

ROLUL STRESULUI OXIDATIV ÎN ETIOPATOGENIA BOLII DUPUYTREN

VALERIU NICULA¹, NICOLETA DECEA¹, CONSTANTIN CIUCE¹

¹Universitatea de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca

Rezumat

Introducere. Prin boală Dupuytren se înțelege retracția fibroasă a aponevrozei palmare și digitale, având, până la ora actuală, mecanisme intrinseci etiopatogenetice incomplet cunoscute.

Obiective. Studiul prezent își propune ca obiective: 1) Investigarea relației între mecanismele de stres oxidativ și boala Dupuytren; 2) Investigarea modificărilor induse de prezența diabetului zaharat în mecanismele patogenetice menționate, la pacienții cu contractură Dupuytren.

Material și metodă. 36 de cazuri de pacienți purtători de leziuni patognomonice ale BD, precum și 25 de cazuri martor au fost selectate în perioada 2005-2007. În funcție de prezența diabetului zaharat, subiecții lotului test au fost subîmpărțiți în două grupuri (DZ prezent, n=28; DZ absent, n=8). Tuturor cazurilor incluse în studiu li s-au recoltat probe de salivă și urină. Din probele urinare și salivare s-au dozat nivelele malondialdehidei (MDA), donorilor de hidrogen (DH). Nivelele ceruloplasminei (CP) salivare au fost, de asemenea, evaluate la toți pacienții în studiu.

Rezultate. Nivelele MDA au fost superioare în lotul test față de martor, cu semnificație statistică pentru determinările urinare ($p=0.011$). Valorile DH, CP au prezentat nivele mai scăzute la lotul cu BD. Pacienții cu BD și prezența DZ au prezentat nivele semnificativ diferite ale MDA ($p=0.004$), DH ($p=0.045$) urinare, precum și ale CP salivare ($p=0.025$), comparativ cu pacienții fără modificări ale statusului glicemic.

Concluzii. Contractura Dupuytren, atât ca boală de sine stătătoare, cât și ca manifestare secundară diabetului zaharat, se asociază cu modificarea echilibrului oxidativ la nivel urinar, salivar și agresiunea oxidativă. Diabetul zaharat, prin mecanisme proprii, intervine în atenuarea injuriei oxidative specifice contracturii Dupuytren.

Cuvinte cheie: contractură Dupuytren, diabet zaharat, stres oxidativ.

THE ROLE OF OXIDATIVE STRESS IN DUPUYTREN'S DISEASE PATHOGENESIS

Abstract

Background. Dupuytren's Disease (DD) means the fibrous retraction of palmar and digital aponeurosis. Up to now, the intrinsic ethiopathogenetic mechanisms of DD are still not completely known.

Aims. We aimed to investigate: 1) the relationship between oxidative stress, inflammatory mechanisms and DD; 2) the alterations induced by diabetes mellitus (DM) in the aforementioned pathogenetic mechanisms of DD.

Material and method. 36 cases bearing DD lesions, as well as 25 control cases were selected between 2005-2007. According to presence of DM, test group was further divided into two sub-groups (presence of DM, n=28; absence of DM, n=8). Collection of urine and saliva was performed for all included cases. Malondialdehyde (MDA), hydrogen donor activity (HD) were assessed on both urinary and salivary samples. Also, ceruloplasmin (CP) was measured in saliva for all patients.

Results. MDA levels were superior in test group as compared to control group for urinary samples ($p=0.011$). HD, CP presented lower values in DD group. Patients presenting DD and DM association recorded significantly different levels of urinary MDA ($p=0.004$), HD ($p=0.045$) as well as salivary CP levels ($p=0.025$) as compared to DD with no glycemic equilibrium alterations group.

Conclusions. Dupuytren contracture, both in the form of stand-alone disease and secondary manifestation of DM is associated with oxidative balance alteration and oxidative injury in saliva and urine. By means of innate mechanisms, diabetes alleviates the DD-specific oxidative injury.

