

2024

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ**

**Cercetări experimentale privind efectul anti-psoriazis al unor
categorii de substanțe în aplicații topice**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

Prof. Univ. Dr. Coman Oana Andreia

Student-doctorand:

Necula căs. Nițescu Diana Ana Maria

Cuprinsul tezei

Introducere.....	1
1.Parteă generală – stadiul actual al cunoașterii	5
1.1.Psoriazisul – patogenie și concepte actuale de tratament topic și sistemic	5
1.2. ... Substanțe cu efect anti-psoriazis aflate în curs de cercetare non-clinică în tratamentul topic al psoriazisului.....	17
1.2.1. Modele experimentale animale folosite în diagnosticul și evaluarea tratamentului topic al psoriazisului.....	24
2. Parteă originală - Contribuții personale.....	28
2.1. Ipoteza de lucru și obiectivele generale.....	28
2.2. Metodologia generală a cercetării.....	28
2.3. Studiul 1- Evaluarea efectului anti-psoriazis al diclofenacului prin modelul cozii la șoarece	31
2.3.1. Introducere.....	31
2.3.2. Material și metodă	32
2.3.3. Rezultate	55
2.3.4. Discuții	61
2.3.5. Concluzii de etapă	67
2.4. Studiul 2- Evaluarea efectului anti-psoriazis al celecoxibului prin modelul cozii la șoarece	68
2.4.1. Introducere.....	68
2.4.2. Material și metodă	68
2.4.3. Rezultate	84
2.4.4. Discuții	89
2.4.5. Concluzii de etapă	93
2.5. Studiul 3 – Evaluarea efectului anti-psoriazis al asocierii de acid salicilic cu celecoxib prin modelul cozii la șoarece	93
2.5.1. Introducere.....	93
2.5.2. Material și metodă	94
2.5.3. Rezultate	104
2.5.4. Discuții	107
2.5.5. Concluzii de etapă	110
2.6. Concluzii generale și contribuții personale	111
Bibliografie:.....	118

1. Cercetări experimentale privind efectul anti-psoriazis al unor categorii de substanțe în aplicații topice - rezumat

1.1. Introducere

Psoriazisul reprezintă o boală cronică dermatologică, cu componentă inflamatorie și autoimună, ce apare ca rezultat al unui cumul de factori genetici predispozanți și factori declanșatori externi sau interni.[1] Fiind una din cele mai întâlnite patologii cronice din practica dermatologică este în același timp o provocare continuă în ceea ce privește tratamentul, cu scopul îmbunătățirii calității vieții pacienților și a creșterii complianței la tratament. În formele localizate și moderate de psoriazis se instituie tratament topic ca terapie unică sau adjuvant în asociere cu terapia sistemică.

Tratamentul topic al psoriazisului este actualmente limitat la câteva clase de substanțe medicamentoase printre care dermatocorticoizi, analogi de vitamina D, retinoizi, inhibitori de calcineurină, substanțe cu rol cheratolitic precum acidul salicilic și lactic. Principala linie de tratament topic este reprezentată de dermatocorticoizi, substanțe din clasa anti-inflamatoarelor steroidiene, care au demonstrat efect favorabil în această patologie însă cu dezavantajul unor reacții adverse redutabile, atât locale (atrofie tegumentară, suprainfecții locale, tahifilaxie) dar și sistемice prin inhibarea axului hipotalamo-hipofizo- corticosuprarenalian.[2]

Interesul în ultimii ani a fost centrat pe descoperirea de noi substanțe cu potențial anti-psoriazis atât în terapia topică, dar și în terapia sistemică. Numeroase studii au avut ca subiect central cercetarea efectului unor noi substanțe în patologia psoriazică sau îmbunătățirea formelor farmaceutice existente pentru anumite medicamente deja aprobate. În ceea ce privește efectul celecoxibului și al diclofenacului în aplicații topice pentru tratamentul psoriazisului nu sunt date disponibile.

În urma analizei literaturii de specialitate din ultimii ani în ceea ce privește terapia topică a psoriazisului, s-a concluzionat faptul că subiectul este de mare interes și s-a dovedit că cercetarea experimentală este încă esențială pentru studiul unor substanțe noi cu potențial efect anti-psoriazis sau pentru descoperirea unor mecanisme noi de acțiune implicate în acest sens, dar și în vederea îmbunătățirii unor formule deja utilizate pentru creșterea absorbției de la locul de acțiune sau a complianței.

În perioada 27.06.2019 și 09.07.2020 am realizat o analiză sistematică de literatură, care a avut ca scop cercetarea interesului științific în acest domeniu și identificarea

substanțelor noi testate cu efect anti-psoriazis, substanțelor deja cunoscute cu efect anti-psoriazis dar în formule noi (formă farmaceutică, doză, concentrație), model experimental folosit și mecanism de acțiune implicat.[3]

Interesul în ceea ce privește tratamentul topic al psoriazisului a urmat o tendință ascendentă în perioada 1951-2020, cu 6052 de articole publicate pe această temă din care 4572 în perioada 1995-2020.[3]

În ceea ce privește cercetările în domeniul terapiei topice a psoriazisului, tendința actuală este de a descoperi noi substanțe cu efect potențial anti-psoriazis și pe de altă parte de a îmbunătăți formele farmaceutice ale substanțelor deja aprobate dar și de cercetare a asocierilor diverse între două sau mai multe substanțe cu efect anti-psoriazis.[3]

În ceea ce privește substanțele deja cunoscute cu efect anti-psoriazis au fost testate substanțe precum ciclosporina, mometazona furoat în gel apazomal, emulsia cu calcipotriol, metotrexatul în combinație cu acidul salicilic, tazarotenul cu cineol 1%.[3]

Cercetările experimentale recente pe modele animale din domeniul terapiei topice anti-psoriazis cuprind substanțe cu mecanisme și căi de acțiune noi dar și substanțe deja cunoscute cu efect anti-psoriazis în formule topice îmbunătățite: licopen, acid salvianolic, albendazol, microARN antisens, calea BMP ca țintă terapeutică, timochinonă în vezicule etozomale, ulei de cătină (*Hippophae rhamnoides*), metotrexat cu acid salicilic în gel etozomal, nitidină, metotrexat în lipozomi deformabili 0,05%, 0,1%, extractul de *Melissa officinalis* spp. *Altissima*, calea FGF-7, BMX-010, proteinkinaza p38 ca țintă terapeutică cu BIRB796 ca inhibitor, tazaroten îmbogățit cu cineole în nanovezicule.[3]

Modelele de psoriazis la animale de laborator oferă avantajul studiului *in vivo* al procesului patologic dar și al unui potențial efect anti-psoriazis al unor substanțe. Principalele modele de psoriazis *in vivo* folosite în cercetările non-clinice sunt reprezentate de modelul cozii pentru psoriazis și modelul cu imiquimod. Pentru că psoriazisul reprezintă o boală multifactorială care nu apare în mod natural la șoarece, modelele experimentale folosesc ca parametri de evaluare diferite aspecte ale bolii precum examinarea clinică corespunzătoare scorului PASI, examinarea histopatologică, profilul citokinic ș.a.

