

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“IULIU HAȚIEGANU” CLUJ-NAPOCA**

**EFFECTUL PORFIRINELOR ASUPRA
CARCINOAMELOR CUTANATE - STUDIU PE
CULTURI DE CELULE CARCINOMATOASE**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**DOCTORAND:
MIRELA SUSAN**

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC:
PROF. DR. RODICA COSGAREA**

2011

CUPRINS

Cuprins	1
Listă de abrevieri	4
Introducere	5
Partea I – Partea generală	
Capitolul 1: Terapia fotodinamică – generalități	7
1.1 De la lumină la terapie fotodinamică	7
1.2 Mecanism de acțiune	8
1.2.1 Reacții fotochimice de tip I și II	8
1.2.2 Mecanismele distrucției tumorale	10
1.3 Substanțe fotosensibilizante	12
1.3.1 Acidul 5-aminolevulinic (5-ALA) și metilesterul 5-ALA	12
1.3.2 Fotosensibilizantii de generația a IIa	14
1.4 Surse de lumină	16
Capitolul 2 : Aplicațiile terapiei fotodinamice în dermatologie	18
2.1 Terapia fotodinamică în leziuni premaligne și maligne	18
2.1.1 Keratoza actinică	18
2.1.2 Carcinomul bazocelular	20
2.1.3 Boala Bowen	25
2.1.4 Boala Paget extramamară.....	27
2.1.5 Neoplazia vulvară și anală intraepitelială.....	27
2.1.6 Limfomul cutanat.....	28
2.2 Terapia fotodinamică în alte dermatoze	28
2.2.1 Acneea vulgară	29
2.2.2 Psoriazis	31
2.2.3 Veruci vulgare și genitale	32
2.2.4 Morfeea și lichenul scleros	34
2.2.5 Leishmanioza cutanată	34
2.2.6 Rejuvenarea facială	35
Capitolul 3: Efecte adverse ale terapiei fotodinamice	37
3.1 Efecte adverse acute.....	37

3.2 Efecte adverse cronice.....	39
Partea II – Partea specială	
Capitolul 4: Studiu experimental – testarea porfirinelor pe culturi primare de keratinocite și celule carcinomatoase	40
4.1 Scopul cercetării	40
4.2 Material și metodă	41
4.2.1 Materialul de studiu	41
4.2.1.1 Culturile celulare primare	41
4.2.1.2 Substanțe fotosensibilizante testate	43
4.2.2 Metodă de lucru	47
4.2.2.1 Evaluarea localizării fotosensibilizanților de studiu la nivel celular	47
4.2.2.2 Evaluarea citotoxicității și fototoxicității fotosensibilizanților de studiu asupra keratinocitelor și celulelor carcinomatoase	48
4.2.2.3 Determinarea tipului de moarte celulară indusă de fotosensibilizanții de studiu	49
4.3 Rezultate	51
4.3.1 Evaluarea localizării fotosensibilizanților de studiu la nivel celular	51
4.3.2 Evaluarea citotoxicității și fototoxicității fotosensibilizanților de studiu asupra keratinocitelor și celulelor carcinomatoase	52
4.3.2.1 Evaluarea citotoxicității și fototoxicității induse de 5-ALA asupra keratinocitelor și celulelor carcinomatoase	52
4.3.2.2 Evaluarea citotoxicității și fototoxicității induse de TSPP asupra keratinocitelor și celulelor carcinomatoase	55
4.3.2.3 Evaluarea citotoxicității și fototoxicității induse de TMP și Zn-TMP asupra keratinocitelor și carcinomatoase	57
4.3.2.4 Evaluarea citotoxicității și fototoxicității induse de fotosensibilizanții de studiu în asociere cu chitosan asupra keratinocitelor și celulelor carcinomatoase ...	60
4.3.3 Determinarea tipului de moarte celulară indusă de fotosensibilizanții de studiu	63
4.3.3.1 Evaluarea apoptozei celulelor carcinomatoase expuse la 5-ALA	63
4.3.3.2 Evaluarea apoptozei celulelor carcinomatoase expuse la TSPP	64
4.3.3.3 Evaluarea apoptozei celulelor carcinomatoase expuse la TMP și Zn-TMP	65

4.4	Discuții	69
4.5	Concluzii	74
Capitolul 5: Studiu clinic comparativ între terapia fotodinamică și cura chirurgicală în tratamentul carcinomului bazocelular.....		76
5.1	Material și metodă	76
5.1.1	Grupul A - terapia fotodinamică.....	77
5.1.2	Grupul B – excizia chirurgicală.....	79
5.2	Rezultate.....	79
5.2.1	Caracteristicile pacienților	79
5.2.2	Rata de răspuns clinic și histopatologic la tratament	83
5.2.2.1	Lotul tratat prin PDT.....	83
5.2.2.2	Lotul tratat prin excizie chirurgicală.....	85
5.2.3	Evaluarea cosmetică.....	86
5.2.4	Efecte adverse.....	88
5.3	Cazuri clinice tratate prin PDT	89
5.4	Discuții	101
5.5	Concluzii	105
Capitolul 6: Concluzii generale		107
Bibliografie		109
Articole publicate		130

Cuvinte cheie: terapie fotodinamică, acid 5-aminolevulinic, carcinom bazocelular, porfirine, celule carcinoatoase, fototoxicitate, apoptoză.

Cancerle cutanate non-melanocitare sunt în prezent cele mai frecvente tipuri de cancer la populația caucaziană; incidența lor a crescut constant în întreaga lume în ultimele decenii în contextul agresiunii actinice și a creșterii expunerii la alți carcinogeni, cu variații geografice în funcție de climă, expunerea la soare și fototip cutanat. Incidența în creștere a carcinoamelor cutanate a dus la dezvoltarea unor noi forme de tratament cu rezultate estetice și funcționale cât mai bune.

În prezent opțiunile terapeutice pentru carcinoamele bazocelulare sunt: chirurgia, crioterapia, radioterapia, tratamentul topic cu 5-fluorouracil sau Imiquimod și terapia fotodinamică; alegerea metodei terapeutice depinde de localizarea leziunii, mărimea,

tipul clinic, precum și de preferința pacientului și asocierile morbide, ținând cont, pe de o parte, de necesitatea asigurării unei cure radicale și, pe de altă parte, de necesitatea asigurării unui aspect estetic satisfăcător.

Terapia fotodinamică reprezintă o metodă relativ nouă în tratamentul carcinoamelor cutanate care utilizează agenți de fotosensibilizare activați prin iradiere cu lumină la o lungime de undă corespunzătoare pentru a induce moartea unor anumite tipuri de celule, prin formarea oxigenului în stare de singlet și a altor radicali activi citotoxici.

Teza este alcătuită din două părți: partea teoretică și partea de contribuții personale. În partea teoretică am realizat o sinteză a datelor din literatură, iar partea specială este structurată în două capitole: un studiu experimental și un studiu clinic.

În cadrul studiului experimental am testat activitatea fotodinamică a 4 substanțe fotosensibilizante pe culturi primare de keratinocite și celule carcinoatoase umane – 5-ALA - acidul 5-aminolevulinic; TSPP - 5,10,15,20-tetra-(p-sulfonato-fenil) porfirina; TMP - 5,10,15,20-tetra-(p-metoxifenil) porfirina și compusul său cu zinc (Zn-TMP). De asemenea am testat o substanță nouă, chitosan, urmărind efectul administrării concomitente a chitosanului cu agenții fotosensibilizanți asupra culturilor celulare iradiate.

În al doilea capitol al părții speciale am efectuat un studiu clinic comparativ între terapia fotodinamică și excizia chirurgicală în tratamentul carcinoamelor bazocelulare cu aprecierea ratei de răspuns la tratament, precum și a aspectului estetic postterapeutic

STUDIU EXPERIMENTAL – TESTAREA PORFIRINELOR PE CULTURI PRIMARE DE KERATINOCITE UMANE ȘI CELULE CARCINOMATOASE

Scopul cercetării

Studiul își propune evaluarea activității fototoxice a unor biocompozite multifazice cu porfirine și chitosan, cu posibile aplicații în terapia fotodinamică a cancerelor cutanate. Experimentele au fost realizate în cadrul unui program cercetare de excelență CEEEX nr. 102/2006 intitulat “Biocompozite cu porfirine cu aplicabilitate în terapia fotodinamică a tumorilor maligne cutanate - PORFIDERM”, în colaborare cu Institutul Național de Cercetare - Dezvoltare pentru Chimie și Petrochimie București și Institutul Național de Cercetare - Dezvoltare pentru Tehnologii Izotopice și Moleculare Cluj Napoca. Experimentele au fost efectuate în Laboratorul de Cercetare al Clinicii Dermatologie Cluj Napoca, în colaborare cu Laboratorul de Cercetare al Institutului Oncologic „Ion

Chiricuță” Cluj Napoca și Catedra de Fiziologie a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj Napoca.