Keywords: Dupuytren contracture, diabetes mellitus, oxidative stress.

Introducere

Prin boala Dupuytren se înțelege retracția fibroasă a aponevrozei palmare și digitale [1]. Prevalența sa în populație variază între 0.2 și 56%. În funcție de arealul geografic, apartenența etnică, nivelele maxime ale prevalenței sunt raportate în cazul grupurilor de pacienți sub tratament cronic cu anticonvulsivante pentru epilepsie [2]. Numeroase studii au incriminat o serie de factori de risc ai apariției bolii Dupuytren, precum: arealul geografic, sexul pacienților, vârsta înaintată, antecedentele heredo-colaterale, alcoolul, fumatul, suprasolicitarea fizică, traumatismele în antecedente, nivelele ridicate de lipide serice [3,4]. De asemenea, unele comorbidități: DZ, epilepsia, boala reumatoidă, ciroza hepatică, boala Peyronie, Ledderhose, HIV/SIDA s-au demonstrat a avea ca și manifestare asociată contractura Dupuytren.

Cu toate acestea, mecanismele intrinseci etiopatogenetice ale bolii nu sunt încă cunoscute. Entitățile nosologice pentru care asocierea cu contractura Dupuytren a fost demonstrată sunt foarte adesea rezultatul unor mecanisme patogenetice, între care stresul oxidativ și inflamația joacă un rol cheie (exemplu: diabetul zaharat); până în acest moment nu există studii dedicate investigării acestor tipuri de mecanisme în BD. Mai mult decât atât, observațiile clinice arată grade mai reduse de severitate la pacienții care prezintă diabet zaharat (DZ) asociat contracturii Dupuytren, comparativ cu pacienții care nu prezintă această comorbiditate asociată.

Obiective

Studiul prezent își propune: 1) Investigarea relației între mecanismele de stres oxidativ și boala Dupuytren; 2) Investigarea modificărilor induse de prezența diabetului zaharat în mecanismele patogenetice menționate, la pacienții cu contractură Dupuytren.

Material și metodă

Au fost incluși în studiu un număr de 36 pacienți, selectați în perioada 2005-2007 din următoarele unități sanitare: Clinica Chirurgie I, Spitalul Militar Cluj-Napoca,

Clinica de Diabet și Boli de Nutriție Cluj-Napoca, Clinica Interservisan Cluj-Napoca, Spitalul Orășenesc Chișinău-Criș (lotul test). Criteriile de selecție au fost prezența leziunilor patognomonice ale bolii Dupuytren. S-au exclus pacienții prezentând ciroză hepatică. Au mai fost incluși în studiu un număr de 25 martori, voluntari sănătoși selectați în perioada 2005-2010. În funcție de prezența diabetului zaharat, subiecții lotului test au fost subîmpărțiți în două grupuri (DZ prezent, $n=28$; DZ absent, $n=8$).

Colecție probe:

Pentru toți pacienții s-a realizat recoltarea de probe de salivă și urină.

Recoltarea salivei s-a efectuat dimineața, înainte de perierea dinților/folosirea aței dentare, înainte de alimentare. S-a indicat subiecților să realizeze o curățire a cavității orale de 2 ori cu apă rece. După care, în condiții bazale (fără stimulare prin mestecare gumă), s-a indicat subiecților să colecteze saliva în recipiente cu capac (tuburi Eppendorf).

Recoltarea urinei s-a realizat din prima urină de dimineață, după toaleta locală, din mijlocul jetului urinar. Colecția s-a realizat în recoltoare speciale.

Dozări biochimice:

Pentru probele de urină s-a realizat dozarea malondialdehidei, precum și a donozilor de hidrogen. Din probele de salivă s-a determinat nivelul de malondialdehidă, donori de hidrogen, precum și de ceruloplasmină. Determinările s-au realizat la Laboratorul de Stres Oxidativ din cadrul Catedrei de Fiziologie al Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca.

