

UNIVERZITET U BEOGRADU

FAKULTET VETERINARSKЕ MEDICINE

Katedra za bolesti kopitara, mesojeda, živine i divljači



Milan Došenović

Ispitivanje uticaja endoskopske dijagnostike u  
opštoj anesteziji na parametre oksidativnog  
stresa i stepen oštećenja DNK kod crvenouhих  
kornjača (*Trachemys scripta elegans*)

Doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Department of equine, small animal, poultry and wild animal  
diseases



Milan Došenović

Evaluation of the effects of endoscopy in general  
anesthesia on oxidative stress parameters and the  
degree of DNA damage in red-eared sliders  
(*Trachemys scripta elegans*)

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

Mentori:

Dr Miloš Vučićević, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

Dr Mirjana Milovanović, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

Članovi komisije:

Dr Darko Marinković, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

Dr Uroš Glavinić, docent

Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

Dr József Özvegy, naučni saradnik

Beogradski zoološki vrt

Datum odbrane \_\_\_\_\_

Beograd

Doktorska disertacija realizovana je zahvaljujući resursima naučnoistraživačkog projekta ev. br. III 46002, kojim je rukovodio prof. dr Zoran Stanimirović, a pod nazivom:

*„Molekularno-genetička i ekofiziloška istraživanja u zaštiti autohtonih genetičkih resursa, očuvanja dobrobiti, zdravlja i reprodukcije gajenih životinja i proizvodnje bezbedne hrane“*

podržanom od Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije u periodu od 2011. do 2019. godine, a od 2020. godine nastavljeno institucionalno finansiranje u okviru naučnoistraživačkog rada Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu po ugovoru ev. br. 451-03-68/2020-14/200143.

# Ispitivanje uticaja endoskopske dijagnostike u opštoj anesteziji na parametre oksidativnog stresa i stepen oštećenja DNK kod crvenouhих kornjača (*Trachemys scripta elegans*)

## SAŽETAK

Endoskopija je veoma bitna dijagnostička procedura u veterinarskoj medicini, a naročito je značajna njena primjena kod gmizavaca, uključujući i kornjače. Da bi se izvršio endoskopski, ili u ovom slučaju celioskopski, pregled, potrebno je da se kornjača uvede u opštu anesteziju. U veterinarskoj medicini se za anesteziranje kornjača koristi veći broj anestetičkih protokola, ali ne postoje temeljna istraživanja o rizicima i neželjenim efektima anestetika koji se koriste.

U ovom radu je proučavan efekat endoskopije i tri anestetička protokola koji se najčešće koriste za anesteziranje crvenouhих kornjača na parametre oksidativnog stresa i stepen oštećenja DNK.

Kornjače su podjeljene u 6 grupa na osnovu toga koji anestetički protokol je primjenjivan i toga da li su podvrgnute endoskopskom pregledu. U cilju procjene nivoa oksidativnog stresa, vršeno je određivanje aktivnosti superoksid dismutaze, katalaze, glutation S transferaze i određivanje nivoa malondialdehida. Da bi se procjenio stepen oštećenja DNK, urađen je komet test.

Svi primjenjeni anestetički protokoli su doveli do promjena nivoa parametara oksidativnog stresa, s tim da je kombinacija ketamina i medetomidina imala najmanji kumulativni efekat. Izvođenje endoskopije nije dovelo do značajnih promjena u nivou parametara oksidativnog stresa. Oštećenje DNK nakon opšte anestezije i endoskopije nije registrovano ni u jednoj od eksperimentalnih grupa primjenom komet testa.

**Ključne riječi:** anestezija, endoskopija, crvenouha kornjača, oksidativni stres, oštećenje DNK

**Naučna oblast:** Veterinarska medicina

**Uža naučna oblast:** Klinička dijagnostika, patologija i terapija životinja

**UDK broj:** 636.09:616-073.7:598.124.2

# Evaluation of the effects of endoscopy in general anesthesia on oxidative stress parameters and the degree of DNA damage in red-eared sliders (*Trachemys scripta elegans*)

## SUMMARY

Endoscopy is a very important diagnostic procedure in veterinary medicine, and its application in reptiles, including turtles, is especially important. To perform an endoscopic, or in this case celioscopic, examination, it is necessary to place the turtle under general anaesthesia. In veterinary medicine, many anaesthetic protocols are used to anesthetize turtles, but there is no thorough research on the risks and side effects of anaesthetics used.

In this study, the effect of endoscopy and the 3 most commonly used anaesthetic protocols for performing this procedure on the parameters of oxidative stress and DNA damage in red - eared sliders was studied.

The turtles were divided into 6 groups based on which anaesthetic protocol was applied and whether they underwent endoscopic examination. To assess the level of oxidative stress, the activity of superoxide dismutase, catalase, glutathione S transferase and the levels of malondialdehyde were determined. A comet test was performed to assess DNA damage.

All applied anaesthetic protocols caused a significant change in the levels of oxidative stress parameters, with the combination of ketamine and medetomidine having the least cumulative effect. Performing endoscopy did not lead to significant changes in the level of oxidative stress parameters. DNA damage after general anaesthesia and endoscopy was not registered in any of the experimental groups using the comet test.

**Key words:** anaesthesia, endoscopy, DNA damage, oxidative stress, Red-eared slider

**Scientific field:** Veterinary medicine

**Scientific subfield:** Clinical diagnostics, pathology and therapy of animals

**UDK number:** 636.09:616-073.7:598.124.2

## SADRŽAJ:

1. UVOD .....	1
2. PREGLED LITERATURE .....	3
2.1. Crvenouha kornjača.....	3
2.2. Reaktivne kiseonikove vrste (ROS), slobodni kiseonikovi radikali i oštećenje DNK .....	5
2.3. Endoskopska dijagnostika .....	9
2.3.1. Uticaj endoskopske dijagnostike na oksidativni stres i oštećenje DNK .....	10
2.4. Propofol .....	10
2.4.1. Uticaj propofola na oksidativni stres i oštećenje DNK.....	13
2.5. Ketamin .....	14
2.5.1. Uticaj ketamina na oksidativni stres i oštećenje DNK.....	16
2.6. Medetomidin .....	17
2.6.1. Uticaj medetomidina na oksidativni stres i oštećenje DNK .....	18
2.7. Izofluran .....	19
2.7.1. Uticaj izoflurana na oksidativni stres i oštećenje DNK.....	21
3. CILJ I ZADACI RADA .....	22
4. MATERIJAL I METODE .....	23
4.1. Materijal.....	23
4.2. Metode .....	23
4.2.1. Grupe, anestetički protokoli i tretmani kornjača .....	23
4.2.2. Endoskopija .....	27
4.2.3. Određivanje parametara oksidativnog stresa.....	28
4.2.4. Određivanje oštećenja DNK primjenom komet testa .....	30
4.2.5. Statistička analiza.....	31

5. REZULTATI.....	32
5.1 Parametri oksidativnog stresa.....	32
5.2 Komet test.....	38
6. DISKUSIJA.....	40
7. ZAKLJUČAK.....	47
8. POPIS LITERATURE.....	48



## SKRAĆENICE

ROS – *Reactive Oxygen Species*

Nrf2 – *Nuclear Factor-E2-related Factor 2*

OxLDL – *Oxidized Low-density Lipoprotein*

PRIS – *Propofol Infusion Syndrome*

GABA – *γ-Aminobutyric Acid*

Bnip3 – *BCL2 Interacting Protein 3*

TNF-α – *Tumor Necrosis Factor α*

IL-6 – *Interleukin 6*

UPR – *Unfolded Protein Response*

Grp78 – *Glucose Regulated Protein 78*

IRE1α – *Inositol-requiring Transmembrane Kinase/endoribonuclease 1α*

FoxO1 – *Forkhead Box O1*

PCP – *Phenylcyclohexyl Piperidine*

NMDA – *N-methyl-D-aspartate*

HNK – *Hydroxynorketamine*

DHNK – *Dehydronorketamine*

HO-1 – *Heme Oxygenase-1*

NOR – *Noradrenaline*

DOP – *Dopamine*

MVS – *Minutni volumen srca*

PaCO<sub>2</sub> – *Parcijalni pritisak ugljendioksida*

PaO<sub>2</sub> – *Parcijalni pritisak kiseonika*

Bcl-2 – *B-cell Lymphoma-2*

γH2A.X – *Phosphorylated Histone H2AX*

CAT – *Catalase*

SOD – *Superoxide Dismutase*

GST – *Glutathione S-transferase*

MDA – *Malondialdehyde*

CDNB – *1-Chloro-2,4-dinitrobenzene*

TBA – *Thiobarbituric Acid*

PBS – *Phosphate-buffered Saline*

TCS - *Total Comet Score*

HPLC-UV - *High-Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet*



# 1. UVOD

Crvenouha kornjača (*Trachemys scripta elegans*) je semiakvatična kornjača iz porodice Emydidae. Ova vrsta kornjača postala je veoma prisutna kao kućni ljubimac, kako u Srbiji tako i u svijetu (Pearson i sar., 2015, Urošević i sar., 2016). Takav trend može se pripisati relativno maloj veličini ove vrste gmizavaca, skromnim potrebama u zatočeništvu i razumno niskoj cijeni po kojoj se mogu kupiti. Pretpostavlja se da je to razlog zašto ljudi ovu vrstu vide kao pristupačnog kućnog ljubimca koji ne zahtijeva puno pažnje i ulaganja i zašto je ova vrsta postala najčešći prvi „egzotični kućni ljubimac“ kojeg ljudi kupuju.

Kako se povećava broj crvenouhих kornjača koje se drže u zatočeništvu, tako se sve češće pojavljuju i kao pacijenti u veterinarskim ustanovama. Zbog anatomskih i fizioloških specifičnosti kornjača, prvenstveno postojanja oklopa i česte nesaradljivosti ovih životinja, opšti klinički pregled je teško izvodljiv i u velikom broju slučajeva ne daje dovoljno informacija o zdravstvenom stanju jedinke. Stoga, za postavljanje dijagnoze, veterinari često moraju primjeniti specijalističke dijagnostičke metode. Dijagnostička metoda koja daje odličan uvid u zdravstveno stanje kod većine gmizavaca, a posebno kod kornjača je endoskopska dijagnostika. Endoskopija se decenijama koristi u dijagnostici bolesti konja, pasa, mačaka i ptica, a kod kornjača je njena upotreba posebno značajna jer druge specijalističke dijagnostičke metode nisu uvijek primjenjive zbog anatomskih specifičnosti ovog reda životinja.

Da bi se obavila endoskopija, koja podrazumjeva hirurško otvaranje celomske šupljine i plasiranje endoskopa radi pregleda unutrašnjih organa, kornjača mora da se uvede u opštu anesteziju. Međutim, anestezija je često neophodna i za izvođenje opšteg kliničkog pregleda ili primjenu neke druge dijagnostičke metode (ultrazvučni pregled, biopsija i drugo). Za anesteziranje kornjača u upotrebi je veći broj različitih anestetičkih protokola, a lijekovi koji se najčešće koriste kod kornjača su ketamin, medetomidin, propofol i izofluran. Navedeni anestetici i sedativ (medetomidin) se koriste, kako pojedinačno, tako i u kombinacijama jedni sa drugima. Sporedni efekti anestetika kod kornjača su relativno slabo ispitani, a koliko je poznato, ne postoje ni studije koje su ispitivale neželjene efekte endoskopije kod ovih životinja (Došenović i sar., 2021).

Jedan od sporednih efekata navedenih anestetika koji je opisan u studijama izvedenim na sisarima je njihov uticaj na sistem antioksidativne zaštite. Sistem antioksidativne zaštite podrazumjeva enzime koji neutrališu slobodne kiseonikove vrste (*Reactive Oxygen Species* - ROS, eng.) i spriječavaju njihove štetne efekte na organizam. U fiziološkim uslovima slobodni kiseonikovi radikali se posredstvom antioksidanasa održavaju na bezbjednom nivou i imaju ulogu u fiziološkim redoks procesima u organizmu. Kada je narušeno funkcionisanje antioksidativnog sistema, u većoj mjeri prisutni, slobodni kiseonikovi radikali u organizmu mogu da reaguju sa makromolekulima (proteini, lipidi, nukleinske kiseline) i izazovu njihova oštećenja, što vodi ka gubitku metaboličke funkcije i ćelijskoj smrti (Li i sar., 2017). Ovi mehanizmi, do sada gotovo uopšte nisu ispitivani kod kornjača, tako da nije poznato da li je nivo interakcije anestetika sa antioksidativnim sistemom

kornjača sličan onom kod sisara, niti kako utiče na organizam ovih životinja u cjelini. Pored uticaja na sistem antioksidativne zaštite organizma, postoje studije koje opisuju uticaj opšte anestezije na oštećenje DNK ljudi i nekih vrsta eksperimentalnih životinja, kao što su pacovi (de Oliveira i sar. 2009; Gazal i sar. 2014). Međutim, uvidom u dostupnu literaturu može se uočiti da efekti anestezije na genetički materijal životinja koje nisu uzgajane u kontrolisanim uslovima, nisu do sada ispitivani (Valčić i sar. 2021).

Na osnovu svega navedenog, predmet ovog istraživanja je bio uticaj endoskopske dijagnostike na oksidativni stres i stepen oštećenja DNK. Uz to, proučavani su efekti najčešće primjenjivanih anestetičkih protokola za izvođenje endoskopske dijagnostike na oksidativni stres i stepen oštećenja DNK kod kornjača.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Crvenouha kornjača

Kornjače (Testudines ili Chelonia) su filogenetski veoma star red životinja iz klase gmizavaca. Smatra se da je prva vrsta bila *Eunotosaurus africanus*, koja je živjela prije 260 miliona godina (Lyson i sar., 2016). Ovaj red gmizavaca ima određene osobine koje nisu prisutne ni kod jedne druge životinjske vrste, prije svega prisustvo oklopa, uz određene karakteristike koje dijele sa drugim gmizavcima, kao što je prisustvo renalnog portalnog krvotoka. Red Testudines danas broji oko 360 živih vrsta kornjača koje su prilagođene na život u slanoj i slatkoj vodi, kao i na kopnu.

Crvenouha kornjača (*Trachemys scripta elegans*) je semiakvatična, slatkovodna kornjača srednje veličine. Crvenouha kornjača pripada porodici Emydidae zajedno sa još 90 vrsta kornjača iz 33 roda, što ih čini najbrojnijom porodicom živih kornjača. Ova vrsta može da naraste i do 40 cm, ali obično dostigne veličinu između 15 i 20 cm. Ženke su u prosjeku veće od mužjaka. Crvenouhe kornjače obično dostignu starost između 20 i 30 godina, ali su zabilježene jedinke koje su živjele i preko 40 godina (Ma i Shi, 2017).

Crvenouha kornjača ima karapaks (gornji deo oklopa) koji je gladak, sa blago narezuckanim kaudalnim skutama. Karapaks je najviši u nivou treće vertebralne skute i najširi u nivou osmih marginalnih skuta. Karapaks je maslinaste do smeđe boje, sa žutim oznakama koje variraju u zavisnosti od geografskog porjekla životinja. Kod starijih mužjaka u nekim populacijama javlja se visoka stopa melanizma. Plastron (donji dio oklopa) je nešto širi u prednjem djelu i dobro srastao za karapaks. Plastron je žute boje i može da ima šablon koji varira u zavisnosti od geografskog porjekla životinja. Glava je zaobljena sa njuškom koja prominira nekoliko milimetara ispred usnog otvora. Kljun je snažan i na simfizi gornjeg djela ima mali usjek. Na glavi su prisutne smeđe-žute pruge koje se pružaju od kljuna kaudalno, s tim da na gornjem djelu glave kod nekih jedinki mogu biti slabije vidljive. Oči su žute boje i kroz njih prolazi tamna linija. U temporalnom djelu glave sa obe strane se nalaze izražene crvene linije po kojima je vrsta i dobila ime. Skelet ovih životinja je djelimično integrisan u oklop. Na nogama imaju djelimično razvijene plovne kožice koje im olakšavaju plavanje i ronjenje (Ernst, 1990).

Crvenouhe kornjače ne hiberniraju, već u hladnijem periodu godine ulaze u stanje dormancije - postaju manje aktivne ali povremeno izlaze na površinu vode da udahnu vazduh. U stanju dormancije crvenouhe kornjače mogu da prežive u anaerobnim uslovima nekoliko nedjelja tako što potrebni ATP obezbjeđuju procesom glikolize. U ovim uslovima nivo metabolizma opada intenzivno, što, uz smanjenje radnog volumena srca i do 80 %, značajno smanjuje energetske potrebe organizma.

Crvenouhe kornjače su porjeklom iz doline rijeke Misisipi u jugoistočnom djelu Sjedinjenih Američkih Država i široko su rasprostranjene od Teksasa na jugu do Ilinoisa na sjeveru. U prirodi naseljavaju uglavnom stajaće vode sa muljevitim dnom, bujnom

vegetacijom i mjestima dostupnim za sunčanje. Sunčanje je veoma važno za termoregulaciju crvenouhих kornjača. Optimalna tjelesna temperatura im je oko 28 °C i održava se upijanjem sunčeve energije. Ukoliko im vremenske prilike dopuste, crvenouhe kornjače će biti aktivne tokom cijele godine. Temperature spektra koji im najviše odgovara je od 10 °C do 32 °C i ukoliko temperatura padne ispod kritične granice kornjače će ući u stanje dormancije (Zimmerman i sar., 2010). Crvenouhe kornjače su aktivne tokom dana, dok noću spavaju ili u mulju na dnu ili plutajući na površini vode. U svom izvornom staništu ispunjavaju ekološku nišu kako plijena tako i predatora.

Ženke kopaju gnijezdo i polažu jaja u maju i junu. Do samog polaganja prvog legla će doći kada se na jajima formira ljuska i kada ona postanu otporna na faktore spoljašnje sredine. Nakon prvog legla, ženka može da položi dodatna legla na različitim mjestima kako bi povećala šansu da se što veći broj mladih izleže. Leglo se obično sastoji od 2 – 25 jaja i ženka može da polaže jaja i do 5 puta godišnje. Veličina legla najviše zavisi od veličine ženke, mada i drugi faktori kao što su starost, doba godine i stanište mogu da igraju određenu ulogu. Mladi se izlegaju nakon 60 do 90 dana od polaganja jaja. Kada se izlegu, mladunci crvenouhe kornjače su veličine oko 25 mm i sposobni su za samostalan život. Pol mladunaca je determinisan ambijentalnom temperaturom tokom rane embriogeneze. Ukoliko je temperatura preko 29 °C pol mladunaca će biti ženski, a ukoliko je temperatura manja od 29 °C pol mladunaca će biti muški.

Ova vrsta kornjača je veoma izdržljiva i prilagodljiva, te se van svog prirodnog staništa brzo prilagođava različitim ekološkim nišama na račun autohtonih vrsta. Preko trgovine kućnim ljubimcima, crvenouhe kornjače su dospjele u zemlje širom svijeta i prisutne su na svim kontinentima osim Antartika. U jugoistočnoj Aziji, konkretno Kini, Japanu, Tajlandu i Singapuru crvenouhe kornjače se smatraju veoma invanzivnom vrstom (Ramsay i sar., 2007). Crvenouhe kornjače se smatraju invazivnom vrstom u zemljama širom svijeta i u mnogim zemljama postoji zakonska zabrana uvoza ovih životinja.

U Srbiji crvenouha kornjača je prisutna u slobodnoj prirodi na preko 25 lokaliteta, i potvrđeno je da se razmnožava na najmanje 4 lokaliteta (Urošević i sar., 2016). Potvrđeno je da crvenouha kornjača u Srbiji zauzima istu ekološku nišu kao i autohtona evropska barska kornjača (*Emys orbicularis*). Pošto je crvenouha kornjača kompetitivnija, što znači da je aktivna duže vrijeme tokom godine, polaže više jaja i otpornija na faktore spoljašnje sredine, crvenouha kornjača potiskuje evropsku barsku kornjaču iz staništa u kojima su prisutne obe vrste (Urošević i sar., 2019). Ovo je naročito bitno jer je prisustvo crvenouhe kornjače potvrđeno i u nekim rezervatima prirode kao što su Zasavica i Obedska bara. U isto vrijeme, crvenouha kornjača je jedan od najčešćih gmizavaca, kućnih ljubimaca na teritoriji Srbije. Moguće ju je kupiti u velikom broju prodavnica kućnih ljubimaca i pet šopova, iako je Pravilnikom o prekograničnom prometu i trgovini zaštićenim vrstama uvoz ove vrste kornjača u Srbiju zabranjen, a njena prodaja ograničena („Službeni glasnik Republike Srbije“ broj 6/2014-9).

## 2.2. Reaktivne kiseonikove vrste (ROS), slobodni kiseonikovi radikali i oštećenje DNK

Reaktivne kiseonikove vrste obuhvataju, kako slobodne kiseonikove radikale, tako i neradikalne kiseonikove derivate (Tabela 1) (Harvey, 2008).

Tabela 1. Prikaz ROS

	Radikali		Neradikali	
ROS	$O_2^{\bullet-}$	superoksid anjon	$H_2O_2$	vodonik peroksid
	$OH^{\bullet}$	hidroksid anjon	$HOCl$	hipohlorna kiselina
	$ROO^{\bullet}$	peroksil radikal	$O_3$	ozon
	$RO^{\bullet}$	alkoksil radikal	$^1O_2$	singletni kiseonik
	$HOO^{\bullet}$	hidroperoksil radikal		

Iz Tabele 1. se vidi da su svi slobodni kiseonikovi radikali reaktivne kiseonikove vrste, ali sve reaktivne kiseonikove vrste nisu i slobodni kiseonikovi radikali (Ortiz i sar., 2017). Superoksid anjon ( $O_2^{\bullet-}$ ) i vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ) su veoma selektivni u reakcijama sa biološkim molekulima, dok hidroksid anjon ( $OH^{\bullet}$ ) ne pokazuje tu vrstu selektivnosti. Slobodni kiseonikovi radikali su prirodna posljedica evolutivnog procesa. Korišćenjem kiseonika, jednoćelijski aerobni organizmi su bili u mogućnosti da proizvedu daleko više energije u obliku ATPa nego anaerobni organizmi, što im je omogućilo da uspostave odnose sa susjednim ćelijama i tako naprave efikasniji sistem zaštite od štetnih faktora spoljašnje sredine, kao i efikasnije metaboličke puteve. Ovo je omogućilo stvaranje sve kompleksnijih multićelijskih organizama, sve do nastanka sisara (Rahman, 2007).

Slobodni radikali kiseonika su joni i molekuli kiseonika ili kiseonika i vodonika u tijelu, koji mogu da nastanu pod uticajem velikog broja faktora. Od spoljašnjih faktora, najčešće su to ultraljubičasto zračenje, dim, zagađenje, ali i fiziološki procesi koji se odvijaju u organizmu, poput disanja ili varenja hrane (Jan i sar., 2015). Uopšteno, slobodni radikali su joni ili molekuli sa neuparenim elektronima u spoljašnjoj orbiti što ih čini veoma nestabilnim. Ovo znači da slobodni radikali mogu veoma lako reagovati sa drugim molekulima, tako što će im donirati elektrone i na taj način ih oštetiti ili čak pretvoriti u slobodne radikale.

Najveći dio kiseonika koji aerobni organizmi udišu transportuje se u mitohondrije, ćelijske organele koje su, između ostalog, odgovorne za stvaranje oko 95 % ATP koji nastaje u ćeliji. Tokom ovog procesa, jedan dio molekula kiseonika se ne metaboliše pravilno. Ova margina greške u metabolizmu kiseonika je predisponirajući faktor za nastajanje ROS-a. Čovjek produkuje djelimično redukovano  $O_2^{\bullet-}$  u prosječnoj količini od 5 kg u periodu od godinu dana. Superoksid anjon ( $O_2^{\bullet-}$ ) je slobodni radikal kiseonika koji, pored toga što oštećuje mitohondrije i makromolekule koji se u njima nalaze, može da dovede do stvaranja drugih ROS i slobodnih kiseonikovih radikala, kao što su  $H_2O_2$  i  $OH^{\bullet}$ . Slobodni kiseonikovi radikali mogu da se stvaraju i u citosolu, kao i u ostalim ćelijskim organelama, ali u dosta manjoj količini, zbog manjeg učešća kiseonika u reakcijama van mitohondrija (Barja i Herrero, 2000).



Lančana reakcija koju pokreću slobodni kiseonikovi radikali može da ošteti sve komponente ćelije, uključujući i DNK. Tokom vremena, ova oštećenja mogu da ugroze i samu funkciju ćelije. Međutim, slobodni radikali ne učestvuju samo u reakcijama koje su štetne za jedinku. Ova grupa molekula ima i neke uloge koje su ključne za održavanje zdravlja i homeostaze cijelog organizma. Najvažnije funkcije slobodnih kiseonikovih radikala u organizmu su fagocitoza i stvaranje eikosanoida – molekula koji su produkti oksigenacije esencijalnih masnih kiselina i koji imaju važnu ulogu u hemostazi, bubrežnoj funkciji i kontroli želudačne sekrecije (Halliwell i Gutteridge, 2015).

Neurodegenerativne bolesti nervnog sistema ljudi koje se povezuju sa prisustvom slobodnih radikala su Alchajmerova bolest, Parkinsonova bolest, cerebralna ishemija, multipla skleroza i mnoge druge (Ortiz i sar., 2017). Uloga oksidativnog stresa u brojnim oboljenjima jetre ljudi, kako infektivnim, tako i neinfektivnim je dobro poznata (Dasgupta i Klein, 2014; Li i sar., 2015). Tokom fiziološke funkcije raznih enzima jetre, kao što su citohrom P450, diamin oksidaza, dehidrogenaze jetre i triptofan dualna oksidaza, stvaraju se slobodni radikali. Kada dođe do zapaljenja jetre, slobodni kiseonikovi radikali se proizvode u većem stepenu, što dovodi do dodatnog oštećenja ćelija domaćina. Dokazano je da kod goveda ROS koji nastaju uslijed povećane koncentracije beta-hidroksibutirata dovode do oštećenja i apoptoze hepatocita. Ovaj mehanizam oštećenja hepatocita je posredovan enzimom p38 i proteinima p53 i Nrf2 (*Nuclear Factor-E2-related Factor 2* – Nrf2, eng.). Ovaj mehanizam je naročito važan kod goveda sa negativnim energetske bilansom i u mnogome utiče na oštećenje jetre koje se javlja kod metaboličkih oboljenja goveda, kao što je ketoza (Song i sar., 2016). Mnogi humani pacijenti sa terminalnom bolešću bubrega i pacijenti na hroničnoj hemodijalizi su u stanju hroničnog zapaljenja o čemu svjedoče povišeni markeri zapaljenja, kao što je povišen nivo C-reaktivnog proteina u serumu. Hronično zapaljenje kod ovih pacijenata s proinflamatornim citokinima kao bitnim medijatorima može da dovede do dugotrajnih komplikacija kao što su ateroskleroza, amiloidoza i rezistencija na eritropoetin. Poznato je da u toku hroničnog zapaljenja dolazi do oksidativnog stresa. Prekomjerna proizvodnja slobodnih radikala kod pacijenata sa završnim stadijumom bubrežne bolesti je povezana s zapaljenjem, metaboličkim promjenama povezanim s uremijom i bioinkompatibilnošću procesa hemodijalize. Osim toga, oštećenje antioksidativnog odbrambenog mehanizma zbog iscrpljivanja superoksid dismutaze i glutation peroksidaze u eritrocitima dodatno doprinosi povećanju oksidativnog stresa kod ovih pacijenata (Morena i sar., 2005). Takođe, dokazano je da postoji korelacija između promjene u nivou ROS u folikularnoj tečnosti kod krava i vjerovatnoće da će se kod tih jedinki razviti folikularne ciste. Ovi nalazi ukazuju da ROS igraju važnu ulogu u reproduktivnom ciklusu i mogu da budu jedan od bitnih faktora u razvoju stečenog steriliteta. Koža je konstantno izložena kako endogenim, tako i egzogenim prooksidansnim agensima. Antioksidativni odbrambeni sistem kože štiti ćelije od oštećenja izazvanim oksidativnim stresom i sprječava proizvodnju oksidirajućih produkata kao što su malondialdehid i 4-hidroksi-2-nonenal koji mogu izazvati oštećenje proteina, apoptozu ili oslobađanje proinflamatornih citokina. Kada je odbrambeni sistem kompromitovan, povišen nivo oksidativnog stresa modifikuje ćelijsku redoks ravnotežu, što dovodi do promjene ćelijske homeostaze i inicijacije degenerativnih procesa. Nekoliko oboljenja kože ljudi, kao što su atopijski dermatitis, kontaktni dermatitis, akne i psorijaza su povezane s povišenim oksidativnim stresom (Briganti i Picardo, 2003). Oksidativni stres takođe igra ulogu u patogenezi akutnog pankreatitisa jer su povišeni nivoi lipid peroksid i

superoksid radikala dokazani u krvi humanih pacijenata sa akutnim pankreatitisom. Povišen oksidativni stres kod ovih pacijenata može da traje duže nego klinička manifestacija oboljenja (Tsai i sar., 1998). Humani pacijenti sa fibromialgijom imaju povišen oksidativni stres, čemu svjedoči povišen nivo malondialdehida i smanjena aktivnost antioksidativnog enzima superoksid dismutaze, u poređenju sa zdravim individuama (Bagis i sar. 2005). Produkcija slobodnih radikala je povećana i kod nekih kardiovaskularnih oboljenja ljudi (Senoner i Dichtl, 2019), kao što su ishemijski i hemoragični infarkt, što dalje rezultira povećanim oksidativnim stresom koji može da doprinese posljedičnom oštećenju moždanog tkiva. Ustanovljeno je i da u ovim slučajevima nivo malondialdehida u krvi ima korelaciju sa količinom tkiva zahvaćenom ishemijskim infarktom i kliničkim ishodom (Cherubini i sar., 2005). Drugi autori su otkrili da je kod humanih pacijenata sa ishemijskim infarktom značajno povišen nivo 4-hidroksinonenala u plazmi u odnosu na kontrolnu grupu i predložili korišćenje ovog jedinjenja kao biomarkera za ishemijski infarkt (Lee i sar., 2012). Aktivacija proinflamatornih signalnih puteva, ekspresija citokina i povećan oksidativni stres su doprinoseći faktori u nastanku arteroskleroze ljudi (Singh i Jialal, 2006). Oksidativno modifikovani molekuli lipoproteina male gustine (*Oxidized Low-density Lipoprotein - OxLDL*, eng.) dovode do otpuštanja bioaktivnih fosfolipida koji aktiviraju ćelije endotela. Aktivirane ćelije endotela na svojoj membrani ispoljavaju receptore koji olakšavaju kotrljanje i adheziju leukocita - limfocita i monocita. Monociti se potom diferenciraju u makrofage, što se smatra ključnim trenutkom u procesu nastanka arteroskleroze (Hansson i Robertson, 2006). Postoje istraživanja u humanoj medicini koja su ustanovila da oksidativni stres ima važnu ulogu u patogenezi atrijalne fibrilacije (Carnes i sar., 2001; Huang i sar., 2009; Korantzopoulos i sar., 2007). Ove studije su potkrepljene i činjenicom da antioksidansi mogu da imaju pozitivan efekat u razvitku atrijalne fibrilacije (Huang i sar., 2009; Korantzopoulos i sar., 2007; Sakabe i sar., 2012).

