
TEZĂ DE DOCTORAT

**INFLUENȚA FOTOCHIMIOTERAPIEI
LOCALE ASUPRA MODIFICĂRILOR
APOPTOTICE ȘI DE STRES OXIDATIV ÎN
VITILIGO**

Rezumat

Doctorand **Daniela Ștefănescu (căș. Porojan)**

Conducător de doctorat **Rodica Cosgarea**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Generalități	17
2. Diagnosticul pozitiv de vitiligo	18
3. Teorii etiopatogenetice	18
3.1. Este vitiligo o afecțiune melanocitară?	18
3.1.1. Apoptoza în vitiligo	19
3.1.2. Un defect intrinsec al melanocitelor	21
3.1.3. Reducerea supraviețuirii melanocitare	21
3.1.4. Melanocitoragia transepidermală	21
3.1.5. Tulburare de adeziune melanocitară	21
3.2. Implicarea keratinocitelor	22
3.3. Implicarea celulelor Langerhans	22
3.4. Stresul oxidativ	23
3.4.1. Radicalii liberi	23
3.4.1.1. Sursele de radicali liberi în organism	23
3.4.1.2. Efectele radicalilor liberi	23
3.4.1.3. Speciile reactive ale oxigenului	24
3.4.1.4. Peroxidul de hidrogen	24
3.4.2. Sistemele antioxidante	24
3.5. Teoria biochimică	25
3.6. Teoria neurală	28
3.7. Teoria imunologică	29
3.7.1. Imunitatea celulară	29
3.7.2. Imunitatea umorală	30
3.8. Mecanisme genetice în vitiligo	32
3.9. Vitiligo ocupațional	35
3.10. Vitiligo – o infecție virală?	35
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru. Obiective	39
2. Metodologie generală	41
3. Studiul 1 - Studiu de genomică funcțională și al procesului apoptotic în vitiligo	43
3.1. Introducere	43
3.2. Ipoteza de lucru. Obiective	45
3.3. Material și metodă	45
3.4. Rezultate	46
3.5. Discuții	60
3.6. Concluzii	61

4. Studiul 2 - Efectul fenitoiniei asupra proliferării melanocitare in vitro	63
4.1. Introducere	63
4.2. Ipoteza de lucru. Obiective	63
4.3. Material și metodă	64
4.4. Rezultate	65
4.5. Discuții	69
4.6. Concluzii	70
5. Studiul 3 - Evaluarea cedării in vitro a fenitoiniei	71
5.1. Introducere	71
5.2. Ipoteza de lucru. Obiective	71
5.3. Material și metodă	71
5.4. Rezultate	72
5.5. Discuții	73
5.6. Concluzii	74
6. Studiul 4 - Evaluarea comparativă a markerilor pro-oxidanți și antioxidanți după terapia topică cu fenitoină și respectiv fotochimioterapia locală în vitiligo	75
6.1. Introducere	75
6.2. Ipoteza de lucru. Obiective	77
6.3. Material și metodă	77
6.4. Rezultate	79
6.5. Discuții	81
6.6. Concluzii	82
7. Studiul 5 - Studiu clinic comparativ între terapia topică cu fenitoină și PUVA terapia locală în vitiligo	83
7.1. Introducere	83
7.2. Ipoteza de lucru. Obiective	85
7.3. Material și metodă	85
7.4. Rezultate	87
7.5. Discuții	93
7.6. Concluzii	93
8. Studiul 6 - Calitatea vieții pacienților cu vitiligo	95
8.1. Introducere	95
8.2. Ipoteza de lucru. Obiective	95
8.3. Material și metodă	96
8.4. Rezultate	97
8.5. Discuții	103
8.6. Concluzii	105
9. Concluzii generale	107
10. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	109
REFERINȚE	111
ANEXE	
Anexa 1: Protocolul de extracție al ARN-ului cu TriReagent	123

Cuvinte cheie: vitiligo, fenitoină, fotochimioterapie locală, genomică funcțională, apoptoză, microarray, culturi melanocitare, cedare in vitro, stres oxidativ, calitatea vieții.

INTRODUCERE

Vitiligo este o afecțiune cutanată a cărei etiologie rămâne necunoscută în ciuda numeroaselor ipoteze emise până în prezent. Metodele terapeutice postulate în tratamentul acestei afecțiuni sunt multiple, fotochimioterapia jucând un rol esențial în ameliorarea defectului estetic reprezentat de vitiligo.

Pe de altă parte, fenitoina (difenilhidantoina), un agent anticonvulsivant frecvent utilizat, posedă o multitudine de efecte care îl fac potențial util în tratamentul vitiligo-ului. Pornind de la această ipoteză am efectuat un studiu experimental de cercetare pe culturi melanocitare in vitro, în vederea aprecierii viabilității celulare, a creșterii și proliferării melanocitare sub acțiunea acestui agent. Evidențierea stimulării viabilității melanocitare sub acțiunea fenitoinii pentru prima dată în literatura de specialitate, a adus după sine necesitatea evaluării efectului in vivo asupra tegumentului afectat de vitiligo, în acest sens studiul clinic efectuat ulterior urmărind gradul de repigmentare obținut în urma aplicațiilor topice de fenitoină comparativ cu o metodă cunoscută și demonstrată anterior ca fiind eficientă în tratamentul acestei afecțiuni, respectiv fotochimioterapia locală.

În cazul unei patologii atât de complexe și atât de puțin înțelese până în prezent, s-a impus și evaluarea efectului agentului medicamentos ipotetic eficient în tratamentul vitiligo-ului asupra unor teorii etiopatogenetice considerate a fi implicate în declanșarea acestei afecțiuni. În acest sens, am explorat două din aceste teorii, respectiv teoria stresului oxidativ și teoria apoptozei. În vederea elucidării acestei patologii complexe, am completat studiul cu o analiză de genomică funcțională aplicată la nivelul întregului transcriptom prin reacția microarray.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Vitiligo este o dermatoză întâlnită la 0,5-2% din populație, caracterizată prin apariția de macule și plăci depigmentate, bine delimitate, al căror număr și dimensiuni cresc progresiv în timp. Este determinată de dispariția melanocitelor funcționale la nivelul zonelor afectate, printr-un mecanism neelucidat până în prezent.

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

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

IPOTEZĂ DE LUCRU. OBIECTIVE

Fenitoina, utilizată până în prezent la nivel cutanat în tratamentul unor afecțiuni cutanate inflamatorii, prin efectul exercitat asupra imunității celulare, este potențial utilă în tratamentul vitiligo-ului.

În acest sens, scopul cercetării constă în:

- aprecierea eficacității fenitoinii asupra culturilor melanocitare.
- evaluarea nivelelor de expresie genică prin reacția microarray. Evaluarea implicării procesului apoptotic în vitiligo.
- urmărirea evoluției echilibrului dintre agenții pro-oxidanți și sistemele enzimatiche antioxidante sub două metode terapeutice comparative.
- evidențierea unor argumente serioase în favoarea sau defavoarea eficienței aplicațiilor topice de fenitoină în repigmentarea leziunilor de vitiligo precum și aprecierea comparativă a eficienței terapiei cu fotochimioterapie locală (PUVA).

