

Czy terapia fotodynamiczna może być zastosowana do leczenia czerniaka?

Can photodynamic therapy be an alternative method in melanoma treatment?

Anna Wawrzuta, Jolanta Saczko, Julita Kulbacka, Agnieszka Chwiłkowska

Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej Akademii Medycznej we Wrocławiu
Kierownik: prof. dr hab. Andrzej Gamian

Przeł Dermatol 2009, 96, 240–243

STRESZCZENIE

SŁOWA KLUCZOWE:

terapia przeciwnowotworowa, apoptoza, reaktywne formy tlenu, stres oksydacyjny, rak skóry.

KEY WORDS:

antitumour therapy, apoptosis, reactive oxygen species, oxidative stress, skin cancer.

Czerniak złośliwy jest nowotworem charakteryzującym się dużą złośliwością z powodu szybkiego wzrostu, wczesnych i licznych przerzutów oraz niewielkiej podatności na leczenie. Zastosowanie terapii fotodynamicznej (ang. *photodynamic therapy* – PDT) otwiera nowe perspektywy w walce z nim. Powstałe w jej wyniku reaktywne formy tlenu indukują w komórce efekt cytotoksyczny. Dochodzi do dezintegracji struktur wewnątrzkomórkowych oraz modulacji informacji genetycznej, wynikiem czego jest śmierć komórki. Wyniki badań wykazują, że PDT powoduje śmierć komórek nowotworowych na drodze dwóch mechanizmów – nekrozy i apoptozy. Szczególnie istotny jest ten drugi proces. Eliminuje on tkankę nowotworową bez przebiegu reakcji zapalnej w organizmie. W niniejszej pracy opisano mechanizm PDT oraz możliwości jej wykorzystania w leczeniu czerniaka skóry.

ABSTRACT

Melanoma is the most severe of all skin neoplasms as it may grow rapidly and metastasize. The application of photodynamic therapy (PDT) opens new perspectives in treatment of this tumour. Photodynamic therapy is an effective local cancer treatment that induces cytotoxicity through intercellular generation of reactive oxygen species. The disintegration of cellular structures and modulation of genetic information induced by PDT direct cancer cells to a death pathway. Numerous studies suggest that the exposure of tumour cells to PDT can lead to cell death via two separate processes: apoptosis or necrosis. In contrast to necrosis, apoptosis is an energy dependent, distinct form of cell death that follows a sequence of genetically programmed events and proceeds without inflammation. This study presents the mechanism of photodynamic therapy and its potential in melanoma treatment.

ADRES DO KORESPONDENCJI:

mgr inż. Anna Wawrzuta
Katedra i Zakład
Biochemii Lekarskiej
Akademii Medycznej
ul. Chałubińskiego 10,
50-368 Wrocław
e-mail: awawrzuta@gmail.com

WPROWADZENIE

Od wieków znana jest koncepcja wykorzystania światła w skojarzeniu z substancją fotouczulającą do leczenia różnych chorób. W starożytności stosowano światło oraz ekstrakt roślin bogatych w psoralen do terapii bie-

lactwa nabytego, krzywicy i łuszczyca [1]. W połowie XIX wieku odkryto hematoporfiryny, których pochodne należą obecnie do najczęściej stosowanych fotouczulaczy.

Terapia fotodynamiczna (ang. *photodynamic therapy* – PDT) wymaga trzech składników: fotouczulacza,

który lokalizuje się w tkance nowotworowej i uczula ją na działanie światła, źródła światła o odpowiedniej długości fali, które wzbudza zakumulowany w tkance nowotworowej fotouczulacz, a także niezbędnego tlenu rozpuszczonego w tkance. Wzbudzony związek przenosi energię z fali świetlnej na tlen cząsteczkowy, a następnie generuje jego reaktywne formy (RFT). Pojawiają się one w miejscu ulokowania fotouczulacza. Obecnie poszukuje się coraz lepszych rozwiązań, w których fotouczulacz selektywnie gromadzi się w tkance nowotworowej, natomiast w obrębie zdrowych tkanek nie powoduje efektów fototoksycznych. Ma on ponadto wykazywać maksymalnie intensywne pasma absorpcji w tzw. oknach transmisyjnych tkanki, które nie pokrywają się z pasmami absorpcji barwników endogennych (melaniny, hemoglobiny, oksyhemoglobiny) oraz z pasmami absorpcji wody w obszarze bliskiej podczerwieni [2]. Warunkiem zainicjowania reakcji fotochemicznej jest korelacja pasma emisji źródła światła z pasmem absorpcji barwnika, dlatego do każdego fotouczulacza należy zastosować odpowiednio dobraną długość fali [1–3].

