books/McGraw Hill medical Publishing Division. St.Louis.

45. Hodgson D. S. (2007) Comparison of isoflurane and sevoflurane for short-term anesthesia in piglets. Vet. Anaesth. Analg. 34, 117-124.

46. Lee H. T., Kim M., Kim N., Billings F. T., D'Agati V. D., Emala C. W. Sr. (2007) Isoflurane protects against renal ischemia and reperfusion injury and modulates leukocyte infiltration in mice. Am. J. Physiol. Renal. Physiol. 293, 713-722.

47. Holmes M. A., Weiskopf R. B., Eger E. I., Johnson B. H., Rampil I. J. (1990) Hepatocellular integrity in swine after prolonged desflurane (I-653) and isoflurane anesthesia: evaluation of plasma alanine aminotransferase activity. Anesth. Analg. 71, 249-253.

48. Inada T., Yamanouchi Y., Jomura S., Sakamoto S., Takahashi M., Kambara T., Shingu K. (2004) Effect of propofol and isoflurane anaesthesia on the immune response to surgery. Anaesthesia. 59, 954-959.

49. Pirttikangas C. O., Salo M., Mansikka M., Grönroos J., Pulkki K., Peltola O. (1995) The influence of anaesthetic technique upon the immune response to hysterectomy. A comparison of propofol infusion and isoflurane. Anaesthesia. 50, 1056-1061.

50. Kvolik S., Glavas-Obrovac L., Bares V., Karner I. (2005) Effects of inhalation anesthetics halothane, sevoflurane, and isoflurane on human cell lines. Life. Scien. 77, 2369-2383.

51. Preckel B. (2005) Pharmacology of modern volatile anaesthetics. Best. Pract. Res. Clin. Anaesthesiol. 19, 331-348.

52. De Rossi L. W., Horn N. A., Buhre W., Gass F., Hutschenreuter G., Rossaint R. (2002) The effect of isoflurane on neutrophil selectin and beta(2)-integrin activation in vitro. Anesth. Analg. 95, 583-587.

53. Faddy S. C., Garlick S. R. (2005) A systematic review of the safety of analgesia with 50% nitrous oxide: can lay responders use analgesic gases in the prehospital setting? Nitrous oxide: a global toxicological effect to consider. Anesthesiology. Emerg. Med. J. 22, 901-908.

54. Vahle-Hinz C., Detsch O., Hackner C., Kochs E. (2007) Corresponding minimum alveolar concentrations of isoflurane and isoflurane/nitrous oxide have divergent effects on thalamic nociceptive signalling. Br. J. Anaesth. 98, 228-235.

55. Fujinaga M., Maze M. (2002) Neurobiology of nitrous oxide-induced antinociceptive effects. Mol. Neurobiol. 25, 167-189.

56. Ytta J. K., Anskanten P. T., Andell T. R. (1996) Comparison of the effects of controlled ventilation with 100% oxygen, 50% oxygen in nitrogen, and 50% oxygen in nitrous oxide on responses to venous air embolism in pigs. Br. J. Anaesth. 77, 658–661.

57. Lumb M., Perry J., Deacon R., Chanarin I. (1981) Changes in tissue folates accompanying nitrous oxide-induced inactivation of vitamin B12 in the rat. Am. J. Clin. Nutr. 34, 2412-2417.

58. Mazze R. I., Wilson A. I., Rice S. A., Baden J. M. (1982) Reproduction and fetal development in mice chronically exposed to nitrous oxide. Teratology. 26, 11-16.

59. Schubert H., Eiselt M., Walter B., Fritz H., Brodhun M., Bauer R. (2012) Isoflurane/nitrous oxide anesthesia and stress-induced procedures enhance neuroapoptosis in intrauterine growth-restricted piglets. Intensive. Care. Med. 38, 1205-1214.

60. Riebold T. W., Thurmon J. C. (1986) Anesthesia in swine. U: Tumbelson, M. E. (ur.), Swine in Biomedical Research. New York: Plenum, pp. 243-254.

61. Swindle M. M. (1998) Anesthesia and analgesia. U: Swindle, M. M. (ur.), Surgery, Anesthesia, and Experimentals Techniques in Swine. Ames: Iowa State University Press, pp. 33-64.

62. Thurmon J. C., Benson G. J. (1993) Anesthesia in ruminants and swine. Current Veterinary Therapy 3: Food Animal Practice. Philadelphia: WB Saunders. 58-76.

63. Popović M, Valpotić I. (2004) Primjena protočne citometrije u veterinarskoj medicini Hrv.Vet. Vjesnik 1-2, 13-14.

64. Popović M., Kardum Paro M. M., Valpotić H., Pavičić Ž., Vujica N., Popović I. (2005) Citometrijska analiza dobno ovisnih imunohematoloških pokazatelja u perifernoj krvi nekih domaćih sisavaca. Vet. Stanica. 36, 263-268.

65. Batinić D., Rnjak L., Dubravčić K. (2006) Protočna citometrija u hematologiji. Ped. Croat. 50, 176-182.

66. Kabalin E. A., Balenović T., Popović M., Valpotić I., Pavičić Ž., Kezić D. (2009) Citometrijska analiza udjela subpopulacija leukocita periferne krvi odojaka velikog jorkšira. Vet. Stanica. 40, 111-115.

67. Binns R. M., Pabst R. (1996) The functional structure of the pig's immune system, resting and activated. U: Tumbleson, M. E., Schook, L. B. (ur.), Advances in swine in biomedical research. Plenum Press, New York, London, pp. 253-262.

68. Song S. Y., Zhou B., Yang S. M., Liu G. Z., Tian J. M., Yue X. Q. (2013) Preventive effects of sevoflurane on lung inflammation in rats. Asian. Pac. J. Trop. Med. 6, 53-56.

