

**Universitatea de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca
Facultatea de Medicină**

Alterații melanocitare sub influența unor factori interni și externi

Conducător științific: Prof. Dr. Rodica Cosgarea

Doctorand: Ioana Bâldea

2010

Rezumatul tezei de doctorat

Cuprins

Introducere	4
Abrevieri	9
I. Partea teoretică - Stadiul actual al cunoștințelor	
Capitolul 1. Biologia melanocitului normal și tulburări pigmentare	10
1. 1. Culoarea pielii.....	10
1. 2. Embriologia și distribuția melanocitelor.....	11
1. 3. Structura și funcția melanocitului.....	14
1. 4. Melanozomul.....	16
1. 5. Transportul și distribuția melanozomilor.....	18
1. 6. Biosinteza melaninei.....	20
1. 7. Reglarea biologică a comportamentului melanocitului normal.....	22
1. 8. Rolurile biologice și proprietățile fizico-chimice ale melaninei și precursorilor melanici.....	25
1. 9. Boli pigmentare congenitale determinate de alterările melanogenezei.....	26
Capitolul 2. Speranța de viață, senescența și apoptoza melanocitelor umane in vivo și in vitro	28
2. 1. Speranța de viață a melanocitelor umane.....	28
2. 2. Senescența melanocitelor.....	29
2. 3. Modificări epigenetice și durata de viață replicativă a melanocitelor umane.....	30
2. 4. Apoptoza melanocitelor umane.....	30
Capitolul 3. Factori care influențează melanocitele umane in vivo și in vitro	32
3.1. Hormonul melanocitostimulator	32
3.2. Radiația ultravioletă	33
3. 2. 1. Influența climei și reliefului asupra radiației solare.....	33
3. 2. 2. Proprietățile optice ale pielii.....	33
3. 2. 3. Efectele expunerii la radiația ultravioletă.....	34
3. 2. 4. Rolul radiației ultraviolete în inducerea leziunilor ADN și a morții celulare în melanocite și keratinocite.....	37
3. 2. 5. Rolul radiației ultraviolete în sinteza hormonilor, citokinelor și factorilor de creștere de către celulele epidermice.....	38
3.3. Tirozina	39
3.4. Antioxidanți	41

3. 4. 1. Principalele substanțe antioxidante	41
3. 4. 2. Antioxidanți topici.....	42
3. 4. 3. Stresul oxidativ, generalități.....	43
3. 4. 4. Retinoizii. Acidul <i>trans retinoic</i>	44
3. 3. 4. 1. Proprietăți fizice și chimice.....	44
3. 3. 4. 2. Efecte asupra melanocitelor și celulelor melanomatoase in vivo și in vitro.....	45
3. 4. 5. Vitamina C.....	48
3. 4. 5. 1. Proprietăți fizice și chimice.....	48
3. 4. 5. 2. Funcții în organism.....	49
3. 4. 5. 3. Mecanismul antioxidant.....	49
3. 4. 5. 4. Utilizări industriale.....	50

II. Partea experimentală – Cercetări personale

Capitolul 4. Ipoteza de lucru	51
4.1. Expunerea melanocitelor la iradierea cu ultraviolete A și B.....	51
4.2. Expunerea melanocitelor la tirozină.....	52
4.3. Expunerea melanocitelor la vitamina C.....	52
4.4. Expunerea melanocitelor la acid <i>trans retinoic</i>	52
Capitolul 5. Materiale și metode de lucru	54
5.1. Obținerea culturilor primare de melanocite epidermice in vitro	54
5.2. Expunerea melanocitelor la tirozină	56
5.2.1. Prepararea mediilor cu tirozină.....	56
5.2.2. Sursa de celule.....	56
5.2.3. Expunerea la radiații ultraviolete tip A și B.....	57
5.3. Expunerea melanocitelor la vitamina C	57
5.3.1. Prepararea mediilor cu vitamina C.....	57
5.3.2. Sursa de celule.....	57
5.3.3. Expunerea la radiații ultraviolete B.....	58
5.4. Expunerea melanocitelor la acid <i>trans retinoic</i>	58
5.4.1. Prepararea mediilor cu acidul <i>trans retinoic</i>	58
5.4.2. Sursa de celule.....	58
5.4.3. Expunerea la radiații ultraviolete tip A și B.....	59
5. 5. Cuantificarea efectelor diversilor stimuli asupra melanocitelor în cultură	59
5.5.1. Proliferarea melanocitelor expuse la diverse condiții de studiu.....	60
5.5.2. Aspectul morfologic și viabilitatea celulară a melanocitelor studiate.....	61
5.5.3. Măsurarea melaninei totale în culturile de melanocite.....	64
5.5.4. Măsurarea proteinelor totale produse de celulele în cultură.....	65
5.5.5. Determinarea activității enzimatică de DOPA oxidază a tirozinazei.....	65
5.5.6. Determinarea stresului oxidativ.....	65
a. Superoxid dismutaza.....	65
b. Catalaza.....	66
5.5.7. Senescența melanocitelor.....	66
5.5.8. Apoptoza melanocitelor în cultură.....	67
5.5.9. Metode statistice de interpretare.....	69
Capitolul 6. Rezultate și discuții	70
6. 1. Efectele iradierii cu ultraviolete A și B asupra proliferării melanocitelor epidermice umane	70
6. 2. Comportamentul melanocitelor expuse la concentrații variate de tirozină și iradiere cu ultraviolete	74
6.2.1. Proliferarea celulară.....	74
6.2.2. Aspectul morfologic.....	77

6.2.3. Viabilitatea melanocitelor.....	81
6.2.4. Conținutul total de melanină.....	82
6.2.5. Activitatea enzimatică a tirozinazei.....	82
6.2.6. Activitatea enzimatică a superoxiddismutazei și a catalazei.....	83
6.2.7. Discuții.....	87
6.3. Comportamentul melanocitelor expuse la concentrații variate de vitamina C și iradiere cu ultraviolete B.....	94
6.3.1. Apoptoza melanocitelor.....	94
6.3.2. Proliferarea melanocitelor epidermice umane.....	97
6.3.3. Aspectul morfologic.....	97
6.3.4. Viabilitatea celulară.....	101
6.3.5. Cantitatea de melanină totală.....	104
6.3.6. Discuții.....	108
6.4. Comportamentul melanocitelor expuse la concentrații variate de acid retinoic și iradiere cu ultraviolete.....	112
6.4.1.1.Proliferarea celulară sub influența acidului retinoic.....	112
6.4.1.2. Proliferarea celulară sub influența acidului retinoic și a iradierii cu ultraviolete.....	118
6.4.2. Viabilitatea celulară.....	124
6.4.3. Conținutul total de melanină.....	126
6.4.4. Activitatea enzimatică a tirozinazei.....	128
6.4.5. Activitatea enzimatică a superoxiddismutazei și a catalazei.....	134
6.4.6. Senescența melanocitelor.....	138
6.4.7. Discuții.....	152
Capitolul 7. Concluzii generale.....	164
7.1. Contribuții originale ale cercetării efectuate.....	164
7.1.1. Realizarea unor culturi celulare primare de la subiecți normali și cu vitiligo.....	164
7.1.2. Crearea unor modele experimentale de studiu in vitro.....	164
7.2. Aplicabilitatea clinică a cercetării efectuate.....	165
7.3. Concluzii.....	168
Capitolul 8. Bibliografie.....	170
Anexe. Articole publicate.....	183

Cuvinte cheie:: melanocit, tirozina, acid retinoic, vitamina C, lumina ultravioletă

Rezumat

Introducere

Descifrarea mecanismelor pigmentării umane este critică pentru a înțelege de ce oamenii cu pielea deschisă la culoare au un risc de 50 de ori mai mare de a dezvolta cancer cutanat bazocelular și spinocelular și sunt de 13 ori mai predispuși la melanom decât cei cu piele închisă la culoare.

Melanina, sintetizată pornind de la tirozină sub acțiunea tirozinazei și a proteinelor înrudite, funcționează ca un ecran solar care absoarbe radiația ultravioletă și previne distrugerea ADN, de asemenea are și proprietăți antioxidante, de neutralizare a radicalilor liberi. Pigmentarea pielii presupune cooperarea între melanocite și keratinocite pentru a produce melanozomi și apoi a-i transfera keratinocitelor, care apoi se distribuie intracelular în modalități variate în drumul keratinocitelor spre suprafața cutanată. Recent, s-a descoperit că și fibroblaștii participă la reglarea creșterii și diferențierii melanocitelor. Determinantul major al culorii pielii este activitatea melanocitelor, adică cantitatea și calitatea pigmentului produs și nu densitatea melanocitelor.

Comparativ cu pielea deschisă la culoare, pielea pigmentată are melanozomi care conțin mai multă melanină și sunt mai mari în diametru; odată transferați keratinocitelor, sunt dispersați și

degradați mult mai încet. Melanogeneza cutanată este crescută după boli cutanate, expunere la radiații ultraviolete (UV), arsuri termice, chimice, traumatisme mecanice și scăzută sau chiar absentă într-o serie de afecțiuni genetice (albinismul oculocutanat, sindromul Chediak-Higashi, sindromul Griscelli, fenilcetonurie) sau dobândite (dermatita atopică).

Speciile reactive de oxigen (ROS) sunt generate de celule în condiții fiziologice și patologice particulare. Atât protecția antioxidantă insuficientă cât și excesul producției de ROS cauzează distrucție oxidativă. Efectele lor fiziologice și patologice sunt determinate de echilibrul dintre oxidanți și sistemele enzimatice antioxidante. Acest dezechilibru pro-oxidant / antioxidant definește “stresul oxidativ”. Cele mai importante enzime implicate în apărarea melanocitelor împotriva stresului oxidativ sunt superoxidismutaza și catalaza. Superoxidismutaza (SOD) este un antioxidant enzimatic care reduce radicalul superoxid O_2^- la peroxid H_2O_2 iar catalaza (Cat) este o enzimă care reduce H_2O_2 la apă.

Rolul speciilor reactive de oxigen în producerea distrugerilor mediate de UV este cunoscut, de aceea se pune problema protecției prin utilizarea unor antioxidanți topici. Studiile efectuate utilizând antioxidanți topici la animale de experiență au arătat că aplicarea de alfa tocoferol, apă îmbogățită în seleniu, flavoferol sau vitamina C precum și a substanțelor chelatoare de fier asociate cu filtre solare reduce stresul oxidativ, tumorigeneza și dermatozele induse de expunerea la radiații UV.

Deși s-au făcut descoperiri remarcabile în ceea ce privește originea și migrarea, senescenta și apoptoza melanocitelor, mecanismele pigmentării cutanate, carcinogeneza cutanată și controlul genetic al acestora, rolul melanocitului și al melaninei în homeostazia cutanată rămâne încă incomplet elucidat.

Obiectivele studiului

Lucrarea studiază efectele determinate de mai mulți factori: tirozina (un aminoacid, precursor al pigmentilor melanici) din mediul extracelular, acidul trans retinoic (derivat activ al vitaminei A), vitamina C (acidul ascorbic) în combinație cu expunerea la radiații ultraviolete A și B, asupra comportamentului melanocitelor, in vitro, urmărind legătura dintre melanogeneza, senescenta, apoptoza și stresul oxidativ în culturile studiate.

Material și metodă

Pentru a putea aprecia efectul factorilor fizici și chimici studiați asupra culturilor melanocitare umane, am utilizat mai multe linii de culturi melanocitare primare, provenite de la subiecți adulți, caucazieni, fototip deschis 2 și 3; linii melanocitare de la pacienți cu vitiligo generalizat, prelevate din zone de tegument cu aspect normal, obținute prin cultivare în Laboratorul de cercetare al Catedrei de Dermatologie, Cluj și o linie de melanocite, *normal human epidermal melanocytes*, obținute din piele (prepuț) de la nou-născut (Promocell, Hamburg, Germania).

