

---

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

# Factorii fiziopatologici și opțiunile terapeutice în acneea vulgară

---

Doctorand **Andrei Coneac**

---

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Adriana Mureșan**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	15
1. Generalități privind acneea vulgară și aspectul clinic	17
1.1. Generalități	17
1.2. Aspectul clinic în acneea vulgară	17
2. Etiologie și patogeneză	21
2.1. Glandele Sebacee și Sebumul	22
2.2. Hormonii	24
2.3. Keratinizarea foliculară anormală	25
2.4. Reactivitatea foliculară	25
2.5. Microorganismele	25
2.6. Inflamația	26
2.7. Alți factori	26
3. Diagnosticul pacienților cu acnee și a sindroamelor asociate	29
3.1. Diagnosticul acneei vulgare	29
3.2. Evaluarea pacienților	29
3.3. Sindroame asociate acneei	30
3.4. Efectul psihologic al bolii	34
4. Tratamentul acneei vulgare	37
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	43
1. Ipoteza de lucru/Obiective	45
2. Metodologie generală	47
3. Studiul 1. Explorarea stresului oxidativ la nivel seric și tisular într-un model de inflamație acută indusă pe model animal	49
3.1. Introducere	49
3.2. Ipoteză de lucru/Obiective	50
3.3. Material și metodă	51
3.4. Rezultate	55
3.5. Discuții	61
3.6. Concluzii	65
4. Studiul 2. Monitorizarea prin HPLC a concentrației de Curcumin într-un plan de prevenție și unul terapeutic, aplicate pe model de inflamație la șobolan	67
4.1. Introducere	67
4.2. Ipoteză de lucru/Obiective	68
4.3. Material și metodă	68
4.4. Rezultate	71
4.5. Discuții	76
4.6. Concluzii	78
5. Studiul 3. Terapia antiandrogenică cu ciproteron acetat la pacientele care suferă de alopecie androgenetică și acnee vulgară	79
5.1. Introducere	79
5.2. Ipoteză de lucru/Obiective	80
5.3. Material și metodă	81
5.4. Rezultate	82
5.5. Discuții	88
5.6. Concluzii	92

6.	Studiul 4. Evaluarea modificărilor hormonale ale balanței androgeni/hormoni feminini în diferitele tipuri de acnee vulgară	93
6.1.	Introducere	93
6.2.	Ipoteză de lucru/Obiective	93
6.3.	Material și metodă	94
6.4.	Rezultate	95
6.5.	Discuții	100
6.6.	Concluzii	103
7.	Studiul 5. Corelația între gradul de severitate a bolii și vârsta pacienților în acnee	105
7.1.	Introducere	105
7.2.	Ipoteză de lucru/Obiective	105
7.3.	Material și metodă	106
7.4.	Rezultate	107
7.5.	Discuții	109
7.6.	Concluzii	112
8.	Concluzii generale	113
9.	Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	115
	REFERINȚE	117

**CUVINTE CHEIE:** Acnee vulgară, stres oxidativ, capacitate antioxidantă, HPLC, Curcumin, factori fiziopatologici, opțiuni terapeutice, terapie antiandrogenică, severitatea bolii, tulburări hormonale

## **INTRODUCERE:**

Acneea vulgară este o afecțiune dermatologică frecventă, o boală inflamatorie cronică polimorfă a foliculilor pilosebacei care poate implica probleme de ordin estetic, social sau psihologic.

În acest context, alegerea unei teme de interes social general ni s-a părut firească, cu atât mai mult cu cât în societățile dezvoltate, acneea vulgară este o boală dermatologică prezentă aproape universal. Ea reprezintă cauza principală a vizitelor la dermatolog pentru pacienții între 14-45 de ani din SUA și a opta afecțiune ca frecvență din lume.

În lucrarea de față ne-am propus să nu ne oprim doar asupra unui mecanism fiziopatologic din acneea vulgară. Fenomenul inflamator fiind la baza etiopatogenei acneei, s-a încercat diminuarea sau anihilarea acestuia cu preparate chimice sau naturale. Datorită proprietăților pe care le deține (preparat natural cu potențial anti-inflamator, antioxidant, anti-invaziv și antiangiogenic) am testat Curcuminul într-un model de inflamație acută în primul studiu experimental efectuat pe șobolani Wistar. Rezultatele promițătoare obținute în determinarea nivelului de stres oxidativ sistemic, respectiv tisular și a capacității totale antioxidante, corelate cu informațiile limitate pe care le-am găsit despre biodisponibilitatea Curcuminului după administrare orală ne-au încurajat să continuăm cercetarea în această direcție. În cadrul tezei am valorificat ideea de interdisciplinaritate în cercetarea experimentală prin monitorizarea cu HPLC a concentrației de Curcumin într-un plan de prevenție și unul terapeutic (în al doilea studiu experimental).

Cele 3 studii clinice, fiecare cu individualitate proprie, se îmbină într-un tot unitar explorând acneea vulgară prin: analiza caracteristicilor clinice și epidemiologice, respectiv testarea corelației între gradul de severitate al bolii și vârsta pacientelor. Bazându-ne pe faptul că determinările hormonale nu se efectuează în mod curent în practica clinică, iar un nivel crescut de androgeni (testosteron) cauzează lărgirea glandelor foliculare și hipersecreție de sebum, am efectuat dozări hormonale la pacientele cu acnee vulgară în scopul evaluării modificărilor hormonale ale balanței androgeni/ hormoni feminini. Următorul pas după analiza componentei hormonale din etiopatogeneza acneei a fost testarea unei variante de terapie. Ne-am axat pe determinarea eficacității terapiei antiandrogenice la pacientele cu acnee vulgară și alopecie androgenetică.

Teza, credem noi, reușește să atingă obiectivele propuse și să răspundă la întrebările formulate sub formă de ipoteze, aducând mai multe elemente de noutate.

Rezultatele obținute în studiile originale (1-5) au făcut obiectul a două lucrări științifice ISI în Revista "Studia Chemia UBB" 2015 și 2016 (F=0,25) și a trei lucrări B+ în jurnalul „Clujul Medical” 2014 și 2015, respectiv “Indian Journal of Applied Research (IJAR)” 2015. Diseminarea rezultatelor obținute s-a realizat prin două prezentări Poster susținute în cadrul Congresului National de Fiziopatologie cu Participare Internațională (Martie 2015, Iași) și în cadrul Academiei Americane de Dermatologie (August 2015, New York).

