

EVALUAREA COMPARATIVĂ A MARKERILOR PRO-OXIDANȚI ȘI ANTIOXIDANȚI DUPĂ TERAPIA TOPICĂ CU FENITOINĂ ȘI RESPECTIV FOTOCHIMIOTERAPIA LOCALĂ ÎN VITILIGO

DANIELA POROJAN¹, NICOLETA DECEA², RODICA COSGAREA¹

¹Clinica de Dermatologie, Spitalul Clinic Județean de Urgență, Cluj-Napoca

²Catedra de Fiziologie, Universitatea de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca

Rezumat

Introducere. Vitiligo este o afecțiune cutanată a cărei etiologie este, până în prezent, incomplet elucidată. Numeroasele metode terapeutice cunoscute nu și-au dovedit în totalitate eficacitatea, în acest sens, fenitoina, prin activitatea sa imunomodulatoare, fiind propusă ca și agent terapeutic în vitiligo. Până în prezent nu sunt studii publicate care să ateste eficacitatea terapiei cu fenitoină în această afecțiune.

Obiective. Evaluarea markerilor pro-oxidanți și antioxidanți în urma aplicării a două metode terapeutice, PUVA terapia locală și, respectiv, terapia topică cu fenitoină, în vederea aprecierii eficacității fenitoină în vitiligo.

Pacienți și metodă. Evaluarea stresului oxidativ s-a realizat prin determinarea echilibrului dintre agenții oxidanți (malondialdehida) și respectiv sistemele antioxidante (capacitatea de donor de hidrogen). Pacienții eligibili au fost incluși în două loturi de studiu, în funcție de tratamentul urmat, terapia topică cu fenitoină gel 2% și, respectiv, fotochimioterapia locală.

Rezultate. Expunerea tegumentului afectat de vitiligo la fenitoină topică determină reducerea proceselor de peroxidare lipidică la 90% din pacienți, precum și stimularea sistemelor antioxidante la nivelul țesutului cutanat în 80% din cazuri, similar metodei terapeutice cunoscute, PUVA terapia locală.

Concluzii. Aplicațiile topice de fenitoină se pot dovedi eficiente în tratamentul vitiligo-ului, prin acțiunea acestui agent asupra balanței oxidanți/antioxidanți.

Cuvinte cheie: vitiligo, stres oxidativ, fenitoină.

COMPARATIVE ASSESSMENT OF PRO-OXIDANT AND ANTIOXIDANT MARKERS AFTER TOPICAL PHENYTOIN THERAPY AND PHOTO-CHEMOTHERAPY IN VITILIGO

Abstract

Background. Vitiligo is a skin disease whose etiology is far from being completely elucidated. Many therapeutic methods have not proven to be fully effective, therefore phenytoin, through its immunomodulatory activity, has been proposed as a therapeutic agent in vitiligo. No studies showing the efficacy of phenytoin in this condition have been published so far.

Aims. Evaluation of pro-oxidant and antioxidant markers after two therapeutic methods, topical PUVA therapy and topical therapy with phenytoin respectively, to assess the effectiveness of phenytoin in vitiligo.

Patients and method. Oxidative stress was evaluated by determining the balance between oxidants (malondialdehyde) and antioxidant systems (hydrogen donor capacity). Eligible patients were enrolled in two groups according to the treatment studied, namely phenytoin topical gel 2% and topical photochemotherapy.

Results. *The treatment with topical phenytoin reduced lipid peroxidation processes in 90% of patients and stimulated the antioxidant systems of the skin in 80% of the cases, similar to a known therapeutic method, topical PUVA therapy.*

Conclusions. *Topical applications of phenytoin may be effective in the treatment of vitiligo, by its efficacy on the oxidant/antioxidant balance.*

Keywords: vitiligo, oxidative stress, phenytoin.

INTRODUCERE

Vitiligo este o dermatoză întâlnită la 0,5-2% din populație, caracterizată prin apariția de macule și plăci depigmentate, bine delimitate, al căror număr și dimensiuni cresc progresiv în timp. Deși nu afectează mortalitatea și morbiditatea generală, afecțiunea poate avea consecințe psihologice devastatoare asupra individului afectat și asupra relațiilor cu cei din jur.