Fotouczulacze mogą być stosowane bezpośrednio na skórę lub wprowadzane do organizmu poprzez iniekcję [3]. Po absorpcji światła, fotouczulacz ze stanu podstawowego przechodzi w stan wzbudzenia, w którym może ulec dwóm typom reakcji (ryc. 1.). W warunkach, gdy stężenie tlenu w środowisku reakcji jest zmniejszone, reakcja fotoutleniania przebiega wskutek wytworzenia form wolnorodnikowych w komórkach nowotworowych (reakcja fotodynamiczna typu I). Wolne rodniki powstają w wyniku przeniesienia wodoru lub elektronu między cząsteczką wzbudzonego fotouczulacza a substratem. Reakcja ta generuje powstanie anionorodnika ponadtlenkowego oraz rodnika wodoronadtlenkowego. Rodniki te są bardzo aktywnymi utleniaczami i ich powstanie zapoczątkowuje niszczenie tkanki nowotworowej w procesie utleniania. Fotouczulacz w stanie trypletowym może także przenosić energię bezpośrednio na cząsteczkę tlenu, która przechodzi w stan wzbudzony, tworząc tlen singletowy – bardzo reaktywną formę tlenu (II typ reakcji) [3–5]. Oba mechanizmy utleniania fotodynamicznego zachodzą jednocześnie. Stosunek między nimi zależy od rodzaju użytego fotouczulacza, stężenia substratu i tlenu oraz zdolności wiązania fotouczulacza do substratu [6]. Najbardziej narażonymi na fotoutlenianie – i związany z tym stres oksydacyjny – są związki zawierające wiązania podwójne w błonach komórkowych. Przy dłuższych czasach działania czynników utleniających destrukcji mogą ulegać także fragmenty białek oraz DNA [3].

Skuteczność zastosowania terapii zależy od wielu czynników: typu i dawki fotouczulacza, jego wewnątrzkomórkowej i zewnątrzkomórkowej lokalizacji, światła, dostępności tlenu i czasu między dostarczeniem fotouczulacza a ekspozycją na światło [7].

W terapii fotodynamicznej niszczenie tkanki nowotworowej może zachodzić w wyniku trzech mechanizmów:

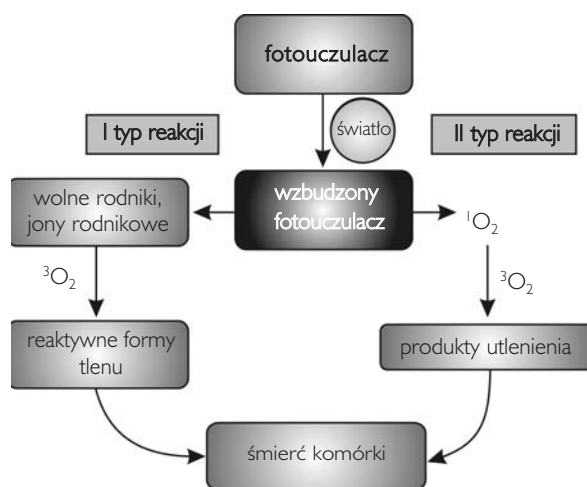
- bezpośredniego niszczenia komórek nowotworowych (nekroza lub apoptoza),
- niszczenia naczyń – PDT powoduje rozpad mikronaczyń, co prowadzi do ostrego niedotlenienia tkanek i martwicy guza,
- odpowiedzi immunologicznej – wyniki badań wykazały, że PDT powoduje aktywację komórek immunokompetentnych, tj. makrofagów, neutrofilów oraz limfocytów; objawia się to zwiększonym wydzielaniem interleukiny 6, interleukiny 10 oraz czynnika martwicy nowotworów (ang. *tumour necrosis factor α* – TNF- α) [7].

Śmierć komórek pod wpływem PDT zachodzi na drodze dwóch mechanizmów – nekrozy lub apoptozy. Nekrozę (martwicę) zwykle poprzedza takie uszkodzenie komórki, które uniemożliwia utrzymanie jej homeostazy. Często wiąże się ona z dużym uszkodzeniem tkanki przy silnej reakcji zapalnej, co z punktu widzenia zdrowia pacjenta nie jest korzystne.