## **ORIGINALITATE ȘI CONTRIBUȚII INOVATIVE ALE TEZEI:**

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei constau în: elaborarea unei metode specifice și performante de cromatografie pe lichid (HPLC) pentru determinarea Curcuminului în plasma provenită de la șobolani Wistar; a unui protocol original de recoltare a probelor de sânge la intervale specifice de timp (15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 minute); a evaluării comparative (prin parametrii stresului oxidativ, a capacității antioxidante, a aspectului histopatologic și al cromatogramelor) a administrării profilactice și terapeutice de Curcumin. Aspectul original al studiilor clinice se bazează pe explorarea modificărilor hormonale ale balanței androgeni/hormoni feminini și stabilirea corelațiilor între acestea și tipul de acnee (juvenilă, matură), respectiv forma de acnee de care suferă pacienta (ușoară, moderată, severă). Un alt aspect original al investigației clinice îl reprezintă aplicarea unei terapii hormonale la paciente cu dublă patologie: acnee vulgară și alopecie androgenetică.

## **CONTRIBUȚIE PERSONALĂ**

Teza cuprinde două cercetări experimentale in vivo pe model animal (șobolani Wistar, studiile 1 și 2) și trei cercetări clinice pe subiecți umani (paciente cu acnee vulgară, studiile 3, 4 și 5). Studiile experimentale au fost realizate în cadrul unui program de cercetare finanțat de către Universitatea de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, printr-un grant intern: 1491/14/28.01.2014.

## **STUDIUL 1) Explorarea stresului oxidativ la nivel seric și tisular într-un model de inflamație acută indusă pe model animal**

### **OBIECTIV GENERAL:**

Scopul studiului nostru a constat în evaluarea nivelului de stres oxidativ sistemic și tisular (măsurat prin MDA și PC) și a capacității antioxidante (prin testarea ABTS) după administrarea de Curcumin la șobolani (150 mg/kg corp,

suspensie orală) într-un model experimental de inflamație acută indusă prin administrarea de ulei de Terebentină (i.m. 0.6 mg/kg corp).

O administrare profilactică (administrare inițială de Curcumin, apoi la o oră inducerea inflamației acute) a fost comparată cu una terapeutică (inducerea inflamației acute, urmată de administrarea de Curcumin la 2 ore). Modificările tisulare locale (din mușchi, rinichi, ficat) au fost evaluate prin analiza histopatologică.

#### **IPOTEZE:**

Parametrii stresului oxidativ ar putea înregistra diferențe semnificative, depinzând de momentul recoltării (intervalele de timp 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 minute) și lotul experimental de la care se face recoltarea (lotul I-III).

Capacitatea antioxidantă a tratamentului cu Curcumin ar putea înregistra diferențe semnificative, depinzând de locul recoltării (ser, mușchi, ficat sau rinichi) și lotul experimental de la care se face recoltarea (lotul I-III).

#### **MATERIAL ȘI METODĂ:**

Experimentele au fost realizate pe 16 șobolani, masculi adulți, rasa Wistar Bratislava. 150 mg de Curcumin a fost dizolvat în carboximetil celuloză (CMC) 0.5% și apoi administrat sub formă de suspensie orală (150 mg Curcumin/kg). Prin injectarea de Terebentină 0.6 ml/kg, i.m. în coapsa posterioară s-a realizat modelul experimental al inflamației sub formă de miozită. Animalele au fost împărțite aleatoriu în patru grupuri (trei grupuri experimentale și un lot martor), fiecare grup conținând un număr de patru șobolani Wistar, de la care s-a recoltat atât ser cât și mușchi și organe interne (ficat, rinichi).

#### **Protocol terapeutic:**

Primul grup a primit suspensie de Curcumin prin gavaj în doză de 0.5 ml/ animal (150 mg Curcumin/ kg), iar probele de sânge au fost prelevate la 15, 30, 60, 90, 120, 150, respectiv 180 min. Al doilea grup (plan profilactic) a primit suspensie de Curcumin prin gavaj iar după o oră s-a administrat i.m. Terebentină pentru inducerea inflamației, iar imediat după această procedură s-a recoltat sânge la intervalele menționate anterior. Al treilea Grup (plan terapeutic) a primit Terebentină i.m. și după 2 ore s-a administrat prin gavaj Curcumin, iar imediat după s-a recoltat sânge după același protocol de studiu.

#### **Metode de evaluare:**

- determinarea stresului oxidativ prin dozarea MDA (malondialdehida) și PC (proteine carbonilate) din ser, mușchii și organele interne (ficat, rinichi) ale animalelor de experiență;
- evaluarea capacității antioxidante a Curcuminului din serul, mușchii și organele interne (ficat, rinichi) ale animalelor de experiență, pe baza testului cu ABTS;
- evaluarea histopatologică a probelor de țesut recoltate.

#### **REZULTATE:**

Rezultatele obținute în urma explorării stresului oxidativ (prin MDA și PC) și a capacității antioxidante totale serice și tisulare ale Curcuminului (măsurate prin testul ABTS) au infirmat ipotezele conform cărora parametrii ar putea avea valori diferite, depinzând de momentul recoltării (intervalele de timp 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 minute).

Efectele biochimice ale inflamației în grupurile II și III au constat în peroxidare intensă, cu creșterea markerilor de stres oxidativ și scăderea capacității totale în ser și țesut (rinichi și mușchi). Doar valorile medii ale MDA seric au fost semnificativ crescute în loturile în care inflamația acută era prezentă (Grupurile II și III) față de lotul tratat doar cu Curcumin (Grup I), nu și cele ale PC seric.

Observațiile noastre atrag atenția asupra faptului că proveniența țesutului (din mușchi, ficat sau rinichi) influențează semnificativ nivelul stresului oxidativ (măsurat prin determinarea MDA tisular). Acesta a înregistrat cea mai ridicată valoare în mușchii coapsei posterioare și nu în organele interne.

Tratamentul preventiv cu Curcumin (efectuat în Grupul II) a avut cea mai scăzută valoare antioxidantă (ABTS seric, hepatic și muscular), comparativ cu planul terapeutic aplicat în Grupul III.

Biopsiile prelevate din coapsa posterioară stângă, parenchimul hepatic și renal de la animalele din grupurile de studiu au prezentat caracteristici morfologice normale.

Rezultatele obținute în studiul nostru subliniază abilitatea Curcuminului ca agent profilactic și terapeutic ce protejează împotriva stresului oxidativ și exercită efect antioxidant în urma administrării orale a dozei de 150 mg/kg corp pe un model de inflamație acută.

