

VITAMIN C У СЕРУМУ ПАЦИЈЕНАТА СА РАЗЛИЧИТИМ ФОРМАМА НЕСПЕЦИФИЧНОГ ОСТЕОМИЈЕЛИТИСА

Мирић Д.¹, Грбић Р.², Васић А.², Божовић Б.¹, Драгојевић И.¹, Марковић М.², Несторовић В.³

¹Институт за биохемију, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

²КБЦ Приштина, Клиника за ортопедску хирургију, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

³Институт за физиологију, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

VITAMIN C CONCENTRATIONS IN SERUM BETWEEN PATIENTS SUFFERING FROM DIFFERENT FORMS OF NON-SPECIFIC OSTEOMYELITIS

Мирић Д.¹, Грбић Р.², Васић А.², Божовић Б.¹, Драгојевић И.¹, Марковић М.², Несторовић В.³

¹Institute for Biochemistry, Medical Faculty Pristina, Kosovska Mitrovica

²CHC Pristina, Clinic for Orthopaedic surgery, Medical Faculty Pristina, Kosovska Mitrovica

³Institute for Physiology, Medical Faculty Pristina, Kosovska Mitrovica

SUMMARY

Bone tissue infections caused by non-specific agents (non-specific osteomyelitis) occur most frequently among children and young individuals demanding surgical and antibiotic therapy, although with unpredictable clinical outcome. While mobilization of cellular response to infectious agents takes place, a bulk of oxygen-derived free radicals emerge with concomitant participation of various elements of endogenous antioxidative defense. Vitamin C is an endogenous antioxidant active in the aqueous phase. It is very likely that osteomyelitic patients already have some kind of disorder in specific antioxidant system due to hematogenic origin of non-specific osteomyelitis. Our results show that serum total vitamin C concentrations among patients with non-specific osteomyelitis are not significantly different from those obtained among control subjects. However, we found significantly different concentrations of ascorbate, dehydroascorbate and their concentration ratio in serum within osteomyelitic patients that points to enlarged consumption of ascorbate even before the bone localization of infection took place.

Key words: Osteomyelitis, Vitamin C, Oxygen-derived free radicals, Antioxidative defense.

САЖЕТАК

Инфекције коштаног ткива изазване неспецифичним агенсима (неспецифични остеомијелитиси) захватају најчешће популацију деце и младих људи, захтевају хируршку и антибиотерапију са често неизвесним клиничким исходом. Због мобилизације ћелијског одговора на инфективни агенс долази до појачаног стварања слободних радикала кисеоника и повећаног учешћа система ендogene антиоксидативне заштите у том процесу. Витамин Ц је ендогени антиоксиданс који делује у воденој средини. Пошто су остеомијелитиси процеси који настају хематогеном дисеминацијом из неког примарног жаришта инфекције врло је вероватно да код таквих пацијената већ постоји дефицијенција у неком од система ендогених антиоксиданаса. Наши резултати показују да се концентрације укупног витамина Ц у серуму пацијената са различитим формама остеомијелитиса не разликују од вредности контролне групе. Нађене су, међутим, значајне разлике у концентрацији аскорбата, дехидроаскорбата и односа ова два облика витамина Ц у серуму наших пацијената већ на пријему што указује на повећани утрошак аскорбата и пре развијања коштане локализације.

Кључне речи: Остеомијелитис, Витамин Ц, Слободни радикали кисеоника, Антиоксидативна заштита.

УВОД

Коштано ткиво је биохемијски и хистолошки изузетно динамична творевина, која осим механичко-потпорне улоге има и бројне метаболичке функције. Биохемијски састав костију зависи од узраста, врсте кости, физичке активности и тежине индивидуе и под сталним је дејством хормонских утицаја. Целог живота индивидуе ове структуре подлежу ремоделовању, а 5 до 25% укупног протока крви обезбеђује нормалну функцију фибробласта, остеобласта и остеокласта у коштаном ткиву. Главни протеин коштаног ткива је колаген, односно осеин којег стварају и у коштани матрикс излу-

чују остеобласти и фибробласти. Основна карактеристика овог трипептида је богато присуство хидроксилисаних аминокиселина. Хидроксилација пролина и лизина у протолагеним влакнима је ензимски процес који се одвија у микрозомима остеобласта и фибробласта уз учешће аскорбинске киселине. Доказано је да се ове хидроксилације одвијају по типу гвожђе-зависних слободних радикалских процеса.