Modelul cozii pentru psoriazis a fost utilizat pentru prima oară în anul 1964 de Jarett și Spearman și se bazează pe inducerea ortokeratozei în acele părți ale cozii de șoarece adult care prezintă în mod normal o diferențiere parakeratozică.[4] [5] Ca indicator al ortokeratozei se folosește grosimea stratului granular (care lipsește sau este minim în parakeratoză) având în vedere faptul că hipogranuloza este practic semnătura existenței

psoriazisului. Acest model a fost utilizat pentru demonstrarea efectului anti-psoriazis pentru mai multe substanțe aplicate topic. Modelul presupune folosirea de șoareci masculi cu greutate medie de 25-30 grame. Modelul se desfășoară pe parcursul a 10 zile și constă în administrarea locală a substanței de cercetat, zilnică, pentru două ore, în ocluzie, la nivelul porțiunii proximale a cozii. La finalul experimentului animalele sunt sacrificate după anestezie generală conform normelor de etică privind cercetarea pe animalul de laborator iar cozile sunt recoltate și se realizează examinarea histopatologică a pieselor. Se cercetează astfel prezența stratului granular și modificările asupra grosimii epidermice. Stratul granular este evaluat din punct de vedere calitativ dar și cantitativ prin raportarea lungimii stratului granular la lungimea totală a scalei, între doi foliculi piloși. Grosimea epidermică se măsoară de la joncțiunea dermo-epidermică la porțiunea inferioară a stratului cornos.

1.2. Ipoteza de lucru și obiectivele generale

Ipoteza de lucru de la care s-a plecat în cadrul experimentului este că diclofenacul și celecoxibul, substanțe din clasa anti-inflamatoarelor nesteroidiene, au efect anti-psoriazis.

În acest scop s-a folosit modelul cozii pentru psoriazis. Modelul se bazează pe inducerea ortokeratozei în acele părți ale cozii de șoarece adult care prezintă în mod normal o diferențiere parakeratozică. Ca indicator al ortokeratozei se folosește grosimea stratului granular (care lipsește sau este minim în parakeratoză). Modelul este bazat în principal pe morfometrie, fiind reproductibil și sensibil în evaluarea cantitativă a efectului anti-psoriazis al substanțelor de cercetat asupra procesului de diferențiere epidermică, clar afectată în psoriazis.

Scopul lucrării

Scopul lucrării este de a stabili, prin folosirea unor modele experimentale de evaluare a psoriazisului la animalul de laborator, efectul anti-psoriazis al unor categorii de substanțe precum unele antiinflamatoare nesteroidiene (diclofenac și celecoxib).

Obiective urmărite

1. Punerea la punct și validarea metodei experimentale de evaluare a psoriazisului la animalul de laborator, folosind modelul cozii.

2. Evaluarea histopatologică a efectului substanțelor de cercetat asupra cozii prin realizarea lamelor în colorație hematoxin-eozină .

3. Stabilirea posibilului mecanism prin care aceste substanțe determină efectul anti-psoriazis.

1.3. Metodologia generală a cercetării

Materiale și metode de lucru

Animale

S-au folosit șoareci masculi, adulți cu greutate de aproximativ 25 de grame. Șoarecii au fost cazați câte unul în cușcă cu acces *ad libitum* la apă și hrană pe toată durata experimentului. De asemenea, condițiile de mediu au fost constante pe toată durata experimentului (luminozitate, temperatură, umiditate).

S-a obținut avizul comisiei de etică (autorizație numărul 13110/27.10.2021) pentru studii non-clinice realizate pe animale de laborator conform legii nr. 43/2014 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice, cu completările ulterioare și a directivei 86/609/CEE din 24 Noiembrie 1986 privind apropierea actelor cu putere de lege și a actelor administrative ale statelor membre în ceea ce privește protecția animalelor utilizate în scopuri experimentale și în alte scopuri științifice.

Substanțe

S-au folosit substanțe achiziționate de la un producător de substanțe pure (Fagron, București).

Studiul experimental

Studiul experimental s-a desfășurat pe parcursul a 14 zile după cum urmează:

Animalele au fost divizate în grupuri:

Grup 1: grup control pozitiv (tretinoin 0,05 % în bază de unguent) – 6 animale

Grup 2: grup control negativ 1 (baza de unguent) – 6 animale

Grup 3: grup control negativ 2 (șoareci netratați) – 6 animale

Grup 4: test 1 – substanța test 1 în baza de unguent – 6 animale

Grup 5: test 2 – substanța test 2 în baza de unguent – 6 animale

Șoarecii au fost tratați cu 0,1 ml de unguent aplicat local în partea proximală a cozii timp de două ore, cu fixarea cu o bandă adezivă a unui cilindru de plastic în contact direct. La sfârșitul celor două ore, cilindrii au fost îndepărtați și cozile au fost spălate cu apă caldă. Această procedură s-a realizat o dată pe zi, 5 zile pe săptămână, 2 săptămâni consecutiv. S-au folosit câte 6 șoareci pe grup. Șoarecii au fost cântăriți la două zile. La două ore de la

ultimul tratament, șoarecii au fost sacrificați după anestezie generală conform normelor de etică privind cercetarea pe animalul de laborator, iar cozile au fost preparate histologic (fixare în 10 % formalină). S-au realizat secțiuni de aproximativ 4 μm grosime colorate cu hematoxilin-eozină.