## **STUDIUL 2) Monitorizarea prin HPLC a concentrației de Curcumin într-un plan de prevenție și unul terapeutic, aplicate pe model de inflamație la șobolan**

#### **OBIECTIV GENERAL:**

Monitorizarea nivelului de Curcumin din plasma șobolanului prin HPLC cu detecție UV după administrarea orală de Curcumin pentru reducerea inflamației în intervale specifice de timp 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 minute. Scopul a fost evaluarea curbei obținute de lotul de Curcumin comparativ cu alte tipuri de administrare a Curcuminului:

profilactic (administrare de Curcumin urmată de inducerea inflamației) și terapeutic (inducerea inflamației urmată de administrare de Curcumin).

#### **IPOTEZE:**

1. Scurgerea timpului ar putea influența concentrația de Curcumin în cadrul loturilor de studiu.
2. Tipul de administrare aplicat (profilactic sau terapeutic) ar putea exercita un efect asupra concentrației de Curcumin.

#### **MATERIAL ȘI METODĂ:**

Modelul animal și designul experimental (inducerea inflamației acute, tipul de tratament aplicat fiecărui grup și preparatul administrat) au fost descrise și în studiul 1. Experimentele au fost realizate pe 8 șobolani, masculi adulți, rasa Wistar Bratislava, împărțiți aleatoriu în patru grupuri (trei grupuri experimentale și un lot martor).

Sângele (aprox. 1 ml) a fost recoltat într-o eprubetă EDTA din plexul retro-orbital al șobolanului la 15, 30, 60, 90, 120, 150, respectiv 180 min post-administrare de suspensie de Curcumin. Imediat după recoltare, tubul a fost agitat ușor pentru a asigura mixarea cu soluția de EDTA. Probele au fost lăsate la temperatura camerei pentru mai mult de jumătate de oră, apoi centrifugate la 4500 rpm, timp de 10 minute. După centrifugare, stratul superior organic a fost aspirat cu o pipetă de unică folosință și plasat într-un recipient Eppendorf, rezultând o cantitate de 0.5 ml de plasmă (care includea 3 tipuri de proteine: albumine, globuline și fibrinogen). La fiecare probă de 200 μl de plasmă s-au adăugat 800 μl de metanol și s-a agitat ușor pentru câteva minute pentru a favoriza precipitarea proteinelor.

Analizele au fost efectuate cu un aparat HPLC Jasco Chromatograph (Japonia) echipat cu un detector de UV/VIS. Sistemul a fost controlat, iar datele experimentale au fost analizate cu ajutorul unui software ChromPass. Separarea a fost efectuată pe o coloană Lichrosorb RP-C18 (25 x 0.46 cm) la o temperatură de 30 °C. Faza mobilă a constat într-o mixtură de metanol și acid formic 0.1% (90:10, v/v). Rata de flux a fost de 1.2 ml/ min și lungimea de detecție UV de 425 nm. Faza mobilă și probele biologice au fost filtrate înainte de injectare prin filtre cu membrană de 0.45 μm.

Soluțiile standard (0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 μg/ml) au fost pregătite prin inserarea a 100 μl din soluție (1, 2, 5, 10 și 20 μg/ml) în 100 μl de plasmă simplă și 800 μL de metanol. Aceste soluții standard au fost folosite pentru a construi curbele de calibrare pentru cuantificarea Curcuminului în concentrațiile de plasmă provenită de la șobolan, care se înscriu în intervalul 100-2000 ng/ml.

Metode de evaluare:

- confirmarea statusului inflamator;
- determinarea concentrației de Curcumin prin HPLC din probele recoltate la intervale prestabilite.

#### **REZULTATE:**

Evaluarea la nivel muscular (la sfârșitul experimentului) a aspectelor caracteristice inflamației acute confirmă statusului inflamator (miozită) în grupurile la care s-a administrat Terebentină (Grup II și III).

Rezultatele HPLC au evidențiat o scădere dependentă de timp a concentrației de Curcumin, în toate loturile de studiu, validând astfel ipoteza noastră inițială de cercetare, conform căreia scurgerea timpului influențează concentrația de Curcumin din loturile de studiu.

În studiul nostru, analiza multivariată a celor trei determinări HPLC pentru fiecare interval de timp a confirmat faptul că în contextul inflamației acute, tipul administrării de Curcumin (profilactic sau terapeutic) influențează semnificativ evoluția concentrației Curcuminului, validând cea de-a doua ipoteză de cercetare. O scădere a nivelului de Curcumin a fost observată când procesul inflamator era prezent în organismul animalului de experiență, ca rezultat al modificării metabolismului pentru combaterea inflamației.

### **STUDIUL 3) Terapia antiandrogenică cu ciproteron acetat la pacientele care suferă de alopecie androgenetică și acnee vulgară**

#### **OBIECTIV GENERAL:**

Obiectivul studiului nostru a fost să analizeze eficacitatea tratamentului cu Melleva la pacientele cu acnee vulgară moderată sau severă, suferind și de Alopecie Androgenetică.

#### **IPOTEZE:**

Studiul a fost inițiat pornind de la ipoteza că pacienții tineri (cu vârsta cuprinsă între 15-20 ani) ar putea prezenta rezultate mai bune decât pacienții la care acnea și alopecia s-au instalat la vârstă matură.

#### **MATERIAL ȘI METODĂ:**

Studiul clinic a inclus 35 de paciente diagnosticate cu Alopecie Androgenetică (AGA) gradul I-II pe Scala lui Ludwig, pe baza istoricului medical detaliat și a examenului obiectiv (aspectul scalpului, modelul de pierdere a părului, aspectul dermatoscopic la examinarea tricoscopică), acestea prezentând și acnee vulgară moderată sau severă, severitatea egală sau peste 2 (GEA≥2). Pacientele au fost de acord să urmeze, timp de 3 luni consecutiv, tratament cu Melleva 35 (2 mg CPA/0.035mg EE) o tabletă pe zi, din prima zi a ciclului până în ziua 21 a fiecărei luni.

Metodele de evaluare aplicate pentru Alopecia Androgenetică au fost evaluarea clinică și tricoscopia (evaluarea non-invazivă a scalpului și rădăcinilor firului de păr prin utilizarea unui dispozitiv manual numit dermatoscop), în timp ce pentru acneea vulgară s-a folosit evaluarea globală a acneei (Scala GEA) și a cicatricilor (ECCA-versiunea simplificată).