METODOLOGIE GENERALĂ

Proiectul cuprinde două laturi ale cercetării:

- studiu experimental
- studiu clinic

Tipul studiului : studiu experimental de tip intervențional.

Populația țintă : pacienți suferinzi de vitiligo care se adresează serviciului Clinicii de Dermatologie și care, în momentul efectuării studiului, nu se aflau sub niciun tratament topic sau sistemic pentru această afecțiune.

STUDIU 1. STUDIU DE GENOMICĂ FUNCȚIONALĂ ȘI AL PROCESULUI APOPTOTIC ÎN VITILIGO.

Introducere

În ultimii ani, tehnologia microarray a fost utilizată pentru analiza modelelor de expresie genică într-o varietate de boli dermatologice, fiind utilă la proiectarea unor abordări individualizate de tratament al afecțiunilor cutanate. Procesul de apoptoză este un model distinctiv de moarte celulară, diferit de procesul de necroză prin morfologie și mecanism, care joacă un rol crucial în homeostazia celulară.

Ipoteză de lucru. Obiective

Studiul de genomică funcțională a urmărit identificarea și studiul genelor implicate în căile de semnalizare celulară, care conduc la activarea sau inhibarea mecanismelor implicate în apariția leziunilor de vitiligo.

Obiectivele urmărite pentru realizarea acestui scop:

1. Evaluarea diferențelor transcriptomice la nivel tisular, în leziunile de vitiligo versus țesut normal pigmentat, pentru a identifica gene implicate în această patologie.
2. Evaluarea căilor și mecanismelor moleculare alterate în această patologie.
3. Evaluarea implicării procesului apoptotic.

Material și metodă

Material biologic

Pentru studiul de genomica funcțională bazat pe reacția microarray au fost utilizate probe biologice tisulare provenite de la 8 pacienți. S-au recoltat două biopsii cutanate în cazul fiecărui pacient, un fragment de la nivelul unei arii depigmentate, iar celălalt de la nivelul unei arii cu tegument normal, neafectat de procesul de depigmentare.

Tehnologia microarray

În studiul de față a fost utilizată tehnologia Agilent (Whole Human Genome) care este capabilă să furnizeze informații asupra întregului transcript celular.

Rezultate

Extracția și purificarea ARN-ului total

Metoda de extracție pentru ARN s-a realizat cu Tri Reagent® (Sigma-Aldrich) și se bazează pe metoda clasică descrisă de Chomczynski et al.

Cuantificarea și evaluarea calitativă a ARN-ului total

Cuantificarea ARN-ului s-a făcut prin nanotehnologii, ținând cont de cerințele studiilor de microarray. Pragul controlului de calitate a fost stabilit pentru $28S/18S > 1.7$ respectiv $RIN > 8$.

După ce s-a stabilit concentrația fiecărui eșantion, toate ARN-urile au fost diluate cu apă liberă de RN-ază la o concentrație finală de 50 ng/μl.

Analizele calitative și cantitative au pus în evidență electroferograme specifice unor ARN-uri de bună calitate, respectiv cantități suficiente pentru etapele ulterioare.

Sinteza sondelor microarray

Sinteza de sonde microarray s-a bazat pe sinteza unui lanț complementar de ADN (ADNc) de pe matricea de ARN mesager, urmată de resinteza și marcarea cu fluorocromi (Cy 3 sau Cy5) a unui lanț de cARN (ARN complementar) de pe matricea de ADN codant.

Hibridarea sondelor microarray

Cantitatea de sonde microarray utilizată pentru reacția de hibridare pe lama microarray a fost de 825 ng pentru fiecare dintre probele microarray.

Achiziția și preprocesarea imaginilor

Spoturile de pe lama/array în care au hibridizat sondele marcate vor emite fluorescență sub excitația laserului.

Analiza bioinformatică a datelor microarray

Fisierele .txt obținute în urma conversiei datelor colorimetrice în cele numerice au fost folosite pentru analiza ulterioară. Algoritmul de analiză a urmat etapele: importarea și normalizarea datelor, suprimarea controalelor, filtrarea

spoturilor marcate, sumarizarea secvențelor, estimarea valorilor lipsă, analiza diferențială și generarea listei de gene diferit exprimate.

Analiza funcțională a genelor diferit exprimate

În urma studiului de genomica funcțională, au fost identificate 163 de gene diferit exprimate în tegumentul depigmentat față de țesutul normal pigmentat, dintre care 57 gene au fost supraexprimate și 106 gene subexprimate.

Analiza funcțională a pachetului de gene diferit exprimate obținute s-a realizat cu softul IPA. Au fost identificate 5 gene (DCT, TYR, RYP, SOX 10, MSH-R) ca fiind inactivate în calea canonică ce implică semnalizarea în pigmentare și dezvoltarea melanocitelor

Modularea mecanismului de apoptoză în vitiligo

Evaluarea mecanismului de apoptoză s-a realizat pe baza a 26 de gene, obținute în studiul microarray și incluse în analiza funcțională. Datele noastre au pus în evidență o inhibare de 2.171 ori a mecanismului de apoptoză în vitiligo comparativ cu tegumentul normal pigmentat, cu o valoare p ajustată de 4.35E-02.

Astfel, datele obținute arată o deficiență a mecanismului de apoptoză, la nivelul căilor indirecte, care nu includ familia BCL2, dar care includ alte gene specifice melanocitelor. Deci, datele studiului nostru arată o slabă implicare a căii Bcl2/ Bax.

Discutii

Marea majoritate a genelor identificate ca fiind specifice pentru vitiligo au prezentat o lipsă a funcției lor, caracterizată printr-o subexprimare a transcriptului comparativ cu cel al genelor similare din tegumentul normal. Parte dintre genele subexprimate sunt implicate în sinteza de melanină (DCT, MC1R, OCA2, PMEL, SOX9, TYR, TYRP1), depozitarea de melanină și hidroxilarea L-tirozinei (TYR), metabolismul melaninei (TYRP1), creșterea melanocitelor (MC1R), transportul fosfatidilserinei (MLANA) sau dezvoltarea celulelor epiteliale (SOX9, SOX10).

Deasemenea, marea majoritate a genelor aparținând familiei BCL2 cu activitate anti-apoptotică: Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w respectiv pro-apoptotică: Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik, Blk, Puma, Noxa nu au nivele modificate de expresie semnificative din punct de vedere statistic.

Concluzii

Rezultatele studiului de față confirmă faptul că melanocitele recoltate de la nivelul leziunilor de vitiligo prezintă o expresie genică semnificativ alterată comparativ cu melanocitele din zonele normal pigmentate.