Deși s-au emis multe ipoteze pentru a explica etiologia acestei afecțiuni, fiecare fiind bazată pe dovezi științifice, nici una dintre ele nu poate explica în totalitate mecanismul dispariției melanocitelor și formarea leziunilor acromice, vitiligo fiind considerată în prezent o afecțiune multifactorială [1].

Teoria stresului oxidativ în vitiligo susține faptul că moartea melanocitelor rezultă dintr-o sensibilitate intrinsecă crescută la stresul oxidativ, secundară intermediarilor toxici ai precursorilor melaninei sau din alte surse. Studiile *in vitro* și *in vivo* pun în evidență existența stresului oxidativ, prin intermediul acumulării de hidrogen peroxid (H_2O_2) și peroxinitrit ($ONOO(-)$) în epidermul pacienților cu vitiligo, secundar nivelelor locale scăzute de catalază [2].

Până la ora actuală nici una dintre metodele terapeutice cunoscute nu și-a demonstrat în totalitate eficacitatea, astfel că alternativele terapeutice cu rezultate mai mult sau mai puțin benefice sunt testate permanent în vitiligo, în vederea găsirii metodei optime de tratament [3]. Deoarece nici una din terapiile utilizate până în prezent nu a fost urmată de vindecare completă, găsirea unor compuși noi, cu efect stimulator asupra procesului de repigmentare și/sau cu efect supresor asupra reacției imunologice locale reprezintă o prioritate în tratamentul vitiligo-ului.

Difenilhidantoina este un agent anticonvulsivant frecvent prescris, utilizat la nivel cutanat în tratamentul epidermolizei buloase, al afecțiunilor inflamatorii, al ulcerelor; a fost folosit în tratamentul oral și topic al lichenului plan. Rapoarte anterior publicate [4,5] sugerează ipoteza conform căreia fenitoina poate reprezenta o opțiune viabilă în tratamentul vitiligo-ului, ținând cont de activitatea imunomodulatoare cunoscută și de efectele secundare de repigmentare facială observate în cursul terapiilor afecțiunilor neurologice. Până la momentul actual nu sunt studii finalizate care să ateste eficiența aplicațiilor topice de fenitoină în tratamentul acestei afecțiuni.

OBIECTIVE

Plecând de la premiza implicării stresului oxidativ în etiopatogenia vitiligo-ului, s-a evaluat amploarea acestui posibil mecanism patogenetic, prin determinarea echilibrului dintre agenții pro-oxidanți și sistemele antioxidante, în urma aplicării a două metode terapeutice considerate a reduce nivelul oxidanților și a augmenta nivelul sistemelor antioxidante, terapia topică cu fenitoină și respectiv PUVA terapia locală. În acest fel se poate aprecia în ce măsură fenitoina se poate dovedi utilă în reechilibrarea balanței pro-oxidanți/antioxidanți în vitiligo.

PACIENȚI ȘI METODĂ

Evaluarea stresului oxidativ și a balanței oxidanți/antioxidanți la pacienții cu vitiligo, în cazul studiului de față s-a realizat pe baza indicatorilor malondialdehida (MDA) și, respectiv, capacitatea de donor de hidrogen (DH), evaluare efectuată în laboratorul catedrei de Fiziologie din cadrul Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca.

Pacienții cu vitiligo incluși în studiu s-au prezentat în serviciul Clinicii de Dermatologie din Cluj-Napoca, având ca și criterii de includere următoarele: pacienți cu vârsta mai mare de 18 ani care în prezent nu urmează nici un tratament pentru această afecțiune, prezența plăcilor depigmentate de vitiligo, progresive sau stabile. Au fost excluși din studiu pacienții cu vârsta < 18 ani sau pacienții aflați sub alte tratamente sistemice sau topice pentru vitiligo, precum și pacienții prezentând macule și plăci depigmentate secundare arsurilor termice, chimice, sau altor afecțiuni dermatologice. Diagnosticul de vitiligo a fost stabilit prin evaluare clinică și examinare cu lampa Wood și s-a practicat evaluarea clinică și paraclinică în vederea excluderii altor afecțiuni autoimune asociate. Douăzeci de pacienți au finalizat toate etapele studiului, pe aceștia realizându-se evaluarea finală.