Material și metodă

S-au utilizat ca fotosensibilizanți acidul 5-aminolevulinic (5-ALA), 5,10,15,20-tetra-(p-sulfonato-fenil)-porfirina(TSPP),5,10,15,20-tetra-(p-metoxifenil)porfirina (TMP) și compusul său cu zinc (Zn-TMP). Testările in vitro s-au realizat pe culturi celulare tumorale primare obținute de la pacienți cu carcinoame bazocelulare și pe culturi primare de keratinocite, obținute din biopsii de tegument normal, utilizând compuși fotosensibilizanți (FS), chitosan și FS asociați cu chitosan. Toți FS utilizați în studiu au fost testați pentru citotoxicitatea lor în absența luminii (toxicitate la întuneric) și după iradiere (fototoxicitate). Viabilitatea a fost evaluată prin **testul cu MTS** (3-4,5-dimetiltiazol-2-yl-5-3-carboximetoxifenil-2-4-sulfofenil-2H-tetrazolium).

Maniera propusă de noi pentru a detecta modificările în morfologia celulară consecutive tratamentului cu FS este printr-o metodă imunocitochimică – cu Anexina V – FITC, procedeu utilizat într-o varietate de sisteme celulare. Am utilizat pentru acest test **kitul de apoptoză Annexin V- FITC** de la BD Biosciences care conține anexina V recombinantă conjugată cu FITC (izotiocianat de fluoresceină).

Rezultate

Pe culturile primare de keratinocite nu s-a înregistrat efect fototoxic pentru nici una dintre substanțele testate; pe culturile primare de celule carcinoatoase am obținut efect fototoxic pentru toate cele 4 substanțe fotosensibilizante, dependent de doza de fotosensibilizant și de doza de iradiere. Timpul de incubare a fost diferit: 4 ore pentru 5-ALA și 24 ore pentru TSPP, TMP și Zn-TMP. Efectul fototoxic a fost mai intens pentru Zn-TMP comparativ cu TMP.

În urma expunerii celulelor carcinoatoase la diferite diluții de chitosan (0,01 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml), rezultatele obținute au arătat că acest compus nu este toxic la concentrații mai mici de 0,5 mg/ml, viabilitatea celulară fiind peste 90%. Am utilizat pentru acest experiment concentrația de 0,5 mg/ml. Pe culturile primare de celule carcinoatoase, administrarea asociată a chitosanului cu substanțele fotosensibilizante a dus la o creștere a supraviețuirii celulare după expunere la lumină în medie cu 20% comparativ cu aceleași concentrații de fotosensibilizator fără chitosan (efect citoprotector).

După însămânțarea pe lame de cultură speciale a celulelor carcinomatoase, tratare cu substanțe fotosensibilizante și expunere la lumină roșie, procentul celulelor apoptotice crește direct proporțional cu doza de substanță fotosensibilizantă pe liniile de celule carcinomatoase – fig.1.

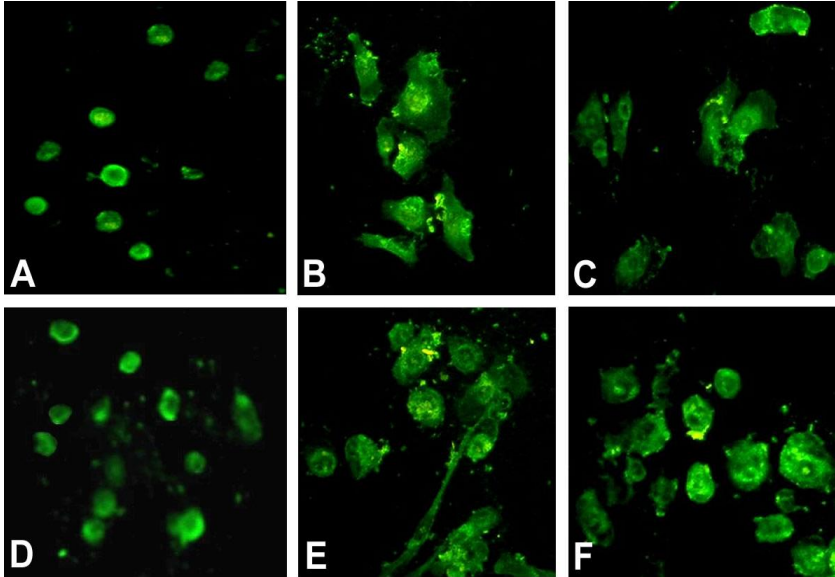


Figura 1. Celule carcinomatoase primare incubate cu TMP și Zn-TMP și iradiate cu lumină roșie – 6 J/cm^2 .

A și D: grupul de control (celule fără fotosensibilizant);

B și C: celule incubate cu TMP și Zn-TMP (concentrația de $5 \mu\text{g/ml}$ și iradiate);

E și F: celule incubate cu TMP și Zn-TMP (concentrația de $50 \mu\text{g/ml}$ și iradiate).

Concluzii

1. Tipurile de celule studiate prezintă un răspuns diferit: pe culturile primare de keratinocite nu s-a înregistrat efect fototoxic pentru nici una dintre substanțe, fenomen explicat probabil prin selectivitatea substanțelor fotosensibilizante de a se concentra preferențial în celulele tumorale.
2. Pe culturile primare de celule carcinomatoase, toate porfirinele testate (5-ALA, TSPP, TMP și Zn-TMP) au exercitat efect fototoxic dependent de doza de fotosensibilizant administrată precum și de doza de iradiere.
3. Administrarea asociată a chitosanului cu substanțele fotosensibilizante a dus la o creștere a supraviețuirii celulare în medie cu 20% după expunere la lumină comparativ cu aceleași concentrații de fotosensibilizator fără chitosan (efect citoprotector), deci chitosanul nu reprezintă un adjuvant în terapia fotodinamică a tumorilor cutanate.

4. În urma incubării cu fotosensibilizanti și expunere la lumină roșie, moartea celulelor tumorale se produce în două moduri: prin apoptoză sau necroză; pentru porfirinele testate s-a produs moartea celulară prin apoptoză, procentul celulelor apoptotice crescând într-o manieră dependentă de doza de fotosensibilizant administrată.
5. Rezultatele acestui studiu in vitro pot fi utilizate în clinică pentru îmbunătățirea tratamentului carcinoamelor bazocelulare sau altor afecțiuni tumorale cutanate.

STUDIUL CLINIC COMPARATIV ÎNTRE TERAPIA FOTODINAMICĂ ȘI CURA CHIRURGICALĂ ÎN TRATAMENTUL CARCINOMULUI BAZOCELULAR

Scopul acestui studiu este de a stabili eficacitatea și avantajele terapiei fotodinamice versus excizie chirurgicală în tratamentul carcinoamelor bazocelulare.

Material și metodă

Am efectuat un studiu prospectiv, randomizat, comparativ între terapia fotodinamică cu acid 5-aminolevulinic (5-ALA) și tratamentul chirurgical al carcinoamelor bazocelulare. 72 pacienți cu 94 carcinoame bazocelulare au fost incluși în studiu în perioada noiembrie 2008 – iulie 2010 și urmăriți până în decembrie 2010.

Rezultate

În total, au fost tratați 72 pacienți cu 94 carcinoame bazocelulare: 32 pacienți cu 48 carcinoame bazocelulare au fost tratați prin terapie fotodinamică, iar la 40 pacienți cu 46 carcinoame s-a efectuat excizie chirurgicală. Caracteristicile pacienților au fost similare între cele două grupuri tratate și sunt redată în tabelul 1.