#### **REZULTATE:**

Terapia cu Melleva a acționat mai bine asupra leziunilor în acneea vulgară prin reducerea numărului de leziuni acneice inflamatorii (pustule și papule), decât asupra cicatricilor. 40% dintre subiecții studiului au înregistrat o ameliorare bună, iar 20% au înregistrat rezultate excelente cu Melleva 35.

Mai mult de jumătate din subiecții studiului (54%) au raportat oprirea parțială a căderii părului, iar o treime dintre pacienți (29%) oprirea totală a căderii părului după 3 luni de terapie antiandrogenică. Recreșterea părului în 77% dintre cazuri a fost observată de către medic.

Acceptarea tratamentului a fost foarte bună, 86% dintre pacienți au fost complianți la terapia administrată în studiu iar mai mult de o treime din numărul total de subiecți (34%) au atins un nivel crescut de satisfacție după tratament, în timp ce 37% au raportat o satisfacție moderată.

Nu a existat o corelație între vârsta subiecților și eficacitatea tratamentului hormonal, ipoteza experimentală a fost respinsă: pacienții tineri (cu vârsta cuprinsă între 15-20 ani) nu au prezentat rezultate mai bune decât pacienții la care acneea și alopecia s-au instalat la vârsta matură.

### **STUDIUL 4) Evaluarea modificărilor hormonale ale balanței androgeni/hormoni feminini în diferitele tipuri de acnee vulgară**

#### **OBIECTIV GENERAL**

Obiectivul studiului nostru a fost evaluarea modificărilor hormonale ale balanței androgeni/hormoni feminini care apar la pacientele cu acnee vulgară.

#### **IPOTEZE**

1. Ar putea exista o corelație între valorile hormonale (modificarea balanței androgeni-estrogeni) și tipul de acnee de care suferă pacienta (juvenilă, matură).

2. Ar putea exista o corelație între valorile hormonale (modificarea balanței androgeni-estrogeni) și forma de acnee de care suferă pacienta (ușoară, moderată, severă).

#### **MATERIAL ȘI METODĂ:**

Studiul clinic s-a desfășurat pe 160 de paciente care au întrunit criteriile de includere: femei cu acnee vulgară cu vârsta între 14-45 ani; care să nu sufere de obezitate sau hirsutism; femei înainte de menopauză; subiecți care nu au luat medicație steroidă și hormonală sau anticoncepționale timp de 6 luni anterior studiului. Designul studiului și detaliile despre subiecți au fost descrise în partea de Metodologie generală. Metodele de evaluare a acneei vulgare au fost:

- Evaluarea globală a acneei (Scala GEA)
- Evaluarea globală a cicatricilor (ECCA-versiunea simplificată)

Studiul a fost desfășurat în colaborare cu Laboratorul Synevo Cluj în vederea recoltării sângelui periferic și a realizării dozărilor hormonale: Estradiol, Progesteron, DHEAS (dehidroepiandrosteron-sulfat), Testosteron liber. Măsurarea valorilor hormonale s-a efectuat à jeun, în ziua 21 (faza luteală a ciclului menstrual) când secreția de estrogen și progesteron atinge un peak. S-a recoltat sânge venos și s-a separat serul prin centrifugare, iar dozarea estradiolului, progesteronului și DHEAS s-a realizat prin metoda imunochimică cu detecție prin electrochemiluminiscentă (ECLIA), iar dozarea testosteronului liber prin metoda ELISA.

#### **REZULTATE:**

Modificarea parametrilor explorării hormonale (Estradiol, Progesteron, DHEAS, Testosteron liber) la mai mult de jumătate din cei 160 de subiecți (65%), sugerează gradul ridicat în care hormonii influențează apariția acneei vulgare.

Pacientele tinere (14-21 ani) par a fi mai susceptibile la modificări hormonale decât pacientele cu acnee matură (72%) fiindcă există o preponderență semnificativă a creșterii individuale a testosteronului, respectiv DHEAS și creșteri mixte a celor doi hormoni în grupul pacientelor cu acnee juvenilă.

La pacientele cu acnee matură am observat modificarea hormonilor feminini: scăderea independentă a progesteronului și a estradiolului sau scăderea concomitentă a celor doi hormoni.

Creșterea valorilor hormonilor androgeni (a testosteronul liber și a DHEAS) a apărut preponderent în formele severe de acnee. Corelația dintre creșterea valorii testosteronului și severitatea acneei a fost semnificativă,  $p=0.001$  ( $p<0.05$ ).

Rezultatele obținute nu au evidențiat existența unei relații de asociere între nivelele hormonilor feminini (estradiol, progesteron) și forma de severitate a bolii.

Balanța androgeni (care cresc în 6.9% din cazuri)/estrogeni (care scad în 8.1% dintre cazuri) este mai dezechilibrată preponderent în tipurile de acnee severă și moderată, creșterea fiind și mai importantă datorită valorilor scăzute ale hormonilor feminini.

## **STUDIUL 5) Corelația între gradul de severitate a bolii și vârsta pacienților în acnee**

### **OBIECTIV GENERAL:**

Obiectivul studiului nostru a fost evaluarea caracteristicilor clinice și epidemiologice care apar la pacientele cu acnee vulgară.

### **IPOTEZE:**

Ar putea exista o corelație între vârsta pacientei (juvenilă sau matură) și forma de acnee de care suferă (în funcție de severitate: ușoară, moderată sau severă)

### **MATERIAL ȘI METODĂ:**

Designul studiului și detaliile despre subiecți au fost descrise în Studiul 4. 170 de subiecți suferind de acnee vulgară au fost împărțiți în 4 grupe: acnee ușoară, moderată, severă sau foarte severă, pe baza sistemului global de gradare a bolii (GAGS).

### **REZULTATE:**

În studiul nostru am testat existența unei corelații între vârstă și gradul de severitate al acneei vulgare la femei, prin compararea cronologică și topografică a modelelor de acnee feminină în diferite grupuri de vârstă. Rezultatele au demonstrat că nu există o corelație între gradul de severitate al acneei și tipul de acnee în funcție de vârsta pacientelor (juvenilă sau matură).

Lipsa corelației între gradul de severitate și vârstă la femeile cu acnee vulgară reîntărește importanța diagnosticului individualizat și a unei abordări terapeutice specifice.

## **CONCLUZII GENERALE:**

### **În ceea ce privește studiile experimentale:**

1.În cadrul modelului de inflamație acută indus prin injecție de Terebentină, studiul nostru subliniază dezechilibrarea balanței oxidanți-antioxidanți.