Specimenele obținute în urma experimentului au fost analizate din punct de vedere histometric pentru:

A) **Lungimea stratului granular complet dezvoltat** în cadrul unei scale (s-au analizat 10 scale pe animal, 6 animale pe grup, 60 de măsurători pe grup);

B) **Lungimea scalei**, stabilită între doi foliculi piloși cu includerea glandei sebacee (s-au analizat 10 scale pe animal, 6 animale pentru fiecare grup, 60 de măsurători pe grup);

C) **Grosimea epidermică măsurată** între joncțiunea dermo-epidermică și partea inferioară a stratului cornos (s-au analizat 5 măsurători pe scală, 10 scale pe animal, 6 animale pe grup, 300 de măsurători în total).

Din aceste date (A-C) au fost calculați următorii parametri derivați conform *Bosman et al.* :

D) **Gradul de ortokeratoză** al scalei individuale exprimat ca raport procentual între A) divizat la B) și

E) **Intensitatea activității substanței (drug activity)** = $(OK_{stest} - OK_{control}) / (100 - OK_{control}) * 100$.

OK= ortokeratoza ca medie a parametrilor exprimată ca medie a parametrilor obținuți la punctul D) pentru substanța test (stest) respectiv pentru grupul control negativ 1 – baza de unguent

F) **Grosimea epidermică medie** a grupului calculată ca medie aritmetică a grosimii epidermice medii a fiecărui șoarece din cadrul grupului.

Din aceste calcule următorii 3 parametri sunt calculați pentru a evalua efectul substanței:

- 1) Gradul de ortokeratoză;
- 2) Intensitatea activității substanței;
- 3) Grosimea epidermică medie.

Pentru comparații statistice se folosește testul Kruskal-Wallis cu nivel de semnificație setat la $p \leq 0.05$.

Datele sunt prezentate ca valori medii.

Imaginile au fost prelucrate în programul ZEN Blue. Dimensiunile s-au calculat în micrometri.

2.Studiul 1- Evaluarea efectului anti-psoriazis al diclofenacului prin modelul cozii la șoarece

Clasa anti-inflamatoarelor nesteroidiene este folosită recent în tratamentul topic al keratozelor actinice, formațiuni cu potențial de transformare în carcinom spinocelular, întrucât prin inhibarea căii ciclooxigenazei 2 are loc inhibarea proliferării keratinocitare.[6,7] [8]

Studii din ultimii ani au demonstrat implicarea diclofenacului în controlul apoptozei celulare a keratinocitelor cu elemente de displazie.[9] [10]

Diclofenacul este aprobat în tratamentul topic al keratozelor actinice.[11] În baza de date *clinicaltrials.gov* până la data de 1 aprilie 2022 nu s-au identificat studii clinice în ceea ce privește efectul topic al diclofenacului în psoriazis. Mecanismul de acțiune implicat în vederea tratamentului keratozelor actinice e reprezentat de inhibarea COX-2 (ciclooxigenaza 2), întrucât această enzimă este implicată în proliferarea keratinocitară aberantă dar și în neoangiogenează.

S-au folosit două grupuri control negativ reprezentate de grupul de șoareci netratați și grupul de șoareci tratați cu vaselină, care e folosită ca bază de unguent. Experimentul s-a realizat în două etape. Într-o prima etapă s-a testat diclofenacul aplicat topic în concentrațiile de 1% și 2%. Pentru că rezultatele au fost satisfăcătoare s-a decis testarea unor concentrații mai mari de diclofenac de 4% și 8 %, cu grupuri martor control negativ și pozitiv, cu același protocol experimental.[12]

2.1.Rezultate în prima parte a experimentului

Gradul de ortokeratoză scade în următoarea ordine: tretinoin 0,05% > diclofenac 1% > diclofenac 2%.

Grosimea epidermică medie în ordine descrescătoare este următoarea: tretinoin 0,05% > baza de unguent > diclofenac 1% >diclofenac 2% > grupul șoarecilor netratați.

Intensitatea de acțiune medicamentoasă este în următoarea ordine descrescătoare: tretinoin 0,05% > diclofenac1% > diclofenac 2%.

Există diferență statistică între grupurile control negativ (șoareci netratați, grupul cu baza de unguent), grupul control pozitiv (tretinoin 0,05%) și grupurile cu diclofenac (1% și 2%) privind gradul de ortokeratoză. Grupurile control negativ (șoareci netratați, baza de unguent) diferă semnificativ statistic față de grupul control pozitiv (tretinoin 0,05%) dar și față de grupurile cu diclofenac (1% și 2%). Nu există diferență din punct de vedere statistic între grupul control pozitiv (tretinoin 0,05%) și grupurile cu diclofenac (1% și 2%).

2.2.Rezultate în a doua parte a experimentului

Gradul de ortokeratoză este crescut semnificativ statistic pentru concentrațiile mai mari de diclofenac (4% și 8%) față de martorul pozitiv (tretinoin 0,05%). Cea mai mare valoare a gradului de ortokeratoză a fost pentru diclofenac 4%.

Grosimea epidermică medie este în următoarea ordine descrescătoare: tretinoin 0,05% > vaselină > diclofenac 4% > diclofenac 8% > grupul șoarecilor netratați.

2.3.Concluzii de etapă

Modelul cozii utilizat în acest experiment cu folosirea celor două grupuri control negativ (șoareci netratați și baza de unguent – vaselina) și a grupului control pozitiv (tretinoin 0,05%) a fost validat de faptul că în grupul control negativ cu vaselină gradul de ortokeratoză nu a fost diferit din punct de vedere al semnificației statistice față de grupul șoarecilor netratați iar în grupul control pozitiv, cu tretinoin 0,05%, gradul de ortokeratoză a fost semnificativ crescut față de grupurile control negativ.

Diclofenacul 4% poate fi utilizat cu rezultate optime în ceea ce privește gradul de ortokeratoză (71,3%), intensitate de acțiune medicamentoasă superioară (66,16%), cu risc de reacții adverse mai redus prin folosirea unei concentrații inferioare.