Cei douăzeci de pacienți eligibili au fost repartizați aleator în grupuri de 1:1 pentru a urma fie terapie topică cu fenitoină gel 2% (lotul I), fie fotochimioterapie locală (Psoralen și UVA - lotul II). După semnarea consimțământului informat, s-au practicat biopsii cutanate din leziunile depigmentate sub anestezie locală cu xilină 1%, ulterior crioconservate la -20°C. După încheierea celor trei luni de monoterapie, s-a practicat o nouă biopsie cutanată de la nivelul zonei tratate în vederea determinării nivelului de MDA, ca și indicator specific al stresului oxidativ, precum și capacitatea de DH, ca și măsură a sistemului

antioxidant. Rezultatele au fost analizate statistic utilizând programul SPSS 13.0 - Statistical Software Package (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA). Valorile $p \leq 0.05$ au fost considerate semnificative din punct de vedere statistic.

Metoda de dozare a MDA prin fluorescență

Pentru dozare, omogenatul tisular s-a fiert timp de o oră cu o soluție de acid 2-tiobarbituric 10 mM în K_2HPO_4 75 mM pH=3. După răcirea bruscă, produsul de reacție a fost extras în n-butanol. Concentrația s-a determinat în faza organică după separarea acesteia prin centrifugare. Măsurarea intensității emisiei s-a efectuat la 534 nm cu un spectrofluorimetru Perkin Elmer (Massachusetts, USA) printr-o tehnică de fluorescență sincronă la o diferență de lungime de undă între excitație și emisie ($\Delta\lambda$) de 14 nm. Valorile concentrației au fost exprimate în nmoli/ml [6].

Determinarea capacității de DH

Măsurarea capacității de DH a serului se bazează pe reducerea radicalului stabil 1,1-difenil-picrilhidrazil (DPPH) de către o serie de componente antioxidante neenzimice ale acestuia: glutatation, tocoferol, acid ascorbic. Această reducere poate fi urmărită prin schimbarea culorii de la violet la galben pal, monitorizată prin modificarea absorbanței la 520 nm [7].

Capacitatea de DH se măsoară în inhibiție % față de probele de control, conform următoarei formule de calcul:

Inhibiție % = $(\text{Extincție control} - \text{Extincție probă de ser}) / \text{Extincție control} \times 100$.

REZULTATE

Cei douăzeci de pacienți luați în studiu au finalizat această evaluare pe o durată de 3 luni, zece pacienți urmând terapie topică cu fenitoină, în timp ce zece pacienți au urmat fotochimioterapie locală. Nu s-a înregistrat niciun abandon în cadrul studiului, datorat efectelor adverse sau intoleranței regimului terapeutic.

S-au înregistrat valorile MDA, precum și capacitatea de DH, atât înainte cât și după trei luni de tratament (Tabel I).

Tabel I. Valorile MDA, precum și ale capacității de DH, înainte și după terapie la pacienții cu vitiligo.

Pacient	Tratament	MDA inițial (nmoli/ml)	MDA final (nmoli/ml)	DH inițial (%inhibiție)	DH final (%inhibiție)
1	fenitoină	1,141449	0,568292	3,36	5,32
2	fenitoină	4,513455	1,22678	5,63	6,42
3	fenitoină	1,822	0,478565	5,56	6,28
4	fenitoină	0,866034	0,210667	4,86	5,2
5	fenitoină	0,496185	0,348632	6,4	7,06
6	fenitoină	3,02396	1,22541	3,6	11,64
7	fenitoină	1,924588	1,369233	5,68	4,21
8	fenitoină	1,379714	1,45232	7,79	7,35
9	fenitoină	0,596345	0,254789	6,05	8,26
10	fenitoină	2,736364	0,109699	6,17	7,38
11	PUVA	0,776143	0,90195	6,47	7,36
12	PUVA	0,483	0,97224	4,15	5,63
13	PUVA	0,38553	0,63418	6,69	5,53
14	PUVA	1,245973	0,34587	2,39	4,83
15	PUVA	0,845213	0,341201	1,81	2,42
16	PUVA	0,58592	0,24103	4,28	5,03
17	PUVA	0,421598	0,228474	4,69	2,13
18	PUVA	0,511856	0,324178	3,6	8,2
19	PUVA	1,38399	0,78801	4,29	6,24
20	PUVA	0,2394	0,119731	7,62	7,95

