

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE CRAIOVA

ȘCOALA DOCTORALĂ



TEZĂ DE DOCTORAT

Rezumat

**ASPECTE HISTOLOGICE ALE TERAPIEI
FOTODINAMICE ÎN DERMATOLOGIE**

Conducător de doctorat,

PROF. UNIV. DR. LAURENȚIU MOGOANTĂ

Student doctorand,

CONSTANTIN CĂTĂLIN RADU

Introducere

Cancerul continuă să reprezinte o importantă problemă de sănătate publică. Morbiditatea prin cancer a avut o creștere impresionantă în ultimele decenii și, în acest context, carcinoamele cutanate au crescut în SUA, Canada, Europa și Australia cu 4-8% pe an. De asemenea, incidența melanomului s-a dublat la fiecare 10 ani în țările cu populație albă. În anul 2007, în lume au fost diagnosticate 12 milioane de cazuri noi de cancer, aproximativ 20% având localizare cutanată.

Cancerurile cutanate reprezintă aproximativ 6% din bolile de piele, cele mai importante caracteristici fiind că se dezvoltă adesea pe leziuni precanceroase, care diagnosticate și tratate timpuriu previn transformarea malignă, prezintă polimorfism clinic și histologic, localizarea lor la vedere permite un diagnostic precoce și utilizarea unei largi game terapeutice.

Printre mijloacele terapeutice ale cancerului cutanat, și-a făcut apariția o metodă cu invazivitate mică și rezultate clinice satisfăcătoare. Deja inclusă în ghidurile terapeutice actuale și adresându-se mai multor afecțiuni dermatologice, și nu numai, această nouă tratament câștigă teren.

Terapia fotodinamică (photodynamic therapy – PDT) este o metodă terapeutică non-invazivă, cu aplicabilitate în dermatologie, ce implică trei elemente cheie (un fotosensibilizant, lumina și oxigenul dintr-un țesut) și se desfășoară în două etape. În prima etapă are loc absorbția preferențială și acumularea porfirinelor fotodinamic active în țesutul țintă iar cea de-a doua etapă presupune iluminarea cu o sursă de lumină, cu o lungime de undă adecvată, producând efectul terapeutic.

Au fost publicate numeroase studii clinice, încercări terapeutice, de asemenea s-a ridicat problema standardizării metodei. Pe lângă nevoia identificării protocolului perfect de tratament, stabilirea acelor elemente care constituie substratul microscopic al terapiei fotodinamice rămâne un deziderat încă greu de atins. Lucrarea de față și-a propus să nominalizeze câteva dintre aceste elemente.

Cuvinte cheie: cancer, afecțiuni cutanate premaligne și maligne, terapie fotodinamică, acid delta-aminolevulinic

I. PARTEA GENERALĂ

Capitolul 1 Ontogeneza și histologia organului cutanat prezintă date recente despre anatomia, embriologia, dezvoltarea și diferențierea organului cutanat. Urmează elementele definitorii ale histologiei cutanate, în ordine, epiderm, derm și hipoderm, expunerea în detaliu a celularității cutanate. Acest capitol se încheie cu prezentarea anexelor pielii, a inervației și vascularizației cutanate.

Capitolul 2 Carcinogeneza cutanată – factori de risc. În acest capitol sunt enumerați principalii factori care contribuie la apariția neoplaziei cutanate. Sunt expuse în amănunt etapele carcinogenezei organului cutanat. Se fac referiri la implicarea factorilor intrinseci, genetici, oncogene, protooncogene, factori de creștere și gene supresoare. Se prezintă în continuare factorii extrinseci, subcapitol în care aducem în discuție carcinogeneza provocată de virusuri și de substanțe chimice. Sunt prezentate de asemenea rolurile jucate de radiațiile ionizante, cunoscut sub numele de radiocarcinogeneză. În completarea acestui capitol amintim fotocarcinogeneza, subcapitol ce evidențiază rolul radiației solare în carcinogeneză. În încheiere supunem atenției factorul mecanic și fumatul, factori extrinseci ce au un cunoscut potențial carcinogenetic.

