

Terapia fotodynamiczna w leczeniu liszaja twardzinowego sromu

Photodynamic therapy of vulvar lichen sclerosus

Anita Olejek¹, Karolina Sieroń-Stołyńska², Iwona Kozak-Darmas¹, Sylwia Kellas-Ślęczka³, Katarzyna Stęplewska⁴, Tomasz Biniszkiwicz², Beata Birkner², Jacek Zamłyński¹, Leszek Nowak¹, Aleksander Sieroń²

¹Katedra i Oddział Kliniczny Ginekologii, Położnictwa i Ginekologii Onkologicznej w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach; kierownik Katedry i Oddziału: dr hab. med., prof. ŚUM Anita Olejek

²Katedra i Oddział Kliniczny Chorób Wewnętrznych, Angiologii i Medycyny Fizykalnej w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach;

kierownik Katedry i Oddziału: prof. dr hab. med. Aleksander Sieroń

³Zakład Brachyterapii, Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach;

kierownik Zakładu: dr med. Brygida Białas

⁴Katedra Histopatologii w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Przeгляд Menopauzalny 2009; 5: 257-260

Liszaj twardzinowy (*lichen sclerosus*) jest przewlekłym schorzeniem występującym głównie u kobiet w wieku pomenopauzalnym, a jego etiologia nadal pozostaje do końca nieznana. Główną przyczyną dolegliwości w liszaju są świąd i pieczenie [1], niezależnie od obecności stanu zapalnego lub innych czynników zewnętrznych. Dolegliwości te są najczęstszą przyczyną, dla której chore zgłaszają się do lekarza. Świąd, pieczenie oraz u niektórych chorych bóle w okolicy sromu są tak silne, że często wymagają włączenia leków steroidowych, antyhistaminowych oraz uspokajających. Leczenie farmakologiczne u części chorych przynosi zmniejszenie dolegliwości, niemniej często po odstawieniu leków obserwuje się nawroty. U pewnej grupy chorych z LS nie obserwuje się ani ustąpienia, ani zmniejszenia dolegliwości podczas leczenia farmakologicznego [2].

Zmiany w liszaju obejmują zarówno skórę włośniową, jak i naskórek [3, 4]. Liszaj twardzinowy początkowo charakteryzuje się obrzękiem sromu, który z czasem przekształca się w stwardnienie z towarzyszącym mu przewlekłym stanem zapalnym. Zmniejsza się elastyczność skóry, wargi sromowe mniejsze i techtaczka zanikają, zwęża się wejście do pochwy, a na spoidle tylnym pojawiają się rozpadliny. Na skórze mogą pojawić się białe naloty.

Obecnie prowadzi się intensywne badania nad poznaniem mechanizmów prowadzących do rozwoju LS oraz poszukuje się skutecznych metod jego leczenia [1–3, 5]. Przedmiotem szczególnego zainteresowania są procesy immunologiczne mogące wiązać się z tym schorzeniem [4, 6, 7]. Zwraca się uwagę na znaczenie ekspresji niektórych białek, m.in. Ki67, limfocytów, np. CD 44, liczby mikronaczyń w podścielisku oraz obecności nacie-

ku zapalnego w rozwoju LS sromu [5, 8–10]. Na jego podłożu, w niewielkim odsetku przypadków może rozwinąć się rak sromu [5, 10, 11].

Jedną z metod leczenia LS sromu jest terapia fotodynamiczna (PDT). Jest ona poprzedzana diagnostyką fotodynamiczną (PDD), pozwalającą uwidocznić zmiany o nieprawidłowej fluorescencji [12, 13]. Terapia fotodynamiczna polega na wybiórczym oddziaływaniu światła ze zmienionymi chorobowo tkankami, w których gromadzi się fotouczulacz. Podczas oddziaływania światła laserowego z barwnikami fotouczulającymi dochodzi do uruchomienia procesów prowadzących m.in. do apoptozy patologicznych komórek. W zdrowych tkankach PDT pobudza angiogenezę, proliferację oraz ma działanie przeciwwzapalne [14–17].

Cel pracy

Celem pracy była ocena skuteczności terapii fotodynamicznej u chorych na LS sromu oraz immunohistochemiczna analiza zmian dotyczących nacieku zapalnego w tkankach sromu przed PDT i po leczeniu.