Caracteristici	Grup A (PDT)	Grup B (chirurgie)
1. Sex M/F	17/15	21/19
2. Vârsta medie	65 (51-85)	66 (49-90)
3. Fototip cutanat		
I	3	3
II	21	19
III	12	13
IV	1	1
4. Localizare leziuni		
Față/scalp	21	20
Gât/trunchi	24	24
Membre	3	2
5. Număr leziuni/pacient		
1 leziune	21	33
2 leziuni	7	5
3 leziuni	3	1

4 leziuni	1	1
6. Forma clinică		
superficial	31	29
nodular	17	17

Tabelul 1. Caracteristicile pacienților incluși în studiu.

Urmărirea mediană a fost 12 luni pentru ambele grupuri tratate, cu variații cuprinse între 4 și 26 luni de la inițierea terapiei. În grupul tratat prin PDT rata de răspuns complet a fost 95,83% (46 cazuri din 48 tratate) cu o recidivă după 12 luni de la efectuarea celei de-a 2-a ședințe PDT și un caz non-responsiv la tratament; în grupul tratat chirurgical rata de răspuns complet a fost 95,65% (44 cazuri din 46 tratate) cu o recidivă la 12 luni după excizia chirurgicală și o excizie incompletă.

Răspunsul cosmetic a fost net superior în favoarea terapiei fotodinamice versus excizie chirurgicală, atât din punctul de vedere al investigatorilor, cât și al pacienților. La 12 luni după tratament, din cele 48 cazuri tratate prin PDT 37 au prezentat un răspuns cosmetic excelent (77,08%), iar la 11 cazuri răspunsul cosmetic a fost evaluat ca bun (22,92%).

Concluzii

1. Rezultatele acestui studiu au demonstrat că PDT este la fel de eficientă ca tratamentul chirurgical, în ceea ce privește rata de răspuns complet la 12 luni (95,83% - PDT versus 95,65% - excizie chirurgicală).
2. Din cele 48 cazuri tratate prin terapie fotodinamică, 43 cazuri au fost tratate prin 2 ședințe PDT, 3 cazuri au necesitat a 3-a ședință PDT, 1 caz a prezentat recidivă la 12 luni după tratament, iar 1 caz a fost considerat non-responsiv.
3. Din cele 46 cazuri tratate prin intervenție chirurgicală, la 2 cazuri s-a practicat reexcizie (1 caz cu examen histopatologic cu margini de rezecție pozitive și 1 caz recidivat la interval de 1 an de la tratamentul chirurgical apreciat histopatologic ca excizat complet).
4. PDT s-a dovedit a fi o metodă de tratament superioară chirurgiei în ceea ce privește aspectul estetic postterapeutic:
 - în grupul A 37 cazuri din cele 48 tratate prin PDT au prezentat un răspuns cosmetic excelent (77,08%);
 - în grupul B tratat chirurgical doar 3 cazuri au prezentat un răspuns excelent postterapeutic (6,52%); în acest grup majoritatea pacienților au prezentat un răspuns cosmetic moderat (47,82%).

Bibliografie selectivă:

1. Wolf P. Photodynamic therapy in dermatology: state of the art. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2001;15:508–509.
2. Taub AF. Photodynamic therapy in dermatology: history and horizons. *J Drugs Dermatol* 2004;3:S8-S25.
3. Oleinick NL, Morris RL, Belichenko T. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem Photobiol Sci* 2002;1:1-21.
4. Babilas P, Landthaler M, Szeimies RM. Photodynamic therapy in dermatology. *Eur J Dermatol* 2006;16(4):340-348.
5. Morton CA, McKenna KE, Rhodes LE. Guidelines for topical photodynamic therapy: update. *Br J Dermatol* 2008;159(6):1245-1266.
6. Zelickson BD. Mechanism of action of topical minolevulinic acid. In: Goldman MP, Dover JS, Alam M. *Procedures in cosmetic dermatology: photodynamic therapy*. Amsterdam:Elsevier,2008:1:2-9.
7. Uehlinger P, Zellweger M, Wagnieres G. 5-Aminolevulinic acid and its derivatives: physical chemical properties and protoporphyrin IX formation in cultured cells. *J Photochem Photobiol B* 2000;54:72-80.
8. Moreira LM, dos Santos FV, Lyon JP, Costa M, Pacheco-Soares C, et al. Photodynamic therapy: porphyrins and phtalocyanines as photosensitizers. *Aust J Chem* 2008;61(10):741-754.
9. . Lehmann P. Methyl aminolaevulinate photodynamic therapy: review of clinical trials in the treatment of actinic keratoses and nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 2007; 156: 793–800.
10. Rhodes LE, de Rie M, Enstrom Y, et al. Photodynamic therapy using topical methyl aminolevulinate versus surgery for nodular basal cell carcinoma: results of a multicenter randomized prospective trial. *Arch Dermatol* 2004;140:17–23.
11. Vinciullo C, Elliot T, Francis D, Gebauer K, Spelman L, et al. Photodynamic therapy with topical methyl aminolaevulinate for ‘difficult-to-treat’ basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2005;152:765-772.
12. Hosterd K, Thissen M.R, Nelemans P, Kelleners – Smeets N.W, janssen R.L, et al. Fractionated 5-aminolaevulinic acid-photodynamic therapy vs surgical excision in the

treatment of nodular basal cell carcinoma: results of a randomized controlled trial. Br J Dermatol 2008 Sep;159(4):864-870.

13. Luo Y, Chang CK, Kessel D. Rapid initiation of apoptosis by photodynamic therapy. Photochem Photobiol 1996;63:528–534.

14. Qi L.F, Xu Z.R, Jiang X. Cytotoxic activities of chitosan nanoparticles and copper-loaded nanoparticles. Bioorg Med Chem Lett 2005;15:1397-1399.

CURRICULUM VITAE

DATE PERSONALE

Nume: Susan

Prenume: Mirela

Data nașterii: 20 iulie 1976

Domiciliul: Strada Tatra nr. 10/3, Cluj-Napoca

Starea civilă: căsătorită, 1 copil

Naționalitate: română

Email: drmirelasusan@yahoo.com; drmirelasusan@dermavision.ro

STUDII

- gimnaziale: 1986 – 1990 - Școala Generală nr. 2 Hațeg, jud. Hunedoara;
- liceale: 1990 – 1994 - Liceul Sanitar Hunedoara;
- superioare: 1996 – 2002 - Universitatea de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca, Facultatea de Medicină Generală.

EXPERIENȚĂ PROFESIONALĂ

- 2003-2005: medic rezident în specialitatea oncologie medicală;
- 2005-2009: medic rezident în specialitatea dermatovenerologie și doctorand cu frecvență la UMF Cluj Napoca;
- 2007-2009: activitate de cercetare: obținerea de culturi primare de keratinocite, fibroblaști, melanocite, celule carcinoatoase, testări in vitro ale citotoxicității și fototoxicității pe linii celulare umane în Laboratorul de Cercetare al Clinicii Dermatologie Cluj-Napoca;
- 2007-2010: activitate didactică – stagii UMF “Iuliu Hațieganu” Cluj Napoca, Facultatea de Medicină Generală și Stomatologie, an VI;
- octombrie 2009: promovarea examenului de medic specialist dermatovenerolog cu media 9,63;
- 2009 - 2010: medic specialist dermatovenerologie Laurus medical clinics Cluj Napoca.
- 2010 – prezent: medic specialist dermatovenerologie Centrul Medical Dermavision Cluj Napoca.

Schimburi de experiență, stagii în străinătate:

- curs practic de pregătire în terapia fotodinamică sub supravegherea Prof. Dr. Lasse Braathen, președintele Societății Europene de Terapie Fotodinamică, Spitalul Saint Louis, Paris, martie 2007.

PREGĂTIRE POSTUNIVERSITARĂ

- curs postuniversitar “Actualități în diagnosticul și tratamentul limfoamelor maligne ganglionare și extraganglionare”, iulie 2003;
- curs postuniversitar “Actualități în tratamentul durerii”, ianuarie 2005;
- curs postuniversitar “Actualități în oncologia medicală”, martie 2005;
- certificat de competență lingvistică – limba engleză, acordat de UMF “Iuliu Hatieganu”, 2005, Cluj –Napoca;
- curs “Conduita medicului dermato- venerolog în infecțiile transmisibile sexual”, București, decembrie 2005;
- curs practic postuniversitar “Dermatologie chirurgicală și cosmetică”, martie 2007, Cluj –Napoca;
- curs postuniversitar “Dermatoscopia- metodă de diagnostic în leziunile pigmentare”, noiembrie 2007, Cluj –Napoca;
- curs postuniversitar “Terapii bazate pe lumina inteligentă - actualități”, martie 2008, București;
- curs postuniversitar “Toxina botulinică în medicina antiaging”, martie 2010, București;
- curs postuniversitar “Aplicațiile mezoterapiei în medicină”, iunie 2010, București;
- curs postuniversitar “Diagnostic și tratament al melanomului cutanat”, iunie 2010, Cluj Napoca;
- curs postuniversitar “Fillere – acid hialuronic - Juvederm”, septembrie 2010, București;
- curs postuniversitar “Peelinguri, dermabraziune”, septembrie 2010, București;
- curs postuniversitar “Peelinguri chimice”, octombrie 2010, București.