Capitolul 3 Carcinoamele cutanate prezintă detaliat caracterele morfo-clinice ale carcinoamelor bazocelulare (CBC). Este menționat că polimorfismul clinic incriminat în perioada de debut a acestor leziuni cutanate maligne nu face decât să se accentueze în perioada de evoluție ulterioară, luând naștere tipuri morfo-clinice foarte deosebite unele de altele. Sunt prezentate în continuare cele mai comune: perlat, plan cicatricial, nodular, Ulcus rodens, chistic, sclerodermiform, pagetoid (superficial), vegetant, pigmentat. Sunt descrise în continuare aspectele microscopice generale ale carcinoamelor bazocelulare, caracterele lor comune dar și cele speciale. Carcinoamele spinocelulare (CSC) sunt descrise în continuare, fiind expuse tipurile clinice ulcero-vegetant, vegetant gigant conopidiform, nodular, keratozic, ulceros, fisurar, infiltrativ cu extensie radială, actinomicozic, epithelioma cuniculatum. Prezentarea acestora este urmată de o descriere a principalelor tipuri histopatologice, carcinomul verucos, cancrioidul, carcinomul scuamos adenoid, carcinomul cu celule „în inel cu pecete”, carcinomul scuamos pigmentat, carcinomul cu celule fusiforme (sarcomatoid), carcinomul bazaloid, fără a omite și

descrierea keratozelor actinice, leziuni cutanate considerate premaligne și a căror evoluție se poate complica cu dezvoltarea unui carcinom spinocelular.

Au fost aduse în atenție și aspectele imunohistochimice ale carcinoamelor bazocelulare și spinocelulare, lucrarea de față urmărind mai departe nu numai modificările histologice induse de terapia fotodinamică, ci și cele imunohistochimice ce survin post-terapeutic.

II. CONTRIBUȚII PERSONALE

Capitolul 4 debutează cu prezentarea tratamentului ce face obiectul lucrării de față și anume terapia fotodinamică (PDT). Sunt expuse pentru început date istorice, încercările mai multor cercetători de a trata fotodinamic variate afecțiuni dermatologice, și nu numai. Urmează o descriere a mecanismului de acțiune fotodinamic. PDT implică activarea prin lumină a unui fotosensibilizator în prezența unui mediu bogat în oxigen. Sunt folosiți ca fotosensibilizatori acidul delta-amino levulinic (ALA) sau esterul său metil (MAL), aplicați topic pe leziunile cutanate pentru perioade variabile de timp, ceea ce conduce la conversia ALA în protoporfirina IX, agent fotoactivator endogen. Protoporfirina IX se acumulează în țesuturile țintă, în cazul de față în țesuturile cu celule rapid proliferative, carcinoame bazocelulare superficiale, spinocelulare in situ sau precursorii acestora, keratozele actinice. După activarea de către o sursă de lumină în prezența oxigenului, sensibilizatorul (protoporfirina IX) este oxidat, ceea ce conduce la generarea unor radicali de oxigen, procesul continuându-se cu distrucția selectivă a celulelor excitate (inducerea apoptozei sau necrozei), fără afectarea țesuturilor înconjurătoare.