Obținerea culturilor melanocitare

Fragmente de tegument sănătos, recoltate steril prin biopsie cutanată au fost dezagregate enzimatic prin expunere la colagenază și tripsină / EDTA pentru separarea celulelor epidermice care au fost cultivate în mediu pentru keratinocite și incubate în atmosferă umedă, la 37°C, 5% CO₂. Culturile de melanocite au fost obținute prin pasaje repetate ale celulelor subconfluente și înlocuirea mediului de cultură, cu mediu de creștere pentru melanocite.

Protocol experimental

Culturile melanocitare au fost expuse la concentrații diferite din substanțele testate, dizolvate în mediu bazal pentru melanocite pentru perioade diferite de timp, respectiv:

- tirozină (0,5mM, 1mM, 2mM, 3,4mM), timp de 24h, respectiv 72h;
- vitamina C (0,1mg/ml, 0,5mg/ml, 1mg/ml, 4mg/ml, 7mg/ml, 10mg/ml, 50mg/ml), timp de 6h, 12h, 24h, 48h;
- acidul *all trans retinoic* (ATRA) ($10^{-9}M$, $10^{-8}M$, $5 \times 10^{-8}M$, $10^{-7}M$, $5 \times 10^{-7}M$, $10^{-6}M$, $10^{-5}M$), timp de 2h, 4h, 6h, 8h, 12h, respectiv 24h;
- urmate sau nu de iradiere cu:
 - ultraviolete A (365nm) cu energii de 20mJ/cm², 30mJ/cm², 40mJ/cm², respectiv 50mJ/cm²
 - ultraviolete B (312nm) cu energii de 10mJ/cm², 20mJ/cm², 30mJ/cm², 40mJ/cm²

Fiecare experiment a fost realizat în triplicat, pentru fiecare probă a existat un martor netratat și neiradiat.

Cuantificarea rezultatelor

Metodele utilizate pentru cuantificarea efectelor acestor factori asupra melanocitelor în cultură sunt moderne, reproductibile, recunoscute și utilizate pe scară largă în laboratoarele de cercetare: testul MTS - proliferarea celulară, colorare cu tripan blue -viabilitatea, metode spectrofotometrice pentru evaluări cantitative de melanină totală/cultură, proteine totale și de cinetică enzimatică – pentru determinarea activității enzimelor melanocitare: tirozinază (de DOPA oxidază), superoxidismutază și catalază; imunfluorescență directă - apoptoză (annexina V-FITC) și senescență celulară (γ H2AX).

Rezultate și discuții

Incidența cancerelor cutanate umane este dependentă de expunerea solară a pielii. Această relație este convingătoare pentru cancerelor nonmelanomatoase, pe când etiologia melanomului pare să fie mai complicată. Tumorigeneza cancerelor de piele a fost descrisă ca un proces cu mai mulți pași, în care radiația ultravioletă A și B joacă un rol important. Rolul UVA este susținut de datele legate de inducerea tumorilor în pielea șoarecilor albino, fără păr și melanomului la pești.

În experiențele efectuate, în culturile melanocitare iradiate cu UVA, am observat stimularea semnificativă ($p=0,000$) a proliferării celulare până la energia de $30\text{mJ}/\text{cm}^2$, stimulare menținută în condiții de cultură diferite și la o doză de $40\text{mJ}/\text{cm}^2$. După iradierea cu UVB, am observat stimularea neliniară, semnificativă ($p=0,000$) cu energia iradierii a proliferării celulare în cazul dozelor mici de $10 - 30\text{mJ}/\text{cm}^2$; energiile UV de iradiere mai mari, au avut efect citotoxic, de reducere a proliferării celulare. Proliferarea crescută după iradiere, mai accentuată după UVA, permite acumularea leziunilor determinate de UV, în special prin generarea de radicali liberi.

Efectele expunerii melanocitelor la diverși factori sunt dependente de fototipul cutanat. Melanocitele subiecților cu fototip cutanat deschis sintetizează în urma expunerii solare puțină eumelanină cu rol protector și multă feomelanină, care pare să aibă efecte prooxidante, amplificând rolul prooxidant al iradierii UV prin generarea de radicali liberi și prin consumarea cisteinei, necesară pentru neutralizarea acestora în procesul de melanogeneză.

L-tirozina a fost folosită pentru a modula selectiv melanogeneza în melanocite. Sustanța este un aminoacid, punctul de plecare al sintezei melanice, prezent in vivo în mediul pericelular și intracelular. Tirozina determină o potență stimulare a melanogenezei, ca și factor protector al melanocitelor față de stimuli naturali sau patologici, în special UV.

Din rezultatele cercetării efectuate am observat că stimularea melanogenezei, prin incubarea melanocitelor provenite de la indivizi cu pielea deschisă la culoare cu concentrații mari de tirozină în mediul de cultură a fost semnificativă statistic (creșterea cantității totale de melanină/cultură ($p=0,002$) și activității enzimatice a tirozinazei ($p=0,003$)), comparativ cu martorul netratat. Melanogeneza indusă după expunerea UV a melanocitelor a înregistrat o creștere liniară cu energia iradierii. Iradierea culturilor după incubare cu tirozină a crescut melanogeneza, semnificativ statistic pentru cantitatea totală de melanină/cultură ($p=0,000$) UVA , respectiv ($p=0,002$) UVB și nesemnificativ pentru activitatea enzimatică a tirozinazei ($p=0,472$) UVA, respectiv ($p=0,504$) UVB, comparativ cu martorul tratat, dar neiradiat. UVB a avut un efect semnificativ stimulator al melanogenezei în aceste condiții, comparativ cu UVA ($p=0,031$ pentru melanină și $p=0,001$ pentru activitatea tirozinazei la o concentrație de tirozină 1mM). Melanogeneza crescută în aceste culturi a avut însă efecte nocive asupra melanocitelor, prin creșterea stresului oxidativ, cu scăderea capacității de protecție antioxidantă a melanocitelor, dar cu creșterea proliferării celulare. Activitatea enzimatică a SOD și Cat a fost stimulată prin creșterea energiei de iradiere. Iradierea UVA a determinat o activare a enzimelor de protecție împotriva stresului oxidativ după expunere la tirozină, în concentrații mai mici decât UVB dar a epuizat mai repede rezervele antioxidante, în special Cat, decât UVB.

Am observat o corelație directă, de intensitate mare între activitatea enzimatică a SOD și a tirozinazei, atunci când culturile au fost expuse la tirozină 1mM ($r=0,732$, $p=0,000$) (fig. 21.) ceea ce în culturile melanocitare expuse la tirozină 2mM a fost inversată, de intensitate medie ($p=0,011$. $r=-$

0.488). Activitatea enzimatică a SOD s-a corelat direct, intensitate mică ($r=0.227$, $p=0.099$) în culturile melanocitare tratate cu tirozină 1mM cu cantitatea de melanină totală din culturile studiate, corelație care s-a menținut, dar indirectă, de intensitate medie pentru culturile expuse la tirozină 2mM ($p=0.022$, $r=-0.446$). De asemenea, am observat o corelație indirectă, de intensitate medie între activitatea enzimatică a Cat și a tirozinazei, pentru culturile expuse la tirozină 2mM ($p=0.045$, $r=-0.397$) dar nu și cu producția de melanină.

În culturile melanocitare provenite de la subiecți cu pielea deschisă la culoare sinteza de pigment, fie în urma iradierii cu ultraviolete, fie stimulată prin expunerea la tirozină a fost un factor de generare a stresului oxidativ și a fost dăunătoare pentru celule, prin reducerea protecției antioxidante și apariția unui aspect senescent, prematur al melanocitelor după expunerea la concentrații mari de tirozină; această alterare ar putea fi considerată ca un marker pentru stresul oxidativ mediat de expunerea la ultraviolete care afectează pielea deschisă la culoare.

Aceste efecte in vitro pot constitui baza pentru o posibilă utilizare terapeutică pentru inducerea diferențierii sau apoptozei celulare a celulelor melanomatoase (o concentrație mare de tirozină 2mM) sau pentru repigmentarea melanocitelor active din plăcile depigmentate de vitiligo sau depigmentări postinflamatorii, prin utilizarea unor concentrații extrem de mici de tirozină (0,5mM).

Acidul ascorbic este un acid organic cu proprietăți antioxidante. Se comportă ca un antioxidant prin disponibilitatea sa de a se oxida în condiții energetice favorabile.

Acidul ascorbic interferează cu diferitele etape ale melaninizării prin interacțiunea cu ionii de cupru la nivelul situsului activ al tirozinazei, reducerea dopachinonei și prin blocarea oxidării DHICA. Esteri variați ai acidului ascorbic, ca și magneziul ascorbat-3-fosfat, stabil în apă și în mediu alcalin și absorbit transcutanat au indus un efect de albire în melanocitele normale și hiperactive in vivo.

Vitamina C este un antioxidant potent, utilizat în clinică în majoritatea topicelor antiaging ca și depigmentant pentru diverse afecțiuni cutanate benigne: melasmă, lentigine, hiperpigmentări postinflamatorii, hiperpigmentări datorate vâstei și expunerii intempestive la soare.

Rezultatele cercetării efectuate în lucrarea de față au arătat că vitamina C modulează melanogeneza in vitro neliniar cu concentrația utilizată, ($r^2=0,45$) atât pe cea indusă de ea însăși cât și pe cea determinată de iradierea UVB, semnificativ statistic cu durata de expunere la substanță ($p=0,026$) și timpul postiradiere ($p=0,026$).

În doze mici, (0,1-0,5mg/ml) vitamina C a avut efect depigmentant, temporar, prin inhibiția melanogenezei, fără a afecta viabilitatea și capacitatea de proliferare a melanocitelor, neinfluențat de iradierea UVB.

În doze medii, (1-4mg/ml) vitamina C a indus pigmentarea melanocitelor proporțional cu concentrația substanței și durata expunerii, efect accentuat prin iradierea UVB, fără afectarea viabilității celulare, dar cu scăderea proliferării melanocitelor.

În doze mari, (7-50mg/ml) vitamina C a crescut sinteza de melanină, cu prețul scăderii viabilității celulare, a inducerii apoptozei, și scăderii proliferării celulare. Iradierea UVB nu a crescut pigmentarea indusă de vitamina C în aceste condiții, dar a determinat alterarea suplimentară a capacității de proliferare celulară și a viabilității celulare și a accentuat apoptoza indusă de acidul ascorbic, având un efect citotoxic pe culturile de melanocite.

Aceste efecte in vitro pot constitui baza pentru o posibilă utilizare terapeutică a produselor topice cu vitamina C pentru obținerea efectului depigmentant în dermatoze cu hiperpigmentare, prin utilizarea unei cantități mici de vitamina C. Efectul depigmentant este tranzitoriu, însă se menține și în condițiile unei expuneri la doze mici de UVB.

În vitiligo melanocitele prezintă o sensibilitate semnificativ mai mare decât melanocitele normale la stresul oxidativ chimic și fizic, care pare să fie corelat cu un dezechilibru al antioxidantilor intracelulari (catalaza) și sunt în final distruse, în lipsa unei intervenții terapeutice.

Datorită faptului că dozele mai mari, pe care le-am utilizat in vitro, necesare pentru inducerea pigmentării în culturile melanocitare de la pacienții cu vitiligo induc scăderea proliferării celulare, nu și a viabilității, ele ar putea fi toxice pentru melanocite.

Expunerea la radiații ultraviolete este o metodă terapeutică cu eficiență dovedită în vitiligo, sub forme variate: UVB (312 nm) bandă îngustă, PUVA terapia, terapia laser (excimer laser) pentru repigmentarea leziunilor existente și oprirea evoluției bolii.

Rezultatele obținute sugerează că efectul combinării vitaminei C topice cu UVB în doză mică pare benefic pentru melanocitele provenite de la acești pacienți și ar putea să fie utilizată pentru scăderea dozelor necesare de UVB și, implicit a efectelor lor secundare, în special a carcinogenezei (cancere nonmelanomatose), la acești pacienți.

Acidul trans retinoic (ATRA) face parte din familia retinoizilor, derivați de vitamina A. Este utilizat în terapia unor forme de cancer (leucemia promielocitică acută), a unor dermatoze variate prin tulburări de keratinizare (genodermatoze, psoriazis, acnee vulgară) și local în dermatologia cosmetică.

