



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

**ВРЕДНОСТИ ПАРАМЕТАРА ОКСИДАЦИОНОГ
СТРЕСА И ИНФЛАМАЦИЈЕ КОД ПАЦИЈЕНАТА СА
ПРЕЛОМОМ КУКА И БУТНЕ КОСТИ**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

др Горан Пешић

Ментор: проф. др Бранко Ристић

Јун, 2017. Крагујевац

САДРЖАЈ

I УВОД	5
1.1 КОСТИ БУТА.....	6
1.1.1 Анатомија бутне кости	6
1.1.2 Основне карактеристике бутне кости	8
1.1.3 Биомеханика бутне кости.....	9
1.2 ПРЕЛОМИ БУТНЕ КОСТИ.....	9
1.2.1 Класификација прелома бутне кости	10
1.2.2 Епидемиолошке одлике прелома бутне кости	14
1.2.3 Клиничка слика прелома бутне кости.....	14
1.2.4 Дијагноза прелома бутне кости	15
1.2.5 Лечење прелома бутне кости	15
1.3 ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС	16
1.3.1 Реактивне врсте кисеоника (ROS).....	17
1.3.2 Липидна пероксидација.....	19
1.3.3 Реактивне врсте азота (RNS).....	20
1.3.4 Антиоксидациони заштитни систем	21
1.4 ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС И ПРЕЛОМИ КОСТИЈУ	25
1.5 ЦИТОКИНИ	27
1.5.1 Проинфламаторни цитокини	27
1.6 ЛИПИДНИ МЕДИЈАТОРИ ИНФЛАМАЦИЈЕ.....	29
1.7 ИНФЛАМАЦИЈА И ПРЕЛОМИ КОСТИЈУ	34
II ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	37
2.1 ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	38
III МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	39
3.1 Популација која се испитује.....	40
3.2 Протокол истраживања.....	40
3.2.1 Биохемијске анализе.....	41
3.3 Статистичка обрада података	51

IV РЕЗУЛТАТИ.....	52
4.1 ДЕМОГРАФСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ИСПИТАНИКА	53
4.2 РЕДОКС СТАТУС	54
4.2.1 Поређење параметара оксидационог стреса у плазми између контролне и експерименталне групе.....	54
4.2.2 Динамика промене нивоа параметара оксидационог стреса током ране фазе зарастања костију.....	56
4.2.3 Поређење параметара антиоксидационих ензима у еритроцитима између контролне и експерименталне групе.....	58
4.2.4 Динамика промене нивоа антиоксидационих ензима током ране фазе зарастања костију.....	59
4.3 ИНФЛАМАТОРНИ МЕДИЈАТОРИ	62
4.3.1 Поређење нивоа инфламаторних медијатора између контролне и експерименталне групе.....	62
4.3.2 Динамика промене нивоа инфламаторних медијатора током ране фазе зарастања костију.....	63
4.4 МАСНОКИСЕЛИНСКИ ПРОФИЛ УКУПНИХ ЛИПИДА ПЛАЗМЕ	65
4.4.1 Поређење маснокиселинског профила укупних липида плазме између контролне и експерименталне групе	66
4.4.2 Динамика промене маснокиселинског профила укупних липида плазме током ране фазе зарастања костију	68
V ДИСКУСИЈА	70
5.1 РЕДОКС СТАТУС	73
5.1.1 Поређење параметара оксидационог стреса у плазми између контролне и експерименталне групе.....	73
5.1.2 Динамика промене нивоа параметара оксидационог стреса током ране фазе зарастања костију.....	75
5.1.3 Поређење параметара антиоксидационих ензима у еритроцитима између контролне и експерименталне групе.....	76
5.1.4 Динамика промене нивоа параметара антиоксидационих ензима током ране фазе зарастања костију.....	78

5.2 ИНФЛАМАТОРНИ МЕДИЈАТОРИ	80
5.2.1 Поређење нивоа инфламаторних медијатора између контролне и експерименталне групе.....	80
5.2.2 Динамика промене нивоа инфламаторних медијатора током ране фазе зарастања костију.....	81
5.3 МАСНОКИСЕЛИНСКИ ПРОФИЛ УКУПНИХ ЛИПИДА ПЛАЗМЕ	84
5.3.1 Поређење маснокиселинског профила укупних липида плазме између контролне и експерименталне групе	84
5.3.2 Динамика промене маснокиселинског профила укупних липида плазме током ране фазе зарастања костију	85
VI ЗАКЉУЧЦИ	87
VII ЛИТЕРАТУРА.....	89

I УВОД

1.1 КОСТИ БУТА

Кости бута, чини само једна дуга и масивна кост која се назива бутна кост (фемур). Бутна кост је парна, највећа и најдужа кост човечијег скелета. Налази се у пределу бута, а њена основна улога је да преноси тежину тела са карличне кости на голењачу (1, 2). Посматрана у природном положају, ова кост је постављена косо наниже и унутра. Горњи делови десне и леве бутне кости су међусобно раздвојени ширином мале карлице, за разлику од њихових доњих делова, који су ближи један другоме тако да се унутрашње стране оба колена додирују (1).

1.1.1 Анатомија бутне кости

На бутној кости разликујемо један средишњи део које се назива тело (*corpus femoris*) и два масивна крајка (*extremitas proximalis et distalis*). Горњи крајак бутне кости, зглобљава се са карличном кости и гради кук, док доњи крајак са голењачом и чашицом гради зглоб колена (*art. genus*) (2, 3).

1.1.1.1 Тело бутне кости

Тело бутне кости је дугачко, испупчено напред и управљено косо наниже ка унутра. Оно је троугласто-призматично и конвексно тако да на њему разликујемо предњу (*facies anterior*), спољашњу (*facies lateralis*) и унутрашњу (*facies medialis*) страну као и три ивице (спољашњу, унутрашњу и задњу ивицу). Спољашња и унутрашња ивица су заобљене и нејасне, али супротно од њих, задња ивица је веома изражена и назива се хрпава линија (*linea aspera*). Управо због заобљених ивица, стране тела бутне кости нису јасно одређене, осим позади где *linea aspera* одваја спољашњу од унутрашње стране.

Предња страна бутне кости је глатка и испупчена, а на њој се припаја средњи стегнени мишић. Врло мали, доњи део ове стране служи за припој постстегненог мшића. Слично предњој и спољашња и унутрашња страна бутне кости је глатка и испупчена. С тим што се на спољашњој страни припаја *m. vastus intermedicus*, док је унутрашња страна

без мишићног припоја прекривена влакнима унутрашњег стегненог мишића (*m. vastus medialis*) (3-5).

1.1.1.2 Горњи крајак бутне кости (проксимални крајак бутне кости)

Горњи крајак (*extremitas superior*) бутне кости заклапа са телом туп угао, а састоји се из главе бутне кости, врата бутне кости, великог трохантера и малог трохантера.

Глава бутне кости (*caput femoris*) је глатко, лоптасто испупчење које је управљено унутра, навише и напред, а обложена је зглобном хрскавицом. Увлачи се у ацетабулум карличне кости, а око њене средине се налази јамица главе бутне кости (*fovea capitalis*) у којој се припаја веза главе бутне кости. Глава бутне кости се наставља на врат бутне кости (6, 7).

Врат бутне кости (*collum femoris*) пружа се косо, наниже и упоље од главе према телу бутне кости. Осовина врата и осовина тела бутне кости међусобно заклапају туп угао од око 125 степени који се назива колодијафизни угао. Овај угао олакшава извођење покрета у зглобу кука и обично је због ширине мале карлице већи код мушкараца него код жена. Врат је најужи у својој средини, при чему је шири према телу него према глави бутне кости (1, 2). Врат бутне кости са главом бутне кости заклапа угао од 140 до 145 степени. Зглобна чаура одваја врат од тела бутне кости. Шупљина ове чауре има синовијални део који обезбеђује клизање зглоба кука. Глава фемура се снабдева крвљу из три извора: *arteria ligae teres femoris*, *arteria circumflexa posterior* и медуларних крвних судова. Снабдевање главе и врата крвљу је слабо, а слаби још више како се иде од базе врата ка субкапиталном делу (4).

Велики трохантер (*trochanter major*) бутне кости налази се споља од врата бутне кости. Представља једно велико, четвртасто испупчење и једини део горњег крајка бутне кости који се може опипати на живо што уједно има и практични значај. *Distantio bitrochanterica* представља растојање између великих трохантера, десне и леве бутне кости и нормално износи 30-32 cm и убраја се у спољне мере карлице. На великом трохантеру описујемо спољашњу и унутрашњу страну и четири ивице, предњу, задњу, горњу и доњу.

Мали трохантер (*trochanter minor*) бутне кости је мање, конично (купасто) испупчење које се одваја од задњег дела врата, на месту његовог споја са телом бутне кости и забачена је према назад и медијално (1, 2).

1.1.1.3 Доњи крајак бутне кости

Доњи крајак (*extremitas inferior*) бутне кости масивнији је од горњег крајака и преноси тежину са бутне кости на голењачу. Састоји се из спољашњег и унутрашњег кондила која представљају два масивна испупчења која су делимично прекривена зглобном хрскавицом. Спољашњи кондил (*condylus lateralis*) и унутрашњи кондил (*condylus medialis*) се налазе у истој равни, а њихове зглобне површине на доњим странама се пружају навише и спајају у глатку чашичну површину (*facies patellaris*) која се зглобљава са чашицом. Спољашњи део чашичне површине лежи изнад спољашњег дела кондиле и јаче је истакнут од њеног унутрашњег дела. Међукондиларна јама (*Flossa intercondylaris*) раздваја кондиле у које се причвршћавају укрштене везе коленог зглоба (1, 4-7).

1.1.2 Основне карактеристике бутне кости

Бројне су карактеристике бутне кости у функционалном смислу. Пре свега врат бутне кости, односно зглоб кука има улогу да омогући основне моторичке способности: стајање, седење, трчање, свакодневни ход, али и спортске активности као што су скакање, пливање и многе друге. Битно је напоменути да је за сам зглоб кука везано двадесет мишића помоћу којих кук обавља све наведене улоге.

С обзиром да је кук изложен свакодневним и непрекидним оптерећењима, зглоб кука представља најугроженији зглоб у телу човека. Физиолошка стања, трудноћа, гојазност, мењају нормалне односе па је у таквим стањима овај зглоб изложен још већим оптерећењима и консекутивно могућностима већих оштећења. Мала површина која је оптерећена током свакодневног хода и других активности, излаже кук сталним

микротраумама. Имајући у виду да су зглобови кука у стојећем ставу оптерећени тежином која је изнад њих, а то износи око $2/3$ телесне тежине (један кук носи оптерећење од $1/3$ телесне тежине), то би значило да оптерећење код просечног човека (од 70 kg) износи $18-20 \text{ kg/cm}^2$ (7).

1.1.3 Биомеханика бутне кости

Биомеханика бутне кости, а пре свега зглоба кука је код човека прилагођена да одржи равнотежу у усправном положају тако да за то користи што мање мишићне снаге и енергије. У основи биомеханике фемура је *Wolff*-ов закон према коме се кост трансформише у складу са функцијом коју обавља односно у складу са механичким стресом коме је изложена (8). Још почетком 20. века *Koch* и његови сарадници су испитивали биомеханику проксималног фемура и силе које су доминантне током физиолошког оптерећења (9). Тек много година касније је показано да је фемур углавном изложен силама притиска, али да постоје и силе истезања које су значајне за морфологију проксималног крајка фемура (10). Сходно томе, они делови фемура који нису под дејством сила притиска имају мању чврстину и густину па су самим тим склонији преломима. Улога истезања кости је јако значајна код особа са остеопорозом јер су силе неравноправно распоређе па је самим тим оваква кост сколна преломима (11).

1.2 ПРЕЛОМИ БУТНЕ КОСТИ

Преломи фемура представљају значајан узрок морбидитета и морталитета у групи повреда локомоторног апарата. На њих отпада око 15% свих прелома (12). Фемур је чврста кост и да би настала његова фрактура потребна је јака сила. Та сила је најчешће увртање услед дејства индиректне или директне силе.

Човек који је активан у периоду од 20. до 50. године направи 210.000.000 корака, што би значило да се на сваку ногу ослони 105.000.000 пута и да наведени притисци стално врше притисак на хрскавицу. Ово је разлог што у физиолошким условима читава бутна кост, а пре свега кукови, доживе дегенеративне промене. Уз то и сама траума брже

доводи до њиховог пропадања. Поред деловања тежине локомоторних активности (ходање, трчање, скакање и други) зглоб кука је изложен и снажном деловању мишићних контракција (4). Код младих особа преломи бутне кости настају врло ретко, а када дође до оваквих прелома обично је то под дејством снажне трауме приликом саобраћајних незгода или падова са висина. Много чешће се овакви преломи срећу код старијих особа (преко шездесет пет година), јер поред трауме значајну улогу има и присутна остеопороза као и атрофија мишића (13).

У литератури сви фактори ризика за прелом врата бутне кости се сврставају у три чиниоца: густину коштане масе, ризик од пада и ефикасност протективних механизма неуромишићног одговора (3, 4, 13). Поред тога, као битнији фактори ризика издвајају се и различити геометријски параметри зглоба кука (14). Утврђено је да са порастом дужине врата и већим коло-дијафизалним углом бутне кости расте и ризик од прелома (15). Такође, различита обољења могу да доведу до повећања ризика од прелома, тако што повећавају ризик од пада или повећавају фрагилност костију (16, 17). Узимање лекова који делују на централни нервни систем (седативи), лекова који утичу на метаболизам витамина D3 (антиконвулзиви), лекова који инхибирају функцију остеобласта (кортикостероиди) могу да повећају ризик од настанка прелома тако што доводе до поремећаја коштане структуре (17, 18). Неки други фактори, као што су место становања, конзумирање цигарета, наркотика и/или алкохола, на различите начине могу повећати ризик од настанка прелома (19, 20).

1.2.1 Класификација прелома бутне кости

Постоји велики број класификација прелома бутне кости, међутим имајући у виду да се фемур може преломити у сваком свом делу, најједноставније је да све преломе класификујемо на основу њихове локализације на фемуру. Сходно томе, према овој класификацији разликујемо: прелом горњег краја бутне кости, прелом дијафизе бутне кости и прелом доњег краја бутне кости (5).

1.2.1.1 Прелом горњег крајка бутне кости

Под појмом „прелом горњег крајка бутне кости“ подразумевају се сви преломи од главе бутне кости до нивоа 5cm испод малог трохантера. Прелом кука је синоним за овај термин и он се најчешће користи у конверзацији.

Постоје многобројне класификације прелома горњег крајка бутне кости међутим ни једна није свеобухватна и опште прихваћена. Оне могу бити базиране на: анатомској локализацији прелома, величини угла (косини) коју фрактурна линија гради са хоризонталном линијом и степену дислокације фемура (19). Оно што је свакако сигурно, то је да класификација треба, пре свега, да пружи информације о томе да ли је прелом стабилан или није.

Према анатомској локализацији разликујемо интракапсулиране и екстракапсулиране преломе. У интракапсулиране спадају преломи врата и главе, док у екстракапсулиране спадају преломи трохантерног масива и дела бутне кости који се налази непосредно испод њега. Простире се на око 5cm дистално од малог трохантера, при чему разликујемо две групе прелома интертрохантерни, транстрохантерни и субтрохантерни (20).

Класификацију која је заснована на величини угла (косини) коју фрактурална линија гради са хоризонталном линијом први пут је описао *Pauwelsa* 1935. године, при чему разликујемо: тип I, када је угао мањи од 30 степени; тип II када је угао између 30 и 70 степени; и тип III када је угао већи од 70 степени (21).

Међутим, касније студије су утврдиле да ова класификација није свеобухватна па се врло брзо прешло на *Garden*-ову класификацију из 1961. године која је и данас прихваћена, а заснована је на степену дислокације главних компресивних трабекула пре репозиције (22). Према овој класификацији постоје четири типа прелома: *Garden I* - недислоцирани, некомплетни преломи, укључујући и импактиране, *valgus* преломе; *Garden II* - недислоцирани, комплетни преломи; *Garden III* - комплетни, делимично дислоцирани преломи; *Garden IV* комплетни преломи са комплетном дислокацијом (22, 23).

1990 године АО група коју је предводио *Muller* предложила је нову класификацију, која је у многоме сложенија од претходних, а преломи врата бутне кости су кодирани од

B1.1 до B3.3. Међутим, иако је ова класификација детаљна, није нашла ширу примену у свакодневном клиничком раду (24).

Такође, последњих деценија објављене су многобројне класификације интертрохантерних прелома. Једна од најстаријих класификација је по *Boyd-у* и *Griffin-у* где су интертрохантерни преломи подељени у четири групе. У првој групи су недислоцирани преломи, у другој коминутивни интертрохантерни преломи, у трећој су преломи чија се преломна линија пружа дистално у субтрохантерни регион, а у четвртој су нестабилни, такозвани инверзни преломи односно преломи са обрнуто косом преломном линијом (25).

Evans-ова класификација из 1949.године се базира на анатомском опису, а највише се употребљава на енглеском говорном подручју. Тип I – недислоцирани 2-фрагментни прелом; Тип II – дислоциран 2-фрагментни прелом; Тип III – 3-фрагментни прелом без постеролатералне подршке, са дислокацијом великог трохантера; Тип IV - 3-фрагментни прелом без медијалне подршке, са дислокацијом малог трохантера и преломом медијалног лука; Тип V – 4-фрагментни прелом без постеролатералне и медијалне подршке (комбинација типа III и IV); R – реверзни, коси преломи (26).

Jensen и *Michaelsen* су 1976. године направили модификацију *Evans-ове* класификације, где захваћеност преломом малог или великог трохантера чини основу за даљу поделу на подгрупе. Ова класификација се базира на основу иницијалног снимка. Тип 1 – дводелни преломи без дислокације; Тип 2 – дводелни преломи са дислокацијом; Тип 3 – троделни прелом, где 3. део представља велики трохантер и постоји губитак постериолатералног ослонца; Тип 4 – троделни прелом, где је 3. део мали трохантер и постоји губитак медијалног ослонца и Тип 5 – четвороделни прелом где су захваћена оба трохантера и постоји губитак и постериолатералног и медијалног ослонца (27).

Према АО класификацији разликују се следећи преломи трохантерног масива: A1 – једноставни (2-фрагментни) преломи пертрохантерне регије; A1.1 – преломи дуж интертрохантерне линије; A1.2 – преломи кроз велики трохантер; A1.3 – преломи испод малог трохантера; A2 – мултифрагментни пертрохантерни преломи; A2.1 – преломи са једним интермедијарним фрагментом; A2.2 – преломи са два интермедијарна фрагмента; A2.3 – преломи са више од два интермедијарна фрагмента; A3 – интертрохантерни

преломи; А3.1 – једноставни, коси преломи; А3.2 – једноставни попречни преломи; А3.3 – преломи са медијалним фрагментом (28).

Такође, постоје и бројне класификације субтрохантерног прелома - *Fielding*-ова, *Waddell*-ова, *Seinsheimer*-ова, АО/ОТА класификација и друге. АО/ОТА класификација субтрохантрних прелома узима у обзир степен коминуције, али не узима у обзир дислокацију фрагмента. Дводелна фрактура (А) са варијететима – спирална фрактура (А1); коса фрактура (А2) и попречна фрактура (А3). Фрактура са лептирастим фрагментом (В) са варијететима – фрактура са троугластим фрагментом са спољашње стране (В1), фрактура са фрагментом са медијалне стране (В2) и фрактура са више фрагмената (В3). Комплексна спирална фрактура (С) са варијететима – вишефрагментна спирална фрактура (С1), сегментна фрактура (С2) и ирегуларна фрактура (С3) (29).

1.2.1.2 Прелом дијафизе и доњег крајка бутне кости

Не постоји универзално прихваћена класификација за фрактуру дијафизе и доњег крајка бутне кости. Фактори као што су повреде меког ткива, анатомска локализација прелома, геометрија прелома и правац преломне линије су често укључени у саму класификацију. Најосновнија подела је на отворене и затворене преломе, при чему се отворени преломи класификују на преломе I, II, IIIА, IIIБ и IIIЦ типа према *Gustilo*-вој методи. Тип I подразумева отворену фрактуру са повредом коже мањом од 1 cm. Тип II фрактуру са раном већом од 1 cm, али без већег оштећења меког ткива, флапова и авулзија, док тип III подразумева фрактуру са великим оштећењима меког ткива и присутним авулзијама и неуроваскуларним оштећењима. У зависности од ткивног дефекта разликујемо субтипове IIIА, IIIБ и IIIЦ (30-33).

Winqvist-ова класификација прелома бутне кости из 1980. године разликује пет типова прелома. Тип 0 – без коминуције или са малим лептирастим фрагментом мањим од 25% од ширине костију; Тип I – мали лептирасти фрагменти мањи од 25% од ширине костију; Тип II – лептирасти фрагмент 50% или мање од ширине костију; Тип III – са коминуцијом и великим лептирастим фрагментом, веће од 50% од ширине костију; Тип IV – неколико коминуција читавог сегмента костију (сегментна коминуција) (34).

Према АО класификацији преломи дијафизе су означавају са 32, док се преломи доњег крајка бутне кости означавају са 33, а потом се у следећој етапи деле на одговарајуће кодове у зависности од врсте прелома (28).

1.2.2 Епидемиолошке одлике прелома бутне кости

Као што је претходно речено, бутна кост се може преломити у свим својим деловима, међутим као најчешћи се издваја прелом горњег крајка бутне кости, односно прелом кука. Практично свака епидемиолошка студија која се бавила овом проблематиком, истиче да се инциденција прелома кука повећава експоненцијално код особа старијих од 50 година, а с обзиром на тренутне демографске промене и дужи животни век, у будућности се очекује значајно већи број прелома кука (35). Посебно високе вредности инциденције прелома кука се бележе у скандинавским земљама, Сједињеним Америчким Државама и Западној Европи, док је стопа знатно нижа у Африци (36-38). Европска унија је објавила податак да је 2000. године било 414.000 случајева прелома проксималног крајка фемура, а да се 2050. године очекује да ће тај број износити око 972.000 (39, 40).

Годишња инциденција прелома кука код одраслих особа на подручју Београда у периоду од 1990. до 2000. године износила је 51,7/1.000.000, што је слично инциденцији прелома у Италији, Француској и Великој Британији (41). Када је о самим епидемиолошким одликама реч, битно је напоменути да је учесталост прелома кука два до четири пута већа код жена него код мушкараца (42, 43).

1.2.3 Клиничка слика прелома бутне кости

У клиничкој слици прелома било ког дела бутне кости пре свега доминира бол који се појачава при покушају пацијента да покрене екстремитет. Поред бола, присутна је и функционална немоћ. Болесник не може активно да подигне повређени екстремитет и одвоји пету од подлоге. Деформација у облику спољне ротације и скраћења ноге је присутна код свих прелома са дислокацијом фрагмената (44). Често, под дејством јаке

механичке силе која је изазвала прелом кости, долази до повреда меких ткива и крварења у мишићима бутине (45).

1.2.4 Дијагноза прелома бутне кости

Клиничка презентација већине прелома фемура је толико очигледна да се њихова дијагноза сматра једним од најлакших дијагноза у медицини. Поставља се на основу анамнезе, клиничке слике, објективног прегледа уз прецизно описан механизам повреде, а потврђује се рендгенским снимцима (антеро-постериорни и профилни снимак). Остали, савременији дијагностички поступци, као што су магнетна резонанца, компјутеризована томографија и сцинтиграфија, нису стандардни за преломе бутне кости и најчешће нису ни потребни (45).

1.2.5 Лечење прелома бутне кости

Врста и начин лечења прелома бутне кости је директно повезан са механизмом повреде. У зависности од статуса, индивидуалних карактеристика болесника и типа прелома може се спровести неоперативно или хируршко лечење. Основни циљ сваког од лечења је постизање зарастања кости уз што бољу позицију са што је могуће квалитетнијом функцијом у што краћем временском интервалу (45).

1.3 ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС

Оксидациони стрес први је дефинисао *Helmut Sies* 1985. године и представља поремећај у којем превагу имају слободни радикали над антиоксидантима, услед чега долази до оштећења битних ћелијским макромолекула као што су протеини, липиди, угљени хидрати и ДНК (46).

Процеси оксидације и редукције се континуирано одвијају у свим живим биолошким системима, при чему приликом оксидације настају слободни радикали. То су молекули, јони или атоми који се налазе између оксидованог и редукованог стања, а у својој структури имају неспарене електроне у последњој орбитали (47). Они су веома реактивни и тежећи да спаре електроне понашају се као снажни електрофили. Слободни радикали се у организму константно стварају и при ниским концентрацијама остварују своју физиолошку улогу (антимикробна активност фагоцитних ћелија, сигнална трансдукција и регулација ћелијског циклуса), међутим у ситуацији повећаног стварања и/или неадекватног уклањања долази до нарушавања редокс хомеостаза ћелије и испољавања негативног ефекта. У тим ситуацијама они изазивају оштећења макромолекула и поремећаја у функционисању живих организама (48, 49).