Инфекције коштаног ткива имају комплексан патолошки супстрат. Инфективни агенс доспева у коштаном ткиво хематогеним путем преко нутритивне арте-

рије из неког примарног жаришта инфекције, али локализација скелетне инфекције, као и степен деструкције коштаног ткива показују бројне разлике, у зависности од врсте остеомијелитиса, узраста и индивидуалних способности одбране (1). Предилекциона места за насељавање бактерија изазивача неспецифичних остеомијелитиса су фертилне метафизе дугих костију због великог потенцијала раста коштане масе у тој зони (2). Поред тога, успорени проток крви у метафизама, богати сплет капилара, бројне анастомозе, мали број фагоцитних ћелија, као и већа изложеност трауми са последичном хеморагијом, стварају повољне услове за локализацију инфекције у метафизама.

Привучени хемотаксичким агенсима неутрофилни леукоцити долазе на место инфекције, маргинализују се уз зид крвних судова, атхерирају на ендотелне ћелије и заједно са моноцитима излазе у инфекцијом захваћено ткиво. У инфламаторни одговор укључују се и тромбоцити који активисани тромбином атхерирају на неутрофиле и моноците а истовремено и на ендотелне ћелије (3). Развијају се тромбангитис и тромбофлебитис који додатно успоравају регионалну циркулацију па долази до пада продукције макроенергетских једињења и исхемичних промена.

У активисаним неутрофилима се, као део одбрамбене стратегије организма, интензивира метаболизам глукозе и кисеоника. У току фагоцитозе активисане се трансмембрански протеин NADPH-оксидаза (4) чијим се дејством цитосолни супстрат NADPH+H⁺ оксидује у присуству кисеоника из којег унивалентном редукцијом настаје супероксид анјон радикал. При физиолошком рН и у присуству извора H⁺ долази до брзе спонтане дизмутације супероксид анјон радикала у водоник пероксид, а при нижим рН, настаје и много реактивнији перхидрокси радикал. Стимулисани фагоцити стварају и најреактивнији од кисеоничких радикала - хидрокси радикал (5).

Реактивне форме кисеоника врше оксидативни атак на незасићене масне киселине ћелијских мембрана и мембрана субцелуларних органела, нуклеинске киселине, липопротеиде, протеине и друге молекуле (6), што нарушава функцију и интегритет ћелије. Системи ендogene антиоксидативне заштите ћелија и екстрацелуларног простора одржавају реактивне кисеоничке радикале у ниским концентрацијама, што се манифестује ниским интензитетом стварања продуката липидне пероксидације. Док је дејство ензима антиоксидативне заштите усмерено пре свега ка превенцији дејства слободних радикала кисеоника на осетљиве ћелијске структуре, дотле неензимски антиоксиданси (аскорбинска киселина, α-токоферол, β-каротен, једињења са тиол групама и други) углавном делују на лимитирању процеса и репарацији оштећења изазваних липидном пероксидацијом.

Витамин Ц је доминантан антиоксиданс у воденој средини, где се налази у редукованом (аскорбинска киселина = аскорбат) и оксидованом облику (дехидроаскорбинска киселина = дехидроаскорбат). У циркулацији се налази углавном слободан, а само мала количина је везана за протеине плазме. И поред доказаног анти-

оксидативног дејства, аскорбат може, захваљујући својој редукционој способности, да делује и као прооксиданс. У условима *in vitro* аскорбат редукује тровалентно гвожђе у двовалентно, чиме се стварају услови за декомпозицију водоник пероксида (7) и настајање веома реактивног хидрокси радикала. Прооксидативно дејство аскорбата реализује се само у присуству гвожђа а интензитет липидне пероксидације аскорбатом има дозно-зависни карактер (8). С обзиром да стимулирани неутрофилни стварају не само кисеоничке радикале већ и протеолитичке ензиме, могућа је деградација протеинског дела феритина ћелија или трансферина плазме, и ослобађање гвожђа у форми погодној за учешће у стварању хидрокси радикала (9).