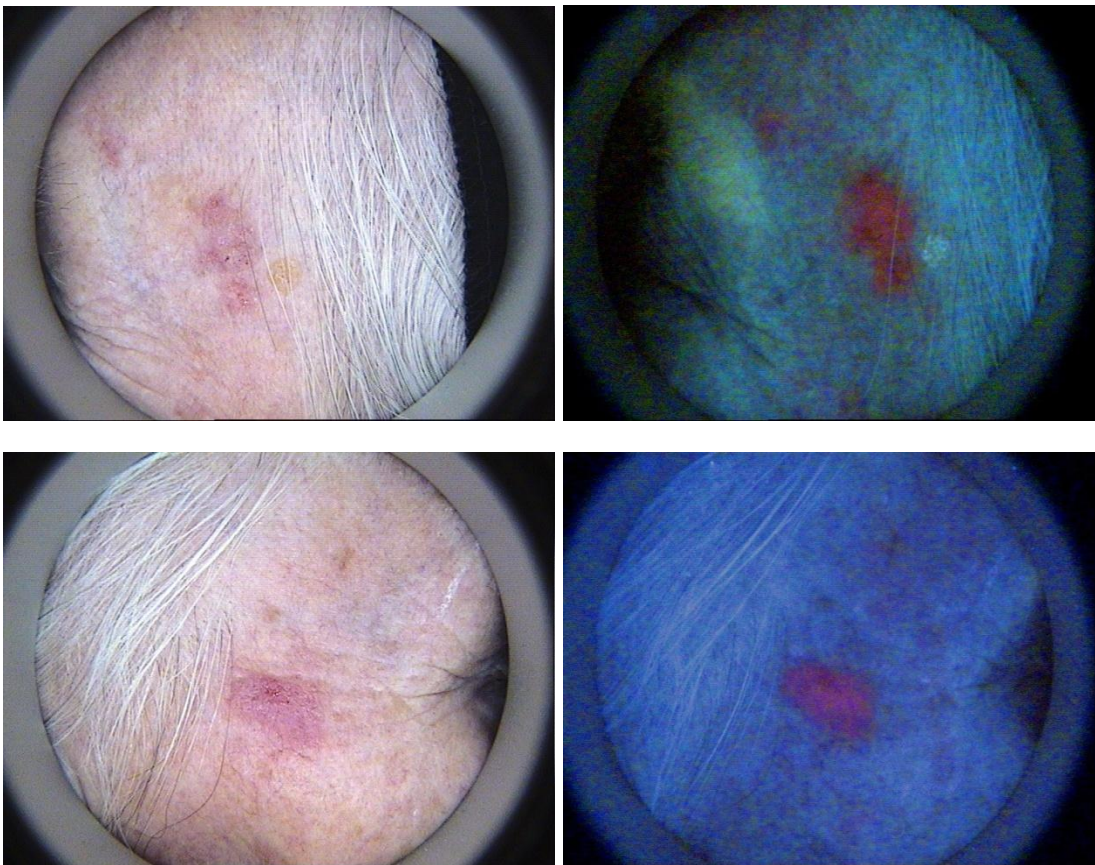
Capitolul 5 descrie metodologia studiului nostru. Am efectuat un studiu retrospectiv de evaluare a rezultatelor PDT pe 30 pacienți tratați în cabinetul dermatologic Ionescu-Borcea, Geldern, Germania. Au fost incluși în studiu 30 de pacienți, pentru fiecare pacient am reținut date de identificare (nume, prenume, sex, vârsta), mediul de proveniență, profesia, fototipul, localizarea cancerului, istoricul bolii și diagnosticul clinic.

Criterii de includere: am ales pentru studiu pacienți la care am documentat clinic și histologic diagnostic de field cancerisation, keratoze actinice și carcinoame cutanate superficiale, cu semne clinice de photoageing, lentigine solare, elastoza solară și anamneștic expunere cronică solară.

Criterii de excludere: anamnezic antecedente de tulburări legate de fotosensibilitate, boală infecțioasă activă, imunosupresie, sarcina, alăptarea, terapie în zona cutanată de tratament cu 5-floruracil, imiquimod sau diclofenac în ultimele 6 luni, alergie sau intoleranță la gelul conținând acid delta-aminolevulinic.

Protocolul de tratament

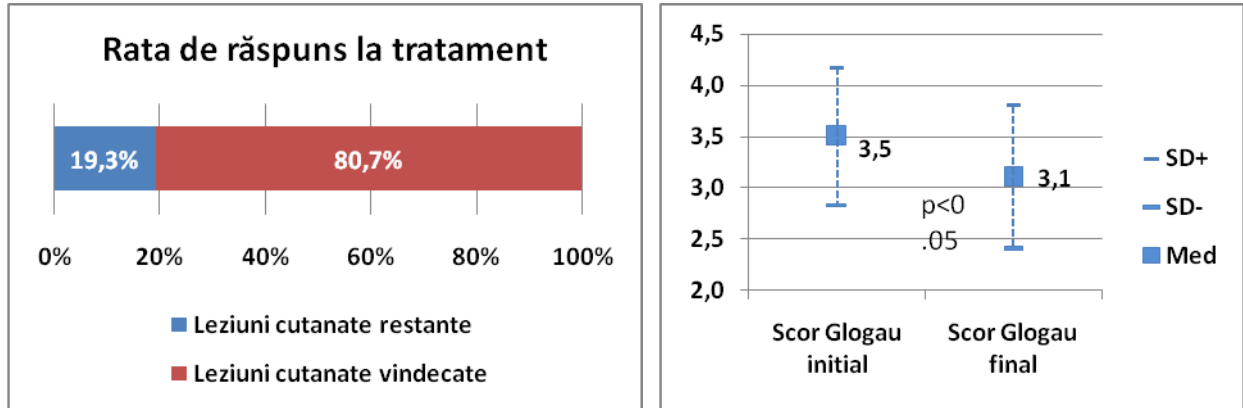
În decurs de 30 de zile am efectuat două ședințe de terapie fotodinamică, constând în aplicarea cutanată a fotosensibilizantului, 20% acid delta-aminolevulinic sub formă de gel sub pansament ocluziv, timp de patru ore.



