

INVESTIGAREA HOMEOSTAZIEI TIOL-DISULFURI ÎN BOLI DERMATOLOGICE – METODĂ DE ANALIZĂ, SEMNIFICAȚIA CLINICĂ

INVESTIGATION OF THIOL-DISULFIDE HOMEOSTASIS IN DERMATOLOGICAL DISEASES – METHOD OF ANALYSIS, CLINICAL SIGNIFICANCE

Ilinca Nicolae*, Mircea Tampa***, Mădălina Mitran**, Cristina Mitran**, Maria Grigore*,
Lucreția Dulgheru*, Simona Roxana Georgescu**

Rezumat

Reactivitatea mare a grupărilor tiolice face ca acești compuși să fie primii antioxidanți consumați în caz de stres oxidativ. În ultimii ani se pune un mare accent pe explorarea mecanismului de acțiune a sistemului redox tiol-disulfuri în sânge. Investigarea homeostaziei tiol-disulfuri (TDH) a devenit posibilă prin automatizarea metodei spectrofotometrice de determinare cantitativă a tiolului total, tiolului nativ, disulfurilor, raporturilor tiol nativ/tiol total, disulfuri/tiol nativ, disulfuri/tiol total. Determinarea TDH în sânge ar putea fi relevantă în evaluarea gradului de stres oxidativ. Interesul autorilor a fost focalizat pe examinarea cantitativă a TDH la populația sănătoasă și a modificărilor înregistrate în homeostazia tiol-disulfuri la pacienți cu unele afecțiuni dermatologice (lichen plan, veruci cutanate, urticarie cronică).

Bolile dermatologice sunt adesea caracterizate prin stres oxidativ, condiție în care există un dezechilibru între producția și inactivarea speciilor reactive de oxigen. Generarea în exces a speciilor reactive de oxigen, scăderea activității sistemelor antioxidante sau ambele mecanisme pot fi implicate în perturbarea TDH.

Cuvinte cheie: homeostazia tiol-disulfuri, stres oxidativ, boli dermatologice.

Abstract

The high reactivity of thiol groups makes these compounds the first antioxidants consumed in case of oxidative stress. In recent years, there is a great emphasis on exploring the mechanism of action of the redox system for thiol-disulfide homeostasis in the blood. Investigation of thiol-disulfide homeostasis (TDH) became possible by automating the spectrophotometric method of quantitative determination of total thiol, native thiol, disulfides, native thiol/total thiol ratio, disulfides/native thiol ratio, disulfides/total thiol ratio. Determination of TDH in the blood could be relevant in assessing the degree of oxidative stress. The author's interest focused on the quantitative examination of TDH in healthy population and of changes in thiol-disulfide homeostasis in patients with some dermatological disorders (lichen planus, skin warts, chronic urticaria).

Dermatological diseases are often characterized by oxidative stress, a condition in which there is an imbalance between the production and inactivation of reactive oxygen species. Excessive generation of reactive oxygen species, decreased activity of antioxidant systems, or both mechanisms may be involved in disrupting TDH.

Keywords: thiol-disulfide homeostasis, oxidative stress, dermatological diseases.

Intrat în redacție: 24.07.2019

Acceptat: 29.08.2019

Received: 24.07.2019

Accepted: 29.08.2019

* Spitalul Clinic de Boli Infecțioase și Tropicale „Dr. Victor Babeș”, București
„Dr. Victor Babeș” Clinical Hospital of Infectious and Tropical Diseases, Bucharest, Romania

** Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila”, București
„Carol Davila” University of Medicine and Pharmacy, Bucharest, Romania

