

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Iva Ferenac

**Procjena oštećenja i popravka DNA nakon izlaganja
sevofluranu *in vivo***

Diplomski rad

Zagreb, 2010. godina

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno - matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Procjena oštećenja i popravka DNA nakon izlaganja sevofluranu *in vivo*

Iva Ferenac

Zavod za animalnu fiziologiju, Prirodoslovno - matematički fakultet,
Sveučilište u Zagrebu, Rooseveltov trg 6

Cilj istraživanja bio je istražiti povezanost oštećenja i popravka DNA u leukocitima periferne krvi, stanicama jetre, bubrega i mozga Swiss albino miševa uzrokovanog uzastopnim izlaganjem sevofluranu. Miševi su bili izlagani sevofluranu u dozi od 2.4 vol% po dva sata dnevno, 3 dana uzastopce. Za procjenu genetičkog oštećenja spomenutih stanica upotrijebljeni su komet test i mikronukleus test.

Za provođenje komet testa miševi su podijeljeni u 5 pokusnih skupina (kontrolna skupina, skupina miševa žrtvovanih treći dan pokusa neposredno nakon izlaganja sevofluranu, 2 sata, 6 sati i 24 sata nakon izlaganja sevofluranu). Rezultati su pokazali statistički značajno povećanje srednje vrijednosti TL, TM i TI u svim pregledanim organima u usporedbi sa kontrolom. Veličina oštećenja DNA u točno određenom vremenu nakon uzastopnog izlaganja sevofluranu, bila je drugačija za svaki pregledani organ. Najveće oštećenje DNA uočeno je odmah nakon izlaganja sevofluranu, posebno u leukocitima periferne krvi. Inducirano oštećenje se dogodilo šest sati kasnije u organima nego u stanicama krvi, što je bilo za očekivati zbog toksikokinetike lijekova, jer se sevofluran prvo apsorbira u krvi. Niti jedno od proučavanih tkiva nije pokazivalo znakove popravka sve dok nisu prošla 24 sata od izlaganja sevofluranu. Za detektiranje nepopravljenih oštećenih dijelova genoma *in vivo* upotrijebljen je mikronukleus test. Broj mikronukleusa u retikulocitima statistički se značajno povećao u svim proučavanim vremenskim razmacima nakon tretmana u odnosu na kontrolnu skupinu.

(23 stranice, 6 slika, 3 tablice, 28 literaturnih navoda, jezik izvornika: Hrvatski)

Rad je pohranjen u knjižnici Zavoda za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, Rooseveltov trg 6.

Ključne riječi: komet test, oštećenje DNA, popravak DNA, sevofluran, inhalatorni anestetici, mikronukleus test, Swiss albino miševi

Voditelj: Prof. dr. sc. Nada Oršolić
Ocjenitelji: Doc. dr. sc. Zdravko Dolenc
Prof. dr. sc. Branka Pevalek-Kozlina
Zamjena: Doc. dr. sc. Vesna Benković

Rad prihvaćen: 10. veljače 2010.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation thesis

The assessment of DNA damage and repair following exposure to sevoflurane *in vivo*

Iva Ferenac

Department of Animal Physiology, Faculty of Science, University of Zagreb, Rooseveltov trg 6

Aim of the study was to investigate the relationship between DNA damage and repair of peripheral blood leucocytes (PBL), liver, kidney and brain cells of Swiss albino mice induced by repeated exposure to sevoflurane. Mice were exposed to sevoflurane in a dose of 2.4vol% for two hours daily, for three consecutive days. Genetic damage of mentioned cells was investigated using comet assay and micronucleus test.

To perform comet assay, mice were divided into 5 experimental groups (control group, groups of exposed mice sacrificed third day of experiment immediately after exposure of sevoflurane, two hours, six hours and twenty-four hours later). The results showed statistically significant increase in mean TL, TM and TI values in all examined organs vs. the control group. The DNA damage at a specific time after the repeated exposure to sevoflurane was different for each examined organ. Significant DNA damage immediately post exposure to sevoflurane was observed in PBL. The induced damage in organs occurred 6 hours later than in PBL what was expected according to toxicokinetic of drugs, where blood is the first compartment to absorb the sevoflurane. However none of the assayed tissues revealed signs of repair until 24th hour after the exposure. To distinguish unrepaired genome damage *in vivo* micronucleus test was applied. Number of micronuclei in reticulocytes showed statistically significant increase compared with control group at all observed times after the treatment.

(23 pages, 6 figures, 3 tables, 28 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central biological library Department of Animal Physiology, Faculty of Science, University of Zagreb, Rooseveltov trg 6

Key words: Comet assay, DNA damage, DNA repair, sevoflurane, inhalation anaesthetics, Micronucleus test, Swiss albino mice

Supervisor: Prof. dr. sc. Nada Oršolić
Rewiewers: Doc. dr. sc. Zdravko Dolenc
Prof. dr. sc. Branka Pevalek-Kozlina
Replacement: Doc. dr. sc. Vesna Benković

Thesis accepted: 10. veljače 2010.

Ovaj diplomski rad, izrađen je u Zavodu za animalnu fiziologiju, Biološkog odsjeka PMF-a Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja prof. biologije i dipl. ing. biologije, smjer ekologija.

Voljela bih se zahvaliti svojoj mentorici prof. dr. sc. Nadi Oršolić na pomoći, potpori i velikom strpljenju. Veliko hvala i doc. dr. sc. Vesni Benković za pomoć pri prvim koracima u laboratoriju. Također se zahvaljujem prim. dr. sc. Josipu Žuniću na pomoći iz područja anesteziologije.

Hvala mojoj obitelji na strpljenju sa svim mojim biološkim "problemima" i naravno hvala im na bezuvjetnoj potpori i ljubavi koju su mi pružili.

Posebno hvala mojim prijateljima koji su trpili moje paničarenje tijekom studija, slušali moje probleme, ali i dijelili sretne trenutke studentskog života.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. ANESTEZIJA.....	1
1.2. ANESTETICI.....	1
1.3. INHALACIJSKI ANESTETICI.....	2
1.3.1. Metabolizam i toksičnost.....	3
1.3.2. Sevofluran.....	5
2. MATERIJALI I METODE.....	8
2.1. POKUSNE ŽIVOTINJE	8
2.2. SEVOFLURAN	9
2.3. PLAN POKUSA.....	9
2.4. KOMET-TEST - METODOLOGIJA.....	9
2.5. MIKRONUKLEUS-TEST IN VIVO - METODOLOGIJA.....	11
2.6. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA.....	12
3. REZULTATI	12
3.1. KOMET-TEST	12
3.2. MIKRONUKLEUS-TEST	15
4. RASPRAVA.....	16
5. ZAKLJUČCI	19
6. LITERATURA	20

POPIS KRATICA

ANOVA - (*Analysis of Variance*) analiza varijance

CBF - (*Cerebral Blood Flow*) protok krvi u mozgu

CSF - (*Cerebrospinal Fluid*) cerebrospinalni likvor

DMSO - (*Dimethyl Sulfoxide*) dimetil sulfoksid

DNA - (*Deoxyribonucleic Acid*) deoksiribonukleinska kiselina

EDTA - (*Ethylenediaminetetraacetic Acid*) etilendiamintetraoctena kiselina

HFIP – (*Hexafluoroisopropanol*) heksafluoroizopropanol

HSD – (*Honest Significant Difference*) značajna razlika

LMA – (*Low-Melting Agarose*) agarozna niske točke tališta

MN – (*Micronucleus*) mikronukleus

MNRET – (*Micronucleated Reticulocytes*) retikulociti koji sadrže mikronukleus

NMP – (*N-Methylpyrrolidone*) N-metilpirolidon

PBL – (*Peripheral Blood Leucocytes*) leukociti periferne krvi

PBRET – (*Peripheral Blood Reticulocytes*) retikulociti periferne krvi

ROS – (*Reactive Oxygen Species*) reaktivne vrste kisika

SD – (*Standard Deviation*) standardna devijacija

TI – (*Tail Intensity*) intenzitet repa

TL – (*Tail Length*) dužina repa

TM – (*Tail Moment*) repni moment

1. UVOD

1.1. ANESTEZIJA

Razlikujemo opću, regionalnu, provodnu i lokalnu anesteziju. Opća anestezija je stanje neosjetljivosti na vanjske podražaje koje je izazvano, kontroliranom, reverzibilnom depresijom živčanih stanica. Pojam uključuje gubitak svijesti, svih bolnih osjeta, gašenje obrambenih refleksa, a često i relaksaciju skeletnih mišića. Opća anestezija može biti izazvana inhalacijskim anestheticima, kombinacijom više anestetika i tehnika. Inhalacijski anestetik ulazi preko pluća u krv, intravenski se anestetik daje preko vene u cirkulaciju, a moguće je anesteziju izazvati i intramuskularnim davanjem lijekova i rektalnom aplikacijom.