У зависности од наелектрисања слободне радикале можемо поделити на радикалске анјоне и катјоне. Еволуција слободних радикала може да се подели у три фазе: иницијацију, пропацију и терминацију. Фаза иницијације подразумева додавање или одузимање једног електрона нерадикалским облицима, при чему им се мењају физичке и хемијске карактеристике и постају знатно реактивнији. Фаза пропације обухвата период током кога настали слободни радикал реагује са околним молекулима и узима један електрон, при чему он сам постиже стабилно стање, али циљни молекул постаје слободан радикал. Настали слободни радикали даље делују са околним молекулима, узрокујући настајање нових слободних радикала, чиме се број слободних радикала у кратком периоду вишеструко повећава. Током фазе терминације слободни радикали се неутралишу деловањем ензимских и неензимских компоненти антиоксидационог система, при чему се спречава њихова даља пропација. Ова неутрализација настаје деловањем неензимских и ензимских антиоксиданаса (50, 51).

1.3.1 Реактивне врсте кисеоника (ROS)

Реактивне врсте кисеоника (енгл. *Reactive Oxygen Species* - ROS) су слободне радикалске честице кисеоника које се непрекидно стварају у организму. Иако је кисеоник есенцијални елемент за аеробно преживљавање, чак и при атмосферским концентрацијама он може бити токсичан. Могу настати ендогено (у току физиолошког процеса) или егзогено (уносом ксенобиотика или других материја у организам), а најчешће настају као непожељни производи ћелијског дисања (52). Реактивне кисеоничне врсте се деле у две групе:

1. слободни радикали кисеоника (у које се убрајају супероксид анјон радикал $O_2^{\bullet-}$, хидроксил радикал OH^{\bullet} , хидропероксил радикал HO_2^{\bullet} , алоксил радикал RO^{\bullet} и пероксил радикал RO_2^{\bullet}) и
2. нерадикалски облици кисеоника (у које се убрајају водоник пероксид H_2O_2 , хипохлорна киселина $HOCl$, озон O_3 , синглет кисеоника 1O_2 и органски хидропероксид $ROOH$) (53).

1.3.1.1 Супероксид анјон радикал ($O_2^{\bullet-}$)

Супероксид анјон радикал може настати приликом процеса дисања, фотосинтезе и фотореспирације (54), аутооксидацијом високореактивних хемијских једињења (55, 56), оксидацијом миоглобина и хемоглобина као и под дејством зрачења (57) или цитостатика (58).

Супероксид анјон радикал је релативно нетоксичан, међутим различитим реакцијама може да пређе у друге, потенцијално токсичније реактивне врсте (59, 60). Међусобном реакцијом два молекула $O_2^{\bullet-}$, при чему се један оксидује, а други редукује настаје водоник пероксид и молекул кисеоника. Такође, $O_2^{\bullet-}$ може да реагује са NO^{\bullet} , при чему настаје пероксинитрит $ONOO^{\bullet}$. Поред тога у *Fenton*-овој реакцији уз присуство прелазних метала реагује са водоник пероксидом формирајући хидроксил-радикал (51-53).

1.3.1.2 Водоник пероксид (H_2O_2)

Водоник пероксид представља најстабилнији од свих облика реактивних кисеоничних врста. Ствара се у пероксизомима и највећим делом настаје реакцијом дисмутације, али може настати и непотпуном редукцијом молекулског кисеоника са два електрона и два протона. Такође, највећи део продукованог $\text{O}_2^{\cdot-}$ се конвертује у H_2O_2 дејством ензима супероксид дисмутаза 2 (SOD2 - MnSOD) у матриксу митохондрија, као и деловањем SOD1 (Cu/ZnSOD) у интермембранском простору митохондрија (64). У случајевима када дође до оштећења пероксизома, велика количина H_2O_2 се ослободи у цитоплазму при чему настаје стање оксидационог стреса (65).

H_2O_2 може да доведе до оксидације сулфхидрилних група протеина и до иницијације процеса липидне пероксидације. Међутим, најзначајнију токсичност испољава тако што у реакцији са $\text{O}_2^{\cdot-}$ доведе до настанка врло реактивног и токсичног хидроксил радикала. Ова реакција је позната као *Haber-Weiss*-ова реакција (66). Сматра се да је она у биолошким системима катализована јонима прелазних метала (најчешће Fe^{2+}) што представља *Fenton*-ову реакцију (63).

Токсичност водоник пероксида је спречена дејством више различитих система. У самим митохондријама најзначајнији је пероксиредоксин 3, који је повезан са тиоредоксинским системом (67), а поред њега значајан је и ензим митохондријска глутатион пероксидаза 1. У цитоплазми постоје слични ензими, као и ензим каталаза, који се примарно налази у пероксизомима, који катализује разградњу H_2O_2 до кисеоника и воде. Осим каталазе, ензими одговорни за уклањање H_2O_2 су и изоензими глутатион пероксидазе. Глутатион пероксидаза уклања водоник пероксид повезујући његову редукцију до воде са оксидацијом глутатиона до глутатион дисулфида (64).

1.3.2 Липидна пероксидација

Слободни радикали реагују са масним киселинама и индукују оштећење процесом липидне пероксидације. У процесу липидне пероксидације липиди се оксидују и започиње процес њихове деградације. Полинезасићене масне киселине (енгл. *polyunsaturated fatty acids* - PUFA) су најосетљивије на процес липидне пероксидације, а као последица оштећења липида ћелијске мембране долази до смањење флуидности, повећане пропустљивости за једно и двовалентне јоне (K^+ и Ca^{2+}) услед чега може доћи до промене осмотског притиска у ћелији и ван ње), инактивације ензима и мембранских губитка интегритета мембране (68).

Јони гвожђа и бакра убрзавају процес липидне пероксидације конвертовањем H_2O_2 у HO^\bullet или кидањем $O-O$ везе, што представља *Fenton*-ову реакцију када је катализатор двовалентни јон гвожђа, при чему настају алкоксил и пероксил радикали, при чему се стварају секундарни радикали чиме се процес липидне пероксидације пролонгира. Излагање високим концентрацијама продуката липидне пероксидације може изазвати низ ћелијских одговора, од акутних токсичних ефеката до инхибиције ћелијске пролиферације, док у ниским концентрацијама продукти липидне пероксидације могу стимулисати неколико процеса као што је активност неколико ензима или транскрипциона регулација антиоксидационих гена (69, 70).

Производи липидне пероксидације се лако детектују у крвној плазми и користе се за мерење оксидационог стреса. Најчешће се одређује концентрација малонилдиалдехида (MDA) који настаје из липидних пероксида у процесу липидне пероксидације (71).

1.3.3 Реактивне врсте азота (RNS)

Главни представник RNS је азот моноксид ($\bullet\text{NO}$) чији метаболизам и реактивност доводе до стварања многих других RNS, а пре свега пероксинитрита, азот диоксида, диазот триоксида и диазот тетраоксида. Они нису увек лоши по живу ћелију, али самим тим што поседују велику биореактивност утичу на нарушавање физиолошких функција протеина, угљених хидрата, липида и нуклеинских киселина (72).

1.3.3.1 Азот моноксид ($\bullet\text{NO}$)

Азот моноксид ($\bullet\text{NO}$) настаје деловањем ензима азот моноксид синтетазе (енгл. *Nitric Oxide Synthases*; NOS) који L-аргинин преводи у цитрулин при чему се ослобађа $\bullet\text{NO}$. Ендотелна и неутрална NOS продукују $\bullet\text{NO}$ у малим количинама, али у неким специјалним условима попут инфламације или исхемије долази до повећане продукције $\bullet\text{NO}$ са дужим временом полуживота, јер се активира индуцибилна NOS (73). Азот моноксид је сам по себи слабо реактиван али због своје директне улоге у сигналним механизмима може да доведе до стварања других реактивних врста које касније могу бити медијатори у редокс сигналном путу. Најбржа реакција азот монооксида је свакако реакција са супероксид анјон радикалом. При овој реакцији настаје токсични пероксинитрит, а супероксид анјон радикал инхибира још и функцију ендотелијалне азот моноксид синтетазе (eNOS) тако што скраћује полуживот азот монооксида умањујући његову расположивост (74). Настанком пероксинитрита долази до оштећења ДНК, оксидације LDL, настанка изопростана, нитрације тирозинских аминокиселинских остатака у протеинима и ћелијске респирације у митохондријама (75). С обзиром да се лако протонује односно, регулише са јоном водоника, у биолошким системима постоји и јонизована и протонувана форма, у зависности од рН (76).

1.3.4 Антиоксидациони заштитни систем

С обзиром да улога слободних радикала у организму директно зависи од њихове концентрације, ћелије су развиле прецизне механизме којима у физиолошким условим одржавају концентрацију слободних радикала у опсегу који је одговарајући за сигналне путеве. Да би се спречио настанак оксидационих оштећења, постоји више екстрацелуларних и интрацелуларних компоненти антиоксидационе заштите. Због тога и кажемо да је антиоксидациони заштитни систем настао током еволуције у циљу спречавања, ограничења или "поправке" оштећења настала деловањем ROS (77). Овај систем чине ензими и једињења мале молекулске масе, а представљају примарну и секундарну антиоксидациону заштиту.

Примарна заштита превасходно обухвата:

1. ензимске компоненте (супероксид-дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатион-пероксидаза (GSH-Px), глутатион-S-трансфераза (GST) и глутатион-редуктаза (GR));
2. неензимске компоненте (липосолубилна једињења - витамин Е и А, провитамин А и коензим Q, хидросолубилна једињења - витамин Ц, мокраћна киселина, глутатион, жучни пигменти, транспортни протеини крвне плазме и аминокиселине) (78).

Секундарну антиоксидациону заштиту чини систем ензима:

1. репаратори који поправљају оштећења настала пропустима примарног система (ДНК гликозилаза, ДНК полимераза, ДНК лигаза, ендонуклеазе);
2. дезинтегратори који уништавају настала оштећења (протеин-специфичне оксидоредуктазе, протеин-АДП-рибозил-трансфераза, АТФ- и Ca^{2+} - независна протеаза) (79).

1.3.4.1 Супероксид дисмутаза (SOD)

Супероксид дисмутаза (SOD) је металопроtein који катализује дисмутацију супероксид анион радикала, у молекулски кисеоник и водоник пероксид, (55) према

следећој једначини:



Наведена реакција се дешава и спонтано, међутим када је катализује SOD одвија се 10.000 пута брже. Супероксид дисмутаза је присутна у свим аеробним организмима, а постоји у неколико различитих облика:

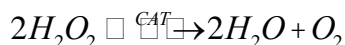
1. гвожђе садржавајућа супероксид-дисмутаза (Fe-SOD),
2. бакар-цинк садржавајућа супероксид-дисмутаза (CuZn-SOD),
3. манган садржавајућа супероксид-дисмутаза (Mn-SOD) и
4. екстрацелуларна супероксид-дисмутаза (EC-SOD) (80, 81).

Fe-SOD се налази у прокариотским организмима, као и у хлоропластима одређених фамилија биљака (81, 82). Mn-SOD је локализован у митохондријама и представља најзначајнији ензим који учествује у разлагању ROS. Значај Mn-SOD је доказан испитивањем *knockout* мишева за ген који кодира Mn-SOD. Овакви мишеви су умирали непосредно након рођења (83). Поред тога, доказана је и његова улога у развоју карцинома у испитивањима ћелијских линија са малигним фенотипом (84). CuZn-SOD се налази у цитоплазми, једру, микрозомима и интермембранском простору митохондрија, при чему Cu^{2+} учествује у процесима оксидације и редукције, док Zn^{2+} омогућава одржавање стабилности ензима (80). Испитивањем *knockout* мишева за ген који кодира CuZn-SOD утврђено је да такве животиње имају већу учесталост женског инфертилитета, дегенерације макуле и повећане смртности услед тумора јетре (85). EC-SOD је по структури хидрофобни гликопротеин, а је откривен у плазми, лимфи и синовијалној течност. Јединствена карактеристика EC-SOD је њен висок афинитет за хепарин. На значај EC-SOD су указале клиничке студије у којима је регистровано смањење активности EC-SOD током старења, код оболелих од хипертензије, вазоспастичке ангине, анеуризме торакалне аорте и аортне стенозе (86, 87).

1.3.4.2 Каталаза (CAT)

Каталаза (CAT) је ензим који катализује "каталазну" реакцију, односно претварање водоник пероксида, који је настао дисмутацијом супероксид анјон радикала, до воде и

молекулног кисеоника и то следећом реакцијом:



С обзиром да је ово двостепена реакција која захтева везивање два молекула водоник пероксида у активном центру ензима, да би се она десила неопходна је висока концентрација водоник пероксида (88).

CAT учествује и у пероксидазној реакцији када се водоник пероксид налази у ниским концентрацијама, као и у присуству неког донора електрона (етанол, редуковани пиридин):



Хоће ли каталаза да катализује брзу каталазну реакцију, или спору преоксидазну реакцију, зависи од брзине настајања водоник пероксида и од концентрације донора водоника. Иначе, азот моноксид може модулирати обе наведене активности CAT (89). Каталаза се налази у пероксизомима и недостатак овог ензима се доводи у везу са развојем дијабетеса типа 2. Ген за каталазу се налази на хромозому 11p13. У стањима повећане продукције ROS цистеин у молекулу каталазе прелази у цистеинску киселину, што узрокује нитрацију тирозина и смањење каталитичке активности ензима (90).

1.3.4.3 Глутатион пероксидаза (GSH-Px)

Глутатион пероксидаза је главни ензим који садржи селеноцистеински остатак као активно место и при ниским концентрацијама уклања водоник пероксид. Ако поредимо са каталазом, GSH-Px је спора и није економична, јер јој је за рад неопходна велика количина ћелијског редуктанта глутатиона. Катализује глутатион-зависну редукцију водоник пероксида у воду.



Као производ реакције настаје оксидовани глутатион (GSSG) који се састоји из два молекула GSH повезаних дисулфидним мостом, и враћа се у редуковано стање деловањем ензима глутатион редуктазе.

Глутатион-пероксидаза катализује и редукцију органских хидропероксида у

алкохоле (91).



Постоји пет познатих изоформи GSH-Px. Класична форма ензима која се налази у ћелијама се углавном обележава ка GSH-Px-1 и њен недостатак доводи до ендотелне дисфункције, срчане слабости и патолошких структурних промена крвних судова и миокарда (92). GSH-Px-2 изоформа се налази у ћелијама које облажу гастроинтестинални систем и сматра се да ова изоформа GPx има улогу у метаболисању пероксида у липидима унетих храном. GSH-Px-3 изоформа се налази у плазми и телесним течностима и сматра се да има значајну улогу у редуковању оксидационог стреса (93). GSH-Px-4 или фосфолипидна GSH-Px катализује редуковање липидних хидропероксида до липидних алкохола и смањује количину оксидованих фосфолипида и холестеролских хидропероксида, као и проинфламаторних пероксида који настају деловањем ензима липооксигеназе и циклооксигеназе, чиме се смањује васкуларни оксидациони стрес и настајање атеросклерозе (94). И пета, SnGSH-Px се налази у семеној течности. У свим облицима GSH-Px селен је неопходан за каталитичку активност ензима (95).

1.4 ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС И ПРЕЛОМИ КОСТИЈУ

С обзиром да је добро познато да оксидациони стрес настаје као последица прекомерне продукције слободних радикала који оштећују ћелијску функцију и доводе до настанка многих патолошких стања и болести, не чуди ни чињеница што се последњих година све више испитује њихова улога у различитим преломима, као и њихов утицај на зарастање костију.

Досадашња истраживања истичу да је њихова улога у коштаном метаболизму двострука у зависности од тога да ли се ради о физиолошким или патолошким стањима. Под физиолошким условима производња ROS од стране остеокласта помаже бржем уништењу калцификованог ткива и на тај начин утиче на ремоделовање костију (96). У патолошким стањима као што су различита хронична односно акутна обољења коштаног система, примећен је пораст нивоа свих параметара оксидационог стреса као и пораст антиоксидационих ензима (97). Слични резултати примећени су и приликом праћења ових параметара код пацијената са фрактуром костију. Студија *Yeler*-а и сарадника указује да је њихова производња највећа одмах након прелома као и да се у нешто мањој мери наставља и током вишемесечног периода зарастања (98). Досадашње студије које су се бавиле овом тематиком указују на могућу повезаност повећане продукције слободних радикала и смањења густине костију (99). Такође, повећана активност остеокласта, као и смањена активност остеобласта могу допринети неравнотежи између проксиданаса и антиоксиданаса код пацијената са различитим преломима костију (97).

Од великог значаја је и добро испитати редокс статус пацијената са преломом бутне кости током периода зарастања. Прецизни механизми који су укључени у процесе зарастања, као и њихове међусобне интеракције нису још увек у потпуности испитане. Зарастање представља комплексан процес који у најбољем случају доводи до потпуног опоравка функције и структуре костију. Уколико су поред саме фрактуре укључени и други фактори ризика као што су остеопороза или остеопенија (што је чест случај код старије популације), сам процес зарастања бива још комплекснији, а самим тим и компликованији (100, 101). Процес зарастања костију може се поделити у три основне фазе, које се међусобно преклапају. Прва фаза се назива инфламаторна фаза зарастања костију. Приликом прелома, односно трауме долази до повреде околног ткиво при чему

настају хематоми и инфламација која утиче на настанак разних продуката запаљења. Настали хематом садржи различите факторе раста, који представљају стимулусе за пролиферацију и диференцијацију ћелија хематома. У овој фази долази до повећања инвазије неутрофила и моноцита као и уклањања изумрлог ткива и дегенерације фибринског угрушка. Након ове фазе, која траје неколико дана наступа друга фаза, фаза репарације и реваскуларизације костију. Ову фазу карактерише стварање везивног ткива и формирање мреже капилара. На самом крају ове фазе долази до настанка хрскавичавог ткива око самог прелома и на тај начин започиње припрема за калцификацију и моделирање. Иницијални матрикс који се створио у првој фази се уклања и замењује га организовано ткиво. Последња фаза је фаза ремоделовања кости, и тек у овој фази долази до стварања пуне зрелости кости и њене првобитне структуре (102, 103).

Упркос досадашњим истраживањима и даље остаје неразјашњено да ли слободни радикали директно утичу на смањење густине костију или су за то одговорни фактори ризика (дијабетес, пушење, старост...) за које се зна да су повезани са њиховом повећаном производњом. Такође, још увек се не може са сигурношћу потврдити да је производња ROS-а већа од антиоксидационе заштите. Поред тога треба испитати и улогу појединих антиоксидационих ензима током зарастања костију.

1.5 ЦИТОКИНИ

Цитокини представљају групу сигналних молекула који су укључени у све аспекте урођеног и стеченог имунског одговора, укључујући ћелијски раст и диференцијацију, инфламацију и репарацију (104). Они имају улогу у ћелијској комуникацији у физиолошким, али и у патолошким условима ћелија имуног система. По структури могу бити протеини, пептиди или гликопротеини, а излучују их различите ћелије као што су лимфоцити, моноцити, макрофаги, фибробласти, астроцити у мозгу, и други. Највећи број цитокина је продукован од стране леукоцита (макрофага и Т-ћелија) и испољава ефекте на друге леукоците па неке од њих често у литератури називају интерлеукинима. Међутим, овај термин није у потпуности прецизан јер постоје и они цитокини који делују на леукоците, а не називају се интерлеукини, такође има и оних цитокина који се тако називају, а нити су продукти леукоцита нити на њих делују (105, 106).

Цитокини делују преко рецептора, где након везивања на циљној ћелији долази до транскрипције гена са последичним фенотипским или функционалним променама циљне ћелије. Основне карактеристике цитокина су мултифакторијалност, плеотропизам, антагонизам, синергизам, хијерархија. У зависности од места деловања испољавају аутокринно, паракринно и ендокрино дејство. Иако цитокини имају широк дијапазон физиолошких функција, устаљена је њихова подела на про- и анти-инфламаторне цитокине. Про-инфламаторни цитокини делују тако што промовишу системску инфламацију, док анти-инфламаторни умањују инфламацију. Поједини цитокини могу да испоље и један и други ефекат (107, 108).

1.5.1 Проинфламаторни цитокини

Проинфламаторни цитокини стимулишу експресију адхезивних молекула на ендотелним ћелијама инфицираног ткива, продукују хемокине утичу на настанак реакције акутне фазе. Односно, они активирају коагулацију и инхибирају фибринолизу што може резултирати дифузним оштећењем ендотела капилара уз последичну дисфункцију великог броја органа. Најзначајнији представници ове групе цитокина су тумор некрозис фактор-алфа (енгл. *Tumor Necrosis Factor-Alpha*; TNF- α) и интерлеукин 6 (IL-6) (109). У највећој

мери их продукују инфламаторне ћелије као што су Т и Б лимфоцити, али и макрофаги, фибробласти, моноцити, ендотелне и ћелије косне сржи. У самом коштаном систему га продукују остеобласти и остеокласти. Механизми преко којих остварују своје дејство још увек нису детаљно проучени, али се зна да је у њихову сигналну трансдукцију укључена аденилат циклаза и циклични аденозин монофосфат (110).

TNF- α је потентни проинфламаторни цитокин кога секретују многобројне ћелије као одговор на инфламацију, инфекцију, повреду или било који други надражај. TNF- α се може везати за два рецептора, TNFR1 (CD120a) и TNFR2 (CD120b). TNFR1 се налази у већини ткива, док се TNFR2 налази само у ћелијама имуног система. Показује снажне цитотоксичне ефекте на туморске ћелије, а поред тога показује значајну прокоагулантну активност и утиче на пролиферацију лимфоцита и апоптозу (111). Поред свега наведеног значајно је напоменути и да доприноси продукцију осталих цитокина као што су IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF, и други. За разлику од њега, IL-6 стимулише Б лимфоците да производе *in vivo* и *in vitro* антитела, а уз то је и један од најпотентнијих стимулатора производње простагландина E2 (PGE2), чиме је директно укључен у одвијање запаљенских реакција (112). Међутим, занимљиво је то да најновији литературни подаци указују да у зависности од ситуације он може деловати и као про- и као анти-инфламаторни цитокин. Антиинфламаторна својства IL-6 заснивају се на ефектима на друге цитокине, конкретно инхибира TNF- α и IL-1, а активира IL-1 α и IL-10 (113).

Од посебног значаја је и међусобни однос продукције ова два цитокина. Као што је већ напоменуто, TNF- α подстиче производњу IL-6, док IL-6 делује инхибиторно на генерисање TNF- α . Заједничко дејство ових цитокина примећено је у анималним моделима појединих леукемија и лимфома (114).

1.6 ЛИПИДНИ МЕДИЈАТОРИ ИНФЛАМАЦИЈЕ

Липиди представљају материје биолошког порекла које су у основи нерастворне или слабо растворне у води, али раствољиве у органским растварачима, попут етра, дихлорметана, ацетона и других. Њихова улога у организму је вишеструка. Представљају основну компоненту биолошких мембрана, утичу на њихову пропустљивост и учествују у предаји бројних нервних импулса, као и у међућелијским контактима. Поред тога, обављају и заштитну улогу организма тако што штите организам од механичких повреда и формирају термоизолациони слој (115). Липиди су енергетска и градивна једињења, а њиховом разградњом настаје енергија која је потребна за различите животне процесе. Једним делом се липиди уносе путем исхране, док се другим делом синтетишу у организму. С обзиром да су липиди нерастворљиви у води, они се у крви налазе у облику липопротеина. Према хемијском саставу разликујемо просте и сложене липиде, док према наелектрисању разликујемо неутралне (у које се убрајају триглицериди, холестерол и холестерол-естри) и поларне (у које се убрајају фосфолипиди и гликолипиди) (116). Основна биолошка улога триглицерида у организму је да служе као ефикасан извор енергије. Најраспрострањенији стероид у организму, холестерол је прекурсор стероидних хормона и жучних киселина, а уз то је и важан састојак биолошких мембрана. Фосфолипиди представљају сложене липиде који су интегрални делови биолошких мембрана и имају читав низ есенцијалних функција. То су амфипатични молекули који се састоје из алкохола, масних киселина, фосфорне киселине и азотне базе, при чему је њихов неполарни (хидрофобни) део сачињен од масних киселина, а поларни (хидрофилни) део од фосфорилисаних алкохола. Омогућавају низ есенцијалних функција биолошких мембрана, попут флуидности, пропустљивости, преноса сигнала хормона и цитокина, инфлукса јона калцијума (117).