ACTIVITATE ȘTIINȚIFICĂ

Lucrări publicate in extenso:

- “Tratamentul lichenului plan”, Victorina Macovei, Rodica Cosgarea, Sorina Dănescu, Simona Șenilă, Ioana Bâldea, **Mirela Susan**, Acta Dermatologica Transilvanica, vol 1-2, 2007;
- “Utilitatea terapiei fotodinamice în dermatologie”, **Mirela Susan**, Rodica Cosgarea, Dermatovenerol, 2009;54:131-135.
- “Photodamaging effects of porphyrins and chitosan on primary human keratinocytes and carcinoma cell cultures”, **Mirela Susan**, Simona Șenilă, Ioana Bâldea, Victorina Macovei, Simina Dreve, Rodica Mariana Ion, Rodica Cosgarea, International Journal of Dermatology, 2011,50(3):280-286, ISSN 1365-4632, factor de impact 1,177.

Lucrări comunicate:

- “Cancerul gastric – analiza cazuisticii pe o perioadă de 10 ani, factori de pronostic, supraviețuire”- Viola Gaal, Cristian Moldovan, **Mirela Susan**, Andreea Gombos, Zilele Institutului Oncologic Cluj-Napoca, octombrie 2003;
- “Limfoamele gastrice – analiza cazuisticii tratate în IOCN în perioada 1997-2001” - Adela Văcar, Doris Pelau, **Mirela Susan**, Cristian Moldovan, Zilele Institutului Oncologic Cluj-Napoca, octombrie 2003;
- “Chimioterapia peros în tratamentul cancerului ovarian recidivat”- Adela Văcar, Doris Pelau, **Mirela Susan**, Alin Sârbu, Al XIV-lea congres al Societății Române de Radioterapie și Oncologie Medicală, Arad, septembrie 2004;

- “Valoarea Interferonului ca tratament adjuvant în melanom” – **Mirela Susan**, Adriana Poruțiu, Nicolae Todor, Adela Văcar, Sesiunea Jubiliară 75 ani de la înființarea Institutului Oncologic Cluj-Napoca, octombrie 2004;
- “Rolul protector al apei termale Herculane asupra keratinocitelor și fibroblaștilor de cultură” – Rodica Cosgarea, Simona Șenilă, **Mirela Susan**, Ioana Bâldea, Conferința Națională de Dermatologie, Sinaia, noiembrie 2007;
- “Variatatea clinică și dermatoscopică a melanomului” – Rodica Cosgarea, Loredana Ungureanu, Daniela Ștefănescu, Simona Șenilă, **Mirela Susan**, Ruxandra Cutuș, Adrian Baican, Conferința Națională de Dermatologie, Sinaia, noiembrie 2007;
- “Pyoderma gangrenosum – dermatoză neutrofilică cu fațete etiopatogenetice diverse” – Rodica Cosgarea, Simona Șenilă, **Mirela Susan**, Veronica Moisil, Ioana Bâldea, Conferința Națională de Dermatologie, Sinaia, noiembrie 2007;
- “Cytotoxic effects of photodynamic therapy with 5,10,15,20 tetra- (p-sulphonate-phenyl)-porphyrin on primary normal human keratinocytes and carcinoma cell cultures” – Rodica Cosgarea, Simona Șenilă, Ioana Baldea, **Mirela Susan**, Rodica Mariana Ion, 5th EADV Spring Symposium, Istanbul, mai 2008;
- “Photodynamic therapy with 5 delta amino levulinic acid and chitosan on primary normal human keratinocytes and carcinoma cell cultures” – Simona Șenilă, Rodica Cosgarea, **Mirela Susan**, Ioana Bâldea, Simina Dreve, 5th EADV Spring Symposium, Istanbul, mai 2008;
- “Evaluation of chitosan cytotoxicity on primary normal human cultured fibroblasts” – Ioana Bâldea, Rodica Cosgarea, Simona Șenilă, **Mirela Susan**, Simina Dreve, 5th EADV Spring Symposium, Istanbul, mai 2008;
- “Apoptosis induced by photodynamic therapy with 5 delta amino levulinic acid and 5,10,15,20 tetra- (p-sulphonate-phenyl)-porphyrin on primary normal human keratinocytes and carcinoma cell cultures” – **Mirela Susan**, Rodica Cosgarea, Ioana Bâldea, Simona Șenilă, Mariana Ion, 5th EADV Spring Symposium, Istanbul, mai 2008;
- “Study of phototoxic effects of ALA and TSP on primary human keratinocytes and carcinoma cell cultures. The evaluation of cytotoxic and phototoxic effects of chitosan on cell cultures” - Rodica Cosgarea, Simona Șenilă, Ioana Bâldea, **Mirela Susan**, Simina Dreve, Mariana Ion, The 10th Congress of the Romanian Society of Physiological Sciences, iunie 2008, Cluj-Napoca;
- “Utilitatea dermatoscopiei în decizia chirurgicală în cazul nevilor atipici” – Rodica Cosgarea, Loredana Ungureanu, **Mirela Susan**, Simona Șenilă, Conferința Națională de Dermatologie, Sibiu, octombrie 2008;
- “Genetical mutations in patients with dystrophic epidermolysis bullosa” Cosgarea Rodica, Sorina Dănescu, Simona Șenilă, **Mirela Susan**, Victorina Macovei, Ioana Bâldea, 6th EADV Spring Symposium, aprilie 2009, București, România;
- “The role of dermoscopy in the surgical decision for the melanocytic nevi” – Rodica Cosgarea, Loredana Ungureanu, Simona Șenilă, **Mirela Susan**, Ruxandra Cutuș, 6th EADV Spring Symposium, aprilie 2009, București, România;
- “The influence of herculane thermal water on the viability of cultured keratinocytes and fibroblasts”, Rodica Cosgarea, **Mirela Susan**, Victorina Macovei, Ioana Bâldea, Ovidiu Bălăcescu, 6th EADV Spring Symposium, aprilie 2009, București, România;

- “Our experience in the treatment and surveillance of malignant melanoma patients” – Rodica Cosgarea, **Mirela Susan**, Loredana Ungureanu, Simona Șenilă, George Dindelegan, Gheorghe Cobzac, 6th EADV Spring Symposium, aprilie 2009, București, România;
- “Protective role of the herculane thermal water on the primary human cultured keratinocytes and fibroblasts”, Cosgarea Rodica, **Susan M**, Macovei V, Baldea I, Bălăcescu O, 6th EADV Spring Symposium, aprilie 2009, București, România;
- “Rolul ecografiei de înaltă frecvență în studiul organului cutanat ” – Maria Crișan, Rodica Cosgarea, Radu Badea, **Mirela Susan**, Ariana Stir, A XIV-a conferință ADT, iunie 2009, Cluj-Napoca;
- “Autoimunitatea și stresul”- Simona Șenilă, Rodica Cosgarea, **Mirela Susan**, Sorina Dănescu, Victorina Macovei, A XIV-a conferință ADT, iunie 2009, Cluj-Napoca;
- “Blitz diagnostic: gută cu leziuni cutanate – prezentare de caz” – Ruxandra Cutuș, **Mirela Susan**, A XIV-a conferință ADT, iunie 2009, Cluj-Napoca;
- “Experiența Clinicii Dermatologie Cluj-Napoca în tratamentul carcinoamelor cutanate prin terapie fotodinamică” – **Mirela Susan**, Rodica Cosgarea, A XIV-a conferință ADT, iunie 2009, Cluj-Napoca;
- “Photodamaging effects of porphyrins on primary human keratinocytes and carcinoma cell cultures. The evaluation of cytotoxic and phototoxic effect of chitosan on cell cultures”, Cosgarea R, **Susan M**, Senila S, Baldea I, Macovei V, Dreve S, 39th Annual ESDR Meeting, 9-11 Septembrie 2009, Budapesta, Ungaria.
- “Terapia fotodinamică – o variantă estetică și eficientă de tratament în carcinoamele cutanate” – **Mirela Susan**, Rodica Cosgarea, Conferința Națională de Dermatologie, Brașov, 2009;
- “Rolul ecografiei de înaltă frecvență în studiul tegumentului și a leziunilor cutanate” – Maria Crișan, Radu Badea, Rodica Cosgarea, Monica Lupșor, **Mirela Susan**, Ariana Stir, Conferința Națională de Dermatologie, Brașov, 2009;
- “Efectele fototoxice ale porfirinelor pe culturi primare de keratinocite umane și celule carcinoatoase. Evaluarea efectului citotoxic și fototoxic al chitosanului pe culturile celulare” – R. Cosgarea, **M. Susan**, S. Șenilă, I. Bâldea, V. Macovei, S. Dreve, R.M. Ion, Zilele UMF “Iuliu Hațieganu” decembrie 2009 – Sesiunea Postere.
- “Our experience in the treatment of non-melanoma skin cancer by photodynamic therapy” – Rodica Cosgarea, **Mirela Susan**, Corina Baican, Simona Senila, 13th World Congress on Cancers of the Skin, 7-10 aprilie 2010, Madrid, Spania.