STUDIUL 2. EFECTUL FENITOINEI ASUPRA PROLIFERĂRII MELANOCITARE IN VITRO.

Introducere

Fenitoina (5,5-difenilhidantoina) este un agent anticonvulsivant eficient și frecvent prescris, utilizat atât la nivel cutanat cât și pe cale sistemică în tratamentul anumitor afecțiuni dermatologice.

Ipoteză de lucru. Obiective

Rapoarte anterior publicate sugerează ipoteza conform căreia fenitoina poate reprezenta o opțiune viabilă în tratamentul vitiligo-ului, ținând cont de activitatea imunomodulatoare cunoscută și de efectele secundare de repigmentare facială observate în cursul terapierilor afecțiunilor neurologice. Obiectivul studiului constă în evaluarea efectului fenitoinii pe culturi de melanocite umane normale și aprecierea citotoxicității substanței utilizând metode colorimetrice.

Material și metodă

Culturile de melanocite umane normale - S-a achiziționat și utilizat o linie de melanocite epidermale umane normale, celulele fiind cultivate în mediu de creștere pentru melanocite.

Morfologie - Aspectul morfologic al melanocitelor a fost observat prin examinare microscopică și documentat fotografic.

Proliferarea celulară - Este studiată prin metode colorimetrice pentru a determina numărul de celule viabile în proliferare sau în teste de chimiosensibilitate.

Rezultate

Analiza statistică relevă faptul că la concentrații mici (0,1 μg/ml și respectiv 0,5 μg/ml) fenitoina stimulează creșterea și proliferarea celulară la nivelul culturilor de melanocite, viabilitatea fiind superioară celei obținute în cazul martor (melanocite în mediu de cultură). La creșterea concentrației de fenitoină, la valori mici, viabilitatea melanocitară crește pentru ca ulterior, la valori mai mari, la fiecare creștere cu o unitate a concentrației de fenitoină să rezulte o scădere a viabilității de 0.001, însă se păstrează trendul.

Discutii

Acest agent posedă o multitudine de efecte care îl fac potențial util în tratamentul vitiligo-ului, fiind postulat în special efectul supresor asupra imunității mediate celular.

Concluzii

Deși până în prezent nu există un panaceu universal în vitiligo, aplicațiile topice de fenitoină, care prezintă efecte inhibitorii asupra imunității mediate celular și are abilitatea de-a stimula melanocitele la concentrații scăzute, se pot dovedi eficiente în tratamentul acestei afecțiuni.

STUDIUL 3. EVALUAREA CEDĂRII IN VITRO A FENITOINEI

Introducere

În prezent, alternative terapeutice cu rezultate mai mult sau mai puțin benefice sunt testate permanent în vitiligo, în vederea găsirii metodei optime de tratament.

Ipoteză de lucru. Obiective

Plecând de la ipoteza conform căreia fenitoina poate reprezenta o opțiune viabilă în tratamentul vitiligo-ului, obiectivul studiului de față constă în selectarea produsului topic care cedează cel mai bine și mai rapid fenitoina, în vederea utilizării lui în studii clinice ulterioare.

Material și metodă

Preparate topice cu fenitoină.

S-au formulat și obținut următoarele tipuri de preparate topice cu fenitoină: gel, cremă hidrofilă și unguent, urmărindu-se selectarea din aceste preparate a celui care cedează cel mai bine și mai rapid fenitoina.

Evaluarea cedării in vitro a fenitoinii.

S-a utilizat o celulă de difuzie compusă dintr-un compartiment donor și unul receptor, între ele aflându-se o membrană pe bază de acetat de celuloză. S-a calculat cantitatea de fenitoină difuzată, determinându-se absorbțiile probelor la 220 nm.

Rezultate

Analizând reprezentarea grafică, se constată că eliberarea fenitoinii crește progresiv începând cu prima oră, valorile obținute fiind de 47,25% pentru gel, 14,54% pentru crema hidrofilică și 1,25% pentru unguent la opt ore de la aplicare. Analiza reprezentăției evidențiază faptul că gelul eliberează fenitoina semnificativ mai rapid decât crema hidrofilică și unguentul.

Discutii

Studiul de față relevă faptul că gelul este un vehicul potrivit pentru preparatul topic cu fenitoină, determinând o cedare in vitro semnificativ mai crescută și mai rapidă decât celelalte vehicule studiate, astfel că preparatul de tip gel va fi selectat pentru studiul clinic ulterior.

Concluzii

Cunoscându-se faptul că la concentrații mici fenitoina stimulează creșterea și proliferarea celulară pe culturi melanocitare, studiul de față evidențiază faptul că gelul pe bază de Carbopol 940 prezintă cea mai bună capacitate de cedare in vitro a fenitoinii, acesta fiind util pentru încorporarea într-un produs topic.

STUDIUL 4. EVALUAREA COMPARATIVĂ A MARKERILOR PRO-OXIDANȚI ȘI ANTIOXIDANȚI DUPĂ TERAPIA TOPICĂ CU FENITAINĂ ȘI RESPECTIV FOTOCHEMIOTERAPIA LOCALĂ ÎN VITILIGO

Introducere

Stresul oxidativ reprezintă totalitatea deteriorărilor oxidative produse de SRO la nivelul celulei și, respectiv la nivelul întregului organism. El este asociat cu perturbarea balanței pro-oxidante/antioxidante, în favoarea primei componente. Teoria stresului oxidativ în vitiligo susține faptul că moartea melanocitelor rezultă

dintr-o sensibilitate intrinsecă crescută la stresul oxidativ, secundară intermediarilor toxici ai precursorilor melaninei, sau din alte surse.

Ipoteză de lucru. Obiective

Plecând de la premisa implicării stresului oxidativ în etiopatogenia vitiligo-ului, s-a evaluat amploarea acestui posibil mecanism patogenetic prin determinarea echilibrului dintre agenții pro-oxidanți și sistemele antioxidante, în urma aplicării a două metode terapeutice considerate a reduce nivelul oxidanților și a augmenta nivelul sistemelor antioxidante, respectiv PUVA terapia locală și terapia topică cu fenitoină.

Material și metodă

Pacienții au fost incluși în studiul de evaluare a markerilor de stres oxidativ sub două metode terapeutice studiate, respectiv terapia topică cu fenitoină gel 2% (lotul I) și fotochimioterapia locală (Psoralen și UVA - lotul II). Pacienților li s-a practicat biopsie cutanată din leziunile depigmentate, atât înainte cât și după încheierea celor trei luni de monoterapie, în vederea evaluării balanței pro-oxidanți/antioxidanți. Aceasta s-a măsurat pe baza indicatorilor malondialdehidei (MDA) și a donozilor de hidrogen (DH).