Pod pojmom regionalna anestezija podrazumijevamo davanje anestetika epiduralno, subarahnoidalno i izvođenje blok-anestezije. Bolesnik je pri svijesti s očuvanim refleksima, diše spontano. Davanjem anestetika/analgetika jedan se dio tijela učini neosjetljivim na vanjske podražaje. Slično se događa kod provodne (blok) anestezije i intravenske regionalne anestezije. Kod lokalne anestezije neosjetljivost se izaziva infiltracijom anestetika u tkivo, te njegovim kapanjem i prskanjem po mjestu primjene (Jukić i sur. 2005).

1.2. ANESTETICI

Za izvođenje anestezije danas se rabe anestetici. Razlikujemo dva osnovna tipa anestetika:

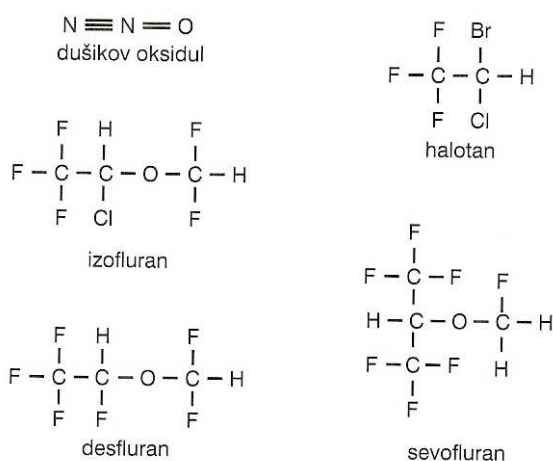
- ❖ **OPĆI ANESTETICI** - tvari koje uzrokuju opću anesteziju
 - INHALACIJSKI (dušikov oksidul, sevofluran, eter, halotan...)
 - INTRAVENSKI (barbiturati)
- ❖ **LOKALNI ANESTETICI** - tvari koje na mjestu primjene izazivaju neosjetljivost na podražaje, ponajprije na bol
 - ESTERSKOG TIPA (benzokain, prokain, tetrakain)
 - AMIDNOG TIPA (lidokain)

Dobar anestetik treba posjedovati određena svojstva: nisku toksičnost u velikom terapijskom području, jednostavnost davanja i rukovanja za anestezičara, brz nastup i brzo izjednačenje s dozom potrebnom za održavanje željene razine anestezije, dobra analgetska svojstva, minimalni učinak na respiratorne i kardiovaskularne funkcije, bez iritacije kože ili sluznica,

dobra fizička i kemijska svojstva (stabilno vrijeme skladištenja, neisparljivost, neeksplozivnost) (Jukić i sur. 2005).

1.3. INHALACIJSKI ANESTETICI

Inhalacijski anestetici daju se udisanjem preko maske i u smjesi s kisikom i zrakom. To su plinovi ili lako hlapljive tekućine. Ovim načinom anestezije se lako upravlja, povećanjem parcijalnog tlaka anestetika povećava se njegova koncentracija u smjesi. Njihove molekule su većinom halogenirani ugljikovodici, malene, lako se otapaju u mastima i uljima (lipofilne su) i lako prolaze kroz stanične membrane. Snažni inhalacijski anestetici su sevofluran, desfluran, halotan i izofluran. Dušikov oksidul ili dušikov-(I)-oksid (N_2O) je slab anestetik. Snažni anestetici mogu, za razliku od slabih, omogućiti za bolesnika siguran nastanak stanja anestezije u prisutnosti dovoljne količine kisika. Kemijska struktura inhalacijskih anestetika prikazana je na Slici 1.



Slika 1. Kemijska struktura inhalacijskih anestetika

Četiri su faze farmakokinetike svakog lijeka: apsorpcija, raspodjela (distribucija), metabolizam i izlučivanje (ekskrecija). Tijekom apsorpcije lijek s mjesta primjene ulazi u krvnu struju. Faza apsorpcije ne postoji tijekom intravenske primjene lijeka. Distribucijom se lijek prenosi kroz različita tkiva u organizmu. Biotransformacija je fizikalno-kemijski proces pri kojem dolazi do promjene lijeka u živom organizmu. Tijekom ekskrecije lijek se izlučuje iz organizma. Djelovanje inhalacijskih anestetika počinje načinom primjene (inhalacijom) i mjestom ulaska u organizam (alveolo-kapilarna membrana). U tijelo ulaze kroz pluća i svi se primarno eliminiraju preko pluća, izdisanjem. Drugi načini eliminacije ovise o intenzitetu

biotransformacije. Količina metaboliziranog anestetika određena je jetrenom enzimatskom aktivnošću i trajanjem izloženosti anestetika jetri.

Dušikov oksidul je jedini anestezijski plin, sve ostale inhalacijske anestetike ubrajamo u hlapljive anestetike, tj. pare hlapljivih tekućina jer su pri sobnoj temperaturi i tlaku tekućine. Današnji inhalacijski anestetici su neionizirani i imaju nisku molekularnu masu. Njihova difuzija je brza i nije potrebna olakšana difuzija ili aktivni transport iz krvi u tkiva.

Inhalacijski anestetici uzrokuju znatne promjene u mentalnoj funkciji, potrošnji kisika u mozgu, protoku krvi u mozgu (engl. *Cerebral Blood Flow*, **CBF**), dinamici cerebrospinalnog likvora (engl. *Cerebrospinal fluid*, **CSF**) i u elektrofiziologiji središnjeg živčanog sustava.

Također svi inhalacijski anestetici uzrokuju respiracijsku depresiju, porast PaCO₂ korelira s dozom anestetika. Većina anestetika s povećanjem koncentracije povećava frekvenciju disanja i smanjuje dišni volumen. Svi anestetici izazivaju depresiju respiracijskog odgovora na CO₂. Visoke doze mogu ukinuti ovaj odgovor. Snažni inhalacijski anestetici ne razlikuju se bitno po učinku na bronhomotorni tonus. Oni dovode do pada otpora u dišnom putu jer uzrokuju bronhodilataciju i histerezu plućnoga tkiva, blokiraju bronhokonstrikciju u istom stupnju.

Što se tiče utjecaja na srčanožilni sustav, svi snažni inhalacijski anestetici smanjuju arterijski tlak u korelaciji s dozom. Mehanizam smanjenja krvnoga tlaka uključuje vazodilataciju, smanjenje minutnoga volumena srca zbog depresije miokarda i smanjenje tonusa simpatičkog živčanog sustava. Potrošnja kisika smanjena je tijekom anestezije 5-10% u odnosu prema budnom stanju. Barorefleksni odgovor je oslabljen tijekom primjene ove vrste anestetika. Anestetici imaju izravni učinak na jetrenu cirkulaciju, smanjuju splahnjički protok krvi.

1.3.1. Metabolizam i toksičnost

Fluorinacijom inhalacijskih anestetika povećava se stabilnost molekule. Ovo je vrlo važno jer su jetrena i bubrežna toksičnost posljedica biotransformacije anestetika, a ne intaktne molekule.