Analizie poddano subiektywne dolegliwości zgłaszane przez chore, objawy kliniczne oraz wyniki badań histopatologicznych oraz immunohistochemicznych przed PDT i po niej.

Ocenie poddano także skład flory bakteriologicznej sromu chorych przed terapią oraz po jej zakończeniu.

Materiał i metody

Badaniami objęto 35 kobiet z LS sromu leczonych w Przyklinicznej Poradni Chorób Sromu Katedry i Oddzia-

Adres do korespondencji:

dr hab. med. **Anita Olejek**, profesor ŚUM, Katedra i Oddział Kliniczny Ginekologii, Położnictwa i Ginekologii Onkologicznej, Śląski Uniwersytet Medyczny, ul. Batorego 15, 41-902 Bytom, tel. +48 32 786 15 40, faks +48 32 786 15 41, e-mail: bytomobstgyn@slam.katowice.pl, klingin1@interia.poczta.pl

tu Klinicznego Ginekologii, Położnictwa i Ginekologii Onkologicznej ŚUM w Bytomiu od kwietnia 2006 r. do stycznia 2008 r. U wszystkich chorych potwierdzono histopatologicznie LS sromu. Wszystkie chore włączone do badań były wcześniej leczone (także poza ośrodkiem autorów niniejszej pracy) metodami farmakologicznymi, niemniej jednak bez efektów klinicznych i histopatologicznych.

Pacjentki zakwalifikowano do PDT po przeprowadzeniu wstępnej PDD. Diagnostykę oraz leczenie przeprowadzono w Ośrodku Laserowym Katedry i Oddziału Klinicznego Chorób Wewnętrznych, Angiologii i Medycyny Fizykalnej ŚUM.

Diagnostykę fotodynamiczną przeprowadzono za pomocą lasera półprzewodnikowego Xillix OncoLIFE System, a następnie każda chora została poddana 6 cyklom terapii fotodynamicznej (w odstępach 2-tygodniowych) z użyciem światła Lasera Diomed 630. Jako fotouczulacza użyto miejscowo 5-procentowego kwasu 5-delta-aminolewulinowego (5 ALA).

Po zakończonej terapii u chorych wykonano kolejne badanie histopatologiczne poprzedzone PDD.

Wycinki pobrane przed terapią i po leczeniu fotodynamicznym poddano badaniom immunohistochemicznym przy użyciu przeciwciał monoklonalnych CD3 (RTU-CD3-PSI) z zastosowaniem metody trójstopniowej ABC (Avidyn-Biotyn-Complex). Procedura reakcji była zgodna z instrukcjami producenta. Jako dodatkia kontrolę zastosowano do oceny ekspresji CD3 tkankę migdałka podniebiennego. Analizę mikroskopową przeprowadzono przy użyciu mikroskopu świetlnego BX51. Oceny reakcji dokonywał niezależnie 2-osobowy zespół diagnostów w warunkach ślepej próby.

Tab. I. Stopień nasilenia świądu przed terapią PDT

| Stopień nasilenia świądu | Liczba chorych | Odsetek [%] |
|--------------------------|----------------|-------------|
| 0 – brak | 0 | 0 |
| 1 – słabo nasilony | 11 | 31,4 |
| 2 – średnio nasilony | 14 | 40,0 |
| 3 – silny świąd | 10 | 28,6 |
| razem | 35 | 100 |

Tab. II. Stopień nasilenia świądu 6 tyg. po zakończeniu PDT

| Stopień nasilenia świądu | Liczba chorych | Odsetek [%] |
|--------------------------|----------------|-------------|
| 0 – brak | 8 | 22,9 |
| 1 – słabo nasilony | 14 | 40 |
| 2 – średnio nasilony | 8 | 22,9 |
| 3 – silny świąd | 5 | 14,2 |
| razem | 35 | 100 |

Intensywność nacieku zapalnego w skórze właściwej oceniano półilościowo w skali 4-stopniowej: 0 – brak nacieku zapalnego, 1 – naciek zapalny małego stopnia, 2 – naciek zapalny średniego stopnia, 3 – naciek zapalny dużego stopnia. Ekspresję limfocytów T CD3+ w nacieku zapalnym skóry właściwej oceniano półilościowo w 6-stopniowej skali [18]: 0 – brak pozytywnie zabarwionych komórek, 1 – pojedyncze zabarwione komórki, 2 – do 10% zabarwionych komórek, 3 – 11–30% zabarwionych komórek, 4 – 31–60% zabarwionych komórek, 5 – 61–100% zabarwionych komórek.