Malondialdehida (MDA) [5]

Proba s-a făcut timp de 1 oră cu o soluție de acid 2-tiobarbituric 10 mM în K_2HPO_4 75 mM pH3. După răcirea bruscă, produsul de reacție s-a extras în n-butanol. Concentrația s-a determinat în faza organică după separarea acesteia prin centrifugare. Măsurarea intensității emisiei s-a realizat la 534 nm cu un spectrofluorimetru Perkin Elmer, printr-o tehnică de fluorescență sincronă la o diferență de lungime de undă între excitație și emisie ($\Delta\lambda$) de 14 nm. Concentrația de malondialdehidă se stabilește pe baza unei curbe de etalonare, realizată cu concentrații cunoscute de MDA prelucrate în același fel.

Determinarea capacității de donoz de hidrogen (Janaszewska, 2002)

Probele au fost diluate cu tampon fosfat 10 mM,

pH 7,4. S-a adăugat soluția 0,1 mM de 1,1-difenilpicrilhidrazil (DPPH), s-a lăsat timp de 30 min la temperatura camerei și s-a citit extincția față de blankuri, care constau în probe tratate în același fel, dar în care a fost adăugat metanol absolut în locul soluției de DPPH. În paralel s-a realizat determinarea extincției unor probe de control care nu conțin ser, ci un volum corespunzător de tampon fosfat.

Capacitatea de donor de hidrogen s-a măsurat în Inhibiție% față de probele de control, conform următoarei formule de calcul: $\text{Inhibiție\%} = (\text{Extincție control} - \text{Extincție proba de ser}) / \text{Extincție control} \times 100$.

Determinarea ceruloplasminei serice [6]

Ceruloplasmina serică este o alfa2-globulină, care in vitro prezintă proprietăți de fenoloxidază, catalizând oxidarea p-fenilendiaminei la un compus de culoare verde. Probele de ser, diluate cu tampon acetat 0.4M PH 5.5, au fost tratate cu o soluție de p-fenilendiamină clorhidrat 0.5% și lăsate să reacționeze la 37°C, timp de 60 min. După acest interval reacția a fost blocată cu o soluție de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.5% rece și extincțiile au fost citite după ½ oră la 530 nm. În paralel au fost prelucrate și probe în care s-a adăugat $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.5%, înainte de incubarea la 37°C. Aceste probe au fost probe blanc pentru fiecare dintre serurile analizate. Calculul concentrației s-a realizat după formula: $\text{Concentrația} = 87.5 \times \text{Absorbanța}_{530}$. Valorile au fost exprimate în mg%.

Metode statistice

Pentru analiza datelor s-a optat pentru teste non-parametrice, după testarea prealabilă a normalității distribuției datelor (testul Kolmogorov Smirnov). Testele utilizate au fost testul Kruskal-Wallis, respectiv Mann-Whitney U Test. Valorile parametrilor numerici continui au fost exprimate ca mediană (min-max). Datele au fost prelucrate utilizând pachetul statistic SPSS 17.0 (Chicago, IL).

Rezultate

Nivelele MDA au fost mai ridicate în cazul lotului cu BD, comparativ cu martorii, atât în salivă, cât și în urină. S-au înregistrat nivele mai scăzute în cazul donrilor de hidrogen, la același lot. Nivelele ceruloplasminei au fost scăzute în cazul lotului test. Diferențele înregistrate au fost semnificative doar pentru parametrul MDA la nivel urinar (Tabelul I).

Subgrupul pacienților cu DZ a înregistrat nivele ale parametrilor oxidativi mai scăzute, precum și valori ale parametrilor antioxidanți mai ridicate, decât subgrupul neputător de DZ. Diferențele înregistrate au atins pragul de semnificație în cazul MDA, DH la nivel urinar, precum și în cazul ceruloplasminei la nivel salivar (Tabelul II).

