

ROLUL UNOR ENZIME OXIDATIVE ȘI ANTI-OXIDATIVE ÎN EXPRESIA SINDROMULUI DUREROS ÎN FIBROMIALGIE

Daniela Cepoi-Bulgac – aist. univ.,
Liliana Groppa – prof. univ., dr. hab. șt. med., șef,
Elena Deseatnicova – conf. univ., dr. șt. med.,
Ala Pascari-Negrescu – conf. univ., dr. șt. med.,
IP USMF „Nicolae Testemițanu”, Disciplina de reumatologie și nefrologie
079638895, daniela.cepoi@gmail.com

Rezumat

În pofida unui număr semnificativ de cercetări, desfășurate în domeniul fibromialgiei, multe întrebări rămân a fi deschise. Scopul acestei lucrări a fost cercetarea unei posibile corelații dintre unii indicatori ai sistemului pro- și anti-oxidant și Indexul Punctelor Tender la pacienții cu fibromialgie la 30 pacienți cu diagnosticul de fibromialgie. Deși la mulți din pacienții cu fibromialgie au fost constatate dereglări ale sistemelor pro- și antioxidante (în multe cercetări), nu s-a reușit depistarea unor legături pentru majoritatea indicatorilor cercetați, cu excepția oxidului nitric, care cel mai constant s-a modificat în corespundere cu valorile Indexului Punctelor Tender. Deși rezultatele au permis evidențierea unei legături dintre nivelul seric ale oxidului nitric și valorile mai înalte ale Indexului Punctelor Tender, legătura constatată poate fi considerată puțin specifică și trebuie supusă unei analize mai profunde.

Cuvinte-cheie: fibromialgia, Indicele Punctelor Tender, sisteme antioxidante, oxid nitric

Summary. Role of some oxidative and anti-oxidative enzymes in the expression of pain syndrome in fibromyalgia

Despite significant effort done in the research of fibromyalgia, it remains an obscure entity. The purpose of this study was correlation of some indices of oxidant and antioxidant systems with Tender Point Index (TPI) in 30 patients with established fibromyalgia and duration over 12 months, based on 2010 ACR Diagnostic criteria. Although the results displayed a negative correlation (the higher the value of TPI, the lower the value of nitric oxide), the established correlation is quite unspecific and further analysis should be performed.

Key words: fibromyalgia, Tender Point Index, antioxidant systems, nitric oxide

Резюме. Значение некоторых оксидантных и антиоксидантных ферментов при фибромиалгии

Несмотря на обширные исследования, проведенные в области фибромиалгии, многие вопросы остаются открытыми. Целью данной работы было исследование значимости некоторых показателей про- и анти-оксидантных систем при фибромиалгии и изучение возможных корреляций между проанализированными показателями и Индексом Тендерных Точек (Tender Point Index) у 30 больных с диагнозом фибромиалгии, на основании классификационных критериев Американского Колледжа Ревматологов. Хотя результаты выявили взаимосвязь между оксидом азота и более высокими значениями Индекса Тендерных Точек, выявленная связь достаточно неспецифична и подлежит более глубокому анализу. Возможно, другие методы обследования больных фибромиалгией следует использовать при исследовании значимости нарушений про- и анти-оксидантных систем при фибромиалгии.

Ключевые слова: фибромиалгии, Индекс Тендерных Точек, анти-оксидантные системы, оксид азота

Introducere. Fibromialgia este un sindrom frecvent musculoscheletal de etiologie necunoscută, ce se caracterizează prin durere cronică, răspîndită și

persistentă, sensibilitate la palpare, și simptome suplimentare, cum ar fi tulburările somnului, redoarea, oboseala, cefaleea, intoleranța la rece, și stres psiho-

logic. Acest sindrom este mai frecvent observat la femei și se pare că are un impact negativ asupra calității vieții. Sindromul de fibromialgie are o prevalență ce poate varia de la 0,66 până la 10,5% în populația adultă. În general 75% din cei diagnosticați cu FM sunt femei.

Asupra etiologiei FM s-au făcut dezbateri de peste mai mult de un secol. Este puțin probabil că FM este cauzată de un singur factor. Substratul genetic, anomaliile musculare, anomaliile sistem nervos autonom și central, anomaliile psihologice, și dereglările somnului au fost investigate în calitate de factori cauzali¹. Studii recente au demonstrat o asociere dintre FM și stresul oxidativ².