Wszystkie chore przed terapią i 6 tyg. po zakończeniu leczenia wypełniały ankietę dotyczącą odczuwanych przez nie dolegliwości subiektywnych. Pacjentki w skali czterostopniowej oceniały nasilenie świądu: 0 – brak, 1 – słabo, 2 – średnio, 3 – silnie nasilone dolegliwości.

Wszystkie chore ukończyły pełny cykl terapii fotodynamicznej.

Do statystycznej oceny różnic, przed terapią i po leczeniu fotodynamicznym, zastosowano nieparametryczny test Wilcoksona dla 2 prób powiązanych. Do scharakteryzowania badanych cech, wobec stosowania metod nieparametrycznych, zastosowano medianę jako miarę średnią.

Weryfikację statystyczną przeprowadzono, uwzględniając następujące progi poziomu istotności:

- $p > 0,05$ – brak istotności statystycznej,
- $p < 0,05$ – istotność statystyczna,
- $p < 0,01$ – wysoka istotność statystyczna,
- $p < 0,001$ – bardzo wysoka istotność statystyczna.

U wszystkich pacjentek przed leczeniem PDT pobierano wymaz bakteriologiczny ze sromu, a w razie stwierdzenia flory patologicznej chore były leczone zgodnie z antybiogramem.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach (zgoda nr NN-6501-202/06/07). Wszystkie pacjentki zakwalifikowane do badań wyraziły na nie pisemną, świadomą zgodę. Badania sfinansowane w ramach projektu badawczego KBN NN-6-277/06.

Wyniki

Średni wiek pacjentek z badanej grupy wyniósł 54,6 roku. Najmłodsza pacjentka miała 32 lata, a najstarsza 74 lata.

U wszystkich 35 chorych w badaniu histopatologicznym potwierdzono LS sromu. Przed rozpoczęciem terapii PDT wszystkie chore zgłaszały świąd sromu, 8 kobiet pieczenie (22,8%) oraz 3 (8,6%) bóle w okolicy sromu (tab. I).

Sześć tygodni po zakończonej terapii fotodynamicznej u 8 chorych (22,9%) świąd sromu ustąpił, u 13 kobiet (37,1%) zmniejszył się, a u 14 (40%) pozostał bez zmian. Zaobserwowano istotną statystycznie różnicę w częstości i nasileniu występowania świądu przed PDT i po leczeniu ($p < 0,001$).

Pieczenie utrzymywało się po zakończonej terapii u 4 chorych (11,4%), a dolegliwości bólowe u 2 kobiet (5,7%) (tab. II).

Spośród 35 chorych u 11 pacjentek (31,5%) w kontrolnym badaniu histopatologicznym nadal rozpoznawano LS, u 16 (45,8%) rozpoznano *vulvitis chronica et hyperkeratosis focalis*, a u 8 (22,7%) *vulvitis chronica*.

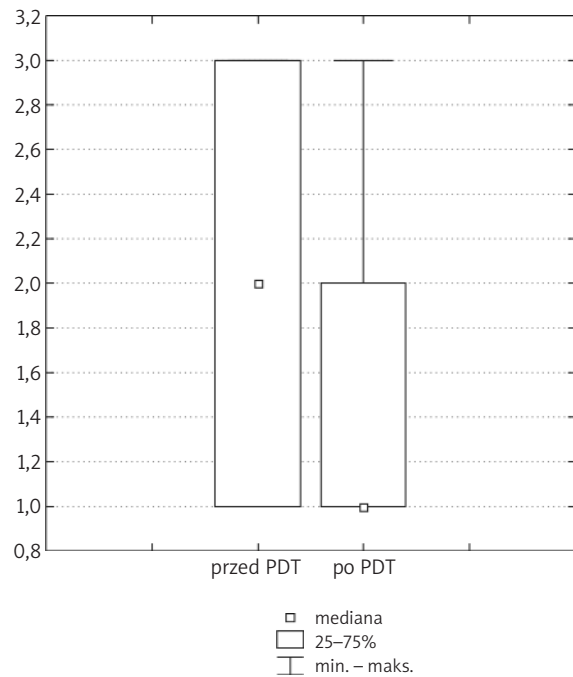
Intensywność nacieku zapalnego w skórze właściwej oceniano półilościowo w skali 4-stopniowej. Zaobserwowano statystycznie istotne zmniejszenie nacieku zapalnego po zakończonej terapii PDT ($p < 0,05$) (ryc. 1).