Introducere

Radicalii liberi sunt intermediari toxici și instabili, care apar în urma unor procese metabolice normale sau ca urmare a unor factori nocivi. Razele solare UV, poluarea, fumatul și factorii de stres duc la apariția radicalilor liberi în piele. Rata de formare a radicalilor liberi este redusă în timpul metabolismului aerobic fiziologic, dar crește odată cu scăderea apărării antioxidante. Organismul uman are capacitatea de a elimina radicalii liberi sau de a repara prejudiciile produse de aceștia printr-un sistem de apărare prompt și eficient (1–13). În ultimul timp se pune un mare accent pe explorarea mecanismului de acțiune a sistemului redox tiol-disulfuri în organismul viu (9–12). Tiolii plasmatici sunt constituiți din tioli proteici (proteine, în special, albumina) și tioli nonproteici (cisteina, homocisteina, glutatiunea, gama-glutamyl-cisteina, cisteinil-glicina). Cisteina este partea activă a moleculei care permite interacțiunea cu o varietate de sisteme biochimice. Tiolii reprezintă 52,9% din capacitatea totală antioxidantă a serului. Tiolii sunt primii antioxidanți consumați în caz de stres oxidativ (1,11,12).

Dovezile acumulate în ultimii ani au arătat că sistemul tiol-disulfuri poate fi evaluat ca răspuns adaptativ în condiții de inflamație cronică și stres oxidativ. Tiolii sunt compuși nucleofili și susceptibili la atacuri electrophile, care funcționează ca un sistem de captare a radicalilor liberi și speciilor reactiv oxidante. Stimulii electrophili polarizează legătura –SH, scad constanta de disociere și cresc vulnerabilitatea la modificări oxidative (1,3,11,12). Compușii electrophili predispuși să reacționeze cu tiolii sunt (3):

- specii reactive de oxigen (ROS), care conduc la formarea punților disulfurice intra- și intermoleculare;
- specii reactive de azot (RNS), care declanșează reacții de nitrare și nitrozilare a tiolului;
- specii carbonil reactive (RCS), care stimulează formarea aductelor (figura 1).

Multă vreme s-a considerat că legăturile disulfurice sunt inerte din punct de vedere funcțional. Descoperiri recente au demonstrat că unele disulfuri pot fi clivate în condiții de stres oxidativ, conducând la modificarea activității redox. Echilibrul tiol-disulfuri este strict controlat, printr-o

Introduction

Free radicals are toxic and unstable intermediates, which occur as a result of normal metabolic processes or as a result of harmful factors. UV rays, pollution, smoking, and stress factors lead to the emergence of free radicals in the skin. The rate of free radical formation is reduced during physiological aerobic metabolism but increases with the decrease of antioxidant defence. The human body has the ability to eliminate free radicals or repair the damage caused by them by a prompt and efficient defence system (1-13). Lately, there is a great emphasis on exploring the mechanism of action of the thiol-disulfide redox system in the living organism (9-12). Plasma thiols are made up of protein thiols (proteins, in particular albumin) and nonprotein thiols (cysteine, homocysteine, glutathione, gamma-glutamyl-cysteine, cysteinyl-glycine). Cysteine is the active part of the molecule that allows interaction with a variety of biochemical systems. Thiols represent 52.9% of the total antioxidant capacity of serum. Thiols are the first antioxidants consumed in oxidative stress (1.11.12).

Evidence from recent years has shown that the thiol-disulfide system can be evaluated as an adaptive response in conditions of chronic inflammation and oxidative stress. Thiols are nucleophilic compounds and are susceptible to electrophilic attacks, which function as a system for capturing free radicals and reactive oxygen species. Electrophilic stimuli polarize the –SH bond, decrease the dissociation constant and increase the vulnerability to oxidative modifications (1.3.11.12). Electrophilic compounds predisposed to react with thiols are (3):

- reactive oxygen species (ROS), which lead to the formation of intra- and intermolecular disulfide bridges;
- reactive nitrogen species (RNS), which trigger thiol nitration and nitrosylation reactions;
- reactive carbonyl species (RCS), which stimulate the formation of adducts (figure 1).