Valoarea medie absolută a variației MDA în urma terapiei cu fenitoină (media $\pm$ deviația standard fiind $1,14 \pm 1,45$) este superioară valorii medii înregistrate în urma PUVA terapiei (media $\pm$ deviația standard fiind $0,37 \pm 0,25$), în timp ce valoarea medie absolută a variației DH în urma terapiei cu fenitoină (media $\pm$ deviația standard $1,78 \pm 2,28$) este inferioară valorii înregistrate în cazul PUVA terapiei (media $\pm$ deviația standard $1,67 \pm 1,85$).

Evaluarea celor două metode terapeutice studiate relevă faptul că ambele determină o reducere a nivelului de oxidanți, respectiv MDA, precum și o creștere a nivelului de antioxidanți, respectiv DH, la terminarea tratamentului (Figura 1; Figura 2). Dacă în cazul nivelului antioxidanților ambele metode terapeutice determină o creștere a acestora în 80% din cazurile evaluate, în cazul nivelului oxidanților se observă superioritatea terapiei topice cu fenitoină, care determină o reducere a nivelului MDA la 90% din pacienți, în timp ce PUVA terapia locală determină reducerea nivelului oxidanților la doar 70% din pacienți.

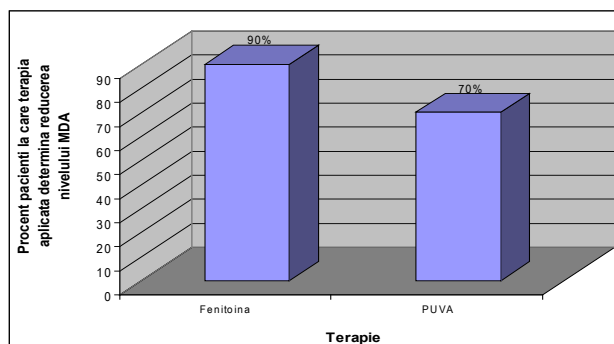


Fig. 1. Distribuția pacienților aflați sub cele două tipuri de monoterapie luate în studiu în funcție de capacitatea de reducere a nivelului de pro-oxidanți.

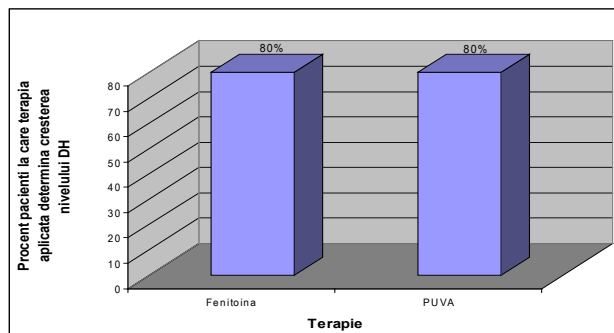


Fig. 2. Distribuția pacienților aflați sub cele două tipuri de monoterapie luate în studiu în funcție de capacitatea de creștere a nivelului de antioxidanți.

În ciuda corelației invers proporționale evidente între nivelele de MDA și respectiv DH în cazul ambelor tipuri de tratament, corelațiile diferențelor de MDA și DH în funcție de tipul tratamentului PUVA vs. fenitoină nu prezintă diferențe semnificative. Aceste corelații nesemnificative

din punct de vedere statistic se pot atribui faptului că lucrăm pe un eșantion de numai 20 de cazuri (Tabel II).

Tabel II. Evaluarea corelațiilor dintre nivelele de MDA și respectiv DH.