W wymazach z pochwy w grupie 35 chorych stwierdzono najczęściej *Streptococcus* spp., *Streptococcus* β *haemolyticus* gr. B oraz w pojedynczych przypadkach *Staphylococcus haemolyticus*, *Gardnerella vaginalis*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* i *Proteus vulgaris*. U wszystkich pacjentek włączono celowaną antybiotykoterapię.

Dyskusja

Liszaj twardzinowy nie jest uznawany jako stan przednowotworowy, niemniej na jego podłożu może się rozwinąć rak sromu [5]. Dane z piśmiennictwa podają, że u ok. 40% chorych z płaskonabłonkowym rakiem sromu w przeszłości występował LS [19]. Schorzenie to występuje częściej u kobiet i w większości przypadków jest zlokalizowane na sromie [20]. Wśród czynników mogących wiązać się z jego rozwojem wymienia się m.in. przyczyny genetyczne, środowiskowe, zakaźne oraz coraz częściej autoimmunologiczne, co znajduje odzwierciedlenie w częstym współwystępowaniu schorzeń z autoagresji u tych chorych [21]. W LS charakterystyczna jest utrata brodawek skórnych, nacieki limfocytarne i zwyrodnienie wodniczkowe w warstwie podstawnej nabłonka oraz rozwój jednorodnej warstwy skóry właściwej o zróżnicowanej grubości [3, 21]. W leczeniu LS sromu często rutynowo stosowane leczenie farmakologiczne jest nieskuteczne. Podejmuje się próby innych form terapii, w tym PDT poprzedzonej PDD [13].

Diagnostyka fotodynamiczna polega na analizie fluorescencji tkanki wzbudzonej światłem laserowym w określonym czasie po podaniu fotouczulacza, którym najczęściej jest kwas 5-delta-aminolewulinowy. Fotouczulacz gromadzi się w tkance patologicznej w znacznie większym stężeniu niż w tkance zdrowej, sprawiając, że fluorescencja tych tkanek się różni. Wykazanie nieprawidłowej fluorescencji pozwala w sposób precyzyjny wybrać miejsce objęte procesem chorobowym i pobrać celowane wycinki do badania histopatologicznego [17]. Podczas terapii fotodynamicznej dochodzi do wybiórczego niszczenia tkanek patologicznych podczas oddziaływania światła laserowego z barwnikami fotouczulającymi. Po zaabsorbowaniu energii promieniowania wzbudzającego fotouczulacz przechodzi w krótkotrwały stan wzbudzony, a następnie powraca do stanu podstawowego z równoczesnym wytworzeniem m.in. wolnych rodników i tlenu singletowego $1O_2$. Ekspozycja komórek tkanki patologicz-



Ryc. 1. Intensywność nacieku zapalnego w skórze właściwej w skali 4-stopniowej przed PDT i po 6 tyg. PDT ($p < 0,05$)

nej na PDT może wywołać ich obumieranie na drodze apoptozy lub nekrozy, co zależy od właściwości biochemicznych fotouczulaczy oraz od czasu naświetlania komórek. Poza efektem cytotelnym PDT działa także bakteriobójczo, wywołuje również szereg reakcji immunologicznych oraz niedotlenienie guza poprzez fotookluzję jego naczyń i modyfikację angiogenezy. Terapia fotodynamiczna daje możliwość selektywnego niszczenia tkanki patologicznej dzięki gromadzeniu się fotouczulacza w jej obrębie w stężeniu większym niż w tkankach otaczających, oraz precyzyjnemu naświetlaniu tkanki patologicznej za pomocą lasera. Zdrowe tkanki pozostają nieuszkodzone lub uszkodzone w stopniu nieznacznym [12].

W przeprowadzonych badaniach uzyskano znaczne zmniejszenie nasilenia dolegliwości subiektywnych zgłaszanych przez chore, zwłaszcza ustąpienie bądź zmniejszenie świądu, który był najczęstszą przyczyną zgłoszenia się chorej do Poradni Leczenia Chorób Sromu.