3. Studiul 2 - Evaluarea efectului anti-psoriazis al celecoxibului prin modelul cozii la șoarece

Celecoxibul face parte din clasa anti-inflamatoarelor nesteroidiene, fiind un inhibitor selectiv de ciclo-oxigenază 2, cu risc mai scăzut de producere a reacțiilor adverse gastrointestinale, utilizat în tratamentul simptomatic al patologiilor reumatologice diverse. Celecoxibul este aprobat FDA încă din anul 1998 pentru utilitatea sa în tratamentul simptomatic al poliartritei reumatoide și al artrozei. Deși se consideră că riscul de producere al hemoragiilor gastrointestinale este mai mic comparativ cu inhibitorii neselectivi de ciclooxigenază, acesta există mai ales la persoanele cu risc crescut de

hemoragii gastro-intestinale. În plus, celecoxibul acționează și prin alte mecanisme precum legarea la caderina 11, considerată un factor de progresie a proliferării tumorale, inhibă anhidraza carbonică 2 și 3, cu un plus de proprietăți anti-neoplazice. [13,14] Absorbția intestinală a celecoxibului este foarte bună cu risc de toxicitate hepatică și renală. Recent au apărut studii cu privire la efectul celecoxibului aplicat topic în diferite dermatoze cu componentă inflamatorie sau auto-imună.

Experimentul s-a realizat în două etape. Într-o prima etapă s-a testat celecoxibul aplicat topic în concentrațiile de 1 % și 2%. Pentru că rezultatele au fost satisfăcătoare s-a decis testarea unor concentrații mai mari de celecoxib de 4% și 8% cu grupurile martor control negativ și pozitiv, folosind același protocol experimental.[12,15]

3.1.Rezultate obținute în prima parte a experimentului

Inducerea diferențierii keratinocitare, măsurată prin gradul de ortokeratoză este în următoarea ordine: celecoxib 2% > tretinoin 0,05% > celecoxib 1% > vaselină > șoareci netratați.

Grosimea epidermică medie înregistrată: tretinoin 0,05% > celecoxib 2% > vaselină > celecoxib 1% > șoareci netratați.

Intensitatea de acțiune scade în următoarea ordine: celecoxib 2% > tretinoin 0,05% > celecoxib 1%.

Nu există diferență din punct de vedere statistic între grupurile cu celecoxib 1% și 2% și grupul control pozitiv în ceea ce privește gradul de ortokeratoză

3.2.Rezultate obținute în a doua parte a experimentului

Gradul de ortokeratoză cel mai mare este pentru celecoxib 8%, urmat de celecoxib 4%, celecoxib 2% și tretinoin 0,05%.

Grosimea epidermică medie este în următoarea ordine: celecoxib 8% > tretinoin 0,05% > celecoxib 4% > vaselină > celecoxib 2% > șoareci netratați.

Intensitatea de acțiune medicamentoasă este în următoarea ordine: celecoxib 8% > celecoxib 2% > tretinoin 0,05%.

Ortokeratoza ca măsură a inducerii stratului granular a fost semnificativă pentru grupurile celecoxib 2%, 4% și 8% față de tretinoin 0,05%. Valorile obținute pentru

concentrațiile de 4% și 8% sunt apropiate și nu diferă din punct de vedere statistic. Acest fapt semnifică un posibil efect anti-psoriazis semnificativ statistic pentru cele trei concentrații de 2%, 4% și respectiv 8%.

În ceea ce privește grosimea epidermică medie s-a obținut semnificație statistică față de șoarecii netratați dar nu și față de cei tratați cu vaselină. Celecoxibul 4%, 8% și tretinoinul 0,05% au crescut semnificativ grosimea epidermică medie față de șoarecii netratați. Celecoxibul 8% și tretinoinul 0,05% au crescut semnificativ statistic grosimea epidermică medie față de celecoxib 2%.

Celecoxibul 8% a avut cel mai intens efect de inducere a gradului de ortokeratoză, urmat îndeaproape de celecoxib 4%. Toate concentrațiile de celecoxib au avut valori ale intensității de acțiune peste 50%, cu un maxim pentru celecoxib 8% (70,59%) și un minim pentru celecoxib 2% (52,16%).

3.3.Concluzii

Celecoxibul 4% și 8% au crescut gradul de ortokeratoză semnificativ statistic față de celecoxib 2%. Aceste rezultate sugerează faptul că se poate folosi unguentul cu celecoxib 4% cât și unguentul cu celecoxib 8%, cu obținerea unui efect similar din punct de vedere statistic.

Se poate considera că celecoxibul 4% poate fi folosit preferențial pentru că acesta conține o concentrație mai mică de substanță activă și deci un risc mai mic de reacții adverse sistemice sau locale.

4. Studiul 3 – Evaluarea efectului anti-psoriazis al asocierii de acid salicilic cu celecoxib prin modelul cozii la șoarece

Acidul salicilic reprezintă un compus cu aplicare topică aprobat pentru tratamentul diferitelor patologii caracterizate prin afectarea diferențierii și proliferării celulare precum ihtiozele, psoriazisul sau dermatita seboreică. Acidul salicilic inhibă ireversibil ciclooxigenazele (COX-1 și COX-2) stopând astfel conversia acidului arahidonic în prostaglandine și tromboxan. Utilitatea sa în bolile reumatice se datorează efectului anti-inflamator și analgezic. Formulele topice cu acid salicilic tratează hiperproliferarea celulară caracterizată de hiperkeratoză, așa cum se întâmplă în acnee, veruci, psoriazis, keratoză pilară ș.a.

Efectul acidului salicilic la aplicare topică este de tip keratolitic și antiseptic. La concentrații mai mici efectul este de tip keratoplastic, de oprire a keratinizării anormale, pe când la concentrații mai mari, de peste 1%, acidul salicilic determină keratoliză, probabil și prin pH-ul scăzut ce duce la distrugerea stratului cornos, cu descumare. Prin efectul keratolitic acidul salicilic este utilizat în asociere cu substanțe topice din alte clase medicamentoase precum glucocorticoizii, întrucât poate facilita accesul substanței active la locul de acțiune prin îndepărtarea scuamelor din placa psoriazică. De asemenea, în perioadele de ameliorare clinică a psoriazisului, acidul salicilic este folosit cu succes cu limitarea folosirii glucocorticoizilor locali.[16]

Acidul salicilic este folosit pentru sinteza acidului acetilsalicilic, care e administrat oral, unul dintre cel mai utilizate produse farmaceutice. Sub formă de esteri, amide și săruri, reprezintă materia primă pentru multe produse farmaceutice. [17]

Dacă acidul salicilic este administrat pe suprafețe extinse de tegument poate fi absorbit sistemic și poate induce salicism, mai ales la copilul mic sau la nou-născut.