			Diferențele de MDA	Diferențele de DH
PUVA	1	Diferențe MDA	1	-0,266
	2	Diferențe DH	-0,266	1
Fenitoină	3	Diferențe MDA	1	-0,264
	4	Diferențe DH	-0,264	1

DISCUȚII

Implicația stresului oxidativ și a speciilor reactive ale oxigenului (SRO) în etiopatogenia vitiligo-ului a fost investigată în mai multe studii [8-11]. Stresul oxidativ a fost propus ca și mecanism declanșator al degenerescentei melanocitare în această afecțiune, SRO putând induce apariția modificărilor pigmentare [12,13].

Epidermul uman reprezintă prima linie de apărare împotriva radicalilor liberi. Datele curente susțin ipoteza unui dezechilibru între pro-oxidanți și antioxidanți la nivelul melanocitelor și keratinocitelor pacienților cu vitiligo. Ipoteza stresului oxidativ sugerează faptul că afectarea melanocitară poate fi determinată de o creștere a stresului oxidativ, cu o inducție consecutivă a acumulării de H_2O_2 în epidermul acestor pacienți [14]. O reciclare defectuoasă a tetrahidrobiopterin-ului în epiderm este asociată cu producția intracelulară de H_2O_2 [15]. De asemenea, nivele scăzute ale sistemelor antioxidante, cum ar fi superoxiddismutaza, catalaza, vitamina A, C, E au fost evidențiate atât în epidermul lezional, cât și non-lezional al pacienților cu vitiligo [16]. O producție intracelulară crescută de SRO care pot interacționa cu macromolecule cum ar fi proteine, lipide membranare și acizi nucleici datorită disfuncționalității mitocondriale, a fost observată în cazul acestor pacienți [17].

MDA, ca și produs final al peroxidării lipidice, este în prezent acceptat ca și indicator specific al stresului oxidativ. În timp ce unele studii au evidențiat un nivel normal de MDA [18], altele au relevat un nivel crescut al acesteia comparativ cu subiecții de control [12]. Indiferent de nivelul MDA, procesul de lipoperoxidare rămâne o manifestare majoră a stresului oxidativ, reducerea acesteia putând juca un rol esențial în tratamentul vitiligo-ului. Capacitatea de DH, ca și măsură a sistemului antioxidant, reprezintă o marcă a capacității de apărare a tegumentului pacienților cu vitiligo. Este primul studiu care evaluează comparativ nivelele tisulare de MDA și de DH sub influența a două metode terapeutice, aplicațiile topice de fenitoină și respectiv PUVA terapia locală.

CONCLUZII

Expunerea tegumentului afectat de vitiligo la fenitoină topică determină reducerea proceselor de peroxidare lipidică la nivelul țesutului cutanat, procese

evaluate prin intermediul nivelului tisular de MDA, similar metodei terapeutice cunoscute, PUVA terapia locală.

Aceeași metodă terapeutică determină stimularea sistemelor antioxidante protectoare la nivel cutanat, în cazul de față capacitatea de DH.

Deși corelațiile diferențelor dintre MDA și DH înainte și după terapia aplicată nu sunt semnificative din punct de vedere statistic datorită dimensiunii eșantionului, invers proporționalitatea este evidentă, cu o reducere a nivelului MDA în 90% și respectiv în 70% din cazurile pacienților aflați sub monoterapie cu fenitoină gel și, respectiv, fotochimioterapie locală și cu o augmentare a nivelului antioxidanților în 80% din cazuri în cele două loturi. Se constată superioritatea terapiei topice cu fenitoină în ceea ce privește reducerea nivelului MDA, superioritate care reprezintă un punct de plecare pentru studiile ulterioare și, de asemenea, este prima evaluare de acest gen din literatura de specialitate.

Deși până în prezent nu există un panaceu universal în vitiligo, aplicațiile topice de fenitoină se pot dovedi eficiente în tratamentul acestei afecțiuni.