1.6.1 Масне киселине

Из липида је изоловано више од 70 различитих масних киселина. Све оне спадају у алифатичне карбоксилне киселине које су од суштинског значаја за исхрану људи, а поред тога су укључене и у различите биолошке функције. Складиште се у ћелијама масног

подкожног ткива, а њиховом разградњом долази до ослобађања велике количине енергије. Уколико се енергетске потребе не могу задовољити храном, прво долази до разлагања резерви гликогена, а затим се разлажу масти. Масне киселине се у организму налазе као слободне, односно неестерификоване (енгл. *free fatty acids*, FFA) и естерификоване. Највећи део масних киселина у циркулацији је естерификован, од чега је око 45% везан у облику триглицерида, нешто мањи у облику фосфолипида, док је најмањи део (око 15%) везан у облику холестерол-естра (118). У зависности од присуства двогубих веза разликујемо засићене (енгл. *saturated fatty acids* - SFA) и незасићене, док у зависности од броја двогубих веза масне киселине могу бити мононезасићене (енгл. *monounsaturated fatty acids* - MUFA) и полинезасићене (PUFA). Према геометријској изомерији разликујемо *cis* и *trans* масне киселине. Сматра се да је висок унос *trans* масти повезан са настанком атеросклерозе и коронарних болести јер снижава ниво HDL-холестерола, а повећава ниво LDL-холестерола. Међутим, како се у биолошким системима често срећу *trans* масне киселине, тешко их је потпуно избећи.

У биолошким системима масне киселине најчешће садрже паран број угљеникових атома од 14-24, а као најчешће издвајају се масне киселине које садрже 16, односно 18 угљеникових С атома. Полинезасићене масне киселине се, у зависности од положаја незасићења, деле на омега 3 (n-3) и омега 6 (n-6) масне киселине (**Табела 1**) (119).

Табела 1. Најважније масне киселине у биолошким системима

Тривијални назив	Положај незасићења	Тривијални назив	Положај незасићења
Засићене масне киселине (SFA)			
лауринска	C12:0	стеаринска	C18:0
миристинска	C14:0	арахинска	C20:0
палмитинска	C16:0	бехенска	C22:0
Мононезасићене масне киселина (MUFA)			
палмитолеинска	C16:1, n-7	гадолеинска	C20:1, n-7
олеинска	C18:1, n-9	еручна	C22:1, n-9
вакценска	C18:1, n-7	цетолеинска	C22:1, n-11
Полинезасићене масне киселина (PUFA)			
n-3 масне киселине		n-6 масне киселине	
алфа-линоленска (ALA)	C18:3	линолна (LA)	C18:2
еикозапентаенска (EPA)	C20:5	гама-линоленска (GLA)	C18:3
докозапентаенска (DPA)	C22:5	дихомо-гама-линолна (DGLA)	C20:3
докозахексаенска (DHA)	C22:6	арахидонска (AA)	C20:4

Синтеза масних киселина се одвија у јетри, масном ткиву, плућима и мозгу. Почетна фаза у синтези заправо представља синтезу малонил-коензим А, након чега следе елонгација, редукција, дехидратација и поновна редукција која доводи до синтезе бутирил-АСР (енгл. *Acyl carrier protein* - АСР; ацил носећи протеин). Прекурсор свих угљеникових атома у масним киселинама је ацетил-коензим А, а ензими који учествују у синтези масних киселина су повезани у један полипептидни ланац који се назива синтаза масних киселина (енгл. *Fatty acid synthase* - FAS) и омогућава синтезу масних киселина до 16 угљеникових атома. Масне киселине са већим бројем С атома синтетишу се помоћу ензима ендоплазматичног ретикулума. Засићене масне киселине у зависности од свог низа могу имати различит утицај на здравље људи. Капринска (C8:0) и каприлна (C10:0) киселина могу имати антивирусну активност, док лауринска може имати и антибактеријску активност (C12:0). Међутим, лауринска, миристинска и палмитинска делујући атерогено и тромбогено, могу имати негативних утицаја на здравље.

Незасићене масне киселине се под дејством ензима стеарил-коензим А конвертују у јетри из засићених масних киселина, тако што се врши инсерција двогубе *cis* везе при чему настају олеил-коензим А и палмитолеил-коензим А. На овај начин се из палмитинске (16:0) и стеаринске (18:0) добијају палмитолеинска (16:1 n-7) и олеинска киселина (18:1 n-9). У састав фосфолипида од MUFA улазе палмитотенска и олеинска киселина. Олеинска киселина има читав низ биолошки значајних улога попут снижавања укупног LDL, HDL холестерола, као и триглицерида, а самим тим утиче и на смањење ризика од коронарних артеријских обољења (120).

Поред наведених ензима у ендоплазматичном ретикулуму се налазе и комплексни системи десатураза које су одговорне за стварање незасићених веза у дуголанчаним масним киселинама. На овај начин настају и PUFAs n-3 и n-6 фамилије (Схема 1).

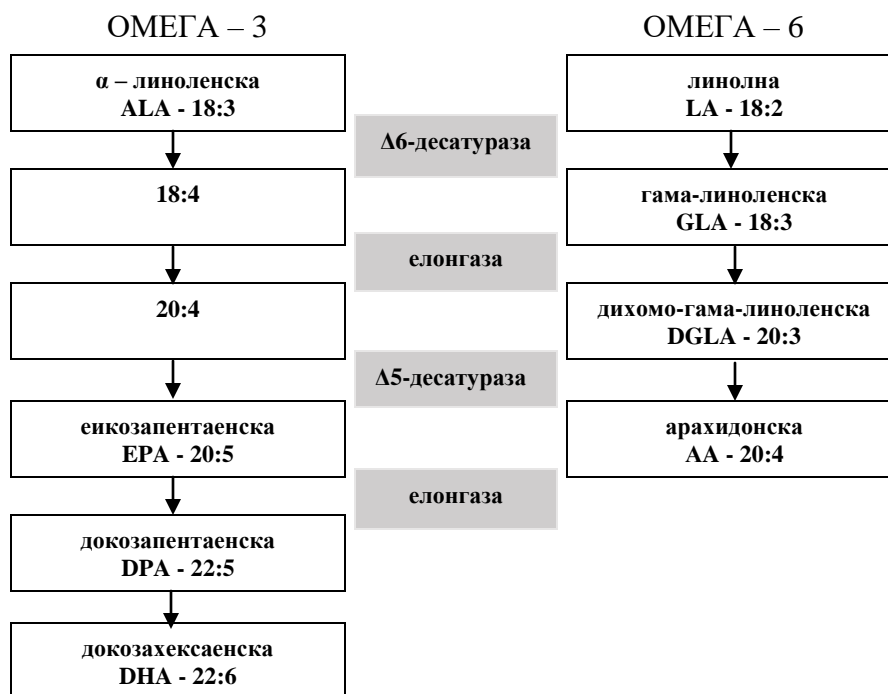


Схема 1. Биосинтеза полинезасићених n-3 и n-6 масних киселина.

Алфа-линолеинска киселина (ALA) која се убраја у n-3 масне киселине, као и линолна киселина (LA) која се убраја n-6 масне киселине, сматрају се есенцијалним и морају се уносити путем исхране. LA представља прекурсор n-6, док ALA представља прекурсор n-3 фамилије масних киселина. Из схеме 1 може се утврдити да оне подлежу процесима десатурације и елонгације, при чему настају различите дуголанчане масне

киселине у организму (121). Прекомерно уношење $n-6$ масних киселина може утицати на елонгацију и десатурацију и тиме довести до дефицита $n-3$ масних киселина. Најчешћи одговор оргнизма на овај дефицит је компензаторно повећање $n-6$ киселине (122). Међутим, с обзиром да је улога $n-3$ и $n-6$ PUFAs различита и често сасвим супротна, за оптимално функционисање организма битан је њихов избалансиран унос.

PUFA у организму поседују читав низ битних биолошких функција, попут регулација раста и развоја организма, развој ретине и можданих функција, регулација имуног одговора, утицај на канцерогенезу (123). Масне киселине ЕРА и АА су прекурсори липидних медијатора еикосаноида, при чему у присуству циклооксигеназе 1 и 2 настају простагландини и тромбокساني, док у присуству липооксигеназе настају леукотриени. Међутим, ЕРА и АА доводе до настанка различитих серија еикосаноида које имају и различито дејство у организму. Еикосаноиди који се синтетишу из АА показују снажно проинфламаторно дејство као одговор на повреде и стрес, док еикосаноиди синтетисани из ЕРА на истим циљним ћелијама модулирају њихов ефекат. Деривати ЕРА, односно $n-3$ масне киселине се формирају спорије у односу на деривате АА али слабе њихов ефекат. На тај начин они штите организм од срчаног и можданог удара али и инфламаторних болести попут лупуса, артритиса, астме и многих других (124, 125). Осим тога моно- и трихидрокси деривати сузбијају продукцију проинфламаторних цитокина као што су $IL-1\beta$ и $TNF-\alpha$. Сходно томе, можемо рећи да физиолошке улоге $n-3$ масних киселина су антиоксидација, антиинфламација, а новије клиничке студије указују да поседују и кардио- и неуро- протективно дејство (124-126). Такође, литературни подаци указују да поремећај односа $n-6/n-3$ PUFAs у организму учествује у настанку низа инфламаторних, аутоимуних обољења, али и неуролошких, психијатријских, метаболичких, ендокриних као и малигних обољења (127, 128).

1.7 ИНФЛАМАЦИЈА И ПРЕЛОМИ КОСТИЈУ

Инфламација односно запаљење представља један од кључних процеса помоћу којег организам може да одреагује на инфекцију или повреду са циљем да што пре уклони штетан стимулус и започне процес излечења. Акутна инфламација се карактерише болом, топлотом, отоком, црвенилом, као и губитком функције. Све ове карактеристике заправо настају као последица вазодилатације, повећаног протока крви, повећаног ћелијског метаболизма, отпуштања солубилних медијатора, екстравазацијом флуида и инфилтрацијом одређених ћелија (129).

Инфламаторни одговор организма на прелом настаје као резултат локалне повреде ткива, али и имунолошке реакције која је проузрокована локланом некрозом, хипоксијом и продором бактерија (130). Иницијалној инфламацији која настаје након прелома доприносе и цитокини, тромбоцити, коштани морфогенетски протеини и мезенхималне матичне ћелије. Као први одговор на тешку трауму настају полиморфонуклеарни леукоцити који представљају 50-60% од укупне количине циркулишућих ћелија. На самом месту трауме они поседују значајну улогу јер штите од инфекција и доприносе зарастању рана, односно прелома. Међутим, примећено је да могу да утичу и на друге органе који нису захваћени траумом, при чему могу да доведу до оштећења околног ткива. IL-1, IL-6 и TNF- α које секретују инфламаторне ћелије, укључујући и полиморфонуклеарне леукоците, показују хемотактичке ефекте на друге медијаторе запаљења (131). Самим тим фрактуре доводе до хиперинфламације које повећавају продукцију проинфламаторних цитокина и доводе до настанка посттрауматске инфламаторне реакције (енгл. „*secondary hit*“) која често може да буде узрок постоперативних компликација. На основу литературних података можемо утврдити да је инфламаторни одговор интерлеукина на преломе пролазан. *Cho* и сарадници су у експерименталној студији на анималном моделу показали да након прелома долази до повећане експресије IL-1 и IL-6 чији се пикови бележе првог дана након прелома, да би се након три дана ове вредности свеле на готово недетактабилне (132). Значајно је напоменути и да се у литератури истиче да цитокини, као што су TNF- α и IL-6, супримирају функцију остеобласта, а стимулишу активност, односно диференцијацију остеокласта. На овај начин долази до индукције ресорпције и

супримирања процеса формирања коштаног ткива, што свакако доприноси њиховој значајној улози како у преломима, тако и током зарастања костију (133).

Епидемиолошке студије указују да фактори ризика за настанак прелома може да буде изложеност појединим масним киселинама. Наиме, повећан унос SFA повећава и ризик за настанак прелома, док са друге стране повећан унос MUFA и PUFA може да утиче на смањење вероватноће од настанка прелома. Међутим, као што је претходно речено, услед прелома и повишених вредности медијатора запаљења, долази и до повишених вредности нивоа масних киселина, а пре свега PUFA, које уједно представљају и потенцијалне мете за деловање слободних радикала. На овај начин настају оштећења фосфолипида, ћелијских мембрана и нарушава се интегритет ћелије услед чега, највероватније долази и до компликација процеса зарастања костију. Како се у великом броју *in vivo* и *in vitro* експерименталних студија сугерише да n-3 и n-6 PUFA поседују различите улоге у костима и мишићима, потребне су и клиничке студије које би ове ефекте детаљно објасниле и испитале. Липидни медијатори који се секретују из n-6 масних киселина (AA) и n-3 масних киселина (EPA и DHA), су значајни регулатори инфламаторних процеса. Сматра се да медијатори који потичу од n-6 масних киселина делују промотивно на запаљенске процесе, док медијатори који потичу од n-3 масних киселина, делују супресивно (134). Масне киселине потичу из фосфолипида ћелијске мембране, при чему калцијум-зависна цитосолна фосфолипаза катализује хидролизу AA и EPA из мембранских фосфолипида, а фосфолипаза A₂ катализује хидролизу DHA из фосфолипида. Деловањем ензима циклооксигеназе, липооксигеназе или групе ензима који припадају цитохромима P450 оне се преводе у одговарајуће липидне медијаторе, који имају даље ефекте на процесе зарастања костију (135). Литературни подаци указују да повећано уношење n-3 масних киселина показује бенефите на кости експерименталних животиња, међутим њихова улога на коштани систем код људи још увек није у потпуности разјашњена (136).

Поред свега наведеног и даље постоје бројни опречни ставови о дејствима медијатора који потичу од n-6 и n-3 масних киселина на хомеостазу и регенерацију коштаног ткива, што је последица недовољног познавања механизма дејства липидних медијатора, као и експресије ензима који их синтетишу и одговарајућих рецептора током зарастања прелома.

II ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

2.1 ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Циљеви овог истраживања су били следећи:

1. Упоредити вредности наведених параметара оксидационог стреса и антиоксидационих ензима код пацијената са преломом кука и бутне кости са вредностима здравих особа одговарајућег пола и старосне доби.
2. Упоредити вредности наведених параметара инфламаторних и липидних медијатора код пацијената са преломом кука и бутне кости са вредностима здравих особа одговарајућег пола и старосне доби.
3. Одређивање динамике промена редокс статуса пацијената са преломом бутне кости, односно кука током ране фазе зарастања костију (7 дана од операције), одређивањем нивоа: индекса липидне пероксидације (TBARS), азот монооксида ($\bullet\text{NO}$), супероксид анион радикала ($\text{O}_2^{\bullet-}$), водоник пероксида (H_2O_2), као и антиоксидационих ензима каталазе (CAT), супероксид дисмутазе (SOD) и редукованог глутатиона (GSH).
4. Одређивање динамике промене вредности инфламаторних медијатора (TNF- α и IL-6) и маснокиселинског профила фосфолипида плазме код пацијената са преломом кука и бутне кости током ране фазе зарастања костију (7 дана од операције).

III МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1 Популација која се испитује

Истраживање је обухватало 78 пацијената са преломом кука или бутне кости који су представљали експерименталну групу и 78 испитаника без прелома, одговарајућег пола и старости који су представљали контролну групу. Сви пацијенти са преломом су боравили на одељењу ортопедије, Клиничко-болничког центра у Крагујевцу у периоду од фебруара до маја 2015. године.

Сви пацијенти из експерименталне групе који су укључени у студију су били старији од 18 година, са индикацијом за хирушку интервенцију. Критеријуми за искључивање из експерименталне групе били су: недостатак натколенице/а или потколенице/а непогодних за протезу (непогодним патрљком за протезу сматра се патрљак на коме постоје трофичке промене, стални отоци, гризлице, фистуле, болни неурини, деформитети патрљка, опсежни ожиљци, екстремна атрофија мишића). Оштећење кичмене мождине или периферних нерава (квадриплегија, параплегија и хемиплегија) са или без губитка контроле мокрења и дефекације. Терцијални стадијуми малигних болести. Такође, ни један од испитаника није узимао антиоксидационе препарате који би потенцијално могли да утичу на резултате редокс статуса.

Сви пацијенти су у писменој форми информисани о садржају истраживања и начину употребе добијених резултата, након чега су пацијенти добровољно потписали сагласност за учешће. Након одобрења Етичког комитета КЦ Крагујевац отпочело се са истраживањем које је спроведено према принципима Добре клиничке праксе и Хелсиншке декларације (последње важеће верзије) и регулаторним прописима.

3.2 Протокол истраживања

Ово је проспективна, клиничка студија. Спроведена у периоду од фебруара до јуна 2015. године.

Пацијентима из експерименталне групе узиман је узорак венске крви у првих 6-12h након прелома кости, а потом тога и првог, трећег и седмог дана након операције, током периода опоравка. Испитаницима из контролне групе узорци венске крви, су узети само

једном. Крв је узимана у вакумске епрувете са цитратом, а основна обрада узорака састојала се од одвајања еритроцита од плазме центрифугирањем (10 min на 5000 rpm, 4 °C). Исталожени еритроцити су ресуспендовани и три пута испрани физиолошким раствором уз центрифугирање 10 min на 5000 rpm, а затим замрзнути на -20 °C до анализе.

3.2.1 Биохемијске анализе

У узорцима венске крви одређивани су следећи параметри:

1. параметри оксидационог стреса:
 - а) индекс липидне пероксидације (мерен као TBARS),
 - б) азот моноксид (NO), у форми нитрита (NO₂⁻),
 - в) супероксид анјон радикал (O₂⁻),
 - г) водоник пероксид (H₂O₂),
2. активност антиоксидационих ензима:
 - а) супероксид дисмутаза (SOD),
 - б) каталаза (CAT),
 - в) редуковани глутатион (GSH-Px),
3. нивои цитокина:
 - а) интерлеукин 6 (IL-6),
 - б) фактор некрозе тумора алфа (TNF-α),
4. маснокиселински профил укупних липида плазме:
 - а) засићене масне киселине (FSA);
 - б) мононезасићене масне киселине (MUFA);
 - в) полинезасићене масне киселине (PUFA).

Параметари оксидационог стреса и нивои цитокина мерени у узорцима (плазми) пацијената који су узимани у првих 12h од прелома, а након тога и првог, трећег и седмог дана од операције. Активност антиоксидационих ензима мерена је у ресуспендованим еритроцитима пацијената који су узимани у претходно споменутиим временским интервалима. Насупрот њима нивои масних киселина мерени су у плазми пацијената која је узимана у првих 12h од прелома и 7 дана од операције.

Такође, вредности наведених параметара у крви пацијената која је узимана одмах након прелома су поређене са вредностима одговарајућих параметара у крви код здравих добровољаца.

Биохемијске анализе параметара оксидационог стреса и активност антиоксидационих ензима су спроведене у Лабораторији за кардиоваскуларну физиологију на Факултету медицинских наука у Крагујевцу. Мерење је спроведено спектрофотометријском методом на апарату марке *Shimadzu UV-1800*, Северна Америка.

Биохемијске анализе концентрације цитокина, интерлеукина шест (IL-6) и туморске некрозе фактора- α , (TNF- α) су спровођене у Лабораторији за Имунологију, Факултета медицинских наука у Крагујевцу. Мерење је спроведено на апарату *Microplate reader-a (Zenyth, Anthos, UK)* Велика Британија.

Маснокиселински профил укупних липида плазме је урађен у Центру изузетне вредности у области истраживања исхране и метаболизма Института за медицинска истраживања, Универзитета у Београду. Масне киселине су анализирани гасно-течном хроматографијом (енгл. *Gas liquid chromatography-GLC*) на апарату *Shimadzu 2014*, Кјото, Јапан.

3.2.1.1 Одређивање индекса липидне пероксидације (TBARS)

Индекс липидне пероксидације, као један од параметара оксидационог стреса, одређује се индиректно на основу продукта реакције липидне пероксидације са тиобарбитурном киселином, одакле и потиче скраћеница TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances* – TBARS). Екстракт се добија комбиновањем 400 μ l 28% трихлорсирћетне киселине (ТСА) и 800 μ l плазме, затим се 15 минута оставља на лед, након чега се 15 минута врши центрифугирање на 6000 rpm. У 800 μ l супернатанта додаје се 200 μ l 1% тиобарбитурне киселине, а потом се добијени узорци кувају 15 минута на 100°C. Након наведене инкубације узорци се прилагођавају собној температури. Поступак за слепу пробу је исти, само се уместо плазме користи дестилована вода. Мерење се врши на спектрофотометру при таласној дужини од 530 nm (137).

Концентрација ослобођеног TBARS-а израчунава се преко следеће једначине:

$$nmol TBARS/ml \text{ плазме} = \frac{\Delta A(As - Abp)}{1.56 * 1.25}$$

При чему су: As - абсорбанца узорка, Abp - абсорбанца следеће пробе, 1.56 и 1.26 представљају факторе за корекцију.

3.2.1.2 Одређивање нитрита (NO₂⁻)

Азот моноксид се брзо разлаже формирајући стабилне нитрит/нитрат метаболите. Имајући у виду да у реакцији азот монооксида са молекуларним облицима кисеоника настаје еквимоларна количина нитрита ($NO + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow NO_2^-$), са великом сигурношћу можемо тврдити да количина ослобођених нитрита заправо представља количину отпуштених •NO.

Метода за детекцију нивоа нитрита у плазми заснива се на *Griess*-овој реакцији, који са нитритима гради диазо-комплекс, који даје љубичасту боју (138). *Griess*-ов реагенс се припрема *ex tempore*, непосредно пре аналитичког одређивања, мешањем једнаких запремина (v/v) 1% сулфанилне киселине, растворене у 5% орто-фосфорној киселини и 0,1% воденог раствора: N-(1-нафтил)-етиленамина дихидрохлорида (NEDA), који се чува у тамној бочици на 4 °C, због своје високе фотохемијске реактивности.

У епрувете се пипетира 0,1 ml екстракта плазме, 250 ml свеже направљеног *Griess*-ов реагенса и 125 ml амонијачног пуфера (pH = 9,0), кога сачињавају амонијум хлорид (NH₄Cl) и натријум тетраборат (Na₂B₄O₇). Амонијачни пуфер, који се у току припреме мора загревати, због изузетно слабе растворљивости натријум тетрабората, има за циљ да изврши стабилизацију диазо-комплекса. Као слепа проба екстракта плазме користи се дестилована вода. Концентрација ослобођених нитрита у узорцима одређује се на основу калибрационе криве. Калибрациона крива конструише се на основу екстинкција узорка, који у себи садрже познату концентрацију нитрита, након њихове реакције са *Griess*-овим реагенсом у присуству пуфера. Добија се пипетирањем различитих количина воденог раствора 1 mM NaNO₂ у 1 ml дестиловане воде и то: 3, 6, 12, 24 ml чиме се добија одређена концентрација нитрита. Након стабилизације боје на собној температури од 5 до 10 минута приступа се детерминисању концентрације ослобођених нитрита

срлектрофотометријски на таласној дужини од 550nm. Концентрација, а затим количина ослобођених нитрита, добија се на основу одређивања стандардног фактора (F):

$$F = \frac{\text{екстинкција стандарда} - \text{екстинкција слепе пробе}}{\text{концентрација } NaNO_2 \text{ у стандарду}}$$

за сваки појединачни стандард (F1 - F4), а затим добијањем њихове аритметичке средине.

Затим се разлика екстинкција узорка и слепе пробе подели са стандардом (F):

$$nmol NO_2/ml \text{ екстракта} = \frac{\Delta E (E_u - E_{sp})}{F}$$

3.2.1.3 Одређивање супероксид анјон радикала (O_2^-)

Одређивање концентрације супероксид анјон радикала у плазми заснива се на реакцији O_2^- са нитро тетразолијум плавим (*Nitro Blue Tetrazolium - NBT*) до нитроформазан плавог (139). Мерење се врши на таласној дужини максималне апсорпције од 550 nm. Есејна смеша (*assay mixture*) садржи: 50 mM TRIS-HCl пуфера (pH = 8.6), 0,1 mM EDTA, 0,1 mg/ml желатина и 0.1 mM NBT. Пре употребе раствор се претходно гасира азотом под притиском у трајању од једног часа. У епрувете (12 x 100) пипетира се 50 ml плазме и 950 ml есејне смеше, чиме реакција отпочиње. Као слепа проба уместо плазме користи се адекватна количина дестиловане воде. На самом почетку реакције измери се екстинкција смеше и нотира се као екстинкција E_1 . Сваких 60 секунди се врши мешање пластичним штапићем и нотира екстинкција након мешања до своје стабилизације, што подразумева две узастопне приближно исте екстинкције. Последња екстинкција се означава као E_2 . Исти поступак се примењује и за слепу пробу.

Концентрација ослобођеног O_2^- добија се на основу следећих једначина:

$$\Delta E_u = E_{2u} - E_{1u} \text{ (за узорак)}$$

$$\Delta E_{sp} = E_{2sp} - E_{1sp} \text{ (за слепу пробу)}$$

$$\Delta E = \Delta E_u - \Delta E_{sp}$$

$$nmol O_2^- / ml \text{ плазме} = \Delta E / 0.015 * 1 / 0.05$$

3.2.1.4 Одређивање водоник пероксида (H₂O₂)

Детерминација количине водоник пероксида (H₂O₂) се заснива на оксидацији фенол-црвеног помоћу водоник пероксида, реакцијом која је катализована пероксидазом из коњске ротквице (*Horse Radish Peroxidase* – HRPO) (140). Ова реакција резултује формирањем једињења чији је максимум апсорпције на 610 nm.