Uloga oksidativnog stresa u kancerogenezi je dosta složena. Dokazano je da oksidativni stres na različite načine djeluje na tumorske ćelije od najranijih faza kancerogeneze do proliferacije i metastaziranja tumora (Hayes i sar., 2020). Postoji veliki broj studija koje ukazuju na značaj slobodnih kiseonikovih radikala u patogenezi nastanka tumora kod ljudi (Evans i sar., 2004; Hayes i sar., 2020; Ishikawa i sar., 2008). Oksidativno oštećenje DNK je bitan izvor mutacija. Procjenjuje se da u normalnoj ćeliji u toku jednog dana dođe do nastanka između 10 000 i 100 000 lezija pod uticajem slobodnih radikala kiseonika, prvenstveno OH• (Helbock i sar., 1998; Lu i sar., 2001). Ukoliko se reparacija oksidativnog oštećenja DNK ne završi prije replikacije, može da dođe do ćelijske smrti, mutacija DNK, grešaka u replikaciji i genomske nestabilnosti (Klaunig i Kamendulis, 2004; Valko i sar., 2006). Ključni trenutak u malignoj transformaciji ćelije je sinteza mutirane DNK koju ćelija ne može da reparira, koja nakon ciklusa replikacije DNK rezultira mutiranim ćelijom. Reaktivne kiseonikove vrste mogu da indukuju kako jednolančane, tako i dvolančane prekide na DNK, unakrsno povezivanje DNK lanaca i pojavu promjena na purinskim i piramidinskim bazama (Klaunig i Wang, 2018). Pored efekata ROS na oštećenje DNK, proučavani su i njihovi negenotoksični efekti (Evans i sar., 2004). Izloženost ROS-u rezultira poremećajem regulacije gena zaduženih za odgovor na stres, uključujući i gene koji regulišu odgovor na oksidativni stres. Visok nivo ROS kod ljudi može da rezultira apoptozom ili nekrozom, dok niži nivo ROS-a uzrokuje promjene u ekspresiji gena za faktore rasta i proto-onkogeni (Fiorani i sar., 1995), što vodi ka

povećanom intenzitetu ćelijske proliferacije. Efekat ROS na ispoljavanje gena se ne odigrava direktno, već preko različitih signalnih puteva. Reaktivne kiseonikove vrste mogu da aktiviraju kinaze, uključujući protein kinazu C, koja reguliše modifikacije ćelijskog ciklusa (Wu i sar., 2006). Ovaj signalni put reguliše dužinu života i proliferaciju ćelija i jedan je od najbitnijih faktora za ROS indukovanu kancerogenezu. Postoje istraživanja koja dokazuju prisustvo aktivacije transkripcionih faktora na signalnim putevima nakon izlaganja ROS (Kensler i sar., 2007; Rankin i Giaccia, 2008). Zbog njihove sposobnosti da stimulišu ćelijski rast, preko regulacije apoptoze i mitoze, transkripcioni faktori mogu da posreduju u mnogim fiziološkim i patološkim efektima uzrokovanim djelovanjem ROS. Kroz regulaciju faktora zaduženih za transkripciju gena i ometanje signalnih puteva, ROS posredno djeluju na ispoljavanje gena koji su odgovorni za neoplastičnu transformaciju ćelije (Klaunig i Wang, 2018). Oksidativni stres takođe, ima važnu ulogu u metastaziranju tumora (Gill i sar., 2016). Iako postoje studije koje pokazuju da povišen nivo ROS-a u određenim okolnostima potpomaže proces metastaziranja tumorskih ćelija kod ljudi (Ishikawa i sar., 2008), daleko je veći broj ispitivanja koja su pokazala da u ovoj fazi ROS imaju zaštitnu ulogu, odnosno da ROS ubijaju tumorske ćelije u većem broju faza procesa metastaziranja (Gill i sar., 2016; Le Gal i sar., 2015; Piskounova i sar., 2015).

Živi organizmi su se tokom vremena prilagodili prisustvu ROS-a, i to na dva načina. Prvi način je da uklanjanjem slobodnih kiseonikovitih radikala preko antioksidativnih sistema ublažavaju njihove neželjene efekte. Drugi način je da organizam koristi slobodne kiseonikove radikale kao glasnike u ćelijskoj signalizaciji i regulaciji tjelesnih funkcija. Među korisnim fiziološkim funkcijama slobodnih kiseonikovitih radikala su regulacija vaskularnog tonusa, detekcija i prilagođavanje na hipoksiju, pa čak i odgovor na oksidativni stres (Juranek i sar., 2013). Reaktivne kiseonikove vrste su veoma važne za organizam, imaju potencijal da izazovu oštećenja na skoro svim organskim sistemima, ali takođe imaju bitnu ulogu u odbrambenom sistemu organizma. Zbog toga je veoma važno da nivoi reaktivnih vrsta kiseonika u organizmu budu u opsegu koji je bezbjedan za jedinku (Ray i sar., 2012).

Parametri koji se u literaturi najčešće koriste za procjenu oksidativnog stresa su superoksid dismutaza (Superoxide Dismutase - SOD, eng.), katalaza (Catalase - CAT, eng.), glutation S transferaza (Glutathione S-transferase - GST, eng.) i malondialdehid (Malondialdehyde - MDA, eng.). Sva navedena jedinjenja imaju važnu ulogu u oksidativno-redukcionim procesima. SOD katalizuje dismutazu superoksida u kiseonik i  $H_2O_2$  koji se dalje kataboliše preko CAT i periksodaze u kiseonik i vodu. SOD je prisutan u skoro svim ćelijama koje su izložene kiseoniku, gdje pomaže u neutralizaciji štetnih reakcija superoksida, štiteći na taj način ćelijski zid od njegovog toksičnog djelovanja. CAT je veoma efikasan enzim, tako da jedan molekul CAT može da prevede 6 miliona molekula  $H_2O_2$  vodu i kiseonik svakog minuta (Jan i sar., 2015). GST nije jedan enzim, već se sastoji od čitave porodice enzima koji katalizuju konjugaciju velikog broja reaktivnih elektrofila i sumpornog atoma tripeptid glutationa. Jedinjenja na koja GST djeluje uključuju halogenonitrobenzene, aren okside, kinone i  $\alpha,\beta$ -nezasićene karbonile (Mathew i sar., 2006). MDA je krajnji proizvod lipidne peroksidacije i sporedni proizvod sinteze tromboksana  $A_2$ . Ovo znači da se MDA konstantno stvara u organizmu, što ga čini pouzdanim markerom oksidativnog stresa. Pored njegovog značaja kao markera

oksidativnog stresa, MDA je biološki veoma aktivan. Malondialdehid može da se veže za veliki broj bioloških molekula kao što su proteini i DNK i utiče na njihovu funkciju. Zbog ovoga se MDA smatra veoma mutagenim i teratogenim jedinjenjem (Giera i sar., 2012).

### 2.3. Endoskopska dijagnostika

Riječ endoskopija (od grčkih riječi „ε̑νδov“ (éndon), unutrašnji i „σκοπεῖν“ (skopein), pregledati) potiče iz staro-grčkog jezika i u bukvalnom prevodu znači gledati unutra ili pregledati unutrašnjost (Berci i Kenneth, 2000). U „*Corpus Hippocraticum*“ se pominju prve izvedene endoskopije, gdje je operator koristio spekulum za pregled fistule. Kasnije, u Galenovom „*Levicom*“ -u se pominje *catoper* koji se koristio kao analni spekulum. Slijedeći bitan napredak u oblasti endoskopije se desio početkom XIX vijeka kada je Philipp Bozzini, njemački ljekar napravio svoj „*Lichtleiter*“ (svjetlosni provodnik), sa ciljem pregleda organa u abdomenu čovjeka. *Lichtleiter* je bio metalni instrument koji se sastojao od cijevi kroz koju su se posmatrali organi, kućišta za izvor svjetla (u ovom slučaju je to bila svjeća) i sistema ogledala koji je usmjeravao svjetlost kroz cjev. Nažalost, njegov izum nije bio prihvaćen od strane njegovih savremenika i bilo je potrebno da prođe još pola vijeka da evropski ljekari počnu da dizajniraju i koriste ovu vrstu instrumenta. Osoba koja se smatra zaslužnom za popularizaciju endoskopa je francuski ljekar Segalas, koji je dizajnirao veliki broj sličnih naprava i rutinski ih upotrebljavao u svojoj praksi (Grunfeld, 1879). Prvi moderni endoskopski sistem je razvio engleski ljekar Hopkins 1959. godine. Prvi standardizovan set za endoskopiju je proizveden početkom šezdesetih godina prošlog vijeka, i smatra se da je time počela epoha savremene endoskopije (Berci i Kont, 1969). Do današnjeg dana je endoskopija postala standardna dijagnostička medicinska procedura koja se koristi u skoro svim većim zdravstvenim ustanovama širom svijeta. O njoj zastupljenosti govori i činjenica da se danas preko 80 % svih operacija žučne bešike obavlja laparoskopski, kao i to da je kolonoskopija dijagnostička procedura izbora za pregled zadnjih partija digestivnog sistema (Hassler i sar., 2021).

Upotreba endoskopa na životinjama je bila zastupljena kao dio eksperimentalnog procesa u razvijanju endoskopskih aparata (Moll i Schultheiss, 2019), međutim upotreba endoskopije u veterinarskoj medicini je dosta skoriji koncept. Prvi objavljeni rad na ovu temu datira iz 1970. godine kada je endoskop prvi put korišćen za pregled respiratornog sistema pasa i mačaka (O'Brien, 1970).

Endoskopska dijagnostika kod gmizavaca počinje da se izvodi početkom devedesetih godina prošlog vijeka i nalazi veliki broj primjena, uključujući određivanje pola, kloakoskopiju, gastroskopiju, traheobronhoskopiju, laparoskopsku ovariohisterektomiju i laparoskopsku biopsiju (Cooper, 1991; Divers, 1999; Gobel i Jurina, 1994). Endoskopija je postala veoma prihvaćena dijagnostička procedura za kratko vrijeme među veterinarima koji se bave gmizavcima, tako da je danas nezaobilazni dio kliničkog pregleda svake jedinke (Hernandez-Divers i sar., 2005).

### 2.3.1. Uticaj endoskopske dijagnostike na oksidativni stres i oštećenje DNK

Prije razmatranja dokaza o prisustvu oksidativnog stresa prilikom izvođenja različitih endoskopskih procedura, potrebno je da se iste podjele u dvije grupe. Prvu grupu čine endoskopske procedure koje se izvode bez jatrogene traume tkiva, ovdje spadaju kolonoskopija, laringoskopija, rinoskopija i slične procedure. Drugu grupu čine endoskopske procedure sa jatrogenom traumom tkiva i ovdje spadaju dijagnostička laparoskopija i endoskopija, kao i različite hirurške procedure koje se izvode pomoću endoskopa.

Ne postoji jasan koncenzus u medicinskoj zajednici o prednostima i manama endoskopskih procedura u pogledu njihovog uticaja na oksidativni stres (Yiannakopoulou i sar., 2013). Ustanovljeno je da je kod otvorenih hirurških intervencija prisutan oksidativni stres u značajnoj količini (Küçükakin i sar., 2009). Kada se govori o oksidativnom stresu i endoskopskoj hirurgiji ili endoskopskoj dijagnostici sa oštećenjem tkiva, postoje studije koje su utvrdile da laparoskopska hirurgija ili endoskopija ne stvaraju ništa manji, ili u nekim slučajevima čak i veći oksidativni stres od klasične, odnosno otvorene hirurgije (Madsen i sar., 2012; Yiannakopoulou i sar., 2013). Međutim, postoje i istraživanja koja su utvrdila da endoskopska dijagnostika i hirurgija skoro uopšte ne dovode do povećanja parametara oksidativnog stresa nakon intervencije (Arsalani-Zadeh i sar., 2011; Tsuchiya i sar., 2008). Razlike u nalazima ovih studija mogu djelom da se objasne i različitim anestetičkim protokolima koji su primjenjivani, činjenicom da su u najvećem broju slučajeva ispitivanja vršena na bolesnim individuama, kao i različitim metodama određivanja prisustva oksidativnog stresa kod pacijenata (Pappas-Gogos i sar., 2013). Kada se u obzir uzmu studije obavljene na pacijentima bez težih patoloških stanja, koji su bili izloženi rutinskim endoskopskim procedurama, rezultati ukazuju na to da kod primjene endoskopske dijagnostike dolazi do stvaranja ROS, ali da je to prisutno u značajno manjoj mjeri nego nakon otvorene hirurgije (Yiannakopoulou i sar., 2013).

## 2.4. Propofol

Propofol (2,6-diizopropilfenol) je snažan intravenski hipnotički lijek. Kao i većina depresora CNS-a (barbiturati, benzodiazepini, neurosteroidi, alkohol), propofol je agonista receptora  $\gamma$ -aminobuterne kiseline ( $\gamma$ -Aminobutyric Acid – GABA, eng.). Djelovanjem na GABA receptore, i to prije svega GABA<sub>A</sub> receptore u CNS-u, propofol olakšava ulazak hloridnih jona u neurone i smanjuje njihovu ekscitabilnost. Ima povoljan farmakokinetički i farmakodinamički profil, što je dovelo do toga da je postao najčešće korišćen intravenski anestetik u posljednje tri decenije (Baker i sar., 2005; Glen, 2019; Glen i James, 1977; Schüttler i Schwilden, 2008). Brza i laka indukcija, sa skoro potpunim odsustvom ekscitacija, kratak poluživot i mala incidenca postoperativne mučnine i povraćanja ga čine podesnim anestetikom za izvođenje različitih hirurških intervencija, kako kod ljudi tako i kod životinja. U humanoj medicini se koristi za sedaciju i anesteziju kod svih vrsta hirurških operacija, a posebno kod minimalno invazivnih procedura, kakva je endoskopska dijagnostika, ali i komplikovanih neurohirurških intervencija, gdje je brzo vraćanje psihomotornih funkcija od naročitog značaja (Joo i Perks, 2000; Ababneh i sar., 2020). U veterinarskoj medicini, propofol se intenzivno koristi za anesteziju pasa i mačaka

(Fredley i sar., 2020; Mallard i sar., 2018; Seiseddos i sar., 2019; Shimizu i Kanda, 2021). Primjenljiv je i kod konja, svinja i koza ali ga visoka cena čini manje atraktivnim anestetikom za velike i farmske životinje (Riedesel, 2008; Posner, 2018).

Propofol je posljednjih godina našao primjenu i u veterinarskoj medicini egzotičnih životinja, uprkos velikom broju prepreka za njegovu efikasnu upotrebu kod ovih vrsta životinja (nemogućnost postavljanja venskog puta, velika razlika u metaboličkim mehanizmima između pojedinih vrsta životinja što otežava određivanje efektivne doze) (Natalini, 2021; Miyabe-Nishiwaki i sar., 2021). Kod gmizavaca je upotreba propofola dosta zastupljena, uglavnom za indukciju anestezije (Bertelsen i sar., 2021). Za intravensku aplikaciju propofola kod zmija i guštera koristi se *v. coccygea ventralis*, a kod kornjača *v. jugularis* i *plexus subcarapacialis*. Kada se primjeni na ovaj način, propofol izaziva dosta brzu i bezbjednu indukciju anestezije, dok se za održavanje anestezije preporučuje upotreba inhalacionih anestetika. Kod nekih gmizavaca intraosealna aplikacija propofola je takođe bezbjedna alternativa. Ukoliko dođe do paravenske aplikacije, to kod gmizavaca, za razliku od sisara, neće dovesti do značajnog oštećenja tkiva (Kania i sar., 2018; Giuseppe i sar., 2018; Ziolo i Bertelsen, 2009).

Neželjeni efekti propofola kod pasa i mačaka ogledaju se u značajnom dozno zavisnom smanjenju srednjeg arterijskog pritiska usled vazodilatacije venskih ali i arterijskih krvnih sudova. Takođe, ovaj anestetik može nepovoljno da djeluje na srčani mišić, tako što smanjuje raspoloživost  $Ca^{2+}$  jona, kao i osjetljivost miokarda na  $Ca^{2+}$  jone, što prouzrokuje direktnu depresiju miokarda. Kod pasa, propofol u toku uvođenja u anesteziju može da prouzrokuje kratku, prolaznu apneju, kao i mioklonične trzaje i zaveslaje ekstremiteta (Riedesel, 2008; Posner, 2018).

U ogledu ispitivanja subakutne toksičnosti propofola primenjenog intravenskom bolus injekcijom kod 10 pasa (6mg/kg t.m.) i 10 mačaka (10mg/kg t.m.), tokom 3 uzastopna dana, od toksičnih efekata zabilježeni su apnea (kod 3 mačke), poremećaj frekvence rada srca i disanja, pad krvnog pritiska, kao i promjena kompletne krvne slike i biohemijskog profila kod svih tretiranih životinja. Isto tako, kod 6 mačaka primjećeno je blago povećanje broja Heinzenovih telašaca u eritrocitima, što bi moglo da uputi na razvoj oksidativnog stresa, ali je uočena pojava bila bez kliničke značajnosti (Matthews i sar., 2004).

Neželjeni efekti propofola su dobro dokumentovani u humanoj medicini, a najčešći je bol pri neodgovarajućoj injekcionoj aplikaciji. Ostali neželjeni efekti su kardiovaskularni (bradikardija, hipotenzija) i metabolički (hiperlipidemija koja je posljedica infuzije lipidne formulacije) (Marik, 2004). Rijedak neželjeni efekat aplikacije ovog anestetika je takozvani sindrom infuzije propofola (*Propofol Infusion Syndrome* – PRIS, eng.), u koji ulaze teška metabolička acidoza, rabdomioliza, hiperkalemija i kardiovaskularni kolaps. Ovo stanje je u velikom broju slučajeva fatalno. Takođe, novija istraživanja ukazuju da sedacija GABA agonističkim lijekovima može da bude neurotoksična kod pedijatrijskih pacijenata i izazove trajni kognitivni deficit. Međutim, klinički značaj ovih tvrdnji nije temeljno ispitan (Sahinovic i sar., 2018).

Propofol se aplikuje intravenski. Intramuskularna aplikacija ne obezbeđuje anestetičku koncentraciju ovog leka u cirkulaciji zbog njegove brze biotransformacije (Divers, 1996).

Isto tako, nije prikladan za oralnu primjenu zbog gorkog ukusa i niske biološke raspoloživosti, uzrokovane visokim stepenom hepatične ekskrecije, čak i do 90 % (Raouf i sar., 1996). Neki autori su pokušali da povećaju biološku raspoloživost propofola primjenivši ga oralno u obliku nanočestica sa hitozan amfifilom, ali je ovaj način primjene ostao u eksperimentalnom domenu (Uchegbu i sar., 2014).

Nakon intravenske aplikacije, najveća frakcija propofola se vezuje za proteine plazme i eritrocite. Slobodna frakcija propofola je svega 1,2 - 1,7 %, ali je dovoljna da lako prođe krvno-moždanu barijeru i izazove brz gubitak svijesti. Brzina indukcije anestezije može da varira i zavisi od većeg broja faktora, od kojih su najvažniji minutni volumen i frekvencija rada srca. Iako je slobodna frakcija propofola u plazmi nešto preko 1 %, u cerebrospinalnoj tečnosti ona iznosi oko 31 % (Dawidowicz i sar., 2003). Nakon intravenske bolus aplikacije ili kratke infuzije propofola, vrijeme pojave kliničkih efekata lijeka je jako kratko zbog njegove brze inicijalne distribucije u CNS, i kod pasa je to period od 2-10 minuta (Riedesel, 2008). Redistribucija u, i iz sporih kompartmenata (masno tkivo, koža) je takođe prisutna, zbog visoke liposolubilnosti propofola. Masno tkivo ima veliki kapacitet da apsorbuje propofol što rezultira prividno veoma visokim stepenom redistribucije, čak i kod jedinki koje nisu gojazne (Hannivoort i sar., 2015). Važno je istaći da kod životinja intraspecijske varijacije utiču na kinetiku propofola. Tako je kod hrtova volumen distribucije ovog hipnotika manji ( $V_d=11,7$  l/kg) u odnosu na pse mješance ( $V_d=17,9$  l/kg), što čini da se u cirkulaciji, po primjeni propofola u propisanoj dozi kod hrtova, nalazi viša koncentracija lijeka, a samim tim i duže trajanje anestezije, i duži oporavak od iste (Posner, 2018).

Jetra je glavno mjesto metabolizma propofola. U hepatocitima se propofol prvo hidrolizuje u 2,6-diizopropil-1,4-hinol (4-hidroksipropofol), a zatim konjuguje i formira (2,6-diizopropil-1,4-hinol)-sulfat i (2,6-diizopropil-1,4-hinol)-glukuronid, metabolite koji su farmakološki neaktivni. Veći broj različitih izoformi citohroma C 450 učestvuje u ovom koraku. Tako je kod pasa, u metabolizmu propofola, vodeći izoenzim citohrom P2B11, dok je citohrom P2D15 dvostruko manje aktivan (Hay Kraus i sar., 2000).

Ukupni klirens propofola iz tjela je brz i premašuje protok krvi u jetri, što ukazuje na njegov ekstrahepatični metabolizam (Posner, 2018.). Mjesto ekstrahepatičnog metabolizma je nejasno, ali se pokazalo da plućno tkivo doprinosi metabolizmu propofola kod mačaka (Riedesel, 2008). Mogu postojati značajne razlike između vrsta u mjestu i količini ekstrahepatičnog metabolizma. Tako se kod ljudi navodi da su to bubrezi, pa čak i tanko crevo (Dawidowicz i sar., 2000; Hiraoka i sar., 2005).

Nakon metabolisanja, 88 % propofola se ekskretuje iz organizma preko urina u prvih 5 dana. Manje od 0,3 % aplikovanog propofola se ekskretuje iz organizma u neizmjenjenom obliku (Sahinovic i sar., 2018). Propofol se ekskretuje i preko pluća, što je najuočljivije kod mačaka (Riedesel, 2008). Količina propofola koja se eliminiše ovim putem je veoma mala, s tim da koncentracija propofola u izdahnutom vazduhu korelira sa koncentracijom propofola u plazmi.

### 2.4.1. Uticaj propofola na oksidativni stres i oštećenje DNK

Protektivna uloga propofola na ćelije u oksidativnom stresu je odavno poznata (Ansley i sar., 1998). Struktura propofola, koji je fenolski derivat, slična je strukturi tokoferola, butiliranog hidroksitoluena, butiliranog hidroksianizola i  $\alpha$ -tokoferola i njihova antioksidativna aktivnost je dobro ispitana te je dokazano da aktiviraju antioksidativne enzime i time moduliraju ćelijski odgovor na oksidativni stres (Östman i sar., 2009). Na osnovu toga se smatralo da je zaštitna uloga propofola isključivo posljedica njegove antioksidativne aktivnosti. Međutim, postoje studije koje ukazuju da propofol aktivno smanjuje koncentraciju slobodnih kiseonikovih radikala u cirkulaciji povećavanjem aktivnosti katalaze, superoksid dismutaze i glutation peroksidaze (Li i sar., 2012). Propofol takođe reaguje sa peroksinitritom što rezultira formiranjem propofolskih derivata fenoksilnih radikala, što može da ukazuje da propofol ima mogućnost da aktivno smanjuje i koncentraciju slobodnih nitritnih radikala u cirkulaciji (Mathy-Hartert i sar., 2000).

Dokazano je da kod ljudi propofol inhibira lipidnu peroksidazu u različitim eksperimentalnim modelima i na taj način štiti ćelije od oksidativnog stresa i povećava antioksidativni kapacitet plazme (Manataki i sar., 2001). U skorijoj studiji ustanovljeno je da propofol ima protektivno dejstvo na ćelije jetre kod hepatične ishemije/reperfuzije i hepatične hipoksije/reoksigenacije preko inhibicije Bnip3 (*BCL2 Interacting Protein 3* – Bnip3, eng.) (Ma i sar., 2021). Naime, hepatična ishemija/reperfuzija dovodi do ćelijske ishemije i hipoksije, i predstavlja okidač za stresni odgovor, stimulišući dodatnu aktivaciju inflamatornih ćelija i sekreciju velikog broja medijatora inflamacije kao što su tumor nekrotični faktor-alfa (*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*  – TNF- $\alpha$ , eng.) i interleukin-6 (IL-6). Aplikacija propofola smanjuje koncentraciju TNF- $\alpha$  i IL-6 u ćelijama jetre u stadijumu inflamacije. Bnip3 je pro-apoptotski protein membrane mitohondrija koji ima veliki broj bioloških funkcija. On takođe utiče na sintezu ROS u različitim patološkim stanjima (Singh i sar., 2018). Kod hepatične ishemije/reperfuzije i hepatične hipoksije/reoksigenacije povećana je ekspresija Bnip3, samim tim veća je šansa da dođe do apoptoze zahvaćenih ćelija. Kako propofol smanjuje ekspresiju ovog proteina, inhibira i apoptozu i inflamaciju ćelija jetre.

Kod ishemijskih procesa na mozgu, propofol takođe pokazuje protektivnu ulogu. Naime, uz to što smanjuje proizvodnju ROS kod ishemijskih procesa na nivou mozga, propofol inhibira djelovanje sukcinat dehidrogenaze i time sprječava nakupljanje sukcinata u mitohondrijama, koji je jedan od najbitnijih faktora za proizvodnju slobodnih kiseonikovih radikala (Yu i sar., 2018).

Propofol povećava stopu preživljavanja ćelija miokarda i smanjuje mogućnost da dođe do apoptoze uzrokovane H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ovo je rezultat toga što propofol podstiče nakupljanje Nrf2 faktora u jedrima, u uslovima oksidativnog stresa. Ovime se omogućava povećana sinteza enzima koje Nrf2 faktor reguliše, a koji imaju ulogu u neutralizaciji slobodnih kiseonikovih radikala (Shinjo i sar., 2018).