Scopul. Scopul acestei lucrări a fost cercetarea relevanței unor indicatori ai sistemului pro- și anti-oxidant la pacienții cu fibromialgie și studierea posibilelor corelații dintre indicatorii analizați și Indexul Punctelor Tender (Tender Point Index), care reprezintă un sistem de calcul cumulativ care include nu doar numărul punctelor tender, ci și intensitatea durerii în fiecare din aceste puncte.

Material și metode

Studiul a inclus 30 pacienți cu diagnosticul de fibromialgie, în baza criteriilor de clasificare propuse de Colegiul American al Reumatologilor 1990. Grupul a inclus doar pacienți de sex feminin cu vârsta medie 45.75 (± 11.11) ani. Durata maladiei a fost cuprinsă între 1-20 ani cu vârsta medie 9 (± 5.9) ani. Ca și criterii de excludere au fost hipo- sau hipertiroidismul, orice modificări biochimice semnificative de laborator (teste hepatice, CFK, LDH, fosfataza alcalină).

Pacienții au fost examinați conform unui plan exhaustiv, inclusiv unii indicatori ai activității pro- și antioxidante, în particular: lipoperoxizii precoci, intermediari și tardivi (un/l), malondialdehida serică ($\mu\text{mol/l}$), activitatea antioxidantă totală (mmol/l), activitatea pro-oxidantă totală serică ($\mu\text{mol/l}$), superoxid-dismutaza (un/l), catalaza serică ($\mu\text{mol/l}$) și azotul nitric seric ($\mu\text{mol/l}$). Pentru obiectivizarea acuzelor musculoscheletale ale pacienților cu fibromialgie, în particular sindromul dureros la presiunea punctelor specifice tender, a fost utilizat Indexul Punctelor Tender. Pentru a stabili semnificația acestor indicatori cu pacienții cu fibromialgie, s-a efectuat analiza corelațională.

- Aprecierea statutului pro- și antioxidant:

Peroxidarea lipidelor

Principiul metodei de apreciere a produșilor peroxidării lipidelor în material biologic se bazează pe determinarea în una și aceeași probă a mai multor produși de transformare a hidroperoxidizilor lipidici: timpurii (primari – dienele conjugate), intermediari

(secundari – cetodiene, triene conjugate, dialdehida malonică) și tardivi (finali – bazele Schiff)³. Se realizează înregistrarea separată în fazele hexanică și în faza propanolică. Se măsoară densitatea optică a ambelor faze la spectrofotometru la 220, 232, 278 și 400 nm.

Rezultatele se exprimă în unități convenționale relative:

1. Conținutul relativ de diene conjugate = $\text{DO}_{232}/\text{DO}_{220}$

2. Conținutul relativ de triene conjugate și cetodiene = $\text{DO}_{278}/\text{DO}_{220}$

3. Conținutul relativ de baze Schiff = $\text{DO}_{400}/\text{DO}_{220}$

Dozarea dialdehidei malonice

- Se bazează pe determinarea spectrofotometrică a complexului trimetinic format în rezultatul interacțiunii dialdehidei malonice (DAM) cu acidul tiobarbituric, care este un complex colorat, intensitatea cărui este direct proporțională cu concentrația DAM în proba cercetată. Se măsoară absorbția fazei organice superioare la 535 nm la spectrofotometru⁴. Calculul se efectuează după formula DAM ($\mu\text{mol/gprot}$) = $(A_{\text{pr}} \times 10^6 \times 3 \text{ ml}) / (1,56 \times 10^5 \times 0,15 \text{ ml} \times \chi) = A_{\text{pr}} \times 182,2$, unde A_{pr} este absorbția probei, 3 ml – volumul fazei organice, 0,15 ml – volumul materialului biologic, χ – concentrația de proteine, g/l, $1,56 \times 10^5 \text{ mol} \times \text{cm}^{-1}$ – coeficientul molar de absorbție al DAM.

Dozarea oxidului nitric în materialul biologic

La baza metodologiei este dozarea vitezei de producere a oxidului nitric care se bazează pe determinarea produsului final de metabolizare a oxidului – nitriților în materiale biologice⁵. Materialul biologic se deproteinizează, se reduce nitratii în nitriți, supernatantul obținut se prelucrează cu reactivul Griss. Conținutul de nitriți în bioprobă se determină prin DO pe baza curbei de etalonare, construită în baza diluțiilor succesive ale soluției standard de nitrit de sodiu.