Sevofluran je otporan na razgradnju kiselinama, ali se razgrađuje u soda apsorberu i barijevu apsorberu, ovisno o temperaturi. Koncentracija krajnjih proizvoda povećana je tijekom izloženosti sevoflurana suhom soda apsorberu i tijekom anestezije s niskim protokom plinova i u kružnom sustavu. Povećana koncentracija anestetika posljedica je povećanog udisanja izdahnutih plinova i manjih gubitaka krajnjih proizvoda putem visokoga protoka. Krajnji je proizvod CFH₂-O-C(-CF₂)(CF₃) ili spoj A. Pojava spoja A povezana je s nastankom

bubrežne tubularne nekroze. Znakovi toksičnosti u laboratorijskih životinja pojavljuju se tijekom izlaganja anestetiku na razini oko 110 ppm, a letalna količina je 340-350 ppm. Metabolizam *in vivo* ovisan je o tkivnoj topljivosti te vremenu potrebnom za potpuno uklanjanje lijeka. Prisutnost anestetika u tijelu kroz produljeni period zbog visoke topljivosti, vodi za sobom kontinuiranu biotransformaciju te stvaranje štetnih proizvoda kao anorganski fluor. Drugi je čimbenik podložnost lijeka biotransformaciji, tj. nastanku međuspojeva (metabolita) u jetri, plućima ili bubrezima, koji su najčešće uzrok njegove toksičnosti. Količine anestetika koje podliježu metabolizmu lijeka pokazane su u Tablici 1.

Tablica 1. Biotransformacija inhalacijskih anestetika

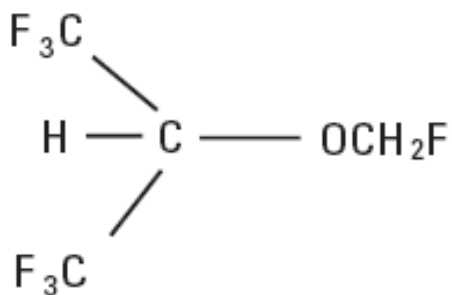
Anestetik	% biotransformacija
halotan	15-20
sevofluran	3
izofluran	0.2
desfluran	0.02

Inhalacijom desflurana nastaje malo povećanje anorganskoga fluora u serumu. Rizik nefrotoksičnosti sevoflurana je nizak, jer je serumska razina anorganskog fluorida povišena relativno kratko vrijeme nakon anestezije. Halotan, izofluran i desfluran odgovarajući su izbor u prijetećoj nefrotoksičnosti. Hepatotoksičnost halotana bila je glavni razlog za razvoj novih anestetika s visoko stabilnom molekulom rezistentnom na metabolizam *in vivo*. Pojavnost hepatitisa u korelaciji s halotanom je rijetkost. Halotan ima mnogo jači učinak na jetru nego drugi anestetici. Izlaganje halotanu može stvoriti uvjete da se razvije imunosni odgovor.

Za razliku od halotana, desfluran ne uzrokuje jetreno oštećenje, a izofluran i sevofluran imaju minimalna neželjena djelovanja. Hepatotoksičnost nije zabilježena kod desflurana. Zabilježena su dva slučaja oštećenja jetre koja se mogu pripisati sevofluranu. Čini se da desfluran, sevofluran i izofluran neće pogoršati kroničnu jetrenu bolest (Jukić i sur. 2005).

1.3.2. Sevofluran

Sevofluran je kompletno fluoriran metilni izopropil eter (Slika 2.) prozirna, bezbojna tekućina bez aditiva, slabo topljiva u vodi. Ne raspada se pod utjecajem svjetlosti, pa ne zahtijeva nikakve posebne uvjete skladištenja. Na njegovu razgradnju ne utječe toplina niti jake kiseline, ali može ju potaknuti soda i barijev apsorber. Može se rabiti u raspršivaču. Topljivost krv/plin je odmah iza desflurana. Nije iritabilan i snažan je bronhodilatator. To ga čini pogodnim za davanje preko maske u djece i u odraslih. Koronarni je vazodilatator, posjeduje pola snage izoflurana.



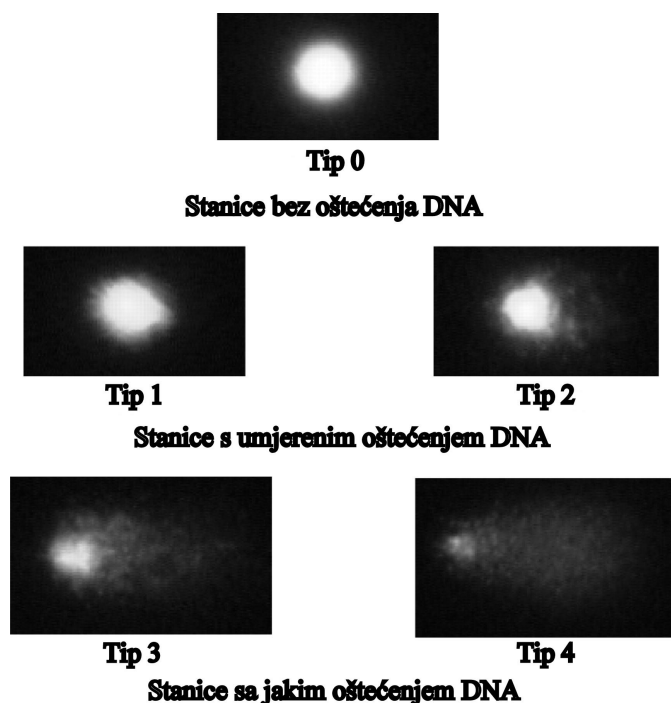
Slika 2. Strukturna formula sevoflurana
(fluorometil 2,2,2-trifluoro-1-(trifluorometil) etil eter)

Sevofluran metabolizira citokrom P450 2E1 u heksafluoroizopropanol uz oslobađanje anorganskog fluorida i CO₂. Formirani heksafluoroizopropanol brzo konjugira s glukuričnom kiselinom i eliminira se kao metabolit urina. Istraživanja su pokazale da se samo 5% sevoflurana metabolizira *in vivo*. Ne stimulira stvaranje protutijela pa nema podataka o nastajanju hepatitisa koji bi bio posljedica imunoloških reakcija. Ne nastaje ugljikov monoksid kad se izlaže CO₂ apsorberu. U prisutnosti CO₂ adsorbera nastaje vinil-halid ili "spoj A" (*Compound A*). Dokazana je nefrotoksičnost u štakora, ali ne i u zdravih dobrovoljaca ili bolesnika u kojih je protok svježih plinova bio 3 L/min (Jukić i sur. 2005).

Molekula DNA (engl. *Deoxyribonucleic Acid*, **DNA**) je neprestano izložena brojnim biološkim, kemijskim i fizikalnim faktorima koji mogu uzrokovati promjene u njezinoj strukturi i dovesti do mutacija te promijeniti njezinu funkciju *in vivo* (Halliwell i Cross 1994). Među brojnim egzogenim spojevima, anestetički plinovi koji se koriste u zahvatima pod općom anestezijom, privukli su veliku pozornost na sebe zbog mogućih

mutagenih/genotoksičnih učinaka (Karabiyik i sur. 2001; Sardaš i sur. 1998). Istraživanje koje je provela Rozgaj i sur. (2009) pokazalo je da izlaganje sevofluranu, izofluranu i dušikovom oksidulu uzrokuje oštećenja u genomu osoba čija struka zahtijeva doticaj s navedenim tvarima. Genotoksičnost u leukocitima periferne krvi (engl. *Peripheral Blood Leucocytes*, **PBL**), stanicama jetre, bubrega i mozga Swiss albino miševa nakon uzastopnog izlaganja sevofluranu *in vivo* tehnikom alkalnog komet testa, dokazana je u prethodnom radu (Brozovic i sur. 2008).