W prezentowanej pracy dokonano, za pomocą badań immunohistochemicznych, porównania ekspresji CD3 przed terapią i po leczeniu fotodynamicznym w wycinkach pobranych ze sromów. Po zakończonej PDT zaobserwowano istotne statystycznie zmniejszenie nacieku zapalnego ($p < 0,05$). Limfocyty CD3 są prekursorami limfocytów CD4 i CD8. Dane z piśmiennictwa dotyczące obecności nacieku zapalnego nie są jednoznaczne. Opisuje się zarówno zwiększenie, jak i zmniejszenie ich liczby [18, 22].

Spośród 35 kobiet, które ukończyły 6 pełnych cykli terapii PDT, u 77,1% nie stwierdzono w kontrolnym badaniu histopatologicznym LS.

Być może jedną z przyczyn faktu, że u wszystkich chorych nie uzyskano poprawy histopatologicznej jest zbyt mała liczba cykli PDT (6 cykli), bądź zbyt małe stężenie stosowanego fotouczulacza (5%). Niektórzy autorzy w terapii fotodynamicznej LS stosują większe stężenia fotouczulacza [11, 15, 23, 24]. Wpływ na wyniki leczenia może mieć również czas, jaki upływa od nałożenia fotouczulacza do rozpoczęcia terapii oraz jego postać. W przeprowadzonych badaniach fotouczulaczem był 5-procentowy kwas 5-delta-aminolewulinowy w postaci pasty aplikowanej na srom 2 godz. przed rozpoczęciem PDT. Pięcioprocentowy kwas 5-delta-aminolewulinowy jest jednym z najczęściej używanych fotouczulaczy. W różnych badaniach jest stosowany w postaci żelów lub płynów nakładanych na srom 2–5 godz. przed terapią [17, 23, 24]. Obecnie w ośrodku autorów niniejszej pracy są prowadzone badania drugiej grupy chorych (60 kobiet) z LS sromu, u których terapia została wydłużona z 6 do 10 naświetlań. W grupie tej zostaną przeprowadzone badania immunohistochemiczne dotyczące także innych antygenów mogących mieć związek z rozwojem tego schorzenia.

Wielu autorów zwraca uwagę na fakt, że PDT jest metodą nieinwazyjną, niewymagającą znieczulenia, dającą dobre efekty kosmetyczne, ale nie daje w pełni zadowalających efektów leczniczych. Często obserwuje się oporność na leczenie PDT lub krótkie okresy remisji [15]. Niemniej wydaje się, że metoda ta, być może – przy zmianach dotyczących fotouczulacza, jego stężenia, postaci, czasu, jaki upływa od zaaplikowania do rozpoczęcia terapii bądź liczby cykli PDT – wpłynie na zwiększenie skuteczności tej formy terapii LS sromu.

Wnioski

Terapia fotodynamiczna jest skuteczną metodą w leczeniu chorych z LS sromu, łagodzącą bądź niwelującą dolegliwości subiektywne zgłaszane przez chore, zwłaszcza świąd sromu.

1. Badania immunohistochemiczne wykazały statystycznie istotne zmniejszenie nacieków zapalnych u chorych na LS sromu po PDT.
2. U 2/3 chorych zaobserwowano ustąpienie cech LS w kontrolnym badaniu histopatologicznym po zakończonej terapii.