It has long been considered that disulfide bonds are functionally inert. Recent findings have shown that some disulfides can be cleaved under oxidative stress, leading to a change in redox activity. The thiol-disulfide balance is strictly controlled, through a variety of mechanisms, in

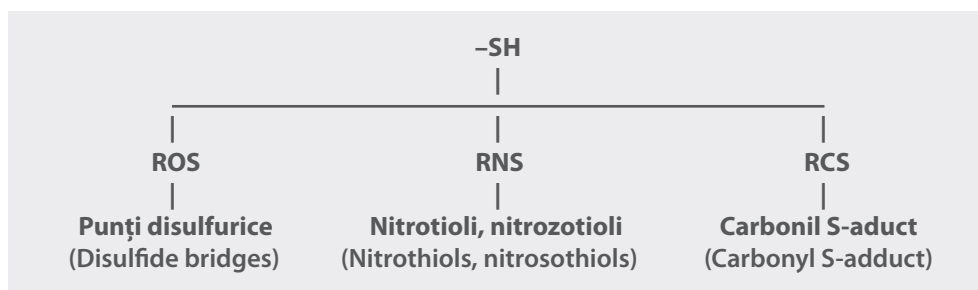


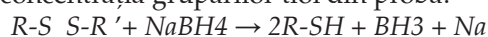
Figura 1. Reactivitatea grupărilor $-SH$ ($-SH$ = grupări tiol, ROS = specii reactive de oxigen, RNS = specii reactive de azot, RCS = specii carbonil reactive).

Figure 1. Reactivity of $-SH$ groups ($-SH$ = thiol groups, ROS = reactive oxygen species, RNS = reactive nitrogen species, RCS = reactive carbonyl species).

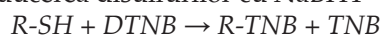
varietate de mecanisme, într-o manieră specifică locației. Reglarea redox extracelulară este guvernată de o multitudine de procese moleculare(3,12). Dinamica concentrațiilor extracelulare de tioli și disulfuri a fost investigată în ultimii ani grație metodei de analiză descrisă recent (11). Până în momentul de față există un număr limitat de lucrări axate pe cercetarea homeostaziei tiol-disulfuri (TDH) în patologia umană. În țara noastră nu au fost publicate informații legate de această temă. În studiul curent, interesul autorilor a fost focalizat pe examinarea cantitativă a TDH la populația sănătoasă și a modificărilor înregistrate în homeostazia tiol-disulfuri la pacienți cu unele afecțiuni dermatologice.

Partea experimentală

Test spectrofotometric pentru determinarea concomitentă a tiolului și disulfurilor. Metoda de determinare cantitativă a fost dezvoltată recent (Erel și Neselioglu 2014). În această metodă, legăturile disulfurice dinamice și reductibile din probe au fost transformate în grupări tiol funcționale libere prin utilizarea borohidruului de sodiu. Excesul de borohidru de sodiu a fost îndepărtat cu formaldehidă. Grupările tiol libere formează cu acidul 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoic un complex colorat. Absorbanta 2-nitro-5-tiobenzoatului la 412 nm este direct proporțională cu concentrația grupărilor tiol din probă.



Reducerea disulfurilor cu $NaBH_4$

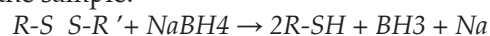


Reacția DTNB cu grupări tiol

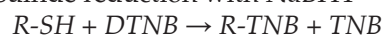
a location-specific manner. Extracellular redox regulation is governed by a multitude of molecular processes (3,12). The dynamics of extracellular concentrations of thiols and disulfides has been investigated in recent years thanks to the recently described method of analysis (11). To date, there are a limited number of papers focused on the research of thiol-disulfide homeostasis (TDH) in human pathology. In our country, no information has been published on this topic. In the current study, the authors' interest focuses on the quantitative examination of TDH in healthy population and changes in thiol-disulfide homeostasis in patients with dermatological disorders.