Rezultate

Evaluarea celor două metode terapeutice studiate relevă faptul că ambele determină o reducere a nivelului de oxidanți, respectiv MDA, precum și o creștere a nivelului de antioxidanți, respectiv DH, la terminarea tratamentului. Dacă în cazul nivelului antioxidanților ambele metode terapeutice determină o creștere a acestora în 80% din cazurile evaluate, în cazul nivelului oxidanților se observă superioritatea terapiei topice cu fenitoină, care determină o reducere a nivelului MDA la 90% din pacienți, în timp ce PUVA terapia locală determină reducerea nivelului oxidanților la doar 70% din pacienți. În ciuda corelației invers proporționale evidente între nivelele de MDA și respectiv DH în cazul ambelor tipuri de tratament, corelațiile diferențelor de MDA și DH în funcție de tipul tratamentului PUVA vs. fenitoină nu prezintă diferențe semnificative. Aceste corelații ne semnificative din punct de vedere statistic se pot atribui faptului că lucrăm pe un eșantion de numai 20 cazuri

Discutii

MDA, ca și produs final al peroxidării lipidice, este în prezent acceptat ca și indicator specific al stresului oxidativ. Capacitatea de DH, ca și măsură a sistemului antioxidant, reprezintă o marcă a capacității de apărare a tegumentului pacienților cu vitiligo. Este primul studiu care evaluează comparativ nivelele tisulare de MDA și de DH sub influența a două metode terapeutice, aplicațiile topice de fenitoină și respectiv PUVA terapia locală.

Concluzii

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

evaluate prin intermediul nivelului tisular de MDA, similar metodei terapeutice cunoscute, PUVA terapia locală. Aceeași metodă terapeutică determină stimularea sistemelor antioxidante protectoare la nivel cutanat, în cazul de față capacitatea de DH.

STUDIU 5. STUDIU CLINIC COMPARATIV ÎNTRE TERAPIA TOPICĂ CU FENITAINĂ ȘI PUVA TERAPIA LOCALĂ ÎN VITILIGO

Introducere

Până la ora actuală, nici una dintre metodele terapeutice cunoscute nu și-a demonstrat în totalitate eficacitatea în tratamentul vitiligo-ului, studiile relevând faptul că rezultate parțial favorabile se pot obține atât prin metode medicale cât și chirurgicale.

Ipoteză de lucru. Obiective

Studiul de față își propune să evalueze eficacitatea aplicațiilor topice de fenitaină, pornind de la ipoteza conform căreia acest agent posedă efecte care îl fac potențial util în tratamentul vitiligo-ului. Eficacitatea va fi apreciată comparativ cu fotochimioterapia locală (PUVA), dovedită eficientă în repigmentarea leziunilor de vitiligo, în vederea unei mai bune decizii terapeutice ulterioare în cazul pacienților suferinzi de vitiligo.

Material și metodă

A fost efectuat un studiu prospectiv caz-martor în vederea aprecierii eficacității celor două metode terapeutice. Cei douăzeci de pacienți eligibili au fost repartizați aleator în grupuri de 1:1 pentru a urma fie tratament topic cu fenitaină (lotul I), fie fotochimioterapie locală (Psoralen și UVA - lotul II). Durata terapiei a fost de 3 luni.

Evaluarea răspunsului terapeutic se realizează din trei perspective:

- a. Evaluare primară a rezultatelor: procent de repigmentare din perspectiva pacientului
- b. Evaluare secundară a rezultatelor: procent de repigmentare a leziunii tratate din perspectiva medicului/observatorului
- c. Evaluare terțiară: existența efectelor adverse ale terapiei.

Rezultate

Din punct de vedere al evaluării primare a rezultatelor, procentul de repigmentare obținut din perspectiva pacientului relevă un rezultat satisfăcător în 30% din cazuri, atât în lotul I cât și în lotul II, în timp ce procentul pacienților care s-au declarat moderat satisfăcuți de metoda terapeutică urmată este sensibil mai mare în cazul lotului care a urmat terapia topică cu fenitaină (50%), comparativ cu lotul supus PUVA terapiei (40%).

Din punct de vedere al evaluării secundare a rezultatelor, ca procent de repigmentare a leziunii tratate din perspectiva medicului/observatorului, se observă o discretă superioritate a terapiei topice cu fenitaină, în 30% din cazuri

obținându-se repigmentare în procent de 75-100% din suprafața tratată, spre deosebire de PUVA terapia locală unde același procent de repigmentare s-a obținut în doar 20% din cazuri

Discutii

Fenitoina (5,5-difenilhidantoina), acest agent anticonvulsivant utilizat atât la nivel cutanat cât și pe cale sistemică în tratamentul anumitor afecțiuni dermatologice, poate fi util în tratamentul vitiligo-ului. Pe de altă parte, fotochimioterapia este o metodă cunoscută ca fiind eficientă în repigmentarea leziunilor de vitiligo, o multitudine de agenți fiind testați în vederea stabilirii protocoalelor de fotochimioterapie.

Concluzii

Din punct de vedere al studiului clinic, aplicațiile topice de fenitoină se dovedesc a fi o metodă facilă și eficientă de tratament, comparabilă din punct de vedere al eficacității cu metode terapeutice consacrate și dovedite eficiente în studii de specialitate. Evaluarea repigmentării obținute în urma terapiei cu fenitoină, atât din perspectiva pacientului cât și din perspectiva observatorului/medicului, relevă un rezultat satisfăcător într-un procent sensibil mai mare decât în cazul PUVA terapiei locale, superioritate care, chiar dacă nu este semnificativă statistic, deschide noi perspective în ceea ce privește tratamentul în vitiligo.

STUDIUL 6. CALITATEA VIEȚII PACIENȚILOR CU VITILIGO

Introducere

Vitiligo este o afecțiune cutanată depigmentantă, cu impact major asupra calității vieții pacienților, afectarea aspectului exterior determinând consecințe psihologice de multe ori devastatoare. Studiile publicate până în prezent atestă relația cauzală existentă între stres și declanșarea bolii.

Ipoteză de lucru. Obiective

Obiectivele studiului constau în evaluarea naturii și extinderii dificultăților sociale și psihologice asociate vitiligo-ului și identificarea determinantilor clinici relevanți pentru calitatea vieții.

Material și metodă

S-au evaluat natura și extinderea dificultăților sociale și psihologice asociate vitiligo-ului și impactul acestora asupra compliancei și răspunsului la tratament, utilizând Indexul Dermatologic de Calitate a Vieții (Dermatology Life Quality Index - DLQI). Varianta validată psihometric în limba română a chestionarului DLQI a fost aplicată în cazul a 40 de pacienți luați în studiu.

Rezultate

Scorurile DLQI obținute au variat de la 0 la 21, media \pm deviația standard fiind 8.17 ± 3.88 , evidențiind un efect moderat al acestei afecțiuni asupra calității vieții

pacienților. Se evidențiază corelația, semnificativă din punct de vedere al calității vieții, cu suprafața cutanată afectată și cu distribuția leziunilor de vitiligo. O suprafață cutanată extinsă și o distribuție periferică, la nivelul zonelor expuse, a leziunilor depigmentate, influențează semnificativ atât calitatea relațiilor sociale cât și percepția propriei afecțiuni cutanate, a propriului corp.