Retinoizii au un comportament complex, deși sunt utilizați ca depigmențanți. Efectele biologice sunt mediate, cel puțin în parte de receptorii specifici-RARs de tip α , β , γ . Nu se cunoaște încă nimic despre expresia constitutivă și mecanismele de reglare a receptorilor nucleari pentru retinoizi în melanocitele normale.

In vivo produc depigmentarea leziunilor hipermelanotice la om, posibil printr-un turn over cutanat crescut și cresc pigmentarea indusă de ultraviolete la om și la șoareci. ATRA in vitro are efecte bimodale asupra melanocitelor: stimulează diferențierea precursorilor melanocitari, inducând transcripția tirozinazei prin activarea PKC și expresia MITF și îndepărtează melanocitele diferențiate prin promovarea apoptozei pe calea caspazei-3 și reducerea bcl-2.

În experimentele efectuate, am observat că ATRA a avut un rol semnificativ statistic de inhibare a proliferării melanocitare, liniar cu concentrația și timpul de expunere la substanță, (de exemplu: $p=0,001$ la 6h, $p=0,006$ la 24h) fără a afecta viabilitatea melanocitelor tratate; în același timp a stimulat melanogeneza, semnificativ față de martorul netratat pentru conținutul de melanină totală ($p=0,009$, 6h), dar ne semnificativ pentru activitatea enzimatică a tirozinazei ($p=0,56$), efect diminuat prin creșterea timpului de expunere la substanță. Acest efect al ATRA nu a mai fost descris în literatură.

Expunerea la ATRA a determinat o creștere lentă a activității SOD, cu timpul de expunere la ATRA, care ar putea fi expresia unei sinteze de novo a enzimei în melanocite, dar nivelul de activitate enzimatică s-a menținut sub martorul netratat, în timp ce nivelul activității catalazei s-a menținut semnificativ mai redus comparativ cu martorul după expunerea la ATRA pentru expunerea de scurtă durată ($p=0,03$, 12h) și a crescut semnificativ la o expunere îndelungată, $p=0,04$, 24h.

Combinarea expunerii ATRA cu iradierea UV a avut efecte diferite în funcție de lungimea de undă. După expunerea de lungă durată la ATRA, în culturile iradiate cu UVA am observat o rată a proliferării mai înaltă, comparativ cu cele iradiate cu UVB, efect invers, marginal semnificativ, comparativ cu expunerea de scurtă durată. ($p=0,077$, 24h)

Efectul combinării celor doi factori, (ATRA și UV) nu a fost cumulativ stimulator pentru melanogeneza, deși ambii, separat au avut un efect semnificativ de creștere a pigmentării melanocitare. Iradierea cu UVA a celulelor preexpușe la ATRA a determinat o stimulare mai redusă, a melanogenezei comparativ cu ATRA după expunerea de 6h, dar expunerea de 12h, respectiv 24h, a stimulat melanogeneza, (ne semnificativ statistic), comparativ cu expunerea la ATRA singur și combinația ATRA-UVB.

Expunerea la combinația ATRA-UVA a avut un efect benefic, semnificativ asupra melanocitelor comparativ cu iradierea UVA la nivelul activității enzimatice a SOD ($p=0,012$) și Cat ($p=0,959$), ceea ce înseamnă că ATRA a avut un efect de protecție împotriva ROS induse de UVA și melanogeneza în culturile de melanocite.

Iradierea cu UVB a crescut activitatea enzimatică a tirozinazei ($p=0,000$). În cazul combinării ATRA cu UVB, efectul cumulativ a fost inhibitor al melanogenezei, comparativ cu ATRA, constant, semnificativ ($p=0,06$), indiferent de timpul de expunere la ATRA. Aceste condiții experimentale au dus la scăderea activității enzimatice a SOD ($p=0,13$ la 12h) și Cat ($p=0,04$ la 12h), cu diminuarea consecutivă a protecției enzimatice a melanocitelor împotriva stresului oxidativ.

Senescența replicativă este o barieră naturală a proliferării, declanșată de eroziunea și disfuncția telomerilor, fiind un răspuns de tip checkpoint datorat degradării ADN activat de telomerii disfuncționali. Senescența este unul din răspunsurile la stresul mutagenic, care duce la oprirea proliferării și deci, blochează amenințarea oncogenică, dar permite celulelor să supraviețuiască și să funcționeze normal, ceea ce ar putea fi benefic. În melanocite se găsesc nivele abundente de factori antiapoptotici: Bcl 2 și Slug, care asigură supraviețuirea melanocitelor, chiar cu prețul intrării în senescență după expunerea la stimuli mutagenici (UV).

Efectul expunerii la ATRA, 6h a fost de *îmbătrânire* a culturilor melanocitare, dar, cu păstrarea unui nivel înalt al *celulelor foarte tinere*, ($p=0,01$) ceea ce sugerează că ATRA a indus cu precădere senescența celulelor deja angajate în procesul de diferențiere, pe când *celulele foarte tinere* au fost stimulate să prolifereze de expunerea la ATRA. Expunerea melanocitelor la ATRA 24h, a determinat *îmbătrânirea* populației de celule, ceea ce sugerează că o expunere de lungă durată afectează toate tipurile de *celule*, inclusiv pe cele *foarte tinere* ($p=0,000$), inducând diferențierea celulară și, consecutiv *senescența*. Acest efect al ATRA este cunoscut la nivelul celulelor leucemice- leucemie mieloidă, celulelor mamare maligne și premaligne, dar nu a fost studiat, după știința autorului, pe culturi de melanocite. Am observat o corelație între efectul antioxidant al ATRA după iradierea cu UV a melanocitelor și senescența celulară. Expunerea melanocitelor la combinația ATRA-UVA a determinat *întinerirea* populației melanocitare, pe când iradierea cu UVB a culturilor melanocitare pretratate cu ATRA a determinat *îmbătrânirea* accentuată a culturilor melanocitare, semnificativ pentru toate *vârstele celulare*.

Aceste efecte observate in vitro, în culturile melanocitare expuse la ATRA ar putea fi utilizate terapeutic pentru scăderea dozelor de iradiere cu ultraviolete și a efectelor lor secundare prin utilizarea unor topice cu acid retinoic, în concentrații extrem de scăzute anterior iradierii terapeutice; uniformizarea repigmentării în vitiligo, având în vedere că expunerea melanocitelor la UVB scade pigmentarea în melanocitele active, dar ar putea să crească pigmentarea în melanocitele inactive din plăcile depigmentate, dar încă viabile (celulele melanocitare usă din infundibulul folicular); obținerea unei protecții antioxidante la expunerea solară a melanocitelor cutanate din pielea subiecților cu fototip cutanat deschis; inducerea diferențierii și senescenței celulare în celulele melanomatoase, în combinație cu iradierea terapeutică.

Concluzii

1. Realizarea unor culturi melanocitare primare umane de la indivizi sănătoși și cu vitiligo a reprezentat, după informațiile pe care le deține autorul, o premieră națională.
2. Cercetarea a fost realizată in vitro; culturile melanocitare și keratinocitare au fost utilizate pentru crearea unor modele experimentale de studiu al efectelor unor factori **interni** (tirozina, modificări ale factorilor de creștere) și **externi chimici** (vitamina C, acidul all trans retinoic) și **fizici** (radiația ultravioletă).
3. După iradierea cu UVA și respectiv UVB, a culturilor melanocitare am observat stimularea neliniară, cu energia iradierii a proliferării celulare la dozele mici și medii; energiile de iradiere mai mari au avut efecte citotoxice.
4. În culturile melanocitare provenite de la subiecți cu pielea deschisă la culoare sinteza de pigment, fie în urma iradierii cu ultraviolete, fie stimulată prin expunerea la tirozină a fost un factor de generare a stresului oxidativ și a fost dăunătoare pentru celule, prin reducerea protecției antioxidante și apariția unui aspect senescent, prematur al melanocitelor după expunerea la concentrații mari de tirozină; această alterare ar putea fi considerată ca un marker pentru stresul oxidativ mediat de expunerea UV.
5. În cazul culturilor studiate, am evidențiat că efectul vitaminei C depinde în special de concentrația sa, ea determină scăderea melanogenezei, fără a fi citotoxică pentru melanocite, dar, în concentrații mai mari, determină creșterea sintezei de melanină și a dendricității cu prețul

scăderii viabilității celulare și inducerii apoptozei, prin efect citotoxic direct și indirect prin inducerea melanogenezei.

6. În experimentele efectuate, ATRA a inhibat proliferarea melanocitară, liniar cu concentrația și timpul, fără a afecta viabilitatea; a stimulat melanogeneza, efect diminuat prin creșterea timpului de expunere la substanță și a determinat o creștere lentă a activității SOD, cu timpul de expunere.
7. Rolul ATRA în combinația ATRA-UVA pare a fi de protejare a melanocitelor pe termen lung, deși a stimulat melanogeneza, prin sporirea mecanismelor de protecție antioxidantă și reducerea senescentei celulare, pe când în combinația ATRA-UVB, rolul ATRA pare a accentua efectele nocive ale iradierii; deși a inhibat melanogeneza de novo, generatoare de radicali liberi, a scăzut activitatea antioxidantă enzimatică și a indus senescenta precoce a melanocitelor iradiate.
8. Rezultatele acestui studiu in vitro pot fi utilizate în clinică pentru îmbunătățirea tratamentului diferitelor discromii cutanate de cauză melanocitară sau chiar în terapia unor afecțiuni tumorale cutanate.

Curriculum Vitae

Date personale

Nume: Ioana Bâldea

Data și locul nașterii: 1 Mai 1976, Cluj-Napoca, Romania

Adresa: Catedra de Fiziologie, Universitatea de Medicină și Farmacie, "Iuliu Hațieganu" Clinicilor 1, Cluj-Napoca, Romania

Telefon/ Fax: +40-264598575

Email: baldeai@yahoo.com

Locul de muncă: asistent universitar, Catedra de Fiziologie, Universitatea de Medicină și Farmacie, "Iuliu Hațieganu" Clinicilor 1, Cluj-Napoca, Romania

Educație și activitate profesională

1994 –2000 - studii universitare, Facultatea de Medicină, Universitatea de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca

Din anul 2006 - medic specialist prin susținerea examenului de specialitate organizat de Ministerul Sănătății, specialitatea: Dermatovenerologie.

Din anul 2009 -Cadru didactic - asistent universitar –Catedra de Fiziologie, Facultatea de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca

Doctorat și activitate de cercetare

1. Doctorat fără frecvență –incepand din **01.11.2004**, Domeniu: Dermatovenerologie, Clinica de Dermatologie, Facultatea de Medicina si Farmacie Iuliu Hatieganu, Cluj-Napoca, Titlul tezei de doctorat: "Alterații melanocitare sub influența unor factori externi si interni", acumulând experiență profesională în Laboratorul de culturi celulare al Catedrei Dermatovenerologie, UMF, Cluj.

2. Schimburi de experiență - Laboratorul de Culturi celulare, Clinica de Dermatologie, Universitatea de Medicină, Freiburg, Germania (ianuarie, 2005).

3. Stagiul de cercetare- Laboratorul de cercetare al Spitalului Universitar **AKH**, secția Dermatologie din Viena, Austria , (ianuarie, 2006).

4. Cursuri de perfectionare: Melanoma Symposium, Occupational Diseases, Skin Disorders of Pregnancy la congresul al 12-lea al Academiei Europene de Dermatovenerologie (EADV), Praga, octombrie 2003; Dermatologie cosmetică și chirurgicală, la Clinica de Dermatovenerologie, Cluj-Napoca, 2004, Paediatric Dermatology, Dermatoimmunology and Allergic Skin Disease, Genetics in dermatology, EADV, Londra octombrie, 2005 , Cryotherapy Course – cu bursă din partea EADV, Saariselka, 2006.