ЦИЉ РАДА

Циљ нашег рада је да у условима хиперпродукције слободних радикала кисеоника изазване инфективним неспецифичним агенсом испитамо квантитет и динамику промена концентрације витамина Ц у серуму пацијената са инфекцијама коштаног ткива, с обзиром на чињеницу да овај витамин делује не само као део антиоксидативне заштите организма, већ да учествује и у синтези колагена, односно осеина коштаног ткива.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Методом проспективне студије обухваћено је 259. пацијената, хоспитализованих и лечених на Клиници за ортопедију КБЦ Приштина, код којих је микробиолошким, радиолошким и клиничким испитивањем дијагностикован неспецифични остеомијелитис. Обиле симптома и знакова који прате неспецифичне остеомијелитисе, као и значајне разлике у дужини трајања болести, условили су већи број подела овог обољења. Ради лакше обраде података користили смо поделу на акутне (до краја 6. недеље трајања болести), субакутне (болест траје до краја 8. недеље), хроничне (болест траје и после 8. недеље) и хроничне егзацерирајуће остеомијелитисе. Сви пацијенти су уз хируршки третман примали и конвенционалне нестероидне антиреуматике као и антибиотике према антибиограму.

Узорци крви добијени су венепункцијом без антикоагуланаса, центрифуговани на 3000 обрт./минути 15 минута а затим је одређивана концентрација укупног витамина Ц, концентрација аскорбата и дехидроаскорбата колориметријском методом (10). Биохемијске анализе рађене су на Институту за биохемију Медицинског факултета у Приштини. Крв за анализе узимана је на пријему (1. дан) а затим 7., 14. и 21. дана хоспитализације. Контролну групу чинили су испитаници старости 1 до 50 година, којима је због других индикација заказан контролни преглед а код којих је физикалним прегледом и на основу анамнестичких података искључено постојање акутних или хроничних инфламаторних болести.

Након одређивања дистрибуције фреквенције, у раду су коришћене методе параметријске статистике: средња вредност, стандардна девијација и анализа варијансе.

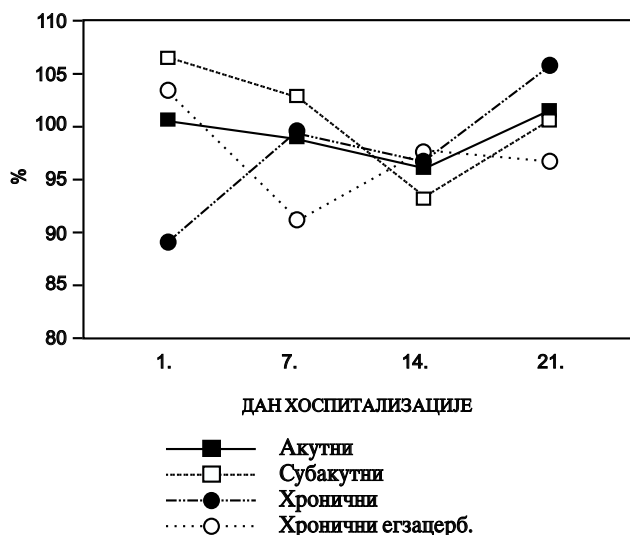
РЕЗУЛТАТИ РАДА

Анализирајући дистрибуцију болесника са неспецифичним остеомијелитисом према клиничкој форми обољења (Таб.1.) очљиво је да половина свих оболелих (52.9%) долази на клинику у акутној фази болести. У другој половини броја оболелих бележи се знатна доминација процентуалне заступљености хроничне форме (18.53%) у односу на субакутни (16.67) и егзацербирајући (13.9%) остеомијелитис.

Табела 1. - Дистрибуција оболелих према клиничкој форми неспецифичног остеомијелитиса.

Форма остеомијелитиса	N	%
Акутни	137	52.90
Субакутни	38	14.67
Хронични	48	18.53
Хронични егзацерб.	36	13.90
Укупно	259	100.00

Концентрације укупног витамина Ц у серуму контролне групе одраслих кретале су распону 30-82 $\mu\text{M/L}$ ($63.1 \pm 10.7 \mu\text{M/L}$) и биле су нешто ниже од вредности контролне групе деце, код којих су се вредности кретале у опсегу 37-96 $\mu\text{M/L}$ ($68.2 \pm 14.8 \mu\text{M/L}$). Нађене разлике, међутим, нису статистички значајне ($p > 0.50$). Наведене вредности укупног витамина Ц контролне групе налазе се у референтном опсегу методе (10).