Experimental part

Spectrophotometric test for the concomitant determination of thiol and disulfides. The quantitative determination method was recently developed (Erel and Neselioglu 2014). In this method, the dynamic and reducible disulfide bonds in the samples were transformed into free functional thiol groups using sodium borohydride. Excess sodium borohydride was removed with formaldehyde. The free thiol groups form with 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid a coloured complex. The absorbance of 2-nitro-5-thiobenzoate at 412 nm is directly proportional to the concentration of thiol groups in the sample.



Disulfide reduction with $NaBH_4$



DTNB reaction with thiol groups

Reactivi necesari:

- reactiv de culoare: acidul 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoic (DTNB) 10 mM;
- borohidrua de sodiu (NaBH₄) 10 mM, Ph 8,2;
- formaldehida 10 mM, pH 8,2;
- standard: acid 2-nitro-5-tiobenzoic (TNB), 10 mM.

Metoda poate fi automată (HumaStar 300, GmbH, Austria) sau semiautomată (BS 3000M).

Metoda permite determinarea cantitativă a următorilor parametri:

1. Tiol nativ (-SH), determinat spectrofotometric, exprimat în $\mu\text{mol/L}$ ser;
2. Tiol total (-SH+-S-S-), determinat spectrofotometric, exprimat în $\mu\text{mol/L}$ ser;
3. Disulfuri (-S-S), determinat spectrofotometric, reprezentând jumătate din diferența obținută prin scăderea cantității de tiol nativ din conținutul total de tiol, exprimate în $\mu\text{mol/L}$ ser;
4. Raportul (-S-S*100/-SH), determinat prin calcul, exprimat ca raport procentual;
5. Raportul (-S-S*100/-SH+-S-S-), determinat prin calcul, exprimat ca raport procentual;
6. Raportul (-SH*100/-SH+-S-S-), determinat prin calcul, exprimat ca raport procentual.

Probele de sânge au fost recoltate dimineața. Centrifugarea probelor de sânge va fi efectuată la 3.000 g, timp de 10 minute, în maxim 30 minute pentru plasmă și în decurs de 1 oră pentru ser. După 1 oră de menținere a probei de sânge integral la temperatura camerei nivelul homocisteinei crește cu aproximativ 10% (fiind sintetizată de către eritrocite). Serurile au fost separate și stocate la minus 80 °C până când au fost utilizate pentru analiză. Au fost eliminate probele hemolizate, icterice, lactescente, contaminate microbiologic.

Stabilirea unui interval de referință pentru TDH.

Pentru a evita anumiți factori de interferență, formularea intervalului de referință pentru TDH este greu de estimat, deoarece la ora actuală nu există studii epidemiologice sau metaanalize referitoare la această temă. De mare utilitate în practica clinică ar putea fi valoarea prag pentru un status TDH adecvat, stabilit pe eșantioane de populație din aceeași zonă

Necessary reagents:

- colour reagent: 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) 10 mM;
- sodium borohydride (NaBH₄) 10 mM, Ph 8.2;
- formaldehyde 10 mM, pH 8.2;
- 2-nitro-5-thiobenzoic acid (TNB), 10 mM.

The method can be automatic (HumaStar 300, GmbH, Austria) or semi-automatic (BS 3000M).

The method allows quantitative determination of the following parameters:

1. Native thiol (-SH), determined spectrophotometrically, expressed in $\mu\text{mol/L}$ serum;
2. Total thiol (-SH+-S-S-), determined spectrophotometrically, expressed in $\mu\text{mol/L}$ serum;
3. Disulfides (-S-S), determined spectrophotometrically, accounting for half of the difference obtained by subtracting the amount of native thiol from the total thiol content, expressed in $\mu\text{mol/L}$ serum;
4. The ratio (-S-S*100/-SH), determined by calculation, expressed as a percentage ratio;
5. The ratio (-S-S*100/-SH+-S-S-), determined by calculation, expressed as a percentage ratio;
6. The ratio (-SH*100/-SH+-S-S-), determined by calculation, expressed as a percentage ratio.