Discutii

În ultimii ani s-a acordat o atenție deosebită efectelor psihologice ale diferitelor afecțiuni cutanate și calității vieții acestor pacienți. Media obținută în urma efectuării studiului de față este mai mare decât cea obținută de Finlay și Khan în studiul din 1994 (7.3) și Kent și Al-Abadie în 1996 (4.82), dar mai mică decât cea obținută de Parsad în 2003 (10.67).

Concluzii

Vitiligo exercită o influență semnificativă asupra calității vieții pacienților, fără a influența morbiditatea și mortalitatea generală astfel că, din perspectivă clinică, evaluarea calității vieții nu ar trebui exclusă dintre variabilele clinice de rutină.

CONCLUZII GENERALE

Analiza de genomică funcțională, aplicată la nivelul întregului transcriptom, utilizând evaluarea nivelelor de expresie genică prin reacția microarray a identificat 163 de gene diferit exprimate în tegumentul depigmentat față de țesutul normal pigmentat, dintre care 57 gene au fost supraexprimate și 106 gene subexprimate. Deasemenea, datele obținute evidențiază o deficiență a mecanismului de apoptoză, relevând o slabă implicare a căii Bcl2/ Bax.

La concentrații mici (0.1 - 0.5 μg/ml) fenitoina stimulează creșterea și proliferarea melanocitară in vitro, abilitatea de-a stimula melanocitele putându-se dovedi eficientă în tratamentul acestei afecțiuni.

Gelul pe bază de Carbopol 940 prezintă cea mai bună capacitate de cedare in vitro a fenitoinii, acesta fiind util pentru încorporarea într-un produs topic.

Din punct de vedere al evaluării balanței stresului oxidativ în cazul celor două metode terapeutice luate în studiu, expunerea tegumentului afectat de vitiligo la fenitoină topică determină reducerea proceselor de peroxidare lipidică la nivelul țesutului cutanat, precum și stimularea sistemelor antioxidante protectoare.

Din punct de vedere al studiului clinic, aplicațiile topice cu fenitoină se dovedesc a fi o metodă facilă și eficientă de tratament, comparabilă din punct de vedere al eficacității cu metode terapeutice consacrate și dovedite eficiente în studii de specialitate, în cazul nostru cu fotochimioterapie locală.

Vitiligo exercită o influență semnificativă asupra calității vieții pacienților, cu afectarea concomitentă a activităților zilnice, a relațiilor interpersonale și a activității profesionale.

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI

În cadrul acestei lucrări am încercat o evaluare de ansamblu a unei afecțiuni prea puțin cunoscute până în prezent, vitiligo. Până la momentul actual nu sunt studii in vitro finalizate care să ateste efectul fenitoină asupra melanocitelor. Prin studiul efectuat pe melanocite umane normale am evidențiat stimularea creșterii și proliferării melanocitare la concentrații mici de fenitoină, fiind primul studiu experimental de acest fel publicat până în prezent.

Atât studiul clinic comparativ între terapia topică cu fenitoină și fotochimioterapia locală, cât și evaluarea balanței stresului oxidativ secundar aplicării celor două metode terapeutice, sunt primele de acest gen până în prezent, conform literaturii de specialitate, reprezentând un punct de plecare pentru studiile ulterioare.

Inovația studiului de genomică funcțională constă în evaluarea întregului transcript celular pe probe de vitiligo comparativ cu țesut normal pigmentat, proces ce reprezintă o abordare importantă, pentru o mai bună înțelegere a dereglărilor care au loc la nivelul mecanismelor moleculare ce validează fenotipul patologiei vitiligo.

PhD THESIS

**INFLUENCE OF LOCAL
PHOTOCHEMOTHERAPY ON APOPTOTIC
CHANGES AND OXIDATIVE STRESS IN
VITILIGO**

Abstract

PhD Student **Daniela Ștefănescu (Porojan)**

Thesis coordinator **Rodica Cosgarea**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	13
Present state of knowledge	
1. Generalities	17
2. Positive diagnosis in vitiligo	18
3. Etiopathogenical theories	18
3.1. Is vitiligo a disease of the melanocytes?	18
3.1.1. Apoptosis in vitiligo	19
3.1.2. An intrinsic defect of the melanocytes	21
3.1.3. Decreased melanocytes survival	21
3.1.4. Transepidermal melanocytoria	21
3.1.5. Disturbance of melanocytes adhesion	21
3.2. Keratinocytes involvement	22
3.3. Langerhans cell involvement	22
3.4. Oxidative stress	23
3.4.1. Free radicals	23
3.4.1.1. Free radicals sources	23
3.4.1.2. Free radicals effects	23
3.4.1.3. Reactive oxygen species (ROS)	24
3.4.1.4. Hydrogen peroxide	24
3.4.2. Antioxidative systems	24
3.5. The biochemical theory	25
3.6. The neural theory	28
3.7. The immunological theory	29
3.7.1. Cellular immunity	29
3.7.2. Humoral immunity	30
3.8. Genetic mechanisms and vitiligo	32
3.9. Occupational vitiligo	35
3.10. Vitiligo – a viral infection?	35
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Working hypothesis	39
2. General methodology	41
3. Study 1 – Functional genomics study of apoptosis in vitiligo	43
3.1. Introduction	43
3.2. Working hypothesis. Objectives	45
3.3. Materials and methods	45
3.4. Results	46
3.5. Discussions	60
3.6. Conclusions	61
4. Study 2 – The effect of phenytoin on in vitro melanocyte	63

proliferation	
4.1. Introduction	63
4.2. Working hypothesis. Objectives	63
4.3. Materials and methods	64
4.4. Results	65
4.5. Discussions	69
4.6. Conclusions	70
5. Study 3 – In vitro evaluation of phenytoin release	71
5.1. Introduction	71
5.2. Working hypothesis. Objectives	71
5.3. Materials and methods	71
5.4. Results	72
5.5. Discussions	73
5.6. Conclusions	74
6. Study 4 – Comparative evaluation of pro-oxidant and antioxidant markers after topical phenytoin and local photochemotherapy treatment in vitiligo	75
6.1. Introduction	75
6.2. Working hypothesis. Objectives	77
6.3. Materials and methods	77
6.4. Results	79
6.5. Discussions	81
6.6. Conclusions	82
7. Study 5 – Comparative clinical study of phenytoin and local PUVA therapy in vitiligo	83
7.1. Introduction	83
7.2. Working hypothesis. Objectives	85
7.3. Materials and methods	85
7.4. Results	87
7.5. Discussions	93
7.6. Conclusions	93
8. Study 6 – Quality of life in vitiligo patients	95
8.1. Introduction	95
8.2. Working hypothesis. Objectives	95
8.3. Materials and methods	96
8.4. Results	97
8.5. Discussions	103
8.6. Conclusions	105
9. General conclusions	107
10. The original elements of the thesis	109
REFERENCES	111
APPENDICES	
Appendix 1: RNA extraction following the TriReagent protocol	123
Appendix 2: RNS purification and microarray protocol (ARNc-Cy3, ARN-Cy5) following Qiagen (RNeasy® Mini kit)	124

Key words: vitiligo, phenytoin, local photochemotherapy, functional genomics, apoptosis, microarray, melanocyte cultures, in vitro release, oxidative stress, quality of life.