Celecoxibul 1% aplicat topic în hidrogel a demonstrat beneficii în aplicare locală la pacienții cu sindromul mână-picior după chimioterapie.[18]

Studii recente *in vivo*, folosind modelul de inflamație cu TPO au arătat potențiala utilitate a celecoxibului aplicat topic în afecțiuni de tip dermatită atopică, eczeme și psoriazis, prin faptul că celecoxibul a redus inflamația și nivelul de citokine proinflamatorii (TNF- α , IL-1 β , IL-6), hiperproliferarea și infiltrarea neutrofilică.[19,20]

Celecoxibul reprezintă un inhibitor selectiv de COX-2 care a demonstrat proprietăți anti-proliferative satisfăcătoare în studiul precedent, de aceea am dorit să verificăm dacă există un efect de potențare medicamentoasă între acidul salicilic și celecoxib.

Cele trei grupuri test utilizate în cadrul studiului au fost cu acid salicilic 2%, celecoxib 2% și cu asocierea acid salicilic 2% cu celecoxib 2%, mixate în baza de unguent, cu grupuri control negativ și pozitiv, cu același protocol experimental.

4.1. Rezultate

Gradul de ortokeratoză este în următoarea ordine: celecoxib 2% și acid salicilic 2% > celecoxib 2% > tretinoin 0,05% > acid salicilic 2% > vaselină > șoareci netratați.

Grosimea epidermică medie este în următoarea ordine: tretinoin 0,05% > acid salicilic 2% > vaselină > celecoxib 2% și acid salicilic 2% > celecoxib 2% > șoareci netratați.

Intensitatea de acțiune medicamentoasă este în următoarea ordine: celecoxib 2% și acid salicilic 2% > celecoxib 2% > tretinoin 0,05% > acid salicilic 2%.

Tretinoinul 0,05% și acidul salicilic 2% cresc gradul de ortokeratoză similar, fără să existe diferențe din punct de vedere statistic. Celecoxibul 2% crește gradul de ortokeratoză fie singur, fie în asociere cu acidul salicilic, semnificativ statistic față de toate celelalte grupuri testate. Gradul de ortokeratoză este mult mai mare atunci când se asociază acid salicilic (72,21% versus 59,43%). Din aceste date se poate concluziona că există un efect de sumare medicamentoasă între acid salicilic și celecoxib.

5. Concluzii și contribuții personale

5.1. Concluzii

Premisele lucrării

Tema de cercetare este reprezentată de evidențierea efectului anti-psoriazis al unor substanțe din clasa AINS, respectiv diclofenac și celecoxib, prin model experimental la șoarece. În acest scop s-a utilizat modelul cozii, un model clasic *in vivo*, bazat pe morfometrie, valid, care poate permite studiul efectului unei substanțe asupra epidermului în general precum și a stratului granular, în special. Este astfel posibilă evaluarea inducerii diferențierii epidermice ca marker al acțiunii anti-psoriazice precum și a intensității de acțiune a unei substanțe.

Protocolul experimental a presupus aplicarea locală a substanței de testat, amestecată în baza de unguent, la nivelul porțiunii proximale a cozii în cantitate de 0,1 mililitri unguent, în ocluzie, pentru două ore. Procedura a fost repetată 5 zile pe săptămână, două săptămâni. La sfârșitul experimentului, după eutanasia animalelor conform cu normele etice, cozile au fost recoltate și fixate în formol 10% și pregătite specific pentru evaluare histopatologică. Șoarecii au fost împărțiți în grupuri control negativ, control pozitiv și grupuri test, câte șase șoareci pentru fiecare grup.

Modelul cozii pentru psoriazis reprezintă un model *in vivo* de cercetare a efectului asupra diferențierii epidermice a unor substanțe aplicate topic, prin calcularea celor trei

parametri principali: gradul de ortokeratoză procentuală, intensitatea de acțiune medicamentoasă și grosimea medie epidermică. Modelul se bazează pe proprietatea anumitor substanțe de a induce diferențierea stratului granular care este absent sau foarte slab reprezentat în psoriazis.

Evaluarea morfometrică s-a realizat prin analiza imaginilor privind:

- Lungimea stratului granular continuu dezvoltat între doi foliculi piloși;
- Lungimea scalei definită ca distanța între doi foliculi piloși.

Din aceste măsurători s-au calculat următorii parametri:

- gradul de ortokeratoză ce reprezintă gradul de inducere a diferențierii epidermice normale, definită ca raport procentual între valorile obținute la cele două măsurători anterioare. Dimensiunile sunt calculate în micrometri;

- intensitatea de acțiune a substanței exprimată ca valori procentuale între gradele de ortokeratoză exprimate ca valori pentru grupurile test, raportate la valorile grupurilor control negativ și pozitiv. Prin acest parametru se poate compara intensitatea activității anti-psoriazice în condiții experimentale diferite;

- grosimea epidermică medie este calculată ca medie aritmetică a cinci măsurători de la nivelul părții inferioare a joncțiunii dermo-epidermice până la nivelul stratului cornos, pentru o scală (între doi foliculi piloși), realizându-se astfel evaluarea a 10 scale pentru fiecare șoarece, 300 de măsurători în total. Grosimea epidermică medie poate fi un marker indirect al creșterii stratului granular;

Primul experiment a folosit ca substanțe test diclofenacul în concentrații de 1%, 2%, 4% și respectiv 8%. Grupul martor pozitiv a fost tratat cu tretinoin 0,05% iar grupurilor martor negativ li s-a aplicat baza de unguent și respectiv nu li s-a aplicat nici o substanță. Grupul martor pozitiv cu tretinoin 0,05% are rezultate semnificative statistic în ceea ce privește gradul de ortokeratoză procentuală, grosimea epidermică medie și intensitatea de acțiune fapt ce arată validitatea testului.

5.1.4. Rezultate în ceea ce privește diclofenacul:

A. Gradul de ortokeratoză ca măsură a inducerii diferențierii epidermice a fost semnificativă statistic față de grupurile control negativ pentru cele patru concentrații de diclofenac testate ($p < 0.05$). Faptul că diclofenacul în concentrații 1% și 2% a avut efecte de stimulare a diferențierii stratului granular comparabile cu a unui retinoid topic, a creat premisele cercetării efectelor unor concentrații mai mari de 4%, respectiv 8%, folosind

același model experimental. În concluzie, diclofenacul are o acțiune anti-psoriazică în ceea ce privește inducerea ortokeratozei, deci a diferențierii epidermice, dependentă de doză cu minim de acțiune la 1% și maxim la 8%, semnificative față de martorii negativi. În plus, concentrațiile de 4% și 8% au avut semnificație statistică și față de tretinoin 0,05%, considerat standardul de bază asupra acțiunii pe stratul granular.