Apoptoza jest procesem czynnym i nazywanym programowaną śmiercią komórki. Mechanizm ten warunkuje prawidłowe funkcjonowanie organizmu. W ostatnim etapie komórki ulegają fagocytozie [8]. Nie dochodzi do reakcji zapalnej. Apoptoza podlega ścisłej regulacji enzymatycznej, wywołana działaniem PDT wiąże się z generacją zwiększonego stężenia ceramidów oraz z uruchomieniem kaskady kaspaz [9].

ZASTOSOWANIE TERAPII FOTODYNAMICZNEJ W LECZENIU ZMIAN DERMATOLOGICZNYCH

Terapię fotodynamiczną stosuje się z powodzeniem w terapii różnych typów nowotworów i schorzeń nienowotworowych. Znalazła ona zastosowanie w leczeniu



Ryc. 1. Dwa typy reakcji w terapii fotodynamicznej
Fig. 1. Two types of reactions in photodynamic therapy

miejscowym i układowym zmian dermatologicznych o charakterze łagodnym, np. łuszczycy, zmian naczyniowych płaskich, oraz w leczeniu nowotworów skóry (raki podstawnocomórkowe, raki kolczystocomórkowe, choroba Bowena) [10].

Stosunkowo dobre wyniki uzyskano w terapii łuszczycy, stosując w PDT kwas 5-aminolewulinowy (ALA-PDT). W badaniach z wielokrotnym powtarzaniem PDT, przy użyciu 10-procentowego ALA oraz naświetlaniu promieniowaniem ultrafioletowym A (UVA), uzyskano ponad 50-procentowe wyleczenia zmian łuszczycowych [10]. Kliniczną skuteczność PDT-ALA opisano w przypadku raków podstawnocomórkowych (ang. *basal cell carcinoma* – BBC). W 90% przebadanych typów BBC uzyskano całkowite ustąpienie nowotworu przy terapii z zastosowaniem 20-procentowego ALA [11]. Przy tym samym stężeniu ALA w PDT, zastosowanej w przypadku choroby Bowena, wyleczono 88% pacjentów [12].

NISZCZENIE KOMÓREK CZERNIAKA ZŁOŚLIWEGO *IN VITRO* Z ZASTOSOWANIEM METODY FOTODYNAMICZNEJ

Wyniki badań *in vitro* nad zastosowaniem PDT w zwalczaniu czerniaka są bardzo obiecujące. Efektem terapii na ludzkiej linii komórek czerniaka o nazwie *Beidegröm Melanoma* (BM) były uszkodzenia DNA odpowiadające zmianom apoptotycznym. W badaniach zastosowano Photofrin[®], który jest oczyszczoną formą pochodnej hematoporfiryny [13]. W badaniach z zastosowaniem tego samego fotouczulacza na ludzkiej linii komórek czerniaka Me45 uzyskano podobne wyniki. W dodatkowych badaniach przeprowadzonych na tej linii wykazano lokalizację Photofrinu[®] w błonach mitochondrialnych, co powoduje zaburzenia potencjału błonowego mitochondriów (depolaryzacja) oraz uwolnienie cytochromu c i innych białek apoptogennych. Zwiększenie stężenia grup karbonylowych oraz podwyższony poziom ekspresji mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej (MnSOD) i hemooksygenazy (HO-1) potwierdzają, że zastosowana PDT indukuje stres oksydacyjny w komórkach Me-45 [14]. Apoptozę stwierdzono również w komórkach linii czerniaka G361, które poddano terapii z użyciem sulfofenylowej pochodnej porfiryny z wbudowanym cynkiem [15]. Wyniki badań przeprowadzonych na mysiej linii czerniaka Cloudman S91/13 dowodzą, że terapia z zastosowaniem Photofrinu[®] i Verteporfinu powoduje generowanie dużych ilości tlenu singletowego. Verteporfin jest pochodną porfiryny, należąca do fotouczulaczy drugiej generacji. Związek ten okazał się bardziej skuteczny w porównaniu z Photofrinem[®], gdyż jego znacznie mniejsze dawki powodowały pożądaną efekt cytotoksyczny [16].