PREMII

- Premiu în sesiunea poster la Zilele UMF “Iuliu Hațieganu” decembrie 2009 pentru “Efectele fototoxice ale porfirinelor pe culturi primare de keratinocite umane și celule carcinoatoase. Evaluarea efectului citotoxic și fototoxic al chitosanului pe culturile celulare”.

PROIECTE DE CERCETARE (MEMBRU DE PROIECT – CERCETATOR ȘTIINȚIFIC):

- cercetător științific - grant CEEEX 102/2006 “Biocompozite cu porfirine cu aplicabilitate în terapia fotodinamică a tumorilor maligne cutanate - PORFIDERM”, coordonator de proiect: Cercetator principal II Dr. Simina Dreve;

- cercetător științific - grant 2624/2008 „Diagnostic precoce neinvaziv în procesul de senescență cutanată fotoindusă. Studii complexe histo-clinico-imagistice - SERENO”, proiect de cercetare exploratorie, coordonator de proiect: Conf. Dr. Maria Crișan.

MEMBRĂ A ASOCIAȚIILOR PROFESIONALE:

- Societății Române de Dermatologie - din 2005;
- Asociației Dermatologilor Transilvani - din 2006;
- International Dermoscopy Society – din 2009;
- Asociației de Medicină Anti-Aging din România – din 2010.

LIMBI STRĂINE:

- Engleza- foarte bine (scris, vorbit)
- Franceza - bine.

**“TULIU HATIEGANU” UNIVERSITY OF MEDICINE AND
PHARMACY CLUJ-NAPOCA**

**THE EFFECTS OF PORPHYRINS ON CUTANEOUS
CARCINOMAS – STUDY ON CARCINOMA CELL
CULTURES**

PhD THESIS ABSTRACT

**PhD STUDENT:
MIRELA SUSAN**

**SCIENTIFIC COORDINATOR:
PROF. DR. RODICA COSGAREA**

2011

TABLE OF CONTENTS

Table of contents.....	1
Abbreviation used in text.....	4
Introduction.....	5
Part I – General part	
Chapter 1: Photodynamic therapy – general aspects.....	7
1.1 From light to photodynamic therapy.....	7
1.2 Mechanism of action.....	8
1.2.1 Type I and II photochemical reactions.....	8
1.2.2 Mechanisms of tumour destruction	10
1.3 Photosensitizers	12
1.3.1 5-aminolevulinic acid (ALA) and methyl aminolevulinate.....	12
1.3.2 Second generation photosensitizers	14
1.4 Light sources	16
Chapter 2: Photodynamic therapy: applications in dermatology.....	18
2.1 Photodynamic therapy for premalignant and malignant lesions.....	18
2.1.1 Actinic keratosis	18
2.1.2 Basal cell carcinoma	20
2.1.3 Bowen disease.....	25
2.1.4 Extramammary Paget’s disease.....	27
2.1.5 Vulvar and anal intraepithelial neoplasia.....	27
2.1.6 Cutaneous lymphoma.....	28
2.2 Photodynamic therapy in other dermatoses.....	28
2.2.1 Acne.....	29
2.2.2 Psoriasis	31
2.2.3 Vulgar and genital warts.. ..	32
2.2.4 Morphea and lichen sclerosus	34
2.2.5 Cutaneous leishmaniasis.....	34
2.2.6 Facial rejuvenation.....	35
Chapter 3: Photodynamic therapy: adverse effects profile.....	37
3.1 Acute adverse effects.....	37
3.2 Chronic adverse effects.....	39

Partea II – Personal research

Chapter 4: Experimental study – porphyrins testing on primary human keratinocytes and carcinoma cell cultures	40
4.1 Objective.....	40
4.2 Materials and methods	41
4.2.1 Materials	41
4.2.1.1 Primary cell cultures.....	41
4.2.1.2. Photosensitizer substances	43
4.2.2 Methods	47
4.2.2.1 Evaluation of photosensitizers subcellular localization	47
4.2.2.2 Evaluation of photosensitizers citotoxicity and phototoxicity on keratinocytes and carcinoma cell cultures	48
4.2.2.3 Detection of cell death induced by photosensitizers	49
4.3 Results	51
4.3.1 Evaluation of photosensitizers subcellular localization	51
4.3.2 Evaluation of photosensitizers citotoxicity and phototoxicity on keratinocytes and carcinoma cell cultures	52
4.3.2.1 Evaluation of citotoxicity and phototoxicity induced by 5-ALA on keratinocytes and carcinoma cell cultures	52
4.3.2.2 Evaluation of citotoxicity and phototoxicity induced by TSPP on keratinocytes and carcinoma cell cultures	55
4.3.2.3 Evaluation of citotoxicity and phototoxicity induced by TMP and Zn-TMP on keratinocytes and carcinoma cell cultures.....	57
4.3.2.4 Evaluation of citotoxicity and phototoxicity induced by photosensitizers associated with chitosan on keratinocytes and carcinoma cell cultures	60
4.3.3 Detection of cell death induced by photosensitizers.....	63
4.3.3.1 Evaluation of carcinoma cells apoptosis exposed to 5-ALA	63
4.3.3.2 Evaluation of carcinoma cells apoptosis exposed to TSPP	64
4.3.3.3 Evaluation of carcinoma cells apoptosis exposed to TMP and Zn-TMP	65
4.4 Discussion	69
4.5 Conclusions	74

Chapter 5: A clinical comparative study between photodynamic therapy and surgical excision in basal cell carcinoma treatment	76
5.1 Materials and methods	76
5.1.1 Group A - photodynamic therapy	77
5.1.2 Group B – surgical excision	79
5.2 Results	79
5.2.1 Patient characteristics	79
5.2.2 Clinical and histopathological response rates to treatment	83
5.2.2.1 PDT group	83
5.2.2.2 Surgical excision group	85
5.2.3 Cosmetic outcome	86
5.2.4 Adverse effects	88
5.3 Clinical cases PDT treated	89
5.4 Discussion.....	101
5.5 Conclusions	105
Chapter 6: General conclusions	107
Bibliography	109
Published articles	130

Keywords: photodynamic therapy, 5-aminolaevulinic acid, basal cell carcinoma, porphyrins, carcinoma cells, phototoxicity, apoptosis.

Presently, nonmelanoma skin cancers are the most common malignancies among the caucasian population; their incidence has been constantly increasing worldwide due to ultraviolet and other carcinogens exposure, with geographic variations depending on climate, sunlight exposure and skin type. The annual growing incidence of cutaneous malignancies necessitated the development of new and more effective methods of treatment, while assuring better cosmetic results and improving patient satisfaction.

Therapeutic options for the local treatment of basal cell carcinomas (BCC) are: surgical excision, cryotherapy, radiotherapy, 5-fluorouracil, Imiquimod and photodynamic therapy; the choice of treatment should be based on clinical type, tumour size and location, as well as patient's preference and morbid associations, taking into consideration the necessity of healing the tumour and a satisfactory esthetic result.

Photodynamic therapy is a new method for the treatment of BCC which involves photosensitizing agents activated through visible light in order to produce singlet oxygen and other cytotoxic radicals that provoke tumour destruction.