Bibliografie

- Guerra L, Dellambra E, Brescia S, Raskovic D. Vitiligo: pathogenetic hypotheses and targets for current therapies. *Curr Drug Metab*, 2010; 11(5):451-467.
- Schallreuter KU, Salem MA, Gibbons NC, et al. Blunted epidermal L-tryptophan metabolism in vitiligo affects immune response and ROS scavenging by Fenton chemistry, part 1: epidermal H_2O_2 /ONOO--mediated stress abrogates tryptophan hydroxylase and dopa decarboxylase activities, leading to low serotonin and melatonin levels. *FASEB J*, 2012; 26(6):2457-2470.
- Falabella R, Barona MI. Update on skin repigmentation therapies in vitiligo. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2009; 22:42-65.
- MR Namazi. Phenytoin as a novel anti-vitiligo weapon. *J Autoim Dis*, 2005; 2:11.
- Bahmani M, Fallahzadeh MK, Jowkar F, Khalesi M, Bahri-Najafi R, Namazi MR. Can topical phenytoin augment the therapeutic efficacy of PUVA against vitiligo? A double-blind, randomized, bilateral-comparison, placebo-controlled study. *J Dermatol Treat*, 2011; 22(2):106-108.
- Conti M, Moran PC, Levillain P, et al. Improved fluorimetric determination of malondialdehyde. *Clin Chem*, 1991; 37:1273-1275.
- Janazsewska A, Bartosz G. Assay of antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand. J. Lab. Invest*, 2002; 62:231-236.
- Passi S, Grandinetti M, Maggio F, et al. Epidermal oxidative stress in vitiligo. *Pigment Cell Res*, 1998; 11:81-85.
- Yildirim M, Baysal V, Inaloz HS, et al. The role of oxidants and antioxidants in generalized vitiligo. *J Dermatol* 2003; 30:104-108.
- Lv YJ, Liao WJ, Luan Q, Wang H, Wang L, Li Q. The polymorphism of catalase T/C codon 389 in exon 9 and vitiligo susceptibility: a meta-analysis. *J Eur Acad Dermatol Venerol*, 2011; 25(8):955-958.
- Schallreuter KU, Salem MA, Gibbons NC, et al. Blunted epidermal L-tryptophan metabolism in vitiligo affects immune response and ROS scavenging by Fenton chemistry, part 2: epidermal H_2O_2 /ONOO - mediated stress in vitiligo hampers indoleamine 2,3-dioxy-

genase and aryl hydrocarbon receptor-mediated immune response signaling. *FASEB J*, 2012; 26(6):2471-2485.

12. Koca R, Armutcu F, Altinyazar HC, Gurel A. Oxidant-antioxidant enzymes and lipid peroxidation in generalized vitiligo. *Clin Exp Dermatol*, 2004; 29:406-409.

13. Hazneci E, Karabulut AB, Ozturk C. A comparative study of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities and nitrate levels in vitiligo patients. *Int J Dermatol*, 2005; 44:636-640.

14. Giovannellia L, Bellandib S, Pitozzia V, Fabbrib P, Dolaraa PP, Morettib S. Increased oxidative DNA damage in mononuclear leukocytes in vitiligo. *Mutat Res*, 2004; 556:101-106.

15. Spencer JD, Gibbons NC, Rokos H, Peters EM, Wood JM, Schallreuter KU. Oxidative stress via hydrogen peroxide affects

proopiomelanocortin peptides directly in the epidermis of patients with vitiligo. *J Invest Dermatol*, 2007; 127:411-420.

16. Schallreuter KU, Moore J, Wood JM, Beazley WD, Gaze DC. In vivo and in vitro evidence for hydrogen peroxide accumulation in the epidermis of patients of vitiligo and its successful removal by UVB activated pseudocatalase. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 2007; 4:91-96.

17. Dell'Anna ML, Maresca V, Brigandi S, Camrea E, Falchi M, Picardo M. Mitochondrial impairment in peripheral blood mononuclear cells during the active phase of vitiligo. *J Invest Dermatol*, 2001; 4:908-913.

18. Shin JW, Nam KM, Choi HR, et al. Erythrocyte malondialdehyde and glutathione levels in vitiligo patients. *Ann Dermatol*, 2010; 22(3):279-283.