B. Intensitatea de acțiune medicamentoasă procentuală a substanțelor în inducerea stratului granular este în jurul valorii 27% - 28% pentru concentrațiile de diclofenac 1% respectiv 2% și 66 % pentru 4% și respectiv 8%. Rezultă de aici faptul că diclofenacul prezintă o intensitate de acțiune anti-psoriazică, de inducere a stratului granular, dependentă de concentrație, cu rezultate superioare martorului pozitiv, tretinoinul 0,05% (cu intensitate de acțiune de aproximativ 36%), pentru concentrațiile de 4% și 8%.

C. Grosimea epidermică medie pentru grupurile cu diclofenac 1%, 2%, 4% și 8% este ne semnificativă statistic față de grupurile control negativ. Grupurile 1%, 2% și 8% diferă semnificativ statistic față de grupul cu tretinoin 0,05% și sunt ne semnificative față de martori. Diclofenacul 4% nu diferă semnificativ statistic față de grupul control pozitiv, din punct de vedere al grosimii epidermice medii. Faptul că aceste substanțe nu au indus o creștere semnificativă statistic a grosimii epidermice medii față de martorii negativi nu poate să excludă un posibil efect anti-psoriazic obiectivat prin creșterea stratului granular.

Concentrația optimă din punct de vedere a efectului anti-psoriazis și a minimizării reacțiilor adverse locale sau sistemice, în cadrul modelului experimental folosit, a unguentului cu diclofenac este de 4%, conform datelor obținute. În urma cercetării considerăm că unguentul în concentrație de 4% este varianta optimă pentru că se obține un grad de diferențiere keratinocitară important, ne semnificativ statistic față de unguentul cu diclofenac 8%. Această concentrație este asemănătoare cu cea aprobată FDA pentru tratamentul topic al keratozelor actinice.

Rezultate în ceea ce privește celecoxibul.

A. Gradul de ortokeratoză ca măsură a inducerii stratului granular a fost semnificativă pentru grupurile celecoxib 2%, 4% și 8% față de tretinoin 0,05%. Valorile obținute pentru concentrațiile de 4% și 8% sunt apropiate și nu diferă din punct de vedere statistic. Acest fapt arată un posibil efect anti-psoriazis semnificativ statistic pentru cele trei concentrații de 2%, 4% și respectiv 8%.

B. Intensitatea de acțiune medicamentoasă.

În ceea ce privește intensitatea de acțiune medicamentoasă, pentru toate concentrațiile de celecoxib s-a observat o relație doză-intensitatea efectului, celecoxibul 8% având cel mai intens efect de inducere al gradului de ortokeratoză (70%) urmat de celecoxib 4% (66,56 %).

C. Grosimea epidermică medie

În ceea ce privește grosimea epidermică medie s-a obținut semnificație statistică față de șoarecii netratați dar nu și față de cei tratați cu vaselină. Valorile cele mai mari ale grosimii epidermice medii au fost pentru celecoxib 8%.

În concluzie, referitor la concentrațiile optime de celecoxib care s-ar putea testa ulterior în studii clinice ca și în cazul diclofenacului, optăm pentru concentrația de 4% care oferă o intensitate a efectului comparabilă cu a celecoxibului 8% dar cu reacții adverse sistemice potențial mai mici.

Rezultate privind asocierea acidului salicilic 2% cu celecoxib 2%.

A.Gradul de ortokeratoză a fost crescut semnificativ statistic de către unguentul cu acid salicilic 2%, celecoxib 2% și asocierea celecoxib 2% cu acid salicilic 2% comparativ cu grupul șoarecilor netratați. Acidul salicilic 2% a crescut gradul de ortokeratoză similar cu tretinoinul 0,05%. Asocierea acidului salicilic 2% la celecoxib 2% a crescut gradul de ortokeratoză semnificativ statistic în plus și față de grupul cu tretinoin 0,05%

B.Intensitatea de acțiune medicamentoasă procentuală a fost de 52,16% pentru unguentul cu celecoxib 2%, 32,97% pentru unguentul cu acid salicilic 2% și respectiv 85,14% pentru unguent cu celecoxib 2% asociat cu acid salicilic 2%. Aceste rezultate semnifică o relație de sumare între efectul acidului salicilic 2% și a celecoxibului 2%.

C.Grosimea epidermică medie nu a fost crescută semnificativ pentru nici unul din cele trei grupuri (celecoxib 2%, acid salicilic 2% și asocierea celecoxib 2% cu acid salicilic 2%).

Asocierea celecoxibului 2% cu acid salicilic 2% determină un efect de sumare medicamentoasă. Acest efect este verificat prin faptul că atunci când s-a testat acidul salicilic în concentrația de 2% sau celecoxibul 2% separat, gradul de ortokeratoză a fost

mai mic în timp ce la asocierea celor două substanțe gradul de ortokeratoză a fost mult mai mare, a crescut cu aproape 20%.

Deși mecanismul de obținere a efectului antiproliferativ al clasei anti-inflamatoarelor nesteroidiene e considerat inhibarea ciclo-oxigenazei 2, este posibil ca și alte mecanisme să fie implicate în acest sens. Cercetări ulterioare sunt necesare în vederea stabilirii acestor mecanisme.

5.2. Contribuții personale

Am testat două substanțe din clasa anti-inflamatoarelor nesteroidiene (diclofenac și celecoxib) pentru efectul anti-psoriazis, efect care nu a mai fost studiat, conform bazelor de date disponibile până la demararea studiului.

Tema de cercetare este reprezentată de evidențierea efectului anti-psoriazis al unor substanțe din clasa AINS, respectiv diclofenac și celecoxib la șoarece. În acest scop s-a utilizat modelul cozii, un model clasic *in vivo*, bazat pe morfometrie, valid, care poate permite studiul efectului *in vivo* al unei substanțe asupra epidermului în general precum și a stratului granular, în special. Este astfel posibilă evaluarea inducerii diferențierii epidermice ca marker al acțiunii anti-psoriazice precum și a intensității de acțiune a unei substanțe.

Diclofenacul 3% este utilizat în formațiuni premaligne precum keratozele actinice. Celecoxibul este în prezent în unele studii non-clinice și clinice pentru utilizarea topică, dar nici unul din aceste studii nu au testat eficacitatea acestor substanțe *in vivo* la animale de laborator, în modele de psoriazis.