Alkalni komet test je metoda koja se često koristi u istraživanjima genotoksičnosti različitih tvari, a kojom se mjeri primarno oštećenje DNA u pojedinim stanicama (Slika 3.), ali treba imati na umu da on otkriva različita oštećenja (jednolančane i dvolančane lomove, mjesta osjetljiva na alkalne uvjete).



Slika 3. Alkalni komet test - prikaz oštećenja DNA

Drugi pokazatelj kromosomskih oštećenja je prisutnost mikronukleusa (engl. *Micronucleus*, **MN**) u perifernim limfocitima. Mikronukleus je pouzdan pokazatelj loma i gubitka kromosoma, što ga čini jedinstvenim u usporedbi s drugim citogenetičkim testovima. Oštećenje kromosoma je pokazatelj genotoksičnosti i može ultimativno rezultirati aneuploidijom. Kromosomske aberacije su također važan segment u karcinogenezi. Velike količine oštećene DNA mogu uzrokovati: preopterećenje mehanizama popravka DNA, značajno povećati broj mikronukleusa, kao i smrt stanica. Jagetia i Nayak (2000) su pokazali

korelaciju između pojave mikronukleusa i stope preživljavanja stanica. Test *in vivo* je posebno važan za procjenu genotoksičnog učinka, čak u toj mjeri da omogućava razmatranje faktora metabolizma, farmakokinetike i procesa popravka DNA *in vivo*, a koristan je i za istraživanje mutagenog učinka koji se provodi *in vitro* genotoksičnim testom.

Navedene tvrdnje izazvale su određenu dozu zabrinutosti, stoga je cilj ovog istraživanja bio istražiti povezanost oštećenja i popravka DNA u leukocitima periferne krvi, stanicama jetre, bubrega i mozga miševa, uzrokovanog uzastopnim izlaganjem sevofluranu u vezi sa vremenom koje je proteklo od izlaganja istom. Određen je stupanj oštećenja DNA gore navedenih stanica u potpuno zdravim Swiss albino miševima, neposredno nakon uzastopnog izlaganja sevofluranu i uspoređen je sa stupnjem oštećenja DNA nakon što su prošla dva, šest i dvadeset i četiri sata, pri tome su korištene visoko osjetljive tehnike; alkalni komet test i mikronukleus test *in vivo*. Jedna od pretpostavki bila je da smanjenje oštećenja DNA u promatranim vremenskim razmacima ovisi o sposobnosti stanice da izvrši popravak oštećenja, a druga pretpostavka bila je da će se oštećenje DNA povećati zbog proizvodnje većih količina metabolita sevoflurana. Za lakše otkrivanje nepopravljenih oštećenja genoma upotrijebljen je mikronukleus test, a kako bi se lakše uočile razlike u popravku nakon uzastopnog udisanja sevoflurana, kao tvari koja uzrokuje oštećenje DNA u zdravim (PBL, jetrenim, bubrežnim i moždanim) stanicama, upotrijebljen je komet test za analizu jednolančanih lomova u DNA i unakrsnih veza DNA-DNA i DNA-protein.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. POKUSNE ŽIVOTINJE

Za pokus je upotrijebljeno 30 mužjaka Swiss albino miševa (starosti 2 mjeseca, težine 20-25g) iz vlastitog uzgoja Zavoda za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta (Slika 4.). Životinje su držane u kontroliranim uvjetima mikrookoliša ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$), uz standardnu laboratorijsku hranu i pitku vodu *ad libitum*. Anestezija je održavana sevofluranom (2.4 vol%) uz kontinuirani protok mješavine kisika i zraka (3 L/min) u omjeru 50:50 u specijalno dizajniranom inkubatoru spojenom na uređaj za anesteziju (Sulla 800; Dräger). Svježi plin je uvijek protjecao u jednom smjeru bez mogućnosti ponovnog udisanja već izdahnutih plinova. Izdahnuti plinovi su ispuštani u atmosferu kroz ispušnu cijev. Jačina anestezije se smatrala zadovoljavajućom ukoliko su miševi spavali mirno, spontano disali i nisu micali repom. Pokusne skupine miševa izlagane su sevofluranu u dozi od 2.4 vol% po dva sata dnevno, 3 dana uzastopce. Kao kontrola poslužilo je 5 miševa koji nisu bili u doticaju s anestetikom. Životinje su žrtvovane cervikalnom dislokacijom.

Istraživanje je osmišljeno i provedeno u skladu s etičkim načelima važećim u Republici Hrvatskoj (Zakon o zaštiti laboratorijskih životinja, NN 19, 1999), te prema uputama vodiča za držanje i korištenje laboratorijskih životinja (Guide for Care and Use of laboratory Animals, DHHS (NIH) Publ # 86-23).



Slika 4. Swiss albino miš

2.2. SEVOFLURAN

Inhalacijski anestetik sevofluran ("Sevorane") proizvod je Abbott Laboratories LTD (Queenborough, UK).

2.3. PLAN POKUSA

Miševi su podijeljeni u pet pokusnih skupina:

- kontrolna skupina
- (S0) skupina miševa žrtvovanih treći dan pokusa neposredno nakon izlaganja sevofluranu
- (S2) skupina miševa žrtvovanih treći dan pokusa 2 sata nakon izlaganja sevofluranu
- (S6) skupina miševa žrtvovanih treći dan pokusa 6 sati nakon izlaganja sevofluranu
- (S24) skupina miševa žrtvovanih treći dan pokusa 24 sata nakon izlaganja sevofluranu