2.Rezultatele obținute în urma explorării stresului oxidativ (prin MDA și PC) și a capacității antioxidante totale serice și tisulare ale Curcuminului (măsurate prin testul ABTS) au infirmat ipoteza conform căreia parametrii ar putea avea valori diferite, depinzând de momentul recoltării (intervalele de timp 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 minute).

3.Valorile medii ale MDA seric au fost semnificativ crescute în loturile în care inflamația acută era prezentă (Grupurile II și III) față de lotul tratat doar cu Curcumin (Grup I). Valorile medii ale PC seric au urmat aceeași tendință ca și cele MDA, dar diferențele înregistrate nu au fost semnificative statistic față de Grupul I sau Control.

4.Observațiile noastre atrag atenția asupra faptului că proveniența țesutului (din mușchi, ficat sau rinichi) influențează semnificativ nivelul stresului oxidativ (măsurat prin determinarea MDA tisular). Acesta a înregistrat cea mai ridicată valoare în mușchii coapsei posterioare și nu în organele interne.

5.Grupul II (plan Curcumin profilactic) a înregistrat cele mai scăzute valori ABTS în ser, ficat și mușchi comparativ cu Grupul III (plan Curcumin terapeutic).

6.Rezultatele obținute în studiul nostru subliniază abilitatea Curcuminului ca agent profilactic și terapeutic ce protejează împotriva stresului oxidativ și exercită efect antioxidant în urma administrării orale a dozei de 150 mg/kg corp pe un model de inflamație acută.

7.Analiza HPLC a evidențiat o scădere a concentrației de Curcumin, dependentă de timp, în toate loturile de studiu. Scăderea nivelului de Curcumin a fost observată prin HPLC când procesul inflamator era prezent în organismul animalului de experiență, ca rezultat al modificării metabolismului pentru combaterea inflamației.

### **În ceea ce privește studiile clinice:**

1.Terapia antiandrogenică cu Melleva 35, o tabletă pe zi, 3 luni consecutive, determină rezultate clinice bune (oprirea totală a căderii părului la o treime din paciente, recreșterea părului în 77% din cazuri, reducerea leziunilor acneice inflamatorii la 40% dintre subiecți) și satisfacție crescută (85%) la pacientele care suferă de Alopecie Androgenetică și de Acnee Vulgară, conform evaluării realizate de medic și de pacient.

2. Studiul nostru nu a demonstrat existența unei corelații între vârsta subiecților și eficacitatea tratamentului hormonal cu Melleva 35.



3. În contextul procentului ridicat de modificări hormonale (65%) este necesar ca atitudinea terapeutică în acnee să se axeze pe echilibrarea statusului hormonal al pacientei.

4. Există o preponderență semnificativă a creșterii hormonilor androgeni la pacientele tinere (14-21 ani) și o scădere a hormonilor feminini la pacientele mature.

5. Studiul nostru a demonstrat o corelație semnificativă între creșterea valorii testosteronului și severitatea acneei  $p=0.001$  ( $p<0.05$ ). Balanța androgeni/ hormoni feminini este mai dezechilibrată preponderent în tipurile de acnee severă și moderată.

6. Rezultatele au arătat că nu există o corelație între gradul de severitate al acneei și tipul de acnee în funcție de vârsta pacientelor (juvenilă sau matură).

---

SUMMARY OF PhD THESIS

# Physiopathological factors and therapeutic options in acne vulgaris

---

PhD Student: **Andrei Coneac**

---

PhD Scientific Coordinator: **Prof. Dr. Adriana Mureșan**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	15
1. General knowledge regarding acne vulgaris and the clinical appearance	17
1.1. General knowledge	17
1.2. Clinical appearance in acne vulgaris	17
2. Etiology and pathogenesis	21
2.1. Sebaceous glands and sebum	22
2.2. Hormones	24
2.3. Abnormal follicular keratinization	25
2.4. Follicular reactivity	25
2.5. Microorganisms	25
2.6. Inflammation	26
2.7. Other factors	26
3. Diagnosis of acne patients and the associated syndromes	29
3.1. Diagnosis of acne vulgaris	29
3.2. Patient assessment	29
3.3. Acne associated syndromes	30
3.4. Psychological effect of the disease	34
4. Treatment of acne vulgaris	37
PERSONAL CONTRIBUTION	43
1. Working hypothesis/Objectives	45
2. General methodology	47
3. Study 1. Exploration of oxidative stress in serum and tissue in a model of acute inflammation induced in an animal model	49
3.1. Introduction	49
3.2. Working hypothesis /Objectives	50
3.3. Material and method	51
3.4. Results	55
3.5. Discussions	61
3.6. Conclusions	65
4. Study 2. HPLC concentration monitoring of Curcumin in a prevention plan and a therapeutic one, on a rat model of inflammation	67
4.1. Introduction	67
4.2. Working hypothesis /Objectives	68
4.3. Material and method	68
4.4. Results	71
4.5. Discussions	76
4.6. Conclusions	78
5. Study 3. Anti-androgenic therapy with cyproterone acetate in patients suffering from androgenetic alopecia and acne vulgaris	79
5.1. Introduction	79
5.2. Working hypothesis /Objectives	80
5.3. Material and method	81
5.4. Results	82
5.5. Discussions	88
5.6. Conclusions	92

6.	Study 4. Changes assessment in androgens/female hormones balance in different types of acne	93
6.1.	Introduction	93
6.2.	Working hypothesis /Objectives	93
6.3.	Material and method	94
6.4.	Results	95
6.5.	Discussions	100
6.6.	Conclusions	103
7.	Study 5. The correlation between the severity of the disease and the patients age in acne	105
7.1.	Introduction	105
7.2.	Working hypothesis /Objectives	105
7.3.	Material and method	106
7.4.	Results	107
7.5.	Discussions	109
7.6.	Conclusions	112
8.	General conclusions	113
9.	Originality of research and innovative contribution	115
	REFERENCES	117

**KEY WORDS:** Acne vulgaris, oxidative stress, antioxidant capacity, HPLC, Curcumin, physiopathological factors, therapeutic options, antiandrogenic therapy, disease severity, hormonal imbalance.

## **INTRODUCTION**

Acne vulgaris is a common dermatological condition, a chronic, inflammatory and polymorphic disease of pilosebaceous follicles that may involve aesthetic, social or psychological problems.