У епрувете (12x100) се пипетира 200 ml плазме и 800 ml свеже направљеног раствора фенол црвеног (*Phenol Red Solution* – PRS) који садржи 140 mM NaCl, 10 mM калијум фосфатног пуфера (pH = 7), 5.5 mM D(+)-глукозе и 0.28 mM фенол-црвеног. Узорцима се затим додаје 10 ml (1:20) HRPO, које је припремљен *ex tempore*. Након тога, узорци се остављају на собној температури 10 минута, а потом се помоћу 1 M NaOH подешава pH>12. Као слепа проба плазме користи се адекватна количина дестиловане воде.

За конструкцију стандардне криве користи се стандардни (*Stock*) раствор H₂O₂, уз претходну проверу концентрације (A₂₃₀ за 10 mM H₂O₂ износи 0.810). У три епрувете се, уместо плазме пипетира 5, 10 и 20 ml 1 mM раствора H₂O₂, 200 ml дестиловане воде, 800 ml раствора фенол-црвеног и 10 ml (1:20) HRPO. Након инкубације од 10 минута на собној температури на исти начин као у претходном случају се подешава pH вредност.

Концентрација, а затим и количина ослобођеног H₂O₂ у венском ефлуенту израчунава се на основу фактора апсорбанце (F)/nmol H₂O₂:

$$nmol H_2O_2/ml \text{ плазме} = \Delta A / F$$

На основу апсорбанце узорка (A_u) на 610nm и њеног упоређивања са слепом пробом (A_{sp}) израчунава се финална апсорбанца (ΔA) (A = A_u - A_{sp}). Помоћу овако добијене апсорбанце, фактора F и количине венског ефлуента употребљеног у есеју (200 ml) израчунава се концентрација и количина H₂O₂ у плазми по формули:

$$F = \Delta A / nmol H_2O_2 / cuv$$

3.2.1.5 Одређивање супероксид дисмутазае (SOD)

Одређивање активности супероксид дисмутазае (SOD) заснива се на епинефринској

методи која се заснива на праћењу смањења брзине аутооксидације у алкалној средини, која зависи од $O_2^{\cdot-}$ (141). SOD уклања $O_2^{\cdot-}$ и на тај начин спречава аутооксидацију епинефрина. Брзина аутооксидације се детектује спектрофотометријски на апсорбанци од 480 nm. Референцу, односно контролу представља брзина аутооксидације епинефрина у одсуству SOD, док брзина аутооксидације епинефрина у присуству SOD представља део референтних вредности. Износ SOD је изражена у јединицама њене активности по граму Hb (unit/gHb) (142). Израчунавање се врши према наведеној реакцији:

$$SOD - 1 = \frac{2(\Delta K - \Delta A) * R}{V * Hb * \Delta K}$$

При чему је:

ΔK промена апсорпције контролне реакције у минути;

ΔA промена апсорпције реакције са узорком у минути;

V запремина узорка која се сипа у реакциону смешу (ml);

Hb количина хемоглобина (g/100ml лизата);

R разблажење.

3.2.1.6 Одређивање каталазе (CAT)

Активност каталазе у сонификату одређује се по методи *Beutler*-а (143). Метода се састоји у спектрофотометријском праћењу брзине разградње водоник-пероксида у присуству каталазе на 230 nm. Наведена таласна дужина је од значаја јер на 230 nm водоник пероксид апсорбује светлост. Прецизна концентрација водоник-пероксида се одређује у односу на апсорпцију разблаженог раствора пуфера (1:10). Као нула, читава се апсорпција раствора састављеног од 0,9 ml разблаженог пуфера и 0,1 ml разблаженог 30% раствора H_2O_2 (1:100). Концентрација водоник пероксида израчунава се на основу екстинкционог коефицијента, који је за H_2O_2 на 230 nm, 0,071, по формули:

$$C = \frac{\Delta A}{0.071}$$

Наон тога, добијена концентрација се разблажује до 10 mM.

Поступак детерминисања нивоа овог антиоксидационог ензима се спроводи тако што се у кварцну кивету у којој се налази 50 μl пуфера додаје између 5 и 50 μl узорка (зависно од активности каталазе). Реакција почиње додатком 1 ml 10 mM раствора водоник-пероксида. Пад апсорбанце прати се на 230 nm у току 3 минута. Активност се изражава у јед/mg протеина, а јединица је дефинисана као количина редукованог H_2O_2 , изражена у μM , у минути. Израчунавање се врши према следећој једначини:

$$CAT = \frac{\Delta A * R}{0.071 * Low * V}$$

при чему је:

ΔA – промена апсорбанце у минути;

R – разблажење;

V – запремина узорка (ml);

Low – количина протеина (mg/ml сонификата).

3.2.1.7 Одређивање редукованог глутатиона (GSH)

Ниво редукованог глутатиона (GSH) у плазми се одређује спектрофотометријски по методи *Beutler*-а (144), а заснива се на оксидацији глутатиона GSH помоћу 5,5–дитио-бис-6,2-нитробензевом киселином (DTNB). GSH се екстрахује тако што се у 0,1 ml 0,1% EDTA дода 0,4 ml плазме и 0,75 ml раствора за преципитацију (1,67g метафосфорне киселине, 0,2g EDTA, 30g NaCl, допунити до 100ml дестилованом водом; раствор је стабилан 3 недеље на +4 $^{\circ}\text{C}$). После мешања на *Vortex* мешалици, смеша се екстрахује 15 минута на леду и центрифугира 10 минута на 4000 rpm. Мерење се спроводи у кварцним киветама запремине 1 ml. У епрувете (12 x 100) пипетира се 300 μl венског ефлуента, 750 μl Na_2HPO_4 и 100 μl DTNB (1 mg DTNB/ml 1% натријум цитрата). Као слепа проба користи се дестилована вода.

Концентрација, а затим и количина редукованог глутатиона у венском ефлуенту одређује се на основу калибрационог дијаграма (стандардне криве), који се одређује за сваки есеј. За конструкцију стандардне криве користи се стандардни Stock-раствор редукованог глутатиона концентрације 1.5 mmol/l. У 4 епрувете се пипетира (уместо

венског ефлуента) 10, 20, 30 и 40 μl 1 mM раствора GSH, 300 μl хладног перфузионог *Krebs-Hensenleit*-овог раствора. Тако се одреди концентрација нитрита у узорцима стандарда (nmol/GSH/ml). Мерење апсорбанце (A) врши се на таласној дужини максималне апсорпције $\lambda_{\text{max}} = 420 \text{ nm}$. Од добијених апсорбанци одузима се вредност апсорбанце следеће пробе (B), чиме се добија коначна апсорбанца (ΔA). Помоћу овако добијене апсорбанце, стандардног фактора (F), и количине венског ефлуента употребљеног у есеју израчунава се концентрација глутатиона у венском ефлуенту по формули:

$$\text{nmol GSH/ml ефлуента} = \Delta A / F$$

$$F = \frac{\Delta A}{\text{nmol GSH/cuv}}$$

3.2.1.8 Одређивање серумске концентрације цитокина (TNF- α и IL-6)

Концентрација цитокина у серуму одређивана је комерцијалним ELISA китовима специфичним за хумане цитокине (*Human IL-6 DuoSet ELISA Development kit, R&D Systems, USA; human TNF- α /TNFSF1A DuoSet ELISA Development kit, R&D Systems, USA*) (145). Стандарди су пре употребе растворени у PBS-у (*Phosphate buffered saline*) чија је pH вредност приближна 7,2 тако да почетне концентрације буду 2000 pg/ml. Направљени штокови су серијски седам пута двоструко разблажени у растварачу (енгл. *Reagent Diluent* који представља 1% BSA у PBS-у) да би се добила стандардна крива са 7 тачака. 100 μl радне концентрације везујућег антитела (енгл. *Capture Antibody*) додато је у бунарчиће полистиренских микротитар плоча (енгл. *microtiter plate* - MTP) које садрже 96 бунарчића са равним дном (SARSTED). Плоче су прелепљене адхезивном фолијом (енгл. *ELISA Plate Sealers*) и остављене преко ноћи на собној температури, након чега су бунарчићи испрани пуфером за испирање (енгл. *Wash Buffer*) у аутоматској машини за испирање MTP-а. Затим је у све бунарчиће додат пуфер за блокирање (*Block Buffer*, 1% BSA у PBS-у) финалног волумена 300 μl и MTP су остављене минимум 1 сат на собној температури. MTP су тада испране пуфером за испирање. Сви узорци су претходно разблажени 10 пута у дејонизованој води. Разблажени узорци и припремљени стандарди сипани су у MTP, које

су прекривене адхезивном фолијом и остављене 2 сата на собној температури. Након инкубације и испирања МТР, у све бунарчиће је додато 100µl радне концентрације детекционог антитела (енгл. *Detection Antibody*), а плоче су поново обложене адхезивном фолијом и остављене додатних 2 сата на собној температури. МТР су поново испране, а у бунарчиће је сипано 100µl радне концентрације *Streptavidin-HRP* (*Streptavidin horseradish peroxidase*). Инкубација на собној температури и без директног излагања светлости прекинута је након 20 минута, испирањем МТР-а. У бунарчиће је сипано 100 µl *Substrate Solution* (*Color reagent A + Color reagent B*, 1:1). Двадесет минута касније, додато је 50 µl *Stop Solution* (2N H₂SO₄) и оптичка гусина је непосредно мерена и сваком бунарчету, помоћу *Microplate* читача (*Zenyth, Anthos, UK*) подешеног на 450 nm (енгл. *enzyme linked immunosorbent assay*) (146).

Све измерене вредности су умањене за вредности апсорбанци слепе пробе (дејонизована вода). На основу измерених вредности стандарда направљена је стандардна крива, а помоћу ње су израчунате вредности за сваки појединачан узорак. Сви узорци су мерени у трипликату.

3.2.1.9 Анализа маснокиселинског профила укупних липида плазме гасно-течном хроматографијом

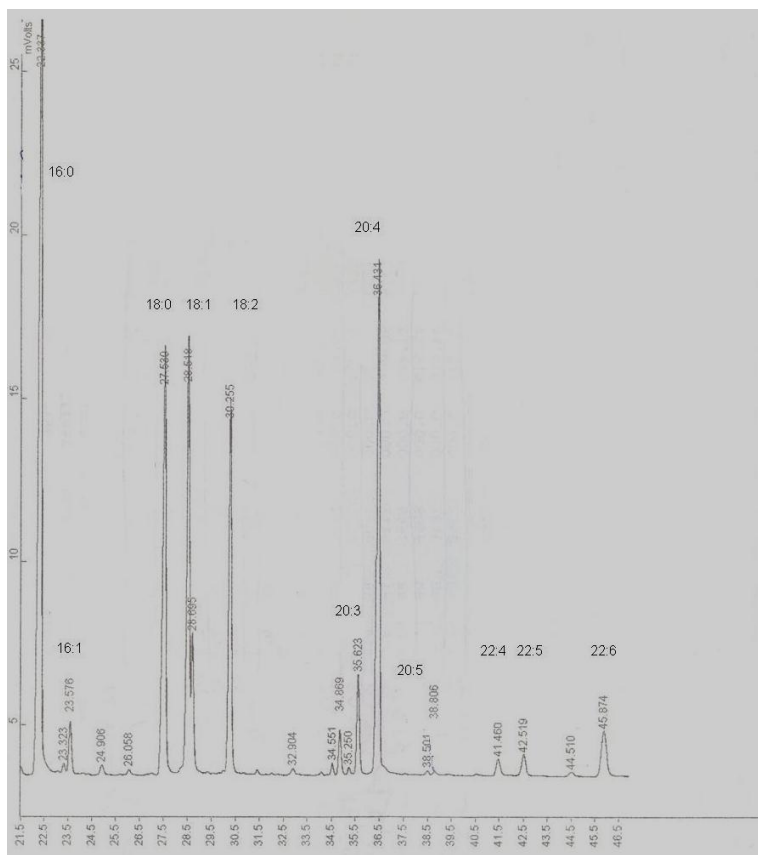
Анализа маснокиселинског профила укупних липида плазме гасно-течном хроматографијом подразумева директну трансестерификацију, при чему је маснокиселински профил укупних липида плазме одређиван по методи *Glaser-a* и сарадника (2010) уз мале модификације (147).

У 100 µl плазме додато је 1,5 ml HCl у метанолу (3N HCl у метанолу који садржи и 2 g/l 2,6-ди-терт-бутил-р-крезол тј. ВНТ), након чега су епрувете током 30 секунди мешане на вортексу. Процес директне трансестерификације започиње загревањем узорака на 85°C, а завршава се након 45 минута. Епрувете су затим охлађене на собној температури при чему се у сваки узорак додаје 1 ml хесана који садржи 2 g/l ВНТ-а који има улогу антиоксиданса. Након десетоминутног центрифугирања на 1860 x g, горњи хексански слој пренет је у епендорфице и упарен до сува у струји азота. Узорци припремљених метил-

естара растворени су непосредно пре анализирања у 20 μl хексана, а од тога је у гасни хроматограф ињектован 1 μl .

Након тога су масне киселине анализирани гасно-течном хроматографијом (енгл. *Gas liquid chromatography-GLC*) на апарату *SHIMADZU 2014*, Кјото, Јапан. Коришћена је капиларна колоне *Rtx 2330, RESTEK, USA*, димензија 60 m и 0.25 mm ID. Дебљина филма стационарне фазе је 0.20 μm . Проток носећег гаса (хелијума) био је 5 ml/мин, проток ваздуха 320 ml/мин, а водоника 30 ml/мин. Температура детектора била је 240°C, а ињектора 220°C. Температура колоне са 140°C колика је била на старту, је подизана до 220°C, брзином 3°C/минуто.

Масне киселине су идентификоване упоређивањем са хроматограмом стандарда масних киселина PUFA-2 стандард (*Supelco, Inc., Bellefonte, Pa., USA*). Резултати су изражени у процентима од укупно раздвојених масних киселина. Пример GLC хроматограма масних киселина укупних липида плазме приказан је на слици 1.



Слика 1: GLC хроматограм масних киселина укупних липида плазме

3.3 Статистичка обрада података

Статистичка обрада података рађена је у статистичком пакету *SPSS 20.0 for Windows*. Параметри од значаја су у зависности од њихове природе описани коришћењем метода дескриптивне статистике. У зависности од расподеле која је проверена помоћу *Kolmogorov-Smirnov* или *Shapiro-Wilk*-овог теста, за анализу података коришћени су одговарајући параметријски или непараметријски тестови. ANOVA или *Kruskal Wallis*-ов тест су коришћени да би се упоредила аритметичка средина неког обележја више од две групе. Значајност разлике између два мерења у оквиру једне групе испитаника анализирана је упареним т-тестом односно *Willcoxon*-овим тестом.

Резултати у табелама и на графицима су приказани као средња вредност \pm стандардна грешка ($X \pm SD$), док је статистичка значајност разлике била постављена на нивоу од $p < 0,05^*$ и $p < 0,01^{**}$.

IV РЕЗУЛТАТИ

4.1 ДЕМОГРАФСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ИСПИТАНИКА

Демографске карактеристике испитаника су приказане у **Табели 2**. Као што се из **Табеле 2** може видети, статистички значајне разлике у полној дистрибуцији и годинама старости између експерименталне и контролне групе није било.

Табела 2. Опште карактеристике учесника студије

Експериментална група (n=78)		Контролна група (n=78)		Р
Старост [#]	72,8 (35-98)	Старост [#]	70,5 (37-87)	p > 0,05
Мушки пол	33,34% (26)	Мушки пол	33,34% (29)	p > 0,05
Женски пол	66,67% (52)	Женски пол	66,67% (49)	p > 0,05

[#]Вредности су представљене као средња вредност и опсег у коме су се вредности кретале.

Женски пол је био заступљенији и у контролној и у експерименталној групи. Од укупно седамдесетосам (78) пацијената који су били укључени у експерименталну групу, њих педесетдвоје (52) су чиниле жене, а двадесетшесторо (26) је чинило мушкарце. У контролној групи било је укључено четрдесетдевет (49) жена и двадесетдевет (29) мушкараца. Другим речима, хомогеност контролне и експерименталне групе је била висока.

Сви учесници студије су били сличне животне доби. У експерименталној групи просечан број година старости је износио 72,8, док је у контролној групи износио 70,5.

4.2 РЕДОКС СТАТУС

4.2.1 Поређење параметара оксидационог стреса у плазми између контролне и експерименталне групе

Табела 3 и **График 1** приказују разлике у вредностима про-оксидационих маркера између контролне (добровољни учесници без прелома) и експерименталне (пацијенти са преломом кука или бутне кости) групе.

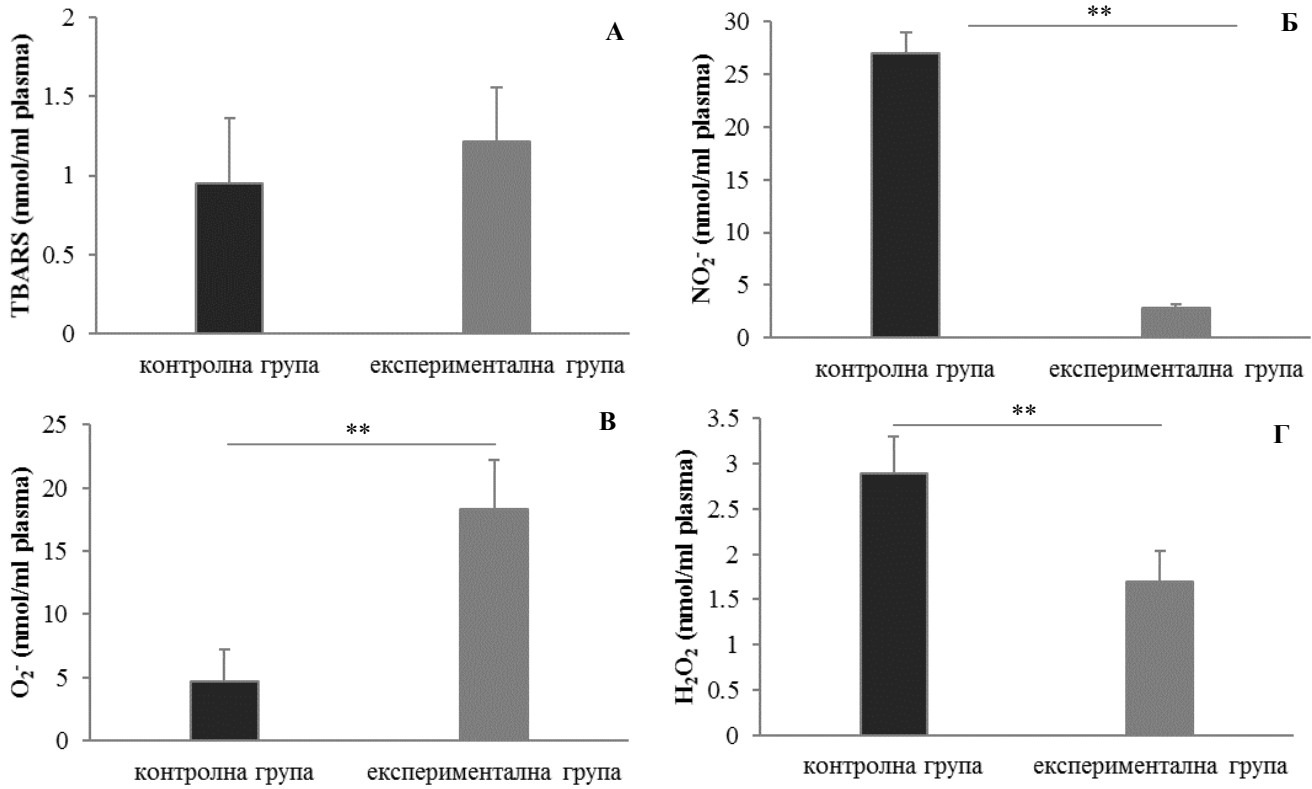
Ниво липидне пероксидације (мерен као TBARS) је био виши у експерименталној групи у односу на контролну групу, али без статистичке значајности (**График 1А**). Нивои NO_2^- и H_2O_2 су били статистички нижи у групи пацијената са преломом у односу на контролну групу (**График 1Б, 1Г**), док су нивои O_2^- били статистички значајно виши у експерименталној у односу на контролну групу (**График 1В**).

Табела 3. Разлике у нивоима параметара оксидационог стреса између експерименталне и контролне групе ($X \pm SD$).

Варијабле	Експериментална група (n=78)	Контролна група (n=78)	P
TBARS ($\mu\text{mol/ml}$)	1,22 \pm 0,34	0,95 \pm 0,41	p > 0,05
NO₂⁻ (nmol/ml)	2,88 \pm 0,32	27,02 \pm 1,91	p < 0,01
O₂⁻ (nmol/ml)	18,26 \pm 3,95	4,66 \pm 2,56	p < 0,05
H₂O₂ (nmol/ml)	1,70 \pm 0,32	2,89 \pm 0,37	p < 0,01

Вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна девијација.

График 1. Разлике у нивоима параметара оксидационог стреса између експерименталне и контролне групе; Вредности су приказане као $X \pm SD$; X – средња вредност, SD – стандардна девијација, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$; **А** Нивои липидне пероксидације (мерених као TBARS); **Б** Нивои нитрита (NO_2^-); **В** Нивои супероксид анјон радикала; **Г** Нивои водоник пероксида.



4.2.2 Динамика промене нивоа параметара оксидационог стреса током ране фазе зарастања костију

Табела 4 и **График 2** приказују динамику промене вредности слободних радикала код пацијената са преломом бутне кости или кука током ране фазе зарастања костију. Вредности индекса липидне пероксидације (TBARS), азот монооксида ($\bullet\text{NO}$), супероксид анион радикала ($\text{O}_2^{\bullet-}$), водоник пероксида (H_2O_2) су праћене током првих 7 дана од операције костију и то у следећим интервалима: у првих 6-12h након прелома, а потом првог, трећег и седмог дана након операције.

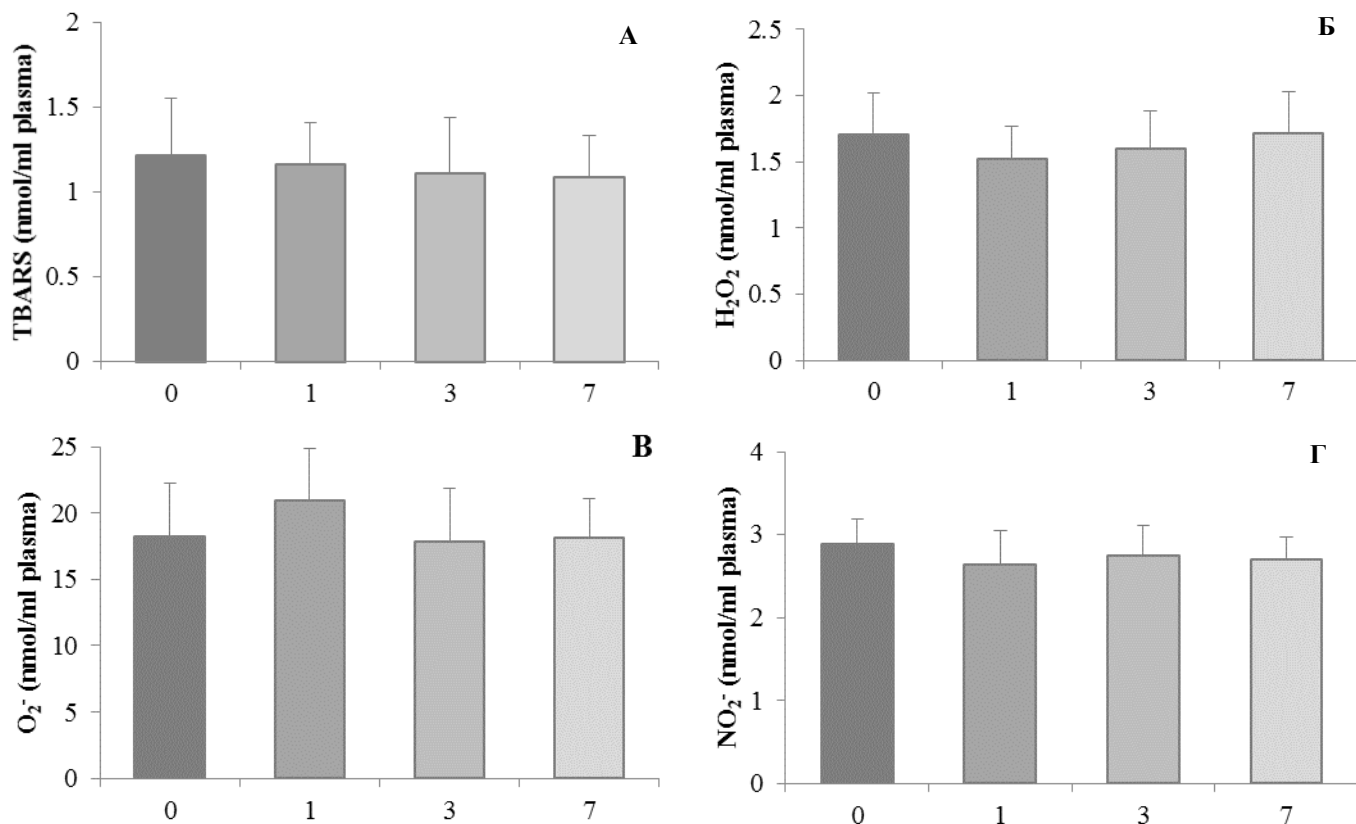
Током периода ране фазе зарастања костију (првих седам дана након операције) није дошло до статистички значајних промена вредности испитиваних параметара оксидационог стреса (**График 2А-Г**).