Blood samples were collected in the morning. Centrifugation of blood samples will be performed at 3.000 g for 10 minutes, within maximum 30 minutes for plasma and within 1 hour for serum. After 1 hour of keeping the whole blood sample at room temperature, the homocysteine level increases by about 10% (being synthesized by erythrocytes). Serums were separated and stored at minus 80 °C until used for analysis. The microbiologically contaminated haemolysed, jaundiced, lactescent samples were removed.

Establishing a reference range for TDH

In order to avoid certain interference factors, the formulation of the reference interval for TDH is difficult to estimate, because at present there are no epidemiological studies or meta-analyses on this topic. Of great use in clinical practice could be the threshold value for an appropriate TDH status, established on population samples from the same geographical area.

geografică. Preocupați de această problemă, noi am examinat TDH la 60 persoane adulte, fără patologie cunoscută, fără tratament medicamentos, cu status nutrițional adecvat, din aceeași arie geografică.

Rezultatele obținute, în condițiile noastre experimentale, au arătat că:

- valori ale tiolului total mai mari de 400 $\mu\text{mol/L}$ ser ar putea reprezenta un status redox optim pentru desfășurarea proceselor fiziologice în organism;
- valori mai mici de 375 $\mu\text{mol/L}$ ser pentru tiolul nativ ar putea fi considerate ca indicator de insuficiență relativă a mecanismelor antioxidante extracelulare ;
- valori serice mai mari de 22 $\mu\text{mol/L}$ pentru disulfuri ar putea fi asociate cu o reducere a potențialului antioxidant al serului;
- valori ale raportului procentual tiol nativ/ tiol total mai mari de 90 și mai mici de 4 ale raporturilor disulfuri/tiol nativ, respectiv, disulfuri/tiol total ar putea evidenția o activitate antioxidantă promptă și eficientă a serului.

Noi am analizat TDH în urticaria cronică spontană (Congres UMF 2019), în lichen plan și infecția cu HPV (rezultate nepublicate). Perturbarea metabolismului tiolic consolidează constatările noastre anterioare, conform cărora stresul oxidativ joacă rol central în patogeneza lichenului plan (5,7,13), verucilor (14), urticariei (4,8).

Semnificația clinică a TDH în boli cutanate

Tiolul nativ, tiolul total, raportul tiol nativ/ tiol total definesc potențialul antioxidant al serului, iar disulfurile, raportul disulfuri/tiol nativ, raportul disulfuri/tiol total definesc statusul prooxidant. Reducerea nivelurilor tiolului nativ (-SH) și tiolului total (-SH + -S-S-) arată că acești compuși au fost consumați datorită stresului oxidativ prezent într-un anumit context patologic. Reducerea raportului (-S-S-/-SH+-S-S-) poate sugera că mecanismele antioxidante au fost eficiente, adică activitatea antioxidantă protectivă a fost crescută în acea fază a bolii (1,2,3,9,10,11,12). Creșterea nivelurilor de tiol nativ și tiol total și scăderea nivelului disulfurilor sunt asociate cu boli proliferative, în timp ce nivelurile mai scăzute de tioli și nivelurile disulfidice mai mari

Concerned about this problem, we examined TDH in 60 adult people, without known pathology, without drug treatment, with adequate nutritional status, from the same geographical area.

The results showed that:

- total thiol values greater than 400 $\mu\text{mol/L}$ serum could represent an optimal redox status for physiological processes in the body;
- values lower than 375 $\mu\text{mol/L}$ serum for native thiol could be considered as an indicator of relative insufficiency of extracellular antioxidant mechanisms;
- serum values greater than 22 $\mu\text{mol/L}$ for disulfides could be associated with a reduction in the antioxidant potential of the serum;
- values of the native thiol/total thiol ratio greater than 90 and less than 4 of the disulfide/native thiol ratio and disulfides/total thiol ratio respectively could reveal a prompt and efficient antioxidant activity of the serum.