WNIOSKI

Ponad 20 lat temu badacze stwierdzili, że czerniaki barwnikowe nie są wrażliwe na PDT, gdyż dochodzi do przekazywania wzbudzonej energii do melaniny zamiast do tlenu zawartego w komórkach [10]. W przeprowadzonych ostatnio badaniach wykazano jednak stres oksydacyjny i śmierć komórek czerniaka w wyniku zastosowanych terapii, co wskazuje, że metoda PDT może być skuteczna w leczeniu *melanoma*.

Metoda ta otwiera nowe możliwości nieinwazyjnego leczenia czerniaka z wykorzystaniem nowoczesnych osiągnięć biologii molekularnej, chemicznej syntezy związków i fizyki optycznej.

Piśmiennictwo

1. **Dolmans D.E., Fukumura D., Jain R.K.:** Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* 2003, 3, 380-387.
2. **Dougherty T.J.:** Photoradiation therapy. *Urology* 1984, 23, 61-64.
3. **Graczyk A.:** Biochemiczne i biofizyczne podstawy fotodynamicznej metody wykrywania i leczenia nowotworów. [w:] Fotodynamiczna metoda rozpoznawania i leczenia nowotworów. A. Graczyk (red.), Dom Wydawniczy Bellona, Warszawa 1999, 21-73.
4. **Vrouenraets M.B., Visser G.W., Snow G.B., van Dongen G.A.:** Basic principles, applications in oncology and improved selectivity of photodynamic therapy. *Anticancer Res* 2003, 23, 505-522.
5. **Tudaj A., Podbielska H., Zychowicz J., Stręk W.:** Światło leczy – wprowadzenie do terapii i diagnostyki fotodynamicznej. [w:] Diagnostyka i terapia fotodynamiczna. H. Podbielska, A. Sieroń, W. Stręk (red.), Urban & Partner, Wrocław 2004, 1-32.
6. **Kulbacka J., Saczko J., Chwiłkowska A., Ługowski M., Banaś T.:** Fototerapia jako alternatywna metoda leczenia nowotworów. *Med Rodz* 2008, 4, 88-95.
7. **Gerber-Leszczyszyn H., Ziółkowski P.:** Terapia fotodynamiczna nowotworów głowy i szyi. *Dent Med Probl* 2003, 40, 217-219.
8. **Stępień A., Izdebska M., Grzanka A.:** Rodzaje śmierci komórki. *Post Hig Med Dośw* 2007, 61, 420-428.
9. **Lesiak K., Sztiller-Sikorska M., Czyż M.:** Czynniki transkrypcyjne w powstawaniu i progresji czerniaka. *Post Hig Med Dośw* 2007, 61, 576-595.
10. **Lanigan S.W.:** Terapia fotodynamiczna w dermatologii. [w:] Lasery w dermatologii. S.W. Lanigan (red.), Wydawnictwo Czelej, Lublin 2005, 89-94.
11. **Kennedy J.C., Pottier R.H., Pross D.C.:** Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *J Photochem Photobiol B* 1990, 6, 143-148.
12. **Babilas P., Landthaler M., Szeimies R.M.:** Photodynamic therapy in dermatology. *Eur J Dermatol* 2006, 16, 340-348.
13. **Saczko J., Kulbacka J., Chwiłkowska A., Drag-Zalesińska M., Wysocka T., Ługowski M.:** The influence of photodynamic therapy on apoptosis in human melanoma cell line. *Folia Histochem Cytobiol* 2005, 43, 129-132.
14. **Wawrzuta A., Saczko J., Kulbacka J., Chwiłkowska A.:** The influence of PDT on the melanoma cells in vitro. *Acta Biochim Pol* 2008, 55 (Suppl 3), 319.

-
15. **Kolarova H., Macecek J., Nevrelova P., Huf M., Tomecka M., Bajgar R. i inni:** Photodynamic therapy with zinc-tetra (p-sulfophenyl) porphyrin bound to cyclodextrin induces single stand breaks of cellular DNA in G361 melanoma cells. *Toxicol in vitro* 2005, 19, 971-974.
16. **Nowak-Śliwińska P., Karocki A., Elas M., Pawlak A., Stochel G., Urbańska K.:** Verteporfin, photofrin II and merocyanine 540 as PDT photosensitizers against melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, 349, 549-555.

Otrzymano: 17 XII 2008 r.

Zaakceptowano: 31 III 2009 r.