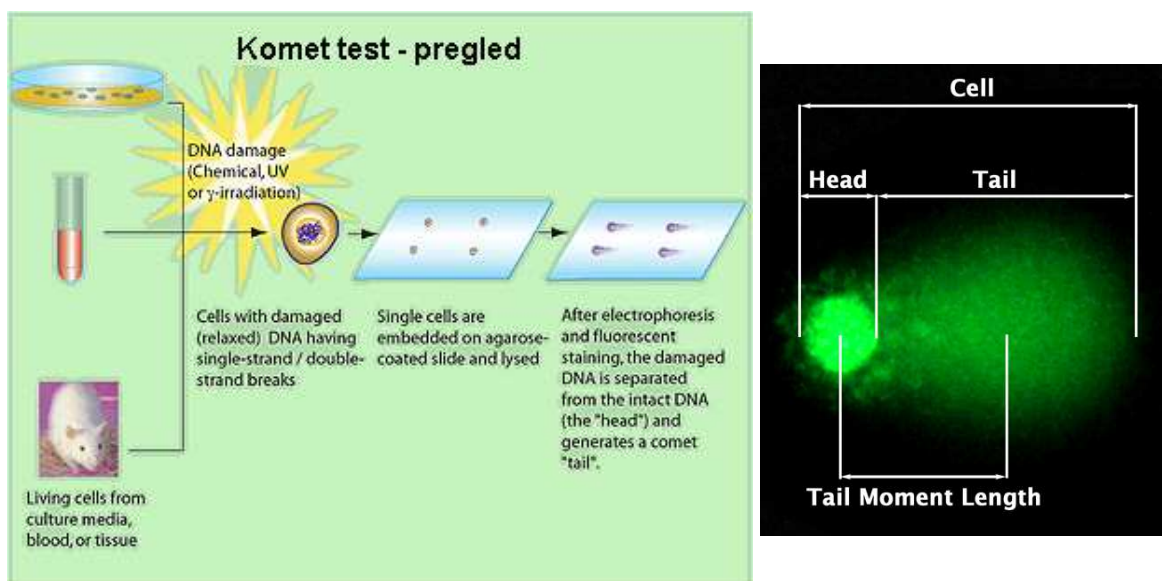
2.4. KOMET-TEST - METODOLOGIJA

U svakoj skupini nalazilo se pet miševa. Uzorkci krvi uzeti su mikropipetom iz zarezane repne vene miša. Uzorci tkiva mozga, jetre i bubrega uzeti su iz miševa, potom su protisnuti kroz sito u homogeniziranu puferisku otopinu pH 7.5 (0.075 M NaCl i 0.024 M EDTA) i ohlađeni su na temperaturu od 4°C (u omjeru 1g tkiva : 1 mL pufera). Korišten je Potter-type homogenizator (Sasaki i sur. 1997). Svi sakupljeni uzorci pripremljeni su za analizu pomoću modificirane metode koju su koristili Singh i suradnici (1988), koja će biti opisana u narednom tekstu (Slika 5.). Šest mikrolitara homogenata tkiva bubrega, jetre, mozga ili periferne krvi suspendirano je u 100µl 0.5% agaroze niske točke tališta (engl. *Low-Melting Agarose, LMA*) (Sigma, USA) i nanešeno je na očišćena predmetna stakalca, koja su prethodno premazana s 300 µl 0.6% NMP agaroze. Kako bi se agarozni gel skrutio, stakalca su stavljena 10 minuta na led i nakon toga su premazana slojem 0.5% LMP agaroze. Nakon što se gel ponovo skrutio, stakalca su uronjena na 1 sat u ledenu otopinu za lizu stanica, koja se sastojala od 100 mM Na₂EDTA, 2.5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl i 1% natrijeva sarkosinata, čija pH vrijednost je podešena na pH 10 pomoću 1% Triton X-100 i 10% DMSO dodanog neposredno prije upotrebe. Prije elektroforeze, stakalca su izvađena iz ledene otopine za lizu stanica i stavljena su u horizontalni uređaj za elektroforezu (u blizini anode) na 20 minuta, koji je bio ispunjen alkalnim puferom kako bi došlo do odmotavanja DNA molekule i kako bi

se utvrdila oštećenja odnosno alkalno-labilna mjesta u DNA molekuli. Alkalna otopina za elektroforezu se sastojala od 1 mM Na₂EDTA i 300 mM NaOH, pH 13. Nakon što se DNA odmotala, provedena je elektroforeza u svježe pripremljenoj alkalnoj otopini na 25V (300 mA) u trajanju od 20 minuta. Alkalno odmotavanje DNA i sama elektroforeza provodili su se na temperaturi od 4°C. Elektroforeza sa visokim pH vrijednostima, rezultira nastankom struktura koje nalikuju kometu, a detektiraju se fluorescencijskim mikroskopom. Ovisno o tome kakav je intenzitet repa kometa u odnosu na njegovo tijelo (glavu), može se utvrditi brojnost lomova u DNA molekuli. Po završetku elektroforeze predmetna stakalca su neutralizirana pomoću Tris pufera (pH 7.5), obojana su s 200 µl etidij bromida (Sigma, USA) (2 µl/ml), te su pokrivena i pohranjena u dobro zatvorene kutije na temperaturu od 4°C, spremne za daljnju analizu. Svi koraci u pripremi preparata provedeni su u polumraku kako bi se spriječila dodatna oštećenja DNA molekule.

Na svakom uzorku analizirano je 100 nasumično odabranih stanica (broji se 50 stanica ukoliko se radi o stakalcu duplikatu). Ukupno 500 stanica iste vrste iz svake skupine analizirano je pomoću Leitz Orthoplan epifluorescencijskog mikroskopa pri povećanju od 250x, koji je opremljen s eksitacijskim filterom od 515-560 nm i filterom za fluorescenciju od 590 nm. Mikroskop je bio spojen preko kamere na računalni sustav za analizu slike (Comet Assay IV software, Perspective instruments).

Komete (Slika 5.) su nasumično snimane na konstantnoj dubini gela i pritom su izbjegavani rubovi gela, povremene mrtve stanice i položeni kometi. Kao mjera za jačinu oštećenja DNA molekule u ovom radu se koristila **dužina repa kometa** (TL, udaljenost u mikrometrima koju je prešla DNA migrirajući iz sredine tijela stanice tj. jezgre), **repni moment** (TM, dužina repa x % DNA u repu) i **intenzitet repa** (TI, postotak genomske DNA koja je migrirala tijekom elektroforeze iz jezgre u rep).



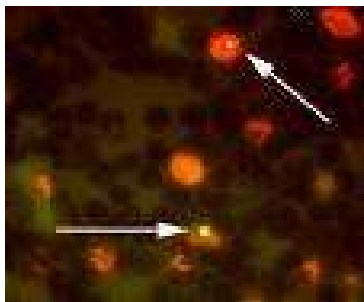
Slika 5. Komet test - pregled postupka, te prikaz kometa na epifluorescencijskom mikroskopu

2.5. MIKRONUKLEUS-TEST *IN VIVO* - METODOLOGIJA

Krvni razmaz uzorka periferne krvi pripremljen je prema metodi koju je opisao Holden i sur. (1997). Uzorci krvi uzeti su iz repne vene miša neposredno nakon posljednjeg izlaganja anestetiku (**uzorak S0**), dva sata (**uzorak S2**), šest sati (**uzorak S6**), dvadeset i četiri sata (**uzorak S24**), te četrdeset i osam sati (**uzorak S48**) nakon posljednjeg izlaganja anestetiku. Razmaz je pripremljen na prethodno očišćenim predmetnim stakalcima. Krvni razmazi su se sušili na sobnoj temperaturi i fiksirani su u apsolutnom metanolu 5 minuta. Nakon fiksacije stakalca su obojana acridin orange-om i dva puta isprani fosfatnim puferom (pH 6.8) kako je opisao Hayashy i sur. (1994). Odmah nakon toga su na predmetna stakalaca stavljene pokrovnice.

Preparati su analizirani pod Leitz Orthoplan epifluorescencijskim mikroskopom s eksitacijskim filterom 502-525 nm na prisutnost mikronukleusa. Jezgra stanica i struktura endoplazmatskog retikuluma retikulocita fluoresciraju intenzivno zeleno i crveno. Mikronukleusi (Slika 6.) su okrugli po obliku i fluoresciraju intenzivno žuto-zeleno. Stanice sa samo crvenom fluorescirajućom točkicom ili točkicama nisu smatrane retikulocitima. Analiza učestalosti pojave retikulocita koji sadrže mikronukleuse (engl. *Micronucleated Reticulocytes*, **MNRET**), temeljila se na proučavanju 2000 stanica retikulocita po životinji.

Kako bi se umanjila varijabilnost rezultata zbog subjektivnosti, analizu je proveo jedan čitač stakalaca bez informacija o proučavanim skupinama miševa.



Slika 6. Mikronukleusi u retikulocitima periferne krvi miševa

2.6. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA

Statistička analiza podataka provedena je u programu Basic Statistica 5.0 (Statisoft, Tulsa, USA). Srednja vrijednost i standardna devijacija (engl. *Standard Deviation*, **SD**) računata je za sve životinje po skupinama. Analiza varijance (engl. *Analysis of Variance*, **ANOVA**) odabrana je za testiranje učinka sevoflurana. Tukey HSD test (engl. *Honest Significant Difference*, **HSD**) korišten je za analizu razlika između promatranih skupina. Razina statističke značajnosti iznosila je $p < 0.05$ (5%).