We have analysed TDH in chronic spontaneous urticaria (UMF Congress 2019), in lichen planus and HPV infection (unpublished results). Disruption of thiol metabolism reinforces our previous findings that oxidative stress plays a central role in the pathogenesis of lichen planus (5.7.13), warts (14), urticaria (4.8).

Clinical significance of TDH in skin diseases

Native thiol, total thiol, native thiol/total thiol ratio define the antioxidant potential of the serum, and disulfides, disulfide/native thiol ratio, disulfide/total thiol ratio define the prooxidant status. The reduction of the levels of native thiol (-SH) and total thiol (-SH + -S-S-) shows that these compounds were consumed due to the oxidative stress present in a certain pathological context. The reduction of the ratio (-S-S-/-SH+-S-S-) may suggest that the antioxidant mechanisms were effective, that is, the protective antioxidant activity was increased in that phase of the disease (1.2.3.9.10.11.12). Increased levels of native thiol and total thiol and decreased levels of disulfides are associated with proliferative diseases, while lower levels of thiols and higher disulfide levels are associated with

sunt asociate cu boli degenerative (12).

Este important de remarcat faptul că modificarea TDH spre statusul oxidat afectează apărarea antioxidantă, apoptoza, proliferarea, detoxifiere, transcripție, reglarea activităților enzimatică, semnalizarea (1–3,9,12) Astfel, TDH joacă un rol cheie în patogeneza multor boli, care includ cancerul, infecțiile, inflamația.

După cum s-a arătat mai sus, menținerea unor niveluri adecvate de tioli oxidabili, turnover-ul și starea de oxidare sunt importante pentru desfășurarea normală a funcțiilor celulare, iar modificări în aceste procese determină apariția diverselor patologii. Alterarea TDH se manifestă printr-o susceptibilitate crescută la stres oxidativ, iar prejudiciul rezultat este considerat a fi un pas cheie în debutul și progresia mai multor boli cutanate (telogen effluvium, vitiligo, rozacea, psoriasis, lichen plan, alopecia areata, carcinom bazocelular, leziuni cutanate determinate de agenți fotobiologici, chimici, alergeni, infecții fungice ale pielii, dermatita atopică, urticaria acută și urticaria cronică, tulburări de pigmentare a pielii, acne vulgaris) (1-3,9-12). În schimb, niveluri ridicate de tioli, creșterea capacității antioxidante și rezistența la stresul oxidativ se observă în multe tipuri de celule tumorale (12).

Concluzii

Determinarea TDH în sânge ar putea fi relevantă, pe de o parte, în evaluarea gradului de stres oxidativ, iar, pe de altă parte, în utilizarea de strategii terapeutice care vizează statusul prooxidanți/antioxidanți, cu scopul de a întârzia debutul sau de a împiedică progresia bolilor dermatologice asociate cu stres oxidativ.

Bibliografie/Bibliography

1. Baek J, Min-Geol Lee. Oxidative stress and antioxidant strategies in dermatology, Redox Report, 2016; 21(4) 164–169.
2. Pektas S, Alatas ET, Dogan G et al. A marker for evaluation of oxidative stress in patients with alopecia areata. Thiol-disulphite homeostasis. Meandros Med. Dent. J. 2018; 19: 205-10.
3. Yi CM, Khosla C. Thiol-disulfide exchange reactions in the mammalian extracellular environment, ARCB, 2016; 7: 197–222.
4. Dinu LU, Ene CD, Nicolae IL, Tampa M, Matei CL and Georgescu SR: The serum levels of 8-hydroxy-deoxyguanosine under the chemicals influence. Rev Chim 2014; 65: 1319-26.
5. Nicolae I, Mitran CI, Mitran MI, Ene CD, Tampa M and Georgescu SR: Ascorbic acid deficiency in patients with lichen planus. J Immunoassay Immunochem 2014; 38: 430–437.
6. Kalkan G, Seçkin HY, Duygu F, Akbaş A, Ozyurt H, Sahin M: Oxidative stress status in patients with acute urticaria. Cutan Ocul Toxicol 2014; 33: 109-14.26.

degenerative diseases (12).