In this context, choosing a theme of large social interest seems justifiable, especially as in developed societies, acne vulgaris is a dermatological disease almost universally present. It is the leading cause of visits to the dermatologist for patients between 14-45 years in the USA and it is eighth in the world diseases frequency.

In this paper we intended not to stop restrictively on a single pathophysiological mechanism of acne vulgaris. Since the inflammatory phenomenon, lies at the basis of acne etiopathogenesis, attempts have been made to reduce or annihilate inflammation by means of chemical or natural substances. Due to the properties that it owns (natural substance with anti-inflammatory, antioxidant, anti-invasive and antiangiogenic potential), we tested Curcumin in a model of acute inflammation in the first experimental study performed on Wistar rats. The promising results obtained in determining the level of systemic and tissue oxidative stress and of the total antioxidant capacity respectively, correlated with the limited information found about Curcumin bioavailability after oral administration, encouraged us to continue research in this direction. Within the thesis, we put into use the idea of interdisciplinarity in experimental research by monitoring with HPCL the concentration of Curcumin in a prevention plan and a therapeutic one.

The 3 clinical studies, each with its own individuality, merge into a unified whole to explore acne vulgaris by the analysis of clinical and epidemiological characteristics and by testing the correlation between disease severity and age of patients. Based on the fact that hormone determinations are not performed on a regular basis in clinical practice, and an increased level of androgens (testosterone) determines enlargement of follicular glands and hypersecretion of sebum, we performed the hormonal dosage to the patients with acne vulgaris in order to assess the hormonal changes of the androgens/ female hormones balance. The next step after the analysis of the hormonal component in the etiopathogenesis of acne was to test a therapy option. We focused on determining the efficacy of anti-androgenic therapy in patients with acne vulgaris and androgenetic alopecia.

We think the thesis succeeds to reach its objectives and to answer the questions formulated as hypotheses, bringing about several elements of novelty.

The results obtained in the original studies (1-5) have been the subject of two scientific papers in ISI journal "Studia UBB Chemia" 2015 and 2016 (F = 0.25) and three works B + in the journal "Medical Cluj" 2014 and 2015 and "Indian Journal of Applied Research (IJAR)" 2015, respectively. The dissemination of results was achieved by two poster presentations in the National Congress of Pathophysiology with international participation (in March 2015, Iasi) and the American Academy of Dermatology (August 2015, New York).

## **ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE THESIS:**

The originality and innovative contributions of the thesis consist of: elaboration of a specific and high performance method of liquid chromatography (HPLC) for determining Curcumin in plasma derived from Wistar rats; devising an original protocol of blood sampling at specific time intervals (15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 minutes); a comparative evaluation (by parameters of oxidative stress, antioxidant capacity, and histopathological appearance of chromatograms) of the prophylactic and therapeutic administration of Curcumin. The original feature of the clinical trials relies on the exploration of the hormonal changes of the androgens/ female hormones balance and the correlations between the latter and the type of acne (juvenile, mature) or form of acne the patient is suffering from (mild, moderate, severe). Another original aspect of the clinical investigation is the use of hormone therapy in patients with dual pathology: acne and androgenetic alopecia.

## **PERSONAL CONTRIBUTIONS**

The thesis includes two experimental studies in vivo on animal model (Wistar rats, studies 1 and 2) and three clinical trials on human subjects (patients with acne, studies 3, 4 and 5). Experimental studies have been completed under a research program funded by the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca by an internal grant: 1491/14/28.01.2014.

## **STUDY 1) EXPLORATION OF OXIDATIVE STRESS IN SERUM AND TISSUE IN A MODEL OF ACUTE INFLAMMATION INDUCED IN AN ANIMAL MODEL**

### **GENERAL OBJECTIVE:**

The aim of our study was to assess the level of systemic and tissue oxidative stress (measured by MDA and PC) and antioxidant capacity (by testing ABTS) after administration of Curcumin to rats (150 mg/kg oral suspension) in an experimental model of acute inflammation induced by the administration of Turpentine (i.m. 0.6 mg/kg).

A prophylactic administration (initial administration of Curcumin, followed by induction of acute inflammation after one hour) was compared with a therapeutic administration (acute inflammation induction, followed by Curcumin administration after two hours). The local tissue changes (in muscle, kidney, liver) were evaluated by histopathological analysis.

#### **HYPOTHESES:**

The parameters of oxidative stress could register significant differences depending on the time of sampling (time spans of 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 minutes) and the experimental group on which the sampling is performed (Groups I-III).

The antioxidant capacity of Curcumin treatment could register significant differences depending on the site of sampling (serum, muscle, liver or kidney) and the experimental group on which the sampling is performed (Groups I-III).

#### **MATERIAL AND METHOD:**

Experiments were performed on 16 adult male Wistar Bratislava rats. 150 mg of Curcumin was dissolved in carboxymethyl cellulose (CMC) 0.5% and then administered as an oral suspension (150 mg Curcumin/kg). By injecting Turpentine, 0.6 ml/kg i.m. in the posterior thigh we performed an experimental model of inflammation in the form of myositis. The animals were assigned randomly into four groups (three experimental groups and a control group), each group consisting of four Wistar rats, from which serum, muscle and internal organs (liver, kidney) were collected.

##### **Therapeutic protocol:**

The first group received a suspension of Curcumin by gavage at a dose of 0.5 ml/animal (150 mg Curcumin/kg) and blood samples were prelevated at 15, 30, 60, 90, 120, 150, and 180 min. The second group (prophylactic plan) received Curcumin suspension by gavage and after one hour, Turpentine was administered i.m. to induce inflammation. Immediately after this, blood was sampled at the aforementioned intervals. The third group (treatment plan) received Turpentine i.m. and after 2 hours, Curcumin was administered by gavage. Blood was sampled according to the same study protocol.

##### **Assessment methods:**

- Determination of oxidative stress by dosing MDA (malondialdehyde) and PC (protein carbonyls) in serum, muscles and internal organs (liver, kidney) of experimental animals;
- Evaluation of the antioxidant capacity of Curcumin from serum, muscles and internal organs (liver, kidney) of experimental animals, in a test with ABTS;
- Histological evaluation of tissue samples collected.

#### **RESULTS:**

The results obtained from the exploration of oxidative stress (by MDA and PC) and total antioxidant capacity of Curcumin in serum and tissue (measured by the ABTS) have refuted the hypothesis that the parameters may have different values depending on the time of sampling (at 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 minutes).