The paper consists of two parts: the theoretical and the personal contribution part. In the theoretical part we have made a synthesis of literature data; the personal contribution part is divided in two chapters: an experimental study and a clinical one. In the experimental study we have tested the photodynamic activity of four photosensitizing substances on primary human keratinocytes and carcinoma cell cultures: 5-ALA – 5-aminolaevulinic acid; TSPP - 5,10,15,20tetra-(p-sulphonatophenyl)porphyrin; TMP-5,10,15,20-tetra-(p-methoxyphenyl)porphyrin and its zinc compose, Zn-TMP. We have also tested a new substance, chitosan, observing the effect of combining the photosensitizer substances with chitosan on the irradiated cell cultures. In the second chapter of the personal contribution part we have made a clinical comparative study between photodynamic therapy and surgical excision in the treatment of basal cell carcinomas, appreciating the lesion complete remission rate to treatment and the cosmetic outcome posttherapeutic.

EXPERIMENTAL STUDY – PORPHYRINS TESTING ON PRIMARY HUMAN KERATINOCYTES AND CARCINOMA CELL CULTURES

The **aim** of this study was to evaluate the phototoxic activity of multiphasic biocomposites with porphyrins and chitosan, with possible applications in cutaneous carcinomas photodynamic therapy. The experiments were realised in an excellency research programme CEEEX no. 102/2006 entitled „Biocomposites with porpyrins with applications in photodynamic therapy of skin cancers – PORFIDERM”, in cooperation with The National Institute for Research and Development in Chemistry and Petrochemistry Bucharest and The National Institute for Research and Development of Isotopic and Molecular Technologies Cluj Napoca. The experiments were made in the Research Laboratory of Dermatology Clinic Cluj Napoca, in cooperation with the Research Laboratory of The Oncology Institute „Prof.Dr.Ion Chiricuta” Cluj Napoca and Physiology Cathedra of The University of Medicine and Phrmacy „Iuliu Hatieganu” Cluj Napoca.

Materials and methods

We have used 5-aminolaevulinic acid (5-ALA), 5,10,15,20-(p-sulphonatophenyl)-porphyrin (TSPP), 5,10,15,20-tetra-(p-methoxyphenyl)porphyrin (TMP) and its compose with zinc (Zn-TMP) as photosensitizers. The in vitro tests have been made on primary human carcinoma cells obtained from patients with basal cell carcinomas and on primary

human keratinocytes obtained from normal skin biopsies, using photosensitizers, chitosan and photosensitizers with chitosan. The photosensitizers have been tested for cytotoxicity in the absence of the light (dark cytotoxicity) and after irradiation (phototoxicity). The viability was evaluated by MTS test (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium).

We have proposed an immunocytochemical method for detecting the changes in cellular morphology after the incubation of the cells with photosensitizers – Annexin V-FITC apoptosis detection kit from BD Biosciences which contains recombinant annexin V conjugated with FITC (fluorescein isothiocyanate).

Results

There has been no phototoxic effect on primary human keratinocytes for none of the photosensitizers; all four tested substances had a phototoxic effect on primary human carcinoma cell cultures, which positively correlated with the concentration of the photosensitizer and irradiation dose. The period of incubation was different: 4 hours for 5-ALA and 24 hours for TSPP, TMP and Zn-TMP. The phototoxic effect was more intense for Zn-TMP compared with TMP.

When we have exposed the primary human carcinoma cells to different dilution of chitosan (0,01 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml), we have found that this substance was not toxic for concentrations under 0,5 mg/ml, with a cells viability over 90%. We have used a concentration of 0,5 mg/ml for this experiment. The administration of photosensitizing substances in association with chitosan increased cell viability by 20% after exposure to red light compared to the same concentrations of photosensitizer without chitosan (cytoprotective effect).

When we have incubated carcinoma cells with photosensitizers on chamber slides and we have exposed them to red light, we have found that the number of apoptotic carcinoma cells were increased in a manner that positively correlated with the concentration of photosensitizer.

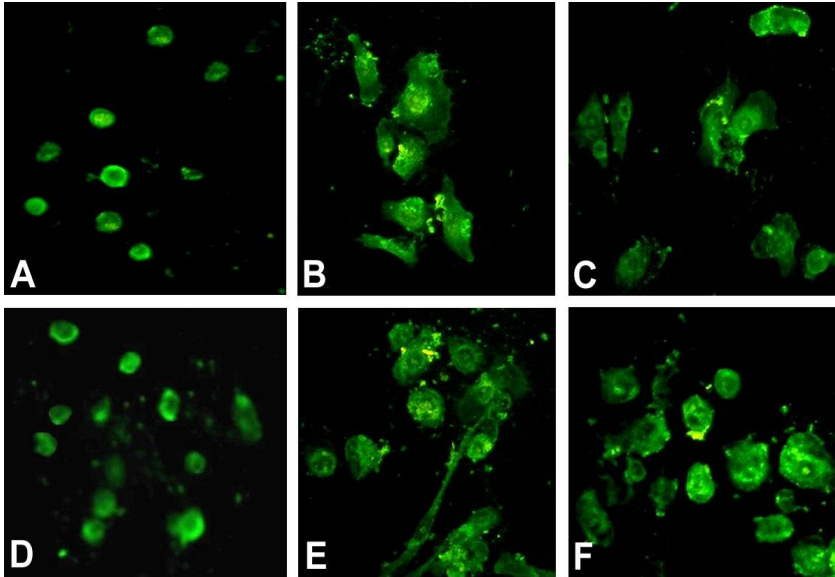


Figure 1. Fluorescence images of primary human carcinoma cells after incubation with TMP and Zn-TMP and irradiation with red light – 6 J/cm^2 .

A and D: control cells (without photosensitizers);

B and C: cells were incubated with TMP and Zn-TMP at 5 µg/ml and irradiated.

E and F: cells were incubated with TMP and Zn-TMP at 50 µg/ml and irradiated.

Conclusions:

1. The types of studied cells present a different response: there was no phototoxic effect on primary human keratinocytes, probably because of the preferential accumulation of photosensitizers in tumoral cells.
2. All four tested porphyrins (5-ALA, TSPP, TMP and Zn-TMP) had a phototoxic effect on primary human carcinoma cells, which positively correlated with the concentration of the photosensitizer and irradiation dose.
3. The associated administration of photosensitizer substances with chitosan increased cell viability with 20% after exposure to red light compared with the same concentrations of photosensitizer without chitosan (cytoprotective effect); chitosan doesn't represent an adjuvant in photodynamic therapy of skin carcinomas.
4. Two modes of cell death, apoptosis and necrosis, were observed in the cells after incubation with photosensitizers and irradiation with red light. We have identified the mechanism of cell death after light exposure for all porphyrins

as apoptosis; our experiments showed that apoptotic responses were dose-dependent.

5. The results of this in vitro study could be used in clinical practice for the improvement of basal cell carcinomas or other skin tumours treatment.

A CLINICAL COMPARATIVE STUDY BETWEEN PHOTODYNAMIC THERAPY AND SURGICAL EXCISION IN BASAL CELL CARCINOMA TREATMENT

The **aim** of this study was to compare the efficacy and the advantages of photodynamic therapy versus surgical excision in the treatment of basal cell carcinomas.

Materials and methods:

This was a controlled, prospective, randomized, parallel-group clinical study which included 72 patients with 94 basal cell carcinomas treated between November 2008 and July 2010 and followed until December 2010.

Results:

In total, 94 BCCs in 72 patients were treated in the study, 32 with ALA-PDT and 40 with surgery. The baseline characteristics of the 2 treatment groups were similar (Table 1).

Characteristic	ALA-PDT	Surgery
1. Sex M/F	17/15	21/19
2. Age, mean (range)	65 (51-85)	66 (49-90)
3. Skin type (Fitzpatrick score)		
I	3	3
II	21	19
III	12	13
IV	1	1
4. Location of lesions		
Face/scalp	21	20
Neck/trunk	24	24
Extremities	3	2
5. No of lesions per patient		
1 lesion	21	33
2 lesions	7	5
3 lesions	3	1
4 lesions	1	1
6. Clinical form		
superficial	31	29
nodular	17	17

Table 1. Baseline characteristics of the patients included in the study.