It is important to note that modification of TDH to oxidized status affects antioxidant defence, apoptosis, proliferation, detoxification, transcription, regulation of enzymatic activities, signalling (1–3.9.12). Thus, TDH plays a key role in the pathogenesis of many diseases, which include cancer, infections, inflammation.

As shown above, the maintenance of adequate levels of oxidizable thiols, the turnover and the oxidation status are important for the normal unfolding of cellular functions, and changes in these processes determine the occurrence of various pathologies. TDH alteration is manifested by an increased susceptibility to oxidative stress, and the resulting injury is considered to be a key step in the onset and progression of several skin diseases (telogen effluvium, vitiligo, rosacea, psoriasis, lichen planus, alopecia areata, basal cell carcinoma, skin lesions caused by photobiological agents, chemicals, allergens, fungal infections of the skin, atopic dermatitis, acute urticaria and chronic urticaria, skin pigmentation disorders, acne vulgaris) (1-3,9-12). In contrast, high levels of thiols, increase of antioxidant capacity and resistance to oxidative stress are observed in many types of tumour cells (12).

Conclusions

Determination of TDH in the blood could be relevant, on the one hand, in the assessment of the degree of oxidative stress, and, on the other, in the use of therapeutic strategies aimed at the prooxidant/antioxidant status, in order to delay its onset or prevent the progression of dermatological diseases associated with oxidative stress.

7. Mitran MI, Nicolae I, Ene CD, Mitran CI, Matei C, Ene C, Tampa M and Georgescu SR: Relationship between gamma-glutamyl transpeptidase activity and inflammatory response in lichen planus. *Rev Chim* 2018; 69: 739–743.
8. Nicolae I, Ene CD, Georgescu SR, Tampa M, Matei C and Ceausu E. Effects of UV Radiation and Oxidative DNA Adduct 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine on the Skin Diseases. *Rev Chim* 2014; 65: 1036–1041.
9. Akbas A, Kilinc F, Sener S, et al. Investigation of thiol-disulphide balance in patients with acute urticaria and chronic spontaneous urticaria. *Cutan Ocul Toxicol.* 2017; 36: 205-10.
10. Demirseren DD, Cicek C, Alisik M, et al. Dynamic thiol/disulphide homeostasis in patients with basal cell carcinoma. *Cutan Ocul Toxicol.* 2017; 36: 278–82.
11. Erel O, Neselioglu S. A novel and automated assay for thiol/disulphide homeostasis. *Clin Biochem.* 2014; 47: 326–32.
12. Dirican N, Dirican A, Sen O et al. Thiol/disulfide homeostasis: A prognostic biomarker for patients with advanced non-small cell lung cancer?, *Redox Report*, 2016; 21(5): 197–203
13. Georgescu SR, Ene CD, Nicolae IL, Mitran MI, Musetescu AL, Matei CL, Rusu LC and Tampa M: Reflectometric analysis for identification of various pathological conditions associated with lichen planus. *Rev Chim*, 2017; 68: 1103-11087.
14. Nicolae I, Tampa M, Mitran C, Ene CD, Mitran M, Matei C, Muşetescu A, Pişuru S, Pop CS, Georgescu SR, Gamma-glutamyl transpeptidase alteration as biomarker of oxidative stress in patients with human papillomavirus lesions following topical treatment with sinecatechins. *Farmacia*, 2017; 65(4): 617–623.

Conflict de interese
NEDECLARAT

Conflict of interests
NONE DECLARED

Adresa de corespondență: Dr Mircea Tampa
dermatology.mt@gmail.com

Correspondance address: Dr Mircea Tampa
dermatology.mt@gmail.com