5. Școala de vară –7th International Stem Cell School in Regenerative Medicine si curs practic „Biomaterials” cu bursă finanțată de European Union Marie Curie Conferences and Training Courses „RegMedTeach” organizate de *Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic*, Praga, noiembrie, 2009

6. Premii- acordat de SRSF pentru lucrarea : Baldea I, Cosgarea R, Filip A, Mureșan A. Influences of all trans retinoic acid and ultraviolet light exposure on normal human melanocytes, prezentată la Conferința Națională a Societății Române de Științe Fiziologice cu participare internațională, mai, 28-30, Craiova; **-premiul UMF pentru posterul :** Rodica Cosgarea, Simona Șeniță, **Baldea I**, Mirela Susan, Mariana Ion, Efectul citotoxic al terapiei fotodinamice al terapiei cu 5,10,15,20 Tetrapsulfonat-fenil-porfirina (TSPP) pe culturile primare de keratinocite și celule carcinoatoase, prezentat la Sesiunea de postere a UMF “Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca, decembrie 2009

7. Societăți științifice: Societatea Română de Dermatovenerologie (SRD), European Society for Pigment Cell Research (ESPCR), Societatea Română de Științe Fiziologice (SRSF), Asociația Stresului oxidativ in medicină (ASOM)

8. Participare ca membru in proiecte naționale (CNCSIS, CEEEX, PN II)

Grantul CNCSIS (nr 33382/20.06.04) intitulat REALIZAREA TEHNOLOGIEI DE CULTIVARE A KERATINOCITELOR SI MELANOCITELOR IN VITRO - GREFAREA DE KERATINOCITE SI MELANOCITE. PROGRAMUL CERCETARE - GRANT CNCSIS TIP A– director de proiect Prof. dr. RODICA COSGAREA

Proiectul de cercetare CEEEX, intitulat “DIAGNOSTIC MOLECULAR AL EPIDERMOLIZELOR BULOASE. TEHNICI MODERNE DE CERCETARE, DIAGNOSTIC, TRATAMENT SI PREVENIRE A EPIDERMOLIZELOR BULOASE. REALIZAREA UNUI REGISTRU NATIONAL AL GENODERMATOZELORE - DEGEB” director de proiect Prof. dr. RODICA COSGAREA, 2006-2008.

Proiectul de cercetare CEEEX, intitulat “BIOCOMPOZITE CU PORFIRINE CU APLICABILITATE IN TERAPIA FOTODINAMICA A TUMORILOR MALIGNNE CUTANATE” - director de proiect cercetător principal II, dr. Simina Dreve, 2006-2008.

Programul parteneriat, PN II: 2008 42/ 104/01102008, „FOTOCHEMOPROTECȚIA PRIN PRODUȘI NATURALI ÎN CANCERELE EPITELIALE FOTOINDUSE” -director de proiect Șef lucrări dr. Gabriela Adriana Filip, 2008-2010

9. Lucrări științifice și publicații:

Participarea cu lucrări la sesiuni de comunicări științifice:

1. Cosgarea R, Șindrilariu A, Corlățeanu O, Coța G, **Bâldea I**. Diagnosticul și tratamentul Micozisului fungoides. - Conferința Anuală a Asociației Dermatologilor Transilvani, Cluj-Napoca, 2002

2. Cosgarea R, Covaciu C, Corlățeanu O, **Bâldea I**. Clinical, Pathogenetic and Immunological Variability in Pyoderma Gangrenosum. Congresul al 11-lea al EADV, Praga, JEADV, XVI (Suppl.1) 316, 2002

3. Cosgarea R, Covaciu C, Corlățeanu O, Cota G, **Bâldea I**. Papuloeritrodermia Ofuji. Congresul Societății Române de Dermatologie, Dermatovenerologie, ISSN 1220-3734, supliment XLIII (3):54, 2002

4. Cosgarea R, Barb D, **Bâldea I**, Covaciu C. Dermatita IgA liniară după budesonid. Conferința Națională de Dermatologie, Dermatovenerologie, ISSN 1220-3734, supliment, XLVIII (3):16, 2003

5. Cosgarea R, **Bâldea I**, Iacob D. Paniculita reactivă la un copil cu boala Lyme. Conferința Națională de Dermatologie, Sinaia, Dermatovenerologie, ISSN 1220-3734, XLIX (3) supliment 1, 14-15, 2004

6. Cosgarea R, Senila S, **Bâldea I**, Baciu A. Tehnici de grefare în carcinoamele feței. Conferința Nationala de Dermatologie, Dermatovenerologie, ISSN 1220-3734, L (3);6, 2005

7. **Bâldea I**, Șenița S, Cosgarea R, Reacție buloasa după Leflunomid, Conferința Națională de Dermatologie, Dermatovenerologie, ISSN 1220-3734, L(3);15, 2005

8. Cosgarea R, Cutuș R, Șenila S, **Bâldea I**. Neurosyphilis – Early and Late Manifestations of the Infection. P14.62. Congresul al 16lea al EADV, Londra, JEADV, Suppl, 2005
9. Cosgarea R, Șenila S, **Bâldea I**, Ispasoiu D, Ungureanu L, Colibaba L, Crisan A, Baci A. Melanomul malign – evoluție previzibilă? Conferința Națională de Dermatologie Cosmetică și Chirurgicală, București, 2006
10. Cosgarea R, Șenila S, **Bâldea I**, Colibaba L, Crisan A, Baci A. Pulsterapia cortizonică în alopecia areata. Conferința Națională de Dermatologie, cu participare internațională, Dermatovenerologie, LI (3), suppl1, ISSN 1220-3734; 2006:21
11. Cosgarea R, Șenila S, **Bâldea I**, Ispasoiu D, Ungureanu L, Colibaba L, Crisan A, Baci A, Voicu D. Melanomul malign - Aspecte clinice si evolutive neobișnuite, Conferința Națională de Dermatologie, cu participare internațională, Dermatovenerologie, LI (3), suppl1, ISSN 1220-3734; 2006:68
12. Cosgarea R, **Bâldea I**, Macovei V, Senila S. Utilitatea grefelor de keratinocite si melanocite in patologia cutanata. Simpozionul: Departamentul de explorare a stresului oxidativ - 5 ani de activitate. Realizări si perspective, Cluj-Napoca, 2006
13. Cosgarea R, **Bâldea I**, Macovei V, Senila S. Utilitatea culturilor de keratinocite in practica dermatologică, Conferința Națională de Dermatologie, cu participare internațională, Dermatovenerologie, LI (3), suppl1, ISSN 1220-3734; 2006:38
14. Cosgarea R, Șenila S, Malinovschi G, Moisil V, **Bâldea I**, Danescu S, Ispasoiu D, Harceaga O. Aspecte particulare in diagnosticul si evolutia melanoamelor, A XII-a Conferinta a Asociației Dermatologilor Transilvani, Cluj- Napoca 2007
15. Cosgarea R, Senila S, Malinovschi G, Moisil V, **Bâldea I**, Danescu S, Ispasoiu D, Harceaga O. Lambouri in acoperirea defectelor cutanate faciale, A XII-a Conferință a Asociației Dermatologilor Transilvani, 1-2 iunie, Cluj- Napoca, 2007
16. Cosgarea R, Senila S, **Bâldea I**, Ispasoiu D, Ungureanu L, Colibaba L, Crisan A, Malignant Melanoma - could it have a predictable course? P 720, 16th Congress of EADV, Viena, 2007
17. Senila S, **Bâldea I**, Ungureanu L, Ispasoiu D, Macovei V, Cosgarea R. Down's Syndrome and Alopecia areata totalis responsive to topical immunotherapy with diphenylcyclopropenone P764, 16th Congress of European Academy of Dermatology and Veneorology, Viena, 2007
18. Senila S, **Bâldea I**, Cosgarea R. Acroosteopathia ulceromutilans nonfamiliaris – case presentation, 21 World Congress of Dermatology, Buenos Aires, 2007
19. **Baldea I**, Cosgarea R, Senila S. Influence of ascorbic acid on cultured vitiligo melanocytes, PP 039, Program and Abstracts of the 13th Meeting of the European Society for Pigment Cell Research, 2007
20. Senila S., **Bâldea I.**, Danescu S., Macovei V., Ungureanu L., Stefanescu D., Cosgarea R., Imunoterapia topica in alopecia areata, Conferința Națională de Dermatologie, cu participare internationala, Dermatovenerologie, ISSN 1220-3734, LII (2), supl 1, 2007:29-30
21. Cosgarea R., Ungureanu L., Stefanescu D., **Bâldea I.**, Senila S., Moisil V., Harceaga O., Susan M., Danescu S., Macovei V., Cutus R., Baican A., Varietatea clinica si dermatoscopică a melanomului, , Conferința Națională de Dermatologie, cu participare internationala, Dermatovenerologie, ISSN 1220-3734, LII (2), supl 1, 2007: 43-44
22. Cosgarea R., Senila S., Malinovschi G., **Bâldea I.**, Moisil V., Harceaga O., Susan M., Colibaba L., Crisan A., Danescu S., Macovei V., Pyoderma gangrenosum – dermatoza neutrofilica cu fatete diverse, Conferința Națională de Dermatologie, cu participare internationala, Dermatovenerologie, ISSN 1220-3734, LII (2), supl 1, 2007: 67-68
23. Cosgarea R., Senila S., Susan M., **Bâldea I.**, Efectul apei termale Herculane asupra eliberării de histamina pe extras de piele umana (studiul SEPhRA); Rolul protector al apei termale Herculane asupra keratinocitelor si fibroblastilor de cultura (studiul Clinicii Dermatologie, Cluj- Napoca), Conferința Națională de Dermatologie, cu participare internationala, Dermatovenerologie, ISSN 1220-3734, LII (2), supl 1, 2007:19-20