Табела 4. Динамика промене нивоа параметара оксидационог стреса током ране фазе зарастања костију ($X \pm SD$).

	TBARS ($\mu\text{mol/ml}$)	NO_2^- (nmol/ml)	O_2^- (nmol/ml)	H_2O_2 (nmol/ml)
0	$1,22 \pm 0,34$	$2,88 \pm 0,32$	$18,26 \pm 3,95$	$1,70 \pm 0,32$
1	$1,17 \pm 0,24$	$2,64 \pm 0,41$	$20,96 \pm 3,87$	$1,52 \pm 0,24$
3	$1,11 \pm 0,33$	$2,74 \pm 0,37$	$17,86 \pm 4,03$	$1,59 \pm 0,29$
7	$1,09 \pm 0,24$	$2,70 \pm 0,28$	$18,09 \pm 3,04$	$1,71 \pm 0,31$

Вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна девијација.

График 2. Динамика промене нивоа параметара оксидационог стреса током ране фазе зарастања костију код пацијената са преломом бутне кости или кука; **0** Првих 12h након прелома; **1** Први дан након операције; **3** Трећи дан након операције; **7** Седми дан након операције; Вредности су приказане као $X \pm SD$; X – средња вредност, SD – стандардна девијација, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$; **А** Нивои липидне пероксидације (мерених као TBARS); **Б** Нивои нитрита (NO_2^-); **В** Нивои супероксид анјон радикала; **Г** Нивои водоник пероксида.



4.2.3 Поређење параметара антиоксидационих ензима у еритроцитима између контролне и експерименталне групе

Табела 5 и **График 3** приказују разлике у вредностима анти-оксидационих маркера између контролне (добровољни учесници без прелома) и експерименталне (пацијенти са преломом кука или бутне кости) групе.

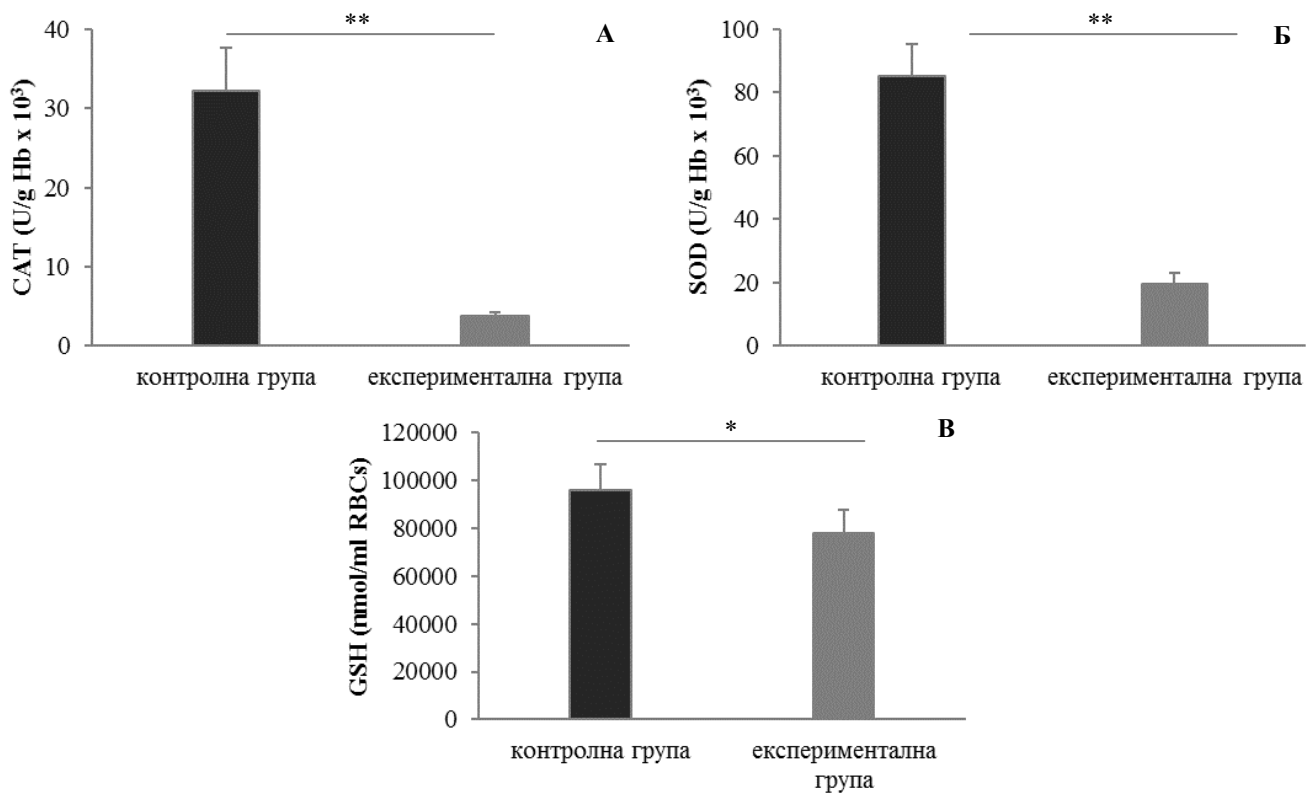
Нивои свих мерених антиоксидационих ензима (каталаза, супероксид дисмутаза, редуковани глутатион) су били статистички значајно нижи код пацијената са преломом у односу на контролну групу (**График 3А-В**).

Табела 5. Разлике у нивоима антиоксидационих ензима између експерименталне и контролне групе ($X \pm SD$).

Варијабле	Експериментална група (n=78)	Контролна група (n=78)	Р
CAT (U/g Hb x 10 ³)	5,38 ± 0,53	32,24 ± 3,76	p < 0,01
SOD (U/g Hb x 10 ³)	19,61 ± 3,28	85,32 ± 10,21	p < 0,01
GSH (nmol/ml RBCs)	77679.82 ± 10005.78	95678,32 ± 11042.8	p < 0,05

Вредности су представљене као средња вредност ± стандардна девијација.

График 3. Разлике у нивоима антиоксидационих ензима између експерименталне и контролне групе; Вредности су приказане као $X \pm SD$; X – средња вредност, SD – стандардна девијација, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$; **А** Активност каталазе (CAT); **Б** Активност супероксид дисмутазе (SOD); **В** Активност редукованог глутатиона (GSH).



4.2.4 Динамика промене нивоа антиоксидационих ензима током ране фазе зарастања костију

Табела 6 и **График 4** приказују динамику промене активности антиоксидационих ензима код пацијената са преломом бутне кости или кука током ране фазе зарастања костију. Вредности антиоксидационих ензима каталазе (CAT), супероксид дисмутазе (SOD) и редукованог глутатиона (GSH) су праћене током првих 7 дана од операције костију и то у следећим интервалима: у првих 6-12h након прелома, а потом првог, трећег и седмог дана након операције.

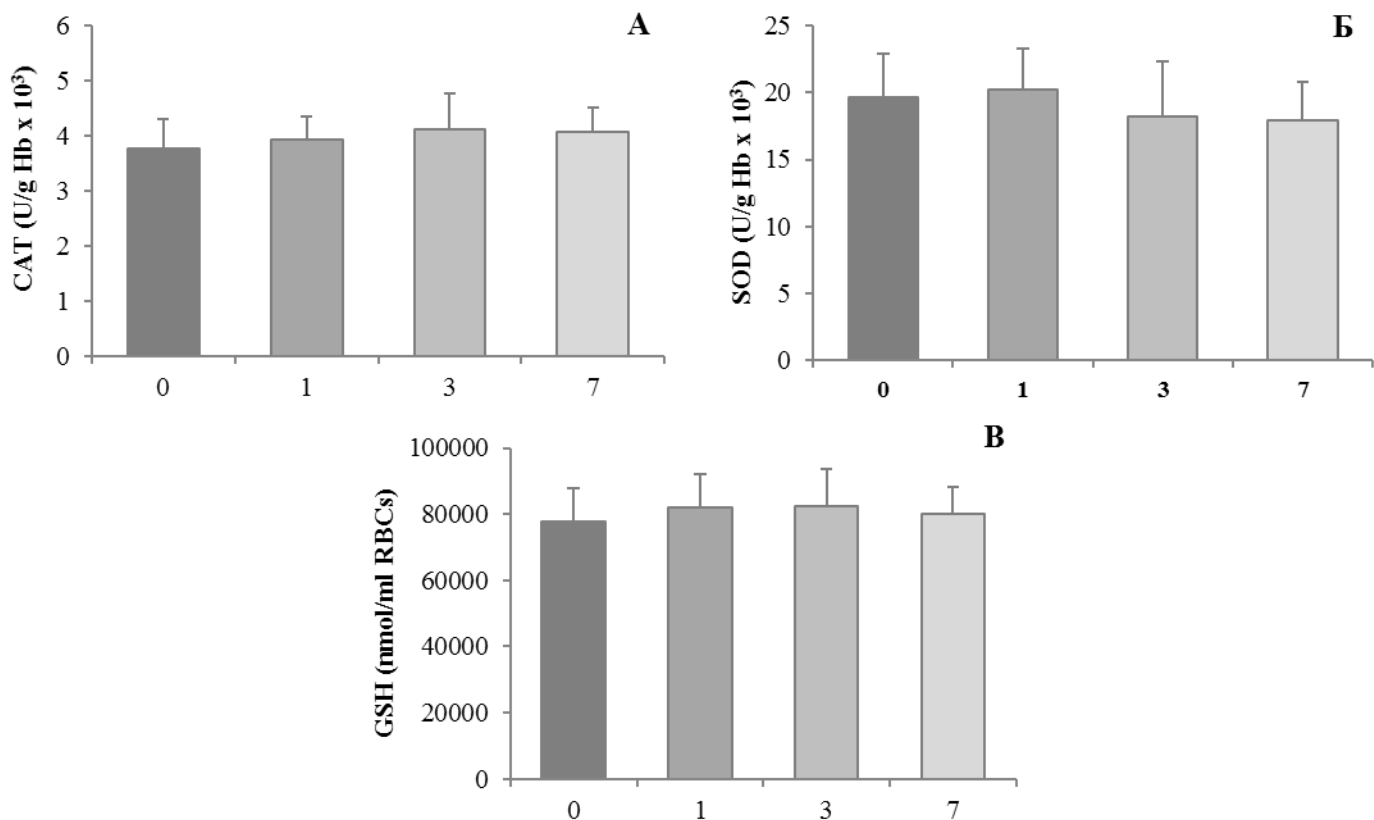
Током периода ране фазе зарастања костију (првих седам дана након операције) није дошло до статистички значајних промена активности испитиваних антиоксидационих ензима (**График 4А-В**).

Табела 6. Динамика промене активности антиоксидационих ензима током ране фазе зарастања костију ($X \pm SD$).

	CAT (U/g Hb x 103)	SOD (U/g Hb x 103)	GSH (nmol/ml RBCs)
0	3,76 ± 0,53	19,61 ± 3,28	77679,82 ± 10005,78
1	3.93 ± 0,41	20,61 ± 3,15	81993,58 ± 10106,9
3	4.12 ± 0,64	18,23 ± 4,05	82564,20 ± 11004,07
7	4.06 ± 0,46	17,91 ± 2,9	80178,44 ± 8091,1

Вредности су представљене као средња вредност ± стандардна девијација.

График 4. Динамика промене нивоа активности антиоксидационих ензима током ране фазе зарастања костију код пацијената са преломом бутне кости или кука; **0** Првих 12h након прелома; **1** Први дан након операције; **3** Трећи дан након операције; **7** Седми дан након операције; Вредности су приказане као $X \pm SD$; X – средња вредност, SD – стандардна девијација, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$; **А** Активност каталазе (CAT); **Б** Активност супероксид дисмутазе (SOD); **В** Активност редукованог глутатиона (GSH).



4.3 ИНФЛАМАТОРНИ МЕДИЈАТОРИ

4.3.1 Поређење нивоа инфламаторних медијатора између контролне и експерименталне групе

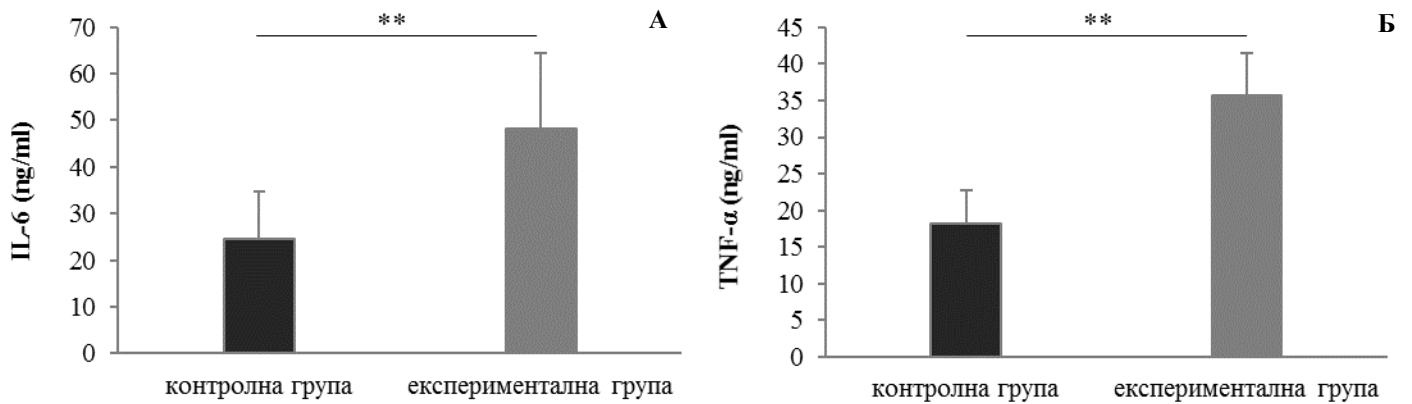
Табела 7 и **График 5** приказују разлике у вредностима инфламаторних медијатора између контролне групе коју чин (добровољни учесници без прелома и експерименталне групе коју чине пацијенти са преломом кука или бутне кости.

Оба мерена цитокина (IL-6 и TNF- α) су показала статистички значајно више вредности у групи пацијената са преломом у односу на контролну групу (**График 5А, 5Б**).

Табела 7. Разлике у нивоима инфламаторних медијатора између експерименталне и контролне групе (X \pm SD).

Варијабле	Експериментална група (n=78)	Контролна група (n=78)	Р
IL-6 (ng/ml)	48,28 \pm 16,03	24,52 \pm 10,12	p < 0,01
TNF-α (ng/ml)	35,77 \pm 5,76	18,61 \pm 4,52	p < 0,01

График 5. Разлике у нивоима инфламаторних медијатора између добровољних учесника и пацијената са преломом бутне кости или кука; Вредности су приказане као $X \pm SD$; X – средња вредност, SD – стандардна девијација, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$; **А** Интерлеукин-6 (IL-6); **Б** Фактор некрозе тумора-алфа (TNF- α).



4.3.2 Динамика промене нивоа инфламаторних медијатора током ране фазе зарастања костију

Табела 8 и **График 6** приказују динамику промене нивоа испитиваних медијатора инфламације код пацијената са преломом бутне кости или кука током ране фазе зарастања костију. Вредности интерлеукина-6 (IL-6) и фактора некрозе тумора алфа (TNF- α) су праћене током првих 7 дана од операције костију и то у следећим интервалима: у првих 6-12h након прелома, а потом првог, трећег и седмог дана након операције.

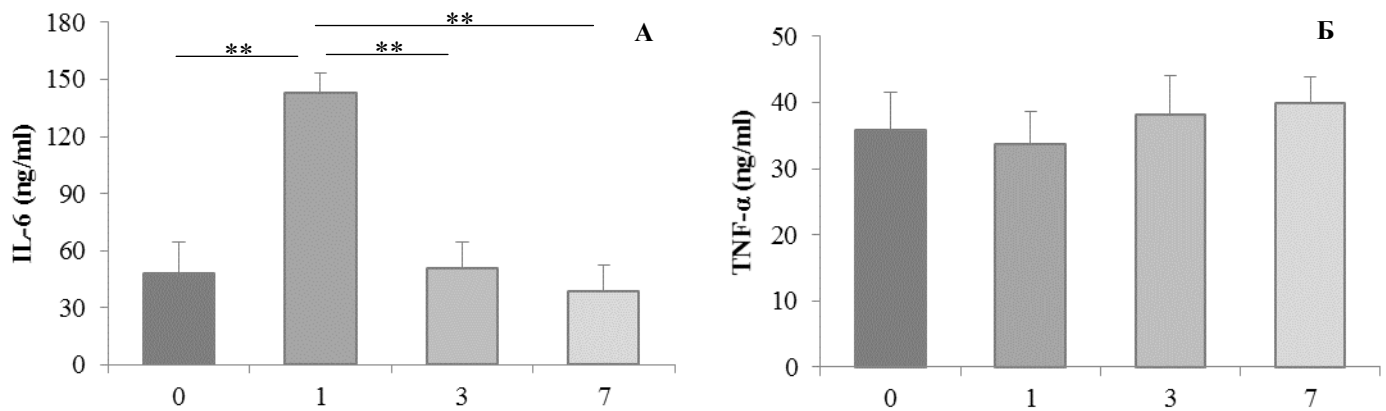
У периоду ране фазе зарастања костију дошло је до статистички значајног повећања нивоа IL-6 првог дана након операције у односу на све остале тачке од интереса (након прелома, трећег и седмог дана од операције) (**График 6А**). Вредности TNF- α се нису статистички значајно мењале током временског интервала у коме су узимани узорци крви (**График 6Б**).

Табела 8. Динамика промене нивоа липидних медијатора инфламације током ране фазе зарастања костију ($X \pm SD$).

	IL-6 (ng/ml)	TNF-α (ng/ml)
0	48,28 \pm 16,03	35,77 \pm 5,76
1	142,79 \pm 10,31	33,75 \pm 4,88
3	50,88 \pm 13,46	38,20 \pm 5,94
7	38,51 \pm 13,66	39,91 \pm 3,96

Вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна девијација.

График 6. Динамика промене нивоа испитиваних медијатора инфламације код пацијената са преломом бутне кости или кука током ране фазе зарастања костију **0** Првих 12h након прелома; **1** Први дан након операције; **3** Трећи дан након операције; **7** Седми дан након операције; Вредности су приказане као $X \pm SD$; X – средња вредност, SD – стандардна девијација, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$; **А** Интерлеукин-6 (IL-6); **Б** Фактор некрозе тумора-алфа (TNF- α).



4.4 МАСНОКИСЕЛИНСКИ ПРОФИЛ УКУПНИХ ЛИПИДА ПЛАЗМЕ

Одређивањем маснокиселинског профила укупних липида плазме детектовано је присуство 14 масних киселина које су подељене у три групе: засићене масне киселине (SFA), мононезасићене масне киселине (MUFA) и полинезасићене масне киселине (PUFA).

4.4.1 Поређење маснокиселинског профила укупних липида плазме између контролне и експерименталне групе

Процентуална заступљеност масних киселина фосфолипида плазме између контролне (добровољни учесници без прелома) и експерименталне (пацијенти са преломом кука или бутне кости) групе приказана је у **Табели 9**.

Процент засићених масних киселина, палмитинске киселине (C16:0) и стеаринске (C18:0) био је статистички значајно виши ($p < 0,01$) код пацијената са преломом у односу на здраве испотанике.

У фосфолипидима плазме детектоване су три мононезасићене масне киселине: палмитолеинска (C16:1, n-7), олеинска (C18:1, n-9) и вакценска (C18:1, n-7). У поређењу са контролном групом, пацијенти са преломом бутне кости или бута су имале значајније већи удео ($p < 0,01$) свих детектованих, као и укупних мононезасићених масних киселина (MUFA).

Полинезасићене масне киселине су због различитих хемијских структура подељене у две групе n-3 и n-6. Процентуална заступљеност линолне киселине (C18:2, n-6) била је приближно иста ($p > 0,05$) код обе испитиване групе, али је заступљеност АА (C20:4, n-6) била значајно нижа ($p < 0,01$) код пацијената са преломом бутне кости или кука. Са друге стране, све детектоване n-3 PUFA су показале нижу процентуалну заступљеност код пацијената са преломом у односу на контролну групу. Такође и удео n-6, n-3 као и укупних PUFA је био значајно нижи ($p < 0,01$) код пацијената са преломом. Међутим, однос n-6/n-3 био је статистички виши ($p < 0,01$) у експерименталној групи.

Табела 9. Процентуална заступљеност масних киселина фосфолипида плазме између контролне и експерименталне групе ($X \pm SD$).

Масне киселине (mol%)	Експериментална група (n=78)	Контролна група (n=78)	P
Засићене масне киселине			
C16:0	30,65 ± 2,28	26,43 ± 2,51	p < 0,01
C18:0	13,53 ± 1,17	15,93 ± 1,92	p < 0,01
SFA	44,18 ± 2,17	42,36 ± 4,43	p < 0,01
Мононезасићене масне киселине			
C16:1, n-7	1,96 ± 0,84	0,82 ± 1,12	p < 0,01
C18:1, n-9	15,91 ± 1,81	11,71 ± 1,50	p < 0,01
MUFA	20,12 ± 2,63	12,53 ± 1,62	p < 0,01
Полинезасићене масне киселине			
C18:2, n-6 (LA)	24,53 ± 3,33	25,90 ± 3,52	p > 0,05
C20:3, n-6	1,93 ± 0,88	2,71 ± 1,02	p < 0,01
C20:4, n-6 (AA)	6,47 ± 1,43	11,22 ± 2,01	p < 0,01
C22:4, n-6	0,31 ± 0,14	0,32 ± 0,21	p > 0,05
n-6	33,68 ± 3,69	40,15 ± 3,92	p < 0,01
C20:5, n-3 (EPA)	0,26 ± 0,18	0,30 ± 0,21	p < 0,05
C22:5, n-3	0,33 ± 0,09	0,62 ± 0,11	p < 0,01
C22:6, n-3 (DHA)	1,22 ± 0,52	3,62 ± 1,09	p < 0,01
n-3	2,04 ± 0,67	4,54 ± 1,25	p < 0,01
n-6/n-3	16,50 ± 2,63	8,84 ± 2,31	p < 0,01
PUFA	35,71 ± 3,71	44,69 ± 4,27	p < 0,01

Вредности су представљене као средња вредност ± стандардна девијација.

4.4.2 Динамика промене маснокиселинског профила укупних липида плазме током ране фазе зарастања костију

Маснокиселински профил засићених, мононезасићених и полинезасићених масних киселина приказан је у **Табели 10**.

Удео стеаринске киселине (C18:0) није се значајно мењао током периода зарастања костију док је проценат палмитинске киселине (C16:0), као и укупних SFA био статистички значајно виши ($p < 0,01$) седам дана након операције костију него након прелома костију.

У фосфолипидима плазме детектоване су палмитолеинска (C16:1, n-7), олеинска (C18:1, n-9) и вакценска (C18:1, n-7) MUFA. Током ране фазе зарастања костију није дошло до значајних променама у уделу наведених мононезасићених масних киселина.

Анализа полинезасићених масних киселина током првих седам дана зарастања костију показала је значајно нижу процентуалну заступљеност LA ($p < 0,01$), n-6 PUFA ($p < 0,01$) као и укупних PUFA ($p < 0,01$) седмог постоперативног дана у односу на њену заступљеност у плазми пацијента одмах након прелома. Док са друге стране, однос n-6/n-3 масних киселина је већи ($p < 0,01$) код пацијената након седмодневног зарастања костију него одмах након прелома.

Табела 10. Процентуална заступљеност масних киселина фосфолипида плазме одмах након прелома и 7 дана након операције пацијената са преломом бутне кости или кука ($X \pm SD$).