69. Valpotić I. (2002) Imunost i stres: koncepcija o međudjelovanju. Hrv. Vet. Vjesnik. 25, 49-65.

70. Dubreuil P., Farmer C., Couture Y. (1993) Hematological and biochemical changes following an acute stress in control and somatostatin – immunized pigs. Can. J. Anim. Sci. 73, 241 – 252.

71. Puig N. R., Ferrero P., Bay M. L., Hidalgo G., Valenti J., Amerio N., Elegna G. (2002) Effects of sevoflurane general anesthesia: immunological studies in mice. Int. immunopharmacol. 2, 95-104.

72. Harapin I., Bedrenica Lj., Hahn V., Šoštarić B., Grančer D. (2003) Haematological and biochemical values in blood of vild boar (*Sus scrofa ferus*). Vet. Arhiv 73, 333-343.

73. Dubreuil P., Couture Y., Tremblay A. (1990) Effects of experimenters and different blood sampling techniques on blood metabolite values in growing pigs. Can. J. Vet. Res. 54, 379 – 383.

8. KRATICE I SIMBOLI

- ALB - albumini
- ALT – alanin aminotransferaza
- ALP – alkalna fosfataza
- APC- antigen prezentirajuće stanice (engl. Antigen-presenting cells)
- APES – aminopropil-tritoksilen
- AST aspartat aminotransferaza
- BALT- limfatičko tkivo pridruženo bronhima/bronhioloma (eng. Bronhiol associated lymphoid tissue)
- CD – diferencijcijske molekule (eng. cluster differentiations)
- CSF – činitelj stimulacije kolonija
- CSF- cerebrospinalni likvor
- DNA- deoksiribonukleinska kiselina
- EDTA - etidiamintetriacetat
- FITC – fluorescein-izotiocijanatom
- GGT – gamaglutamil transferaza
- HCT – hematokrit
- HE – hemalaun-eozin bojanje tkiva
- HGB – koncentracija hemoglobina
- IFN- interferon
- KKS – kompletna krvna slika
- LČ- limfni čvorovi
- LP- lamina proprija
- MAK – minimalna alveoalna koncentracija
- MCH – masa hemoglobina po eritrocitu

- MCHC – koncentracija hemoglobina po eritrocitu
- MCV- prosječni volumen eritrocita
- MHC- glavni sustav tkivne snošljivosti (engl. Major histocompatibility complex)
- mPt- monoklonska protutijela
- NK stanice – prirodnoubilačke stanice (eng. Nature killer cells)
- PBS – fosfatni pufer
- Pe- fikoeritrin
- PP- Peyerove ploče
- RNA – ribonukleinska kiselina
- PLT – broj trombocita
- SPF-specifični patogen (engl. specific-pathogen free)
- TCR- T- stanični receptor
- TGF- transformacijski činitelj rasta
- TNF- tumor nekrotizirajući faktor
- WBC – broj leukocita

9. ŽIVOTOPIS

Ivan Lerotić je rođen 26.07.1974.g. u Zagrebu. Nakon završenog osnovnog i srednješkolskog obrazovanja, 1994.g. upisuje studij medicine na kojem je diplomirao 2001.g. Pripravnički staž obavio je u Klinici za traumatologiju u Zagrebu te 2002. godine položio državni ispit.

Poslijediplomski studij je upisao 2003.g., smjer FIZIOLOGIJA-IMUNOBIOLOGIJA na Prirodnoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu.

Iste godine zaposlio se u Sisačko moslavačkoj županiji pri Domu zdravlja kao liječnik Hitne medicinske pomoći u Sisku, a zatim u ispostavi Petrinja u trajanju od tri godine.

U opću bolnicu "Dr.Ivo Pedišić" u Sisku dolazi 2006.g. kada započinje i specijalizaciju iz ginekologije i porodništva.

Magistrirao je 2010.g. na temu "Koncentracija lidokaina u serumu kunića nakon epiduralne primjene u kombinaciji s adrenalinom, morfinom i fentanilom".

Doktorski studij upisao je 2011.g. na Prirodnoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu.

Specijalistički ispit iz područja ginekologije i porodništva položio je 2012.g.

ZNANSTVENI RADOVI

Radovi u časopisima citiranim u Current Contents

1. Gusak V, Turkovic V, Nesek-Adam V, Lerotic I, Popović M, Brajenović N, Brčić Karaconji I, Vnuk D (2013) Lidocaine serum concentration after epidural administration in combination with morphine and fentanyl in rabbit – A preliminary study. /Research in veterinary science. 94:651 – 655.

PRISUSTVOVANJA NA ZNANSTVENIM SKUPOVIMA

1. Špiranec K, Ćurković S, Brzica H, Mršić G, Špoljarić D, Gršković B, Lerotić I, Mihelić D, Popović M (2014) Growth promoters effects of Agaricus bisporus in quadricepsfemoris muscle of lika pramenka sheep breed // Book of Abstracts of the 2nd International scientific Meeting of Anatomy and Physiology Fundamentals of Medicine / Vilić, Marinko ; Lucić, Hrvoje (ur.). Zagreb: Intergrafika, Zagreb. 48-48 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).

2. Berić Lerotić S, Popović M, Mršić G, Špoljarić D, Špiranec K, Crnjac J, Lerotić I, Ćuk A,; Pirkić B, Musolin A, Gusak V, Vnuk D (2014) Utjecaj sevoflurana na kinetiku $CD45^+$ stanica periferne krvi kunića. Zbornik, Veterinarski dani 2014. 2014. 161-165 (poster, recenzija, objavljeni rad, znanstveni).