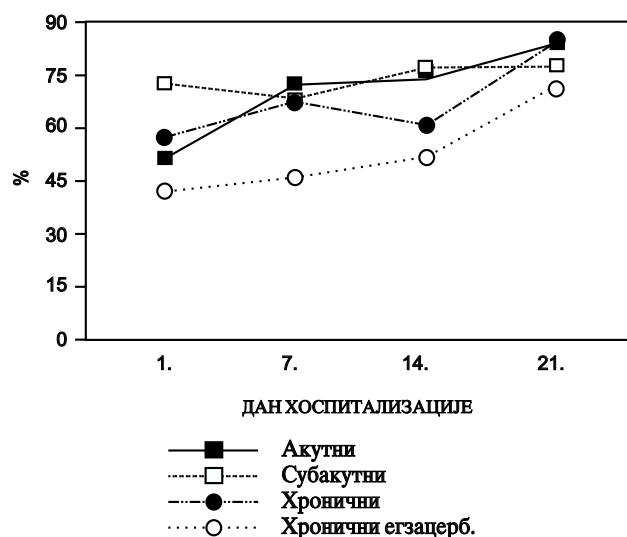


Графикон 1. - Средња вредности концентрација укупног витамина Ц у серуму пацијената са различитим формама неспецифичног остеомијелитиса у зависности од дана хоспитализације, приказана као % вредности концентрације контролне групе.

Резултати приказани на Граф.1. су средње вредности концентрације укупног витамина Ц у серуму контролне групе и пацијената са различитим формама неспецифичног остеомијелитиса у зависности од дана хо-

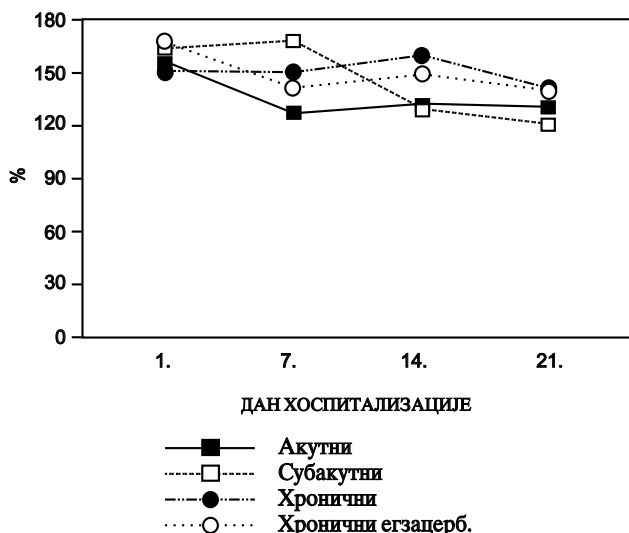
спитализације, дате као % вредности контролне групе, које су узете као 100%. Најниже вредности концентрације укупног витамина Ц нађене су у групи хроничног остеомијелитиса и то првог дана хоспитализације. Нађена разлика у односу на вредности контролне групе, као и у односу на вредности добијене код осталих форми остеомијелитиса првог дана хоспитализације, није била статистички значајна ($p > 0.05$). Анализом варијансе утврђено је да не постоји ни статистички значајна разлика вредности укупног витамина Ц у узорцима добијеним у наведеним интервалима.

Да је витамин Ц активни учесник ендogene антиоксидативне заштите, поготово у условима појачаног генерисања слободних радикала кисеоника, показују концентрације аскорбата и дехидроаскорбата, као и концентрацијски однос ових форми витамина Ц (дехидроаскорбат/аскорбат) у серуму пацијената са различитим клиничким облицима неспецифичног остеомијелитиса (Граф. 2., Граф. 3. и Граф. 4.).