Spinaliom in situ, documentat histologic, aspect clinic si diagnostic fotodinamic folosind FotoFinder

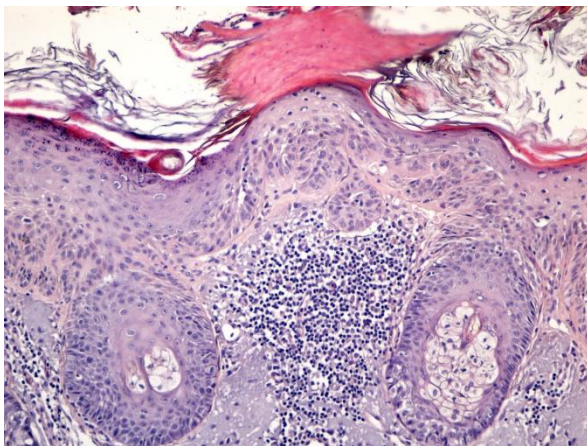
S-a procedat la iluminarea suprafețelor cutanate cu lumină roșie, lungimea de undă specificată de producător având un vârf la 630 nm (PhotoDyn[®]750, Heine.Med GmbH & Co. KG, Germany) cu o doză de lumină totală de 37 J cm².

Capitolul 6. Rezultate Evaluarea clinică s-a bazat pe: anamneză, istoricul bolii, precizarea localizării, a diagnosticului clinic, a formei clinice a leziunii în momentul începerii terapiei. De asemenea răspunsul clinic s-a documentat fotografic înainte și după al doilea tratament (rata de vindecare). S-a cuantificat regresia procesului de îmbătrânire cutanată utilizând Scala Glogau.

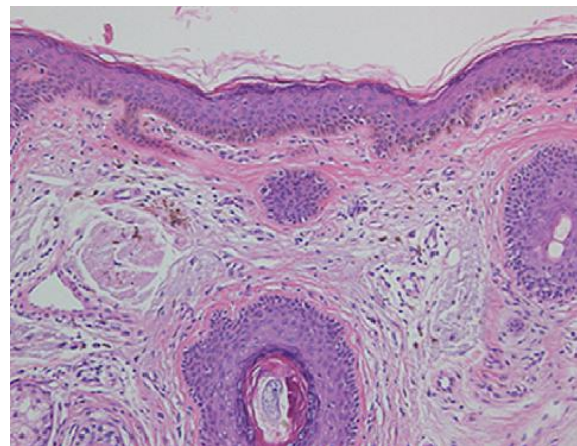


Rata de răspuns la tratament și regresia procesului de îmbătrânire cutanată, înainte și după terapie utilizând scorul Glogau