Масне киселине (mol%)	Након прелома 0	Седам дана након операције 7	P
Засићене масне киселине			
C16:0	30,65 ± 2,28	33,33 ± 1,47	p < 0,01
C18:0	13,53 ± 1,17	12,66 ± 1,91	p > 0,05
SFA	44,18 ± 2,17	45,99 ± 2,35	p < 0,05
Мононезасићене масне киселине			
C16:1, n-7	1,96 ± 0,84	1,90 ± 0,72	p > 0,05
C18:1, n-9	15,91 ± 1,81	16,84 ± 1,98	p > 0,05
C18:1, n-7	2,24 ± 0,55	2,23 ± 0,55	p > 0,05
MUFA	20,12 ± 2,63	20,98 ± 2,16	p > 0,05
Полинезасићене масне киселине			
C18:2, n-6 (LA)	24,53 ± 3,33	22,65 ± 2,81	p < 0,01
C18:3, n-6	0,44 ± 0,29	0,42 ± 0,25	p > 0,05
C20:3, n-6	1,93 ± 0,88	1,91 ± 0,67	p > 0,05
C20:4, n-6 (AA)	6,47 ± 1,43	5,91 ± 1,56	p > 0,05
C22:4, n-6	0,31 ± 0,14	0,32 ± 0,27	p > 0,05
n-6	33,68 ± 3,69	31,20 ± 2,51	p < 0,01
C18:3, n-3	0,22 ± 0,07	0,17 ± 0,08	p > 0,05
C20:5, n-3 (EPA)	0,26 ± 0,18	0,21 ± 0,11	p > 0,05
C22:5, n-3	0,33 ± 0,09	0,32 ± 0,14	p > 0,05
C22:6, n-3 (DHA)	1,22 ± 0,52	1,13 ± 0,34	p > 0,05
n-3	2,04 ± 0,67	1,18 ± 0,41	p > 0,05
n-6/n-3	16,50 ± 2,63	26,44 ± 4,71	p < 0,01
PUFA	35,71 ± 3,71	33,03 ± 2,61	p < 0,01

Вредности су представљене као средња вредност ± стандардна девијација.

V ДИСКУСИЈА

Преломи бутне кости, пре свега кука, представљају типичне преломе код старијих пацијената. Упркос хируршким достигнућима протеклих година, ова врста прелома још увек за собом повлачи високу стопу компликација, па самим тим доприноси повећању инвалидитета, морбидитета и морталитета. Једна трећина пацијената захтева виши ниво дугорочне неге, а важно је напоменути и да смртност у самој болници износи око 10%, док смртност у току прве године од прелома износи око 27% (148). Као што је већ речено, ризик од прелома је у корелацији са годинама пацијената јер било који губитак остеобласта или повећање остеокласта, доводи до остеопорозе, смањене густине костију, смањења масе костију као и слабљења костију, а самим тим и веће вероватноће за настанак прелома костију (96).

Основни циљ овог истраживања био је да испита улогу оксидационог стреса и инфламације како код прелома тако и првих седам дана током процеса зарастања костију код пацијената са преломом бутне кости или кука. Током истраживања праћени су најзначајнији параметри оксидационог стреса, као што су липидна пероксидација (мерена као TBARS), азот моноксид (мерен у форми нитрита), супероксид анјон радикал, водоник пероксид и антиоксидационих ензима као што су супероксид дисмутаза, каталаза и редуковани глутатион. Такође, праћене и бележене су вредности цитокина и то интерлеукина-6 и фактора некрозе тумора алфа, а уз то је одређиван и маснокиселински профил укупних липида плазме, односно нивои засићених, као и моно- и поли-незасићених масних киселина. Сврха истраживања била је да приближи и што боље објасни улогу оксидационог стреса и инфламаторних и липидних медијатора током ране фазе зарастања костију, имајући у виду да многи научници ове параметре повезују са многобројним обољењима и поремећајима у организму.

Велики број научних радова посвећен је испитивањима фактора који утичу на здравље скелетног система. Научници истичу и посебну пажњу најчешће посвећују калцијуму, витамину Д као и протеинима који доприносе здрављу скелетног система тако што утичу на продукцију и минерализацију коштаног матрикса (149-151). Међутим, последњих година све више се истиче и значај промене нивоа појединих хормона, различитих дијететских стања, оксидациони стрес као и бројни други фактори за које има података да су повезани са минералном хомеостазом (152-156). Имајући у виду веома мали број истраживања који су били посвећени испитивању наведених параметара и да је

ова студија једина која испитује и повезује њихову улогу када пацијената са преломом кука или бутне кости, резултати ове студије би могли да употпуне и из више угла сагледају слику сложеног процеса зарастања костију. Поред свега наведеног очекује се да резултати ове студије помогну бољем разумевању улоге оксидационог стреса, инфламаторних медијатора и липидних медијатора, као и њихове евентуалне интеракције у клиничком исходу, постоперативном опоравку и рехабилитацији пацијената са преломом кука и бутне кости.

5.1 РЕДОКС СТАТУС

5.1.1 Поређење параметара оксидационог стреса у плазми између контролне и експерименталне групе

Последњих двадест година све је већи број научника који истичу водећу улогу слободних радикала у настанку повреде ткива у различитим органским системима. Као што је већ споменуто, слободни радикали изазивају оштећења биомолекула, пре свега протеина, ДНК и угљених хидрата, што проузрокује повреду ткива (157-159).

Једна од најштетнијих реакција између полинезасићених масних киселина и реактивних кисеоничних једињења доводи до липидне пероксидације, а као крајњи производ ове реакције настаје малондиалдехид (MDA). С обзиром да ROS имају јако кратак полу-живот, у нашем истраживању липидна пероксидација је мерена индиректно, преко вредности TBARS-а (160). Иако је дошло до повећања TBARS-а код пацијената са преломом у односу на контролну групу (здрави испитаници), забележено повећање није било статистички значајно (**Табела 3, График 1А**). Наши резултати су у корелацији са резултатима *Wang*-а и сарадника који су такође показали пораст овог параметра код старијих пацијената са преломом врата бутне кости (161). С обзиром да су у својој студији испитивали и вредности овог параметра код млађих пацијената са фрактуром бутне кости, дошли су до закључка да је статистички значајнији пораст примећен код старијих пацијената. Ако узмемо у обзир да је разлика у просечној старости између пацијената у нашој и њиховој студији више од 15 година (у нашој студији 70,5, док је у њиховој 86 година) то може бити и један од разлога зашто код нас није дошло до значајнијег пораста овог параметра (161). У сличном истраживању које су спровели *Kartikay* и сарадници такође је показана повећана липидна пероксидација (162). Истраживање наведеног аутора је спроведено на пацијентима са преломом и здравим испитаницима, а липидна пероксидација је мерена у плазми преко вредности MDA, али истовремено и преко вредности TBARS-а. Оба параметра су показала статистички значајно повећање код пацијената са преломом у односу на здраве испитанике (162).

У нашој студији, мерењем вредности азот монооксида и водоник пероксида забележен је статистички значајан ($<0,01$) пад у експерименталној групи у односу на

контролну групу (Табела 3, График 1Б, 1Г). Имајући у виду да експерименталних студија о вредностима ових параметара у истим или сличним условима скоро и да нема, ови резултати су од посебног значаја за даља истраживања у овој области.

Са друге стране, резултати наше студије указују на статистички значајан ($<0,01$) пораст вредности супероксид анјон радикала у експерименталној групи (пацијенти са преломом врата бутне кости) у односу на контролну групу (здрави испитаници) (Табела 3, График 1В). На основу литературних података можемо приметити да су мишљења о примарном механизму настанка високе концентрације супероксид анјон радикала подељена. Поједини истраживачи сматрају да су високе концентрације супероксид анјон радикала највероватније последица деловања бројних фагоцита: моноцита, макрофага и неутрофила, који настају услед фрактуре (163), док други сматрају да O_2^- настаје као последица ресорпције остеокласта и калцитропних хормона (164, 165). Такође, повећана продукција веома реактивног O_2^- наводи на могућност његове интеракције са NO при чему може настати један од најтоксичнијих врста ROS, пероксинитрит ($ONOO^-$). Наведено конвертовање O_2^- и NO може уједно бити и једно од објашњења за смањену вредност азот монооксида у експерименталној у односу на контролну групу. Ранија *in vitro* истраживања на глодарима су показала да су слободни радикали укључени у остеокластогенезу и ресорпцију костију (166) и то највероватније тако што активирају нуклеарни фактор *kappaB* (NF- κ B; енгл. *Nuclear factor κ B*). С обзиром да је NF- κ B редокс-осетљив транскрипциони фактор који игра значајну улогу у регулацији запаљенских процеса, деградацији протеина и оштећењу мишића (167, 168). У истраживању *Basu*-а и сарадника који су на 101 пацијенту испитивали вредности 8-изо-PGF_{2 α} , који представља један од биомаркера оксидационог стреса, дошло се до закључка да су повишене вредности оксидационог стреса, а пре свега липидне пероксидације повезане са смањеном минералном густином костију (169). Наведене чињенице су у сагласју са нашим резултатима и указују на потребу додатних истраживања на молекулском нивоу који би допринели разумевању улоге слободних радикала и њиховог утицаја на патофизиолошке процесе код пацијената са преломом.

5.1.2 Динамика промене нивоа параметара оксидационог стреса током ране фазе зарастања костију

Приликом праћења динамике промена нивоа липидне пероксидације, азот монооксида, супероксид анјон радикала и водоник пероксида нису забележене статистички значајне ($>0,05$) промене након прелома костију, као ни током првих седам дана након операције (Табела 4, График 2А-В).

Wang и његови сарадници су спровели истраживање које је за циљ имало да упореди вредности биомаркера оксидационог стреса, митогеном-активирани протеин киназе (МАРК), као и да испита токсичност која настаје као резултат оксидационог стреса код пацијената са преломом дугих костију испод педесете и преко шездесетпет година старости (161). Резултати наведеног аутора показују значајно повећање нивоа липидне пероксидације током првих 6 сати након прелома само код старијих пацијената, док код млађих пацијената није било значајних промена у вредностима овог параметра. Исти аутори су показали и да приликом прелома може доћи до повећања активације p38 MAPK што уједно може иницирати и продукцију проинфламаторних цитокина (IL-6, TNF- α) о којима ће касније бити више речи (170). Резултати *Gokturk*-а и сарадника су у корелацији са резултатима овог истраживања. Наиме у споменутој експерименталној студији праћени су нивои MDA у узорку кости током тронедељног периода зарастања бутне кости пацова. Аутори описаног истраживања су закључили да се нивои наведеног параметра статистички значајно повећавају тек током друге, а пре свега током треће недеље зарастања костију (171). До сличних резултата дошли су и *Prasad* и сарадници чије је истраживање за циљ имало да утврди повезаност између оксидационог стреса и прелома. Током свог истраживања пратили су промене у нивоима MDA, нестабилне азотне киселине (индиректно, мерењем реактивних азотних интермедијера (RNI, енгл. *Reactive Nitric Intermedier*) и цитрулина) и ендогеног антиоксидационог статуса (FRAP; енгл. *Ferric Reducing Anti-Oxidant Power Assay*) током четворонедељног периода зарастања костију (172). Резултати наведеног истраживања су показали да нивои RNI и цитрулина расту током раног периода зарастања, при чему се њихова највиша вредност бележи 14ог дана од прелома костију. Међутим, примећено је и да током треће и четврте недеље зарастања вредности опет снижавају на вредности приближне почетним. Такође, показано је да до

значајног повећања вредности MDA долази тек током друге недеље зарастања костију, при чему се ове вредности снижавају током четврте недеље. Вредности наведених параметара зависили су и од тежине прелома. Значајније промене у свим параметрима бележене су код пацијената са вишеструким преломима у односу на оне који су имали једноструке преломе костију.

Имајући у виду да у тренутку прелома долази до прекида протока крви у близини повређеног кости (период који се назива исхемија), све промене које се дешавају у том региону не могу моментално да се одразе на крв. Ово би уједно могло да буде и објашњење зашто се у нашем, али и у истраживањима других научника, нивои оксидационог стреса нису значајно променили одмах током прве недеље зарастања костију. Тек након прве недеље зарастања калус формира нове ћелије и нове судове капилара. Самим тим долази до повећане прокрвљености региона (период који се назива реперфузија), али и повећане продукције инфламаторних ћелија које утичу на настанак велике количине слободних кисеоничних радикала (172-178). С обзиром да претерана и продужена активност слободних кисеоничних радикала изазива оштећења ткива која спречавају диференцијацију остеобласта, самим тим долази до продужавања период зарастања костију (178).

Наведени механизам којим се објашњавају оксидационе повреде примећен је и на другим ткивима (174-177), међутим да би се прецизно испитао механизам оксидационих радикала у прелому, потребно је за морфолошке и биохемијске анализе узети узорак ткива директно са повређене кости, али то свакако не би било етички оправдано.

5.1.3 Поређење параметара антиоксидационих ензима у еритроцитима између контролне и експерименталне групе

Антиоксидациони заштитни систем чине многобројни молекули способни да спрече, односно „санирају“ оштећења до којих је дошло услед деловања слободних радикала. Представљају донори електрона, који конвертују радикале у стабилне, нетоксичне метаболите. За заштиту од слободних радикала хумане ћелије садрже три

најважнија ензима: супероксид дисмутаза (SOD), редуковани глутатион (GSH) и каталазу (CAT) (179), концентрација сва три ензима одређивана је приликом овог истраживања.

Супероксид дисмутаза је најзаступљенији антиоксидациони ензим, а главна улога му је да катализује реакцију неутрализације супероксидних анјона (180). Студија која је рађена у Француској почетком 90-тих година прошлог века, забележила је значајан пад овог ензима код старијих пацијената (181), што је у корелацији са теоријом која повезује слободне радикале и сам процес старења (179, 182). Приликом мерења концентрације SOD, у нашој студији, забележен је драстичан пад ($<0,01$) у експерименталној групи у односу на контролну групу (**Табела 5, График 3Б**). Бројни истраживачи сматрају да је један од могућих објашњења за ниске концентрација овог ензима код пацијената са преломом врата бутне кости управо велика продукција супероксид анјон радикала који би могао даље да доведе до патофизиолошки поремећаја у организму (183, 184). Наиме, остеокласти доводе до повећане продукције O_2^- , а са друге стране да би се смањило нагомилавање супероксид анјон радикала долази до утрошка SOD која је одговорна за његову катализацију (185).

Најважнија улога каталазе у организму је да учествује у разлагању H_2O_2 и самим тим заштити ћелије од његовог негативног утицаја. Од свих мерених антиоксидационих ензима у овом раду, најдрастичнији статистички значајан ($<0,01$) пад у експерименталној групи примећен је код CAT (**Табела 5, График 3А**). Иако се у литератури спомиње могући пад антиоксидационих ензима приликом прелома фемура (185), конкретних студија које испитују вредности параметара као што су CAT и GSH нема. Глутатион пероксидаза, слично CAT има улогу да заштити ћелије од водоник пероксида. Такође, резултати добијени у овом истраживању, сугеришу да прелом фемура доводи до значајног ($<0,05$) пада вредности GSH (**Табела 5, График 3В**), међутим он није драстичан као код CAT. Једно од могућих објашњења за присутни дисбаланс између прооксиданаса и антиоксиданаса код пацијената са преломом кука, може бити услед смањене активности остеобласта и повећане активности остеокласта (186-188). Наиме *Altindag* и сарадници су у свом истраживању на 39 пацијената са остеопорозом и 26 здравих контрола мерили и упоређивали укупни антиоксидациони и оксидациони статус, као и индекс оксидационог стреса. Резултати наведеног истраживања су показала да су ниже вредности укупног антиоксидационог статуса, а са друге стране повишене вредности укупног оксидационог

статуса и индекса оксидационог стреса код пацијената са остеопорозом у односу на контролну групу (189).

Смањење активности свих антиоксиданаса услед прелома је тешко објаснити, с обзиром на мали број научноистраживачких радова посебно на субцелуларном нивоу, који су се бавили овом тематиком. Међутим, једно од могућих објашњења је смањење активности каспазе-2 која уједно доводи и до редукције у експресији антиоксидационих гена (190). Сагледавајући разлике редокс статуса између контролне и експерименталне групе, намеће се још једно од потенцијалних објашњење за забележен пад мерених антиоксидационих ензима. Наиме, с обзиром да је, како је више пута и напоменуто, од прелома до узимања узорка крви прошло свега 6 до 12 часова, готово да је немогуће да је сам прелом у тако кратком временском року успео да доведе до драстичног пада свих наведених ензима. Самим тим једно од могућих објашњења је да су пацијенти већ имали снижене вредности ових ензима, које су као такве потенцијално представљале и додатни фактор ризика за наступајући прелом костију. Највероватније је да услед прелома долази до активирања више сложених процеса и молекулских механизма којима се организам брани од новонастале трауме.

5.1.4 Динамика промене нивоа параметара антиоксидационих ензима током ране фазе зарастања костију

Као што се из резултата истраживања може приметити, приликом праћења динамике промена нивоа каталазе, супероксид дисмутазе и редукованог глутатиона није дошло до статистички значајних ($>0,05$) промена током ране фазе зарастања костију, односно вредности свих мерених антиоксидационих ензима су биле исте у првих 12h од прелома костију, као и првог, трећег и седмог дана од операције (**Табела 6, График 4А-В**).

Слични резултати добијени су и у раније споменутом истраживању које су почетком 21. века спровели *Prasad* и сарадници, у коме је између осталих претходно наведених параметара, праћен и ниво ендогеног антиоксидационог статуса (FRAP; енгл.

Ferric Reducing Anti-Oxidant Power Assay) током четворонедељног периода зарастања костију. Вредности FRAP се нису значајно мењале током прве недеље зарастања костију, док се током друге недеље зарастања бележи статистички значајно повећање испитиваног параметра. Међутим, након четврте недеље нивои FRAP били су нижи од вредност које су забележене одмах након прелома. То би значило да се антиоксидациони статус значајно промени тек на крају ране фазе зарастања костију, да би у касној фази зарастања његове вредности биле и ниже од вредности након прелома (172). У истраживању *Sandukji* и сарадника такође није забележена статистички значајна промена у вредностима мерених антиоксидационих ензима (SOD, глутатион пероксидаза, редуковани глутатион) током ране фазе зарастања костију. Међутим, примећено је да двонедељна примена антиоксидационе терапије (микстура витамина А, С, Е и селена) повећава вредности остеокалцина као и активност алкалне фосфатазе у плазми пацијената. Такође, код ових пацијената је дошло до снижења вредности TBARS-а, али и повећања нивоа SOD и глутатион пероксидазе већ након прве недеље антиоксидационе терапије. Вредности редукованог глутатиона су се повећале тек након двонедељне примене антиоксиданаса (185). Резултати претходно наведене, као и многобројних других студија, указује на значај примене витамина, минерала, односно антиоксидационе терапије код пацијената са преломом (185, 191-196). Такође, значајно је споменути и резултате експерименталне студије *Mohamad* и сарадника који указују да антиоксидациона терапија највероватније не постиже очекивани учинак уколико се примени тек у касној фази зарастања костију, односно уколико се не примени одмах након прелома, односно у раној фази зарастања костију (197). Међутим, многобројне студије свакако препоручују исхрану богату високим концентрацијама флавоноида током периода опоравка, који као природни антиоксиданси помажу зарастање костију и опоравку целокупног организма (198-200).

5.2 ИНФЛАМАТОРНИ МЕДИЈАТОРИ

5.2.1 Поређење нивоа инфламаторних медијатора између контролне и експерименталне групе

Као што је раније напоменуто, литературни подаци указују да фрактуре костију могу довести до макро и микротраума, а самим тим и до инфламације мишићног ткива у близини прелома. Приликом настанка инфламације једну од кључних улога остварују управо комуникацијски међућелијски молекули који се називају цитокини. Генерални проблем са свим цитокинима је немогућност да се са сигурношћу одреди да ли они показују анти- или про- инфламаторно дејство. Многобројне студије указују да цитокини које смо ми проучавали у овој студији показују про-инфламаторно дејство (201, 202), али са друге стране постоје начници који уверавају у супротно (203). Последњих година све је више научноистраживачких радова који истичу значајну улогу појединих цитокина како у преломима тако и у обољењима попут остеопорозе, осетеоартритиса, али и након операција, траума или других критичних стања. IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 и различите металопротеиназе (MMP) су се у досадашњим истраживањима издвојиле као најзначајнији параметри у различитим врстама прелома (204-208).

У нашем истраживању мерене су вредности IL-6 као и TNF- α . Оба цитокина показала су значајно (<0,01) више вредности у групи пацијената са преломом него у групи здравих испитаника (**Табела 7, График 5А, 5Б**). Литературни подаци указују да ови цитокини играју значајну улогу у прогресији дегенерације зглобова, смањујући продукцију екстрацелуларног матрикса као и повећавајући продукцију протеолитичких ензима (209-211). Резултати наше студије су у сагласју са резултатима *Adams* и сарадника који су испитивали 15 инфламаторних цитокина и матрикс металопротеиназа у синовијалној течности пацијената након прелома интра-артикуларног чланка. Код 21 пацијента са преломом забележене су више вредности 11 испитиваних цитокина (GM-CSF, IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α) и MMP (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-10) у односу на контролну групу. Што би значило да прелом најверватније изазива читав низ сложених процеса и реакција инфламације који доводе до повећане продукције великог броја различитих цитокина (212). Такође, *Furman* и сарадници су показали да код

пацијената са фрактуром зглоба долази до повећања TNF- α али и IL-1 β (213). Међутим, у годину дана раније рађеној експерименталној студији истог аутора показано је да локална примена анти-IL-1 β код пацијената са пост трауматским артритисом током акутне инфламаторне фазе смањује артритичне промене за разлику од анти-TNF- α који не утиче ове промене. Резултати ове студије указују да значајнију улогу како у прелому тако и у зарастању костију највероватније има IL-1 β (214).

Бројне студије показују да су нивои цитокина у плазми, одакле су и мерени у нашој студији, у корелацији са нивоима цитокина у синовијалној течности. *Haller* и сарадници су на основу података о улози цитокина у запаљенском процесу у близини повређеног ткива, за циљ свог истраживања имали упоређивање вредности великог броја цитокина у синовијалној течности повређеног и неповређеног колена. Резултати њихове студије указују да је су вредности цитокина више у синовијалној течности повређеног у односу на неповређено колена. Међутим, показано је да нивои цитокина нису у корелацији са тежином повреде (215).

Да би се испитала улога цитокина у преломима костију, поред упоређивања вредности цитокина између пацијената са преломом и пацијената без прелома, од суштинског значаја је и испратити њихове вредности током периода зарастања костију, о чему ће бити речи у наредном делу.

5.2.2 Динамика промене нивоа инфламаторних медијатора током ране фазе зарастања костију

IL-6 представља један од најчешће проучаваних цитокина. Као што је већ речено, у навећој мери га продукују моноцити и активирани макрофаги, али и друге ћелије попут фибробласта и миобласта (216). Литературни подаци указују да је његова продукција из наведених ћелија, повећана услед траума односно операција. Док са друге стране, значајну улогу у његовом ослобађању имају и други цитокини који такође могу да иницирају ослобађање IL-6. Бројне експерименталне студије сведоче да TNF- α може да индукује секрецију IL-6 из хуманих миобласта, што би значило да ова два цитокина заправо

директно зависе један од другог. Заправо, оба цитокина утичу на регенерацију мишићних ћелија након повреде, а поред тога потпомажу пролиферацију и диференцијацију нових зрелих миофибрила (217-219). Поред свега наведеног, не сме се занемарити ни чињеница да је у бројним истраживањима показана и доказана улога IL-6 на активацију хепатичке синтезе С-реактивног протеина, који је један од најзначајнијих биомаркера инфламације (220).

У нашој студији, приликом праћења динамике промена нивоа IL-6, у периоду ране фазе зарастања костију забележено је значајно повећање ($<0,01$) нивоа испитиваног цитокина првог постоперативног дана, у односу вредности које су забележене одмах након прелома, трећег и седмог дана од операције, а које су биле међусобно сличне (Табела 8, График 6А). За разлику од интерлеукина, вредности TNF- α се нису статистички значајно мењале током ране фазе зарастања костију (Табела 8, График 6Б).

Операција сама по себи представља сложену процедуру која услед репарације костију доводи до системског инфламаторног одговора, стога је и повећање вредности IL-6 очекивано (221, 222). *Beeton* и сарадници истичу да активност циркулишућег IL-6 може да стимулише радну фазу зарастања костију јер комплекс IL-6 и рецептора стимулише ћелије мезенхималне лозе и повећава формирање коштаног ткива остеобласта (221). Резултати истраживања *Volpin* и сарадника указују да се вредности IL-6 смањују и до 6 месеци након иницијалне повреде (222). Иако у нашем истраживању нисмо пратили пацијенте у толико дугом временски период, чак и у раној фази зарастања се примећује тренд пада вредности овог маркера инфламације током времена. *Yang* и сарадници који су у свом истраживању испитивали ефекте овог цитокина на IL-6 *knockout* мишевима, дошли су до закључка да IL-6 игра значајну улогу током ране фазе зарастања костију, али се улога током времена смањује (223).