3. REZULTATI

3.1. KOMET-TEST

Koristeći računalni sustav za analizu slike, izmjerena su oštećenja u DNA molekuli leukocita periferne krvi (PBL), te stanicama jetre, bubrega i mozga neposredno nakon uzastopnog izlaganja sevofluranu i uspoređeni su s oštećenjima DNA nakon dva, šest i dvadeset i četiri sata. Skupina od pet miševa koji nisu tretirani anestetikom poslužili su kao kontrola. Rezultati komet testa provedeni na PBL-ima, stanicama jetre, bubrega i mozga prikazani su u Tablici 2. Dvadeset i četiri sata nakon izlaganja sevofluranu u tkivima nisu uočeni znakovi popravka oštećenja. U usporedbi s kontrolom, sve skupine obrađene sevofluranom pokazale su povećanje srednje vrijednosti TL, TM i TI u leukocitima periferne krvi. Rezultati TL-a u leukocitima periferne krvi izloženih skupina miševa (osim S2 skupine), značajno su se razlikovali od kontrolne skupine ($p < 0,05$). Oštećenje molekule DNA u PBL-

ima dva sata nakon obrade, također je bilo veće od onog u PBL-ima kontrolne skupine miševa, ali nije bilo značajno. Najznačajnije povećanje TL, TM i TI uočeno je 24 sata nakon izlaganja sevofluranu. Procjena razine oštećenja DNA uzrokovanog sevofluranom, pokazuje da se najveće oštećenje DNA u stanicama jetre dogodilo šest sati nakon izlaganja sevofluranu ($p < 0,05$ u usporedbi s kontrolom, S0 i S2). Nakon šest sati oštećenje DNA se počelo smanjivati, ali se stanje u DNA molekuli nije vratilo na početnu razinu ni nakon 24 sata ($p < 0,05$ u usporedbi s kontrolom i S0). Oštećenje DNA u stanicama bubrega nakon uzastopnog izlaganja sevofluranu bilo je najveće 24 sata nakon izlaganja sevofluranu (prema dužini repa $p < 0,05$ u usporedbi s kontrolom, S0 i S2), što je u suprotnosti s rezultatima dobivenim u stanicama jetre. Procjena razine oštećenja DNA uzrokovanog sevofluranom pokazuje da su stanice bubrega najosjetljivije od svih spomenutih stanica. Moždane stanice Swiss albino miševa nakon uzastopne obrade sevofluranom, pokazale su najveća oštećenja DNA šest sati nakon obrade ($p < 0,05$ u sva tri parametra u odnosu na kontrolu, S0 i S2). Zanimljivo je da se oštećenje DNA u moždanim stanicama nije smanjilo nakon šest sati, nego je ostalo na gotovo istoj razini i nakon 24 sata.

Tablica 2. Rezultati alkalnog kometa testa za leukocite periferne krvi (PBL), stanice jetre, bubrega i mozga miševa izloženih sevofluranu (srednja vrijednost \pm SD)

	PBL			STANICE JETRE			STANICE BUBREGA			STANICE MOZGA		
	TL/100 kometa	TM/100 kometa	TI/100 kometa	TL/100 kometa	TM/100 kometa	TI/100 kometa	TL/100 kometa	TM/100 kometa	TI/100 kometa	TL/100 kometa	TM/100 kometa	TI/100 kometa
Tretman	Srednja vrijednost \pm SD	Srednja vrijednost \pm SD	Srednja vrijednost \pm SD	Srednja vrijednost \pm SD	Srednja vrijednost \pm SD	Srednja vrijednost \pm SD	Srednja vrijednost \pm SD	Srednja vrijednost \pm SD	Srednja vrijednost \pm SD	Srednja vrijednost \pm SD	Srednja vrijednost \pm SD	Srednja vrijednost \pm SD
Kontrola	14,38 \pm 2,75 ^{bde}	0,15 \pm 0,24 ^e	1,77 \pm 2,81 ^e	15,86 \pm 4,13 ^{de}	0,23 \pm 1,00 ^d	2,30 \pm 5,67 ^d	17,80 \pm 4,00 ^{de}	0,42 \pm 0,46 ^{de}	4,18 \pm 4,42 ^e	13,76 \pm 2,41 ^{de}	0,12 \pm 0,22 ^{de}	1,43 \pm 2,77 ^{de}
Sevofluran 0h (S0)	18,22 \pm 4,57 ^a	0,28 \pm 0,39	2,74 \pm 3,71 ^e	16,20 \pm 3,92 ^{de}	0,21 \pm 0,42 ^d	2,15 \pm 4,08 ^d	17,39 \pm 4,40 ^{de}	0,43 \pm 0,46 ^e	4,32 \pm 4,59 ^e	14,09 \pm 2,79 ^{de}	0,09 \pm 0,19 ^{de}	1,04 \pm 1,96 ^{de}
Sevofluran 2h (S2)	15,80 \pm 3,63 ^e	0,22 \pm 0,28 ^e	2,44 \pm 3,11 ^e	18,19 \pm 4,60 ^d	0,30 \pm 0,42 ^d	2,98 \pm 4,30 ^d	18,24 \pm 5,00 ^{de}	0,29 \pm 0,39 ^{de}	2,91 \pm 0,10 ^e	14,98 \pm 3,12 ^{de}	0,16 \pm 0,33 ^{de}	1,73 \pm 3,02 ^{de}
Sevofluran 6h (S6)	17,93 \pm 5,5 ^a	0,22 \pm 0,35 ^e	1,98 \pm 3,05 ^e	21,95 \pm 7,25 ^{abc}	0,77 \pm 0,79 ^{abc}	6,68 \pm 6,62 ^{abc}	23,22 \pm 6,39 ^{abc}	1,08 \pm 1,14 ^{ac}	8,46 \pm 8,29 ^c	19,09 \pm 5,46 ^{abc}	0,40 \pm 0,59 ^{abc}	4,03 \pm 6,04 ^{abc}
Sevofluran 24h (S24)	19,26 \pm 5,02 ^{ac}	0,42 \pm 0,51 ^{acd}	4,01 \pm 4,4 ^{abcd}	19,80 \pm 4,44 ^{ab}	0,39 \pm 0,42	3,54 \pm 3,96	25,54 \pm 7,48 ^{abc}	1,26 \pm 1,08 ^{abc}	10,17 \pm 7,73 ^{ac}	18,40 \pm 4,38 ^{abc}	0,46 \pm 0,47 ^{abc}	4,45 \pm 4,70 ^{abc}

^aStatistički značajno u usporedbi s kontrolom; ^bStatistički značajno u usporedbi s S0; ^cStatistički značajno u usporedbi s S2; ^dStatistički značajno u usporedbi s S6; ^eStatistički značajno u usporedbi s S24.

3.2. MIKRONUKLEUS-TEST

Rezultati analize učestalosti pojave mikronukleusa u 2000 retikulocita periferne krvi (engl. *Peripheral Blood Reticulocytes*, **PBRET**) po skupini prikazani su u Tablici 3. Najveća učestalost pojave mikronukleusa uočena je u stanicama šest sati nakon posljednje obrade miševa sevofluranom ($p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu skupinu, S0 i S48 skupina). Uočeno je i konstantno povećanje broja mikronukleusa u retikulocitima periferne krvi tijekom prvih šest sati. Suprotno povećanju broja mikronukleusa u retikulocitima periferne krvi u prvih šest sati, došlo je do smanjenja broja mikronukleusa u retikulocitima 24 sata i 48 sati nakon izlaganja miševa sevofluranu. Učestalost pojave mikronukleusa u 2000 retikulocita po mišu koji je bio izložen djelovanju sevoflurana varirala je tijekom vremena i bila je statistički značajna u usporedbi s kontrolom (11,75; 13,75; 20,50; 15,25; 9,75 u odnosu na 2,0)

Tablica 3. Broj mikronukleusa u retikulocitima periferne krvi miševa izloženih sevofluranu (srednja vrijednost \pm SD)

Obrada	Učestalost mikronukleusa na 2000 PBRET
Kontrola	2,0 \pm 1,41 ^{bcdf}
Sevofluran 0h (S0)	11,75 \pm 4,19 ^{ad}
Sevofluran 2h (S2)	13,75 \pm 3,10 ^a
Sevofluran 6h (S6)	20,50 \pm 3,87 ^{abe}
Sevofluran 24h (S24)	15,25 \pm 3,40 ^a
Sevofluran 48h (S48)	9,75 \pm 4,50 ^{ad}

^aStatistički značajno u usporedbi s kontrolom; ^bStatistički značajno u usporedbi s S0; ^cStatistički značajno u usporedbi s S2; ^dStatistički značajno u usporedbi s S6; ^eznačajno u usporedbi s S24; ^fStatistički značajno u usporedbi s S48