The median follow up of the total study population was 12 months (range 4-26). In PDT group lesion complete remission (CR) rate was 95,83% (46 cases from 48 treated), with a recurrence after 12 months from the 2nd PDT session and a nonresponsive case; in the surgery group lesion CR rate was 95,65% (44 cases from 46 treated), with a recurrence after 12 months from surgical excision and an incomplete excision.

Assessment of cosmesis favored ALA-PDT over surgery at all time points, whether rated by clinician or subject. At 12 months after treatment, of 48 BCCs treated with ALA-PDT, 37 BCCs presented an excellent cosmetic response (77,08%) and 11 BCCs a good cosmetic response (22,92%).

Conclusions:

1. A time-to-event analysis of lesion response over time showed that ALA-PDT is as effective as excision surgery, in terms of clinical complete response rate at 12 months (95,83% vs 95,65%, respectively).
2. Of 48 BCCs treated by PDT, 43 BCCs was treated by 2 sessions PDT, 3 BCCs presented incomplete response after 2 PDT sessions and were treated with 1 treatment session again, 1 BCC recurred after 2nd PDT session and 1 BCC was nonresponsive.
3. Of 46 BCCs treated by surgery, 2 BCCs needed reexcision (1 BCC excised with positive resection margins histologically was reexcised and 1 BCC with surgical free margins histologically recurred 12 months after treatment and it was reexcised).
4. The cosmetic outcome of cleared lesions was statistically superior with MAL-PDT than with surgery at each visit after last treatment:
 - In PDT group 37 BCCs from 48 BCCs treated pesented an excellent cosmetic response (77,08%);
 - In surgery group of 46 BCCs treated with surgery, only 3 BCCS were evaluated with an excellent cosmetic response (6,52%), 17 BCCs with a good cosmetic response (36,95%), 22 BCCs with a fair cosmetic response (47,82%).

Selective bibliography:

1. Wolf P. Photodynamic therapy in dermatology: state of the art. J Eur Acad Dermatol Venereol 2001;15:508–509.

2. Taub AF. Photodynamic therapy in dermatology: history and horizons. *J Drugs Dermatol* 2004;3:S8-S25.
3. Oleinick NL, Morris RL, Belichenko T. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem Photobiol Sci* 2002;1:1-21.
4. Babilas P, Landthaler M, Szeimies RM. Photodynamic therapy in dermatology. *Eur J Dermatol* 2006;16(4):340-348.
5. Morton CA, McKenna KE, Rhodes LE. Guidelines for topical photodynamic therapy: update. *Br J Dermatol* 2008;159(6):1245-1266.
6. Zelickson BD. Mechanism of action of topical minolevulinic acid. In: Goldman MP, Dover JS, Alam M. *Procedures in cosmetic dermatology: photodynamic therapy*. Amsterdam:Elsevier,2008:1:2-9.
7. Uehlinger P, Zellweger M, Wagnieres G. 5-Aminolevulinic acid and its derivatives: physical chemical properties and protoporphyrin IX formation in cultured cells. *J Photochem Photobiol B* 2000;54:72-80.
8. Moreira LM, dos Santos FV, Lyon JP, Costa M, Pacheco-Soares C, et al. Photodynamic therapy: porphyrins and phtalocyanines as photosensitizers. *Aust J Chem* 2008;61(10):741-754.
9. . Lehmann P. Methyl aminolaevulinate photodynamic therapy: review of clinical trials in the treatment of actinic keratoses and nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 2007; 156: 793–800.
10. Rhodes LE, de Rie M, Enstrom Y, et al. Photodynamic therapy using topical methyl aminolevulinate versus surgery for nodular basal cell carcinoma: results of a multicenter randomized prospective trial. *Arch Dermatol* 2004;140:17–23.
11. Vinciullo C, Elliot T, Francis D, Gebauer K, Spelman L, et al. Photodynamic therapy with topical methyl aminolaevulinate for ‘difficult-to-treat’ basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2005;152:765-772.
12. Hosterd K, Thissen M.R, Nelemans P, Kelleners – Smeets N.W, janssen R.L, et al. Fractionated 5-aminolaevulinic acid-photodynamic therapy vs surgical excision in the treatment of nodular basal cell carcinoma: results of a randomized controlled trial. *Br J Dermatol* 2008 Sep;159(4):864-870.
13. Luo Y, Chang CK, Kessel D. Rapid initiation of apoptosis by photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 1996;63:528–534.

14. Qi L.F, Xu Z.R, Jiang X. Cytotoxic activities of chitosan nanoparticles and copper-loaded nanoparticles. Bioorg Med Chem Lett 2005;15:1397-1399.

CURRICULUM VITAE

PERSONAL INFORMATION

Name: Susan

Surname: Mirela

Date of birth: 20 iulie 1976

Residence: Tatra street no. 10/3, Cluj-Napoca

Marital status: married, 1 child

Citizenship: romanian

Email: drmirelasusan@yahoo.com; drmirelasusan@dermavision.ro.

EDUCATION

- middle school: 1986 – 1990 – no.2 General School Hateg, Hunedoara
- high school: 1990 – 1994 – Sanitary High School Hunedoara
- University: 1996 – 2002 – The Faculty of Medicine, “Iuliu Hatieganu” University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca.

PROFESSIONAL ACTIVITY

- 2003 – 2005: medical oncology resident “Prof. Dr. Ion Chiricuta” Oncology Institute Cluj Napoca;
- 2005 – 2009: dermatovenereology resident and PhD Student at Dermatology Clinic, “Iuliu Hatieganu” University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca;
- 2007 – 2009: research activity: cultivation of primary human keratinocytes, fibroblasts, melanocytes, in vitro testing of citotoxicity and fototoxicity on primary human cultures in Research Laboratory of Dermatology Clinic, Cluj Napoca;
- 2007 – 2010: didactic activity – The Faculty of Medicine and Dentistry, 6th year, “Iuliu Hatieganu” UMF Cluj Napoca;
- october 2009: pass the examination for specialist in dermatovenereology (9,63 note);
- 2009 – 2010: specialist in dermatovenereology Laurus medical clinics Cluj Napoca;
- 2010 – present: specialist in dermatovenereology Dermavision Cluj Napoca.

EXCHANGES

- photodynamic therapy training course under the supervision of Prof. Dr. Lasse Braathen, the president of European Society of Photodynamic Therapy, Saint Louis Hospital, Paris, march, 2007.

POSTGRADUATE COURSES

- postuniversity course “News in the diagnosis and treatment of ganglionar and extraganglionar malignant lymphomas”, July 2003;
- postuniversity course “News in the treatment of pain”, January 2005;

- postuniversity course “New trends in medical oncology”, March 2005;
- competition language certificate – english, UMF “Iuliu Hatieganu“, 2005, Cluj – Napoca;
- postuniversity course “Dermatovenereologist attitude in sexually transmitted diseases”, December 2005, Bucharest ;
- postuniversity training course “Surgical and cosmetic dermatology”, March 2007, Cluj –Napoca;
- postuniversity course “Dermoscopy – diagnostic method in pigmentary lesions”, November 2007, Cluj –Napoca;
- postuniversity course “Therapies based on intelligent light”, March 2008, Bucharest;
- postuniversity course “ Botulinum toxin in antiaging medicine”, March 2010, Bucharest;
- postuniversity course “ Mesotherapy applications in medicine”, June 2010, Bucharest;
- postuniversity course “ Cutaneous melanoma diagnosis and treatment”, June 2010, Cluj Napoca;
- postuniversity course “ Fillers – hialuronic acid - Juvederm”, September 2010, Bucharest;
- postuniversity course “ Peelings, dermabrasion”, September 2010, Bucharest;
- postuniversity course “ Chemical peelings”, October 2010, Bucharest.

SCIENTIFIC ACTIVITY

Articles published in extenso:

- “Lichen planus treatment”, Victorina Macovei, Rodica Cosgarea, Sorina Dănescu, Simona Senilă, Ioana Baldea, **Mirela Susan**, Acta Dermatologica Transilvanica, vol 1-2, 2007;
- “The utility of photodynamic therapy in dermatology”, **Mirela Susan**, Rodica Cosgarea, Dermatovenerol, 2009;54:131-135.
- “Photodamaging effects of porphyrins and chitosan on primary human keratinocytes and carcinoma cell cultures”, **Mirela Susan**, Simona Șenilă, Ioana Bâldea, Victorina Macovei, Simina Dreve, Rodica Mariana Ion, Rodica Cosgarea, International Journal of Dermatology, 2011,50(3): 280-286, ISSN 1365-4632, impact factor 1,177.