Истраживачи широм света истичу да је TNF- α потентан стимулатор ресорпције костију, као и инхибитор стварања костију, највероватније тако што утичу на повећање настанка остеокласта (224, 225). *Hranjec* и сарадници у својој студији наводе да повишена концентрација IL-6 и TNF- α у постоперативном периоду, представља фактор ризика за настанак компликација па чак и смрти пацијента (226). Резултати новије студије *Marino* и сарадника су у корелацији са нашим резултатима. Наиме, поменута група аутора је у својој студији имала за циљ да упореди вредности IL-6, TNF- α и CRP-а сат времена пре и

двадесетчетири часа након операције прелома. Вредности TNF- α се нису мењале у зависности од операције, док је са друге стране аналогно нашој студији дошло до значајног повећања вредности IL-6 након операције у односу на период пре операције (225).

5.3 МАСНОКИСЕЛИНСКИ ПРОФИЛ УКУПНИХ ЛИПИДА ПЛАЗМЕ

5.3.1 Поређење маснокиселинског профила укупних липида плазме између контролне и експерименталне групе

Процент свих детектованих засићених масних киселина као и мононезасићених масних киселина био је статистички значајно виши ($<0,01$) код пацијената са преломом у односу на здраве испитанике. Резултати ове студије су у корелацији са резултатима многобројних епидемиолошких студија које истичу да са повећањем SFA расте и ризик од настанка прелома костију (227). Са друге стране, заступљеност AA (C20:4, n-6) је била значајно нижа ($<0,01$) код пацијената са преломом бутне кости или кука, као и све детектоване n-3 PUFA. Такође и удео n-6, n-3 као и укупних PUFA је био значајно нижи ($<0,01$) код пацијената са преломом. Међутим, однос n-6/n-3 био је статистички виши ($<0,01$) у експерименталној групи (Табела 9).

Почетком прошлог века дошло је до повећаног интересовања научне јавности о повезаности конзумирања моно- и полинезасићених киселина са преломима. Од тада па до данас израђен је велики број студија, али није се дошло до генералног закључка који може бити опште прихваћен. Наши резултати су у корелацији са бројним студијама у којима се наводи да PUFA могу утицати на здравље костију путем вишеструких механизма као што је модулација продукције цитокина (228-231), производња простагландина E2 (232), као и повољан утицај n-3 масних киселина на транспорт калцијума у цревима (233) и излучивање калцијума (234). Сматра се да n-3 и n-6 масне киселине могу утицати на кости тако што се понашају као лиганди за PPAR α и PPAR γ (235). Такође, у експерименталним студијама на анималном моделу показан је бенефит на снагу костију код животиња са нижим односом n-6/n-3 масних киселина (236-238), што је свакако показано и у нашој студији јер су пацијенти са преломом имали дупло више вредности у односу на контролну групу.

Suzuki и сарадници су испитивали утицај исхране и других животних навика на ризик од настанка прелома кука код старијих пацијената. У случај-контрола студији наведеног аутора наводи се да конзумација рибе 3-4 пута дневно смањује ризик од

настанка прелома (239). Међутим, у лонгитудиналној студији *Farina* и сарадника повећано конзумирање хране богате ALA је повезано са смањењем ризика за настанак прелома костију код оба пола, док је конзумирање хране богате AA повезано са смањењем ризика од прелома кука код мушкараца, али не и код жена (240). ALA највероватније има позитиван утицај на кости тако што смањује маркер ресорпције костију N-телопептид (241). Исхрана богата ланеним семеном које је богато ALA, у комбинацији са мањим дозама естрогена доводи до чувања минералне густине костију и биомеханичке снаге (242). Сматра се да потенцијалан протективан механизам AA је највероватније последица супресије NF-κB или то што дериват AA 12d-PGJ2 има способност да стимулише синтезу колагена у хуманим ћелијама остеобласта (243).

5.3.2 Динамика промене маснокиселинског профила укупних липида плазме током ране фазе зарастања костију

Приликом праћења процентуалног удела масних киселина код пацијената одмах након прелома и 7 дана након операције, примећено је да је укупни удео SFA био статистички значајно виши ($<0,01$) седмог дана након операције костију у односу на удео који је забележен у првим сатима након прелома костију. Са друге стране, је примећено да је седмог дана зарастања костију процентуална заступљеност LA, n-6 PUFA као и укупних PUFA нижа у односу на њену заступљеност у плазми одмах након прелома. Међутим, прерачунат однос n-6/n-3 масних киселина је већи ($<0,01$) код пацијената седмог дана зарастања костију него одмах након прелома.

Наша студија је једна од ретких која је пратила динамику промене масних киселина током периода зарастања костију. Имајући у виду да је најкраћи период у коме могу да се забележе промене маснокиселинског профила укупних липида плазме управо период од седам дана, јасно је зашто нису уочене веће разлике и зашто је ове постојаће јако тешко протумачити.

На основу резултата наше студије и литературних података можемо утврдити да би требало више пажње обратити на исхрану током периода опоравка, како би дошло до промена у процентуалној заступљености масних киселина и смањења ризика од настанка

прелома. Пацијентима би се требало саветовати да уносе што већу количину воћа, поврћа, легуминоза и млечних производа и производа богатих n-3 масним киселинама (244). Lau и сарадници наводе да смањењем односа n-6/n-3 PUFA, као и смањењем n-3, пре свега ЕРА и ДНА може се повећати снага костију (245), а управо то и треба постићи код наших пацијената.

Наведени резултати истраживања указују на комплексност процеса зарастања, међутим потребна су даља испитивања која би на молекулском нивоу детаљније испитала процес зарастања и прецизно утврдила улогу сваког од испитиваних параметара у овој студији.

VI ЗАКЉУЧЦИ

На основу свега изложеног у овом истраживању можемо извести следеће закључке:

1. Имајући у виду да се вредности параметара редокс статуса разликују између групе пацијената са преломом и контролне групе, може се закључити да прелом бутне кости или кука највероватније доводи до повећане продукције појединих слободних радикала, али главни разлог за настанак оксидационог стреса је драстичан пад свих мерених ензима антиоксидационе заштите (SOD, CAT, GSH) код пацијената са преломом.
2. Анализирајући резултате инфламационих медијатора уочава се да услед прелома бутне кости или кука долази до значајне продукције оба испитивана параметра, што је највероватније последица макро- и микро- траума, које настају након прелома, као и инфламације ткива у близини прелома.
3. Повишене вредности IL-6 након операције сугеришу да је његова повећана продукција највероватније последица одговора на стрес у раној фази зарастања костију.
4. Већа процентуална заступљеност SFA и MUFA, као и нижа процентуална заступљеност n-6 и n-3, као и укупних PUFA код пацијената са преломом бутне кости или кука иду у прилог томе да ови параметри уједно представљају и значајне факторе ризика за настанак прелома костију.
5. Анализирајући промене процентуалне заступљености масних киселина током ране фазе зарастања костију, намеће се закључак да треба више пажње обратити на исхрану током периода опоравка. Пацијентима би требало саветовати унос веће количине воћа, поврћа, легуминоза и млечних производа, као и производа богатих n-3 масним киселинама.

VII ЛИТЕРАТУРА

1. Мијач М, Благотић М, Ђорђевић Љ, Теофиловски-Парапид Г. Кости буга. У: Анатомија човека: остеологија: за студенте медицине. 9. допуњено издање. Савремена администрација: Београд; 2003. стр. 184-90.
2. Мрваљевић Д, Мрваљевић М. Кости буга. У: Анатомија доњег екстремитета. 13. и допуњено издање. Савремена администрација: Београд; 2003. стр 11-3.
3. Бабић РР, Младеновић М, Младеновић Д, ет ал. Костолом трохантерног масива - рендгенолошко - клиничка слика. *Apollinem medicum et aescularium*. 2014; 12(4): 7-18.
4. Јевтић РМ, Марић ЈВ, Лозо БВ, Гаврић НН. Доњи екстремитети. У: Рехабилитациона медицина у трауматологији и ортопедији. Медицински факултет Фоча: Бања Лука; 2009. стр 80-91.
5. Bender EC, Campbell CD, Berquist NT. The Femur and Thigh. In: *Imaging of orthopedic trauma*. Raven Press: New York; 1992. Pp. 311-32.
6. Trueta, J. The normal vascular anatomy of the human femoral head during growth. *Bone & Joint Journal*. 1957; 39:358-94.
7. Yoshioka Y, Siu D, Cooke TD. The anatomy and functional axes of the femur. *J Bone Joint Surg Am*. 1987; 69:873-880.
8. Wolff J. *The law of bone remodeling*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1986.
9. Fetto J, et al. Evolution of the Koch model of the biomechanics of the hip: clinical perspective. *J Orthop Sci* 2002; 7: 724-30.
10. Speirs AD et al. Physiologically based boundary conditions in finite element modeling. *J Biomech* 2007; 40: 2318-2323.
11. Boehm HF et al. Local topological analysis of densitometer-generated scan images of the proximal femur for differentiation between patients with fracture and age-matched controls. *Osteoporosis Int* 2009; 20: 617-624.
12. Diamantopoulos AP, Rohde G, Johnsrud I, Skoie IM, Johnsen V, Hochberg M, Haugeberg G. Incidence rates of fragility hip fracture in middle-aged and elderly men and women in southern Norway. *Age Ageing*. 2012; 41:86–92.
13. Rubin CD. Evaluation and management of hip fracture risk in the aged. *American Journal of the Medical Sciences*. 2012; 343:233–42.

14. Khoo BC, Wilson SG, Worth GK, Perks U, Qweitin E, Spector TD, Price RI. A comparative study between corresponding structural geometric variables using 2 commonly implemented hip structural analysis algorithms applied to dual-energy Xray absorptiometry images. *J Clin Densitom* 2009; 12(4): 461-7.
15. Calis HT, Eryavuz M, Calis M. Comparison of femoral geometry among cases with and without hip fractures. *Yonsei Medical Journal* 2004; 45(5): 901-7.
16. Høidrup S, Grønbaek M, Pedersen AT, Lauritzen JB, Gottschau A, Schroll M. Hormone replacement therapy and hip fracture risk: effect modification by tobacco smoking, alcohol intake, physical activity, and body mass index. *Am J Epidemiol* 1999;15: 1085-93.
17. Whooley MA, Kip KE, Cauley JA, Ensrud KE, Nevitt MC, Browner WS. Depression, falls, and risk of fracture in older women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Arch Intern Med* 1999; 159(5): 484-90.
18. Liu B, Anderson G, Mittmann N, To T, Axcell T, Shear N. Use of selective serotoninreuptake inhibitors of tricyclic antidepressants and risk of hip fractures in elderly people. *Lancet* 1998; 351(9112): 1303-7.
19. DeLee CJ. Fracture and dislocations of the Hip. In: *Fractures in adults*. Third Edition. J.B. Lippincott Company: Phyladelphia; 1991. Pp 1481-653.
20. Klenerman L, Marcuson RW. Intracapsular fractures of the neck of the femur. *J Bone Joint Surg.* 1970; 514-17.
21. Bartonicek J. Pauwels' classification of femoral neck fractures: correct interpretation of the original. *J Orthop Trauma* 2001;15: 358–360.
22. Garden RS. Stability and union in subcapital fractures of the femur. *Bone & Joint Journal.* 1964; 46:630-647.
23. Lein T, Bula P, Jeffries J, Engler K, Bonnaire F. Fractures of the femoral neck. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech.* 2011; 78: 10-9.
24. Muller ME, Nazarian S, Koch P, Schatzker J: *The comprehensive clasiffication of fractures of long bones*. Berlin. Heidelberg, New York, Springer Verlag. 1994.
25. Boyd HB., Griffin L. L., *Classification and treatment of trochanteric fractures*. *Arch. surg.* 1949; 58: 853-866.
26. Evans E. M. *The tretment of trochanteric fractures of the femur*. *J. Bone Joint Surg.* 1949; 31B: 190-203.

27. Jensen J.S. Classification of intertrochanteric fractures. *Acta Orthopaedica* 1980; 51(1-6); 803-10.
28. Ruedi PT, Murphy MW. *AO principles of fracture management*. Thieme, StuttgartNew York, 2000.
29. Loizou CL, McNamara I, Ahmed K, Pryor GA, Parker MJ. Classification of subtrochanteric femoral fractures. *Injury*. 2010; 41(7):739-45.
30. Gustilo RB, Anderson JT. Prevention of infection in the treatment of one thousand and twenty-five open fractures of long bones: retrospective and prospective analyses. *J Bone Joint Surg Am*. 1976; 58:453-8.
31. Gustilo RB, Mendoza RM, Williams DN. Problems in the management of type III (severe) open fractures: a new classification of type III open fractures. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 1984; 24:742-6.
32. Gustilo RB, Merkow RL, Templeman DA. The management of open fractures. *JBJS*. 1990; 72:299-304.
33. Icks A, Haastert B, Glaeske G, Stumpf U, Windolf J, Hoffmann F. Correction factor for the analysis of the hip fracture incidence-differences between age, sex, region, and calendar year. *Wiener klinische Wochenschrift*. 2012; 124: 391.
34. Winqvist RA, Hansen Jr ST. Comminuted fractures of the femoral shaft treated by intramedullary nailing. *Orthop Clin N Am*. 1980;11(3):633–48.
35. Maggi S, Kelsey JL, Litvak J, Heyse SP. Incidence of hip fracture in the elderly: A cross-national analysis. *Osteoporosis Int* 1991; 1:232–41.
36. Memon A, Pospula WM, Tantawy AY, Abdul-Ghafar S, Suresh A, Al-Rowaih A. Incidence of hip fractures in Kuwait. *Int J Epidemiol* 1998; 27:860–5.
37. Zhang L, Cheng A, Bai Z, et al. Epidemiology of cervical and trochanteric fractures of the proximal femur in 1994 in Tangshan, China. *J Bone Miner Metab* 2000; 18:84–8.
38. Kannus P, Niemi S, Pakkari J, Palvanen M, Vouri I, Järvinen M. Hip fractures in Finland between 1979 and 1997 and predictions for the future. *The Lancet* 1999;353: 802-805.
39. Cooper C, Campion G, Melton LJ, III. Hip fractures in the elderly: a world-wide projection. *Osteoporos Int* 1992;2: 285–289.

40. Barbier S, Ecochard R, Schott AM, et al. Geographical variations in hip fracture for women: strong effects hidden in standardised ratios. *Osteoporosis Int.* 2009; 20:371–7.
41. Prodovic T, Ristic B, Rancic N, Bukumiric Z, Zeljko S, Ignjatovic-Ristic D. Factors Influencing The Six-Month Mortality Rate In Patients With A Hip Fracture. *Zdr Varst.* 2016; 55(2):102-7.
42. Prođović T, Ristić B, Vućetić D, Ignjatović-Ristić D. The impact of gender differences on mortality in elderly patients after hip fracture. *Vojnosanit Pregl*, 2017: DOI: 10.2298/VSP161122022P.
43. Keene GS, Parker MJ, Pryor GA. Mortality and morbidity after hip fractures. *Bmj.* 1993; 307:1248-1250.
44. Al-Yassari G, Langstaff RJ, Jones JWM, Al-Lami M. The AO/ASIF proximal femoral nail (PFN) for the treatment of unstable trochanteric femoral fracture. *Injury.* 2002; 33:395-9.
45. Hu S, Zhang S, Yu G. Treatment of femoral subtrochanteric fractures with proximal lateral femur locking plates. *Acta Ortop Bras.* 2012; 20:329–33.
46. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med.* 1991; 91:31–8.
47. Ames BN, Shigenaga Mk, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90:7915–22.
48. Стевановић Ј, Борозан С, Јовић С, Игњатовић И. Физиологија слободних радикала. *Вет Гласник* 2011; 65:95–107.
49. Das SK. Free radicals, antioxidants and nutraceuticals in health, disease & radiation biology. Preface. *Indian J Biochem Biophys.* 2012; 49:291–2.
50. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002; 82:47-95.
51. Halliwell B, Gutteridge JMC (2006) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 4. Clarendon Press, Oxford.
52. Muller F. The nature and mechanism of superoxide production by the electron transport chain: Its relevance to aging 2000; 4:227–53.

53. Chen AF, Chen DD, Daiber A, et al. Free radical biology of the cardiovascular system. *Clin Sci (Lond)*. 2012; 123:73–91.
54. Sichel G, Corsaro C, Scalia M, Sciuto S, Geremia E. Relationship between melanine content and superoxide dismutase activity in the liver of various species of animals. *Cell Biochem Funct* 1987; 5:123–8.
55. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase enzymatic function for erythrocyte. *J Bio Chem* 1969; 244:6049–55.
56. Petkau A. Scientific basis for the clinical use of superoxide dismutases. *Cancer Treatment* 1985; 13:17–44.
57. Doroshow JH. Anthracycline antibiotic-stimulated superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radical production by NADH dehydrogenase. *Cancer Res* 1983; 43(10).
58. Singh A. Introduction: Interconversion of singlet oxygen and related species. *Photochem. Photobiol.* 1978; 28:429–33.
59. Novo E, Marra F, Zamara E, et al. Dose dependent and divergent effects of superoxide anion on cell death, proliferation, and migration of activated human hepatic stellate cells. *Gut*. 2006; 55:90–7.
60. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science*. 1978;201(4359):875-80.
61. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; 39:44–84.
62. Pall ML. The NO/ONOO-cycle as the central cause of heart failure. *Int J Mol Sci*. 2013 Nov 13;14(11):22274-330 222.
63. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot*. 2003;91 Spec No:179-94.
64. Pelletier M, Lepow TS, Billingham LK, Murphy MP, Siegel RM. New tricks from an old dog: mitochondrial redox signaling in cellular inflammation. *Semin Immunol*. 2012; 24:384-92.
65. Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett*. 1991; 281:9–19.
66. Haber F, Weiss J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc R Soc Lond A* 1934; 147: 332–51.

67. Cao Z, Lindsay JG, Isaacs NW. Mitochondrial peroxiredoxins. *Subcell Biochem.* 2007; 44:295-315.
68. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006; 141:312-22.
69. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 1984; 219:1-14.
70. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 1991; 11:81-128.
71. Fridovich SE, Porter NA. Oxidation of arachidonic acid in micelles by superoxide and hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* 1981; 256:260-5.
72. Hu C, Noll BC, Schulz CE, Scheidt WR. Four-coordinate iron(II) porphyrinates: electronic configuration change by intermolecular interaction. *Inorg Chem.* 2007; 46:619–21.
73. Mangge H, Becker K, Fuchs D, Gostner JM. Antioxidants, inflammation and cardiovascular disease. *World J Cardiol.* 2014; 6:462-77.
74. Squadrito GL, Cueto R, Splenser AE, Valavanidis A, Zhang H, Uppu RM, Pryor WA. Reaction of uric acid with peroxynitrite and implications for the mechanism of neuroprotection by uric acid. *Arch Biochem Biophys.* 2000; 376:333-7.
75. Denicola A, Freeman BA, Trujillo M, Radi R. Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. *Arch Biochem Biophys.* 1996; 333:49-58.
76. Cabrales P, Friedman JM. HBOC vasoactivity: interplay between nitric oxide scavenging and capacity to generate bioactive nitric oxide species. *Antioxid Redox Signal.* 2013; 18:2284-97.
77. Cotgreave IA, Mold P, Orrenius S. Host biochemical defense mechanisms against prooxidants. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1988; 28:189–212.
78. van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NP. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2003; 13:57–149.
79. Halliwell B. Vitamin C: poison, prophylactic or panacea? *Trends Biochem Sci.* 1999; 24:255–9.
80. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995; 64:97–112.

81. Bowler C, Van Montague M, Inze D. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mo1 BiiA*. 1992; 43:83-116.
82. Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem*. 1987; 22:111-80.
83. Miao L, St Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med*. 2009; 47:344-56.
84. Oberley LW. Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression. *Biomed Pharmacother* 2005; 59:143-8.
85. Turner BJ, Talbot K. Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. *Prog Neurobiol*. 2008; 85:94-134.
86. Yamashita K, Takahiro K, Kamezaki F, Adachi T, Tasaki H. Decreased plasma extracellular superoxide dismutase level in patients with vasospastic angina. *Atherosclerosis*. 2007; 191:147-52.
87. Liao M, Liu Z, Bao J, Zhao Z, et al. A proteomic study of the aortic media in human thoracic aortic dissection: implication for oxidative stress. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2008; 136:65-72.
88. Zamocky M, Furtmüller PG, Obinger C. Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxid Redox Signal*. 2008; 10:1527-48.
89. Brunelli L, Yermilov V, Beckman JS. Modulation of catalasa peroxidatic and catalytic activity by nitric oxide. *Free Rad Biol Med*. 2001; 7:709–14.
90. Góth L. Catalase deficiency and type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2008; 31:e93.
91. Morgan B, Sobotta MC, Dick TP. Measuring E (GSH) and H₂O₂ with roGFP2-based redox probes. *Free Radic Biol Med*. 2011; 51:1943–51.
92. Prabhakar R, Morokuma K, Musaev DG. Peroxynitrite reductase activity of selenoprotein glutathione peroxidase: a computational study. *Biochemistry*. 2006; 45:6967-77.
93. Ramprasath T, Murugan PS, Kalaiarasan E, Gomathi P, Rathinavel A, Selvam GS. Genetic association of Glutathione peroxidase-1 (GPx-1) and NAD(P)H: Quinone Oxidoreductase

- 1(NQO1) variants and their association of CAD in patients with type-2 diabetes. *Mol Cell Biochem.* 2012; 361:143-50.
94. Seiler A, Schneider M, Förster H, Roth S, Wirth EK, Culmsee C, Plesnila N, Kremmer E, Rådmark O, Wurst W, Bornkamm GW, Schweizer U, Conrad M. Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent and AIF-mediated cell death. *Cell Metab.* 2008; 8:237-48.
 95. Leopold JA, Loscalzo J. Oxidative risk for atherothrombotic cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med.* 2009; 47:1673-706.
 96. Banfi G, Iorio EL, Corsi MM. Oxidative stress, free radicals and bone remodeling. *Clin Chem Lab Med.* 2008; 46:1550–5.
 97. Jyoti A, Singh S, Mukhopadhyay B, Gavel R, Mishra SP. Free radicals and antioxidant status in chronic osteomyelitis patients: a case control study. *J Clin Diagn Res.* 2015; 4:8–10.
 98. Yeler H, Tahtabas F, Candan F. Investigation of oxidative stress during fracture healing in the rats. *Cell biochemistry and function*, 2005; 23:137–9.
 99. Basu S, Michaëlsson K, Olofsson H, Johansson S, Melhus H. Association between oxidative stress and bone mineral density. *Biochemical and biophysical research communications.* 2001; 288:275–9.
 100. Gajdobranski D, Zivković D. Disorders in fracture healing. *Med Pregl.* 2003; 56:146-51.
 101. Shuid AN, Mohamad S, Muhammad N, et al. Effects of α -tocopherol on the early phase of osteoporotic fracture healing. *J Orthop Res.* 2011; 29:1732-8.
 102. Wehner T, Gruchenberg K, Bindl R, Recknagel S, Steiner M, Ignatius A, Claes L. Temporal delimitation of the healing phases via monitoring of fracture callus stiffness in rats. *J Orthop Res.* 2014; 32:1589-95.
 103. Ketenjian AY, Jafri AM, Arsenis C. Studies on the mechanism of callus cartilage differentiation and calcification during fracture healing. *Orthop Clin North Am.* 1978; 9:43-65.

104. Doan T, Melvold R, Viselli S, et al. (2009). Innate immune function. In: Harvey RA, Champe PC (eds). Lippincott illustrated review: immunology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; pp. 41-55.
105. Костић Т, Андрић С (2006). Молекуларна и ћелијска имунологија. Нови Сад: Даниел принт.
106. Gilman A, Goodman LS, Hardman JG, Limbird LE (2001). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. New York: McGraw-Hill.
107. Malm C. Exercise Immunology: A skeletal perspective. *Exerc. Immunol. Rev.* 2002; 8:116-67.
108. Suzuki K, Nakaji S, Yamada M, Totcuka M, Sato K, Sugawara K. Systemic inflammatory response to exhaustive exercise. *Cytokine kineticc. Exerc. Immunol. Rev.* 2002; 8:6-48.
109. Mantovani A, Bussolino F, Introna M. Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. *Immunol Today.* 1997; 18:231-40.
110. Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). *FASEB J.* 1990; 4:2860-7.
111. Grivennikov SI, Tumanov AV, Liepinsh DJ et al. Distinct and nonredundant in vivo functions of TNF produced by T cells and macrophages/neutrophils: protective and deleterious effects. *Immunity.* 2005; 22: 93-104.
112. Birkedal-Hansen H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *Journal of periodontal research.* 1993; 28(6), 500-10.
113. Leung BP, Sattar N, Crilly A, Prach M, McCarey DW, Payne H, et al. A novel anti-inflammatory role for simvastatin in inflammatory arthritis. *The Journal of Immunology,* 2003; 170(3):1524-1530.
114. Bruunsgaard H. Effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in elderly populations. *European cytokine network.* 2001; 13(4): 389-391.
115. Nelson DL, Cox MM. Principles of Biochemistry. New York: W.H. Freeman. 2005.
116. Parker K, Brunton L, Goodman, Sanford L, Lazo JS, Gilman A. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11, New York: McGrawHill 2006.