4. RASPRAVA

Mnogi lijekovi i tvari u okolišu mogu uzrokovati oštećenja u DNA molekuli. Stoga velik izazov za razvoj farmacije, zdravstva i znanosti o okolišu predstavlja predviđanje i razumijevanje mogućih ishoda izloženosti opasnim i štetnim tvarima. Upravo kompleksno uzajamno djelovanje brojnih staničnih puteva koji utječu na oštećenje i popravak struktura unutar stanica, određuje konačne biološke posljedice izlaganja štetnim tvarima. Uvođenje sevoflurana u kliničku praksu potaknulo je istraživanja biokemijskih mehanizama odgovornih za toksičnost anestetika, te se istovremeno nastavilo s kliničkim istraživanjima o povezanosti metabolizma anestetika i njegove toksičnosti na organe (Kharasch 1995). Podaci o genotoksičnosti sevoflurana još uvijek su nedostadni. Szyfter i sur. (2004) zaključili su da sevofluran nema genotoksična svojstva u uvjetima *in vivo* i *in vitro*. Međutim rezultati istraživanja na stanicama periferne krvi medicinskog osoblja (Rozgaj i sur. 2009), te stanicama periferne krvi, bubrega jetre i mozga Swiss albino miševa (Brozovic i sur. 2008) ukazuju na genotoksičnost sevoflurana.

Cilj ovog istraživanja bio je istražiti povezanost oštećenja i popravka u DNA molekuli uzrokovanog uzastopnim izlaganjem sevofluranu. U istraživanju je upotrijebljen komet test kao učinkovita metoda za praćenje raspona oštećenja i popravaka DNA molekule nakon kratkoročnog izlaganja niskim dozama lijekova ili toksina. Alkalni komet test pokazatelj je jednolančanih ili dvolančanih lomova, mjesta osjetljivih na alkalne uvjete, omogućuje praćenje popravka nastalih oštećenja, te lomova povezanih s replikacijom stanica koje proliferiraju) (Dusinska i Collins 2008). Rezultati su pokazali statistički značajno povećanje srednje vrijednosti TL, TM i TI u svim pregledanim organima u usporedbi s kontrolom. Veličina oštećenja DNA u točno određenom vremenu nakon uzastopnog izlaganja sevofluranu, bila je drugačija za svaki pregledani organ. Najveće oštećenje DNA uočeno je odmah nakon izlaganja sevofluranu, posebno u leukocitima periferne krvi (S0). Rezultati dobiveni na životinjskom modelu u potpunosti su usporedivi s rezultatima dobivenim na ljudskom modelu uz sličnu vremensku dinamiku, blago modificiranu zbog alometričkih razlika među vrstama. U radu (Karabiyik i sur. 2001), autori navode podatke o genotoksičnim svojstvima dvaju inhalacijskih anestetika (sevofluranu i izofluranu) u limfocitima periferne krvi pacijenata, prije, tijekom i nakon anestezije, dobivene na temelju komet testa. Primijetili su značajno povećanje srednje vrijednosti odgovora na komet test u krvi uzetoj pacijentima jedan sat i dva sata nakon anestezije. Ti se rezultati podudaraju sa rezultatima dobivenima

ovim istraživanjem, ali u kraćem vremenu (S0) zbog bržeg metabolizma miševa. Nadalje autori su naveli podatke o nestanku oštećenja u DNA molekuli 72 sata nakon anestezije. Također su naveli da je proces popravka počeo unutar prvih 48 sati, te da je potpuni popravak izvršen unutar pet dana. Treba imati na umu da se oštećenje DNA sastoji većinom od kratkotrajnih lezija. Popravak DNA molekule je ključni element u zaštiti naših stanica od raka, jer uklanja potencijalno mutagene promjene u DNA (Dusinska i Collins 2008). Na temelju toga niže vrijednosti TL, TM i TI u S2 skupini, mogu se objasniti činjenicom da u leukocitima funkcioniraju mehanizmi popravka. Kasnije povećanje TL, TM i TI vrijednosti nakon 6 sati i 24 sata, može se objasniti činjenicom da genotoksične kemikalije mogu utjecati na brzinu popravaka, kao i činjenicom da metabolička transformacija povećava koncentraciju metabolita sevoflurana u krvi. Ovakvi rezultati ukazuju na moguću kroničnu proizvodnju reaktivnih vrsta kisika (engl. *Reactive Oxygen Species*, **ROS**) nakon udisanja anestetika, koje mogu uzrokovati stanično oštećenje DNA (Morgan 2003a, 2003b). Potvrda navedenom su istraživanja provedena na ljudskoj koži, koja ukazuju na produženi oksidativni stres nakon zračenja (Laurent i sur. 2006). Značajniji popravak lomova u DNA molekuli nastupio je tek nakon 24 sata, te su donešeni zaključci slični onima dobivenim iz istraživanja na ljudima (Karabiyik i sur. 2001).

Mikronukleus test upotrijebljen je kao dopuna komet testu, kako bi se procijenila sposobnost sevoflurana da uzrokuje dvostruke lomove DNA. Učestalost mikronukleusa u 2000 retikulocita miševa izloženih sevofluranu, bila je statistički značajna i mijenjala se tijekom vremena u odnosu na kontrolu (11.75, 13.75, 20.50, 15.25, 9.75 vs 2.0). Najveći broj mikronukleusa pronađen je u grupi S6 (6 sati nakon višestrukog izlaganja miševa anestetiku sevofluranu), a smanjio se nakon 24 i 48 sati. Podaci dobiveni mikronukleus testom, podudaraju se s podacima dobivenim komet testom. Bez obzira na genetičku fragmentaciju koja se događa zbog klastogenih ili aneugenh mehanizama, rezultat nakon eritropoetskog rasta ostaje isti: stanice koje pretrpe veće oštećenje DNA prolaze proces gubitka jezgre (enukleacija), ali formiraju retikulocite koji sadrže "mikronukleuse", male fragmente DNA obavijene jezgrinom membranom (Heddle i sur. 1991). Poznato je da slezena ima važnu ulogu u uklanjanju oštećenih eritrocita, tako da inače <1% eritrocita u cirkulaciji spontano sadrži mikronukleuse nastale oštećenjima DNA. Ovi podaci se podudaraju s podacima koje su iznijeli drugi autori, oni naime upozoravaju da dugoročno izlaganje osoblja malim količinama brzo hlapljivih anestetika ima štetan učinak na zdravlje tih ljudi (Byhahn i sur. 2001; Hobbhahn i sur.1998). Nasuprot tome, Wiesner i sur. (2008) pokazali su da samo jedan brzo hlapljivi anestetik (sevofluran) u malim koncentracijama uzrokuje povećanu izmjenu

sestrinskih kromatida, ali ne i nastanak mikronukleusa. Razlog tome mogao bi biti drugačiji način izlaganja sevofluranu, kao i upotrijebljeni model u istraživanjima (miš, čovjek).