INTRODUCTION

Vitiligo is a skin disorder with unknown etiology despite numerous present hypotheses regarding the subject. Postulated therapeutic methods to treat this condition are multiple, among these, photochemotherapy plays a vital role in improving the aesthetic defect caused by vitiligo.

On the other hand, phenytoin (diphenylhydantoin), a commonly used anticonvulsant agent, has a multitude of effects that make it potentially useful in the treatment of vitiligo. Based on this hypothesis we conducted an experimental in vitro study on melanocyte culture research, to assess cell viability, growth and proliferation of melanocytes in phenytoin added cultures. Highlighting the phenytoin induced stimulating viability of melanocyte proliferation for the first time in the literature, implied the assessing of the "*in vivo*" vitiligo evaluation; this clinical trial appraised the degree of repigmentation obtained after local application of phenytoin compared with previously demonstrated to be effective methods in treating this condition, photochemotherapy respectively.

In a disease so complex and so poorly understood so far, it is required to evaluate the effect of hypothetical drug agent's effectiveness upon some etiopathogenic theories thought to be involved in triggering the disease. In this regard, we explored two of these theories, namely the theory of oxidative stress and apoptosis theories. In order to elucidate the complex pathologies, we completed a study of functional genomics analysis for the entire transcriptome by microarray analysis.

PRESENT STATE OF KNOWLEDGE

Vitiligo is a common dermatosis that affects 0.5-2% of the population and is characterized by the appearance of well defined depigmented macules and plaques, whose number and size increase gradually over time. Depigmentation is caused by the loss of functional melanocytes in the affected areas, but still the mechanism remains unknown.

Although many hypotheses have been issued to explain the etiology of this condition, each based on scientific evidence, none of them can completely explain the disappearance of melanocytes and standing mechanism for the acromic lesions, therefore vitiligo is currently considered to be a multifactorial disorder.

PERSONAL CONTRIBUTION

WORKING HYPOTHESIS. OBJECTIVES

Phenytoin, is currently used in the treatment of inflammatory skin disorders, the effect upon cellular immunity is potentially useful in the treatment of vitiligo, therefore the purpose of the research is to:

- Assess the effectiveness of phenytoin on melanocyte cultures;

- Assess gene expression levels by microarray reaction. Evaluate the involvement of apoptosis in vitiligo;
- Evaluate the balance between pro-oxidant and antioxidant enzyme systems agents in two comparative therapeutic methods;
- Emphasizing some serious arguments for or against the effectiveness of local applications of phenytoin in repigmentation of vitiligo lesions and comparative assessment of the effectiveness of local photochemotherapy (PUVA).

GENERAL METHODOLOGY

The project emphasizes 2 different research pathways:

- Experimental study
- Clinical research study

Study type: interventional experimental study

Targeted population: patients diagnosed with vitiligo, addressing the Dermatology Clinic service, with no local or systemic treatment at the time of the survey for the disorder.

STUDY 1. FUNCTIONAL GENOMIC STUDY OF APOPTOSIS IN VITILIGO

Introduction

In recent years, microarray technology was used to analyze gene expression patterns in a variety of skin diseases and is useful for designing individualized approaches to treat various skin disorders. The process of apoptosis is a distinctive pathway of cell death differentiated from necrosis by morphology and mechanism and plays a crucial role in cellular homeostasis.

Working hypothesis. Objectives

The functional genomics study follows the identifications and the study of genes involved in the cell signalling pathways that activate or respectively inhibit the mechanisms implied in vitiligo lesion development.

Objectives:

4. Transcriptomic tissue difference evaluation in vitiligo versus normal tissue for identifying genes involved in this pathology;
5. Assessment of altered pathways and molecular mechanisms involved in vitiligo etiopathogenesis;
6. Assessment of apoptotic process in vitiligo.

Materials and methods

Biological material

For functional genomics study, based on microarray analysis, we used biological tissue samples from 8 patients diagnosed with vitiligo. Two different skin biopsies were harvested from each patient, a fragment of the depigmented areas and another one from normal unaffected skin areas.

Microarray technology

For this study we used Agilent (Whole Human Genome) technology, that is capable to provide reliable and accurate information upon the entire cellular transcriptome.

Results

Total RNA extraction and purification

RNA extractions used Tri Reagent® (Sigma-Aldrich) technology and follows the classic protocol described by Chomczynski et al.

Qualitative evaluation and quantification of total RNA

RNA quantification required nanotechnology techniques according international microarray study protocols.

Quality control threshold was set for 28S/18S > 1.7 and RIN > 8 respectively.

After the concentration of each sample was properly evaluated, all RNAs were diluted with RNA-ase free water for a final concentration of 50 ng/μl.

Qualitative and quantitative analyses revealed specific electroferogram sites of good suitable RNA for undergoing studies.

Microarray probes (reporters) synthesis

Microarray probe synthesis is based upon a complementary DNA chain (cDNA), of messenger RNA followed by hybridisation and fluorochrome labelling (Cy 3 or Cy5) of a short segment of cRNA of the coding DNA.

Microarray probe hybridisation

Hybridisation required 825 ng of each specific probe for microarray analysis

Acquisition and image processing

The collection of microscopic DNA spots attached to a solid surface were detected and quantified by detection of fluorophore labelled targets to determine relative abundance of nucleic acid sequences in the target.

Bioinformatics analysis of the microarray obtained data

Text files obtained from the numerical colorimetric conversion of the data were used for further analysis. Analysis algorithm followed some steps: importing and normalizing data suppression controls marked spots filtering, summarizing

sequences, estimating missing values, differential analysis and generate a list of differently expressed genes.

The functional analysis of the gene expression

The functional genomics study identified 163 genes, with a different expression in the affected depigmented skin tissue, compared to pigmented nonaffected skin, with a total of 57 overexpressed genes and 106 downregulated gene.

The functional analysis for the analysed gene package used IPA computer soft programme. A number of 5 genes were therefore identified (DCT, TYR, RYP, SOX 10, MSH-R) to inactivate the canonical pathway implied in the pigmentation signalling and melanocytes development.

Apoptotic regulation in vitiligo

The assessment of apoptotic mechanisms was based on the analysis of 26 genes all evaluated in the functional microarray analysis. Our data highlighted a decreased value bellow 2.171 for the apoptotic mechanism in vitiligo compared to normal unaffected skin, with an adjusted p value of 4.35E-02.