24. Cosgarea R, Senila S, Susan M, **Bâldea I**, Ion M, Cytotoxic effects of photodynamic therapy with 5,10,15,20 tetra- (p-sulphonate-phenyl)-porphyrin on primary normal human keratinocytes and carcinoma cell cultures, al 5- lea Simpozion de primavara al European Academy of Dermatology and Veneoreology, Istanbul, mai, 2008
25. Senila S, Cosgarea R, **Bâldea I**, Susan M, Photodynamic therapy with 5 delta amino levulinic acid and chitosan on primary normal human keratinocytes and carcinoma cell cultures, al 5- lea Simpozion de primavara al European Academy of Dermatology and Veneoreology, Istanbul, mai, 2008
26. **Bâldea I**, Cosgarea R, Susan M, Dreve S, Evaluation of chitosan cytotoxicity on primary normal human cultured fibroblasts ,al 5-lea Simpozion de primavara al European Academy of Dermatology and Veneoreology, Istanbul, mai, 2008
27. **Bâldea I**, Cosgarea R, Stefanescu D, Senila S, Macovei V, Danescu S, Influence of ascorbic acid and ultraviolet radiation B on cultured vitiligo melanocytes, al 5- lea Simpozion de primavara al European Academy of Dermatology and Veneoreology, Istanbul, mai, 2008
28. **Bâldea I**, Cosgarea R, Nistea Roxana, Senila S, Macovei V, Danescu S, Influences of all trans retinoic acid and UV light on normal human melanocyte cultures, Congresul European Academy of Dermatology and Veneoreology, Paris, octombrie, 2008
29. Simona ŞeniIă, Rodica Cosgarea, Mirela Susan, **Bâldea I**, Simina Dreve, Terapia fotodinamica cu acid 5-aminolevulinic si chitosan pe culture primare de keratinocite si celule carcinomatoase, P6, Conferința Națională de Dermatologie cu participare internațională, Dermatovenerologie, ISSN 1220-3734,LIII (2), supl 1;2008: 94
30. Mirela Susan, Rodica Cosgarea, **Bâldea I**, Simona ŞeniIă, Mariana Ion, Efectul apoptotic al terapiei fotodinamice cu acid 5-aminolevulinic și 5,10,15,20 tetra-p- sulfonat-fenilporfirina pe culturi primare de keratinocite si celule carcinomatoase, P8, Conferința Națională de Dermatologie cu participare internațională, Dermatovenerologie, ISSN 1220-3734, LIII (2), supl 1;2008: 94
31. Rodica Cosgarea, Simona ŞeniIă, **Bâldea I**, Mirela Susan, Mariana Ion, Efectul citotoxic al terapiei fotodinamice cu 20 tetra-p- sulfonat-fenilporfirina pe culturi primare de keratinocite si celule carcinomatoase P7, Conferința Națională de Dermatologie cu participare internațională Dermatovenerologie, ISSN 1220-3734, LIII (2), supl 1;2008: 95
31. **Bâldea I**, Rodica Cosgarea, Mirela Susan, Simona ŞeniIă, Simina Dreve, Evaluarea efectului citotoxic al chitosanului pe culturi primare de fibroblasti , P10, Conferința Națională de Dermatologie cu participare internațională, Dermatovenerologie, ISSN 1220-3734,LIII (2), supl 1;2008: 95
32. **Bâldea I**, Rodica Cosgarea, Daniela Ştefănescu, Simona ŞeniIă, Victorina Macovei, Sorina Dănescu, Efectele acidului ascorbic si a radiatiei ultraviolete B pe culturi de melanocite provenite de la pacienti cu vitiligo P11, Conferința Națională de Dermatologie cu participare internațională, Dermatovenerologie, ISSN 1220-3734,LIII (2), supl 1;2008: 96
33. **Bâldea I**, Rodica Cosgarea, Simona ŞeniIă, Sorina Dănescu, Victorina Macovei, Influențele acidului retinoic si a radiatiei ultraviolete pe culturi de melanocite umane P12, Conferința Națională de Dermatologie cu participare internațională, Dermatovenerologie, ISSN 1220-3734,LIII (2), supl 1;2008: 96
34. **Bâldea I**, Rodica Cosgarea, Filip Adriana, Mureşan Adriana Influences of all trans retinoic acid and ultraviolet light exposure on normal human melanocytes, Fiziologia,Official Journal of the Society of Physiological Sciences, ISSN 1223-2076, supliment, p 5, 2009
35. Cosgarea R, Susan M, Senila S, **Bâldea I**, Macovei V, Dreve S. Photodamaging effects of porphyrins on primary human keratinocytes and carcinoma cell cultures. The evaluation of cytotoxic and phototoxic effect of chitosan an cell cultures. Journal of Investigative Dermatology, 2009: (129) 28, 39th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Science
36. Stefanescu D, **Bâldea I**, Cosgarea R, The effect of Phenitoin on melanocyte cultures. Journal of Investigative Dermatology, 2009: (129) 26, 39th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Science

37. **Baldea I**, Rodica Cosgarea, Filip Adriana, Mureșan Adriana. Study of human melanocyte modifications after exposure to all trans retinoic acid and ultraviolet radiation in vitro, Rom J Biochem., 46, suppl. ISSN 1582-3318 , P. Bucharest, 2009:33-34

Publicații:

1. Cosgarea R, Covaciu C, **Bâldea I**, Cota G, Corlateanu O. Papuloeritrodermia Ofuji și Amiloidoza Cutanată. Dermatovenerologie, ISSN 1220-3734, XLVIII(1):43-47, 2003
2. **Bâldea I**, Actualitati în literatura privind alterările melanocitare. Acta Dermatologica Transilvanica, IV, (3-4):80, 2004
3. **Bâldea I**, Senila S, A Ciceo, V Macovei, R Cosgarea, M Petrescu, Fibroepiteliomul Pinkus- prezentare de caz. Acta Dermatologica Transilvanica, vol V, nr 1-2, 30 -33, 2005
4. Senila S, **Bâldea I**, Mihailescu C, Caz pentru diagnostic. Acta Dermatologica Transilvanica, vol V, nr 1-2, 67 – 68, 2005
5. **Bâldea I**, Cosgarea R, Senila S. Grefarea keratinocitelor autologe – Utilitate in acoperirea defectelor cutanate. Acta Dermatologica Transilvanica, vol V, nr 3-4:55, 2005
6. **Bâldea I**, Cosgarea R, Melanocitul și melanogeneza, Acta Dermatologica Transilvanica, vol VII, nr 1-2:5-12, 2007
7. Macovei V, Cosgarea R, Danescu S, Senila S, **Bâldea I**, Susan M, Tratamentul lichenului plan, Acta Dermatologica Transilvanica, vol VII, nr 1-2:12-20, 2007
8. Susan M, Cosgarea R, Șenilă S, **Bâldea I**, Macovei V, Utilitatea terapiei fotodinamice în dermatologie, Acta Dermatologica Transilvanica, vol VII, nr 3-4:12 -17, 2007
9. **Bâldea I**, Cosgarea R – Influența acidului ascorbic și a iradierii cu UVB asupra melanocitelor umane normale, in vitro, Revista Dermato-Venerologie, 2009, 54: 107-113 [CNCSIS B]
10. Cosgarea R., Dănescu S., Cutus R., Senilă S., Macovei V., **Bâldea I**, Pop R., Pop V., Ferencz B., Popescu O., Lelutiu L. Diagnosticul molecular intr-un caz de epidermoliză buloasă distrofică forma dominantă, Revista Dermato- Venerologie, 2009, 54: 7-11 [CNCSIS B]
11. **Baldea I**, Mocan T, Cosgarea R. The role of ultraviolet radiation and tyrosine stimulated melanogenesis in the induction of oxidative stress alterations in fair skin melanocytes Exp Oncol 2009; 31(4): 200-208 PUBMED 20010534 [INDEXED FOR MEDLINE]

Melanocyte alterations under the influences of internal and external factors

Contents

Introduction	4
Abbreviations	9
Part I. Background	
Ch. 1: Biology of the normal melanocyte and pigmentary disorders	10
1. 1. Skin colour.....	10
1. 2. Embriology and distribution of the melanocytes.....	11
1. 3. Structure and function of the melanocyte.....	14
1. 4. The melanosom.....	16
1. 5. Melanosomal transport and distribution.....	18
1. 6. Melanin biosynthesis.....	20
1. 7. Biological regulation of the normal melanocyte function.....	22
1. 8. Melanin and melanin precursors – physicochemical properties and biological roles.....	25
1. 9. Congenital pigmentary disorders caused by alterations of melanogenesis.....	26
Ch. 2. Normal human melanocytes – life expectancy, senescence, apoptosis in vivo and in vitro.	28
2. 1. Life expectancy of melanocytes.....	28
2. 2. Melanocytes senescence.....	29
2. 3. Epigenetic alterations and replicative life of the melanocytes.....	30

2. 4. Melanocyte apoptosis.....	30
Ch. 3. Factors which influence human melanocytes in vivo and in vitro.....	32
3.1. Melanocystostimulating hormone.....	32
3. 2. Ultraviolet irradiation.....	33
3. 2. 1. Climate and altitude influence on solar ultraviolet radiation.....	33
3. 2. 2. Optical properties of the skin.....	33
3. 2. 3. Effects of ultraviolet exposure on human skin.....	34
3. 2. 4. Roles of ultraviolet irradiation in the induction of DNA alterations and cell death in melanocytes and keratinocytes.....	37
3. 2. 5. Roles of ultraviolet irradiation in stimulating the synthesys of hormones, cytokines, growth factors in epidermal cells	38
3. 3. Tyrosine.....	39
3. 4. Antioxidants.....	41
3. 4. 1. Main antioxidants.....	41
3. 4. 2. Topical antioxidants	42
3. 4. 3. Oxidative stress, general data.....	43
3. 4. 4. Retinoids. All trans retinoic acid.....	44
3. 4. 4. 1. Physical and chemical properties.....	44
3. 4. 4. 2. Effects on melanocytes and melanoma cells in vivo and in vitro.....	45
3. 4. 5. C vitamin.....	48
3. 4. 5. 1. Physical and chemical properties.....	48
3. 4. 5. 2. Roles in organism.....	49
3. 4. 5. 3. Antioxidant mechanism.....	49
3. 4. 5. 4. Industrial uses.....	50

Part II. Original research

Ch. 4. Working hypothesis.....	51
4.1. Melanocyte culture exposure to ultraviolet A and ultraviolet B	51
4.2. Melanocyte culture exposure to tyrosine.....	52
4.3. Melanocyte culture exposure to C vitamin.....	52
4.4. Melanocyte culture exposure to all <i>trans retinoic acid</i>	52
Ch. 5: Materials and methods.....	54
5.1. Primary normal human melanocyte culture isolation.....	54
5.2. Tyrosine exposure.....	56
5.2.1. Tyrosine media preparation.....	56
5.2.2. Cell source.....	56
5.2.3. Ultraviolet A and B irradiation exposure.....	57
5.3. C vitamin exposure.....	57
5.3.1. C vitamin media preparation.....	57
5.3.2. Cell source.....	57
5.3.3. Ultraviolet B irradiation exposure.....	58
5.4. All trans retinoic acid exposure.....	58
5.4.1. All trans retinoic acid media preparation.....	58
5.4.2. Cell source.....	58
5.4.3. Ultraviolet A and B irradiation exposure.....	59
5.5. Melanocyte bioassay.....	59
5.5.1. Cell proliferation/ citotoxicity assessment.....	60
5.5.2. Cell morphology and viability assessment.....	61
5.5.3. Total melanin content assessment	64
5.5.4. Total protein content assessment.....	65
5.5.5. Tyrosinase enzymatic activity (DOPA oxidase) assessment.....	65

5.5.6. Oxidative stress assessment.....	65
a. Superoxiddismutase enzymatic activity.....	65
b. Catalase enzymatic activity.....	66
5.5.7. Melanocyte senescence assessment.....	66
5.5.8. Melanocyte apoptosis assessment.....	67
5.5.9. Statistical methods.....	69
Ch. 6: Results and discutions.....	70
6.1. Ultraviolet irradiation effects on epidermal melanocyte proliferation.....	70
6.2. Melanocyte behaviour after tyrosine and ultraviolet irradiation exposure.....	74
6.2.1. Melanocyte proliferation.....	74
6.2.2. Melanocyte morphology.....	77
6.2.3. Melanocyte viability.....	81
6.2.4. Total melanin content.....	82
6.2.5. Tyrosinase enzymatic activity.....	82
6.2.6. Superoxiddismutase & Catalase enzymatic activity.....	83
6.2.7. Discutions.....	87
6.3. Melanocyte behaviour after C vitamin and ultraviolet B irradiation exposure.....	94
6.3.1. Melanocyte apoptosis.....	94
6.3.2. Melanocyte proliferation.....	97
6.3.3. Melanocyte morphology.....	97
6.3.4. Melanocyte viability.....	101
6.3.5. Total melanin content.....	104
6.3.6. Discutions.....	108
6.4. Melanocyte behaviour after <i>all trans retinoic acid</i> and ultraviolet irradiation exposure.....	112
6.4.1. Melanocyte proliferation after retinoic acid exposure.....	112
6.4.2. Melanocyte proliferation after retinoic acid and ultraviolet light exposure.....	118
6.4.3. Melanocyte viability.....	124
6.4.4 Total melanin content	126
6.4.5. Tyrosinase enzymatic activity.....	128
6.4.6. Superoxiddismutase & Catalase enzymatic activity.....	134
6.4.7. Melanocyte senescence.....	138
6.4.8. Discutions.....	152
Ch. 7: General conclusions.....	164
7.1. Original contributions of the research.....	164
7. 1. 1. Primary normal human melanocyte cultures isolation from normal and vitiligo skin...	164
7. 1. 2. Experimental models design for in vitro studies.....	164
7.2. Potential uses of the current research in clinical practice.....	165
7. 3. Conclusions.....	168
Ch.8: References.....	170
Anexes: Published articles.....	183

Key words: melanocyte, tyrosine, all trans retinoic acid, C vitamin, ultraviolet light

Abstract

Background

Knowing the mechanisms of skin pigmentation is critical for understanding why the people with light colored skin are 50 times more likely to develop basal or squamous skin carcinoma and 13 times more likely to develop malignant melanoma than those with darker skin.