Piśmiennictwo

1. Rolfe KJ, Crow JC, Reid WM, et al. The effect of topical corticosteroids on Ki67 and p53 expression in vulvar lichen sclerosis. *Br J Dermatol* 2002; 147: 503-8.
2. Li Ch, Bian D, Chen W, et al. Focused ultrasound therapy of vulvar dystrophies: a feasibility study. *Obstet Gynecol* 2004; 104 (5 Pt 1): 915-21.
3. Farrell AM, Marren P, Dean D, Wojnarowska F. Lichen sclerosis: evidence that immunological changes occur at all levels of the skin. *Br J Dermatol* 1999; 140: 1087-92.
4. Lukowsky AJ, Muche M, Sterry W, Audring H. Detection of expanded T cell clones in skin biopsies of patients with lichen sclerosis et atrophicus by T cell receptor- γ polymerase chain reaction assay. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 254-9.
5. Rolfe KJ, Eva LJ, MacLean AB, et al. Cell cycle proteins as molecular markers of malignant change in vulvar lichen sclerosis. *Int J Gynecol Cancer* 2001; 11: 113-8.
6. Tchórzewski H, Rotsztejn H, Banasik M, et al. The involvement of immunoregulatory T cells in the pathogenesis of lichen sclerosis. *Med Sci Monit* 2005; 11: 39-43.
7. Rotsztejn H. Kilka uwag na temat liszaja twardzinowego. *Ginekol Pol* 2004; 75: 979-83.
8. Raspollini MR, Asirelli G, Taddei GL. The role of angiogenesis and COX-2 expression in the evolution of vulvar lichen sclerosis to squamous cell carcinoma of the vulva. *Gynecol Oncol* 2007; 106: 567-71.
9. Kaya G, Augsburg E, Stamenkovic I, Saurat JH. Decrease in epidermal CD44 expression as a potential mechanism for abnormal hyaluronate accumulation in superficial dermis in lichen sclerosis et atrophicus. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 1054-8.
10. Saravanamuthu J, Reid WM, George DS, et al. The role of angiogenesis in vulvar cancer, vulvar intraepithelial neoplasia, and vulvar lichen sclerosis as determined by microvessel density analysis. *Gynecol Oncol* 2003; 89: 251-8.
11. Bamberger ES, Perrett CW. Angiogenesis in benign, pre-malignant and malignant vulvar lesions. *Anitcancer Res* 2002; 11 (6C): 3853-65.
12. Saczko J, Daczewska M, Marcinkowska A, et al. Śmierć komórek nowotworowych indukowana terapią fotodynamiczną. *Ginekol Pol* 2002; 73: 1154-8.
13. Akoel KM, Welfel J, Gottwald L, Suzin J. Zastosowanie metody fotodynamicznej w diagnostyce zmian przednowotworowych i nowotworowych sromu. *Ginekol Pol* 2003; 74: 662-5.
14. Campbell SM, Gould DJ, Salter L, et al. Photodynamic therapy using meta-tetrahydroxyphenylchlorin (Foscan) for the treatment of vulvar intraepithelial neoplasia. *Br J Dermatol* 2004; 151: 1076-80.
15. Hillemanns P, Untch M, Dannecker Ch, et al. Photodynamic therapy of vulvar neoplasia using 5-aminolevulinic acid. *Int J Cancer* 2000; 85: 649-53.
16. Olejek A, Rembielak-Stawecka B, Kozak-Darmas I, et al. Diagnostyka i terapia fotodynamiczna w ginekologii – aktualny stan wiedzy. *Ginekol Pol* 2004; 75: 228-34.
17. Olejek A, Kozak-Darmas I, Biniszkiwicz T, et al. Terapia fotodynamiczna w leczeniu śródnałonkowej neoplazji sromu. *Ginekol Pol* 79: 276-80.
18. Gross T, Wagner A, Ugurel S, et al. Identification of TIA-1+ and granzyme B+ cytotoxic T cells in lichen sclerosis et atrophicus. *Clin Lab Invest* 2001; 202: 198-202.
19. Zaki I, Dalziel KL, Solomonsz FA, Stevens A. The under-reporting of skin disease in association with squamous cell carcinoma of the vulva. *Clin Exp Dermatol* 1996; 21: 334-7.
20. Meffert JJ, Davis BM, Grimwood RE. Lichen sclerosis. *Am J Acad Dermatol* 1995; 32: 393-416.
21. Chil A, Kopczyński J, Starzewski J, et al. Immunohistochemical assessment of lymphocytic infiltrate and selected markers of activation of the immune system (Fas, HLA-DR) in lichen sclerosis associated with vulvar cancer. *Gynecol Oncol* 2005; 3: 160-9.
22. Carlson JA, Grabowski R, Chichester P, et al. Comparative immunophenotypic study of lichen sclerosis. *Am J Dermatopathol* 2002; 24: 97-107.
23. Hillemanns P, Untch M, Pröve F, et al. Photodynamic therapy of vulvar lichen sclerosis with 5-aminolevulinic acid. *Obst Gynecol* 1999; 93: 71-4.
24. Kurwa HA, Barlow RJ, Neill S. Single-episode photodynamic therapy and vulvar intraepithelial neoplasia type III resistant to conventional therapy. *Br J Dermatol* 2000; 143: 1040-2.