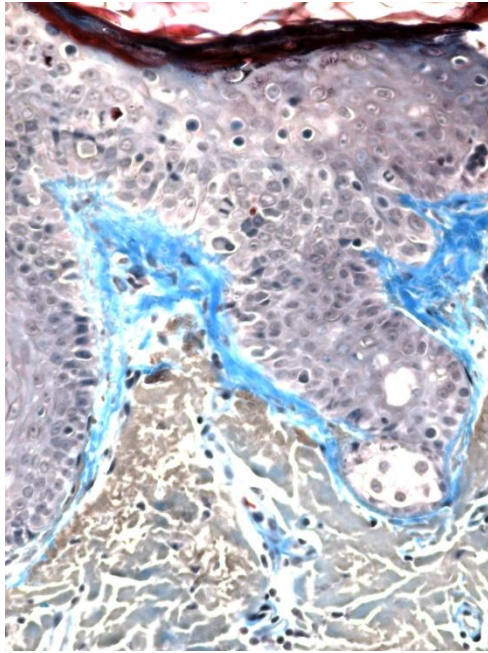
Studiul histologic si imunohistochimic



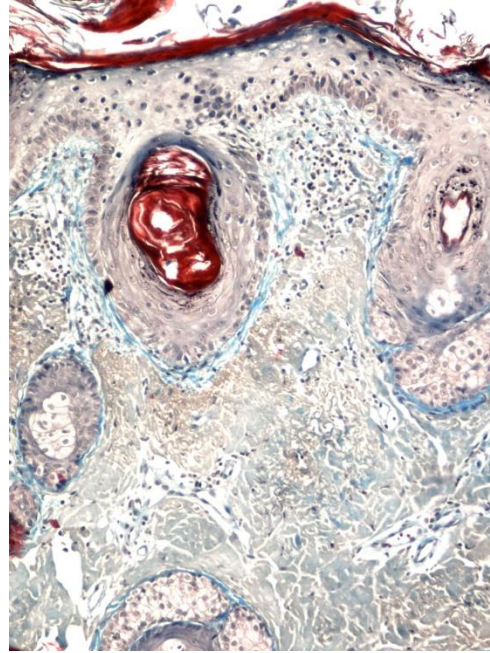
Fragment cutanat preterapeutic



Fragment cutanat, post-terapeutic. Col. HE x40



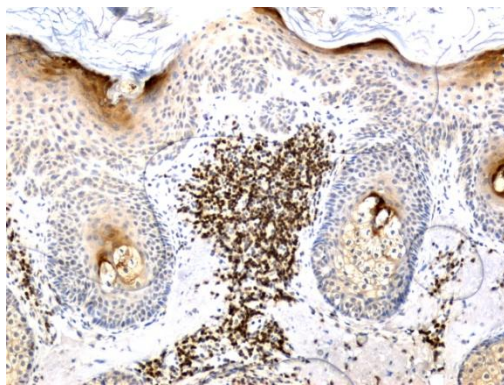
Preterapeutic: Fibre colagene dezorganizate



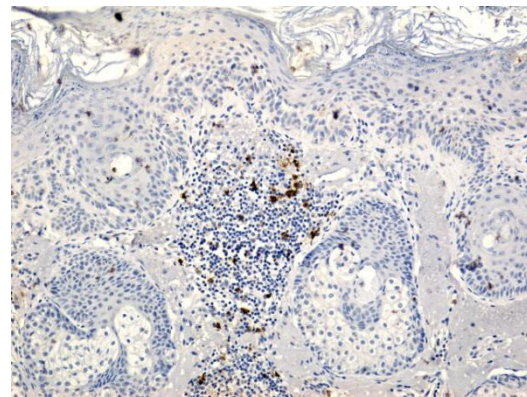
**Postterapeutic, normalizarea
dispozitiei fibrelor de colagen**

Col. Tricromic Goldner Szekely, X20

Pentru o diferențiere mai bună a celulelor prezente în infiltratul inflamator, am utilizat mai mulți anticorpi specifici și anume: CD3 pentru evidențierea limfocitelor T, CD20 pentru punerea în evidență a limfocitelor B, CD68 pentru studiul distribuției celulelor de tip macrofagic, CD34 pentru evidențierea capilarelor de angieneză, în special în țesutul inflamator, exemplificate mai jos.



**Infiltrat limfocitar focal cu limfocite CD3 într-o
keratoză actinic Imunomarcare cu CD3 X10**



**Imagine de infiltrat inflamator într-o keratoză actinică
cu rare limfocite CD20 pozitive. Imunomarcare cu CD20 X 10**

Capitolul 7 Discuții. Există în acest moment numeroase studii clinice care compară PDT cu tehnicile terapeutice clasice (chirurgie, crioterapie, citostatice aplicate local, 5 fluorouracil, imiquimod), studii ale căror rezultate sunt mai mult decât promițătoare. Szeimies și colab. (1) a comparat timp de un an rezultatele tratamentului chirurgical cu rezultatele PDT asupra carcinoamelor bazocelulare superficiale, studiu efectuat pe 196 pacienți. La 3 luni rata succesului clinic era de 92.2 % (PDT) vs. 99.2% (tratament chirurgical). La 12 luni s-a înregistrat o recurență în procent de 9.4% a leziunilor maligne tratate fotodinamic și nicio recidivă a carcinoamelor tratate chirurgical. De Haas și colab. publică rezultate similare (2).