Dozarea activității superoxid dismutazei

Principiul metodei constă în inhibiția reducerii sării de tetrazolium nitroblue (NBT) în sistemul ce conține fenazinmetasulfat și NADH sub acțiunea SOD⁶. În urma reducerii NBT se formează nitroformazan cu colorație albastră, intensitatea căreia este proporțională cantității de NBT redus. Activitatea enzimei corelează cu gradul de inhibiție a acestui proces. Ea se exprimă în unități convenționale, o unitate fiind echivalentă cu cantitatea de enzimă necesară pentru inhibiția cu 50% a reacției de reducere a NBT, raportate la 1 ml de ser.

Determinarea activității catalazei

Activitatea catalazei se estimează în baza proprietății enzimei de a cataliza reacția de scindare a moleculei de H_2O_2 în H_2O și O_2 ⁷. Peroxidul de hidrogen formează cu molibdatul de amoniu un compus de

culoare galbenă. Pe măsura descompunerii H_2O_2 are loc decolorarea amestecului. Activitatea fermentului corelează cu gradul decolorării într-o anumită perioadă de timp, care poate fi determinat spectrofotometric la 410 nm. Calcularea se efectuează utilizând curba de calibrare și se exprimă în micromol/s $\times$ l.

- Aprecierea sindromului dureros

Indicele Punctelor Tender

Indicele punctelor tender constituie suma punctelor obținute prin palparea a 18 puncte tender recomandate de Colegiul American de Reumatologie pentru clasificarea fibromialgiei. Punctele recomandate sunt palpate cu o forță de 4 kg/cm² (tab. 1).

Tabelul 1

Punctele Tender conform recomandărilor ACR 1990

	D	S
1. Occiput – în locul de inserție a mușchiiului suboccipital		
2. Cervical inferior – pe suprafețele anterioare ale apofizelor transversale C5-C7		
3. Trapez – la jumătatea marginii superioare a m. trapez		
4. Supraspinat – la origine, superior de spina scapulei lângă marginea medială		
5. Coasta II – superior lateral de joncțiunea II costo-condrală		
6. Epicondilul lateral (2) - 2 cm distal de epicondili		
7. Gluteal (2) – în cadrul superior lateral al feselor în flexura anterioară a mușchiului		
8. Marele trohanter (2) - posterior de prominența trohanterică		
9. Genunchi (2) – în țesutul celulo-adipos medial proximal de linia articulară		

Pacienții sunt rugați să gradeze durerea cu un scor de la 0 până la 4, acumulând un punctaj de la 0 până la 72 de puncte, punctajul mai înalt indicând o maladie mai severă, vezi tab. 2.

Tabelul 2

Scara severității durerii percepute în Punctele Tender

Intensitate	Interpretare
0	absența durerii
1	durere raportată cu indiferență sau reacție fizică
2	durere raportată asociată cu un răspuns fizic obiectivabil (de ex., contracție, retracție)
3	durere raportată cu insistență și răspuns fizic exagerat sau dramatic (de ex., contracție, retracție, junghi)
4	zonă intangibilă; durerea este anticipată atât de mult încât pacientul evită palparea așteptată

Rezultate

Datele examinării parametrilor statutului pro- și anti-oxidant au fost corelate cu valorile obținute în urma examinării punctelor tender. Rezultatele corelării sunt prezentate în fig. 1 și 2.

Deși la mulți din pacienții cu fibromialgie au fost constatate dereglări ale sistemelor pro- și antioxidante, nu s-a reușit depistarea unor legături pentru majoritatea indicatorilor cercetați, cu excepția oxidului nitric, care cel mai constant s-a modificat în corespundere cu valorile Indexului Punctelor Tender. Corelația depistată a avut un caracter negativ (o valoare mai mare a Indexului Punctelor Tender corespundea unui nivel mai scăzut de oxid nitric), dar a fost o corelație cu putere moderată (-0.47, $p < 0.05$).