De remarcat că în cazul subgrupului cu DZ, nivelele MDA urinare, precum și ceruloplasminei salivare au fost semnificativ diferite față de martor (MDA: $p=0.006$; CP: $p=0.005$) (Figurile 1-3).

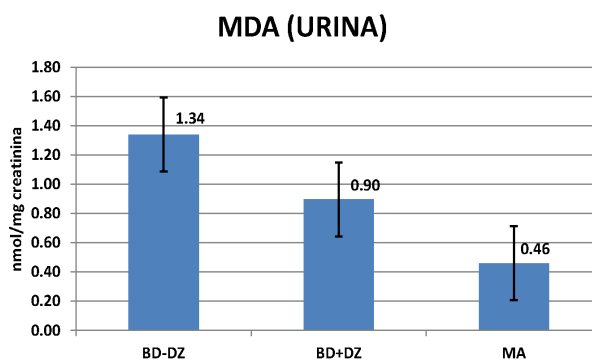


Fig. 1. Nivelele malondialdehidei în urină, la cele trei subgrupuri de pacienți.

Tabelul I. Nivelele markerilor analizați la lotul martor, respectiv control.

Parametru	Lot Martor (n=25)	Lot BP (n=36)	p
Mediana (min-max)			
Urina			
Malondialdehida (MDA)	0.5 (0.4-0.7)	1.02 (0.2-2.4)	0.011
Donori de hidrogen (DH)	64.2 (45.1-71.3)	60.1 (57.7-65.5)	0.527
Saliva			
Malondialdehida (MDA)	0.6 (0.2-0.8)	0.65 (0.1-1.4)	0.885
Donori de hidrogen (DH)	19.0 (10.2-39.5)	14.3 (12.8-23.5)	0.145
Ceruloplasmina (CP)	8.5 (4.3-13.9)	2.8 (0.3-12.4)	0.921

Tabelul II. Nivelele markerilor analizați în funcție de prezența/absența diabetului zaharat.

Parametru	Lot BP Absența DZ (n=28)	Lot BP Prezența DZ (n=8)	p
Mediana (min-max)			
Urina			
Malondialdehida (MDA)	1.3 (1.04-2.4)	0.9 (0.2-2.0)	0.004
Donori de hidrogen (DH)	58.1 (54.3-65.5)	65.6 (45.1-71.3)	0.045
Saliva			
Malondialdehida (MDA)	0.7 (0.61-1.4)	0.6 (0.1-0.8)	0.913
Donori de hidrogen (DH)	14.3 (10.2-39.5)	19.0 (17.2-23.9)	0.625
Ceruloplasmina (CP)	1.9 (0.3-2.2)	3.7 (0.8-13.9)	0.025

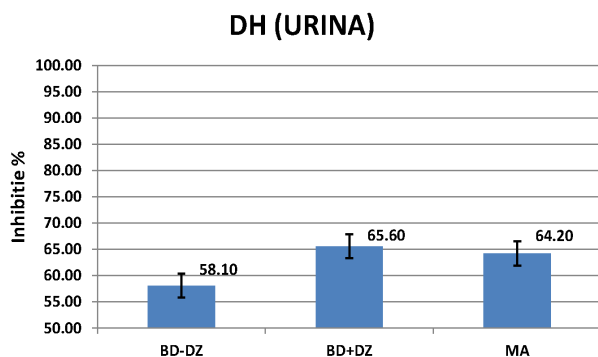


Fig. 2. Nivelele capacității antioxidante totale în urină, la cele trei subgrupuri de pacienți.