Propofol ispoljava antioksidativno dejstvo i na nivou endoplazmatskog retikuluma. Stres endoplazmatskog retikuluma je alternativni signalni put u modulaciji ćelijskog oksidativnog stresa. Važan faktor u stresnom odgovoru endoplazmatskog retikuluma je



odgovor nesavijenih proteina (*Unfolded Protein Response* – UPR, engl.) jer je odgovoran za održavanje homeostaze unutar endoplazmatskog retikuluma. Ustanovljeno je da su proteini Grp78 (*Glucose Regulated Protein 78* - Grp78, eng.), IRE1 $\alpha$  (*Inositol-requiring Transmembrane Kinase/endoribonuclease 1a* – IRE1 $\alpha$ , eng.) i kaspaza 12 ključni signalni molekuli u modulaciji UPR-a (Goldenberg-Cohen i sar., 2012). Koncentracija navedenih molekula raste u prisustvu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Propofol snižava nivoe Grp78, IRE1 $\alpha$  i sprječava aktivaciju kaspaze 12, što ukazuje da propofol sprječava oštećenja izazvana H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indukovanim oksidativnim stresom i preko supresije oksidativnog stresa koji nastaje dejstvom endoplazmatskog retikuluma (Liu i sar., 2017).

Propofol takođe smanjuje stepen oštećenja DNK zaštitnim djelovanjem na organizam u oksidativnom stresu. Dokazano je da propofol inhibicijom fosforilacije FoxO<sub>1</sub> (*Forkhead Box O1* – FoxO1, eng.) proteina atenuira faktore oštećenja DNK u ćelijama miokarda (Zhou i sar., 2019). Međutim, postoji i istraživanje koje pokazuje da propofol može i da izazove oštećenje DNK supresijom gena koji su zaduženi za reparaciju DNK lanca (Wu i sar., 2013).

## 2.5. Ketamin

Ketamin ((R,S)-ketamin) je derivat fenilcikloheksilamina koji se sastoji od njegova dva optička enantiomera, (S)- i (R)-ketamina (Kurdi i sar., 2014). Postao je komercijalno dostupan za upotrebu u humanoj kliničkoj praksi 1970. godine kao brzodjelujući *i.v.* anestetik. Ketamin je sintetisan iz fenciklidina (*Phenylcyclohexyl Piperidine* – PCP, eng.), s ciljem smanjenja ozbiljnih psihomimetičkih/psihodisleptičkih neželjenih dejstva i potencijala zloupotrebe izvornog lijeka, koji je nedugo nakon toga (1978), uklonjen s tržišta (Mion i Villevieille, 2013). Međutim, ketamin je zadržao disocijativno dejstvo i još uvijek je podložan zloupotrebi, doduše značajno manje nego fenciklidin (Morgan i sar., 2012). Uprkos ovim nuspojavama, ketamin je ostao široko korišćen lijek zbog svog kratkog poluživota i bezbjednosti od pojave klinički značajne depresije disanja (Gorlin i sar., 2016).

Opšte anestetičko dejstvo ketamina odvija se preko nekompetitivne inhibicije N-metil-D-aspartata (*N-methyl-D-aspartate* – NMDA, eng.), koji postaju nedostupni ekscitatornim neurotransmiterima glutamatu i glicinu, i tako ostaju zatvoreni za protok Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> i Ca<sup>2+</sup> jona. Ovo sprječava pokretanje neurona drugog reda što za posljedicu ima depresiju aktivnosti talamokortikalnog i limbičkog sistema, i jedara u retikularnom aktivacionom sistemu. Takođe, ketamin u izvesnoj mjeri djeluje na opioidne receptore ( $\mu > \kappa$ ), monoaminergičke, muskarinske i  $\zeta$ -1 receptore (kalcijumska transmisija na endoplazmatskog retikulumu), dok na GABA receptore ne djeluje (Posner, 2018). Upravo iz tog razloga, ketamin ima i veliki broj sporednih efekata sa manjom ili većom primjenom u medicini (Eldufani i sar., 2018). U posljednjih nekoliko godina, zapažen broj studija je usmjeren na izučavanje dejstva ketamina kao antidepresiva (Andrade, 2017; Corriger i Pickering, 2019; Ionescu i sar., 2015). Ketamin se primjenjuje i za liječenje hroničnog bola, posebno onog sa neuropatskom komponentom, kao pratećeg simptoma različitih bolesti kod ljudi i životinja (Maher i sar., 2017, Posner, 2018). Nekoliko kliničkih studija je pokazalo da primjena ketamina u kombinaciji s morfinom u liječenju kancerskog bola rezultira manjim utroškom oba lijeka, a time i manjom incidencom razvoja neželjenih

efekata (Niesters i sar., 2014). Kao nekompetitivni antagonista NMDA receptora ketamin ima značaja u palijativnoj terapiji Alchajmerove bolesti (Rocha i sar., 2021). Ketamin je antagonista glutamatu i može da ima pozitivnu ulogu u liječenju produžene cerebralne ishemije nakon subarahnoidalnog krvarenja i cerebralnog vazospazma. To ukazuje da ketamin može da ima protektivno dejstvo na ćelije mozga i može da smanji rizik od apoptoze do koje dolazi pod uticajem glutamata (Jung i sar., 2013). Ketamin smanjuje nivo tumor nekrotičnog faktora  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) i interleukina (IL) i smanjuje proizvodnju azot oksida (NO). Svi ovi medijatori igraju vitalnu ulogu tokom upalnog procesa i inhibicija njihove aktivnosti može uticati na makrofagima posredovan imuni odgovor. (Beilin i sar., 2007).

Ketamin ima i neželjena dejstva. Dominantni su psihoaktivni efekti koji su dozno zavisni. Tako, ketamin primjenjen *i.v.* u subanestetičkoj dozi, prouzrokuje osećaj razdvojenosti (disocijaciju), u vidu izobličenja u vizuelnim, slušnim ili somatosenzornim stimulusima ili promjene u percepciji, kao i pozitivne psihomimetičke efekte (konceptualna dezorganizacija, halucinacije, sumnjičavost) i negativne psihomimetičke efekte (zatupljenost, emocionalna apatija, motorna retardacija) (Ionescu i sar., 2015). Nešto veće doze ketamina mogu da dovedu do vestibularnih perturbacija, uključujući vrtoglavicu i mučninu/povraćanje (Wan i sar., 2014). Na kardiovaskularni sistem ketamin djeluje dvojako. Direktno na miokard depresivno, ali stimulacijom monoaminergičkih receptora i inhibicijom preuzimanja kateholamina u sinapsama prouzrokuje povećanje minutnog volumena srca, a postoji opasnost da izazove i tahikardiju, posebno kod pacijenata sa srčanim tegobama (Posner, 2018). Nasuprot tome, na respiratorni sistem ketamin djeluje mnogo povoljnije u odnosu na druge intravenske anestetike. Mogućnost pojave respiratorne depresije kod primjene ketamina je minimalna i uglavnom je vezana za brzu *i.v.* aplikaciju ovog anestetika u velikoj dozi. Takođe, ketamin prouzrokuje bronhodilataciju, pa u tom smislu djeluje povoljno kod pacijenata sa bronhospazmom (Eilers i Yost, 2018). Kod svinja rase landras i jorkšir ketamin primjenjen u terapijskoj dozi može da prouzrokuje malignu hipertermiju, mada je po nekim autorima ovaj podatak upitan (Posner, 2018). Tako, u kliničkoj studiji sprovedenoj na 76 svinja, ketamin primjenjen *i.v.* za indukciju i/ili održavanje anestezije nije prouzrokovao malignu hipertermiju (Dershwitz i sar, 1989).

Ketamin podleže kaskadnom metabolizmu, koji počinje demetilacijom azotne grupe u jetri i rezultira nastajanjem aktivnog metabolita norketamina. Nakon demetilacije ketamina u norketamin, on se dalje metaboliše u hidroksinorketamin (Hydroxynorketamine - HNK, eng.) i dehidronorketamin (*Dehydronorketamine* - DHNK, eng.), a zatim konjuguje sa glukuronidom kako bi se trajno eliminisao urinom. Kod mačaka se, vjerovatno zbog manjka glukuronida, ketamin metaboliše do nivoa norketamina, i kao takav izlučuje urinom (Posner, 2018). Prosječno vrijeme za koje metaboliti ketamina dostignu maksimalnu koncentraciju u plazmi je 1,33 sata za norketamin i 3,83 sata za HNK i DHNK (Zhao i sar., 2012). U studiji koju su uradili Cohen i saradnici (1973), izmjerene su koncentracije metabolita ketamina u mozgu nakon davanja ketamina (20 mg/kg) u repnu venu kod pacova. Ovi autori su pokazali da se ketamin i norketamin brzo akumuliraju u mozgu s maksimalnom koncentracijom postignutom unutar jednog minuta nakon aplikacije anestetika. Nasuprot tome, nivo DHNK u moždanom tkivu po aplikaciji ketaina je veoma nizak i ne može da se kvantifikuje, što ima

simsla kada se uzme u obzir da je DHNK neaktivni metabolit, da se vezuje za eritrocite i da slabo prolazi krvno-moždanu barijeru (Moaddel i sar., 2016).

Ketamin se može aplikovati na različite načine, *i.v.*, *i.m.*, *i.p.*, *s.c.*, *p.o.*, intranazalno, epiduralno i perrektalno (Andrade, 2017). Za postizanje efekta opšte anestezije najbolja je *i.v.* primjena ketamina, jer se na taj način najbrže postiže odgovarajuća koncentracija ovog anestetika u plazmi. Intramuskularna aplikacija, koja se obično primjenjuje u hitnim slučajevima i kod nesaradljivih pacijenata, ima dobru bioraspodjeljivost anestetika, ali je potrebno određeno vrijeme da aktivna supstanca dostigne dovoljnu koncentraciju u plazmi (kod ljudi je to oko 5-30 minuta). Ostali načini aplikacije ketamina su klinički neprimjenjivi, iz razloga što imaju lošu iskoristivost anestetika i produženo vrijeme ulaska u anesteziju (Fanta i sar., 2015; Zanos i sar., 2018).

Ketamin se vezuje za proteine plazme oko 50 % (pas 53,5 %, mačka 53 %, konj 50 %, čovjek 12 %) i brzo distribuira u tkiva sa dobrom perfuzijom, uključujući mozak, što rezultira velikim volumenom distribucije u stanju dinamičke ravnoteže (Peltoniemi i sar., 2016, Posner, 2018, Eilers i Yost, 2018).

Ketamin ima visok klirens i kratko poluvrijeme eliminacije ( $t_{1/2}=2 - 4$  h). Eliminacija ketamina se obavlja primarno preko bubrega. Relativno mala količina anestetika se izlučuje u formi ketamina (2 %), norketamina (2 %) i DHNK (16 %). Najveći dio lijeka se ekskretuje u vidu glukuronidnog konjugata hidrosiketamina i hidrosinorketamina, koji se izlučuju preko žuči i mokraće (Dinis-Oliveira, 2017). Postoje dokazi da višekratna primjena ketamina produžava vrijeme eliminacije lijeka iz organizma (Adamowicz i Kala, 2005). Takođe, postoje bitne razlike u vremenu eliminacije ketamina iz organizma kod različitih vrsta, kao i kod različitih grupa jedinki unutar jedne vrste. Faktori koji najviše utiču na ovo su pol, starost i zdravstveno stanje (Zanos i sar., 2017).

### **2.5.1. Uticaj ketamina na oksidativni stres i oštećenje DNK**

Postoje dokazi da aplikacija ketamina, čak i u subanestetičkim dozama, može da smanji aktivnost superoksid dismutaze i katalaze u mozgu pacova, što je indikator povećanog oksidativnog stresa. U istoj studiji je dokazano da nakon aplikacije ketamina dolazi do povećane lipidne peroksidacije i oksidativnog oštećenja proteina u mozgu pacova (de Oliveira i sar., 2009). Međutim, u drugoj studiji je dokazano da ketamin u nekim situacijama može da smanji oštećenja izazvana oksidativnim stresom u moždanom tkivu pacova, nakon povrede kičmene moždine (Yazihan i sar., 2008). Takođe, na modelu pacova sa endotoksemijom i akutnim oštećenjem pluća, dokazano je da ketamin smanjuje nivoe medijatora upale plućnog tkiva i nivoe citokina u plazmi i štiti plućno tkivo od oksidativnog oštećenja (Gokcinar i sar., 2013). Na modelu pacova sa oštećenjem jetre, dokazano je da ketamin smanjuje oksidativno oštećenje jetre regulacijom Nrf2/HO-1 signalnog puta i posljedičnom pojačanom ekspresijom citoprotektivnog enzima HO-1 (*Heme Oxygenase-1* – HO-1, eng.) koji aktivno učestvuje u antioksidativnom odgovoru (Xu i sar., 2021).

U istraživanju u kojem su ispitivani efekti ketamina na embrionima zebrića (*Danio rerio*), utvrđeno je da se po aplikaciji ovog anestetika povećava nivo antioksidativnih enzima superoksid dismutaze i katalaze, uz povećanje nivoa glutation disulfida, kaspaze 9

i ROS. Pored toga, *in vivo* je kod ovih životinja primjećena povećana ekspresija proapoptotskih gena i apoptoza izazvana aplikacijom ketamina (Félix i sar., 2018).

U istraživanju na miševima je dokazano da visoke doze ketamina izazivaju oštećenje DNK u ćelijama krvi i moždanog korteksa (Leffa i sar., 2016). Međutim, u ovoj studiji su korišćene veoma visoke doze ketamina, tako da je ostalo pitanje koliki je stepen oštećenja DNK prilikom primjene ketamina u kliničkim dozama.

## 2.6. Medetomidin

Medetomidin je snažan i visoko specifičan agonist  $\alpha_2$ -adrenoreceptora i intenzivno se koristi u veterinarskoj medicini. Najčešće se primjenjuje u kombinaciji sa disocijativnim anestheticima i opioidima jer se tako smanjuje doza ovih lijekova, a sa tim i rizik od njihovih potencijalnih neželjenih efekata (Sinclair, 2003, Pascoe i Steffey, 2018).

Primarna uloga medetomidina je vezana za njegovo sedativno i analgetsko dejstvo. Alfa 2-agonisti se vezuju i strukturno mjenjaju membrane presinaptičkih  $\alpha_2$ -adrenoreceptora (G-kuplovani protein), sprječavajući dalje oslobađanje ekscitatornih neurotransmitera noradrenalina (*Noradrenaline* – NOR, eng.) i dopamina (*Dopamine* – DOP, eng.) u CNS-u. Ako je oslobađanje ovih neurotransmitera blokirano, nastaje sedacija.

Analgetski efekat medetomidina je prvenstveno posredovan inhibicijom oslobađanja NOR i supstance P u dorzalnom rogu kičmene moždine (Hellyer i sar., 2007). Bitno je napomenuti da analgetsko dejstvo medetomidina traje upola kraće nego njegovo sedativno dejstvo (Cullen, 1996).

Medetomidin, kao i ostali  $\alpha_2$ -agonisti ima centralno posredovano miorelaksantno dejstvo (Eilers i Yost, 2018).

Agonisti  $\alpha_2$ -adrenoreceptora stimulacijom centralnih i perifernih adrenoreceptora značajno utiču na kardiovaskularnu funkciju, što je izraženo kod bolesnih, iscrpljenih ili pacijenata sa kompromitovanim kardiovaskularnim sistemom (Kutara i sar., 2020). Glavni negativni kardiovaskularni efekti svih  $\alpha_2$ -agonista uključuju bradikardiju i povezane bradiaritmije (atrioventrikularni srčani blok 1. i 2. stepena), značajno smanjenje minutnog volumena srca (MVS) do 50 % i povećanje sistemskog vaskularnog otpora. Kod gmizavaca je takođe zabilježena dozno zavisna depresija kardiovaskularnog sistema nakon aplikacije medetomidina (Sladky i Mans, 2012). Sedacija izazvana  $\alpha_2$ -agonistima dovodi do periodičnog smanjenja brzine disanja i minutnog volumena ventilacije, sa mogućim blagim povećanjem parcijalnog pritiska ugljendioksida ( $\text{PaCO}_2$ ) i smanjenjem parcijalnog pritiska kiseonika ( $\text{PaO}_2$ ). Opisana respiratorna disfunkcija nastaje kao posljedica depresije CNS-a uzrokovane stimulacijom  $\alpha_2$ -adrenoreceptora. Međutim, stepen depresije kod sedacije  $\alpha_2$ -agonistima je manji nego kod drugih sedativa, posebno barbiturata (Kumar i sar., 2020, Posner, 2018a).

Medetomidin ima brojne sporedne efekte. Medetomidin može da u manjem broju slučajeva uzrokuje hipertermiju. Uz to anestetički protokoli sa  $\alpha_2$ -agonistima smanjuju perioperativne nivoe hormona stresa i samim tim stresni odgovor organizma nakon

hirurškog zahvata. Renin-angiotenzin sistem je takođe podložan uticaju medetomidina, kako direktno, tako i indirektno (Kumar i sar., 2020). Kod pasa i mačaka,  $\alpha$ 2-agonisti obično izazivaju povraćanje stimulišući zonu hemoreceptora, koja je u neposrednoj blizini *locus coeruleus*-a u mozgu (Kato i sar., 2020). Uočeno je da se midrijaza javlja nakon primjene  $\alpha$ 2-agonista kod životinja (Cullen, 1996). Pretpostavlja se da je ovaj efekat posljedica centralne inhibicije parasimpatičkog tonusa direktne simpatičke stimulacije  $\alpha$ 2-adrenoreceptora koji se nalaze u irisu.

Medetomidin može da se aplikuje na različite načine, ali u praksi je to najčešće *i.v.*, *s.c.* ili *i.m.* putem. Brzina resorpcije i dostizanje maksimalne koncentracije u plazmi zavisi od načina aplikacije, vrste jedinice kojoj se medetomidin aplikuje, ali i od doze medetomidina. U prosjeku vrijeme dostizanja maksimalne koncentracije u plazmi varira od 1,5 minuta nakon *i.v.* aplikacije do 60 minuta nakon *s.c.* aplikacije (Kint i sar., 2020).

Medetomidin se prvenstveno metaboliše u jetri, putem hepatične hidrosilacije. Poluvrijeme eliminacije medetomidina takođe veoma varira i zavisi od vrste, pa je tako kod pasa 57 do 76,8 minuta, kod konja  $51,3 \pm 13,09$  minuta, kod goveda 44,4 do 52,7 minuta, a kod ovaca 32,7 do 34,8 minuta (Posner, 2018a). Nažalost, ne postoje detaljne studije o farmakokinetici medetomidina kod gmizavaca (Sladky i Mans, 2012).

### 2.6.1. Uticaj medetomidina na oksidativni stres i oštećenje DNK

Kako se medetomidin skoro nikada ne aplikuje samostalno, veoma je malo dostupne literature o efektu ovog lijeka na oksidativni stres. Međutim, postoji značajan broj studija koje su se bavile ispitivanjem uticaja deksmedetomidina, koji je izomer medetomidina, na oksidativni stres kako u *in vitro*, tako i u *in vivo* uslovima (Li i sar., 2018; Polat i sar., 2011; Wu i sar., 2020).

Kako deksmedetomidin ima veoma sličnu strukturu i isti princip djelovanja kao i medetomidin, a kako je dokazano da su efekti deksmedetomidina na oksidativni stres posredovani aktivacijom  $\alpha$ 2-adrenoreceptora, pretpostavlja se da i medetomidin djeluje slično na oksidativni stres (Gaidin i sar., 2019). Istraživanje koje je ispitivalo uticaj deksmedetomidina, na nastajanje ulcera na želucu pacova je pokazalo da ovaj lijek ima antiulcerativni, dozno zavisani efekat. Smatra se da je za ovaj efekat odgovoran uticaj aktivacije  $\alpha$ 2-receptora na oksidativni stres. Naime, kod pacova kojima je aplikovan deksmedetomidin bili su povećani nivoi antioksidativnih enzima, izuzev katalaze, a sniženi nivoi parametara oksidativnog oštećenja (Polat i sar., 2011). Slični rezultati su dobijeni i kod aplikacije deksmedetomidina nakon akutnog oštećenja mozga. Deksmetomidin je i u ovom slučaju smanjio nivo malondialdehida, a povećao aktivnost superoksid dismutaze i glutation peroksidaze u moždanom tkivu nakon akutnog oštećenja mozga (Li i sar., 2018). Takođe, deksmedetomidin može da ima zaštitno dejstvo kod ishemije/reperfuzije srčanog mišića, stanja kod koga oksidativni stres ima veoma važnu ulogu. U ovom slučaju, deksmedetomidin preko različitih signalnih puteva smanjuje nivo oksidativnog stresa, poboljšava funkciju srčanog mišića nakon ishemije/reperfuzije i sprječava apoptozu ćelija miokarda (Wu i sar., 2020).

## 2.7. Izofluran

Izofluran je inhalacioni anestetik koji se koristi za indukciju i održavanje opšte anestezije i odobren je za upotrebu u Sjedinjenim Američkim Državama od 1979. godine. Kao i većina isparljivih anestetika, izofluran je halogenovano etarsko jedinjenje i strukturni je izomer svog prethodnika, enflurana. Za razliku od enflurana, izofluran nije zapaljiv, ali ima jak, oštar miris koji otežava njegovu upotrebu za inhalacionu indukciju opšte anestezije (Hawkley i sar., 2020).

Uvođenje i održavanje opšte anestezije inhalacionim anesticima postiže se istovremenim delovanjem na različitim djelovima CNS-a (Brosnan i Steffey, 2018). Tako se imobilnost postiže prevashodnim djelovanjem inhalacionih anestetika na nivou kičmene moždine, i to depresijom lokomotornih neuronskih mreža smještenih u ventralnom rogu (Jinks i sar., 2005), a gubitak svesti depresivnim delovanjem na korteks, najvjerojatnije na nivou amigdala i hipokampusa (Alkire i Nathan, 2005; Perouansky i sar., 2010). Analgetička komponenta djelovanja inhalacionih anestetika, pa tako i izoflurana, odnosi se na depresiju kortikalnih funkcija koje sprječavaju životinju da doživi motivaciono-afektivnu dimenziju bola, i dozno je zavisna (Brosnan i Steffey, 2018).

U samom mehanizmu djelovanja inhalacionih anestetika, posebno izoflurana, dominira onaj koji uključuje aktivaciju jonskih kanala u sklopu GABA-ergičke neurotransmisije (GABA<sub>A</sub> receptor) (Jones i sar., 1992).

Druga mjesta djelovanja inhalacionih anestetika odnose se na organske sisteme. Što se tiče srčane funkcije, izofluran ima minimalan uticaj na funkciju leve komore, ali izaziva dozno zavisno smanjenje sistemskog vaskularnog otpora usljed blage beta-adrenergičke stimulacije što dovodi do smanjenog predopterećenja srca i, zauzvrat, smanjenog minutnog volumena, ali povećanje frekvence rada srca ublažava smanjenje srčanog volumena. Pored smanjenja sistemskog vaskularnog otpora, a time i smanjenja arterijskog pritiska, izofluran izaziva i koronarnu dilataciju. Međutim, ova pojava je zanemariva kada se uporedi sa kardioprotektivnim dejstvom izoflurana, koje se ogleda u neposrednom smanjenju oštećenja srca izazvanim ishemijskom/reperfuzijom (Van Allen i sar., 2012) i takozvanom ishemijskom prekondicioniranju, odnosno pojavi kada kratak period ishemije miokarda praćenog reperfuzijom štiti od sledećeg, dugotrajnog perioda ishemije, koji završava infarktom miokarda (Ristić-Anđelkov i sar., 2005).

Na respiratorni sistem izofluran djeluje tako što prouzrokuje značajno smanjenje alveolarne ventilacije sa minimalnim povećanjem brzine disanja, što dovodi do ukupnog smanjenja minutnog volumena disanja. Smanjenje minutnog volumena disanja prouzrokuje povećanje PaCO<sub>2</sub> (Massey i Richerson, 2017), što je u korelaciji sa veličinom primjenjene doze inhalacionog anestetika, kao i vrstom životinje (Brosnan i Steffey, 2018). Inhalacioni anestetici direktnim djelovanjem na glatke mišiće bronhijalnog stabla prouzrokuju bronhodilataciju, koja je kod izoflurana manje izražena u odnosu na halotan (Brosnan i Steffey, 2018).

Promjene u nivou endokrinih hormona u cirkulaciji su zabilježene tokom i nakon anestezije izofluranom kod ljudi oba pola podvrgnutih hirurškoj intervenciji ekstipacije karcinoma laringsa/faringsa. Nivoi adrenalina i noradrenalina su bili povećani, kako

tokom anestezije, tako i nakon njenog završetka. Nivo kortizola je rastao od početka anestezije do 10 časova po njenom završetku, dok je nivo adrenokortikotropnog hormona zabilježio rast samo u toku anestezije. Isto tako, zabilježen je i značajan porast nivoa antidiuretičkog hormona u toku anestezije izofluranom, dok je nivo isulina povećan tek nakon završetka anestezije ovim inhalacionim anestetikom. Istovremeno, koncentracija glukoze se povećavala, a koncentracija glukagona smanjivala tokom anestezije izofluranom (Nishiyama i sar., 2005).

Oštećenje jetre je više puta uočeno nakon anestezije izofluranom kod ljudi, uključujući i jedan slučaj hepatične nekroze koji je rezultirao smrću (Carrigan i Straughen, 1987). Prikazani su klinički, histohemijski i imunohistohemijski dokazi koji ukazuju da je oštećenje jetre izazvano izofluranom povezano sa prisustvom trifluoroacetyl-modifikovanih proteina, što može da ukaže na to da izofluran ima i protein-modulatorne efekte (Njoku i sar., 2002). Ipak, oštećenje jetre izazvano izofluranom je daleko manje izraženo u odnosu na halotan ili hloroform (Plaa, 2000; Kenna and Jones, 1995).

Svi isparljivi inhalacioni anestetici smanjuju bubrežni protok krvi i brzinu glomerularne filtracije na dozno-zavisan način. Smanjeno izlučivanje urina tokom inhalacione anestezije može biti posledica smanjene perfuzije bubrega, ali i naglašene akumulacije ekstracelularne tečnosti izazvane inhalacionim anestheticima. Prolazno povećanje uree, kreatinina i neorganskog fosfata u serumu takođe može da prati inhalacionu anesteziju, posebno ako je produžena. Ipak, opisane promjene funkcije bubrega pod dejstvom isparljivih inhalacionih anestetika su reverzibilne prirode, izuzev kada je u pitanju metoksiflurana (Brosnan i Steffey, 2018).

Minimalno miorelaksantno dejstvo isparljivih inhalacionih anestetika je vjerovatno posljedica kako direktne depresije CNS-a, tako i depresije aktivnosti kalcijumovih kanala u poprečno-prugastim mišićima (Brosnan i Steffey, 2018). Oni takođe poboljšavaju relaksaciju mišića izazvanu nedepolarizujućim miorelaksansima, koji se po potrebi koriste za izvođenje pojedinih dijagnostičkih procedura u opštoj anesteziji (npr. endotrahealna intubacija) ili u premedikaciji nekih hirurških intervencija (Clar i Liu, 2021).

Isparljivi inhalacioni anestetici novije generacije (isofluran, sevofluran, enfluran, desfluran) mogu kod pojedinih vrsta životinja, prije svega svinja i to rase landras, pietren, jorkšir i durok, zatim pasa, konja ali i ljudi da prouzrokuju malignu hipertermiju. Ovo neželjeno dejstvo je u domenu farmakogenetske diskrazije koja uključuje defekt rijanodinskog (ili ponekad dihidropiridinskog) receptora u sarkoplazmatskom retikulumu skeletnih mišića. Ishod opisanog poremećaja je po život opasan, hipermetabolizam skeletnih mišića u prisustvu isparljivih inhalacionih anestetika (Rosenberg i sar., 2015).

Izofluran se metaboliše u jetri posredstvom citohrom P-450 enzimskog sistema do fluoridnog jona i organofluoridnih metabolita. Različite vrste imaju različite puteve metabolizma izoflurana. Na primjer, kod pacova primarni proizvod metabolizma izoflurana je trifluoroacetaldehid, dok je kod ljudi to trifluoracetat. Ova pojava utiče i na izlučivanje izoflurana iz organizma jer različiti metaboliti imaju različite puteve ekskrecije (Pokhrel i Grady, 2021).

### 2.7.1. Uticaj izoflurana na oksidativni stres i oštećenje DNK

Izofluran povećava nivo proapoptotskog proteina Bax i smanjuje nivo antiapoptotskog proteina Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2* – Bcl-2, eng.) u nervnom tkivu miševa i na taj način dovodi do oštećenja mitohondrija i apoptoze (Li i sar., 2014). Uz to, izofluran utiče i na informacionu RNK zaduženu za sintezu ovih proteina kod ispitivanih miševa. Izofluran takođe utiče na regulaciju transporta kalcijuma između mitohondrija i citosola tako što olakšava prelazak kalcijuma u mitohondrije. Povećan nivo kalcijuma u mitohondrijama oštećuje njihovu unutrašnju strukturu i dovodi do pojačane proizvodnje ROS, što dalje intenzivira oštećenje mitohondrija (Zhang i sar., 2010). Međutim, kratkotrajna anestezija izofluranom kod miševa sa ishemijskom/reperfuzijom moždanog tkiva smanjuje nivo ROS u moždanom tkivu i samim tim oksidativno oštećenje neurona. Ovaj efekat izoflurana je ograničen na ranu fazu ishemijske/reperfuzije i prisutan je samo u slučaju da anestezija ne traje duže od 15-30 minuta. Ovaj podatak je važan jer ukazuje da izofluran djeluje na regulaciju oksidativnog stresa na više nivoa i da u nekim slučajevima, ma koliko rjetki i specifični oni bili, izofluran nema štetno već zaštitno dejstvo na ćelije u oksidativnom stresu (Sosunov i sar., 2015).