Oral papers presented at various conferences:

- “Gastric cancer – a case analysis for 10 years, pronostic factors, survival”- Viola Gaal, Cristian Moldovan, **Mirela Susan**, Andreea Gombos, The days of Oncology Institute Cluj-Napoca, October 2003;
- “Gastric lymphomas – an analysis of the cases treated in IOCN in 1997-2001“ - Adela Vacar, Doris Pelau, **Mirela Susan**, Cristian Moldovan, The days of Oncology Institute Cluj-Napoca, October 2003;
- “Peros chemotherapy in the treatment of recurrent ovarian cancer”- Adela Vacar, Doris Pelau, **Mirela Susan**, Alin Sarbu, The 14th Congress of the Romanian Society of Radiotherapy and Medical Oncology, Arad, September 2004;
- “Interpherone value as an adjuvant treatment in melanoma” – **Mirela Susan**, Adriana Porutiu, Nicolae Todor, Adela Vacar, The days of Oncology Institute Cluj-Napoca (75 years celebration), October 2004;

- “Protective role of the Herculane thermal water on the primary human cultured keratinocytes and fibroblasts” – Rodica Cosgarea, Simona Senila, **Mirela Susan**, Ioana Baldea, The National Conference of Dermatology, Sinaia, November 2007;
- “Clinical and dermoscopic diversity of melanoma” – Rodica Cosgarea, Loredana Ungureanu, Daniela Stefanescu, Simona Senila, **Mirela Susan**, Ruxandra Cutus, Adrian Baican, The National Conference of Dermatology, Sinaia, November 2007;
- “Pyoderma gangrenosum – neutrophilic dermatosis with etiopatogenetical diversity” – Rodica Cosgarea, Simona Senila, **Mirela Susan**, Veronica Moisis, Ioana Baldea, The National Conference of Dermatology, Sinaia, November 2007;
- “Cytotoxic effects of photodynamic therapy with 5,10,15,20 tetra- (p-sulphonate-phenyl)-porphyrin on primary normal human keratinocytes and carcinoma cell cultures” – Rodica Cosgarea, Simona Senila, Ioana Baldea, **Mirela Susan**, Rodica Mariana Ion, 5th EADV Spring Symposium, Istanbul, May 2008;
- “Photodynamic therapy with 5 delta amino levulinic acid and chitosan on primary normal human keratinocytes and carcinoma cell cultures” – Simona Senila, Rodica Cosgarea, **Mirela Susan**, Ioana Baldea, Simina Dreve, 5th EADV Spring Symposium, Istanbul, May 2008;
- “Evaluation of chitosan cytotoxicity on primary normal human cultured fibroblasts” – Ioana Baldea, Rodica Cosgarea, Simona Senila, **Mirela Susan**, Simina Dreve, 5th EADV Spring Symposium, Istanbul, May 2008;
- “Apoptosis induced by photodynamic therapy with 5 delta amino levulinic acid and 5,10,15,20 tetra- (p-sulphonate-phenyl)-porphyrin on primary normal human keratinocytes and carcinoma cell cultures” – **Mirela Susan**, Rodica Cosgarea, Ioana Baldea, Simona Senila, Mariana Ion, 5th EADV Spring Symposium, Istanbul, May 2008;
- “Study of phototoxic effects of ALA and TSPP on primary human keratinocytes and carcinoma cell cultures. The evaluation of cytotoxic and phototoxic effects of chitosan on cell cultures” - Rodica Cosgarea, Simona Senila, Ioana Baldea, **Mirela Susan**, Simina Dreve, Mariana Ion, The 10th Congress of the Romanian Society of Physiological Sciences, Cluj-Napoca, June 2008;
- “The utility of dermoscopy in the surgical decision for atypical nevi” – Rodica Cosgarea, Loredana Ungureanu, **Mirela Susan**, Simona Senila, The National Conference of Dermatology , Sibiu, October 2008;
- “Genetical mutations in patients with dystrophic epidermolysis bullosa” Cosgarea Rodica, Sorina Danescu, Simona Senila, **Mirela Susan**, Victorina Macovei, Ioana Baldea, 6th EADV Spring Symposium, April 2009, Bucharest, Romania;
- “The role of dermoscopy in the surgical decision for the melanocytic nevi” – Rodica Cosgarea, Loredana Ungureanu, Simona Senila, **Mirela Susan**, Ruxandra Cutus, 6th EADV Spring Symposium, April 2009, Bucharest, Romania;
- “The influence of herculane thermal water on the viability of cultured keratinocytes and fibroblasts”, Rodica Cosgarea, **Mirela Susan**, Victorina Macovei, Ioana Baldea, Ovidiu Bălăcescu, 6th EADV Spring Symposium, April 2009, Bucharest, Romania;
- “Our experience in the treatment and surveillance of malignant melanoma patients” – Rodica Cosgarea, **Mirela Susan**, Loredana Ungureanu, Simona Senila, George Dindelegan, Gheorghe Cobzac, 6th EADV Spring Symposium, April 2009, Bucharest, Romania;

- "Protective role of the herculane thermal water on the primary human cultured keratinocytes and fibroblasts", Cosgarea Rodica, **Susan M**, Macovei V, Baldea I, Balacescu O, 6th EADV Spring Symposium, April 2009, Bucharest, Romania;
- "The role of high frequency ultrasonography in the study of skin" – Maria Crisan, Rodica Cosgarea, Radu Badea, **Mirela Susan**, Ariana Stir, 14th ADT Conference, June 2009, Cluj-Napoca;
- "Autoimmunity and stress"- Simona Senila, Rodica Cosgarea, **Mirela Susan**, Sorina Danescu, Victorina Macovei, 14th ADT Conference, June 2009, Cluj-Napoca;
- "Blitz diagnosis: gout with skin lesions" – Ruxandra Cutus, **Mirela Susan**, 14th ADT Conference, June 2009, Cluj-Napoca;
- "The experience of Dermatology Clinic Cluj Napoca in the treatment of basal cell carcinomas using photodynamic therapy" – **Mirela Susan**, Rodica Cosgarea, 14th ADT Conference, June 2009, Cluj-Napoca;
- "Photodynamic therapy – an esthetic and efficient method of treatment in basal cell carcinomas" – **Mirela Susan**, Rodica Cosgarea, The National Conference of Dermatology, Brasov, 2009;
- "The role of high frequency ultrasonography in the study of skin lesions" – Maria Crisan, Radu Badea, Rodica Cosgarea, Monica Lupsor, **Mirela Susan**, Ariana Stir, The National Conference of Dermatology, Brasov, 2009;
- "Photodamaging effects of porphyrins on primary human keratinocytes and carcinoma cell cultures. The evaluation of cytotoxic and phototoxic effect of chitosan on cell cultures" – R. Cosgarea, **M. Susan**, S. Senila, I. Baldea, V. Macovei, S. Dreve, R.M. Ion, The days of UMF "Iuliu Hatieganu" UMF, December 2009 – poster session.
- "Our experience in the treatment of non-melanoma skin cancer by photodynamic therapy" – Rodica Cosgarea, **Mirela Susan**, Corina Baican, Simona Senila, 13th World Congress on Cancers of the Skin, 7th-10th April 2010, Madrid, Spain.

AWARDS

- Award of "Iuliu Hatieganu" University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca for the paper "Photodamaging effects of porphyrins on primary human keratinocytes and carcinoma cell cultures. The evaluation of cytotoxic and phototoxic effect of chitosan on cell cultures", December 2009, Poster Session.

NATIONAL RESEARCH PROGRAMS:

- research assistant - program CEEEX 102/2006 "Biocomposites with porphyrins used in photodynamic therapy for malignant skin tumors - PORFIDERM", project manager senior researcher II Dr. Simina Dreve;
- research assistant – program 2624/2008 „Uninvasive precocious diagnosis in the process of photoinduced cutaneous senescence. Complexe histo-clinical-imagistic studies - SERENO", project manager: Conf. Maria Crisan MD, PhD.

MEMBER OF PROFESSIONAL ASSOCIATIONS

- Romanian Society of Dermatology - from 2005;
- Transylvanian Association of Dermatologists - from 2006;
- International Dermoscopy Society – from 2009;

- Romanian Anti-Aging Association – from 2010.

FOREIGN LANGUAGES

1. English – very good
2. French – good.