Discuții

Speciile reactive de oxigen sunt specii chimice extrem de reactive cu un electron impar formate prin catalizarea metalelor de tranziție cum ar fi fierul, cuprul sau manganul⁸. Speciile reactive de oxigen sunt formate în cadrul proceselor oxidative care se desfășoară în mod normale la nivele relativ joase în toate celulele și țesuturile. În circumstanțe normale, concentrațiile speciilor reactive de oxigen sunt ținute sub control strict prin activitatea unui sistem complex defensiv inclusiv enzimelor și speciile non-enzimatice. Pe de altă parte, dozele mari și/sau eliminarea inadecvată a speciilor reactive de oxigen se soldează cu stres oxidativ, care poate cauza defecțiuni severe metabolice și leziunea macromoleculelor biologice⁹. Ultimii ani, un număr mare de studii au investigat rolul posibil al stresului oxidativ în etiopatogeneza diverselor maladii reumatologice, inclusiv artrita reumatoidă, spondilita anchilozantă și sindromul de oboseală cronică^{10,11}.

Oxidul nitric joacă un rol important în multe procese biochimice, cum ar fi reglarea dilatării vaselor sangvine și răspunsul imun, precum și funcții cum ar fi cele ale neurotransmițătorilor¹². Metaboliții reactivi ai oxigenului pot participa în câteva reacții care pot potențial fi dăunătoare sistemelor biologice. Recent, a fost demonstrat că enzima NOS reglează nivelele speciilor de oxigen reactiv într-o varietate de celule¹³. Experiențele pe animale au sugerat că oxidul nitric este un transmițător important în căile dureroase ale măduvei spinării și că sensibilizarea acestor căi poate fi cauzată de sau cel puțin asociată cu activarea NOS și generarea de oxid nitric. Oxidul nitric se pare că joacă un rol important în stările de durere cronică cu inducerea ciclooxigenazei-2 (COX-2) ca cea din sensibilizarea centrală¹⁴. Citokinele, care induc activitatea enzimei iNOS, de asemenea induc izoforma inductibilă a COX, și anume COX-2. Cele două căi interacționează strâns¹⁵. Din moment ce fenomenul

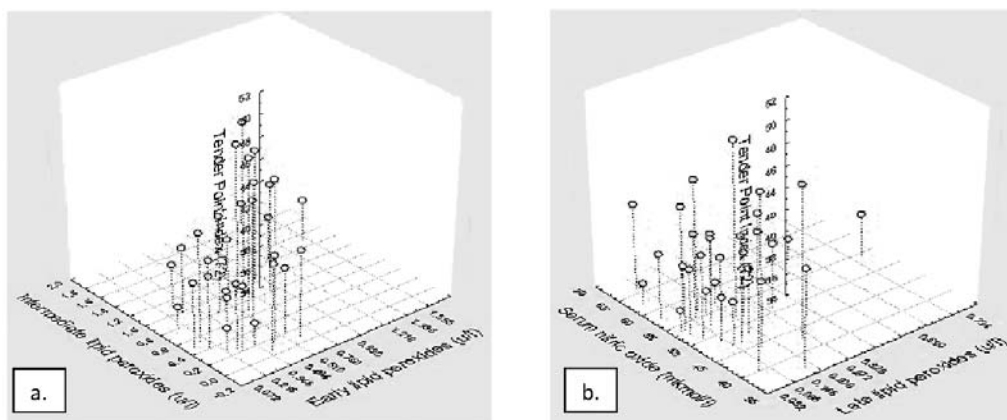


Fig. 1. Corelarea Indicelui Punctelor Tender cu producții timpurii și intermediari ai peroxidării lipidelor (a) și producții tardivi ai peroxidării lipidelor și oxidul nitric (b)

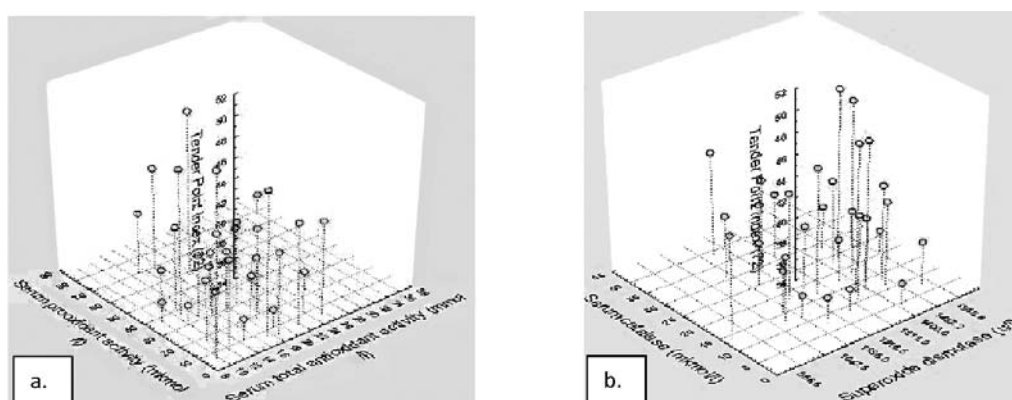


Fig. 2. Corelarea Indicelui Punctelor Tender cu activitate pro- și anti-oxidantă totală (a) și catalaza serică și superoxid dismutaza (b)