U istraživanju koje je vršeno na pacovima, dokazano je da izofluran značajno povećava parametre oksidativnog stresa u kardiomiocitima svih pacova. Pored toga, kod pacova sa dijabetesom izofluran smanjuje koncentraciju intracelularnog kalcijuma i dovodi do smanjene kontraktilnosti srca. Ovo može da ima za posledicu tkivnu hipoksiju za vrijeme anestezije izofluranom i posljedično povećan nivo oksidativnog stresa na nivou čitavog organizma (Shen i sar., 2014).

Postoje brojna istraživanja koja pokazuju kako određene supstance atenuiraju oksidativni stres izazvan izofluranom (Cheng i sar., 2015; Li i sar., 2017; Song i sar., 2019). Većina ovih supstanci ima veoma različit mehanizam dejstva na oksidativni stres, neke inhibiraju proizvodnju kaspaze 3, neke moduliraju ekspresiju pojedinih proteina koji učestvuju u oksidativnom stresu, a neke aktivno neutrališu slobodne kiseonikove radikale u ćelijama ili vanćelijskoj tečnosti. Ovo posredno ukazuje da izofluran utiče na regulaciju oksidativnog stresa na svim tim nivoima, iako ne postoje studije koje to eksplicitno dokazuju.

Izofluran povećava nivoe histona  $\gamma$ H2A.X (*Phosphorylated Histone H2AX* –  $\gamma$ H2A.X, eng.), koji je marker oštećenja DNK, aktivacije kaspaze 3 (kaspaza 3 je proizvod oksidativnog oštećenja mitohondrija) i translokacije nukleusa kaspazom aktivirane dezoksiribonukleaze. Uz to, izofluran smanjuje nivoe inhibitora kaspazom aktivirane DNK-aze i tumorskog proteina p53, koji su faktori oštećenja DNK. Ovo ukazuje da izofluran dovodi do oštećenja DNK preko faktora oksidativnog stresa i regulacije ekspresije tumorskog proteina p53 (Ni i sar., 2017).



### 3. CILJ I ZADACI RADA

Ciljevi ovog rada su da se ustanovi uticaj endoskopske dijagnostike u opštoj anesteziji na sistem antioksidativne zaštite organizma i stepen oštećenja DNK kornjača, kao i da se definišu jasne preporuke o upotrebi anestetičkih protokola za izvođenje endoskopske dijagnostike i sličnih dijagnostičkih i hirurških procedura kod crvenouhkih kornjača.

Do postavljenih ciljeva došlo se kroz proces koji je realizovan u sledećim fazama:

1. Anesteziranje kornjača primjenom propofola i izoflurana uz praćenje parametara oksidativnog stresa i stepena oštećenja DNK;
2. Endoskopski pregled kornjača nakon anesteziranja primjenom propofola i izoflurana uz praćenje parametara oksidativnog stresa i stepena oštećenja DNK;
3. Anesteziranje kornjača primjenom ketamina i medetomidina uz praćenje parametara oksidativnog stresa i stepena oštećenja DNK;
4. Endoskopski pregled kornjača nakon anesteziranja primjenom ketamina i medetomidina uz praćenje parametara oksidativnog stresa i stepena oštećenja DNK;
5. Anesteziranje kornjača primjenom ketamina, medetomidina i izoflurana uz praćenje parametara oksidativnog stresa i stepena oštećenja DNK;
6. Endoskopski pregled kornjača nakon anesteziranja primjenom ketamina, medetomidina i izoflurana uz praćenje parametara oksidativnog stresa i stepena oštećenja DNK.

## 4. MATERIJAL I METODE

### 4.1. Materijal

Eksperiment je izveden u periodu septembar 2017. godine – mart 2020. godine. U istraživanje je uključeno 36 odraslih, zdravih crvenouhkih kornjača iz Beo zoo vrta. Konačna eksperimentalna grupa se sastojala od 24 ženke i 12 mužjaka. Prilikom odabira životinja vođeno je računa o tome da budu približno jednake starosti, tjelesne mase (1,2 do 2,0 kg) i kondicije.

Za vrijeme istraživanja, kao i u periodu aklimatizacije, jedinke su bile smještene u bolničkom bloku Nastavne bolnice za male životinje Katedre za bolesti kopitara, mesojeda, živine i divljači Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Period aklimatizacije trajao je 14 dana i za to vrijeme jedinke su držane u kontrolisanim uslovima sa temperaturom vazduha između 21 °C i 25 °C i temperaturom vode od 22 °C. Relativna vlažnost vazduha je iznosila između 75 % i 85 %. Sve jedinke su u periodu aklimatizacije držane zajedno u prostoriji površine 25 m<sup>2</sup> uz dostupne posude sa vodom dužine 150 cm i širine 50 cm. Za vrijeme boravka u Nastavnoj bolnici za male životinje sve kornjače su imale ujednačenu ishranu koja se sastojala iz odgovarajuće količine hrane za kornjače (Reptilix, Versele laga, Belgium). Kornjače su imale jedan obrok u toku dana, kada su hranjene pojedinačno da bi bilo sigurno da svaka jedinka dobija kvalitativno i kvantitativno odgovarajući obrok.

Krv je uzorkovana iz subkarapacijalnog pleksusa (*Plexus subcarapacialis*), plasiranjem igle u predio između vrata i karapaksa pod uglom od 20 stepeni do dubine paralelne sa prvom skutom na karapaksu. Uzorkovanje je vršeno iglom od 21 G postavljenom na heparinizovan špric. Krv je uzorkovana dva puta, oba puta je uzorkovano po 2 ml krvi. Prvo uzorkovanje je bilo jedan dan prije anestezije. Drugo uzorkovanje je bilo 3 sata nakon aplikacije opštih anestetika. Iz svakog uzorka je izdvojeno 100 µl pune krvi, ostatak uzorka je centrifugovan na 1500 g tokom 15 minuta. Iz centrifugovanog uzorka je potom izdvojena plazma. Nakon presipanja uzoraka u epruvete i pojedinačnog obilježavanja, svi uzorci su skladišteni na -20 °C do trenutka izvođenja laboratorijskih analiza.

Klinički dio istraživanja je izveden u Nastavnoj bolnici za male životinje Katedre za bolesti kopitara, mesojeda, živine i divljači Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Laboratorijski dio istraživanja je izveden u Laboratoriji za genetiku životinja, na Katedri za biologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.

### 4.2. Metode

#### 4.2.1. Grupe, anestetički protokoli i tretmani kornjača

Jedinke su podjeljene u 6 grupa, u skladu sa primjenjenim anestetičkim protokolom i vrstom pregleda:

- Prva grupa (grupa PI) je anestezirana propofolom (Diprivan® 10 %, Astrazeneca UK Limited, United Kingdom) u dozi od 10 mg/kg t.m. aplikovanim u subkarapacijalni pleksus kao indukcija, nakon čega su jedinke intubirane i anestezija je održavana upotrebom izoflurana (Isoflurane®, CP-Pharma, Austria) u koncentraciji od 3 % aplikovanog preko trahealnog tubusa. Po završenom opštem pregledu kornjače iz ove grupe su se budile spontano.
- Druga grupa (grupa PIE) je anestezirana propofolom (Diprivan® 10 %, Astrazeneca UK Limited, United Kingdom) u dozi od 10 mg/kg t.m. aplikovanim u subkarapacijalni pleksus kao indukcija, nakon čega su jedinke intubirane i anestezija je održavana upotrebom izoflurana (Isoflurane®, CP-Pharma, Austria) u koncentraciji od 3 % aplikovanog preko trahealnog tubusa. Po ulasku u anesteziju kornjače su podvrgnute endoskopskom pregledu celomske duplje u trajanju od 15 minuta. Kornjače iz ove grupe su se budile spontano.
- Treća grupa (grupa KM) je anestezirana kombinacijom ketamina (Ketamidor® 10 % Richter Pharma, Austria) u dozi od 20 mg/kg t.m. i medetomidina (Domitor®, Orion Pharma, Finland) u dozi od 0,2 mg/kg t.m. aplikovanih u subkarapacijalni pleksus radi opšteg pregleda. Nakon pregleda izlazak iz anestezije je ubrzan primjenom atipamezola (Antisedan®, Orion Pharma, Finland), u dozi od 0,2 mg/kg t.m., aplikovanog intramuskularno.
- Četvrta grupa (grupa KME) je anestezirana kombinacijom ketamina (Ketamidor® 10 % Richter Pharma, Austria) u dozi od 20 mg/kg t.m. i medetomidina (Domitor®, Orion Pharma, Finland) u dozi od 0,2 mg/kg t.m. aplikovanih u subkarapacijalni pleksus i po ulasku u anesteziju kornjače su podvrgnute endoskopskom pregledu celomske duplje u trajanju od 15 minuta. Nakon pregleda, izlazak iz anestezije je ubrzan primjenom atipamezola (Antisedan®, Orion Pharma, Finland), 0,2 mg/kg t.m., aplikovanog intramuskularno.
- Peta grupa (grupa KMI) je anestezirana kombinacijom ketamina (Ketamidor® 10 % Richter Pharma, Austria) u dozi od 10 mg/kg t.m. i medetomidina (Domitor®, Orion Pharma, Finland) u dozi od 0,1 mg/kg t.m. aplikovanih u subkarapacijalni pleksus kao indukcija, nakon čega su jedinke intubirane i anestezija je održavana upotrebom izoflurana (Isoflurane®, CP-Pharma, Austria) u koncentraciji od 3 % aplikovanog preko trahealnog tubusa. Nakon pregleda, izlazak iz anestezije je ubrzan primjenom atipamezola (Antisedan®, Orion Pharma, Finland) u dozi od 0,2 mg/kg t.m., aplikovanog intramuskularno.
- Šesta grupa (grupa KMIE) je anestezirana kombinacijom ketamina (Ketamidor® 10 % Richter Pharma, Austria) u dozi od 10 mg/kg t.m. i medetomidina (Domitor®, Orion Pharma, Finland) u dozi od 0,1 mg/kg t.m. aplikovanih u subkarapacijalni pleksus kao indukcija, nakon čega su jedinke intubirane i anestezija je održavana upotrebom izoflurana (Isoflurane®, CP-Pharma, Austria) u koncentraciji od 3 % aplikovanog preko trahealnog tubusa. Po ulasku u anesteziju kornjače su podvrgnute endoskopskom pregledu celomske duplje u trajanju od 15 minuta. Nakon pregleda, izlazak iz anestezije je ubrzan primjenom atipamezola (Antisedan®, Orion Pharma, Finland) u dozi od 0,2 mg/kg t.m., aplikovanog intramuskularno.

## Šema 1. Dizajn ogleda

VRIJEME (h)	-24h	0h		3h
grupa				
I (PI)	↑ Uzorkovanje krvi	↑ Propofol 10 mg/kg, <i>i.v.</i> + Izofluran 3 % ,inh.	↑ Opšti pregled (15 min)	↑ Uzorkovanje krvi
II (PIE)	↑ Uzorkovanje krvi	↑ Propofol 10 mg/kg, <i>i.v.</i> + Izofluran 3 % ,inh.	↑ Endoskopija (15 min)	↑ Uzorkovanje krvi
III (KM)	↑ Uzorkovanje krvi	↑ Ketamin 20 mg/kg, <i>i.v.</i> + Medetomidin 0,2 mg/kg, <i>i.v.</i>	↑ Opšti pregled (15 min)	↑ Uzorkovanje krvi
			↑ Atipamezol 0,2 mg/kg	
IV (KME)	↑ Uzorkovanje krvi	↑ Ketamin 20 mg/kg, <i>i.v.</i> + Medetomidin 0,2 mg/kg, <i>i.v.</i>	↑ Endoskopija (15 min)	↑ Uzorkovanje krvi
			↑ Atipamezol 0,2 mg/kg	
V (KMI)	↑ Uzorkovanje krvi	↑ Ketamin 10 mg/kg, <i>i.v.</i> + Medetomidin 0,1 mg/kg, <i>i.v.</i> + Izofluran 3 % ,inh.	↑ Opšti pregled (15 min)	↑ Uzorkovanje krvi
			↑ Atipamezol 0,2 mg/kg	
VI (KMIE)	↑ Uzorkovanje krvi	↑ Ketamin 10 mg/kg, <i>i.v.</i> + Medetomidin 0,1 mg/kg, <i>i.v.</i> + Izofluran 3 % ,inh.	↑ Endoskopija (15 min)	↑ Uzorkovanje krvi
			↑ Atipamezol 0,2 mg/kg	

Svi injekcioni anestetici su aplikovani intravenski u subkarapacijalni pleksus na isti način na koji je vršeno uzorkovanje krvi. Atipamezol je aplikovan intramuskularno u mišić prednje noge iz razloga što kornjače posjeduju renalni portalni krvotok koji omogućava da sva krv koja se vraća iz zadnjih ekstremiteta prođe kroz bubrege prije nego što uđe u cirkulaciju, što značajno smanjuje efikasnost lijekova aplikovanih u mišić zadnjeg ekstremiteta.

Za sprovođenje inhalacione anestezije kornjače su intubirane nakon što su uvedene u sedaciju. Za intubiranje je korišćen modifikovani urinarni Nelaton katere za pse (Nelaton Catheter, Hitecare, China) 400 mm x 2,1 mm koji je skraćen na dužinu od 150 mm da bi se olakšala intubacija. Intubacija se izvodila u 5 koraka (Slika 1).

1. Asistent 1 postavlja jedinku u sternalni položaj i fiksira glavu.
2. Asistent 2 instrumentom otvara kljun.
3. Operator vrši blagi pritisak na donju stranu vrata u predjelu ždrijela da bi podigao i vizuelizovao larinks.
4. Lateralnim pokretima tubusa se razdvajaju hrskavice glotisa i tubus se postavlja u traheju do dužine 2/3 traheje.
5. Tubus se osigurava poveskama i meki materijal se stavlja između kljuna i tubusa da bi se spriječilo da se tubus ošteti.



Slika 1: Intubiranje kornjače

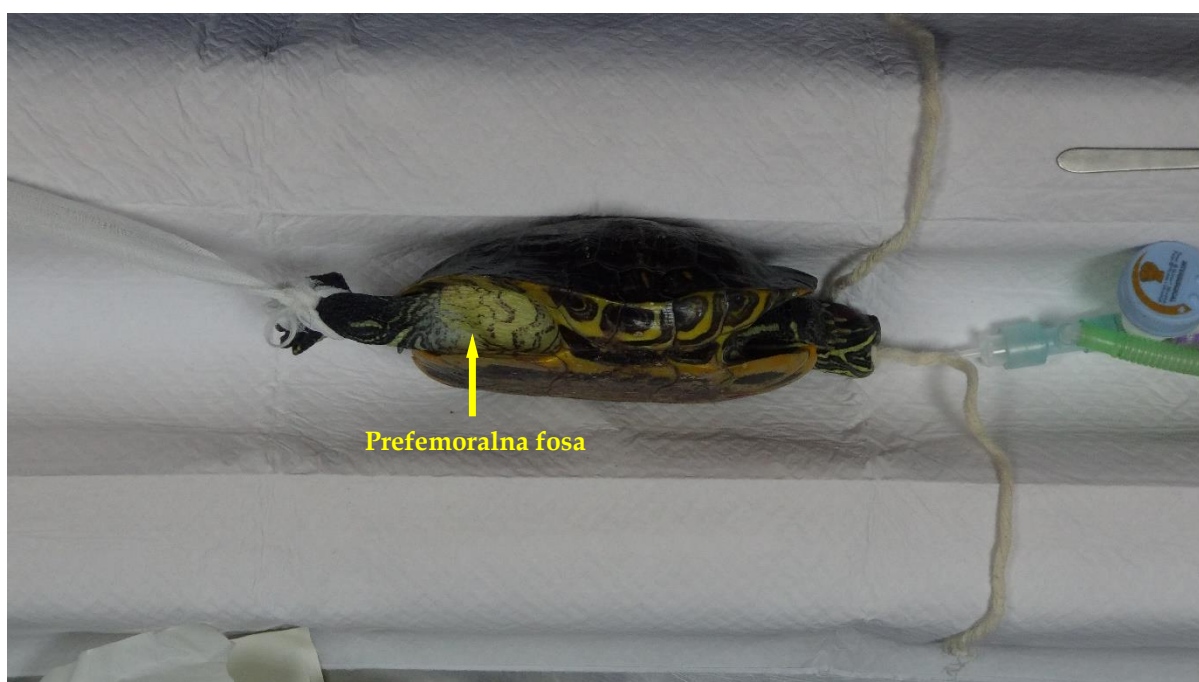
Nakon intubiranja, jedinke su spojene na aparat za inhalacionu anesteziju.

Poslije drugog uzorkovanja krvi svim jedinkama su intramuskularno, u mišiće prednjih nogu aplikovani antibiotik (enrofloksacin, 10 mg/kg t.m.; Baytril®, Bayer Animal Health, Germany) i analgetik (meloksikam, 0,5 mg/kg t.m.; Movalis®, Boehringer Ingelheim, Germany).

#### 4.2.2. Endoskopija

Prije započinjanja procedure endoskopske dijagnostike utvrđeno je da li je dubina anestezije zadovoljavajuća. Ovo je obavljeno ispitivanjem refleksa ispravljanja, refleksa povlačenja ekstremiteta i prisustva, odnosno odsustva, reakcije na inciziju kože. Nakon što je ustanovljeno da su jedinke u odgovarajućem stepenu anestezije, pristupljeno je pripremanju jedinki za endoskopiju.

Kornjače su postavljene u lateralni položaj i fiksirane jastučićima i poveskama. Zadnji ekstremitet sa gornje strane je izvučen i fiksiran poveskom da bi se omogućio pristup prefemoralnoj fosi. Prefemorlana fosa i okolni oklop su prvo očišćeni etil-alkoholom, a potom i dezinfikovani hlorheksidinom.



Slika 2: Kornjača postavljena u položaj za endoskopiju

Na sredini prefemoralne fose je napravljen longitudinalni rez na koži dužine oko 30 mm pomoću hirurškog skalpela (Romed scalpel blades, sterile, no. 15, Romed, Holland). Potkožno vezivno i masno tkivo je potom tupo preparisano pomoću hemostatskog forcepsa (Surgical hemostatic forceps 031113, Medgyn Products USA, Illinois). Disekcija je nastavljena do nivoa celomske aponeuroze, koju formiraju široki ligamenti transverzalnih i kosih trbušnih mišića. Potom je na celomskoj aponeurozi napravljen otvor prečnika 8 - 10 mm pomoću hemostatskog forcepsa. Po pristupanju celomskoj duplji, obavljena je petnaestominutna dijagnostička endoskopija. Endoskopija je obavljena pomoću otoskopa za male životinje dijametra 5 mm, dužine 85 mm sa radnim kanalom dijametra 5 Fr (67260OSA, Karl Storz Veterinary Endoscopy America Inc, California), spojenim na ksenonski izvor svjetla (201326-20, Karl Storz Veterinary Endoscopy America Inc, California). Digitalni zapis procedure je dobijen korišćenjem Karl Storz veterinarske video kamere (692360-20 Karl Storz Veterinary Endoscopy America Inc, California).

Po završetku endoskopskog pregleda celomska aponeuroza je zatvorena prostim tekućim šavom korišćenjem resorptivnog konca debljine 2.0 (Suture Polysorb UD GS-21 2-0 30" 36/BX®, Covidien Ltd, Ireland). Koža je zatvorena pojedinačnim šavovima korišćenjem neresorptivnog konca debljine 2.0 (Covidien Surgipro-II Suture CP-411®, Covidien Ltd, Ireland).

### 4.2.3. Određivanje parametara oksidativnog stresa

#### 4.2.3.1. Određivanje aktivnosti katalaze

Aktivnost katalaze je određena stepenom dekompozicije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na 240 nm po metodi koju je opisao Aebi 1984. godine. Aktivnost CAT se prati kao pad apsorbance na datoj talasnoj dužini.

Reagensi:

- 1 M Tris pH 8,0
- 10 mM rastvor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %)

Laboratorijski postupak:

- 1- U epruvetu se sipa 1 ml 1 M Trisa (pH 8) i dodaje 10 ml dH<sub>2</sub>O.
- 2- 1,3 ml razblaženog Trisa se uzima i prenosi u drugu epruvetu.
- 3- Zatim se dodaje 50 µl hemolizata.
- 4- Smješa se projmeša u vorteksu i prebacuje u kivetu.
- 5- Kiveta se postavlja u spektrofotometar i očitavaju se rezultati.

Aktivnost katalaze je izračunata prema formuli:

$$\text{Specifična aktivnost } \left( \frac{\text{U}}{\text{mg}} \text{ prot.} \right) = \frac{(\Delta A_{\text{uz}} - \Delta A_{\text{asp}}) \times 1000}{43.6 \times \text{Cpr} \times \text{Vuz}/\text{Vrs}}$$

Gdje je:

$\Delta A_{\text{uz}}$  - promjena apsorbance u minuti za uzorak

$\Delta A_{\text{asp}}$  - promjena apsorbance u minuti za slepu probu

Cpr - koncentracija proteina mg/ml

Vuz - zapremina uzorka

Vrs - zapremina reakcione smješe

43.6 - molarni ekstincioni koeficijent za vodonik peroksid na 240 nm

Aktivnost enzima je definisana kao 1 mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> razložen u 1 minutu<sup>-1</sup>. Aktivnost katalaze je izražena u U/ml.

#### 4.2.3.2. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze

Aktivnost superoksid dismutaze je procjenjena na osnovu njene sposobnosti da inhibira autoksidaciju epinefrina u adrenohrom, po metodi koju su razvili Misra i Fridovich 1972. godine.

Reagensi:

- 0,05 mmol/l karbonatni pufer pH 10,2
- 20 mmol/l 37 % HCl
- 10 mmol/l adrenalin hidrohlorida rastvoren u HCl

Laboratorijski postupak:

- 1- U epruvetu se sipa 1,6 ml karbonatnog pufera, 0,2 ml uzorka i 0,2 ml adrenalina.
- 2- Sadržaj epruvete se promješa na vorteksu.
- 3- Epruveta se inkubira u vodenom kupatilu 30 °C/3 minuta.
- 4- Nakon inkubacije, sadržaj epruvete se prebacuje u kivetu.
- 5- Kiveta se prebacuje u spektrofotometar i očitava se reakcija.

Reakcija je očitavana na 480 nm tokom 3 minuta. Jedinica superoksid dismutaze je definisana kao količina enzima potrebna da inhibiše stopu autoksidacije epinefrina za 50 % na 30 °C, a rezultati su izraženi u U/ml.

#### 4.2.3.3. Određivanje aktivnosti glutathion S transferaze

Aktivnost glutathion S transferaze je određena korišćenjem 1-hloro-2,4- dinitrobenzena, kao substrat u prisustvu redukovano glutathiona po metodi koju su opisali Habig i saradnici 1974. godine.

Reagensi:

- 0.5M fosfatni pufer pH 6.5
- 0,0304 g CDNB
- 20 mM GSH

Laboratorijski postupak:

- 1- U epruvetu se sipa reakciona smješa koja se sastoji od 1 ml destilovane vode, 300 µl fosfatnog pufera, 150 µl glutathiona i 50 µl 1-hloro-2,4-dinitrobenzena.
- 2- U epruvetu se dodaje 25 µl uzorka.
- 3- Sadržaj epruvete se promješa na vorteksu.
- 4- Sadržaj epruvete se prebacuje u kvarcnu kivetu.
- 5- Kiveta se prebacuje u spektrofotometar i očitava se reakcija.

Promjena u apsorbananci je mjerena na 340 nm u toku 3 minuta na 25 °C. Rezultati su izraženi u U/ml.



#### 4.2.3.4. Određivanje nivoa malondialdehida (MDA)

Nivo MDA u plazmi određen je mjerenjem stvaranja supstanci koje reaguju na tiobarbiturnu kiselinu po metodi koju su opisali Girotti i saradnici 1991. godine.

Reagensi:

- TBA reagens (*Thiobarbituric Acid* – TBA, eng.)

Laboratorijski postupak:

- 1- U epruvetu se sipa 300 µl uzorka i 600 ml TBA regensa.
- 2- Sadržaj epruvete se promješa na vorteksu.
- 3- Epruveta se prebacuje u termošejker i inkubira 15 minuta na 99 °C.
- 4- Epruveta se prebacuje u kadnicu sa ledom o istavlja da stoji 5 minuta.
- 5- Epruveta se prebacuje u centrifugu sa hlađenjem i centrifuguje 10 minuta na 1000 G i 4 °C.
- 6- Sadržaj epruvete se prebacuje u kvarcnu kivetu.
- 7- Kiveta se prebacuje u spektrofotometar i očitava se reakcija.

Apsorbancija obojenog kompleksa je mjerena spektrofotometrijom na talasnoj dužini od 535 nm i izražena u nmol/ml. Sve korišćene metode su spektrofotometrijske i izvedene su na Biobase spektrofotometru (Biobase BK-7390 UV-VIS spectrophotometer Agilent Technologies, USA).

#### 4.2.4. Određivanje oštećenja DNK primjenom komet testa

U cilju određivanja oštećenja DNK izveden je alkalni komet test sa blagim modifikacijama (Tice i sar., 2000). Krv je razrijeđena u fosfatnom puferu (*Phosphate-buffered Saline* – PBS, eng.) (1:100), ubačena u agarozu (0,5 % agaroz sa niskom tačkom topljenja) i postavljena na prethodno premazane pločice 1 % agarozom. Pločice su potom potopljene u hladni *lysis* rastvor (2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, 1 % Triton X-100, 10 % DMSO, na pH 10) preko noći na 4 °C. Nakon toga, pločice su postavljene u horizontalnu gel-elektroforetsku komoru i potopljene u svježe napravljeni hladni elektroforetski pufer (pH > 13) na 20 minuta, da bi se omogućilo odmotavanje DNK lanaca. Potom su pločice prebačene u elektroforezu 20 minuta na 25 V i 300 mA.

Po završetku elektroforeze pločice su neutralisane Tris-HCl puferom (pH 7,5) 15 minuta. Na kraju procesa pločice su obojene etidijum bromidom i posmatrane pod fluorescentnim mikroskopom (AxioImager Z1, excitation filter, 515–560 nm; emission filter, 590 nm, Carl Zeiss, Germany). Procjena kometa je izvršena vizuelno i rezultati su svrstani u 5 kategorija prema količini DNK u repu komete (Anderson i sar., 1994). Rezultati komet testa su računati množenjem broja oštećenjih ćelija po uzorku sa vrijednosti odgovarajuće kategorije (0 – 4) i izraženi u totalnom komet skor (Total Comet Score – TCS, eng.). TCS je izračunat prema formuli:

$$\text{TCS} = 0 \times A + 1 \times B + 2 \times C + 3 \times D + 4 \times E$$

gdje su ćelije podjeljene prema procentu oštećenja:

- (A) Bez oštećenja, <5 %;
- (B) Nizak stepen oštećenja, 5–20 %;
- (C) Srednji stepen oštećenja, 20–40 %;
- (D) Visoki stepen oštećenja, 40–95 %;
- (E) Potpuno oštećenje, > 95 % („*hedgehogs comets*“).

Prije izvođenja komet testa urađeno je ručno brojanje ćelija i procjena vijabilnosti ćelija *Trypan blue* ekskluzionim testom.

#### 4.2.5. Statistička analiza

U zavisnosti od vrijednosti koeficijenta varijacije (*cv*), podaci za rezultate komet testa su bili homogeni ( $cv < 30\%$ ), dok su rezultati za parametre oksidativnog stresa bili heterogeni ( $cv > 30\%$ ) i bilo je potrebno da se obrade na odgovarajući način prije početka statističke analize (LOG10+1). Podaci su prvo poređeni dvosmjernim ANOVA testom. Nakon toga, pojedinačne grupe su poređene *Tukey* testom. Rezultati su predstavljeni kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija. Značajnost je procjenjivana na dva nivoa ( $P < 0,05$  i  $P < 0,01$ ). Statistička analiza je obavljena pomoću GraphPad Prism 6 softvera (GraphPad, San Diego, CA, USA).