Uzorak inducirano oštećenja DNA molekule tijekom vremena razlikovao se u svim proučavanim organima u odnosu na leukocite periferne krvi. Inducirano oštećenje se dogodilo šest sati kasnije u organima nego u stanicama krvi, što je bilo i za očekivati prema toksikokinetičkim modelima, jer se sevofluran prvo apsorbira u krvi. Drugi razlog mogao bi biti visoka osjetljivost hematopoetskog sustava na genotoksične tvari, djelomično zbog toga što se hematopoetske stanice brzo dijele. Iako sevofluran ima nisku topljivost u krvi i tkivima, te se metabolizira do slobodnog fluorida i heksafluoroizopropanola (engl. *Hexafluoroisopropanol*, **HFIP**) koji se brzo eliminira urinom (Kharasch 1995), oko 5% udahnutog sevoflurana se metabolizira u jetri preko citokroma P450, a posebno preko izoenzima 2E1, a najviše se metabolizira oksidativnim putem. Uzimajući u obzir, da se značajno oštećenje DNA u stanicama jetre, bubrega i mozga dogodilo šest sati kasnije nego u krvnim stanicama, može se zaključiti da je to vrijeme bilo potrebno za procese biotransformacije. Akumulacija različitih metaboličkih ostataka sevoflurana i inhibicija procesa popravka u tom vremenskom periodu, mogla bi biti odgovorna za povećane TL vrijednosti u stanicama jetre, bubrega i mozga. Nadalje, nakon što je prošlo 6 sati, odnosno 24 sata količina oštećenih DNA lanaca se smanjila u jetrenim i moždanim stanicama, vjerojatno zbog kombiniranih procesa eliminacije ksenobiotika i ponovnog uspostavljanja aktivnosti enzima popravka. S obzirom na oštećenje DNA u svim navedenim tipovima stanica, stanice bubrega su najosjetljivije na djelovanje anestetika. Stanice bubrega pokazuju kontinuirano povećanje razine oštećenja DNA, a 24 sata nakon izlaganja razina oštećenja dostiže svoj vrhunac ($p < 0.05$ u usporedbi s kontrolom, S0 i S2 skupinom).

5. ZAKLJUČCI

Temeljem dobivenih rezultata možemo izvesti zaključke kako slijedi:

1. Niti jedno od proučavanih tkiva nije pokazivalo znakove popravka sve dok nisu prošla 24 sata od izlaganja sevofluranu. Uzrok toga može biti metabolizam sevoflurana i preostali ostaci njegove biotransformacije koji su još uvijek prisutni u organizmu od 6 do 24 sata.
2. U usporedbi s kontrolom, sve skupine obrađene sevofluranom pokazale su povećanje srednje vrijednosti TL, TM i TI u leukocitima periferne krvi.
3. Procjena razine oštećenja DNA uzrokovanog sevofluranom pokazuje da su stanice bubrega najosjetljivije od svih spomenutih stanica.
4. Općenito gledano, najveća učestalost pojave mikronukleusa uočena je u stanicama šest sati nakon posljednjeg tretmana miševa sevofluranom ($p < 0.05$ vs kontrolna skupina, S0 i S48 skupina).
5. Daljnja istraživanja trebala bi se provoditi duže vrijeme, kako bi se moglo točno utvrditi vrijeme potrebno za popravak DNA molekule nakon uzastopnog izlaganja sevofluranu različitih tipova stanica.

6. LITERATURA

1. Bienengraeber MW, Weihrauch D, Kersten JR, Pagel PS, Warltier DC, 2005. Cardioprotection by volatile anesthetics. *Vascul Pharmacol* 42: 243-52.
2. Brozovic G, Orsolcic N, Knezevic F, Horvat Knezevic A, Benkovic V, Vrdoljak DV, Saric A, 2008. Evaluation of DNA damage in vivo induced by combined application of cisplatin and sevoflurane. *Eur J Anaesthesiol* 25: 642-7.
3. Byhahn C, Heller K, Lischke V, Westphal K, 2001. Surgeon's occupational exposure to nitrous oxide and sevoflurane during pediatric surgery. *World J Surg* 25: 1109-12.
4. Dusinska M, Collins AR, 2008. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis* 23: 191-205.
5. Halliwell B, Cross CE, 1994. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect* 102, Supplement 10: 5-12.
6. Hayashi M, Hashimoto S, Sakamoto Y, Hamada C, Sofuni T, Yoshimura I, 1994. Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay. *Environ Health Perspect* 102, Supplement 1: 49-52.
7. Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, Romagna F, Shelby MD, Tucker JD, Vanparys P, MacGregor JT, 1991. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. *Environ Mol Mutagen* 18: 277-91.
8. Hobbhahn J, Wiesner G, Taeger K, 1998. Occupational exposure and environmental pollution: the role of inhalation anesthetics with special consideration of sevoflurane. *Anaesthesist* 47, Supplement 1: 77-86.
9. Holden HE, Majeska JB, Studwell D, 1997. A direct comparison of mouse and rat bone marrow and blood as target tissues in the micronucleus assay. *Mutat Res* 391: 87-89.

10. Jagetia GC, Nayak V, 2000. Effect of doxorubicin on cell survival and micronuclei formation in HeLa cells exposed to different doses of gamma-radiation. *Strahlenther Onkol* 176: 422-428.
11. Jalozyński P, Kujawski M, Wasowicz M, Szulc R, Szyfter K, 1999. Genotoxicity of inhalation anesthetics halothane and isoflurane in human lymphocytes studied in vitro using the comet assay. *Mutat Res* 439: 199-206.
12. Jukić M, Majerić Kogler V, Husedžinović I, Sekulić A, Žunić J, 2005. Klinička anesteziologija. *Anestezija* 2: 9-10; *Inhalacijski anestetici* 5: 55-69.
13. Karabiyik L, Sardas S, Polat U, Kocabas NA, Karakaya AE, 2001. Comparison of genotoxicity of sevoflurane and isoflurane in human lymphocytes studied in vivo using the comet assay. *Mutat Res* 492: 99-107.
14. Keaney A, Diviney D, Harte S, Lyons B, 2004. Postoperative behavioral changes following anesthesia with sevoflurane. *Paediatr Anaesth* 14: 866-70.
15. Kharasch ED, 1995. Biotransformation of sevoflurane. *Anesth Analg* 81, Supplement 6: 27-38.
16. Laurent C, Voisin P, Pouget JP, 2006. DNA damage in cultured skin microvascular endothelial cells exposed to gamma rays and treated by the combination pentoxifylline and alpha-tocopherol. *Int J Radiat Biol* 82: 309-321.
17. Meyer RR, Münster P, Werner C, Brambrink AM, 2007. Isoflurane is associated with a similar incidence of emergence agitation/delirium as sevoflurane in young children- a randomized controlled study. *Paediatr Anaesth* 17: 56-60.
18. Morgan WF, 2003. Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: I. Radiation-induced genomic instability and bystander effects in vitro. *Radiat Res* 159: 567-568.

19. Morgan WF, 2003. Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: II. Radiation-induced genomic instability and bystander effects in vivo, clastogenic factors and transgenerational effects. *Radiat Res* 159: 581-596.
20. Pihlainen K, Ojanperä I, 1998. Analytical toxicology of fluorinated inhalation anaesthetics. *Forensic Sci Int* 97: 117-133.
21. Rozgaj R, Kasuba V, Brozović G, Jazbec A, 2009. Genotoxic effects of anaesthetics in operating theatre personnel evaluated by the comet assay and micronucleus test. *Int J Hyg Environ Health* 212: 11-17.
22. Sardaş S, Aygün N, Gamli M, Unal Y, Unal N, Berk N, Karakaya AE, 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.
23. Sasaki YF, Nishidate E, Izumiyama F, Matsusaka N, Tsuda S, 1997. Simple detection of chemical mutagens by the alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet) assay in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney and bone marrow). *Mutat Res* 391: 215-231.
24. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL, 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175: 184-191.
25. Szyfter K, Szulc R, Mikstacki A, Stachecki I, Rydzanicz M, Jalozyński P, 2004. Genotoxicity of inhalation anaesthetics: DNA lesions generated by sevoflurane in vitro and in vivo. *J Appl Genet* 45: 369-374.
26. Wiesner G, Schiewe-Langgartner F, Lindner R, Gruber M, 2008. Increased formation of sister chromatid exchanges, but not of micronuclei, in anaesthetists exposed to low levels of sevoflurane. *Anaesthesia* 63: 861-864.

27. Wong CH, Liu TZ, Chye SM, Lu FJ, Liu YC, Lin ZC, Chen CH, 2006. Sevoflurane-induced oxidative stress and cellular injury in human peripheral polymorphonuclear neutrophils. *Food Chem Toxicol* 44: 1399-1407.
28. <http://www.rxlist.com/ultane-drug.htm>