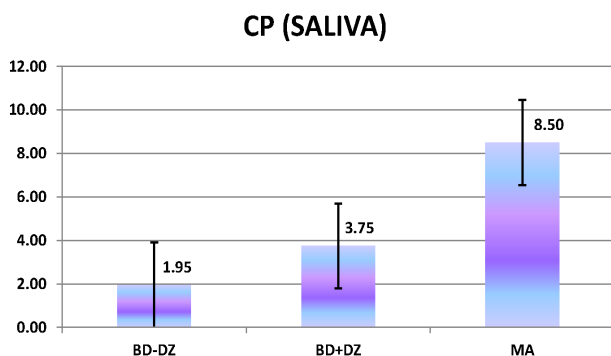


Fig. 3. Nivelele ceruloplasminei în salivă, la cele trei subgrupuri de pacienți.

Discuții

Stresul oxidativ reprezintă o condiție asociată cu o generare crescută de specii reactive de oxigen (ROS) și/sau capacitate antioxidantă celulară scăzută, conducând la un dezechilibru între formarea de radicali liberi și potențialul de contracarare a efectelor acestora de către organism. În condiții normale, există un echilibru între elementele pro-oxidante și cele antioxidante în organism. O supraexpresie relativă a elementelor pro-oxidante poate induce stres oxidativ.

Rolul stresului oxidativ în fiziopatogenia diverselor afecțiuni a fost îndelung studiat. Cercetările asupra bolii Dupuytren sunt însă abia la început de drum. Există un număr limitat de studii dedicate acestui subiect în literatură. Primele studii efectuate comparativ la un lot prezentând contractură Dupuytren și la un lot de control au sugerat implicarea producției de radicali liberi în etiopatogenia bolii Dupuytren [7]. Concluziile studiului s-au bazat pe detecția unor nivele crescute de hipoxantină și xantinoxidază la pacienți, raportat la nivelele martorilor, sugerând implicarea căii hipoxantină-xantinoxidază în formarea de radicali liberi. Blocarea acestei căi patogenetice poate explica răspunsul pozitiv la tratamentul cu allopurinol, observat în BD. Alte publicații arată efecte similare, indicând implicarea radicalilor superoxid în patogeneza BD, prin efectele pe care acestea le exercită asupra fibroblaștilor [8]. În timpul

ischemiei, molecula de adenosin-trifosfat (ATP) este convertită în hipoxantină și xantină. Xantindehidrogenaza endotelială se transformă în xantinoxigenază, proces favorizat în prezența alcoolului, explicând corelația dintre boala Dupuytren și consumul de alcool. Xantinoxidaza catalizează oxidarea hipoxantinei în xantină și acid uric, cu eliberarea de radicali liberi superoxid și hidroxil. Nivelul hipoxantinei, detectat de un alt studiu [9], a fost de șase ori mai ridicat la pacienți decât la martori. Experimentele in vitro au confirmat efectele proliferative ale radicalilor liberi asupra fibroblaștilor. De asemenea, aceleași experimente au confirmat capacitatea fibroblaștilor de a elibera cantități proprii de radicali liberi de oxigen [9].

Un alt studiu sugerează că radicalii liberi ai oxigenului, eliberați de la nivelul microvascularizației pe care apar îngustări de lumen, dar și de la nivelul fibroblaștilor în sine, joacă un rol important în stimularea proliferării fibroblastice. Secundar modificărilor de densitate ce apar în structurile fibroblastice, în cadrul bolii pot fi detectate modificări de collagen și **glucozaminoglicani** [10]. Noi mediatori la nivel celular au fost raportați în literatură ca fiind implicați în patogeneza bolii Dupuytren. Mutații genice unice au fost descrise recent [11].

Astfel, într-un studiu recent, 90% dintre pacienții cu BD au prezentat o mutație în zona mitocondrială 16s rRNA, demonstrând posibilă implicare a mutației în patogeneza BD [12]. Studii proteomice de ultimă oră [13] au demonstrat implicarea unor variate procese moleculare în progresia BD, semnalizarea intra și extra-celulară, stresul oxidativ, modificările scheletale, alterările metabolismului celular. În mod particular, reglarea autocrină prin intermediul receptorilor ERBB-2 și IGF-1R, precum și calea de semnalizare Akt, au fost pentru prima dată identificate ca elemente de semnalizare pro-supraviețuire în fibroblaștii specifici bolii Dupuytren și, de aceea, pot constitui noi ținte terapeutice pentru tratamentul acestei patologii [13].