## 5. REZULTATI

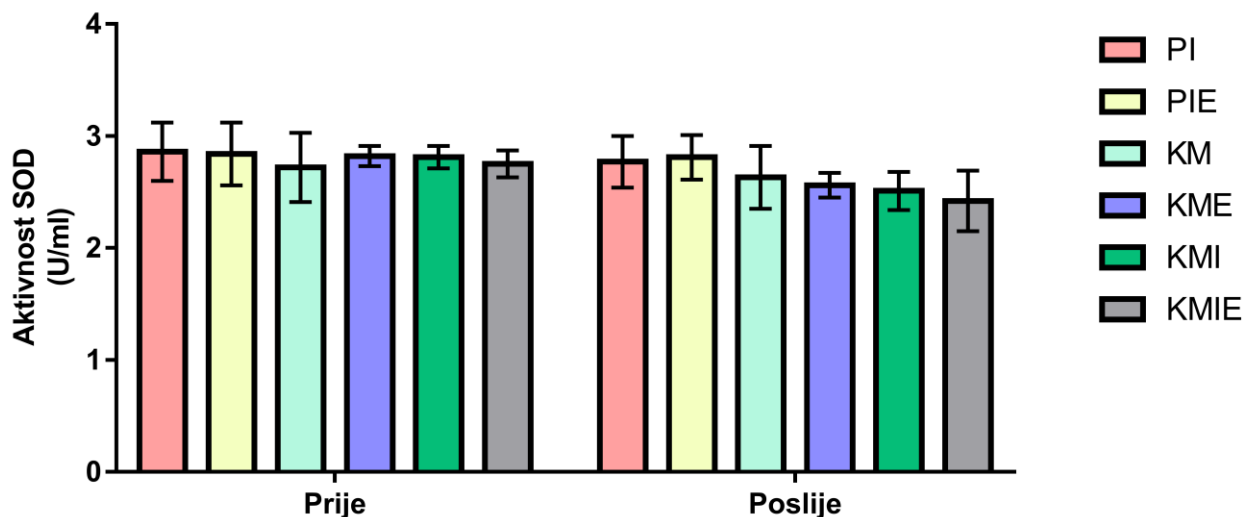
Upotrebom svih ispitivanih anestetičkih protokola bilo je moguće uvesti ispitivane jedinice u opštu anesteziju. Sve jedinice su bile anestezirane po 30 minuta. Nakon aplikacije atipamezola jedinkama u čijem anestetičkom protokolu je bio priustan medetomidin, sve jedinice su izlazile iz opšte anestezije u narednih 2 - 10 minuta, bez bilo kakvih komplikacija. Petnaestominutni endoskopski pregled celoma je bio dovoljan da se vizuelizuju dostupni unutrašnji organi kornjača, kao i da se uradi klinička procjena zdravstvenog stanja kornjača.

### 5.1 Parametri oksidativnog stresa

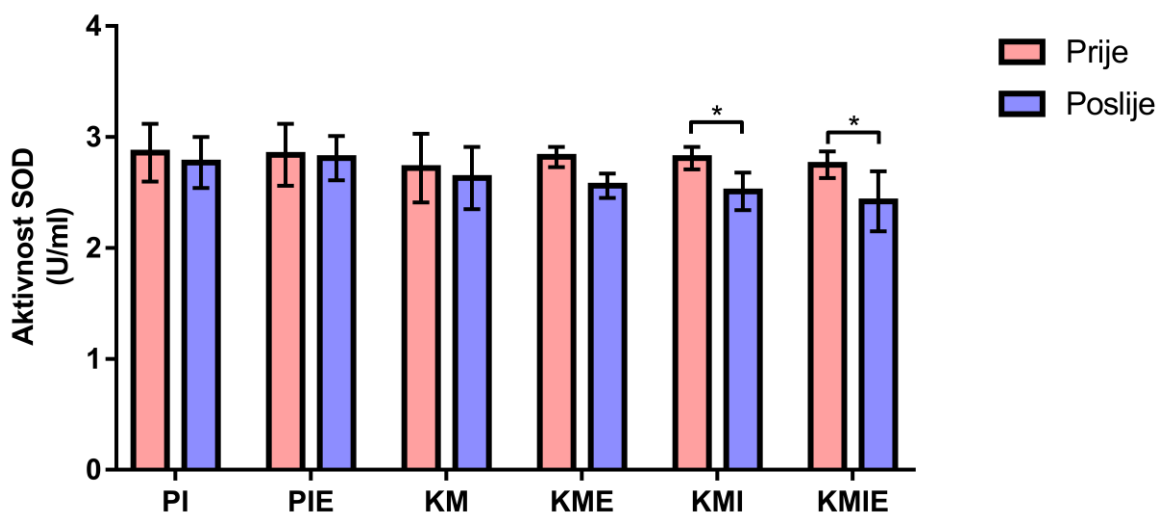
Posmatrani su rezultati svih grupa kornjača prije i poslije anestezije, odnosno endoskopskog pregleda, kao i podaci za svaku grupu kornjača prije i poslije anestezije, odnosno endoskopskog pregleda.

Analizom dobijenih podataka nije ustanovljena statistički značajna razlika u aktivnosti superoksid dismutaze među različitim grupama ispitivanih kornjača prije anestezije, odnosno endoskopskog pregleda. Statistički značajne razlike između grupa nije bilo ni nakon anestezije, odnosno endoskopskog pregleda (Grafikon 1).

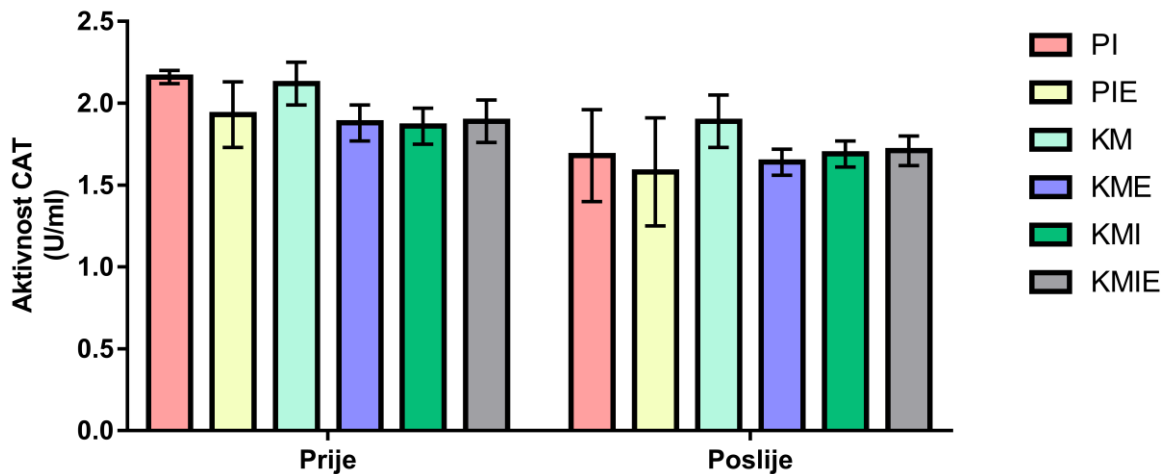
Analizom rezultata aktivnosti SOD unutar jedne grupe kornjača prije i poslije anestezije, odnosno endoskopskog pregleda, nije ustanovljena statistički bitna razlika u aktivnosti superoksid dismutaze prije i poslije anestezije kod kornjača anesteziranih kombinacijom propofola i izoflurana, odnosno ketamina i medetomidina ( $P > 0,05$ ). Značajnih promjena nije bilo ni kod kornjača anesteziranih kombinacijom propofola i izoflurana, odnosno ketamina i medetomidina kod kojih je izvršena endoskopija ( $P > 0,05$ ). Značajan pad u aktivnosti superoksid dismutaze je zabilježen kod kornjača anesteziranih kombinacijom ketamina, medetomidina i izoflurana, kao i kod kornjača kod kojih je nakon uvođenja u anesteziju ovim anestetičkim protokolom izvršen endoskopski pregled ( $P < 0,05$ ) (Grafikon 2).



Grafikon 1: Aktivnost superoksid dismutaze (U/ml) prije i poslije anestezije i opšteg kliničkog, odnosno endoskopskog pregleda izražena kao SE±SD.

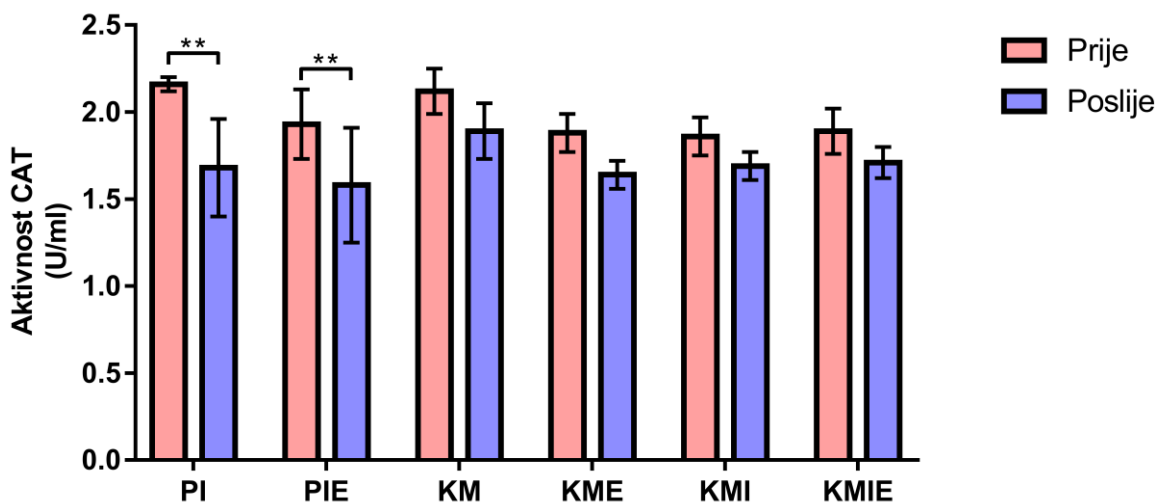


Grafikon 2: Aktivnost superoksid dismutaze (U/ml) po grupama prije i poslije anestezije i opšteg kliničkog, odnosno endoskopskog pregleda, izražena kao SE±SD. \* ( $P < 0,05$ ) u odnosu na anesteziju (dvosmjerna ANOVA i Tukey test).



Grafikon 3: Aktivnost katalaze (U/ml) prije i poslije anestezije i opšteg kliničkog, odnosno endoskopskog pregleda izražena kao SE±SD.

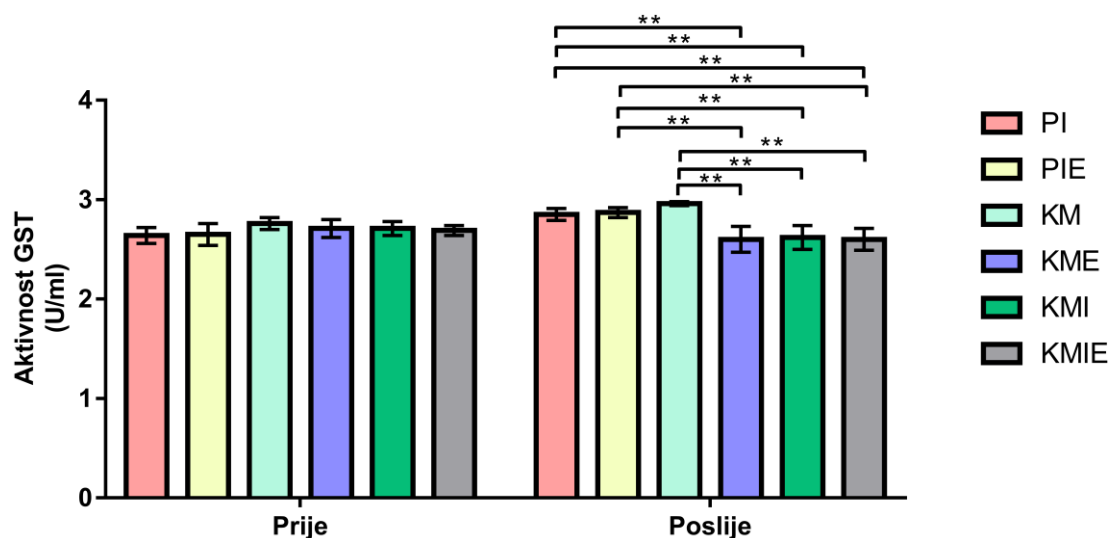
Analizom dobijenih podataka nije ustanovljena statistički značajna razlika u aktivnosti katalaze među različitim grupama ispitivanih kornjača prije anestezije, odnosno endoskopskog pregleda. Statistički značajne razlike između grupa nije bilo ni nakon anestezije, odnosno endoskopskog pregleda (Grafikon 3).



Grafikon 4: Aktivnost katalaze (U/ml) po grupama prije i poslije anestezije i opšteg kliničkog, odnosno endoskopskog pregleda izražena kao SE±SD. \*\* ( $P < 0,01$ ) u odnosu na anesteziju (dvosmjerna ANOVA i Tukey test).

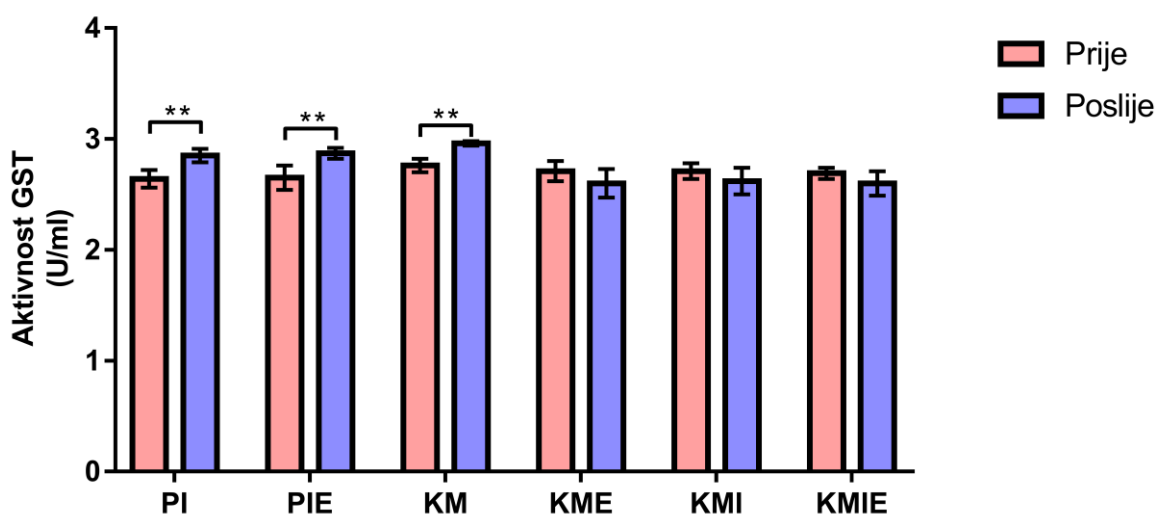
Analizom rezultata aktivnosti CAT unutar jedne grupe kornjača prije i poslije anestezije, odnosno endoskopskog pregleda, nije ustanovljena statistički bitna razlika u aktivnosti CAT prije i poslije anestezije kod kornjača anesteziranih kombinacijom ketamina i medetomidina, odnosno ketamina, medetomidina i izoflurana ( $P > 0,05$ ). Značajnih promjena nije bilo ni kod kornjača anesteziranih kombinacijom ketamina i medetomidina, odnosno ketamina, medetomidina i izoflurana kod kojih je izvršena endoskopija ( $P > 0,05$ ). Statistički veoma značajan pad u aktivnosti katalaze je zabilježen kod kornjača anesteziranih kombinacijom propofola i izoflurana, kao i kod kornjača kod kojih je nakon uvođenja u anesteziju ovim anestetičkim protokolom izvršen endoskopski pregled ( $P < 0,01$ ) (Grafikon 4).

Analizom dobijenih podataka nije ustanovljena statistički značajna razlika u aktivnosti glutacion S transferaze među različitim grupama ispitivanih kornjača prije anestezije, odnosno endoskopskog pregleda. Statistički veoma značajne razlike nakon anestezije, odnosno endoskopskog pregleda postoje između grupe kornjača koje su anestezirane kombinacijom propofola i izoflurana te između grupe kornjača koje su anestezirane kombinacijom propofola i izoflurana, a potom podvrgnute endoskopskom pregledu u poređenju sa kornjačama koje su anestezirane kombinacijom ketamina, medetomidina i izoflurana, i grupama kod kojih je nakon anestezije kombinacijom ketamina i medetomidina, odnosno ketamina, medetomidina i izoflurana, izvršen endoskopski pregled ( $P < 0,01$ ). Statistički veoma značajne razlike nakon anestezije, odnosno endoskopskog pregleda postoje i između grupe kornjača koje su anestezirane kombinacijom ketamina i medetomidina u poređenju sa kornjačama koje su anestezirane kombinacijom ketamina, medetomidina i izoflurana, i grupama kod kojih je nakon anestezije kombinacijom ketamina i medetomidina, odnosno ketamina, medetomidina i izoflurana izvršen endoskopski pregled ( $P < 0,01$ ). U svim opisanim poređenjima zabeležen je pad aktivnosti glutacion S transferaze (Grafikon 5).



Grafikon 5: Aktivnost glutacion S transferaze (U/ml) prije i poslije anestezije i opšteg kliničkog, odnosno endoskopskog pregleda izražena kao SE±SD. \*\* ( $P < 0,01$ ) između testiranih grupa sa različitim anestetičkim protokolima i dijagnostičkim procedurama (dvosmjerna ANOVA i Tukey test).

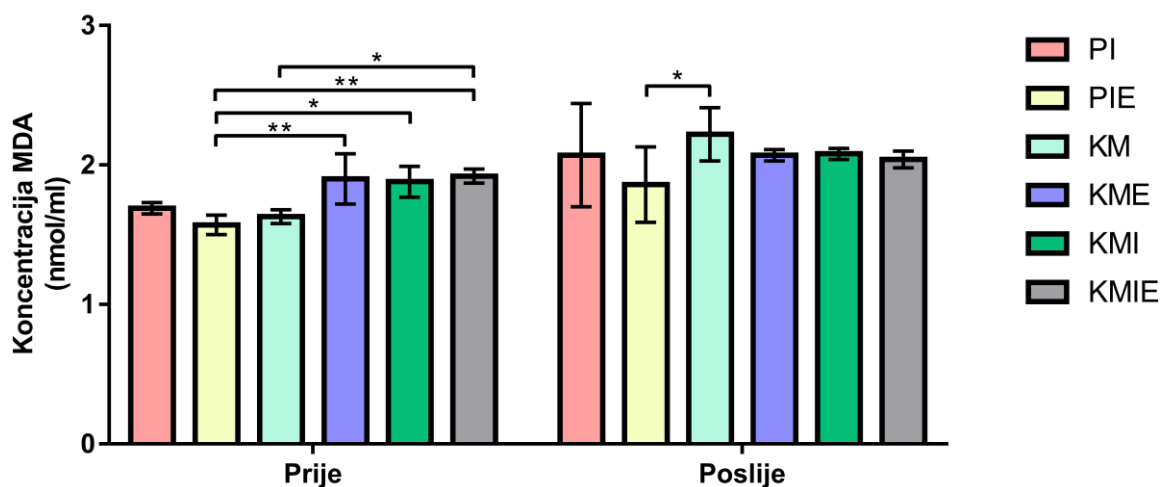
Analizom rezultata aktivnosti GST unutar jedne grupe kornjača prije i poslije anestezije, odnosno endoskopskog pregleda, nije ustanovljena statistički bitna razlika u aktivnosti GST prije i poslije anestezije kod kornjača anesteziranih kombinacijom ketamina, medetomidina i izoflurana ( $P > 0,05$ ). Značajnih promjena nije bilo ni kod kornjača anesteziranih kombinacijom ketamina i medetomidina, odnosno ketamina, medetomidina i izoflurana kod kojih je izvršena endoskopija ( $P > 0,05$ ). Statistički veoma značajan porast u aktivnosti glutacion S transferaze je zabilježen kod kornjača anesteziranih kombinacijom propofola i izoflurana, kao i kod kornjača kod kojih je nakon uvođenja u anesteziju ovim anestezičkim protokolom izvršen endoskopski pregled ( $P < 0,01$ ). Statistički veoma značajan pad u aktivnosti GST nakon anestezije je zabilježen i kod kornjača koje su anestezirane kombinacijom ketamina i medetomidina (Grafikon 6).



Grafikon 6: Aktivnost glutacion S transferaze (U/ml) po grupama prije i poslije anestezije i opšteg kliničkog, odnosno endoskopskog pregleda izražena kao SE±SD. \*\* ( $P < 0,01$ ) u odnosu na anesteziju (dvosmjerna ANOVA i Tukey test).

Analizom dobijenih podataka ustanovljena je statistički veoma značajna razlika u koncentraciji MDA prije anestezije odnosno endoskopskog pregleda između grupe kornjača koje su anestezirane kombinacijom propofola i izoflurana a potom podvrgnute endoskopskom pregledu i grupa koje su anestezirane kombinacijom ketamina i medetomidina, te ketamina, medetomidina i izoflurana a potom podvrgnute endoskopskom pregledu ( $P < 0,01$ ). Statistički značajna razlika u koncentraciji MDA prije anestezije odnosno endoskopskog pregleda je ustanovljena i između grupe kornjača koje su anestezirane kombinacijom propofola i izoflurana, a potom podvrgnute endoskopskom pregledu i kornjača koje su anestezirane kombinacijom ketamina, medetomidina i izoflurana ( $P < 0,05$ ). Statistički značajna razlika u koncentraciji MDA prije anestezije odnosno endoskopskog pregleda je takođe ustanovljena između grupe kornjača koje su anestezirane kombinacijom ketamina i medetomidina i kornjača koje su anestezirane kombinacijom ketamina, medetomidina i izoflurana, a potom podvrgnute endoskopskom pregledu ( $P < 0,05$ ). U svim opisanim poređenjima zabeležen je rast koncentracije MDA. Nakon anestezije odnosno endoskopskog pregleda ustanovljena je statistički značajna razlika u koncentraciji MDA između grupe kornjača koje su anestezirane kombinacijom

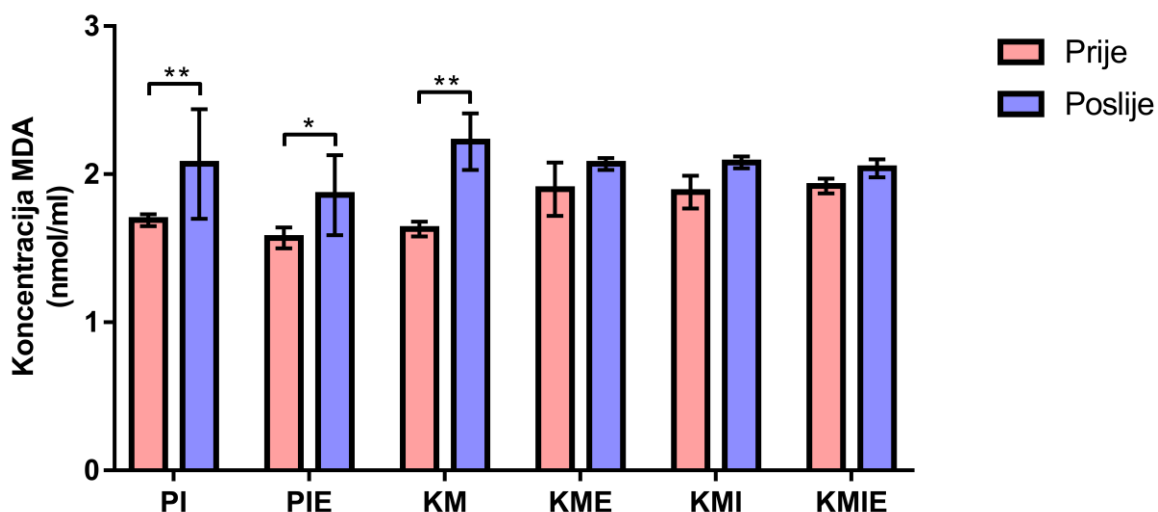
propofola i izoflurana, a potom podvrgnute endoskopskom pregledu i kornjača koje su anestetizirane kombinacijom ketamina i medetomidina ( $P < 0,05$ ) U ovom opisanom poređenju zabeležen je rast koncentracije MDA (Grafikon 7).



Grafikon 7: Koncentracija malondialdehida (nmol/ml) prije i poslije anestezije i opšteg kliničkog, odnosno endoskopskog pregleda izražena kao SE±SD. \* ( $P < 0,05$ ), \*\* ( $P < 0,01$ ) između testiranih grupa prije anestezije. \* ( $P < 0,05$ ) između testiranih grupa sa različitim anestetičkim protokolima i dijagnostičkim procedurama (dvosmjerna ANOVA i Tukey test).

Analizom rezultata koncentracije MDA unutar jedne grupe kornjača prije i poslije anestezije, odnosno endoskopskog pregleda, nije ustanovljena statistički bitna razlika u aktivnosti MDA prije i poslije anestezije kod kornjača anestetiziranih kombinacijom ketamina, medetomidina i izoflurana ( $P > 0,05$ ). Značajnih promjena nije bilo ni kod kornjača anestetiziranih kombinacijom ketamina i medetomidina, odnosno ketamina, medetomidina i izoflurana kod kojih je izvršena endoskopija ( $P > 0,05$ ). Statistički veoma značajan rast koncentracije MDA je zabilježen kod kornjača anestetiziranih kombinacijom propofola i izoflurana, kao i kod kornjača koje su anestetizirane kombinacijom ketamina i medetomidina ( $P < 0,01$ ). Statistički značajan rast koncentracije MDA nakon anestezije je zabilježen kod kornjača anestetiziranih kombinacijom propofola i izoflurana kod kojih je nakon uvođenja u anesteziju izvršen endoskopski pregled ( $P < 0,05$ ) (Grafikon 8).

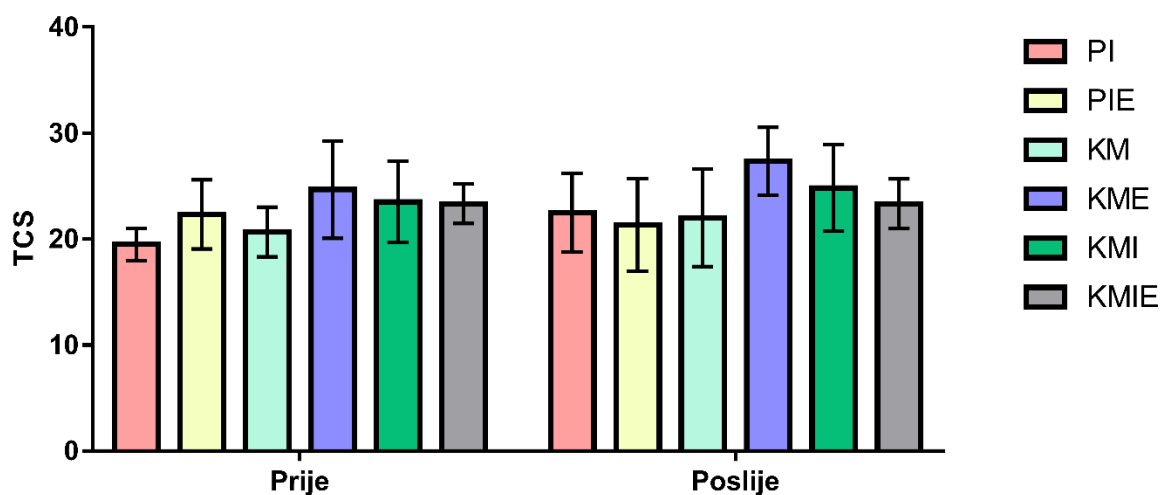




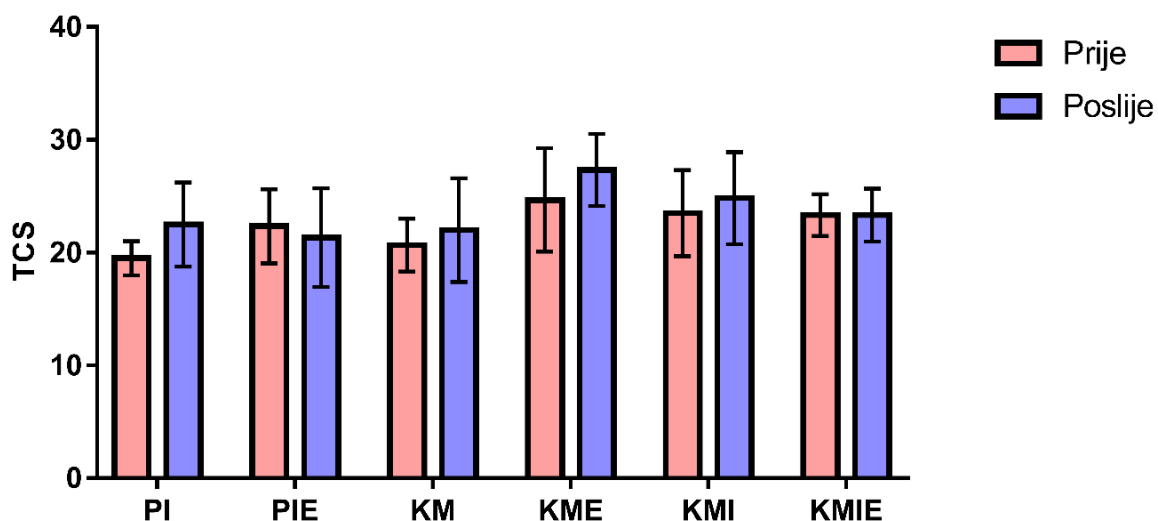
Grafikon 8: Koncentracija malondialdehida (nmol/ml) po grupama prije i poslije anestezije i opšteg kliničkog, odnosno endoskopskog pregleda izražena kao SE±SD. \* ( $P < 0,05$ ), \*\* ( $P < 0,01$ ) (dvosmjerna ANOVA i Tukey test).