Thus, the data obtained show a deficiency of the indirect pathways of the apoptotic mechanisms that do not include BCL2 family but other melanocyte-specific genes. So, our survey data show a weak involvement of *BCL2 / Bax pathway*.

Discussions

The vast majority of genes identified as being specific for vitiligo showed a lack of function, characterized by a underexpression of the vitiligo isolated transcript compared with that of similar genes in normal skin. Some of the downregulated genes involved in the synthesis of melanin (DCT, MC1R, OCA2, PMEL, Sox9, TYR, TYRP1), storage of melanin and L-tyrosine hydroxylation (TYR), melanin metabolism (TYRP1), melanocytes growth (MC1R) phosphatidylserine transport (MLAN) or epithelial cell development (Sox9, SOX10).

Also, most of the genes belonging to the BCL2 family with a anti-apoptotic activity: Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w or pro-apoptotic activity: Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik, Blk, Puma, with no statistically significant altered levels of expression.

Conclusions

The results of the study confirm the hypothesis that melanocytes originated from vitiligo affected skin lesions have an significant altered gene expression compared to normal pigmented nonaffected skin melanocytes.

STUDY 2. THE EFFECT OF PHENYTOIN ON IN VITRO MELANOCYTES PROLIFERATION

Introduction

Phenytoin (5, 5-diphenylhydantoin) is an effective and commonly prescribed anticonvulsant agent, used both local and systemic treatment of certain dermatological disorders.

Working hypothesis. Objectives

Previously published reports suggest the hypothesis that phenytoin may be a reliable option in the treatment of vitiligo, given the known immunomodulatory activity of facial pigmentation side effects observed during treatment of neurological conditions. The objective of this study is to evaluate the effect of phenytoin on normal human melanocyte cultures and assess the substance cytotoxic effects using colorimetric methods.

Materials and methods

- **Human normal in vitro melanocyte cultures** - a specific melanocyte cell lineage was acquired and grown in a special melanocyte culture.
- **Morphology** - the morphological aspect of the melanocytes was observed and documented by microscopic examination.
- **Cell proliferation** - was assessed using chemosensitivity or colorimetric methods to determine the number of viable dividing (proliferating) cells

Results

Statistical analysis shows that at low concentrations (0.1 mg/ml and 0.5 mg/ml) phenytoin stimulates growth and cell proliferation in the melanocytes cultures, viability was higher than that obtained for controls (melanocytes in culture). Slight increased phenytoin concentrations increase viability of melanocytes but later at higher values, the increase in the concentration of phenytoin shows a decrease in viability by 0001, with each administrated unit.

Discussions

This agent has a multitude of effects that make it potentially useful in the treatment of vitiligo, being postulated particularly because of the suppressant effect on cell-mediated immunity.

Conclusion

Although in the present there is no universal panacea for vitiligo, topical applications of phenytoin, which has inhibitory effects on cell-mediated immunity and has the ability to stimulate melanocytes at low concentrations, may be effective in treating this condition.

STUDY 3. IN VITRO EVALUATION OF PHENYTOIN RELEASE

Introduction

Currently, more or less permanent beneficial alternative therapeutic results are tested for vitiligo, in order to find the optimal method of treatment.

Working hypothesis

Assuming that phenytoin may be a viable option in the treatment of vitiligo, the objective of this study is to select the topical phenytoin products that give the better and faster results for specific use in subsequent trials.

Materials and methods

We prepared different topical phenytoin products: gel, hydrophilic creams and moisturisers aiming at the selection of these formulas in selecting the one that properly releases phenytoin.

In vitro assessment of phenytoin release

Using a cell consisting diffusions of a donor and a receiver, each a membrane-based cellulose acetate compartment. The amount of diffused phenytoin was then assessed by determining sample absorption at 220 nm.

Results

The graphic analysis revealed that the release of phenytoin increases progressively from the first hour, the values obtained being 47.25% for gel, 14.54% for hydrophilic cream and 1.25% for ointment, eight hours after application. Analysis shows that phenytoin gel releases the active product significantly faster than hydrophilic cream and ointment.

Discussions

This study shows that the gel is a suitable vehicle for topical preparation with phenytoin, resulting in a significantly higher in vitro release and faster than other

transporter studied, so therefore gel products will be selected for further clinical studies.

Conclusions

Knowing that low concentrations of phenytoin stimulates growth and cell proliferation in melanocyte cultures, the present study shows that based gel Carbopol 940 has the best ability in vitro release of phenytoin, which is useful for incorporation into a topical product.

STUDY 4. COMPARATIVE EVALUATION OF PRO-OXIDANT AND ANTI-OXIDANT MARKERS AFTER TOPICAL PHENYTOIN AND LOCAL PHOTOCHEMOTHERAPY TREATMENT IN VITILIGO

Introduction

Oxidative stress is defined by oxidative damage of the cell and therefore entire body caused by ROS. It is associated with a disruption between pro-oxidative/anti-oxidative balance in favour of the first component. Theory of oxidative stress in vitiligo melanocytes implies an increased intrinsic sensitivity to oxidative stress secondary to toxic intermediates of melanin precursors, or from other sources.

Working hypothesis. Objectives

Assuming the involvement of oxidative stress in vitiligo etiopathogenesis, I tried to evaluate the extent of this possible pathogenetic mechanism in determining the balance between pro-oxidant agents and antioxidant systems in the application of two therapeutic methods considered to reduce antioxidant components and also augment the oxidant levels, respectively topical PUVA therapy and local therapy with phenytoin

Materials and methods

Patients were included in the study to assess the oxidative stress markers in two different therapeutic methods, topical therapy with phenytoin gel 2% (group I) and local photochemotherapy (Psoralen and UVA - group II). Patients underwent skin biopsy of depigmented lesions both before and after three months alone to assess pro-oxidative/anti-oxidative balance. All measures were based upon malondialdehyde (MDA) and hydrogen donors (DH) indicators.

Results

The evaluation of these two therapeutic study methods show that both lead to a reduction in the level of oxidants and MDA respectively and also increase the level of antioxidants at the end of the treatment, namely DH. If antioxidative levels increases in 80% of cases for both of the applied therapeutic methods, the oxidantive level is observed to be superior in case of topical therapy with phenytoin, which causes a reduction in MDA levels in 90% of patients, while PUVA therapy reduces oxidative levels in only 70% of patients. Despite the obvious inverse correlation between levels of MDA and DH respectively for both types of treatment, MDA and DH correlations differences depending on the type PUVA therapy vs. phenytoin were not significantly different. These correlations are statistically insignificant, attributable to the fact that we evaluated a small sample of only 20 cases.

Discussions

MDA, as the final product of lipid peroxidation, and is currently accepted as a specific indicator of oxidative stress. DH capacity as an antioxidant marker signifies the skin's defence capacity of patients with vitiligo. This is the first study assessing comparative levels of MDA and DH tissue under the influence of two therapeutic methods, topical applications of local phenytoin and PUVA local therapy.