Melanin is synthesised starting from tyrosine by tyrosinase and the related proteins, it works like a sun screen which absorbs UV radiation and prevents the degradation of DNA. It also has antioxidant properties, which neutralise the free radicals. Skin pigmentation requires the cooperation between melanocytes and keratinocytes to produce the melanosoma and to transfer them to the keratinocytes, where they are distributed intracellular in different patterns while the keratinocyte advances to the skin surface. Recently it has been discovered that fibroblasts play an active role in the melanocyte growth regulation and differentiation.

The major determinant of skin color is the activity of melanocytes, i.e. the quantity and quality of pigment production, not the melanocyte density. Compared to light colored skin, the dark skin has larger melanosoma which contain more melanin; once transferred to the keratinocytes they are dispersed and degraded much slower. Skin melanogenesis is increased after cutaneous diseases, UV light exposure, chemical, physical burns, mechanical trauma and decreased or even absent in several genetic disorders (oculocutaneous albinism, Chediak-Higashi syndrome, Griscelli syndrome, phenylketonuria) or acquired skin conditions like atopic dermatitis.

Reactive oxygen species (ROS) are generated in the cells in special physiologic and pathologic conditions. ROS can create oxidative distractions when their production exceeds the antioxidant protection, thus creating oxidative stress which is defined as the lack of equilibrium between the oxidative substances and antioxidant defences. The most important enzymes involved in the melanocyte protection against oxidative stress are superoxid dismutase (SOD) and catalase (Cat). SOD is an enzymatic antioxidant which reduces superoxid radical O_2^- to peroxid H_2O_2 and Cat is an enzyme which reduces H_2O_2 to water. ROS roles in producing UV mediated distractions in the skin is well known, thus resides the importance of the protection by using a topical antioxidant. Studies conducted in vivo, in lab animals showed that alfa tocopherol, selenium enriched water, flavopherol or C vitamin, as well as iron quenching substances associated with solar filters reduced oxidative stress, tumor production and dermatosis induced by UV exposure.

Although there were remarkable discoveries in what concerns the mechanisms of skin melanogenesis, senescence, apoptosis, carcinogenesis and genetic control of the melanocytes, the role of the cutaneous melanocyte and melanin in skin homeostasis is not completely understood.

Aim and objectives

The thesis studies the influences of exposures to tyrosine (an aminoacid, melanin precursor), all trans retinoic acid (activ derivative of A vitamin), respective, C vitamin (ascorbic acid) combined with UV light exposure type A and B in vitro, on cell proliferation, melanogenesis, apoptosis and oxidative stress in cultured human melanocytes.

Materials and methods

We used several primary normal human adult melanocyte cultures from individuals with phototype II and III, melanocyte cultures from patients with vitiligo, taken from normal skin areas, cultivated in the Dermatology Department Research Lab, Cluj and a *normal human epidermal melanocyte* culture from Caucasian newborn foreskin, (Promocell, Hamburg, Germany).

Primary human melanocyte cultures isolation: Melanocytes were obtained from skin biopsies taken from healthy skin, through sterile biopsy, incubated with collagenase and trypsin/EDTA. Recovered cells were resuspended and seeded onto a 25 cm² culture plates in serum free, keratinocyte growth medium. All cultures were fed twice weekly and incubated in a 37 °C and 5% CO₂, humidified environment. Melanocytes were separated from the keratinocytes through repeated passages and resuspended in complete melanocyte growth medium.

Melanocyte bioassay: The cell cultures were exposed to the tested substances dissolved in serum free basal medium for melanocytes in different concentrations for various periods of time:

- tyrosine (0,5mM, 1mM, 2mM, 3,4mM), for 24h, respective 72h;
- C vitamin (0,1mg/ml, 0,5mg/ml, 1mg/ml, 4mg/ml, 7mg/ml, 10mg/ml, 50mg/ml), for 6h, 12h, 24h, 48h;

- *all trans retinoic acid* (ATRA) (10^{-9} M, 10^{-8} M, 5×10^{-8} M, 10^{-7} M, 5×10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M), for 2h, 4h, 6h, 8h, 12h, respective 24h;
- followed by exposure to UV irradiation with:
- ultraviolet A (365nm) with energies of 20mJ/cm^2 , 30mJ/cm^2 , 40mJ/cm^2 , respective
- 50mJ/cm^2
- ultraviolet B (312nm) with energies of 10mJ/cm^2 , 20mJ/cm^2 , 30mJ/cm^2 , 40mJ/cm^2

All experiments were conducted, in triplicate, for each set of conditions there were untreated controls.

Results assessment: The methods used to measure the effects of the studied factors on the melanocyte cultures were modern, reproducible, reliable and widely used in the reserch labs: proliferation -MTS assay; viability-trypan blue exclusion dye method; spectrophotometrical methods quantitative determination of the total melanin content, protein content, enzymatic kinetics for the activities of tyrosinase, superoxide dismutase and catalase; direct immunofluorescence - apoptosis (annexin V-FITC) and cell senescence ($\gamma\text{H}_2\text{AX}$).

Results and discutions

The prevalence of human skin cancer depends on solar exposure of the skin. This relationship is respected for nonmelanoma skin cancers, while melanoma etiology seems to be more complicated. Skin cancer oncogenesis was described as a multistep process, in which ultraviolet radiation type A and B play an important role. The implication of UVA in tumorigenesis is sustained by data linked to aparition of skin melanoma in fish and hairless albino mice.

In our studies, we obtained a significant stimulation of cell proliferation in melanocyte cultures exposed to UVA ($p=0,000$), untill the energy of 30mJ/cm^2 , maintained in diferent culture conditions at 40mJ/cm^2 . UVB exposure of the melanocyte cultures significantly ($p=0,000$) stimulated cell proliferation, nonlinear with the energy of radiation, for the low doses $10 - 30 \text{mJ/cm}^2$; while the higher energy levels of irradiation had a cytotoxic effect on melanocytes.

Increased proliferation rate after UV light exposure, most important after UVA, allows accumulation of the lesions UV induced, esspecially through generation of free radicals.

The effects of exposure to various factors on melanocytes depend on skin phototype. We used melanocytes from individuals with low skin phototype (II, III). They do not present an intense tanning response after UV irradiation. These melanocytes synthesize eumelanin and pheomelanin, in contrast to Negroid individuals who synthesize only eumelanin. Melanin in light skin could contribute to sunlight-induced genotoxicity and maybe to melanocyte transformation, because pheomelanin acts as a photosensitizing agent and also, synthesis of pheomelanin, consumes cysteine and this may limit the capacity of the cellular antioxidative defense.

We used L-tyrosine to selectively modulate melanogenesis in melanocytes. The substance is an aminoacid, the starting point of melanin synthesis, present in pericellular and intracellular media. It strongly stimulates melanogenesis, as a protection factor against phisiological and pathological stimuli, esspecially UV exposure.

Our research data showed that increasing the tyrosine concentration in the culture media of the light skin melanocyte cultures determined a significant augmentation of melanogenesis both total content of melanin/culture ($p=0,002$) and tyrosinase enyimatic activity ($p=0,003$), compared to controls. UV exposure induced a dose dependent increase of melanogenesis. UV irradiation after previous tyrosine exposure of the melanocyte cultures increased melanogenesis significantly for total melanin content/culture ($p=0,000$) after UVA, respective ($p=0,002$) after UVB exposure. Tyrosinase activity was increased, not significant ($p=0,472$) UVA, respective ($p= 0,504$) UVB, compared to unirradiated tyrosine exposed cultures. UVB significantly increased melanogenesis compared to UVA ($p=0,031$ melanin content and $p= 0,001$ for tyrosinase enyimatic activity, at a tyrosine concentration of 1mM).

Melanogenesis was damaging for the cells due to increased oxidative stress, correlated with a lower antioxidant enzymatic protection of the melanocytes, but with higher proliferation rates. Enzymatic activities of SOD and Cat were increased (dose dependent) with the energy of irradiation. UVA irradiation determined increased activities of the antioxidant enzymes after tyrosine exposure

with lower concentrations than UVB, however it exhausted the antioxidant reserves, especially Cat, quicker than UVB. SOD activity was directly correlated ($r = 0.732$, $p = 0.000$) with the enzymatic activity of tyrosinase, when the melanocytes were treated to tyrosine 1 mM.

However, when the melanocytes were exposed to tyrosine 2 mM, SOD and enzymatic tyrosinase activity were indirectly correlated ($p = 0.011$, $r = -0.488$). SOD activity was also directly correlated ($r = 0.227$, $p = 0.099$) with the total melanin content of the cultures treated with tyrosine 1 mM. After exposure to tyrosine 2 mM SOD activity was indirectly correlated with melanin content ($p = 0.022$, $r = -0.446$). There were no correlations between SOD and tyrosinase activity, respective melanin content in the cultures treated with 0.5 mM tyrosine. Cat indirectly correlated with tyrosinase activity when the melanocytes were treated to tyrosine 2 mM ($p = 0.045$, $r = -0.397$), but not with melanin production.

Our data indicate that in low phototype melanocytes, melanogenesis, either following UV irradiation, or tyrosine exposure, especially in high concentrations, was detrimental for the cells by reducing the activity of catalase and superoxidodismutase, the natural antioxidants. UVA was more efficient in stimulating the activity of superoxide dismutase and catalase but also in depleting the reserves of the enzymatic defense against oxidative stress, especially catalase, than UVB. This physiologic response to UV light can be considered as an adjunctive risk factor for people with low phototype for developing a melanoma, when exposed to UV irradiation.

These effects in vitro can be used for a possible therapeutic use to induce differentiation or apoptosis of the melanoma cells (high tyrosine concentrations 2mM) or for repigmentation of the active melanocytes from the depigmented vitiligo plaques or postinflammatory depigmentations (low tyrosine concentrations 0,5mM).

Ascorbic acid is an organic acid with antioxidant properties. It behaves as an antioxidant due to his capacity to oxidate in energetic favorable conditions. The substance interferes with different stages of melanin production, it interacts with copper ions at the active site of the tyrosinase, it reduces dopaquinone and blocks dihidroxi indol carboxilic acid (DHICA) oxidation. Different types of ascorbic acid esters, like magnesium ascorbate-3- phosphate are known to produce a whitening effect in normal and hyperactive melanocytes in vivo.

C vitamin is used in dermatological practise in most antiage topical products, as a hipopigmenting agent for various benign cutaneous pigmentary disorders such as: melasma, lentigines, postinflammatory hyperpigmentations, hiperpigmentations due to advancing age and solar exposure.

The results of our reseach shows that C vitamin modulates significantly ($r^2 = 0,45$) in vitro melanogenesis, according to the used concentration, in a dose independent manner. This is applied both to the action of C vitamin when used on cultured melanocytes alone or in association with UVB irradiation. It was statistically significant with the exposure time to C vitamin ($p = 0,026$) and postirradiation time ($p = 0,026$).

Low concentrations of C vitamin (0,1-0,5mg/ml) temporarily inhibited melanogenesis, without changing the cell viability and proliferation rate of the treated melanocytes. This effect was maintained after UVB irradiation.

Medium C vitamin concentrations (1-4mg/ml) induced a dose dependent hyperpigmentation in the melanocyte cultures, increased with time elapsed. The effect was increased with UVB exposure, without affecting the cell viability, but it reduced cell proliferation.

High C vitamin concentrations (7-50mg/ml) stimulated melanogenesis at the cost of reduced cell viability and proliferation. This cytotoxic effect was accentuated by UVB irradiation which did not increase the pigmentation, however it altered the cell viability, proliferation and increased apoptosis in the cultures melanocytes.

This research results can be used in therapy in order to obtain a depigmenting effect in hyperpigmentation disorders, using small amounts of C vitamin. The depigmenting effect is temporar, but it can be achieved even after low doses of UVB irradiation.

In vitiligo, the melanocytes suffer from a loss of oxidant-antioxidant balance, due to low levels of antioxidants, and especially catalase; the cells are destroyed without therapeutic intervention. The C

vitamin concentrations that we used in order to achieve hyperpigmentation in the melanocyte cultures from patients with vitiligo induced lower proliferation rates, but no decrease in cell viability. Still, they could be toxic for the melanocytes. UV irradiation is an efficient therapy in vitiligo. There are various types of treatments: UVB (312 nm) narrow band, PUVA therapy, laser therapy (excimer laser) for repigmenting the lesions and stopping the advancing disease.