## 5.2 Komet test

U svim uzorcima krvi vijabilnost ćelija ustanovljena *Trypan blue* ekskluzionim testom je bila prihvatljiva (preko 90 %), što je indikator da je nivo toksicnosti zadovoljavajući i dokazuje da su prikupljeni uzorci adekvatni za dalje analize. Rezultati komet testa nisu pokazali značajnu razliku kod kornjača prije i poslije anestezije, kao ni prije i nakon izvođenja endoskopske dijagnostike pod bilo kojim od ispitivanih anestetičkih protokola.



Grafikon 9: TCS prije i poslije anestezije i opšteg kliničkog, odnosno endoskopskog pregleda



Grafikon 10: TCS po grupama prije i poslije anestezijske i opšteg kliničkog, odnosno endoskopskog pregleda

Tabela 2. Zbirni prikaz rezultata sa istaknutim statističkim značajnostima

	PI	PIE	KM	KME	KMI	KMIE
SOD	↓	↓	↓	↓	↓*	↓*
CAT	↓**	↓**	↓	↓	↓	↓
GST	↑**	↑**	↑**	↓	↓	↓
MDA	↑**	↑*	↑**	↑	↑	↑
TCS	↑	↓	↑	↑	↑	=

↑ - Povećanje (vrijednosti / aktivnosti / koncentracije); ↓ - Smanjenje (vrijednosti / aktivnosti / koncentracije); ↑\* - Statistički značajano povećanje (vrijednosti / aktivnosti / koncentracije) ( $P < 0,05$ ); ↓\* - Statistički značajano smanjenje (vrijednosti / aktivnosti / koncentracije) ( $P < 0,05$ ); ↑\*\* - Statistički veoma značajano povećanje (vrijednosti / aktivnosti / koncentracije) ( $P < 0,01$ ); ↓\*\* - Statistički veoma značajano smanjenje (vrijednosti / aktivnosti / koncentracije) ( $P < 0,01$ ); = - bez promjena.

## 6. DISKUSIJA

Broj egzotičnih kućnih ljubimaca je u stabilnom rastu već dugi niz godina. Prema novijim podacima, egzotični kućni ljubimci čine preko jedne trećine ukupnog broja kućnih ljubimaca u Evropi i Sjedinjenim Američkim Državama (Lenzi i sar., 2020). Crvenouhe kornjače i ostale vrste kornjača, u nešto manjoj mjeri, postale su značajno prisutne kao kućni ljubimci u posljednjih nekoliko godina. Ovaj trend se može uočiti kako u svijetu, tako i u Srbiji (Pearson i sar., 2015; Urošević i sar., 2016).

Kako se broj jedinki ove vrste povećava u domaćinstvima, tako se njihovo prisustvo kao pacijenata u veterinarskim ambulancama takođe povećava. Pošto osnovne dijagnostičke metode u najvećem broju slučajeva nisu dovoljne za potpuni pregled kornjača, upotreba specijalističkih dijagnostičkih metoda je praktično obavezna da bi se došlo do tačne dijagnoze. Veterinari za pregled kornjača koriste veći broj specijalističkih dijagnostičkih metoda, kao što su rendgenografija, ultrazvučni pregled i analiza broja krvnih elemenata i biohemijskih parametara krvi. Međutim, sve ove dijagnostičke metode imaju značajne nedostatke kada je u pitanju pregled kornjača, i rezultati koji se dobijaju njihovom primjenom su često nedovoljni da se isključe sve diferencijalne dijagnoze za oboljenje na koje se sumnja (Hernandez-Divers i sar., 2005).

Endoskopija je dijagnostička metoda izbora prilikom pregleda kornjača jer daje više informacija o zdravstvenom stanju jedinke od drugih specijalističkih metoda pregleda. I nakon opšteg kliničkog pregleda, pregleda rezultata krvne slike i biohemijskih parametara, te radiološkog pregleda, često je indikovano izvođenje endoskopije jer vizuelizacija patološkog procesa može da potvrdi ili opovrgne dijagnozu. Najveći nedostatak endoskopije je činjenica da je izvođenje ove procedure moguće samo na jedinkama koje su u opštoj anesteziji. Za anesteziranje kornjača, u cilju izvođenja endoskopije, koristi se više različitih anestetičkih protokola (Hernandez-Divers i sar., 2005). Anestetici izazivaju, pored svojih primarnih efekata – anestezija, u nekim slučajevima analgezija i miorelaksacija, i sporedne, uglavnom neželjene efekte (kardiovaskularne i metaboličke poremećaje, hipereaktivnost pri buđenju i sl.). Takođe, treba imati na umu da je endoskopija u principu hirurška intervencija, koliko god neznatno oštećenje tkiva u ovom slučaju bilo. To znači da se radi o invazivnoj dijagnostičkoj proceduri koja može da ostavi određene posljedice po organizam kao cjelinu. Kod crvenouhих kornjača neželjeni efekti endoskopije nisu ispitani (Došenović i sar., 2021). Takođe, ne postoje detaljni podaci o tome koji anestetički protokol za izvođenje ove procedure ima najmanje neželjenih efekata (Došenović i sar., 2021; Valčić i sar., 2021)

Oksidativni stres se smatra dobrim kontrolnim parametrom oštećenja organizma kada se prate sistemske bolesti ili sistemski efekti, lijeka ili hirurške intervencije, jer su ROS koje čine osnovu za nastajanje oksidativnog stresa, značajni induktori oštećenja tkiva i organa u cijelom organizmu. Oštećenje DNK je takođe značajan parametar trajnog negativnog uticaja ksenobiotika (ljekovi, pesticidi, industrijski otrovi) jer je to preduslov za razvoj

genetskih mutacija, što na kraju može da dovede do nastanka neoplazmi (Evans i sar., 2004; Hayes i sar., 2020; Ishikawa i sar., 2008).

U ovoj studiji nisu ustanovljene statistički značajne razlike u aktivnosti superoksid dismutaze među različitim grupama ispitivanih kornjača prije anestezije, odnosno endoskopskog pregleda, što ukazuje da se radi o zdravim, intaktnim, pravilno nasumično raspoređenim jedinkama po oglednim grupama. Statistički značajne razlike između grupa nije bilo ni nakon anestezije, odnosno endoskopskog pregleda, što je svakako poželjan rezultat za dalju analizu uticaja anestezije i endoskopije na razvoj oksidativnog stresa kod kornjača.

U ovom istraživanju nisu ustanovljene statistički značajne promjene u aktivnosti superoksid dismutaze kod crvenouhkih kornjača koje su anestezirane kombinacijom propofola i izoflurana i podvrgnute opštem kliničkom pregledu, kao ni kod kornjača koje su podvrgnute endoskopiji nakon anestezije navedenim anestetičkim protokolom. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima studija koje su ispitivale uticaj propofola na aktivnost superoksid dismutaze kod eksperimentalnih glodara (Ozkan i sar., 2012; Xu i sar., 2008). U ovim studijama se aktivnost superoksid dismutaze nije značajno mijenjala kako kod jedinki koje su samo anestezirane propofolom, tako ni kod jedinki koje su nakon anestezije propofolom podvrgnute hirurškim zahvatima. Međutim, životinje iz ovih studija nisu održavane u anesteziji pomoću izoflurana. U istraživanju izvedenom na psima, kod jedinki koje su bile anestezirane primjenom izoflurana, ili kombinacijom izoflurana i propofola, aktivnost superoksid dismutaze je bila značajno manja nakon anestezije, dok se kod pasa koji su bili anestezirani samo propofolom aktivnost superoksid dismutaze nije značajno mijenjala (Lee i Kim, 2012). Sa druge strane, u istraživanju sprovedenom na ljudima kojima je rađena transplantacija jetre nije bilo značajnih promjena u aktivnosti superoksid dismutaze prije i poslije anestezije kombinacijom propofola i izoflurana (Ucar i sar., 2015). Ovo može da ukaže na to da primjena izoflurana za anesteziranje kod kornjača ali i ljudi, ne dovodi do stvaranja iste količine oksidativnog stresa kao kod drugih vrsta životinja, što je vrlo interesantno zapažanje znajući da su kornjače reptili, a ljudi najrazvijenija sisarska vrsta. Razlog za ovo mogu da budu varijacije među vrstama u odgovoru superoksid dismutaze na anesteziju kombinacijom propofola i izoflurana, i donekle različito doziranje pomenutih anestetika u odnosu na vrstu. Međutim, ne treba previdjeti mogućnost da odsustvo promjena u aktivnosti ovog enzima kod anestezije propofolom i izofluranom ne isključuje druge puteve nastajanja oksidativnog stresa prilikom primjene ovog anestetičkog protokola.

U grupama kod kojih su za anesteziranje jedinki korišćeni ketamin i medetomidin nije zabilježen značajan pad aktivnosti superoksid dismutaze nakon anestezije i endoskopije, kao ni kod kornjača koje su anestezirane ali nisu podvrgnute endoskopskom pregledu. Ovi rezultati, u izvesnoj meri odstupaju od rezultata istraživanja koje su sproveli Guler i saradnici (2014), a koji su ustanovili da ketamin i ksilazin primijenjeni *i.p.* kod eksperimentalnih glodara smanjuju aktivnost superoksid dismutaze na nivou značajnosti od 0,05. Uočene razlike se mogu objasniti protektivnom ulogom medetomidina u procesu nastajanja oksidativnog stresa, što je zabeleženo u slično dizajniranom ogledu kod pasa rase bigl (Choi i sar., 2012). Činjenica da nije došlo do značajnih promjena u aktivnosti SOD ni kod kornjača kod kojih je izvršen endoskopski pregled nije u skladu sa studijama

gdje je endoskopija navedena kao jedan od potencijalnih faktora koji može da izazove nastajanje superoksid anjona ( $O_2^{\bullet-}$ ), kog superoksid dismutaza detoksifikuje, kada se izvodi na ljudima (Arsalani-Zadeh i sar., 2011; Yiannakopoulou i sar., 2013).

Kod kornjača koje su anestetizirane kombinacijom ketamina, medetomidina i izoflurana sa i bez endoskopije je došlo do značajnog pada aktivnosti superoksid dismutaze, što je u suprotnosti sa istraživanjima koja pokazuju da ketamin i izofluran, kada se primjene kod pacova u istom anestetičkom protokolu, povećavaju aktivnost ovog enzima sa pozitivnim trendom u zavisnosti od veličine primijenjene doze ketamina. (Wang i sar., 2019). Imajući u vidu da prisustvo sedativa-hipnotika medetomidina u našem anestetičkom protokolu, predstavlja lijek više u odnosu na dizajn oglada Wang i sar. (2019), a pozivajući se na tumačenje rezultata iz prethodnog pasusa (naš ogled: KM grupa) možemo pretpostaviti da sadejstvo izoflurana i medetomidina zajedno sa ketaminom doprinosi značajnom padu aktivnosti superoksid dismutaze, što je jedan od mogućih pokazatelja razvoja oksidativnog stresa, bez obzira da li su anestetizirane kornjače podvrgnute endoskopiji ili je samo obavljen opšti klinički pregled.

U ovoj studiji nisu ustanovljene statistički značajne razlike u aktivnosti katalaze među različitim grupama ispitivanih kornjača prije anestezije, odnosno endoskopskog pregleda, što je još jedan pokazatelj dobrog nasumičnog odabira zdravih jedinki prilikom formiranja oglednih grupa. Statistički značajne razlike između grupa nije bilo ni nakon anestezije, odnosno endoskopskog pregleda. Ovo, ukazuje da se različiti anestetički protokoli primenjeni kod kornjača, kao i endoskopija sama po sebi, bitno ne razlikuju, kada se posmatra zadati parametar.

Iako je kod svih grupa registrovano smanjenje aktivnosti katalaze nakon anestezije i opšteg kliničkog, odnosno endoskopskog pregleda statistički veoma značajan pad aktivnosti katalaze je zabilježen kod dvije grupe kornjača i to, onih anestetiziranih kombinacijom propofola i izoflurana kod kojih je izvršen opšti klinički pregled, kao i kod kornjača kod kojih je nakon anestetiziranja ovim anestetičkim protokolom izvršen endoskopski pregled. U dostupnoj literaturi nismo mogli da pronađemo sličan model oglada koji je pratio promenu aktivnosti katalaze, kao važnog antioksidativnog parametra, u prisustvu propofola i izoflurana. Donekle uporedivo sa našim rezultatima, može biti istraživanje Ozkan i sar. (2012) sprovedeno na pacovima kod kojih je zabilježena smanjena aktivnost katalaze iz mišićnog tkiva na nivou značajnosti od 0,05 u prisustvu propofola, ali ne i izoflurana.

Pad aktivnost katalaze kod kornjača koje su anestetizirane kombinacijom ketamina i medetomidina ali nisu podvrgnute endoskopskom pregledu, nije bio statistički značajan. Ovaj rezultat je u izvesnoj mjeri u skladu sa rezultatima grupe autora koji su pokazali da nakon anestezije ketaminom i ksilazinom dolazi do značajnog pada aktivnosti katalaze u mišićnom tkivu pacova (Ozkan i sar., 2012). Statistički značajan pad aktivnosti katalaze nije zabilježen ni kod kornjača kod kojih je nakon uvođenja u anesteziju obavljen endoskopski pregled. Ovaj rezultat nije u skladu sa istraživanjima koja tvrde da endoskopski pregled dovodi do značajnih promjena u aktivnosti antioksidativnih enzima kada se izvodi na humanim pacijentima (Arsalani-Zadeh i sar., 2011; Yiannakopoulou i sar., 2013).

Kod kornjača koje su anestetizirane kombinacijom ketamina, medetomidina i izoflurana nije došlo do značajnog pada aktivnosti katalaze, što je u izvesnoj meri u skladu sa istraživanjima koja pokazuju da ketamin i izofluran primenjeni zajedno kod pacova, povećavaju aktivnost ovog enzima, i to dozno-zavisno u odnosu na ketamin (Wang i sar., 2019). Takođe, pad aktivnosti katalaze nije bio statistički značajan ni kod kornjača koje su nakon anestetiziranja primjenom ove kombinacije anestetika, podvrgnute endoskopskom pregledu.

Antioksidansi, superoksid dismutaza i katalaza, imaju važnu ulogu u mehanizmu antioksidativne zaštite: superoksid dismutaza detoksikuje superoksid anjon ( $O_2^{\bullet-}$ ) do vodonik peroksida ( $H_2O_2$ ), dok katalaza posreduje u konverziji  $H_2O_2$  do vode i kiseonika. Razlike u odgovoru superoksid dismutaze i katalaze na oksidativni stres upućuju na to da odgovor ova dva enzima nije uvijek u korelaciji. Pad aktivnosti katalaze može da bude posljedica hiperprodukcije ROS, naročito  $H_2O_2$  nakon aplikacije propofola. Međutim, postoje i studije koje nisu zabilježile značajne razlike u nivou aktivnosti katalaze i superoksid dismutaze nakon anestezije i endoskopske hirurške intervencije (Mila-Kierzenkowska i sar., 2013). Razlog može da bude to što su u navedenoj studiji ispitanici bili kancerski pacijenti kod kojih je očekivano prisustvo izraženog oksidativnog stresa, tako da su anestezija i endoskopija marginalizovane procedure u odnosu na osnovnu bolest za posmatranu pojavu.

U savremenoj anesteziologiji postoji sve veći interes u izučavanju aktivnosti glutathion S transferaze (Mikstacki i sar., 2015). Ovaj enzim igra značajnu ulogu u ćelijskoj detoksikaciji ksenobiotskih i endogenih jedinjenja, kao i proizvoda oksidativnog stresa.

Nije bilo statistički značajne razlike u aktivnosti GST između grupa prije anestetiziranja odnosno, endoskopskog pregleda, što ukazuje da se radi o zdravim, intaktnim, pravilno nasumično raspoređenim jedinkama po oglednim grupama. Nakon anestezije odnosno, endoskopskog pregleda, aktivnost GST je bila značajno veća kod grupa kornjača koje su anestetizirane kombinacijom propofola i izoflurana sa ili bez endoskopije, u odnosu na grupe kornjača koje su anestetizirane kombinacijom ketamina medetomidina i izoflurana, bez obzira da li je kod kornjača izveden endoskopski pregled ili ne. Ovo ukazuje da propofol u kombinaciji sa izofluranom značajno više utiče na aktivnost GST od kombinacije ketamina medetomidina i izoflurana i da endoskopski pregled ne remeti aktivnost posmatranog parametra. Neočekivano je, međutim da je i kod kornjača koje su anestetizirane kombinacijom ketamina i medetomidina ali nisu podvrgnute endoskopskom pregledu aktivnost SOD bila veća sa statističkom značajnošću na nivou od 0,01 nego kod kornjača kod kojih je nakon anestetiziranja ovim anestetičkim protokolom izveden endoskopski pregled.

Adaramoye i saradnici (2013) su pokazali da propofol značajno povećava aktivnost glutathion S transferaze kod Wistar pacova, što je u saglasnosti sa rezultatima ovog istraživanja. Uz to, propofol je uzrokovao povećanje aktivnosti ovog enzima u škragama i ćelijama krvi kod riba (Gressler i sar., 2016). Međutim, postoje dokazi da upotreba propofola kao anestetika nema efekta na aktivnost glutathion S transferaze nakon dužih hirurških intervencija kod ljudi (Murray i sar., 1994). U prethodnim studijama Cetin i saradnici (2015) su pokazali da istovremena primjena ketamina i dezflurana u anestetičkom protokolu za pacove ne utiče na promjenu aktivnosti glutathion S transferaze,

dok primjena ketamina samog prouzrokuje pada aktivnosti ovog enzima u poređenju sa negativnom kontrolom. Takođe, kod pacova koji su anestetizirani samo izofluranom, nije došlo do promjene u aktivnosti glutacion S transferaze (Hussey i sar., 1988).

Različiti odgovori u aktivnosti glutacion S transferaze ukazuju na zavisnost od tipa ksenobiotika, vrste životinje i tipa tkiva koje je ispitivano (Ferrari i sar., 2007; Oruç i Üner, 2000). Pošto se u ovom istraživanju aktivnost glutacion S transferaze nije mjenjala u zavisnosti od toga da li je jedinka podvrgnuta endoskopskom pregledu ili ne kada je anestetički protokol sadržao kombinaciju injekcionih i inhalacionog anestetika, može da se pretpostavi da je porast aktivnosti ovog enzima u pojedinim grupama rezultat odgovora kornjača isključivo na aplikaciju tih kombinacija anestetika.

Malondialdehid (MDA) je reaktivni aldehid koji u organizmu nastaje u toku lipidne peroksidacije, odnosno kada ROS, poput peroksida i superoksid radikala, razgrađuju dvogubo i trogubo nezasićene masne kiseline u sastavu lipidnih membrana. Kao takav, MDA i sam ima visok reaktivni potencijal i može da ošteti proteinske strukture ćelija ali i DNK. S toga se mjerenje koncentracije MDA u plazmi i tkivima koristi kao biomarker lipidne peroksidacije, odnosno jačine oksidativnog stresa.

U ovom ispitivanju pokazane su razlike u koncentraciji MDA na nivou značajnosti od 0,05 i 0,01 između različitih grupa kornjača prije anestetiziranja odnosno endoskopskog pregleda. Pošto je ovo jedini ispitivani parametar kod kojeg su prije anestetiziranja postojale varijacije to može da ukazuje da kod kornjača koncentracija MDA ima znatno šire granične vrijednosti u odnosu na druge ispitivane parametre. Takođe, treba razmotriti i podatak koji su iznijeli Polgar i saradnici (2010), a koji ukazuje na manjkavost u pripremi uzoraka plazme/tkiva za kvantifikaciju MDA (visoka temperatura i kisela pH), bilo da se radi o metodi spektrofotometrije (metoda korišćena u ovom ispitivanju) ili tečne hromatografije sa UV detekcijom (*High-Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet* - HPLC-UV/VIS, eng.), a koja bi se takođe mogla smatrati razlogom neravnomjerne distribucije rezultata posmatranog parametra po grupama prije anestetiziranja odnosno endoskopskog pregleda.

Analizom rezultata koncentracije malondialdehida po različitim grupama nakon anestezije, odnosno endoskopskog pregleda uočava se značajan porast nivoa malondialdehida kod kornjača koje su anestetizirane kombinacijom ketamina i medetomidina bez endoskopije, u odnosu na kornjače anestetizirane kombinacijom propofola i izoflurana, a koje su potom podvrgnute endoskopskom pregledu. U ostalim grupama došlo je do blagog porasta nivoa malondialdehida, bez statističke značajnosti između grupa. Ovaj rezultat ukazuje da endoskopija uglavnom ne utiče na stepen lipidne peroksidacije, jer su dobijene razlike u koncentraciji malondialdehida u ovom istraživanju teško uporedive. Međutim, kada se posmatra nivo malondialdehida po grupama prije i poslije anestezije, uočava se da je kod svih ispitivanih grupa zabilježen porast ovog reaktivnog aldehida, sa statističkom značajnošću na nivou od 0,05 kod kornjača anestetiziranih propofolom i izofluranom sa endoskopijom, i na nivou od 0,01 kod kornjača anestetiziranih propofolom i izofluranom, ali i ketaminom i medetomidinom koje su bile podvrgnute samo opštem kliničkom pregledu. Moguće, da je povećan nivo malondialdehida kod svih posmatranih grupa kornjača posle anestezije odnosno endoskopskog pregleda, sa ili bez statističke značajnosti, posljedica smanjene antioksidativne aktivnosti koja je prouzrokovana samim tretmanom (anestezija i opšti

klinički pregled/ endoskopija). Rezultati ovog istraživanja su u skladu sa studijama koje su pokazale da je, nakon aplikacije ketamina, došlo do značajnog porasta lipidne peroksidacije kod pacova (Ahiskalioglu i sar., 2015; de Oliveira i sar., 2009; Gazal i sar., 2014). Isto tako su Kim i saradnici (2006) utvrdili da kod pacova nakon aplikacije izoflurana dolazi do pojačane produkcije malondialdehida. U drugom istraživanju, aplikacija ketamina je dovela do porasta lipidne peroksidacije, dok nakon kombinovane primjene ketamina i tiopentala nije bilo značajnih promjena u nivou malondialdehida kod pacova (Ahiskalioglu i sar., 2018). Takođe, zabilježen je porast nivoa malondialdehida nakon prostaktetomije kod pacijenata sa primarnom dijagnozom kancera jednjaka, u kojoj je kao anestetik korišćen propofol (Han i sar., 2015). Postoji i studija gdje je dokazano da nakon opšte anestezije propofolom kod pasa, dolazi do značajnog povećanja koncentracije malondialdehida (Alipour i sar., 2018). U suprotnosti sa rezultatima ovog istraživanja, zabeleženi su slučajevi značajnog smanjenja u lipidnoj peroksidaciji u toku anestezije propofolom (Allaouchiche i sar., 2001; Akin i sar., 2015). Međutim, postoje i studije gdje nije dokazana promjena nivoa lipidne peroksidacije kao posljedica aplikacije propofola (Adaramoye i sar., 2013; Braz i sar., 2009;). Kada je riječ o propofolu, svi citirani autori se slažu u jednom, da propofol zahvaljujući svojoj strukturi (prisustvo fenolne hidroksile grupu), koja je nalik vitaminu E (potentan antioksidans), svakako ima kapacitet za antioksidativnu aktivnost, ali da je ona uslovljena veličinom primijenjene doze i dužinom ekspozicije jedinki ovom anestetiku, odnosno uslovljena dužinom trajanja hirurške intervencije.

U ovoj studiji nisu ustanovljene statistički značajne razlike u TCS među različitim grupama ispitivanih kornjača prije anestezije, odnosno endoskopskog pregleda. Statistički značajne razlike između grupa nije bilo ni nakon anestezije, odnosno endoskopskog pregleda. Koeficijenti varijacije za pojedinačno posmatrane grupe prije anestezije i endoskopije su bili normalni do viši, odnosno srednje visoki poslije anestezije i endoskopije. Ali kako se u ovom ispitivanju radi o jedinkama koje su gajene u identičnim uslovima i istog genetskog porjekla, onda taj varijabilitet i prosjek možemo da smatramo da i jeste sličan populacionom. Tako da ove rezultate možemo da koristimo za statističku analizu pomoću ANOVA testa, jer on dozvoljava ovaj stepen varijacije.

Reaktivne kiseonikove vrste imaju sposobnost da reaguju sa svim komponentama DNK i izazovu različita oštećenja, kao što su oksidacija baza, stvaranje unakrsnih veza na lancu DNK i stvaranje jednolančanih ili dvolančanih prekida. Promjene na lancu DNK mogu da dovedu do pojave mutacija, genomske nestabilnosti, pa i do razvoja tumora. Komet test je osjetljiv indikator genotoksičnosti i efektivan biomarker za detekciju oštećenja DNK. Postoji samo nekoliko zabilježenih instanci primjene ovog testa kod kornjača, i u svim slučajevima je komet test korišćen samo za provjeru zdravstvenog stanja jedinki (Caliani i sar., 2014; Zapata i sar., 2016)

Primjenom komet testa u ovom istraživanju nije zabilježeno oštećenje DNK kod kornjača, nakon uvođenja jedinki u opštu anesteziju sa ili bez izvođenja endoskopije. U skladu sa našim rezultatima, u ispitivanju na konjima, primjena ketamina, dijazepam, ksilazina i izoflurana nije dovela do oštećenja DNK (Strasser i sar., 2012). Anestezija propofolom kod ljudi se takođe pokazala kao bezbjedna sa aspekta genotoksičnosti (Braz i sar., 2015). Takođe, dokazano je da izofluran ne dovodi do oštećenja DNK u ćelijama



periferne krvi kod pacova (Rocha i sar., 2015). Sa druge strane, postoje dokazi da izlaganje izofluranu uzrokuje značajno oštećenje DNK u limfocitima pacova (Kim i sar., 2006). Moguće objašnjenje za razlike u prezentovanju rezultata Kim i saradnika (2006) i rezultata ovog istraživanja može da bude u ispitivanom uzorku, gde je određivanje oštećenja DNK rađeno na punoj krvi, tako da su mehanizmi antioksidativne zaštite bili dovoljni da spriječe bilo kakvo oštećenje DNK izazvano izofluranom (Baskurt i Meiselman, 2003).

## 7. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata ovog istraživanja i podataka koji mogu da se pronađu u dostupnoj literaturi, izvedeni su slijedeći zaključci:

1. Anesteziranje kornjača primjenom propofola i izoflurana dovelo je do statistički veoma značajnog pada aktivnosti katalaze ( $P < 0,01$ ), veoma značajnog porasta aktivnosti glutation S transferaze ( $P < 0,01$ ) i koncentracije malondialdehida ( $P < 0,01$ ). Kod kornjača anesteziranih primjenom navedenog protokola a potom podvrgnutih endoskopskom pregledu došlo je do statistički veoma značajnog pada aktivnosti katalaze ( $P < 0,01$ ), veoma značajnog porasta aktivnosti glutation S transferaze ( $P < 0,01$ ) i značajnog porasta koncentracije malondialdehida ( $P < 0,05$ );
2. Anesteziranje kornjača primjenom ketamina i medetomidina dovelo je do statistički veoma značajnog porasta aktivnosti glutation S transferaze ( $P < 0,01$ ) i koncentracije malondialdehida ( $P < 0,01$ );
3. Anesteziranje kornjača primjenom ketamina, medetomidina i izoflurana dovelo je do statistički značajnog pada u aktivnosti superoksid dismutaze, nezavisno od toga da li su bile podvrgnute endoskopskom pregledu ili ne ( $P < 0,05$ );
4. Anesteziranje kornjača primjenom ispitivanih anestetičkih protokola ne dovodi do statistički značajnog oštećenja DNK, kao ni izvođenje endoskopskog pregleda;
5. Kombinacija ketamina i medetomidina se pokazala kao najbezbjednija za anesteziranje prilikom endoskopije crvenouhkih kornjača. Endoskopski pregled ne utiče na parametre oksidativnog stresa.