The biochemical effects of inflammation in Groups II and III consisted of intense peroxidation, with increased oxidative stress markers and decreased total capacity in serum and tissue (kidney and muscle). Only the mean values of serum MDA were significantly increased in groups in which acute inflammation was present (Groups II and III) compared to the group treated only with Curcumin (Group I), and not those of serum PC.

Our observations point out that the origin of tissue (muscle, liver or kidney) influence significantly the level of oxidative stress (measured by determining tissue MDA). The latter has recorded the highest value in the posterior thigh muscles and not in the internal organs.

Preventive treatment with Curcumin (carried out in Group II) had the lowest antioxidant value (ABTS in serum, liver and muscle) as compared to the therapeutic plan applied in Group III.

Biopsies taken from the posterior left thigh, liver and kidney parenchyma from animals in the study groups showed normal morphological characteristics.

The results obtained in our study emphasizes the ability of Curcumin as a prophylactic and therapeutic agent that protects against oxidative stress and exerts antioxidant effects after oral dose of 150 mg/kg in a model of acute inflammation.

### **STUDY 2) HPLC concentration monitoring of Curcumin in a prevention plan and a therapeutic one, on a rat model of inflammation**

#### **GENERAL OBJECTIVE:**

Monitoring the rat plasma levels of Curcumin by HPLC with UV detection following oral administration of Curcumin to reduce inflammation in specific time intervals 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 minutes. The aim was to evaluate the curve obtained from the group of Curcumin compared with other types of Curcumin administration:

prophylactic (Curcumin administration followed by induction of inflammation) and treatment (induction of inflammation followed by administration of Curcumin).

**HYPOTHESES:**

1. The length of time could influence the concentration of Curcumin in the study groups.
2. The type of administration applied (prophylactic or therapeutic) might exert an effect on Curcumin concentration.

**MATERIAL AND METHOD:**

The animal model and the experimental design (induction of acute inflammation, the type of treatment applied to each group and the substance administered) have been described in the study 1. The experiments were carried out on 8 adult male Wistar Bratislava rats, randomly assigned to four groups (three experimental groups and a control group).

Blood (approx. 1 mL) was collected in an EDTA tube from the retro-orbital plexus of the rat at 15, 30, 60, 90, 120, 150 and 180 min post-administration of Curcumin suspension. Immediately after sampling, the tube was gently shaken to ensure mixing with EDTA solution. The samples were left at room temperature for more than half an hour, then centrifuged at 4500 rpm for 10 minutes. After centrifugation, the organic upper layer was aspirated with a disposable pipette and placed in an Eppendorf recipient, resulting a quantity of 0.5 ml of plasma (which included three types of proteins: albumin, globulin and fibrinogen). To each sample of 200 µl of plasma, 800 µl of methanol were added and stirred gently for a few minutes to ease protein precipitation.

The analyses were performed on a Jasco HPLC Chromatograph device (Japan) equipped with a UV/VIS detector. The system was controlled and experimental data were analysed using software ChromPass. Separation was performed on a Lichrosorb RP-C18 column (25 x 0.46 cm) at a temperature of 30 °C. The mobile phase consisted of a mixture of methanol and 0.1% formic acid (90:10, v / v). The flow rate was 1.2 ml / min and the UV detection length was of 425nm. The mobile phase and the biological samples were filtered prior to injection through 0.45 µm membrane filters.

The standard solutions (0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 µg/ml) were prepared by inserting the 100 µl of solution (1, 2, 5, 10 and 20 µg/ml) in 100 µl of simple plasma and 800 µl of methanol. These standard solutions were used to make the calibration curves for measuring plasma concentrations of Curcumin derived from rats, that were within the range of 100-2000 ng/ml.

Methods of evaluation:

- Confirmation of the inflammatory status;
- Determining the concentration of Curcumin by HPLC from the samples taken at predetermined time intervals.

**RESULTS:**

The evaluation at muscle level (at the end of the experiment) of the aspects characterizing acute inflammation confirmed the inflammatory status (myositis) in the groups that were administered Turpentine (Groups II and III).

HPLC results showed a time-dependent decrease in the concentration of Curcumin in all study groups, thus validating our initial research hypothesis, that the length of time influences the concentration of Curcumin in the study groups.

In our study, the multivariate analysis of the three HPLC determinations for each time interval confirmed that in the context of acute inflammation, the type of Curcumin administration (prophylactic or therapeutic) significantly influences the development of Curcumin concentration, validating the second research hypothesis. A decrease in the level of Curcumin was noticed when the inflammatory process was present in the experimental animal, as a result of changes in metabolism to fight against inflammation.

**STUDY 3) Anti-androgenic therapy with cyproterone acetate in patients suffering from androgenetic alopecia and acne vulgaris**

**GENERAL OBJECTIVE:**

The objective of our study was to examine the efficacy of Melleva treatment in patients with moderate or severe acne, also suffering from androgenetic alopecia.

**HYPOTHESES:**

The study was initiated on the assumption that young patients (aged 15-20 years) could present better results than patients whose acne and alopecia sat in at mature age.

**MATERIAL AND METHOD:**

The clinical study included 35 patients diagnosed with androgenetic alopecia (AGA) grade I-II on Ludwig Scale, based on detailed medical history and objective examination (aspect of the scalp, pattern of hair loss, dermatoscopical aspect at trichoscopy examination), the patients also exhibiting moderate or severe acne vulgaris with severity equal

to or above 2 (GEA $\geq$ 2). Patients agreed to follow, for 3 consecutive months, the treatment with Melleva 35 (2 mg CPA/0.035mg EE), a tablet per day, starting with the first day of the cycle and until day 21 of each month.

The evaluation methods applied for androgenetic alopecia were clinical evaluation and trichoscopy (non-invasive evaluation of the scalp and hair roots by using a handheld device called dermatoscope), while for acne vulgaris we used the global assessment of acne (GEA Scale) and scars (ECCA-simplified version).

#### **RESULTS:**

Melleva therapy acted better on acne vulgaris lesions in reducing the number of inflammatory acne lesions (pustules and papules) than on the scar. 40% of study subjects reported an improvement while 20% reported excellent results with Melleva 35.

More than half of the study subjects (54%) experienced a partial stop of hair loss, and a third of the patients (29%) reported a total stop of hair loss after three months of anti-androgenic therapy. In 77% of the cases the doctor identified hair regrowth.

The treatment acceptance was very good, 86% of patients were compliant with the therapy administered in the study and more than a third of the total number of subjects (34%) attained a high level of satisfaction after treatment, while 37% reported moderate satisfaction.