Originalitatea acestei teze este dată de faptul că este prima dată când cele două substanțe sunt testate în studii non-clinice *in vivo* la șoareci.

În această lucrare am pus la punct un model experimental clasic bazat pe morfometrie, dar a cărui validitate a fost probată de rezultatele semnificativ statistice obținute pentru martorul control pozitiv cu tretinoin.

Pe baza acestui model evaluarea s-a realizat utilizând un sistem de măsurare obiectivă prin metodologia de lucru folosită.

Parametrii rezultați și în special gradul de ortokeratoză s-a obținut prin evaluarea prezenței stratului granular ca indicator al activității anti-psoriazice. Un alt parametru deosebit de important a fost intensitatea de acțiune medicamentoasă, exprimată ca parametru derivat din gradul de ortokeratoză, care permite compararea intensității în condiții experimentale diferite și raportate la un efect maximal.

Rezultatele obținute au întărit ipotezele de lucru cu care s-a pornit în desfășurarea tezei, în sensul ca s-au descris efecte anti-psoriazice atât pentru diclofenac cât și pentru celecoxib astfel:

- pentru unguentul cu diclofenac s-a obținut o intensitate a efectului medicamentos dependentă de concentrație, cea mai mare la 8%, superioară chiar tretinoinului, care este standardul de bază și martorul control pozitiv.

- deoarece intensitatea efectului anti-psoriazis a fost aproximativ egală pentru concentrațiile de 4% și 8 % putem propune ca pentru studiile ulterioare non-clinice și clinice să se ia în considerare diclofenacul 4% având în vedere că raportul eficacitate-siguranță este optim.

- pentru unguentul cu celecoxib, s-a evidențiat o importantă relație doză-efect iar intensitatea de acțiune medicamentoasă a fost relativ asemănătoare pentru concentrațiile de 2%, 4% și 8%, cu valorile cele mai mari pentru concentrația de 8%. În cazul celecoxibului propunem concentrația de 4% pentru studii viitoare datorită unui raport eficacitate-siguranță optim.

Celecoxibul este un inhibitor selectiv de COX recent aprobat pentru utilizare locală, fapt ce argumentează importanța rezultatelor cercetării noastre privind efectul topic anti-psoriazis și deschide noi direcții de cercetare pentru noi posibile efecte topice ale acestei substanțe.

De remarcat că celecoxibul aparține inhibitorilor selectivi de ciclooxigenază 2 deci e posibil ca aceste efecte topice să fie efecte de clasă și pentru alți coxibi, ipoteze care s-ar putea confirma.

Ca o privire de ansamblu se poate afirma că celor două anti-inflamatoare nesteroidiene studiate în prezenta lucrare, diclofenacul și celecoxibul, substanțe deja utilizate în practica de mai mulți ani și cu efecte analgezice și antiinflamatoare foarte bine demonstrate inclusiv topic, li s-au relevat în urma acestor cercetări noi valențe terapeutice, rezultatele urmând să fie testate ulterior în studii non-clinice dar mai ales clinice.

În plus, celecoxibul, un inhibitor selectiv de ciclooxigenază 2 care nu a mai fost utilizat până la demararea studiului în aplicări topice, a demonstrat o nouă valență terapeutică în tratamentul local al psoriazisului. Această posibilă utilizare terapeutică deschide noi orizonturi privind implicarea ciclooxigenazei 2 în patogeneza bolilor inflamatorii cutanate prin care se numără și psoriazisul, boli care ar putea beneficia și de alte abordări terapeutice decât cele clasice (glucocorticoizi, inhibitori de calcineurină, analogi de vitamina D etc). Posibila introducere în terapia topică a acestor inhibitori de ciclooxigenază singuri sau în asociere cu acidul salicilic dar și cu alte substanțe deja aflate în uz deschide noi perspective în terapia psoriazisului dar și a altor afecțiuni inflamatorii (dermatite, erupții postmedicamentoase).

Rezultatul la asocierea acidului salicilic cu celecoxib este interesant prin obținerea unui efect de sumare, acidul salicilic 2% întărind efectul celecoxibului 2% prin sumarea acțiunilor anti-psoriazice. Această asociere ar putea permite pe de o parte scăderea concentrațiilor de celecoxib administrat topic cu scăderea posibilelor reacții adverse sistemice după absorbție transcutană și pe de altă parte ar aduce beneficii proprii ținând cont de intensitatea acțiunii sale medicamentoase, prin sumarea acțiunii asupra ciclooxigenazei 2.

Bibliografie selectivă

1. Lowes, M.A.; Suárez-Fariñas, M.; Krueger, J.G. Immunology of Psoriasis. *Annu Rev Immunol* **2014**, *32*, 227–255, doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120225.
2. Nițescu, D.; Alecu, M.; Coman, L.; Georgescu, S.; Coman, O. Topical Immunomodulatory Therapy in Topical and Experimental Dermatology. *Dermatovenerologia Journal* **65(4): 33-41**.
3. Nițescu DAM, Mușetescu A, Nițescu M, Costescu M, Coman OA Experimental Research in Topical Psoriasis Therapy (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*. **2021**, *22(3):971*, doi:doi: 10.3892/etm.2021.10403.
4. Bosman, B. Testing of Lipoxygenase Inhibitors, Cyclooxygenase Inhibitors, Drugs with Immunomodulating Properties and Some Reference Antipsoriatic Drugs in the Modified Mouse Tail Test, an Animal Model of Psoriasis. *Skin Pharmacol* **1994**, *7: 324–334*.
5. Bosman, B.; Matthiesen, T.; Hess, V.; Friderichs, E. Quantitative Method for Measuring Antipsoriatic Activity of Drugs by the Mouse Tail Test. *Skin Pharmacol* **1992**, *5:41–48*.
6. Bakry, O.; Samaka, R.; Shoeib, M.; Abdel Aal, S. Nuclear Factor Kappa B and Cyclo-Oxygenase-2: Two Concordant Players in Psoriasis Pathogenesis. *Ultrastruct Pathol*. **2015**, *39(1):49-61*.
7. Thomas, G.; Herranz, P.; Balta Cruz, S.; Parodi, A. Treatment of Actinic Keratosis through Inhibition of Cyclooxygenase-2: Potential Mechanism of Action of Diclofenac Sodium 3% in Hyaluronic Acid 2.5%. *Dermatol Ther* . **2019**, *32(3):e12800*., doi:doi: 10.1111/dth.12800.
8. Campione, E.; Paternò, E.; Candi, E.; Falconi, M.; Constanza, G.; Diluvio, L.; Terrinoni, A.; Bianchi, L.; Orlandi, A. The Relevance of Piroxicam for the Prevention and Treatment of Nonmelanoma Skin Cancer and Its Precursors. *Drug Des Devel Ther*. **2015**, *9: 5843–5850*.
9. Nelson, C. Diclofenac Gel in the Treatment of Actinic Keratoses. *Ther Clin Risk Manag*. **2011**, *7: 207–211*., doi:doi: 10.2147/TCRM.S12498.
10. Fecker, L.F.; Stockfleth, E.; Braun, F.K.; Rodust, P.M.; Schwarz, C.; Köhler, A.; Leverkus, M.; Eberle, J. Enhanced Death Ligand-Induced Apoptosis in Cutaneous SCC Cells by Treatment with Diclofenac/Hyaluronic Acid Correlates with