## 8. POPIS LITERATURE

1. Ababneh, O.A., Suleiman, A.M., Bsisu, I.K., Al-Ghanem, S.M., Samarah, W.K., Al-Zaben, K.R., Qudaisat, I.Y., Khreasha, L.A., Al Edwan, G.M., Murshidi, M.M. (2020). A co-induction technique utilizing 4% sevoflurane followed by 0.75 mg/kg propofol in elderly patients undergoing minimally invasive procedures: a prospective randomized control study. *Medicina*, 56(12), 682.
2. Adamowicz, P., Kala, M. (2005). Urinary excretion rates of ketamine and norketamine following therapeutic ketamine administration: method and detection window considerations. *Journal of analytical toxicology*, 29(5), 376-382.
3. Adaramoye, O. A., Akinwonmi, O., Akanni, O. (2013). Effects of propofol, a sedative-hypnotic drug, on the lipid profile, antioxidant indices, and cardiovascular marker enzymes in wistar rats. *International Scholarly Research Notices*, Article ID 230261.
4. Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, 105, 121-126.
5. Ahiskalioglu, A., Ince, I., Aksoy, M., Ahiskalioglu, E. O., Comez, M., Dostbil, A., Celik, M., Alp, H.H., Coskun, R., Taghizadehghalehjoughi, A., Suleyman, B. (2015). Comparative investigation of protective effects of metyrosine and metoprolol against ketamine cardiotoxicity in rats. *Cardiovascular toxicology*, 15(4), 336-344.
6. Ahiskalioglu, E. O., Aydin, P., Ahiskalioglu, A., Suleyman, B., Kuyruklu, U., Kurt, N., Altuner, D., Coskun, R., Suleyman, H. (2018). The effects of ketamine and thiopental used alone or in combination on the brain, heart, and bronchial tissues of rats. *Archives of medical science: AMS*, 14(3), 645.
7. Akin, M., Ayoglu, H., Okyay, D., Ayoglu, F., Gür, A., Can, M., Yurtlu, S., Hanci, V., Küçükosman, G., Turan, I. (2015). Effects of various anesthesia maintenance on serum levels of selenium, copper, zinc, iron and antioxidant capacity. *Revista brasileira de anesthesiologia*, 65, 51-60.
8. Alipour, F., Emami, M. R., Mohri, M. (2018). Endocrine and oxidative stress characteristics in different anesthetic methods during pneumoperitoneum in dogs. *Comparative Clinical Pathology*, 27(6), 1667-1673.
9. Alkire, M.T., Nathan, S.V. (2005). Does the amygdala mediate anesthetic-induced amnesia? Basolateral amygdala lesions block sevoflurane-induced amnesia. *Anesthesiology*, 102, 754-760.
10. Allaouchiche, B., Debon, R., Goudable, J., Chassard, D., Duflo, F. (2001). Oxidative stress status during exposure to propofol, sevoflurane and desflurane. *Anesthesia & Analgesia*, 93(4), 981-985.
11. Anderson, D. Y. T. W., Yu, T. W., Phillips, B. J., Schmezer, P. (1994). The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 307(1), 261-271.
12. Andrade, C. (2017). Ketamine for depression, 4: in what dose, at what rate, by what route, for how long, and at what frequency? *The Journal of clinical psychiatry*, 78(7), 10106.

13. Ansley, D. M., Lee, J. U., Godin, D. V., Garnett, M. E., Qayumi, A. K. (1998). Propofol enhances red cell antioxidant capacity in swine and humans. *Canadian Journal of Anaesthesia*, 45(3), 233-239.
14. Arsalani-Zadeh, R., Ullah, S., Khan, S., MacFie, J. (2011). Oxidative stress in laparoscopic versus open abdominal surgery: a systematic review. *Journal of Surgical Research*, 169(1), e59-e68.
15. Bagis, S., Tamer, L., Sahin, G., Bilgin, R., Guler, H., Ercan, B., Erdogan, C. (2005). Free radicals and antioxidants in primary fibromyalgia: an oxidative stress disorder? *Rheumatology international*, 25(3), 188-190.
16. Baker, M. T., Naguib, M., Warltier, D. C. (2005). Propofol: the challenges of formulation. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 103(4), 860-876.
17. Barja, G., Herrero, A. (2000). Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 14(2), 312-318.
18. Baskurt, O. K., Meiselman, H. J. (2003). Blood rheology and hemodynamics. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, 29(05), 435-450
19. Beilin, B., Rusabrov, Y., Shapira, Y., Roytblat, L., Greemberg, L., Yardeni, I. Z., Bessler, H. (2007). Low-dose ketamine affects immune responses in humans during the early postoperative period. *British Journal of Anaesthesia*, 99(4), 522-527.
20. Berci, G., Kenneth, A.F. (2000). History of endoscopy. What lessons have we learned from the past? *Surgical endoscopy*, 14, 5-15.
21. Berci, G., Kont, L.A. (1969). A new optical system in endoscopy with special reference to cystoscopy. *British Journal of Urology*, 41, 564-571.
22. Bertelsen, M. F., Buchanan, R., Jensen, H. M., Leite, C. A., Abe, A. S., Wang, T. (2021). Pharmacodynamics of propofol and alfaxalone in rattlesnakes (*Crotalus durissus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 256, 110935.
23. Boheler, J., Hamrick, J. C., McKnight, R. L., Eger, E. I. (1982). Isoflurane and malignant hyperthermia. *Anesthesia & Analgesia*, 61(8), 712-713.
24. Braz, M. G., Magalhães, M. R., Salvadori, D. M., Ferreira, A. L., Braz, L. G., Sakai, E., Braz, J. R. (2009). Evaluation of DNA damage and lipoperoxidation of propofol in patients undergoing elective surgery. *European Journal of Anaesthesiology*, 26(8), 654-660.
25. Braz, M. G., Braz, L. G., Freire, C. M., Lucio, L. M., Braz, J. R., Tang, G., Salvadori, D.M., Yeum, K. J. (2015). Isoflurane and propofol contribute to increasing the antioxidant status of patients during minor elective surgery: a randomized clinical study. *Medicine*, 94(31), e1266.
26. Briganti, S., Picardo, M. (2003). Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin disease: what's new? *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 17(6), 663-669.
27. Brosnan, J. R., Steffey, P. E. (2018). 11 Inhalation anesthetics. In *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, by Riviere, E. J., Papich, G.M.. 216-247, John Wiley & Sons.

28. Caliani, I., Campani, T., Giannetti, M., Marsili, L., Casini, S., Fossi, M. C. (2014). First application of comet assay in blood cells of Mediterranean loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *Marine environmental research*, 96, 68-72.
29. Carnes, C. A., Chung, M. K., Nakayama, T., Nakayama, H., Baliga, R. S., Piao, S., Kanderian, A., Pavia, S., Hamlin, R.L., McCarthy, P.M. Van Wagoner, D. R. (2001). Ascorbate attenuates atrial pacing-induced peroxynitrite formation and electrical remodeling and decreases the incidence of postoperative atrial fibrillation. *Circulation research*, 89(6), e32-e38.
30. Carrigan, T. W., Straughen, W. J. (1987). A report of hepatic necrosis and death following isoflurane anesthesia. *Anesthesiology (Philadelphia)*, 67(4), 581-583.
31. Cetin, N., Suleyman, B., Altuner, D., Kuyruklyildiz, U., Ozcicek, F., Coskun, R., Kurt, N. Suleyman, H. (2015). Effect of disulfiram on ketamine-induced cardiotoxicity in rats. *International journal of clinical and experimental medicine*, 8(8), 13540-13547.
32. Cheng, B., Zhang, Y., Wang, A., Dong, Y., Xie, Z. (2015). Vitamin C attenuates isoflurane-induced caspase-3 activation and cognitive impairment. *Molecular neurobiology*, 52(3), 1580-1589.
33. Cherubini, A., Ruggiero, C., Polidori, M. C., Mecocci, P. (2005). Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biology and Medicine*, 39(7), 841-852.
34. Choi, K. H., Lee, J. Y., Jeong, S. M., Kim, M. C. (2012). Oxidative effects of isoflurane and medetomidine-tiletamine/zolazepam combination in Beagle dogs. *Journal of Veterinary Clinics*, 29(2), 119-123.
35. Clar, T.D., Liu, M. (2021). Non-depolarizing Neuromuscular Blockers - StatPearls - available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534828/>
36. Cohen, M., Chan, S. L., Way, W., Trevor, A. (1973). Distribution in the brain and metabolism of ketamine in the rat after intravenous administration. *Anesthesiology*, 39(4), 370-375.
37. Colin, P., Eleveld, D. J., van den Berg, J. P., Vereecke, H. E., Struys, M. M., Schelling, G., Apfel, C.C. Hornuss, C. (2016). Propofol breath monitoring as a potential tool to improve the prediction of intraoperative plasma concentrations. *Clinical pharmacokinetics*, 55(7), 849-859.
38. Cooper JE. 1991. Endoscopy in Exotic Species. In: *Color Atlas of Small Animal Endoscopy*, by Brearley, M. J., Cooper, J. E., Sullivan, M. 111-122, Mosby, St. Louis.
39. Corriger, A., Pickering, G. (2019). Ketamine and depression: a narrative review. *Drug design, development and therapy*, 13, 3051-3067.
40. Cullen, L. K. (1996). Medetomidine sedation in dogs and cats: a review of its pharmacology, antagonism and dose. *British Veterinary Journal*, 152(5), 519-535.
41. Dasgupta, A., Klein, K. (2014). *Antioxidants in food, vitamins and supplements: prevention and treatment of disease*. Academic Press.
42. Dawidowicz, A. L., Fornal, E., Mardarowicz, M., Fijalkowska, A. (2000). The role of human lungs in the biotransformation of propofol. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 93(4), 992-997.

43. Dawidowicz, A. L., Kalitynski, R., Fijalkowska, A. (2003). Free and bound propofol concentrations in human cerebrospinal fluid. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 56(5), 545-550.
44. de Oliveira, L., Spiazzi, C. M. D. S., Bortolin, T., Canever, L., Petronilho, F., Mina, F. G., Dal-Pizzol, F., Quevedo, J. Zugno, A. I. (2009). Different sub-anesthetic doses of ketamine increase oxidative stress in the brain of rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(6), 1003-1008.
45. Dershwitz, M., Sreter, F.A., Ryan, J.F. (1989). Ketamine does not trigger malignant hyperthermia in susceptible swine. *Anesthesia & Analgesia*. 69, 501-503.
46. Dinis-Oliveira, R. J. (2017). Metabolism and metabolomics of ketamine: a toxicological approach. *Forensic sciences research*, 2(1), 2-10.
47. Divers, S. J. (1996). The Use of Propofol in Reptile Anestheisa. *Proceedings Association of Amphibian and Reptilian Veterinarians*, 57-58.
48. Divers, S. J. (1999). Lizard endoscopic techniques with particular reference to the green iguana (*Iguana iguana*). *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 8(3), 122-129.
49. Došenović, M., Radaković, M., Vučićević, M., Vejnović, B., Vasiljević, M., Marinković, D., Stanimirović, Z. (2021). Evaluation of the effects of two anaesthetic protocols on oxidative status and DNA damage in red-eared sliders (*Trachemys scripta elegans*) undergoing endoscopic coeliotomy. *Acta Veterinaria Hungarica*, 68(4), 337-344.
50. Eldufani, J., Nekoui, A., Blaise, G. (2018). Nonanesthetic effects of ketamine: a review article. *The American journal of medicine*, 131(12), 1418-1424.
51. Eilers, H., Yost, S. (2018). Chapter 25. General Anesthetics. In: *Basic&Clinica Pharmacology 14th ed.*, by Katzung, G. B. 440-458, McGraw-Hill Education,
52. Ernst, C. H. (1990). Systematics, taxonomy, variation, and geographic distribution of the slider turtle. *Life history and ecology of the slider turtle*, 1, 56-67.
53. Evans, M. D., Dizdaroglu, M., Cooke, M. S. (2004). Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 567(1), 1-61.
54. Fanta, S., Kinnunen, M., Backman, J. T., Kalso, E. (2015). Population pharmacokinetics of S-ketamine and norketamine in healthy volunteers after intravenous and oral dosing. *European journal of clinical pharmacology*, 71(4), 441-447.
55. Ferrari, A., Venturino, A., de D'Angelo, A. M. P. (2007). Effects of carbaryl and azinphos methyl on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) detoxifying enzymes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88(2), 134-142.
56. Félix, L. M., Vidal, A. M., Serafim, C., Valentim, A. M., Antunes, L. M., Monteiro, S. M., Matos, M. Coimbra, A. M. (2018). Ketamine induction of p53-dependent apoptosis and oxidative stress in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Chemosphere*, 201, 730-739.
57. Fiorani, M., Cantoni, O., Tasinato, A., Boscoboinik, D., Azzi, A. (1995). Hydrogen peroxide- and fetal bovine serum-induced DNA synthesis in vascular smooth muscle cells: positive and negative regulation by protein kinase C isoforms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1269(1), 98-104.

58. Fredley, V., Kreisler, R., Miller, K. (2020). Subhypnotic dose of intravenous propofol stimulates appetite in cats with stress-induced anorexia. *Veterinary Record*, 187(8), 58-58.
59. Gaidin, S. G., Turovskaya, M. V., Mal'tseva, V. N., Zinchenko, V. P., Blinova, E. V., Turovsky, E. A. (2019). A complex neuroprotective effect of alpha-2-adrenergic receptor agonists in a model of cerebral ischemia-reoxygenation in vitro. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 13(4), 319-333.
60. Gazal, M., Valente, M. R., Acosta, B. A., Kaufmann, F. N., Braganhol, E., Lencina, C. L., Stefanello, F.M., Ghisleni, G., Kaster, M. P. (2014). Neuroprotective and antioxidant effects of curcumin in a ketamine-induced model of mania in rats. *European journal of pharmacology*, 724, 132-139.
61. Giera, M., Lingeman, H., Niessen, W. (2012). Recent advancements in the LC-and GC-based analysis of malondialdehyde (MDA): a brief overview. *Chromatographia*, 75(9), 433-440.
62. Gill, J. G., Piskounova, E., Morrison, S. J. (2016). Cancer, oxidative stress, and metastasis. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology Vol. 81*, 163-175. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
63. Girotti, M. J., Khan, N., McLellan, B. A. (1991). Early measurement of systemic lipid peroxidation products in the plasma of major blunt trauma patients. *The Journal of trauma*, 31(1), 32-35.
64. Giuseppe, M. D., Faraci, L., Luparello, M. (2018). Preliminary survey on influence of renal portal system during propofol anesthesia in yellow-bellied turtle (*Trachemys scripta scripta*). *Journal of Veterinary Medicine and Allied Science*, 2(1), 1-4.
65. Glen, J. B., James, R. (1977). U.S. Patent No. 4,056,635. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
66. Glen, J. B. (2019). Try, try, and try again: personal reflections on the development of propofol. *British journal of anaesthesia*, 123(1), 3-9.
67. Gobel, T., Jurina, K. (1994). Endoskopie des Respirationstraktes bei Reptilien. *Kleintierpraxis*, 39, 791-794.
68. Gokcinar, D., Ergin, V., Cumaoglu, A., Menevse, A., Aricioglu, A. (2013). Effects of ketamine, propofol, and ketofol on proinflammatory cytokines and markers of oxidative stress in a rat model of endotoxemia-induced acute lung injury. *Acta Biochimica Polonica*, 60(3), 451-456.
69. Goldenberg-Cohen, N., Raiter, A., Gaydar, V., Dratviman-Storobinsky, O., Goldstein, T., Weizman, A., Hardy, B. (2012). Peptide-binding GRP78 protects neurons from hypoxia-induced apoptosis. *Apoptosis*, 17(3), 278-288.
70. Gorlin, A. W., Rosenfeld, D. M., Ramakrishna, H. (2016). Intravenous sub-anesthetic ketamine for perioperative analgesia. *Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology*, 32(2), 160-167.
71. Gressler, L. T., Sutili, F. J., Loebens, L., Saccol, E. M. H., Pês, T. S., Parodi, T. V., da Costa, S.T., Pavanato, M.A., Baldisserotto, B. (2016). Histological and antioxidant responses in *Rhamdia quelen* sedated with propofol. *Aquaculture research*, 47(7), 2297-2306.
72. Grünfeld, J. (1879). *Zur Geschichte der Endoskopie und der endoskopischen Apparate*. C. Ueberreuter'sche Buchdruckerei (M Salzer).

73. Guler, L., Bozkirli, F., Bedirli, N., Unal, Y., Guler, A., Oztas, Y., Balta, S., Cakar, M., Demirkol, S., Arslan, Z., Unlu, M. (2014). Comparison of the effects of dexmedetomidine vs. ketamine in cardiac ischemia/reperfusion injury in rats-preliminary study. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 23(5), 683-689.
74. Habig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.
75. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press, USA.
76. Han, C., Ding, W., Jiang, W., Chen, Y. U., Hang, D., Gu, D., Jiang, G., Tan, Y., Ge, Z., Ma, T. (2015). A comparison of the effects of midazolam, propofol and dexmedetomidine on the antioxidant system: a randomized trial. *Experimental and therapeutic medicine*, 9(6), 2293-2298.
77. Hannivoort, L. N., Eleveld, D. J., Proost, J. H., Reyntjens, K. M., Absalom, A. R., Vereecke, H. E., Struys, M. M. (2015). Development of an optimized pharmacokinetic model of dexmedetomidine using target-controlled infusion in healthy volunteers. *Anesthesiology*, 123(2), 357-367.
78. Hansson, G. K., Robertson, A. K. Söderberg-Nauclér, C. (2006). Inflammation and atherosclerosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 1, 297-329.
79. Hassler, K. R., Collins, J. T., Philip, K., Jones, M. W. (2021). *Laparoscopic cholecystectomy*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2021. PMID: 28846328.
80. Hawkley, TF, Preston, M, Maani, CV. (2020). *Isoflurane*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2020. PMID: 30422552.
81. Hay Kraus, B.L., Greenblatt, D.J., Venkatakrisnan, K., Court, M.H. (2000). Evidence for propofol hydroxylation by cytochrome P4502B11 in canine liver microsomes: breed and gender differences. *Xenobiotica*, 30(6), 575-588.
82. Hayes, J. D., Dinkova-Kostova, A. T., Tew, K. D. (2020). Oxidative stress in cancer. *Cancer cell*, 38(2), 167-197.
83. Helbock, H. J., Beckman, K. B., Shigenaga, M. K., Walter, P. B., Woodall, A. A., Yeo, H. C., Ames, B. N. (1998). DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(1), 288-293.
84. Hellyer, P.W., Robertson, S., Fails, A. (2007). Pain and its management. *Lumb and Jones' Veterinary Anesthesia and Analgesia*. 4, 31-57.
85. Hernandez-Divers, S. J., Hernandez-Divers, S. M., Wilson, H. G., Stahl, S. J. (2005). A review of reptile diagnostic coelioscopy. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 15(3), 16-31.
86. Hiraoka, H., Yamamoto, K., Miyoshi, S., Morita, T., Nakamura, K., Kadoi, Y., Kunimoto, F., Horiuchi, R. (2005). Kidneys contribute to the extrahepatic clearance of propofol in humans, but not lungs and brain. *British journal of clinical pharmacology*, 60(2), 176-182.



87. Horn, E. P., Standl, T., Sessler, D. I., von Knobelsdorff, G., Buchs, C., Schulte am Esch, J. (1998). Physostigmine prevents postanesthetic shivering as does meperidine or clonidine. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 88(1), 108-113.
88. Huang, C. X., Liu, Y., Xia, W. F., Tang, Y. H., Huang, H. (2009). Oxidative stress: a possible pathogenesis of atrial fibrillation. *Medical hypotheses*, 72(4), 466-467.
89. Hussey, A. J., Aldridge, L. M., Paul, D., Ray, D. C., Beckett, G. J., Allan, L. G. (1988). Plasma glutathione S-transferase concentration as a measure of hepatocellular integrity following a single general anaesthetic with halothane, enflurane or isoflurane. *British Journal of Anaesthesia*, 60(2), 130-135.
90. Ionescu, D. F., Luckenbaugh, D. A., Niciu, M. J., Richards, E. M., Zarate Jr, C. A. (2015). A single infusion of ketamine improves depression scores in patients with anxious bipolar depression. *Bipolar disorders*, 17(4), 438-443.
91. Ishikawa, K., Takenaga, K., Akimoto, M., Koshikawa, N., Yamaguchi, A., Imanishi, H., Hayashi, J. I. (2008). ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science*, 320(5876), 661-664.
92. Jan, A., Azam, M., Siddiqui, K., Ali, A., Choi, I., Haq, Q. (2015). Heavy metals and human health: Mechanistic insight into toxicity and counter defense system of antioxidants. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 29592-29630.
93. Jinks, S.L., Atherley, R.J., Dominguez, C.L., Sigvardt, K.A., Antognini, J.F. (2005). Isoflurane disrupts central pattern generator activity and coordination in the lamprey isolated spinal cord. *Anesthesiology*. 103, 567-575.
94. Jones, M. V., Brooks, P. A., Harrison, N. L. (1992). Enhancement of gamma-aminobutyric acid-activated Cl-currents in cultured rat hippocampal neurones by three volatile anaesthetics. *The Journal of physiology*, 449(1), 279-293.
95. Joo, H. S., Perks, W. J. (2000). Sevoflurane versus propofol for anesthetic induction: a meta-analysis. *Anesthesia & Analgesia*, 91(1), 213-219.
96. Jung, C. S., Lange, B., Zimmermann, M., Seifert, V. (2013). CSF and serum biomarkers focusing on cerebral vasospasm and ischemia after subarachnoid hemorrhage. *Stroke research and treatment*, 2013. Article ID 560305.
97. Juránek, I., Nikitovic, D., Kouretas, D., Hayes, A. W., Tsatsakis, A. M. (2013). Biological importance of reactive oxygen species in relation to difficulties of treating pathologies involving oxidative stress by exogenous antioxidants. *Food and chemical toxicology*, 61, 240-247.
98. Harvey, W. J. (2008). Nature of Oxidants in Biology in Chapter 7. *The Erythrocyte: Physiology, Metabolism, and Biochemical Disorders*, In *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, by Kaneko, J. J., Harvey, W. J., Bruss L. M. 203-204, Elsevier Inc.
99. Kania, B. F., Ferdyn, K., Lonc, G. (2018). Analgesia/Anesthesia in Reptiles. *World Journal of Veterinary Science*, 6, 42-51.
100. Kato, K., Itami, T., Nomoto, K., Endo, Y., Tamura, J., Oyama, N., Sano, T., Yamashita, K. (2021). The anesthetic effects of intramuscular alfaxalone in dogs premedicated with low-dose medetomidine and/or butorphanol. *Journal of Veterinary Medical Science*, 83(1), 53-61.

101. Kenna, J.G., Jones, R.M. (1995). The organ toxicity of inhaled anesthetics. *Anesthesia & Analgesia*, 81, 51-66.
102. Kensler, T. W., Wakabayashi, N., Biswal, S. (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47, 89-116.
103. Kim, H., Oh, E., Im, H., Mun, J., Yang, M., Khim, J. Y., Lee, E., Lim, S.H., Kong, M.H., Lee, M., Sul, D. (2006). Oxidative damages in the DNA, lipids, and proteins of rats exposed to isofluranes and alcohols. *Toxicology*, 220(2-3), 169-178.
104. Kint, L. T., Seewoo, B. J., Hyndman, T. H., Clarke, M. W., Edwards, S. H., Rodger, J., Feindel, K.W., Musk, G. C. (2020). The pharmacokinetics of medetomidine administered subcutaneously during Isoflurane anaesthesia in Sprague-Dawley Rats. *Animals*, 10(6), 1050.
105. Klaunig, J. E., Kamendulis, L. M. (2004). The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44, 239-267.
106. Klaunig, J. E., Wang, Z. (2018). Oxidative stress in carcinogenesis. *Current Opinion in Toxicology*, 7, 116-121.
107. Korantzopoulos, P., Kolettis, T. M., Galaris, D., Goudevenos, J. A. (2007). The role of oxidative stress in the pathogenesis and perpetuation of atrial fibrillation. *International journal of cardiology*, 115(2), 135-143.
108. Kumar, R., Aakanksha, A. K., Verma, N. K., Saxena, A. C., Hoque, M. (2020). Systemic effects and clinical application of dexmedetomidine. *The Pharma Innovation Journal*, 9(11), 241-246
109. Kumar, R., Singh, M., Verma, N. K., Akash, R., Kumar, R., Hoque, M. (2020). Systemic effects and clinical application of medetomidine in animals: A review. *Indian journal of animal research*, 54(9), 1063-1068.
110. Kurdi, M. S., Theerth, K. A., Deva, R. S. (2014). Ketamine: Current applications in anesthesia, pain, and critical care. *Anesthesia, essays and researches*, 8(3), 283-290.
111. Kutara, K., Kanda, T., Maeta, N., Mochizuki, Y., Itoh, Y., Ono, F., Asanuma, T. (2020). Effects of Sedation by Intramuscular Administration of Medetomidine on Canine Abdominal Vascular System and Hepatic Parenchyma Imaging Using Enhancement Dynamic Computed Tomography. *Veterinary Sciences*, 7(3), 91-103.
112. Küçükakin, B., Gögenur, I., Reiter, R. J., Rosenberg, J. (2009). Oxidative stress in relation to surgery: is there a role for the antioxidant melatonin?. *Journal of Surgical Research*, 152(2), 338-347.
113. Lee, J. Y., Kim, M. C. (2012). Effect of propofol on oxidative stress status in erythrocytes from dogs under general anaesthesia. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 54(1), 1-4.
114. Lee, W. C., Wong, H. Y., Chai, Y. Y., Shi, C. W., Amino, N., Kikuchi, S., Huang, S. H. (2012). Lipid peroxidation dysregulation in ischemic stroke: plasma 4-HNE as a potential biomarker?. *Biochemical and biophysical research communications*, 425(4), 842-847.