There was no correlation between the age of the subjects and the efficacy of the hormonal treatment, therefore the experimental hypothesis was rejected: the younger patients (aged 15-20 years) did not show better results than the patients in whom acne and alopecia set in at mature age.

### **Study 4) Changes assessment in androgens/female hormones balance in different types of acne**

#### **GENERAL OBJECTIVE**

The objective of our study was to assess changes in androgens/ female hormones balance that occur in patients with acne vulgaris.

#### **HYPOTHESES**

1. Could there be a correlation between the values of hormones (estrogen-androgen balance change) and type of acne which the patient suffers from (juvenile, mature).

2. Could there be a correlation between the values of hormones (estrogen-androgen balance change) and the form of patient's acne (mild, moderate, severe).

#### **MATERIAL AND METHOD:**

The clinical study was conducted on 160 patients who met the inclusion criteria: women with acne aged 14-45 years; which do not suffer from obesity or hirsutism; premenopausal women; subjects who did not take steroid and hormonal medication or contraceptives for 6 months prior to the study. The design of the study and details of the subjects were described in the general methodology. Assessment methods for acne were:

- Global Acne Assessment (GEA Scala)
- Overall assessment of scars (ECCA-Lite)

The study was conducted in collaboration with the Laboratory Synevo Cluj for peripheral blood sampling and hormonal dosage: Estradiol, Progesterone, DHEAS (dehydroepiandrosterone sulphate), Free Testosterone. Measurement of hormonal levels was performed fasting on day 21 (the luteal phase of the menstrual cycle) when the secretion of estrogen and progesterone reaches a peak. Venous blood was sampled, serum was separated by centrifugation, estradiol, progesterone and DHEAS dosage was carried out by immunochemical method with electrochemiluminescence detection (ECLIA), and the free testosterone dosage by ELISA.

#### **RESULTS:**

Changing hormone levels (Estradiol, Progesterone, DHEAS, free testosterone) more than half of the 160 subjects (65%), suggests the high occurrence rate that hormones have on acne vulgaris onset.

Young patients (14-21 years) seem to be more susceptible to hormonal changes than mature patients with acne (72%) mainly because there is a significant individual increase in testosterone and DHEAS levels respectively mixed increase of the two hormones in patients from juvenile acne group.

In patients with mature acne, female hormones have experienced changes: independent decrease in progesterone and estradiol levels or simultaneous reduction of the two hormones.

Increased levels of androgens (free testosterone and DHEAS) appeared primarily in severe forms of acne. The correlation between high testosterone values and the severity of acne was significant,  $p = 0.001$  ( $p < 0.05$ ).

Results do not reveal any association relations between the levels of female hormones (estradiol, progesterone) and the severity form of disease.

The androgens (grown in 6.9% of cases)/estrogens (lowering in 8.1% of cases) balance is disrupted mostly in moderate and severe types of acne, the increase being particularly important due to low values of female hormones.



## **STUDY 5) The correlation between the severity of the disease and the patients age in acne**

### **GENERAL OBJECTIVE:**

The objective of our study was to evaluate the clinical and epidemiological characteristics that occur in patients with acne vulgaris.

### **HYPOTHESES:**

Could there be a correlation between patients age (juvenile or mature) and the acne form (according to severity: mild, moderate or severe)

### **MATERIAL AND METHOD:**

The design of the study and the details of the subjects were described in Study 4. 170 subjects suffering from acne vulgaris were divided into 4 groups: mild acne, moderate, severe or very severe, based on global grading system (GAGs).

### **RESULTS:**

In our study we tested the correlation between the age and severity of acne vulgaris in women by comparing the chronological and geographical patterns of female acne in different age groups. The results demonstrated that there is no correlation between the severity of acne and acne type considering the patients age (juvenile or mature).

The lack of correlation between severity and age in women with acne vulgaris reinforces the importance of individualized diagnosis and a specific therapeutic approach.

### **GENERAL CONCLUSIONS:**

#### **Regarding experimental studies:**

1. In the model of acute inflammation induced by injection of Turpentine, our study emphasizes disrupting oxidant-antioxidant balance.

2. The results obtained from exploration of oxidative stress (by MDA and PC) and total antioxidant capacity in serum and tissue of Curcumin (measured by the ABTS test) have disproved the assumption that the parameters may have different values depending on the time of sampling (intervals for 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 minutes).

3. Mean serum MDA values were significantly increased in the groups in which acute inflammation was present (Groups II and III) compared to the group treated only with Curcumin (Group I). The mean values of serum PC followed the same trend as the MDA ones, but the differences were not statistically significant compared to Group I or Control.

4. Our observations draw the attention to the fact that the origin of the tissue (muscle, liver or kidney) influence significantly the level of oxidative stress (measured by determining MDA tissue). It recorded the highest value in the back thigh muscles and not internal organs.

5. Group II (Curcumin prophylactic plan) recorded the lowest serum, liver and muscle ABTS values, compared to Group III (Curcumin therapeutic plan).

6. The results obtained in our study emphasize the ability of Curcumin as a prophylactic and therapeutic agent that protects against oxidative stress and exerts antioxidant effects after taking an oral dose of 150 mg/kg in a model of acute inflammation.

7. HPLC determination showed a time-dependent decrease in the concentration of Curcumin in all study groups. The decrease in the level of Curcumin was observed by HPLC when the inflammation process was present in the body of the experimental animal as a result of the modified metabolism to combat inflammation.

#### **Regarding clinical trials:**

1. The antiandrogen therapy with Melleva 35, one tablet per day, three months consecutive, causes good clinical results (total hair loss stop to a third of patients, regrowth of hair in 77% of cases, reduces inflammatory acne lesions in 40% of subjects) and increased satisfaction (85%) in patients suffering from Androgenetic Alopecia and Acne Vulgaris, according to the assessment made by the physician and patient.

2. Our study did not show a correlation between the age of subjects and effectiveness of hormonal treatment with Melleva 35.

3. In the context of the high percentage of hormonal changes (65%) it is necessary that the therapy of acne should focus on balancing the hormonal status of the patient.

4. There is a significant rate of increase in androgens among young women (14-21 years) and a decrease in female hormones among mature patients.

5. Our study demonstrated a significant correlation between increased testosterone value and the severity of acne,  $p = 0.001$  ( $p < 0.05$ ). Androgens/female hormones balance is mostly disrupted in moderate and severe types of acne.

6. The results show that there is no correlation between the severity of acne and acne type compared to the age of patients (juvenile or mature).