sensibilizării centrale poate juca un rol esențial în clinica durerii din cadrul sindromului de FM și receptorii N-metil-D-aspartat (NMDA) sunt implicați în producerea oxidului nitric, nu este surprinzător că anume acest parametru a avut cea mai semnificativă corelație.

Concluzii. Deși rezultatele au permis evidențierea unei legături dintre nivelul seric ale oxidului nitric și valorile mai înalte ale Indexului Punctelor Tender, legătura constatată poate fi considerată puțin specifică și trebuie supusă unei analize mai profunde. Probabil, alte metode de examinare a pacienților cu fibromialgie trebuie utilizate în studierea relevanței dereglărilor sistemelor pro- și antioxidante în caz de fibromialgie.

Bibliografie

1. Bennett RM. *Fibromyalgia*. In: Wall PD, Melzack R, eds. *Textbook of Pain*. London: Harcourt Publishers Ltd; 1999:579–601.; Goldenberg DL. *Fibromyalgia and related syndromes*. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smoen JS, Weinblatt ME, weisman MH, eds. *Rheumatology*. Philadelphia, PA: Elsevier Ltd; 2003:701–12.
2. Cordero MD. *Oxidative stress in fibromyalgia: pathophysiology and clinical implications*. *Reumatol Clin* 2011; 7: 281–283.

3. Tagadiuc Olga, Gudumac Valentin. *Procedeu de determinare a indicilor peroxidării lipidelor în materialul biologic*.//Certificat de inovator nr. 4764 din 25.09.2009.

4. Gudumac Valentin, Tagadiuc Olga, Nastas Ion. *Procedeu de dozare a dialdihidei malonice*.// Certificat de inovator nr. 4366 din 15.11.2005.

5. Gudumac Valentin. *Procedeu de izolare a metabolitului oxidului nitric în materialul biologic*.// Certificat de inovator nr.4047 din 24.11.2003.

6. Tagadiuc Olga, Gudumac Valentin, Pantea Valeriana. *Procedeu de dozare a activității superoxidismutazei*.// Certificat de inovator nr. 4891 din 15.07.2010.

7. Baci Elena, Nastas Ion. *Procedeu de determinare a activității catalazei*.// Certificat de inovator nr. 3122 din 08.11.1996.

8. Halliwell B, Gutteridge JM. (eds) (1996) *Free radicals, ageing, and disease*. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford, UK, pp 417–506.

9. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J (2007) *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44–84

10. Vecchiet J, Capillone F, Falasca K, Mezzetti A, Pizzigallo E, Bucciarelli T, De Laurentis S, Affaitati G, De Cesare D, Giamberardino MA (2004) *Relationship between musculoskeletal symptoms and blood markers of*

oxidative stres in patients with chronic fatigue syndrome. Neurosci Lett 335:151–154.

11. Eisinger J, Gndolfo C, Zakarian H, Ayavou T (1997) *Reactive oxygen species, antioxidant status and fibromyalgia.* J Musculoskelet Pain 5(4):5–15.

12. Dogruer ZN, Unal M, Eskandari G, et al. *Malondialdehyde and antioxidant enzymes in children with obstructive adenotonsillar hypertrophy.* Clin Biochem 2004;37:718–21.

13. Cepinskas G, Rui T, Kvietys PR. *Interaction between reactive oxygen metabolites and nitric oxide in oxidant tolerance.* Free Radical Biol Med 2002;33:433–40.

14. Ashina M, Bendtsen L, Jensen R, et al. *Possible mechanisms of action of nitric oxide synthase inhibitors in chronic tension-type headache.* Brain 1999;122:1629–35.

15. Sandrini G, Tassorelli C, Cecchini AP, Alfonsi E, Nappi G. *Effects of nimesulide on nitric oxide-induced hyperalgesia in humans—A neurophysiological study.* Eur J Pharmacol. 2002;450:259–62.