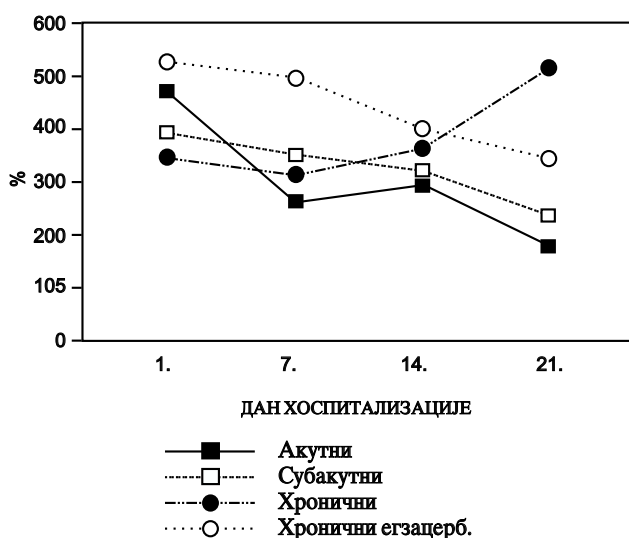


Графикон 2. - Средње вредности концентрације аскорбата у серуму пацијената са различитим формама остеомијелитиса у зависности од дана хоспитализације, приказане као % вредности концентрације контролне групе.

Резултати наших истраживања показују да, без обзира на клиничку манифестацију коштане инфекције долази до оксидације аскорбинске киселине серума у дехидроаскорбат. Ово доказују значајно ниже вредности концентрације аскорбата у серуму пацијената са неспецифичним остеомијелитисом у односу на вредности контролне групе, као и значајно више вредности дехидроаскорбата. Посебно се издваја група пацијената са хроничним егзацербирајућим остеомијелитисом код којих је концентрација аскорбата на пријему најнижа ($p < 0.01$ у односу на контролну групу и $p < 0.05$ у односу на групу са субакутним остеомијелитисом). У току хоспитализације пацијената са неспецифичним остеомијелитисом долази до постепене реверзије концентрацијског односа дехидроаскорбат/аскорбат према вредностима контролне групе, што је вероватно узроковано применом хируршке и антибиотерапије. Пацијенти са хронич-



Графикон 3. - Средње вредности концентрације дехидроаскорбаји у серуму пацијената са неспецифичним остеомијелитисом у зависности од дана хоспитализације, приказана као % вредности контролне групе.



Графикон 4. - Концентрацијски однос дехидроаскорбаји/аскорбаји у серуму пацијената са различитим формама неспецифичног остеомијелитиса у зависности од дана хоспитализације, приказан као % вредности контролне групе.

ном егзацербирајућом формом остеомијелитиса, међутим, и 21. дана по хоспитализацији имају у односу на контролну групу, као и у односу на групу са акутним и субакутним остеомијелитисом и даље статистички значајно веће вредности концентрацијског односа дехидроаскорбат/аскорбат ($p < 0.01$, односно $p < 0.05$).

ДИСКУСИЈА

Дигестија фагоцитиране честице одвија се након спајања фагозома са секундарним а затим и са примарним лизозомима неутрофила. У неким случајевима садржај лизозома, па и фагозома, се може избацити и у

екстрацелуларни простор узрокујући општећења мембране фагоцита, али и околног ткива (11), некротичне кости и сржних елемената. Овако настали детритус са новим количинама ексудата врши компресију на околне крвне судове чиме настају нове зоне некрозе.

Код деце до годину дана епифизна плоча не представља баријеру за метафизно-епифизне анастомозе (12), тако да инфекција захвата епифизу, а самим тим и зглобне структуре. У узрасту од 1. до 15. година епифизна плоча је дебела, анастомозе су прекинуте, тако да је немогуће ширење инфекције на епифизе. Изузетак је зглоб кука код кога метафиза фемура лежи унутар капсуле. После 15. године живота, са затварањем епифизне плоче поново се успостављају анастомозе што омогућава захватање епифизе па и самог зглоба инфламацијом. Ширење према периосту врши се кроз кортекс (13) а формирани субпериостални апсцес одлужљује периост због чега је знатно редукован доток крви у кортекс што доводи до његове некрозе. Ширењем процеса кроз медуларни канал долази до деструкције сржних елемената, а ексудат притиска нутритивну артерију и њене гране, тако да настаје некроза и медуларног дела кортекса.