Downregulation of c-FLIP. *Journal of Investigative Dermatology* **2010**, *130*, 2098–2109, doi:10.1038/jid.2010.40.

11. Martin, G.M.; Stockfleth, E. Diclofenac Sodium 3% Gel for the Management of Actinic Keratosis: 10+ Years of Cumulative Evidence of Efficacy and Safety. *J Drugs Dermatol* **2012**, *11*, 600–608.

12. Nițescu, D.A.-M.; Păunescu, H.; Ștefan, A.E.; Coman, L.; Georgescu, C.C.; Stoian, A.C.; Gologan, D.; Fulga, I.; Coman, O.A. Anti-Psoriasis Effect of Diclofenac and Celecoxib Using the Tail Model for Psoriasis. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 885, doi:10.3390/pharmaceutics14040885.

13. Zhu, J.; Huang, J.-W.; Tseng, P.-H.; Yang, Y.-T.; Fowble, J.; Shiau, C.-W.; Shaw, Y.-J.; Kulp, S.K.; Chen, C.-S. From the Cyclooxygenase-2 Inhibitor Celecoxib to a Novel Class of 3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase-1 Inhibitors. *Cancer Res* **2004**, *64*, 4309–4318, doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-4063.

14. Weber, A.; Casini, A.; Heine, A.; Kuhn, D.; Supuran, C.T.; Scozzafava, A.; Klebe, G. Unexpected Nanomolar Inhibition of Carbonic Anhydrase by COX-2-Selective Celecoxib: New Pharmacological Opportunities Due to Related Binding Site Recognition. *J Med Chem* **2004**, *47*, 550–557, doi:10.1021/jm030912m.

15. Nitescu, D.A.-M.; Paunescu, H.; Gologan, D.; Mihai, A.; Stoian, A.C.; Coman, O.A. The Effect of Topical Celecoxib as an Anti-Psoriasis Agent. *Maedica (Bucur)* **2022**, *17*, 805–811, doi:10.26574/maedica.2022.17.4.805.

16. Massiot, P.; Pinto, P.C.; Leclerc-Mercier, S.; Rasmont, V.; Piraccini, B.M.; Rudnicka, L.; Reygagne, P.; Melo, D.F.; Vano-Galvan, S.; Wu, W.; et al. Clinical Benefit and Tolerance Profile of a Keratolytic and Hydrating Shampoo in Subjects with Mild to Moderate Psoriasis. Results from a Double-blind, Randomized, Vehicle-controlled Study. *J of Cosmetic Dermatology* **2023**, *22*, 2050–2053, doi:10.1111/jocd.15693.

17. *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*; O'Neil, M.J., Merck Sharp and Dohme Research Laboratories, Eds.; 13. ed.; Merck: Whitehouse Station, NJ, 2001; ISBN 978-0-911910-13-1.

18. Shayeganmehr, D.; Ramezannia, F.; Gharib, B.; Rezaeilaal, A.; Shahi, F.; Jafariazar, Z.; Afshar, M. Pharmaceutical and Clinical Studies of Celecoxib Topical Hydrogel for Management of Chemotherapy-Induced Hand-Foot Syndrome. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **2023**, *396*, 1571–1581, doi:10.1007/s00210-022-02339-8.

19. Rahman, S.; Haque, R.; Raisuddin, S. Potential Inhibition of 12- *O* -Tetradecanoylphorbol-13-Acetate-Induced Inflammation, Hyperproliferation, and Hyperplasiogenic Responses by Celecoxib in Mouse Skin. *Cutaneous and Ocular Toxicology* **2023**, 1–10, doi:10.1080/15569527.2023.2295843.
20. Chun, K.-S. Celecoxib Inhibits Phorbol Ester-Induced Expression of COX-2 and Activation of AP-1 and P38 MAP Kinase in Mouse Skin. *Carcinogenesis* **2003**, 25, 713–722, doi:10.1093/carcin/bgh076.

Lista cu lucrările științifice publicate

1. **Nițescu, DAM.**; Mușetescu, A.; Nițescu, M.; Costescu, M.; Coman, OA. Experimental Research in Topical Psoriasis Therapy (Review). *Exp. Ther. Med.* 2021, 22, 971, PMID: 34335913, PMCID: PMC8290406, doi: 10.3892/etm.2021.10403, IF:2.7. (Studiu cuprins în capitolul 1).

2. **Nițescu, DAM.**; Păunescu, H.; Ștefan, AE; Coman, L.; Georgescu, CC.; Stoian, AC; Gologan, D; Fulga, I.; Coman, OA. Anti-Psoriasis Effect of Diclofenac and Celecoxib Using the Tail Model for Psoriasis. *Pharmaceutics* 2022, 14, 885. PMID: 35456720, PMCID: PMC9025614, DOI:10.3390/pharmaceutics14040885, IF:5.4. (Studiu cuprins în capitolul 2).

3. **Nițescu DAM,** Păunescu H, Gologan D, Mihai A, Stoian AC, Coman OA, The Effect of Topical Celecoxib as an Anti-Psoriasis Agent. *Maedica -a journal of clinical medicine,* 2022; 17(4): 805-811. PMID: 36818260, PMCID: PMC9923066, DOI: 10.26574/maedica.2022.17.4.805. (Studiu cuprins în capitolul 2)