Our data suggest that the combination of topical C vitamin and UVB irradiation might have a good effect on the vitiligo melanocytes and could be safely used to decrease the overall energy of UVB irradiation treatment, thus limiting their side effects, (nonmelanoma skin cancers) in these patients.

All trans retinoic acid (ATRA) is a retinoid, A vitamin derivate, used in the leukemia therapy (promyelocytic acute leukemia), cutaneous disorders of keratinisation (genodermatosis, psoriasis, acne) and topically, in cosmetic dermatology.

Retinoids have a complex behaviour, although they are used as depigmenting agents. Their biological effects in the normal melanocytes are mediated, at least in part by specific nuclear receptors (RARs) type α , β , γ . The constitutive expression of the receptors in the melanocytes and their regulation mechanisms are still unknown. In vivo, the retinoids have depigmenting effects on hypermelanotic lesions in humans, possibly though increased keratinocyte turn-over. They increase UV light induced pigmentation in humans and mice. In vitro, ATRA has bimodal effects on melanocytes. The substance stimulates the differentiation of melanocytic precursors and the induction of tyrosinase through PKC pathway and increased mycophthalmia transcription factor (MITF) expression. It also induces apoptosis of the differentiated melanocytes through capase-3 activation and reduced bcl-2 level.

In our experiments, ATRA inhibited cell proliferation significantly in a dose dependent manner, with time exposure to the substance ($p=0,001$ la 6h, $p=0,006$ la 24h). Cell viability was not altered. Melanogenesis was stimulated compared to untreated controls, significantly for total melanin content ($p=0,009$, 6h), but not significant for tyrosinase activity ($p=0,56$). However, this effect was reduced with time exposure to ATRA. This finding was not described in the literature. ATRA exposure determined a slow increase of SOD with time, which can be the expression of de novo synthesys of the enzyme, but the activity level was maintained lower than that of controls. The Cat level was significantly lower in the ATRA treated cultures than in controls when exposed for a short time to ATRA ($p=0,03$, 12h) but it was significantly increased with longer exposure to ATRA ($p=0,04$, 24h).

Combination exposure to ATRA and UV determined different effects depending on the wave length. Longer ATRA exposure, followed by UVA irradiation stimulated proliferation more than UVB irradiation, the opposite effect of that recorded with shorter time exposure to ATRA, marginally significant ($p=0,077$, 24h). ATRA and UV combined did not produce a cumulative stimulating effect on melanogenesis, although both of them significantly increased melanogenesis. UVA irradiation of preexposed melanocytes to ATRA determined a lower stimulation of melanogenesis compared to ATRA alone at 6h, but increasing the exposure time to ATRA (12h, 24h) increased melanogenesis (not significant) compared to ATRA alone and ATRA-UVB combination exposure.

ATRA-UVA combination exposure had a beneficial effect on melanocytes compared to UVA irradiation alone regarding the level of the enzymatic activities of SOD ($p=0,012$) and Cat ($p=0,959$), which shows that ATRA protected the melanocytes against ROS induced by UVA and melanogenesis.

UVB irradiation increased tyrosinase enzymatic activity ($p=0,000$) as expected. ATRA-UVB combination exposure determined an inhibiting effect on melanogenesis, compared to ATRA ($p=0,06$), constant with time elapsed. ATRA-UVB determined in the same time decrease of the enzymatic activities of SOD ($p=0,13$, 12h) and Cat ($p=0,04$, 12h), thus diminishing the antioxidant protection of the melanocytes.

Replicative senescence is a natural barrier of cell proliferation, determined by erosion and disfunction of the telomeres, being a checkpoint due to DNA activation by the disfunctional telomeres.

Senescence is a response to oncogenic stress that blocks proliferation but allows the cells to live on and perform its physiologic function could thus be beneficial. Normal skin melanocytes produce

abundant levels of the antiapoptotic protein Bcl2 and Slug, which promotes melanocyte survival, even at the cost of entering senescence after mutagenic stimuli exposure.

ATRA exposure (6h) *aged* overall the melanocyte cultures, but kept a high % of *very young cells* ($p=0,01$), which suggests that ATRA induced senescence in the differentiated cells, while the *very young* cells were proliferating. 24h ATRA exposure *aged* the cell culture population overall, which suggests that a longer ATRA exposure affects the entire melanocyte population, including the *very young* ($p=0,000$), inducing cell differentiation and senescence. This effect of ATRA is known on leukemia cell- myeloid leukemia, mammary cells premalignant and malignant but has not been yet studied (to our knowledge) on melanocyte cultures.

We noticed a correlation between the antioxidant effect of UV irradiation of the melanocytes and cell senescence. ATRA-UVA combination exposure of the melanocytes increased the % of *young* cells in the culture, while ATRA-UVB increased the % of *old* cells, significantly for all categories of melanocytes, relative to ATRA and controls.

The results of our research in vitro on melanocyte cultures may be used in therapy: to diminish the therapeutic UV irradiation doses, thus their side effects, by using topically low concentrations ointments with retinoids, before irradiation; to help improve the repigmentation of vitiligo lesions, considering that UVB inhibits pigmentation in active melanocytes but it might increase the pigmentation in inactive, viable melanocytes from the depigmented plaques (the stem cells from the hair bulge); to protect the skin melanocytes from individuals with light skin phototype; to induce the differentiation and senescence of the melanoma cells in combination with therapeutic irradiation.

Conclusions

1. Isolation of primary melanocytic cultures from healthy individuals and from patients with vitiligo represents, to our knowledge a national first.
2. The research was conducted in vitro, the melanocyte cultures were used to create experimental models for the study of the effects of internal factors (tyrosine, growth factors alterations) and external chemical (C vitamin, all trans retinoic acid) and physical (ultraviolet radiation).
3. UVA respective UVB irradiation of the melanocyte cultures determined a stimulating of cell proliferation, in a dose independent manner at low and medium energies of irradiation, while the high energies had cytotoxic effects.
4. In light skin melanocyte cultures, melanogenesis, either UV induced either tyrosine stimulated increased oxidative stress in the melanocytes while decreasing the cells enzymatic antioxidant defence mechanisms, this generated a premature senescent aspect of the melanocytes. This alteration can be considered a marker for the oxidative stress, mediated by UV exposure.
5. C vitamin effect depends mainly of the concentration, it inhibits melanogenesis, without side effects for the melanocytes, however higher concentrations increase melanin production and dendricity but decrease cell viability, proliferation and induce apoptosis having a cytotoxic effect.
6. ATRA inhibited melanocyte proliferation in a dose and time dependent manner, without affecting cell viability, it increased melanogenesis, but the effect diminished with time elapsed and determined a slow increase in SOD activity.
7. The role of ATRA in the ATRA-UVA combination exposure of the melanocyte cultures was to protect the cells after longer exposure; although it stimulated melanogenesis, it reduced cell senescence and improved the antioxidant defence of the cells. In the ATRA-UVB combination exposure, the role of ATRA was to increase the damaging effects of UVB irradiation; it inhibited melanogenesis, it lowered the antioxidant enzymatic defence mechanisms and induced premature senescence of the melanocytes.
8. The results of the present in vitro study can be used in therapy to improve the treatment of various pigmentary disorders or even skin tumors.

Curriculum Vitae

Personal data

Name: Ioana Baldea

Date and place of birth: May 1, 1976, Cluj-Napoca, Romania

Nationality: romanian

Work address: Department of Physiology, "Iuliu Hatieganu" University of Medicine and Pharmacy
Clinicilor 1, Cluj-Napoca, Romania

Phone/ Fax: +40-264598575

Email: baldeai@yahoo.com

Current position: Assistant professor, Department of Physiology and PhD student Department of Dermatology, University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, Romania

Education and training

1994–2000- Faculty of Medicine, University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, Romania

2006 - specialist in Dermatovenereology,

2009 - Assistant professor, Department of Physiology, University of Medicine and Pharmacy

PhD studies and research activity

1. **Research activity:** from november 2004 PhD student, Department of Dermatology, University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, Title: *Melanocyte alterations under the influences of internal and external factors.*

2. **Experience exchange:** training stage in the Dermatology Research Lab of the University Hospital in Freiburg, January, 2005.

3. **Research stage:** Dermatology Research Lab in AKH, University Hospital, Department of Dermatology, Vienna, January, 2006.

4. **Training Courses:** Melanoma Symposium, Occupational Diseases, Skin Disorders of Pregnancy, EADV, Prague, october 2003; Cosmetical and Surgical Dermatology, Department of Dermatology, Cluj-Napoca, 2004, Paediatric Dermatology, Dermatoimmunology and Allergic Skin Disease, Genetics in dermatology, EADV, Londra october, 2005, Cryotherapy Course – with EADV scholarship, Saariselka, February, 2006.

5. **Summer school:** *7th International Stem Cell School in Regenerative Medicine* and practical course „Biomaterials” European Union Grant awarded by the European Union Marie Curie Conferences and Training Courses „RegMedTeach” organised by the *Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic*, Prague, November, 2009.

6. **Awards: the Romanian Society of Physiological Sciences award** for the paper: **Baldea I**, Cosgarea R, Filip A, Mureşan A. Influences of all trans retinoic acid and ultraviolet light exposure on normal human melanocytes, presented at the National Conference of Physiologic Sciences with International Participation, May, 28-30, Craiova; **University award** for the poster presentation : Cosgarea R, Şeniţă S, **Baldea I**, Susan M, Ion M, Cytotoxic effects of photodynamic therapy with 5,10,15,20 tetra- (p-sulphonate-phenyl)-porphyrin on primary normal human keratinocytes and carcinoma cell cultures, at the Poster Session of the University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, December, 2009

7. **Affiliations to scientific societies:** **Romanian Dermatological Society (SRD)**, European Society for Pigment Cell Research (ESPCR), Romanian Society of Physiological Sciences (SRSF), Oxidative stress in Medicine Association (ASOM)

Collaborator in national research projects (CNCSIS, CEEEX, PN II)

CNCSIS Grant (nr 33382/20.06.04) title: The cultivation technology of the keratinocytes and melanocytes in vitro – grafting of the keratinocytes and melanocytes. Research program – CNCSIS grant type A, project manager prof dr. Cosgarea Rodica, 2004-2006.

Research project CEEEX, title “Molecular diagnostic of the bulous epidermolysis. Modern research techniques, diagnosis, treatment and prevention of the bulous epidermolysis. National register of the genodermatosis – DEGEB” project manager prof dr. Cosgarea Rodica, 2006-2008.

Research project CEEEX, title “Biocomposite with porphyrins with applicability in the photodynamic therapy of the cutaneous malignant tumors -” project manager senior researcher II dr. Simina Dreve, 2006-2008.

Partnership programme, PN II: 2008 42/ 104/01102008, title „Photochemoprotection through natural products in epitelial photoinduced cancers” project manager lecturer.dr. Gabriela Adriana Filip, 2008-2010.