Борећи се против инфекције периост ствара нову кост, односно младо гранулационо ткиво које продире у зоне гнојне, некротичне кости. Ово ткиво је богато остеобластима и остеокластима. Задњих је година постало јасно да значајну улогу у иницијацији деобе и пролиферацији ћелија у регенеративним процесима има супероксид анјон радикал (14) највероватније посредством повећања концентрације интрацелуларног калцијума, што доводи до активације Ca^{2+} -зависних ензима.

Дејство витамина Ц у антиоксидативној заштити је комплексно питање. Учешћем у регенерацији витамина Е он десетоструко појачава ефикасност токоферола у прекидању ланца липидне пероксидације (15), међутим, највећи број података из литературе говори у прилог дејства аскорбинске киселине на активне форме кисеоничких радикала. Функција аскорбинске киселине у односу на супероксид анјон радикал доказана је и на моделима *in vivo* када је утврђено да овај витамин омогућава вазодилатацију и након адхезије неутрофила на ендотелне ћелије (16), као и да примена аскорбата може да доведе до реверзије ендотелне вазомоторне дисфункције (17). Аскорбинска киселина има важно место и у регулацији интрацелуларног редокс статуса. Наиме, у условима повећаног оксидативног стреса биолошки активан редуковани глутатион се оксидује у глутатион дисулфид. Реагујући са супероксидом, витамин Ц чува глутатион од оксидације (18).

У младом гранулационом ткиву које се ствара у току остеомијелитиса убрзан је метаболизам аминокиселина, посебно лизина и пролина (19), као и њихова хидроксилација у присуству аскорбата и гвожђа (20). У току остеомијелитиса често су захваћене и зглобне структуре. За разлику од других телесних течности синовијална течност *de norme* има мерљиву количину тзв. блеомидин детектибилног гвожђа, односно гвожђа које није везано за протеине (21) и самим тим представља катализатор у генерисању слободних радикала кисеоника. Истраживања су показала да се у синовијалној течности

особа са реуматоидним артритисом одиграва изузетно интензивна липидна пероксидација (22) као последица хиперпродукције слободних радикала кисеоника. Експерименти *in vitro* показују да аскорбат-зависно стварање реактивних форми кисеоника доводи до деполимеризације хијалуронске киселине (23).

Аскорбат примењен у високим концентрацијама као адјувантна терапија доводи до реверзије вазомоторне дисфункције пацијената са болешћу коронарних артерија (17), смањује пермеабилност микроваскулатуре при дејству ендотоксина (24), редукује компликације код пацијената са тешким опекотинама (25) и инхибише репликацију и инфекциозност неких вируса (26). Све је већи број експерименталних и клиничких студија које потврђују делотворност овог антиоксиданса у одбрани организма од дејства слободних радикала кисеоника.