115. Leffa, D. D., Bristot, B. N., Damiani, A. P., Borges, G. D., Daumann, F., Zambon, G. M., de Andrade, V. M. (2016). Anesthetic ketamine-induced DNA damage in different cell types in vivo. *Molecular neurobiology*, 53(8), 5575-5581.
116. Lenzi, C., Grasso, C., Rizzolo, J. B. (2020). Are exotics suitable pets?. *The Veterinary Record*, 186(14), 459-460.
117. Le Gal, K., Ibrahim, M. X., Wiel, C., Sayin, V. I., Akula, M. K., Karlsson, C., Bergo, M. O. (2015). Antioxidants can increase melanoma metastasis in mice. *Science translational medicine*, 7(308), 308re8-308re8.
118. Li, C., Hou, L., Chen, D., Lin, F., Chang, T., Li, M., Zhang, L., Niu, X., Wang, H., Fu, S., Zheng, J. (2017). Hydrogen-rich saline attenuates isoflurane-induced caspase-3 activation and cognitive impairment via inhibition of isoflurane-induced oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and reduction in ATP levels. *American journal of translational research*, 9(3), 1162-1172.
119. Li, F., Wang, X., Deng, Z., Zhang, X., Gao, P., Liu, H. (2018). Dexmedetomidine reduces oxidative stress and provides neuroprotection in a model of traumatic brain injury via the PGC-1 $\alpha$  signaling pathway. *Neuropeptides*, 72, 58-64.
120. Li, S., Tan, H. Y., Wang, N., Zhang, Z. J., Lao, L., Wong, C. W., Feng, Y. (2015). The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *International journal of molecular sciences*, 16(11), 26087-26124.
121. Li, W., Zhang, Y., Liu, Y., Yue, F., Lu, Y., Qiu, H., Gao, D., Gao, Y., Wu, Y., Wang, Z., Huang, R. (2012). In vitro kinetic evaluation of the free radical scavenging ability of propofol. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 116(6), 1258-1266.
122. Li, X. M., Zhou, M. T., Wang, X. M., Ji, M. H., Zhou, Z. Q., Yang, J. J. (2014). Resveratrol pretreatment attenuates the isoflurane-induced cognitive impairment through its anti-inflammation and-apoptosis actions in aged mice. *Journal of Molecular Neuroscience*, 52(2), 286-293.
123. Liu, X. R., Cao, L., Li, T., Chen, L. L., Yu, Y. Y., Huang, W. J., Liu, L., Tan, X. Q. (2017). Propofol attenuates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress and apoptosis via the mitochondria-and ER-mediated pathways in neonatal rat cardiomyocytes. *Apoptosis*, 22(5), 639-646.
124. Lu, A. L., Li, X., Gu, Y., Wright, P. M., Chang, D. Y. (2001). Repair of oxidative DNA damage. *Cell biochemistry and biophysics*, 35(2), 141-170.
125. Lyson, T. R., Rubidge, B. S., Scheyer, T. M., de Queiroz, K., Schachner, E. R., Smith, R. M., Botha-Brink, J., Bever, G. S. (2016). Fossorial origin of the turtle shell. *Current Biology*, 26(14), 1887-1894.
126. Ma, H., Liu, Y., Li, Z., Yu, L., Gao, Y., Ye, X., Yang, B., Li, H., Shi, J. (2021). Propofol Protects Against Hepatic Ischemia Reperfusion Injury via Inhibiting Bnip3-Mediated Oxidative Stress. *Inflammation*, 44(4), 1288-1301.
127. Ma, K., Shi, H. (2017). Red-eared slider *Trachemys scripta elegans* (Wied-Neuwied). In *Biological invasions and its management in China Vol 2*, by Wan, F., Jiang, M., Zhan, A. 49-76, Springer, Singapore.
128. Madsen, M. T., Küçükakin, B., Lykkesfeldt, J., Rosenberg, J., Gögenur, I. (2012). Oxidative stress response after laparoscopic versus conventional sigmoid resection: A

- randomized, double-blind clinical trial. *Surgical Laparoscopy Endoscopy & Percutaneous Techniques*, 22(3), 215-219.
129. Maher, D. P., Chen, L., Mao, J. (2017). Intravenous ketamine infusions for neuropathic pain management: a promising therapy in need of optimization. *Anesthesia & Analgesia*, 124(2), 661-674.
  130. Mallard, J. M., Rieser, T. M., Peterson, N. W. (2018). Propofol infusion-like syndrome in a dog. *The Canadian Veterinary Journal*, 59(11), 1216-1222.
  131. Manataki, A. D., Tselepis, A. D., Glantzounis, G. K., Arnaoutoglou, H. M., Tsimoyiannis, E. C., Stavropoulos, N. E. (2001). Lipid peroxidation and the use of emulsified propofol in laparoscopic surgery. *Surgical endoscopy*, 15(9), 950-953.
  132. Marik, P. E. (2004). Propofol: therapeutic indications and side-effects. *Current pharmaceutical design*, 10(29), 3639-3649.
  133. Massey, C. A., Richerson, G. B. (2017). Isoflurane, ketamine-xylazine, and urethane markedly alter breathing even at subtherapeutic doses. *Journal of neurophysiology*, 118(4), 2389-2401.
  134. Mathew, N., Kalyanasundaram, M., Balaraman, K., (2006). Glutathione S-transferase (GST) inhibitors. *Expert opinion on therapeutic patents*, 16(4), 431-444.
  135. Mathy-Hartert, M., Mouithys-Mickalad, A., Kohnen, S., Deby-Dupont, G., Lamy, M., Hans, P. (2000). Effects of propofol on endothelial cells subjected to a peroxy nitrite donor (SIN-1). *Anaesthesia*, 55(11), 1066-1071.
  136. Matthews, N.S., Brown, R.M., Barling, K.S., Lovering, S.L., Herrig, B.W. (2004). Repetitive propofol administration in dogs and cats. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 40(4), 255-60.
  137. Mikstacki, A., Zakerska-Banaszak, O., Skrzypczak-Zielinska, M., Tamowicz, B., Szalata, M., Slomski, R. (2015). Glutathione S-transferase as a toxicity indicator in general anesthesia: genetics and biochemical function. *Journal of clinical anesthesia*, 27(1), 73-79.
  138. Mila-Kierzenkowska, C., Woźniak, A., Drewna, T., Woźniak, B., Szpinda, M., Krzyżyńska-Malinowska, E., Rajewski, P. (2013). Effects of open versus laparoscopic nephrectomy techniques on oxidative stress markers in patients with renal cell carcinoma. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013, Article ID 438321.
  139. Mion, G., Villeveille, T. (2013). Ketamine pharmacology: an update (pharmacodynamics and molecular aspects, recent findings). *CNS neuroscience & therapeutics*, 19(6), 370-380.
  140. Misra, H. P., Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological chemistry*, 247(10), 3170-3175.
  141. Miyabe-Nishiwaki, T., Kaneko, A., Yamanaka, A., Maeda, N., Suzuki, J., Tomonaga, M., Masui, K. (2021). Propofol infusions using a human target controlled infusion (TCI) pump in chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Scientific reports*, 11(1), 1-8.
  142. Moaddel, R., Sanghvi, M., Ramamoorthy, A., Jozwiak, K., Singh, N., Green, C., O'Loughlin, K., Torjman, M., Wainer, I. W. (2016). Subchronic administration of (R, S)-

- ketamine induces ketamine ring hydroxylation in Wistar rats. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 127, 3-8.
143. Moll F.H., Schultheiss D. (2019). How Endoscopy Founded Modern Urology. In: *Urologic Oncology*, by Merseburger A., Burger M. Springer, Cham.
  144. Morena, M., Delbosc, S., Dupuy, A. M., Canaud, B., Cristol, J. P. (2005). Overproduction of reactive oxygen species in end-stage renal disease patients: a potential component of hemodialysis-associated inflammation. *Hemodialysis international*, 9(1), 37-46
  145. Morgan, C. J., Curran, H. V., Independent Scientific Committee on Drugs (ISCD). (2012). Ketamine use: a review. *Addiction*, 107(1), 27-38.
  146. Murray, J. M., Phillips, A. S., Fee, J. P. H. (1994). Comparison of the effects of isoflurane and propofol on hepatic glutathione-S-transferase concentrations during and after prolonged anaesthesia. *British journal of anaesthesia*, 72(5), 599-601.
  147. Natalini, C. (2021). Anesthetic effects of emulsified isoflurane, sevoflurane, or propofol in Koi carp (*Cyprinus carpio*). *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 48(6), 996-997.
  148. Ni, C., Li, C., Dong, Y., Guo, X., Zhang, Y., Xie, Z. (2017). Anesthetic isoflurane induces DNA damage through oxidative stress and p53 pathway. *Molecular neurobiology*, 54(5), 3591-3605.
  149. Niesters, M., Martini, C., Dahan, A. (2014). Ketamine for chronic pain: risks and benefits. *British journal of clinical pharmacology*, 77(2), 357-367.
  150. Nishiyama, T., Yamashita, K., Yokoyama, T. (2005). Stress hormone changes in general anesthesia of long duration: isoflurane-nitrous oxide vs sevoflurane-nitrous oxide anesthesia. *Journal of clinical anesthesia*, 17(8), 586-591.
  151. Njoku, D. B., Shrestha, S., Soloway, R., Duray, P. R., Tsokos, M., Abu-Asab, M. S., Pohl, L.R. West, A. B. (2002). Subcellular localization of trifluoroacetylated liver proteins in association with hepatitis following isoflurane. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 96(3), 757-761.
  152. Ortiz, G.G., Pacheco Moisés, F., Mireles-Ramírez, M., Flores-Alvarado, L., González-Usigli, H., Sánchez-González, V., Sánchez-López, A., Sánchez-Romero, L., Díaz-Barba, E., Santoscoy-Gutiérrez, J.F., Rivero-Moragrega, P. (2017). Oxidative Stress: Love and Hate History in Central Nervous System, In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, by Donev, R. 108, 1-31, Academic Press.
  153. Oruç, E. Ö., Üner, N. (2000). Combined effects of 2, 4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 127(3), 291-296.
  154. Ozkan, F., Şenayli, Y., Ozyurt, H., Erkorkmaz, U., Bostan, B. (2012). Antioxidant effects of propofol on tourniquet-induced ischemia-reperfusion injury: an experimental study. *Journal of Surgical Research*, 176(2), 601-607.
  155. O'Brien, J.A. (1970). Bronchoscopy in the dog and cat. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 156, 213-217

156. Östman, B., Michaëlsson, K., Helmersson, J., Byberg, L., Gedeberg, R., Melhus, H., Basu, S. (2009). Oxidative stress and bone mineral density in elderly men: antioxidant activity of alpha-tocopherol. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(5), 668-673.
157. Pappas-Gogos, G., Tellis, C., Lasithiotakis, K., Tselepis, A. D., Tsimogiannis, K., Tsimoyiannis, E., Chalkiadakis, G. Chrysos, E. (2013). Oxidative stress markers in laparoscopic versus open colectomy for cancer: a double-blind randomized study. *Surgical endoscopy*, 27(7), 2357-2365.
158. Pascoe, J. P., Steffey, P. E. (2018). 9 Introduction to Drugs Acting on the Central Nervous System and Principles of Anesthesiology. In *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, by Riviere, E.J., Papich, G.M., 167-193. Wiley-Blackwell
159. Pearson, S.H., Avery, H.W., Spotila, J.R. (2015). Juvenile invasive red-eared slider turtles negatively impact the growth of native turtles: implications for global freshwater turtle populations. *Biological Conservation*, 186, 115-121.
160. Peltoniemi, M. A., Hagelberg, N. M., Olkkola, K. T., Saari, T. I. (2016). Ketamine: a review of clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics in anesthesia and pain therapy. *Clinical pharmacokinetics*, 55(9), 1059-1077.
161. Perouansky, M., Rau, V., Ford, T., Oh, S. I., Perkins, M., Eger, E. I., Pearce, R. A. (2010). Slowing of the hippocampal theta rhythm correlates with anesthetic-induced amnesia. *Anesthesiology*, 113, 1299-1309.
162. Piskounova, E., Agathocleous, M., Murphy, M. M., Hu, Z., Huddlestun, S. E., Zhao, Z., Morrison, S. J. (2015). Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells. *Nature*, 527(7577), 186-191.
163. Plaa, G.L. (2000). Chlorinated methanes and liver injury: highlights of the past 50 years. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 40, 42-65.
164. Pokhrel, L. R., Grady, K. D. (2021). Risk assessment of occupational exposure to anesthesia Isoflurane in the hospital and veterinary settings. *Science of the Total Environment*, 783, 146894.
165. Polat, B., Albayrak, Y., Suleyman, B., Dursun, H., Odabasoglu, F., Yigiter, M., Halici, Z., Suleyman, H. (2011). Antiulcerative effect of dexmedetomidine on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Pharmacological Reports*, 63(2), 518-526.
166. Polgar, M., Domijan, A.M., Ralić, J. (2010). Optimiziranje metode za određivanje koncentracije malondialdehida u biološkim uzorcima. 8. susret mladih kemijskih inženjera, Zagreb, 2010. - knjiga sažetaka (ured. Bolf, N., Šoljić Jerbić, I.), Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, 167.
167. Posner P. L. (2018). 12 Injectable Anesthetic Agents. In *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, by Riviere, E.J., Papich, G.M., 247-280. Wiley-Blackwell.
168. Posner P. L. (2018a). 14 Sedatives and Tranquilizers. In *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, by Riviere, E.J., Papich, G.M., 324-368. Wiley-Blackwell.
169. Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, 2(2), 219-236.

170. Ramsay, N. F., Ng, P. K. A., O'Riordan, R. M., Chou, L. M. (2007). The red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) in Asia: a review. In *Biological invaders in inland waters: Profiles, distribution, and threats* by Gherardi, F. , 161-174. Springer, Dordrecht,
171. Rankin, E. Á., Giaccia, A. J. (2008). The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death & Differentiation*, 15(4), 678-685.
172. Raoof, A. A., Augustijns, P. R., Verbeeck, R. K. (1996). In vivo assessment of intestinal, hepatic, and pulmonary first pass metabolism of propofol in the rat. *Pharmaceutical research*, 13(6), 891-895.
173. Ray, P. D., Huang, B. W., Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling*, 24(5), 981-990.
174. Riedesel, H.D. (2008). Chapter 6. Anesthetics. IV. Injectable anesthetics. C. Propofol. In *Handbook of Veterinary Pharmacology* by Walter H. Hus , 146-147. Wiley-Blackwell.
175. Ristić-Anđelkov, A., Baškot, B., Damjanović, M., Rafajlovski, S. (2005). Ishemijsko prekonicioniranje. *Vojnosanitetski Pregled: Military Medical & Pharmaceutical Journal of Serbia*, 62(1), 73-77.
176. Rizzo, A., Minoia, G., Trisolini, C., Mutinati, M., Spedicato, M., Jirillo, F., Sciorsci, R.L. (2009). Reactive oxygen species (ROS): involvement in bovine follicular cysts etiopathogenesis. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 31(4), 631-635.
177. Rocha, F. L., de Vasconcelos Cunha, U. G., Paschoalin, R. C., Hara, C., Thomaz, D. P. (2021). Use of subcutaneous ketamine to rapidly improve severe treatment-resistant depression in a patient with Alzheimer's disease. *International Clinical Psychopharmacology*, 36(2), 104-105.
178. Rocha, T. L., Dias-Junior, C. A., Possomato-Vieira, J. S., Gonçalves-Rizzi, V. H., Nogueira, F. R., de Souza, K. M., Braz, L. G., Braz, M. G. (2015). Sevoflurane induces DNA damage whereas isoflurane leads to higher antioxidative status in anesthetized rats. *Biomed research international*, 2015, Article ID 264971.
179. Rosenberg, H., Pollock, N., Schiemann, A., Bulger, T., Stowell, K. (2015) Malignant hyperthermia: a review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 10(1), 1-19.
180. Sahinovic, M. M., Struys, M. M., Absalom, A. R. (2018). Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of propofol. *Clinical pharmacokinetics*, 57(12), 1539-1558.
181. Sakabe, M., Fujiki, A., Sakamoto, T., Nakatani, Y., Mizumaki, K., Inoue, H. (2012). Xanthine oxidase inhibition prevents atrial fibrillation in a canine model of atrial pacing-induced left ventricular dysfunction. *Journal of cardiovascular electrophysiology*, 23(10), 1130-1135.
182. Seiseddos, A., Galán, A., Carletti, B., Quirós, S., Funes, F., Martín, E. M., Granados, M. M. (2019). Anesthetic effects of isoflurane and propofol on cerebrospinal fluid biochemical markers in healthy dogs. *Veterinary clinical pathology*, 48(2), 270-275.
183. Schüttler, J., Schwilden, (2008). *Modern anesthetics*, 344-345. New York, NY: Springer.
184. Senoner, T., Dichtl, W. (2019). Oxidative stress in cardiovascular diseases: still a therapeutic target?. *Nutrients*, 11(9), 2090.

185. Shen, X., Bhatt, N., Xu, J., Meng, T., Aon, M. A., O'Rourke, B., Berkowitz, D.E., Cortassa, S. Gao, W. D. (2014). Effect of isoflurane on myocardial energetic and oxidative stress in cardiac muscle from Zucker diabetic fatty rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 349(1), 21-28.
186. Shimizu, Y., Kanda, T. (2021). Effects of Pre-Anesthesia Anxiety on Propofol Induction Dose in Cats. *Animals*, 11(7), 2126.
187. Shinjo, T., Tanaka, T., Okuda, H., Kawaguchi, A. T., Oh-Hashi, K., Terada, Y., Isonishi, A., Morita-Takemura, S., Tatsumi, K., Kawaguchi, M., Wanaka, A. (2018). Propofol induces nuclear localization of Nrf2 under conditions of oxidative stress in cardiac H9c2 cells. *PLoS One*, 13(4), e0196191.
188. Sinclair, M. D. (2003). A review of the physiological effects of  $\alpha$ 2-agonists related to the clinical use of medetomidine in small animal practice. *The Canadian veterinary journal*, 44(11), 885-897.
189. Singh, A., Azad, M., Shymko, M. D., Henson, E. S., Katyal, S., Eisenstat, D. D., Gibson, S. B. (2018). The BH3 only Bcl-2 family member BNIP3 regulates cellular proliferation. *PloS one*, 13(10), e0204792.
190. Singh, U., Jialal, I. (2006). Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology*, 13(3), 129-142.
191. Sladky, K. K., Mans, C. (2012). Clinical anesthesia in reptiles. *Journal of exotic pet medicine*, 21(1), 17-31.
192. Shioya, N., Ishibe, Y., Shibata, S., Makabe, H., Kan, S., Matsumoto, N., Endo, S. (2011). Green urine discoloration due to propofol infusion: a case report. *Case reports in emergency medicine*, 2011, Article ID 242514.
193. Song, Y., Li, N., Gu, J., Fu, S., Peng, Z., Zhao, C., Zhang, Y., Li, X., Wang, Z., Li, X., Liu, G. (2016).  $\beta$ -Hydroxybutyrate induces bovine hepatocyte apoptosis via an ROS-p38 signaling pathway. *Journal of Dairy Science*, 99(11), 9184-9198.
194. Song, Y., Li, X., Gong, X., Zhao, X., Ma, Z., Xia, T., Gu, X. (2019). Green tea polyphenols improve isoflurane-induced cognitive impairment via modulating oxidative stress. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 73, 108213.
195. Sosunov, S. A., Ameer, X., Niatsetskaya, Z. V., Utkina-Sosunova, I., Ratner, V. I., Ten, V. S. (2015). Isoflurane anesthesia initiated at the onset of reperfusion attenuates oxidative and hypoxic-ischemic brain injury. *PloS one*, 10(3), e0120456.
196. Strasser, A., Kühnel, H., Velde, K., Dadak, A. (2012). Immunomodulation during and after castration under inhalation anaesthetic without genotoxic effects on equine lymphocytes. *Research in veterinary science*, 92(2), 306-310.
197. Takizawa, D., Sato, E., Hiraoka, H., Tomioka, A., Yamamoto, K., Horiuchi, R., Goto, F. (2005). Changes in apparent systemic clearance of propofol during transplantation of living related donor liver. *British journal of anaesthesia*, 95(5), 643-647.
198. Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C. Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis*, 35(3), 206-221.



199. Tsai, K., Wang, S. S., Chen, T. S., Kong, C. W., Chang, F. Y., Lee, S. D., Lu, F. J. (1998). Oxidative stress: an important phenomenon with pathogenetic significance in the progression of acute pancreatitis. *Gut*, 42(6), 850-855.
200. Tsuchiya, M., Sato, E. F., Inoue, M., Asada, A. (2008). Open abdominal surgery increases intraoperative oxidative stress: can it be prevented?. *Anesthesia & Analgesia*, 107(6), 1946-1952.
201. Ucar, M., Oztgöl, U., Polat, A., Toprak, H. I., Erdogan, M. A., Aydogan, M. S., Durmus, M., Ersoy, M. O. (2015, March). Comparison of antioxidant effects of isoflurane and propofol in patients undergoing donor hepatectomy. *Transplantation proceedings*, 47(2), 469-472.
202. Uchegbu, I., Jones, M. C., Corrente, F., Godfrey, L., Laghezza, D., Carafa, M., Holm, P., Schatzlein, A. (2014). The oral and intranasal delivery of propofol using chitosan amphiphile nanoparticles. *Pharmaceutical Nanotechnology*, 2(2), 65-74.
203. Urošević, A., Tomović, L., Ajtić, R., Simović, A., Džukić, G. (2016). Alterations in the reptilian fauna of Serbia: Introduction of exotic and anthropogenic range expansion of *Aneley* native species. *Herpetozoa*, 28(3/4), 115-132.
204. Urošević, A., Popović, M., Maričić, M., Pomorišac, G., Petrović, D., Grabovac, D., Surla, A., Medenica, I., Avramović, S. Golubović, A. (2019). Spread of *Trachemys scripta* ssp.(Testudines, Emydidae) in Serbia, with overview of possible reproduction.
205. Valčić, O., Milanović, S., Došenović, M., Özvegy, J., Radaković, M., Vejnović, B., Vučićević, M. (2021). Plasma glutathione peroxidase (gpx 3) activity in the freshwater turtle *Trachemys scripta elegans* after isoflurane inhalation anesthesia. *Veterinarski glasnik*, 75(1), 76-82.
206. Valko, M., Rhodes, C. J. B., Moncol, J., Izakovic, M. M., Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160(1), 1-40.
207. Van Allen, N. R., Krafft, P. R., Leitzke, A. S., Applegate, R. L., Tang, J., Zhang, J. H. (2012). The role of Volatile Anesthetics in Cardioprotection: a systematic review. *Medical gas research*, 2(1), 1-13.
208. Wan, L. B., Levitch, C. F., Perez, A. M., Brallier, J. W., Iosifescu, D. V., Chang, L. C., Foulkes, A., Mathew, S.J., Charney, D.S. Murrough, J. W. (2014). Ketamine safety and tolerability in clinical trials for treatment-resistant depression. *The Journal of clinical psychiatry*, 76(3), 0-0.
209. Wang, R., Zhang, Z., Kumar, M., Xu, G., Zhang, M. (2019). Neuroprotective potential of ketamine prevents developing brain structure impairment and alteration of neurocognitive function induced via isoflurane through the PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$  pathway. *Drug design, development and therapy*, 13, 501-512.
210. Wu, K. C., Yang, S. T., Hsu, S. C., Chiang, J. H., Hsia, T. C., Yang, J. S., Liu, K.C., Wu, R.S.C. Chung, J. G. (2013). Propofol induces DNA damage in mouse leukemic monocyte macrophage RAW264. 7 cells. *Oncology reports*, 30(5), 2304-2310.
211. Wu, W. S., Tsai, R. K., Chang, C. H., Wang, S., Wu, J. R., Chang, Y. X. (2006). Reactive oxygen species mediated sustained activation of protein kinase C  $\alpha$  and

- extracellular signal-regulated kinase for migration of human hepatoma cell Hepg2. *Molecular Cancer Research*, 4(10), 747-758.
212. Wu, Z. L., Davis, J. R. J., Zhu, Y. (2020). Dexmedetomidine protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by ameliorating oxidative stress and cell apoptosis through the Trx1-dependent Akt pathway. *BioMed Research International*, 2020, Article ID 897927.
  213. Xu, J. J., Wang, Y. L. (2008). Propofol attenuation of hydrogen peroxide-mediated oxidative stress and apoptosis in cultured cardiomyocytes involves haeme oxygenase-1. *European journal of anaesthesiology*, 25(5), 395-402.
  214. Xu, W., Wang, P., Wang, D., Liu, K., Zhang, S., Zhao, W., Liu, G. (2021). S-ketamine alleviates carbon tetrachloride-induced hepatic injury and oxidative stress by targeting the Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 99(12), 1308-1315.
  215. Yazihan, N., Uzuner, K., Salman, B., Vural, M., Koken, T., Arslantas, A. (2008). Erythropoietin improves oxidative stress following spinal cord trauma in rats. *Injury*, 39(12), 1408-1413.
  216. Yiannakopoulou, E. C., Nikiteas, N., Perrea, D., Tsigris, C. (2013). Effect of laparoscopic surgery on oxidative stress response: systematic review. *Surgical Laparoscopy Endoscopy & Percutaneous Techniques*, 23(2), 101-108.
  217. Yiannakopoulou, E., Nikiteas, N., Perrea, D., Tsigris, C. (2013). Minimally invasive surgery and oxidative stress response: what have we learned from animal studies? *Surgical Laparoscopy Endoscopy & Percutaneous Techniques*, 23(1), 25-28.
  218. Yu, W., Gao, D., Jin, W., Liu, S., Qi, S. (2018). Propofol prevents oxidative stress by decreasing the ischemic accumulation of succinate in focal cerebral ischemia-reperfusion injury. *Neurochemical research*, 43(2), 420-429.
  219. Zanos, P., Moaddel, R., Morris, P. J., Wainer, I. W., Albuquerque, E. X., Thompson, S. M., Thomas, C.J., Zarate, C.A., Gould, T.D. (2017). Reply to: antidepressant actions of ketamine versus hydroxynorketamine. *Biological psychiatry*, 81(8), 69-71.
  220. Zanos, P., Moaddel, R., Morris, P. J., Riggs, L. M., Highland, J. N., Georgiou, P., Pereira, E.F., Albuquerque, E.X., Thomas, C.J., Zarate, C.A., Gould, T. D. (2018). Ketamine and ketamine metabolite pharmacology: insights into therapeutic mechanisms. *Pharmacological reviews*, 70(3), 621-660.
  221. Zapata, L. M., Bock, B. C., Orozco, L. Y., Palacio, J. A. (2016). Application of the micronucleus test and comet assay in *Trachemys callirostris* erythrocytes as a model for in situ genotoxic monitoring. *Ecotoxicology and environmental safety*, 127, 108-116.
  222. Zhang, Y., Dong, Y., Wu, X., Lu, Y., Xu, Z., Knapp, A., Yue, Y., Xu, T., Xie, Z. (2010). The mitochondrial pathway of anesthetic isoflurane-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 285(6), 4025-4037.
  223. Zhao, X., Venkata, S. L. V., Moaddel, R., Luckenbaugh, D. A., Brutsche, N. E., Ibrahim, L., Zarate Jr, C.A., Mager, D.E., Wainer, I. W. (2012). Simultaneous population pharmacokinetic modelling of ketamine and three major metabolites in patients with treatment-resistant bipolar depression. *British journal of clinical pharmacology*, 74(2), 304-314.

224. Zhou, D., Zhuang, J., Wang, Y., Zhao, D., Zhao, L., Zhu, S., Pu, J., Yin, M., Zhang, H., Wang, Z., Hong, J. (2019). Propofol alleviates DNA damage induced by oxygen glucose deprivation and reperfusion via FoxO1 nuclear translocation in H9c2 cells. *Frontiers in physiology*, 10, 223.
225. Zimmerman, L. M., Paitz, R. T., Vogel, L. A., Bowden, R. M. (2010). Variation in the seasonal patterns of innate and adaptive immunity in the red-eared slider (*Trachemys scripta*). *Journal of Experimental Biology*, 213(9), 1477-1483.
226. Ziolo, M. S., Bertelsen, M. F. (2009). Effects of propofol administered via the supravertebral sinus in red-eared sliders. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 234(3), 390-393.

## BIOGRAFIJA

Milan Došenović rođen je 06. maja 1992. godine u Sanskom Mostu (Bosna i Hercegovina), gde je završio osnovnu i srednju školu. Studije veterinarske medicine upisao je 2010. godine, a diplomirao je 2018. godine sa prosečnom ocenom 8,57 (osam i 57/100). Iste godine upisuje doktorske akademske studije na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Tokom doktorskih akademskih studija položio je sve ispite predviđene planom i programom sa prosečnom ocenom 9,18 (devet i 18/100).

Nakon završetka integrisanih akademskih studija Milan Došenović je izabran u zvanje istraživača pripravnika i stručni i naučni rad obavljao je na Katedri za bolesti kopitara, mesojeda, živine i divljači i na Katedri za biologiju Fakulteta veterinarske medicine. Znanja i veštine je sticao u okviru Nastavne bolnice za male životinje i Laboratorije za genetiku životinja u okviru navedenih katedri.

Učestvovao je na brojnim stručnim i naučnim simpozijumima i konferencijama. Stručne i naučne radove je publikovao u domaćim i stranim časopisima i to ukupno 8, od čega su tri rada u časopisima sa SCI liste. Milan Došenović je učestvovao kao istraživač na projektu: „*European Brown Hair Syndrome* i smanjenje populacije vrste *Lepus europaeus* u Republici Srbiji“. Projekat finansiran od strane Uprave za šume, Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, a kojim je rukovodio prof. dr Miloš Vučićević.

## IZJAVA O AUTORSTVU

Potpisani Milan Došenović

Broj upisa:

Izjavljujem

Da je doktorska disertacija pod naslovom „Ispitivanje uticaja endoskopske dijagnostike u opštoj anesteziji na parametre oksidativnog stresa i stepen oštećenja DNK kod crvenouhих kornjača (*Trachemys scripta elegans*)“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada
- da predložena disertacija u cjelini ni u djelovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova
- da su rezultati konkretno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu,  
2023. godine

Potpis doktoranda

## IZJAVA O ISTOVJETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE DOKTORSKOG RADA

Ime i Prezime autora: Milan Došenović

Broj upisa:

Studijski program: doktorske akademske studije

Naslov rada: Ispitivanje uticaja endoskopske dijagnostike u opštoj anesteziji na parametre oksidativnog stresa i stepen oštećenja DNK kod crvenouhkih kornjača (*Trachemys scripta elegans*).

Mentor 1: Prof. dr Miloš Vučićević

Mentor 2: Prof. dr Mirjana Milovanović

Potpisani Milan Došenović

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovjetna elektronskoj verziji koju sam predao za objavljivanje na portalu Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mjesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu,

2023. godine

Potpis doktoranda

## IZJAVA O KORIŠĆENJU

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom „Ispitivanje uticaja endoskopske dijagnostike u opštoj anesteziji na parametre oksidativnog stresa i stepen oštećenja DNK kod crvenouhих kornjača (*Trachemys scripta elegans*)“, koja je moje autorsko djelo.

Disertaciju sa svim prilogima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
- 3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade**
4. Autorstvo - nekomercijalno -djeliti pod istim uslovima
5. Autorstvo - bez prerade
6. Autorstvo - djeliti pod istim uslovima

U Beogradu,  
2023. godine

Potpis doktoranda