Scientific papers and publications

Original papers

1. Cosgarea R, Sindrilaru A, Corlăteanu O, Cota G, **Baldea I**. Diagnosis and Treatment of Micozis fungoides. Transylvanian Dermatology Association Congress, 2002.
2. Cosgarea R, Covaciu C, Corlăteanu O, **Baldea I**. Clinical, Pathogenetic and Immunological Variability in Pyoderma Gangrenosum. 11th Congress of European Academy of Dermatology and Veneorology, Praga, JEADV, XVI (Suppl.1) 2002:316
3. Cosgarea R, Covaciu C, Corlăteanu O, Cota G, **Baldea I**. Papuloeritrodermia Ofuji. Dermatovenerologie, ISSN 1220-3734, suppl XLIII(3):54, 2002
4. Cosgarea R, Barb D, **Baldea I**, Covaciu C. Dermatitis Herpetiformis after Budesonid, Dermatovenerologie, ISSN 1220-3734, XLVIII(3):16, 2003
5. Cosgarea R, **Baldea I**, Iacob M. Reactive Paniculitis in a Child With Lyme Disease, Dermatovenerologie, ISSN 1220-3734, XLIX(3):14, 2004
6. **Baldea I**, Senila S, Baciu A, Cosgarea R. Bullous reaction after Leflunomid, Arava, Dermatovenerologie, ISSN 1220-3734, L(3):53, 2005
7. Cosgarea R, Senila S, **Baldea I**, Baciu A. Grafts technics in facial carcinomas, Dermatovenerologie, ISSN 1220-3734, L(3):6, 2005
8. Cosgarea R, Cutus R, Senila S, **Baldea I**. Neurosyphilis – Early and Late Manifestations of the Infection. JEADV, Suppl EADV London, P14.62, 2005
9. Cosgarea R, Şenila S, **Baldea I**, Ispasoiu D, Ungureanu L, Colibaba L, Crisan A, Baciu A. Malignant Melanoma –predictible evolution? National Conference of Cosmetic and Surgical Dermatology, Bucharest, 2006
10. Cosgarea R, **Baldea I**, Macovei V, Senila S. Utility of Cultured Keratinocytes in Practical Dermatology. Dermatovenerologie, ISSN 1220-3734, LI (3), suppl1, 38, 2006
11. Cosgarea R, Senila S, **Baldea I**, Colibaba L, Crisan A, Baciu A. Pulse Corticosteroid Therapy in Alopecia Areata. Dermatovenerologie, ISSN 1220-3734, LI (3), suppl1, 21, 2006
12. Cosgarea R, Senila S, **Baldea I**, Ispasoiu D, Ungureanu L, Colibaba L, Crisan A, Baciu A, Voicu D. Malignant Melanoma – Unusual Clinical Forms and Evolution. Dermatovenerologie, ISSN 1220-3734, LI (3), suppl1, 68, 2006
13. Cosgarea R, **Baldea I**, Macovei V, Senila S. Utility of Cultured Keratinocytes and Melanocytes in Practical Dermatology. Symposium: Department of Oxidative Stress exploration – 5 years of activity. Achievements and perspectives, Department of Physiology, University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, 2006
14. Cosgarea R, Şenila S, Malinovschi G, Moisil V, **Baldea I**, Danescu S, Ispasoiu D, Harceaga O. Particular aspects in diagnosis and evolution of melanoma, Transylvanian Dermatology Association Conference, Cluj- Napoca 2007
15. Cosgarea R, Senila S, Malinovschi G, Moisil V, **Baldea I**, Danescu S, Ispasoiu D, Harceaga O. Skin flaps for facial cutaneous defects, Transylvanian Dermatology Association Conference, Cluj- Napoca, 2007

16. Cosgarea R, Senila S, **Baldea I**, Ispasoiu D, Ungureanu L, Colibaba L, Crisan A, Malignant Melanoma - could it have a predictable course? P 720, 16th Congress of European Academy of Dermatology and Venerology, Viena, 2007
17. Senila S, **Baldea I**, Ungureanu L, Ispasoiu D, Macovei V, Cosgarea R. Down's Syndrome and Alopecia areata totalis responsive to topical immunotherapy with diphenylcyclopropenone P764, 16th Congress of European Academy of Dermatology and Venerology, Viena, 2007
18. Senila S, **Baldea I**, Cosgarea R. Acroosteopathia ulceromutilans nonfamiliaris – case presentation, 21 World Congress of Dermatology, Buenos Aires, 2007
19. **Baldea I**, Cosgarea R., Senila S. Influence of ascorbic acid on cultured vitiligo melanocytes, PP 039, Program and Abstracts of the 13th Meeting of the European Society for Pigment Cell Research, 2007
20. Senila S., **Baldea I.**, Danescu S., Macovei V., Ungureanu L., Stefanescu D., Cosgarea R., Topical immunotherapy in alopecia areata, Dermatovenerologie, ISSN 1220-3734, LII (2), supl 1, 2007:29-30
21. Cosgarea R., Ungureanu L., Stefanescu D., **Baldea I.**, Senila S., Moisil V., Harceaga O., Susan M., Danescu S., Macovei V., Cutus R., Baican A., Clinical and dermoscopic variety of melanoma, Dermatovenerologie, ISSN 1220-3734, LII (2), supl 1, 2007: 43-44
22. Cosgarea R., Senila S., Malinovschi G., **Baldea I.**, Moisil V., Harceaga O., Susan M., Colibaba L., Crisan A., Danescu S., Macovei V., Pyoderma gangrenosum – neutrophilic dermatosis with different faces, Dermatovenerologie, ISSN 1220-3734, LII (2), supl 1, 2007: 67-68
23. Cosgarea R., Senila S., Susan M., **Baldea I.**, Effect of thermal water from Herculane on histamine release on human skin extract (SEPhRA study); Protective role of Herculane thermal water on keratinocytes and fibroblasts in culture (the Dermatology Department Study, Cluj- Napoca), Dermatovenerologie, ISSN 1220-3734, LII (2), supl 1, 2007:19-20
24. Cosgarea R, Senila S, Susan M, **Baldea I**, Ion M, Cytotoxic effects of photodynamic therapy with 5,10,15,20 tetra- (p-sulphonate-phenyl)-porphyrin on primary normal human keratinocytes and carcinoma cell cultures, Program and Abstracts of the 5th Spring Simpozion of EADV, Istanbul, May, 2008
25. Senila S, Cosgarea R, **Baldea I**, Susan M, Photodynamic therapy with 5 delta amino levulinic acid and chitosan on primary normal human keratinocytes and carcinoma cell cultures, Program and Abstracts of the 5th Spring Simpozion of EADV, Istanbul, May, 2008
26. **Baldea I**, Cosgarea R, Susan M, Dreve S, Evaluation of chitosan cytotoxicity on primary normal human cultured fibroblasts , Program and Abstracts of the 5th Spring Simpozion of EADV, Istanbul, May, 2008
27. **Baldea I**, Cosgarea R, Stefanescu D, Senila S, Macovei V, Danescu S, Influence of ascorbic acid and ultraviolet radiation B on cultured vitiligo melanocytes, Program and Abstracts of the 5th Spring Simpozion of EADV, Istanbul, May, 2008
28. **Baldea I**, Cosgarea R, Nistea R, Senila S, Macovei V, Danescu S, Influences of all trans retinoic acid and UV light on normal human melanocyte cultures, Program and Abstracts of the EADV Congress, Paris, October, 2008
29. ŞeniIă S, Cosgarea R, Susan M, **Baldea I**, Dreve S. Photodynamic therapy with 5 delta amino levulinic acid and chitosan on primary normal human keratinocytes and carcinoma cell cultures, P6, Dermatovenerologie, ISSN 1220-3734, LIII (2), supl 1;2008: 94
30. Susan M, Cosgarea R, **Baldea I**, ŞeniIă S, Ion M, Apoptotic effect of the photodynamic therapy with 5,10,15,20 tetra- (p-sulphonate-phenyl)-porphyrin and with 5-aminolevulinic acid on primary normal human keratinocytes and carcinoma cell cultures, P8, Dermatovenerologie, ISSN 1220-3734, LIII (2), supl 1;2008: 94
31. Cosgarea R, ŞeniIă S, **Baldea I**, Susan M, Ion M. Cytotoxic effects of photodynamic therapy with 5,10,15,20 tetra- (p-sulphonate-phenyl)-porphyrin on primary normal human keratinocytes and carcinoma cell cultures P7, Dermatovenerologie, ISSN 1220-3734, LIII (2), supl 1;2008: 95

32. **Baldea I**, Rodica Cosgarea, Mirela Susan, Simona Şenilă, Simina Dreve, Evaluation of chitosan cytotoxicity on primary normal human cultured fibroblasts , P10, Dermatovenerologie, ISSN 1220-3734,LIII (2), supl 1;2008: 95
33. **Baldea I**, Rodica Cosgarea, Daniela Ştefănescu, Simona Şenilă, Victorina Macovei, Sorina Dănescu, Influence of ascorbic acid and ultraviolet radiation B on cultured vitiligo melanocytes P11, Dermatovenerologie, ISSN 1220-3734,LIII (2), supl 1;2008: 96
34. **Baldea I**, Cosgarea R, Şenilă S, Dănescu S, Macovei V, Influences of all trans retinoic acid and ultraviolet light exposure on normal human melanocytes P12, Dermatovenerologie, ISSN 1220-3734,LIII (2), supl 1;2008: 96
35. **Baldea I**, Cosgarea R, Filip A, Mureşan A. Influences of all trans retinoic acid and ultraviolet light exposure on normal human melanocytes, Fiziologia,Official Journal of the Society of Physiological Sciences, ISSN 1223-2076, supliment, p 5, 2009
36. Cosgarea R, Susan M, Senila S, **Baldea I**, Macovei V, Dreve S. Photodamaging effects of porphyrins on primary human keratinocytes and carcinoma cell cultures. The evaluation of cytotoxic and phototoxic effect of chitosan an cell cultures. Journal of Investigative Dermatology, 2009: (129) 28, 39th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Science
37. Stefanescu D, **Baldea I**, Cosgarea R, The effect of Phenitoin on melanocyte cultures. Journal of Investigative Dermatology, 2009: (129) 26, 39th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Science
38. **Baldea I**, Rodica Cosgarea, Filip Adriana, Mureşan Adriana. Study of human melanocyte modifications after exposure to all trans retinoic acid and ultraviolet radiation in vitro, Rom J Biochem., 46, suppl., P. Bucharest, 2009:33-34

Review articles

1. Cosgarea R, Covaciu C, **Baldea I**, Cota G, Corlateanu O. Ofuji Papuloerithroderma and Cutaneous Amyloidosis. Dermatovenerologie, ISSN 1220-3734, XLVIII(1):43-47, 2003
2. **Baldea I**, Actualities in Literature on Melanocyte Alterations. Acta Dermatologica Transilvanica, IV, (3-4):80, 2004
3. **Baldea I**, Senila S, A Ciceo, V Macovei, R Cosgarea, M Petrescu, Pinkus Fibroepitelioma – case presentation. Acta Dermatologica Transilvanica, vol V, nr 1-2, 30 -33, 2005
4. Senila S, **Baldea I**, Mihailescu C, What’s the diagnosis? Acta Dermatologica Transilvanica, vol V, nr 1-2, 67 – 68, 2005
5. **Baldea I**, Cosgarea R, Senila S. Grafting of Autologous Keratinocytes: it’s Utility in Covering the Skin Defects. Acta Dermatologica Transilvanica,vol V, nr 3-4:55, 2005
6. **Baldea I**, Cosgarea R, Melanocyte and melanogenesis, Acta Dermatologica Transilvanica,vol VII, nr 1-2:5-12, 2007
7. Macovei V, Cosgarea R, Danescu S, Senila S, **Baldea I**, Susan M, Treatment of lichen plan, Acta Dermatologica Transilvanica,vol VII, nr 1-2:12-20, 2007
8. Susan M, Cosgarea R, Şenilă S, **Baldea I**, Macovei V, Utility of photodynamic therapy in dermatology, Acta Dermatologica Transilvanica, vol VII, nr 3-4:12 -17, 2007
9. **Baldea I**, Cosgarea R – Influence of ascorbic acid and UVB irradiation on normal human melanocytes in vitro. Dermatovenerologie, 2009, 54: 107-113 [CNCSIS B]
10. Cosgarea R., Danescu S., Cutus R., Senilă S., Macovei V., **Baldea I**, Pop R., Pop V., Ferencz B., Popescu O., Lelutiu L. Molecular diagnosis in a case of dominant dystrophic bulous epidermolysis, Dermatovenerologie, 2009, 54: 7-11 [CNCSIS B]
11. **Baldea I**, Mocan T, Cosgarea R. The role of ultraviolet radiation and tyrosine stimulated melanogenesis in the induction of oxidative stress alterations in fair skin melanocytes. Exp Oncol 2009; 31(4): 200-208 PUBMID 20010534 [INDEXED FOR MEDLINE]