Rezultatele obținute în cadrul studiului de față sunt concordante cu literatura. Nivelele mai ridicate ale malondialdehidei, scăderea donorilor de hidrogen, scăderea nivelului de ceruloplasmină sunt indicatori ai prezenței stresului oxidativ în lotul prezentând BD. Rezultatele noastre arată nivele mult ridicate ale capacității antioxidante la pacienții care prezintă diabet zaharat, comparativ cu pacienții neprezentând această patologie. Aceste rezultate corespund atât cu observațiile clinice proprii, cât și cu cele publicate în literatură [14], conform cărora nivelul de severitate al contracturii la pacienții cu DZ este mult scăzut.

Concluzii

Contractura Dupuytren, atât ca boală de sine stătătoare, cât și ca manifestare secundară diabetului zaharat, se asociază cu modificarea echilibrului oxidativ la nivel urinar, salivar și agresiunea oxidativă. Diabetul zaharat, prin mecanisme proprii, intervine în atenuarea injuriei oxidative specifice contracturii Dupuytren.

Referințe

1. Rayan GM. Dupuytren disease: anatomy, pathology, presentation, and treatment. *The Journal of Bone and Joint Surgery (American)*, 2007; 89(1): 189-198.
2. Weinstein AL, Haddock NT, Sharma S. Dupuytren's Disease in the Hispanic Population: A 10-Year Retrospective Review. *Plast Reconstr Surg*, 2011; 128(6):1251.
3. Mikkelsen OA. Dupuytren's disease - the influence of occupation and previous hand injuries. *Hand*, 1978; 10(1):1-8.
4. Brenner P, Krause-Bergmann A, Van V. Dupuytren contracture in North Germany. Epidemiological study of 500 cases. *Unfallchirurg*, 2001; 104(4): 303.
5. Conti M, Morand P, Levillain P, et al. Improved fluorometric determination of malonaldehyde. *Clin Chem*, 1991; 37(7):1273.
6. Livshyts' VI, Katsalap OM. A method for determining the oxidase activity of ceruloplasmin after electrophoresis with sodium dodecylsulfate. *Ukr Biokhim Zh*, 1995; 67(1):88-91.
7. Murrell G, Francis M, Bromley L. Free radicals and Dupuytren's contracture. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1987; 295(6610): 1373-1375.
8. Yi IS, Johnson G, Moneim MS. Etiology of Dupuytren's disease. *Hand Clin*, 1999; 15(1):43.
9. Murrell G. An insight into Dupuytren's contracture. *Ann R Coll Surg Engl*, 1992; 74(3):156.
10. II. Scientific comment basic science of Dupuytren's disease. *Annales de Chirurgie de la Main et du Membre Supérieur*, Elsevier, 1992.
11. Hurst LC, Badalamante M. Dupuytren's contracture. *Plastic surgery. Indications, operations and outcomes*, 1989; 4:2057-2071.
12. Bayat A, Walter J, Lambe H, et al. Identification of a novel mitochondrial mutation in Dupuytren's disease using multiplex DHPLC. *Plast Reconstr Surg*, 2005; 115(1): 134.
13. Kraljevic Pavelic S, Sedic M, et al. An integrated proteomics approach for studying the molecular pathogenesis of Dupuytren's disease. *J Pathol*, 2009; 217(4): 524-533.
14. Brown E, Genoway KA. Impact of Diabetes on Outcomes in Hand Surgery. *J Hand Surg*, 2011; 36(12): 2067-2072.