117. Dowhan W, Bogdanov M. Functional roles of lipids in membranes. In: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (4th Edition)*, (edited by D.E. Vance and J.E. Vance, Elsevier Science), 2002; pp. 1-35.
118. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr*, 2002; 21:495-505.
119. Mankura M, Kayama H. AA, EPA, DHA–HUFA Polyunsaturated Fatty Acid ed. by Kayama H, Kouseisya-Kouseikaku, Tokyo, 1995.
120. Kim YC, Ntambi JM. Regulation of steroyl CoA desaturase genes- role in cellular metabolism and preadipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999; 266: 1-4.
121. Haug A, Hostmark AT, Harstad OM. Bovine milk of human nutrition - a review. *Lipids Health Dis*, 2007; 6:25-41.
122. Van Houwelingen AC, Foreman V, Dronglen MMHP, Nicolini U, Nikolaidis KH, Al MDM, Kester ADM, Hornstra G. Essential fatty acids status of fetal plasma phospholipids: Similar to postnatal values obtained at comparable gestational age. *Early Human Dev*, 1996; 46:141-152.
123. Benatti P, Peluso G, Nicolai R, Calvani M. Polyunsaturated Fatty Acids: Biochemical, Nutritional and Epigenetic Properties. *J Am Coll Nutr*, 2004; 23:281-302.
124. Calder PC. N-3 polyunsaturated fatty acids and inflammation: from molecular biology to the clinic. *Lipids*, 2003; 38:343-352.
125. Lauritzen I, Blondeau N, Heurteaux C, Widmann C, Romey G, Lazdunski M. Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors. *EMBO J*. 2000; 19: 1784-1793.
126. Jicha GA, Markesbery WR. Omega-3 fatty acids: potential role in the management of early Alzheimer's disease, *Clin Interv Aging*, 2010; 5:45-61.
127. Liu G, Bibus DM, Bode AM, Ma WY, Holman RT, Dong Z. Omega-3 but not omega-6 fatty acids inhibit activity and cell transformation in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001; 98:7510-7515.

128. Mukutmoni-Norris M, Hubbard NE, Erickson KL. Modulation of murine tumor vasculature by dietary omega-3 fatty acids in fish oils. *Cancer Lett*, 2000; 150:101-109.
129. Doan T, Melvold R, Viselli S, et al. (2009). Innate immune function. In: Harvey RA, Champe PC (eds). *Lippincott illustrated review: immunology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; pp. 41-55.
130. Lenz A, Franklin GA, Cheadle WG. Systemic inflammation after trauma. *Injury*. 2007; 38:1336-45.
131. Pape HC, Marcucio R, Humphrey C, Colnot C, Knobe M, Harvey EJ. Trauma-induced inflammation and fracture healing. *Journal of orthopaedic trauma*. 2010; 24:522-5.
132. Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res*. 2002; 17:513-20.
133. Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, et al. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med* 2000; 191:275-86.
134. Stables MJ, Gilroy DW. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. *Prog Lipid Res* 2011; 50:35-51.
135. Shikano M, Masuzawa Y, Yazawa K, Takayama K, Kudo I, Inoue K. Complete discrimination of docosahexaenoate from arachidonate by 85 kDa cytosolic phospholipase A₂ during the hydrolysis of diacyl- and alkenylacyl glycerophosphoethanol amine. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1212:211-6.
136. Salari P, Rezaie A, Larijani B, et al. A systematic review of the impact of n-3 fatty acids in bone health and osteoporosis. *Med Sci Monit*. 2008; 14: RA37-44.
137. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem*. 1979; 95:351-8.
138. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PI, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982; 126:131-8.

139. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald RA (ed): Handbook of methods for oxygen radical research, CRC Press, Inc, Boca Raton, pp. 123-132, 1999.
140. Pick E, Keisari Y. A simple colometric method for the measurement of hydrogen peroxide by cells in culture. *J Immunol Methods* 1980; 38:161-70.
141. González RR, Puchades MJ, García RR, Saez G, Tormos MC, Miguel A. Effect of oxidative stress in patients with chronic renal failure. *Nefrol* 2006; 26:218-25.
142. Zwart SR, Kala G, Smith SM. Body iron stores and oxidative damage in humans increased during and after a 10- to 12-day undersea dive. *J Nutr.* 2009; 139:90-5.
143. Beutler E. Catalase. In: Beutler E. Red cell metabolism, a manual of biochemical methods. New York: Grune and Stratton 1982; pp.105-6.
144. Beutler, E. Reduced glutathione (GSH). In Red cell metabolism, a manual of biochemical methods. Edited by Beutler, E. Grune and Stratton, New York. 1975; pp. 112-4.
145. Radosavljevic G, Jovanovic I, Majstorovic I, Mitrovic M, Lisnic VJ, Arsenijevic N, Jonjic S, Lukic ML. Deletion of galectin-3 in the host attenuates metastasis of murine melanoma by modulating tumor adhesion and NK cell activity. *Clin Exp Metastasis.* 2011; 28:451-62.
146. Crowther JR. ELISA. Theory and practice. *Methods Mol Biol.* 1995; 42:1-218.
147. Glaser C, Demmelmair H, Koletzko B. High-Throughput Analysis of Total Plasma Fatty Acid Composition with Direct in Situ Transesterification. *PLoS ONE*; 2010; 5(8): e12045.
148. Ristić B, Ignjatović Ristić D, Milić B, Obradović Z. Faktori koji utiču na postoperativni mortalitet kod bolesnika sa prelomom kuka. *Vojnosanitetski pregled* 2006, 63(1): 49-54.
149. Bonjour JP. Protein intake and bone health. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 2011; 81:134–142.
150. Heaney RP. Calcium, dairy products and osteoporosis. *J. Am. Coll. Nutr.* 2000; 19:83S–99S.
151. Heaney RP. Skeletal development and maintenance: The role of calcium and vitamin D. *Adv. Endocrinol. Metab.* 1995; 6:17–38.
152. Sacco SM, Horcajada MN, Offord E. Phytonutrients for bone health during ageing. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2013; 75:697–707.

153. Järvinen R., Tuppurainen M., Erkkilä A.T., Penttinen P., Kärkkäinen M., Salovaara K., Jurvelin J.S., Kröger H. Associations of dietary polyunsaturated fatty acids with bone mineral density in elderly women. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2012; 66:496–503.
154. Almeida M., Han L., Martin-Millan M., Plotkin L.I., Stewart S.A., Roberson P.K., Kousteni S., O'Brien C.A., Bellido T., Parfitt A.M., et al. Skeletal involution by age-associated oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids. *J. Biol. Chem.* 2007; 282:27285–27297.
155. Callaway D.A., Jiang J.X. Reactive oxygen species and oxidative stress in osteoclastogenesis, skeletal aging and bone diseases. *J. Bone Miner. Metab.* 2015; 33:359–370.
156. Manolagas S.C. From estrogen-centric to aging and oxidative stress: A revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. *Endocr. Rev.* 2010; 31:266–300.
157. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews.* 1998; 78:547–81.
158. Salmon AB, Richardson A, Pérez VI. Update on the oxidative stress theory of aging: does oxidative stress play a role in aging or healthy aging? *Free Radical Biology and Medicine.* 2010; 48:642–55.
159. Radovanović D, Ranković G. Oxidative stress, stress proteins and antioxidants in exercise. *Acta Medica Medianae*, 2004; 43:45–7.
160. Pryor WA. The antioxidant nutrients and disease prevention-what do we know and what do we need to find out? *Am J Clin Nutr.* 1991; 53:391-3.
161. Wang Z, Ehnert S, Ihle C, et al. Increased oxidative stress response in granulocytes from older patients with a hip fracture may account for slow regeneration. *Oxid Med Cell Longev.* 2014; 2014:819847.
162. Kartikey K, Singh G, Kidyore B, Somsunder YA, Howarth P, Vargova V, et al. Association of dietary w-6/w-3 fatty acid ratio and inflammation with risk of hip fracture. *Open Nutra J.* 2010; 3:1-5.
163. Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Investig* 1987; 79: 319–26.

164. Datta HK, Manning P, Rathod H, McNeil C. Effect of calcitonin, elevated calcium and extracellular matrices on superoxide anion production by rat osteoclasts. *Exp Physiol.* 1995; 80:713–9.
165. Datta HK, Rathod H, Manning P, Turnbull Y, McNeil CJ. Parathyroid hormone induces superoxide anion burst in the osteoclast: evidence for the direct instantaneous activation of the osteoclast by the hormone. *J Endocrinol.* 1996; 149:269-75.
166. Garrett IR, Boyce BF, Oreffo RO, Bonewald L, Poser J, Mundy GR. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.* 1990; 85:632-9.
167. Suda N, Morita I, Kuroda T, Murota S. Participation of oxidative stress in the process of osteoclast differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* 1993; 1157:318–23.
168. Iotsova V, Caamano J, Loy J, Yang Y, Lewin A, Bravo R. Osteopetrosis in mice lacking NF-kappaB1 and NFkappaB2. *Nat. Med.* 1997; 3:1285-9.
169. Basu S, Michaëlsson K, Olofsson H, Johansson S, Melhus H. Association between oxidative stress and bone mineral density. *Biochemical and biophysical research communications.* 2001; 288:275-9.
170. Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal.* 2000; 12:1–13.
171. Gokturk E, Turgut A, Baycu C, Gunal J, Seber S, Gulbas Z. Oxygen free radicals impair fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand.* 1995; 66:473-5.
172. Prasad G, Dhillon MS, Khullar M, Nagi ON. Evaluation of oxidative stress after fractures. A preliminary study. *Acta Orthop Belg.* 2003; 69:546-51.
173. Cornell CN, Lane JM. Newest factors in fracture healing. *Clin Orthop* 1992; 277:297-311.
174. Dhaliwal H, Kirshenbaum LA, Randhawa AL, Singhal PK. Correlation between antioxidant changes during hypoxia and recovery on reoxygenation. *Am J Physiol* 1991; 261:632-638.
175. Ikeda Y, Anderson JH, Long DM. Oxygen free radicals in the genesis of traumatic and peritumoral brain edema. *Neurosurgery* 1989; 24:679-84.
176. Oda T, Nakai I, Mitou M, Yamagishi H, Oka T, Yoshikawa T. Role of oxygen radicals and

- synergistic effect of superoxide dismutase and catalase on ischemiareperfusion injury of the rat pancreas. *Transplant Proc* 1992; 24:797-8.
177. Rangan U, Bulkley GB. Prospects for treatment of free radical mediated tissue injury. *Br Med Bull* 1993; 49:700-18.
 178. Kirshenbaum LA, Singhal PK. Increase in endogenous antioxidant enzymes protects heart against reperfusion injury. *Am J Physiol* 1993 ; 265 : 484-493.
 179. Vrndić O, Kostić I, Jeftić I, et al. Pathophysiological mechanisms of aging. *Medicinski časopis*. 2010; 44:30-6.
 180. Choi JH, Yu BP. Brain synaptosomal aging: Free radicals and membrane fluidity – *Free Radic Biol Med*. 1995; 18:133–9.
 181. Guemouri L, Artur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cuny G, Siest G. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clin Chem*. 1991; 37:1932-7.
 182. Ilyas A, Odatsu T, Shah A, Monte F, Kim HK, Kramer P, Aswath PB, Varanasi VG. Amorphous silica: a new antioxidant role for rapid critical-sized bone defect healing. *Adv Healthc Mater*. 2016; 5:2199-213.
 183. Sheweita SA, Koshhal K. Calcium metabolism and oxidative stress in bone fractures: role of antioxidants. *Current Drug Metabolism*. 2007; 8:519–25.
 184. Beharka AA, Han SN, Adolfsson O, Wu D, Smith D, Lipman R, et al. Long-term dietary antioxidant supplementation reduces production of selected inflammatory mediators by murine macrophages. *Nutr Res*. 2000; 20:281–96.
 185. Sandukji A, Al-Sawaf H, Mohamadin A, Alrashidi Y, Sheweita SA. Oxidative stress and bone markers in plasma of patients with long-bone fixative surgery: role of antioxidants. *Hum Exp Toxicol*. 2011; 30:435-42.
 186. Yang S, Madyastha P, Bingel S, Ries W, Key L. A new superoxide-generating oxidase in murine osteoclasts. *J Biol Chem*. 2001; 276:5452-8.
 187. Dreher I, Schuetze N, Baur A, Hesse K, Schneider D, Koehrl J, Jakob F. Selenoproteins are expressed in fetal human osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;

245:101-7.

188. Fuller K, Lean JM, Bayley KE, Wani MR, Chambers TJ. A role for TGF- in osteoclast differentiation and survival. *J Cell Sci.* 2000; 113:2445-53.
189. Altindag O, Erel O, Soran N, Celik H, Selek S. Total oxidative/anti-oxidative status and relation to bone mineral density in osteoporosis. *Rheumatology International.* 2008; 28:317-21.
190. Sharma R, Callaway D, Vanegas D, Bendele M, Lopez-Cruzan M, Horn D, Guda T, Fajardo R, Abboud-Werner S, Herman B. Caspase-2 maintains bone homeostasis by inducing apoptosis of oxidatively-damaged osteoclasts. *PLoS One.* 2014 Apr 1;9(4):e93696.
191. Weber P. The role of vitamins in the prevention of osteoporosis—a brief status report. *Int J Vit Nutr Res* 1999; 69: 194–197.
192. Wu XW, Itoh N, Taniguchi T, Nakanishi T, Tatsu Y, Yumoto N, et al. Zinc-induced sodium dependent vitamin C transporter 2 expression: potent roles in osteoblast differentiation. *Arch Biochem Biophys* 2003; 420: 114–120.
193. Mimori K, Komaki M, Iwasaki K, and Ishikawa I. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 is involved in ascorbic acid-induced osteoblastic differentiation in periodontal ligament cells. *J Periodontol* 2007; 78: 328–334.
194. Norazlina M, Chua CW, and Ima-Nirwana S. Vitamin E deficiency reduced lumbar bone calcium content in female rats. *Med J Malaysia* 2004; 59: 623–630.
195. Kaprara A, Krassas GE. Selenium and thyroidal function; the role of immunoassays. *Hell J Nucl Med* 2006; 9: 195–203.
196. Zagrodzki P, Ratajczak R. Selenium status, sex hormones, and thyroid function in young women. *J Trace Elem Med Biol* 2008; 22: 296–304.
197. Mohamad S, Shuid AN, Soelaiman IN. Effects of vitamin E on bone oxidative parameters during fracture healing of postmenopausal osteoporosis rat model. *Research Updates in Medical Sciences.* 2014; 2(1): 39-43.
198. Ehnert S, Döbele S, Braun KF, et al. N-Acetylcyteine and flavonoid rich diet: the

- protective effect of 15 different antioxidants on cigarette smoke-damaged primary human osteoblasts. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2012; 3:1129.
199. Liu S, Hou W, Yao P, et al. Heme oxygenase-1 mediates the protective role of quercetin against ethanol-induced rat hepatocytes oxidative damage. *Toxicology in Vitro*. 2012; 26:74–80.
 200. Fortes C, Agabiti N, Fano V, et al. Zinc supplementation and plasma lipid peroxides in an elderly population. *European journal of clinical nutrition*. 1997; 51:97-101.
 201. Macintyre DL, Reid WD, McKenzie DC. The inflammatory response to muscle injury and its clinical implications. *Sports Med*. 1995; 20:24–40.
 202. Smith LL. Acute inflammation: the underlying mechanism indelayed onset muscle soreness? *Med Sci Sports Exerc*. 1991; 23:542–51.
 203. Dinarello C. Role of pro- and anti-inflammatory cytokines during inflammation: experimental and clinical findings. *J Biol Regul Homeost Agents*. 1997; 11:91–103.
 204. Bigoni M, Sacerdote P, Turati M, et al. Acute and late changes in intraarticular cytokine levels following anterior cruciate ligament injury. *J Orthop Res*. 2013; 31:315-321.
 205. Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology*. 2002; 39:237-246.
 206. Goldring MB, Otero M. Inflammation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2011; 23:471-478.
 207. Irie K, Uchiyama E, Iwaso H. Intraarticular inflammatory cytokines in acute anterior cruciate ligament injured knee. *Knee*. 2003; 10:93-96.
 208. Jawa RS, Anillo S, Huntoon K, Baumann H, Kulaylat M. Interleukin-6 in surgery, trauma, and critical care part II: clinical implications. *J Intensive Care Med*. 2011; 26(2):73-87.
 209. Saklatvala J. Tumour necrosis factor a stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage. *Nature*. 1986; 322(6079):547-9.
 210. Seguin CA, Bernier SM. TNFalpha suppresses link protein and type II collagen expression in chondrocytes: Role of MEK1/2 and NF-kappaB signaling pathways. *J Cell Physiol*. 2003; 197(3):356-69.

211. Stove J, Huch K, Gunther KP, Scharf HP. Interleukin-1b induces different gene expression of stromelysin, aggrecan and tumor-necrosis-factor-stimulated gene 6 in human osteoarthritic chondrocytes in vitro. *Pathobiology*. 2000; 68(3):144-9.
212. Adams SB, Setton LA, Bell RD, Easley ME, Huebner JL, Stabler T, et al. Inflammatory cytokines and matrix metalloproteinases in the synovial fluid after intra-articular ankle fracture. *Foot & ankle international*. 2015; 36:1264-71.
213. Furman BD, Kimmerling KA, Zura RD, et al. Articular ankle fracture results in increased synovitis, synovial macrophage infiltration, and synovial fluid inflammatory cytokines and chemokines. *Arthritis Rheumatol*. 2015; 67:1234-1239.
214. Furman BD, Mangiapani DS, Zeitler E, et al. Targeting pro-inflammatory cytokines following joint injury: acute intra-articular inhibition of interleukin-1 following knee injury prevents post-traumatic arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2014; 16:R134.
215. Haller JM, McFadden M, Kubiak EN, Higgins TF. Inflammatory cytokine response following acute tibial plateau fracture. *J Bone Joint Surg Am*. 2015;97(6):478-83.
216. Marino M, Scuderi F, Provenzano C, Bartoccioni E. Skeletal muscle cells: from local inflammatory response to active immunity. *Gene Therapy*. 2011; 18(2):109-16.
217. Easton R, Balogh ZJ. Peri-operative changes in serum immune markers after trauma: a systematic review. *Injury*. 2014; 45(6):934-41.
218. Honsawek S, Deepaisarnsakul B, Tanavalee A, et al. Relationship of serum IL-6, C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate, and knee skin temperature after total knee arthroplasty: a prospective study. *International Orthopaedics*. 2011; 35(1):31-5.
219. Gallucci S, Provenzano C, Mazzarelli P, Scuderi F, Bartoccioni E. Myoblasts produce IL-6 in response to inflammatory stimuli. *International Immunology*. 1998; 10(3):267–273.
220. Bilgen ÖF, Atici T, Durak K, Karaeminoğullari O, Bilgen MS. C-reactive protein values and erythrocyte sedimentation rates after total hip and total knee arthroplasty. *The Journal of International Medical Research*. 2001; 29(1):7–12.
221. Beeton CA, Chatfield D, Brooks RA, Rushton N. Circulating levels of interleukin-6 and its soluble receptor in patients with head injury and fracture. *Bone Joint J*. 2004; 86:912-7.

222. Volpin G, Cohen M, Assaf M, Meir T, Katz R, Pollack S; Cytokine levels (IL-4, IL-6, IL-8 and TGF β) as potential biomarkers of systemic inflammatory response in trauma patients. *Int Orthop*. 2014; 38:1303-9.
223. Yang X, Ricciardi BF, Hernandez-Soria A, Shi Y, Camacho NP, Bostrom MP. Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. *Bone*. 2007; 41:928-36.
224. Lange J, Sapozhnikova A, Lu C, et al. Action of IL-1 β during fracture healing. *J Orthop Res*. 2010; 28:778-84.
225. Marino M, Palmieri G, Peruzzi M, Scuderi F, Bartoccioni E. A Study of Inflammatory/Necrosis Biomarkers in the Fracture of the Femur Treated with Proximal Femoral Nail Antirotation. *Mediators Inflamm*. 2015; 2015:189864.
226. Hranjec T, Swenson BR, Dossett L A, et al. Diagnosis-dependent relationships between cytokine levels and survival in patients admitted for surgical critical care. *Journal of the American College of Surgeons*. 2010; 210(5):833–844.
227. Bang HO, Dyerberg J. Fatty acid pattern and ischaemic heart disease. *Lancet*. 1987; 1(8533):633.
228. Endres S, Ghorbani R, Kelley VE, Georgilis K, Lonnemann G, van der Meer JW, Cannon JG, Rogers TS, Klempner MS, et al. The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N Engl J Med*. 1989; 320:265–71.
229. Meydani SN, Endres S, Woods MM, Goldin BR, Soo C, Morrill-Labrode A, Dinarello CA, Gorbach SL. Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women. *J Nutr*. 1991; 121:547–55.
230. Vedin I, Cederholm T, Freund Levi Y, Basun H, Garlind A, Faxen Irving G, Jonhagen ME, Vessby B, Wahlund LO, et al. Effects of docosahexaenoic acid-rich n-3 fatty acid supplementation on cytokine release from blood mononuclear leukocytes: the OmegaAD study. *Am J Clin Nutr*. 2008; 87:1616–22
231. Watkins BA, Li Y, Lippman HE, Feng S. Modulatory effect of omega-3 polyunsaturated

- fatty acids on osteoblast function and bone metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2003; 68:387–98.
232. Coetzer H, Claassen N, van Papendorp DH, Kruger MC. Calcium transport by isolated brush border and basolateral membrane vesicles: role of essential fatty acid supplementation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1994; 50:257–66.
233. Baggio B, Budakovic A, Nassuato MA, Vezzoli G, Manzato E, Luisetto G, Zaninotto M. Plasma phospholipid arachidonic acid content and calcium metabolism in idiopathic calcium nephrolithiasis. *Kidney Int*. 2000; 58:1278–84.
234. Krey G, Braissant O, L'Horset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker MG, Wahli W. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol*. 1997; 11:779–91.
235. Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, Fruchart JC, Tedgui A, Haegeman G, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem*. 1999; 274:32048–54.
236. Sun D, Krishnan A, Zaman K, Lawrence R, Bhattacharya A, Fernandes G. Dietary n-3 fatty acids decrease osteoclastogenesis and loss of bone mass in ovariectomized mice. *J Bone Miner Res*. 2003; 18:1206–16.
237. Watkins BA, Li Y, Allen KG, Hoffmann WE, Seifert MF. Dietary ratio of (n-6)/(n-3) polyunsaturated fatty acids alters the fatty acid composition of bone compartments and biomarkers of bone formation in rats. *J Nutr*. 2000; 130:2274–84.
238. Poulsen RC, Moughan PJ, Kruger MC. Docosahexaenoic acid and 17 beta-estradiol co-treatment is more effective than 17 beta-estradiol alone in maintaining bone post-ovariectomy. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008; 233:592–602.
239. Suzuki T, Yoshida H, Hashimoto T, et al. Case-control study of risk factors for hip fractures in the Japanese elderly by a Mediterranean Osteoporosis Study (MEDOS) questionnaire. *Bone*. 1997; 21(5):461-7.
240. Farina EK, Kiel DP, Roubenoff R, Schaefer EJ, Cupples LA, Tucker KL. Dietary intakes

- of arachidonic acid and α -linolenic acid are associated with reduced risk of hip fracture in older adults. *The Journal of nutrition*. 2011; 141(6):1146-53.
241. Griel AE, Kris-Etherton PM, Hilpert KF, Zhao G, West SG, Corwin RL. An increase in dietary n-3 fatty acids decreases a marker of bone resorption in humans. *Nutr J*. 2007;6:2.
242. Sacco SM, Jiang JM, Reza-Lopez S, Ma DW, Thompson LU, Ward WE. Flaxseed does not antagonize the effect of ultra-low-dose estrogen therapy on bone mineral density and biomechanical bone strength in ovariectomized rats. *J Toxicol Environ Health A*. 2009; 72:1209-16.
243. Weiler HA. Dietary supplementation of arachidonic acid is associated with higher whole body weight and bone mineral density in growing pigs. *Pediatr Res*. 2000; 47:692–7.
244. Kartikey K, Singh G, Kidyore B, Somsunder YA, Howarth P, Vargova V, et al. Association of dietary w-6/w-3 fatty acid ratio and inflammation with risk of hip fracture. *Open Nutra J*. 2010; 3:1-5.
245. Lau BYY, Ward WE, Kang JX, Ma DWL. Femur EPA and DHA are correlated with femur biomechanical strength in young fat-1 mice. *J Nutr Biochem*. 2009; 20:453-61.