Conclusions

Vitiligo affected skin to topical phenytoin exposure reduces lipid peroxidation processes in the skin tissue, processes evaluated through MDA skin levels, similar to the therapeutic method known as local PUVA therapy. The same therapeutic method stimulates the skin protective antioxidant systems in this case through DH capacity.

STUDY 5. COMPARATIVE CLINICAL STUDY OF PHENYTOIN AND LOCAL PUVA THERAPY IN VITILIGO

Introduction

So far, none of the known therapeutic methods has not demonstrated full efficacy in the treatment of vitiligo, studies revealing that partially favourable results can be obtained using both medical and surgical methods.

Working hypothesis. Objectives

This study aims to evaluate the effectiveness of topical applications of phenytoin, assuming that this agent has effects that make it potentially useful in the treatment of vitiligo. Efficacy will be assessed versus local photochemotherapy (PUVA), proved

to be effective in repigmentation of vitiligo lesions in order to better subsequent therapeutic decisions in patients suffering from vitiligo.

Materials and methods

A prospective case-control study was designed to assess the effectiveness of these two therapeutic methods. 20 eligible patients were randomly assigned in groups of from 1:1 to either topical treatment with phenytoin (group I) or local photochemotherapy (Psoralen and UVA - group II). Therapy lasted 3 months. Evaluation of therapeutic response is achieved in three ways:

- a. Primary evaluation results: percentage of repigmentation in terms of patient perspective;
- b. Secondary assessment of results: percentage of repigmentation of lesions treated in terms of doctor / perspective and observation;
- c. Tertiary evaluation: the existence of adverse effects of therapy.

Results

In terms of primary evaluation results, the percentage of repigmentation from the patient's perspective reveals a satisfactory result in 30% of cases, both in group I and in group II, while the percentage of patients who reported they were moderately satisfied of this therapeutic method is slightly higher in the group of topical therapy with phenytoin (50%) compared with the group exposed PUVA therapy (40%).

In terms of secondary assessment results as a percentage of repigmentation of lesions treated in terms of doctor / observation and perspective, there is a discrete superiority of topical phenytoin therapy in 30% of cases resulting in repigmentation at the rate of 75-100% of the treated surface, unlike local PUVA therapy where the same percentage of repigmentation was achieved only in 20% of cases.

Discussions

Phenytoin (5,5-diphenylhydantoin), an anticonvulsant agent used both coetaneous and systemically in the treatment of certain skin disorders may be helpful in treating vitiligo. On the other hand, photochemotherapy is a method known to be effective in repigmentation of vitiligo lesions, a variety of agents being tested to establish effective photochemotherapy protocols.

Conclusions

In terms of the current clinical trial, topical applications of phenytoin proves to be an easy and effective method of treatment, comparable in terms of effectiveness

to other therapeutic methods established and proven to be effective. Repigmentation evaluation after phenytoin therapy, both from the patient's perspective and from the perspective of the doctor, shows a satisfactory result in a significantly higher percentage of superiority than for local PUVA therapy, although not statistically significant, opens new perspectives regarding treatment of vitiligo.

STUDY 6. QUALITY OF LIFE IN VITILIGO PATIENTS

Introduction

Vitiligo is a skin pigmentation disorder with a major impact on quality of life, affecting appearance often causing devastating psychological consequences. Current published data show that a causal relationship exists between stress and the onset of this disease.

Working hypothesis. Objectives

The objectives of the study are to assess the nature and extent of social and psychological difficulties associated to vitiligo and identifies relevant clinical determinants of quality of life.

Materials and methods

We assessed the nature and extent of social and psychological difficulties associated to vitiligo and their impact on compliance and response to treatment using the Dermatology Quality of Life Index (Dermatology Life Quality Index - DLQI) psychometrically validated in Romanian version of the DLQI questionnaire, was therefore applied to 40 patients included in the study.

Results

DLQI scores ranged from 0 to 21, mean \pm standard deviation was 8.17 ± 3.88 , showing a moderate effect of the disease on quality of life. It highlights the correlation as significant in terms of quality of life, and affected skin surface distribution of vitiligo lesions. An extended skin surface and a peripheral distribution in the exposed areas, significantly influences the quality of social relations and their aesthetic perception of skin disorder.

Discussions

In recent years special attention was paid to the psychological effects of various skin disorders and quality of life of these patients. The average performance obtained

from this study is higher than that obtained by Finlay and Khan in the 1994 study (7.3) and Kent and Al-Abadie in 1996 (4.82), but lower than that obtained by Parsad in 2003 (10.67)

Conclusions

Vitiligo significantly influence the quality of life without affecting morbidity and mortality so that from clinical perspective, assessing the quality of life should not be routinely excluded from clinical variables.

GENERAL CONCLUSIONS

- Functional genomics analysis, applied to the entire transcriptome, using assessment levels by reacting microarray gene expression identified 163 genes differently expressed in normal tissue from depigmented skin pigment, of which 57 genes were overexpressed and 106 genes downregulated. Also, the data obtained show a deficiency of apoptosis mechanism, revealing a weak involvement of BCL/Bax pathway.

- At low concentrations (0.1 - 0.5 mg / ml) phenytoin stimulates the growth and proliferation of melanocytes in vitro, highlighting the ability to stimulate melanocyte and therefore to be effective in treating this condition.

- Carbopol 940 gel based has the best in vitro ability to release of phenytoin, which is useful for incorporation into a topical product.

- In terms of assessing oxidative stress balance in the two therapeutic methods, the exposure of the affected by vitiligo skin to topical phenytoin reduces lipid peroxidation processes in the skin tissue and stimulate antioxidant protective systems.

- In terms of the clinical trial, topical applications of phenytoin prove to be an easy and effective method of treatment, comparable in terms of effectiveness to other therapeutic methods established and proven to be effective in medical studies, in this particular case photocemotherapy.

- Vitiligo significantly influences the quality of life of patients with concomitant impairment of daily activities, interpersonal relations and professional activity.

ORIGINAL ELEMENTS OF THE THESIS

In this paper I attempted an overall assessment of vitiligo, little known disease until now. So far, there are not completed in vitro studies showing the effect of phenytoin on melanocytes. The present study on normal human melanocytes has highlighted

melanocyte stimulating growth and proliferation at low concentrations of phenytoin, the first experimental study of its kind published to date.

Both clinical trial comparing topical therapy with phenytoin and local photochemotherapy and balance assessment of oxidative stress secondary to therapeutic application of the two methods, are currently the first of its kind, according to the literature, representing a starting point for future studies.

Functional genomics innovation study is to evaluate the entire transcriptome of vitiligo cell samples compared with normal tissue, a process with an important approach for a better understanding of the molecular mechanisms involved in vitiligo etiphatogenesis and also validates the characteristic phenotype in vitiligo.