Па ипак, инфламација коштаног ткива је веома специфичан проблем због честог учешћа и зглобних структура у процесу, са непротеинским гвожђем у синовијалној течности, са природно малим бројем фагоцита у коштаном ткиву и са перманентном потребом управо за одвијањем слободнорадикалског процеса са партиципацијом аскорбата у смислу стварања колагена у гранулационом ткиву. Резултати нашег истраживања показују значај овог ендогеног антиоксиданса у заштити васкуларног простора у току неспецифичних остеомијелитиса. На то указују снижене вредности аскорбата и повишене вредности дехидроаскорбата у серуму наших пацијената.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рейнберг С. А.: Рентгендиагностика заболеваний костей и суставов. Медицина, Москва, 1964.
2. Turek S.: Orthopaedics, Lippincott Comp., Philadelph., 1984.
3. Rinder H.M., Bonan J.L., Rinder C.S., Ault K.A., Smith B.R.: Dynamics of leukocyte-platelet adhesion in whole blood. *Blood* 1991; 78(7): 1730-1737.
4. Weiss S.J.: Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta Physiol Scand* 1986; 548: 9-37.
5. Borregaard A., Schwartz J.H., Tauber A.J.: Proton secretion by stimulated neutrophils. *J Clin Invest* 1984; 74: 455-459.
6. Halliwell B.: Oxygen is poisonous: The nature and med. importance of oxygen radical. *Med Lab Sci* 1984; 41(2): 157-171.
7. Winterbourn C.C.: Comparison of superoxide with other reducing agents in biological production of hydroxyl radicals. *Biochem J* 1979; 182: 625-628.
8. Jain S.K., Williams D.M.: Reduced levels of plasma ascorbic acid (vitamin C) in sickle cell disease patients: Its possible role in the oxidant damage to sickle cells in vivo. *Clin Chim Acta* 1985; 149: 255-258.
9. Biemond P., Van Eijk H.G., Swaak A.J.G., Kaster J.F.: Iron mobilization from ferritin by superoxide derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest* 1984; 73: 1576-1579.
10. Straus B.: Medicinska biokemija. Zagreb: JUMENA; 1988.
11. Showell H.J., Freer R.J., Zigmund S.H., Schiffmann E., Aswanikumar S., Corcoran B., Becker E.L.: The structure-activity relations of synthetic peptides as chemotactic factors and inducers of lysosomal enzyme secretion for neutrophils. *J Exp Med* 1976; 143: 1154-1169.
12. Atanacković M.: Patologija kostiju i zglobova, Beograd, Naučna knjiga, 1990.
13. Horvat M.: Hrskavica rasta dugih kostiju u patološkim uvjetima, *Acta Chir Yugosl*, 1969; Vol. XVI: 73-82.
14. Murell G.A.C., Francis M.J.O., Bromley L.: Oxygen free radicals stimulate fibroblast proliferation. *Biochem Soc Trans* 1989; 17: 484-485.
15. Packer J., Slater T., Wilson R.: Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* 1979; 278: 733-738.
16. Lehr H.A., Frei B., Olofsson A.M., Carew T.E., Arfors K.E.: Protection from oxidized LDL-induced leukocyte adhesion to microvascular and macrovascular endothelium in vivo by vitamin C but not by vitamin E. *Circulation* 1995; 91: 1525-1532.
17. Levine G.N., Frei B., Koulouris S.N., Gerhard M.D., Keaney J.F., Vita J.A.: Ascorbic acid reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1993; 1996: 1107-1113.
18. Meistner A.: Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J Biol Chem* 1994; 269: 9297-9400.
19. Aalto M., Lampiaho K., Pikkarainen J., Kulonen E.: Amino acid metabolism of experimental granulation tissue in vitro. *Biochem J* 1973; 132: 663-671.
20. Levene C.I., Aleo J.J., Prynne C.J., Bates C.J.: The activation of procollagen proline hydroxylase by ascorbic acid in cultured 3T6 fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1974; 338: 29-36.
21. Gutteridge J.M.C., Rowley D.A., Halliwell B.: Superoxide-dependent formation of hydroxyl radical in the presence of iron salts. Detection of "free" iron in biological systems by using bleomycin-dependent degradation of DNA. *Biochem J* 1981; 199(1): 263-265.
22. Wade C.R., Jackson Ph.G., Highton J., Van Rij A.M. Lipid peroxidation and malondialdehyde in the synovial fluid and plasma of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta* 1987; 164: 245-250.
23. Wong S.F., Halliwell B., Richmond R., Skowroreck W.R.: Role of superoxide and hydroxyl radicals in the degradation of hyaluronic acid induced by metal ions and ascorbic acid. *J Inorg Biochem* 1981; 15: 127-134.
24. Matsuda T., Eccleston C.A., Rubinstein I., Rennard I.S., Joyner L.W.: Antioxidants attenuate endotoxin-induced microvascular leakage of macromolecules in vivo. *J Appl Physiol* 1991; 70 (4): 1483-1489.
25. Tanaka H., Matsuda T., Miyagantani Y., Yukioka T., Matsuda H., Shimazaki S.: Reduction of resuscitation fluid volumes in severely burned patients using ascorbic acid administration. *Arch Surg* 2000; 135: 326-331.
26. Bissell J.M., Hatie C., Farson A.D., Schwarz I.R., Soo W.J.: Ascorbic acid inhibits replication and infectivity of avian RNA tumor virus. *Proc Natl Acad Sci USA*; 1980; 77 (5): 2711-2715.