Substratul histologic explică rezultatele favorabile ale terapiei, totodată limitările ei, în obținerea unor procentaje terapeutice inferioare tehnicilor chirurgicale de tratament adresate leziunilor cutanate pre- și maligne. Există studii care cercetează modificările histologice induse de PDT (3), (4). Un studiu recent având ca obiective examinarea modificărilor histologice și rolul apoptozei în cazul keratozelor actinice (5), după PDT folosind acid 5-aminolaevulinic și laser excimer, a sugerat ca apoptoza apare la o zi de la efectuarea PDT. La o oră după PDT s-au găsit în probele bioptice celule cu citoplasma eozinofilică și nuclee semnificativ colorate și a fost observată vacuolizarea unor celule tumorale în stratul inferior al epidermei. Un infiltrat de limfocite și neutrofile s-a observat în stratul superior al dermei. La o zi după PDT, toate straturile epidermei expuneau o necroză ușor degenerativă, cu formarea de celule umbră și condensarea cromatinei în jurul membranei nucleare, în stratul inferior al epidermei. S-a observat necroză în toate straturile epidermei și infiltrare de limfocite, la 3 zile după PDT. Bagazgoitia și colab. observă o reducere a displaziei celulare și a elastozei dar și reducerea expresiei Ki-67 și p53 în probele cutanate prelevate la 6 săptămâni după PDT, în timp ce expresia ciclonei D1 a rămas stabilă. Observațiile autorilor arată că PDT reduce semnele histologice ale procesului de îmbatrânire cutanată, totodată reducerea expresiei markerilor tumorali indică o reversie a procesului de carcinogeneză.

Reducerea elastozei solare și îmbunătățirea globală a aspectului cutanat post-terapeutic poate fi explicat prin efectul PDT asupra colagenului. Supunem atenției un studiu in vitro realizat de S. Karrer și colab. (7), în care pacienții cu sclerodermie localizată care primesc terapie fotodinamică cu acid 5 aminolevulinic arată o reducere a nivelului de infiltrație a pielii, sugerând că această terapie reduce scleroza cutanată. Au fost studiate in vitro efectele PDT asupra

metabolismului colagenului. Fibroblaste normale și sclerodermice au fost tratate cu doze subletale de acid 5 aminolevulinic și lumină roșie și au fost transferate în structuri tridimensionale de colagen. Rezultatele arată că acidul 5 aminolevulinic și lumina roșie induc expresia matrix-metalloproteinazelor 1 și 3 în fibroblastele normale și sclerodermice, în timp ce reduc expresia ARNm a colagenului tip I. Într-un studiu ulterior (8), aceiași autori au tratat in vitro keratinocite cu doze subletale de acid 5 aminolevulinic și la acest mediu au expus fibroblaste umane, pentru a trata efectele paracrine ale keratinocitelor, după terapia fotodinamică. Rezultatul: fibroblastele tratate au arătat o inducție crescută de până la 3 ori a nivelurilor matrix-metalloproteinazelor 1 și 3, ceea ce sugerează că terapia fotodinamică cu acid 5 aminolevulinic modulează MMP 1 și 3 prin mecanisme indirecte. Expresia ARNm al colagenului de tip I nu a fost alterată semnificativ.

Capitolul 8 Concluzii

1. Lucrarea de față abordează o tematică actuală de mare interes, situată la granița dintre histologie, fiziologie, dermatologie, chirurgie, de o importanță deosebită prin numărul mare de cazuri, potențialul invalidant, cancerul cutanat constituind o reală problemă de sănătate publică.
2. Studiul a urmărit răspunsul clinic al terapiei fotodinamice, eficiența în vindecarea leziunilor cutanate premaligne și maligne, îmbunătățirea aspectului cutanat la bolnavii cu tegument fotoexpus cronic și foto-îmbătrânire.
3. S-au prelevat probe cutanate la pacienții la care răspunsul clinic nu a fost cel scontat, urmărind câteva repere histologice și imunohistochimice care au ajutat la o mai bună înțelegere a terapiei la nivel celular.
4. Rezultatele acestui studiu aduc dovezi histologice care atestă efectele benefice ale terapiei fotodinamice asupra tegumentului cronic fotoexpus, foto-îmbătrânit.
5. Analizele histologice și imunohistochimice indică o descreștere a severității și extensiei gradului de atipie keratinocitară asociată cu depunerea dermală de colagen, îmbunătățirea gradului de elastoză solară în ariile cutanate afectate de field-cancerisation.

6. Aceste date sugerează că terapia fotodinamică poate scădea potențialul carcinogenetic în ariile cutanate cu field-cancerisation și poate produce o reversie parțială a procesului de îmbătrânire cutanată.

Bibliografie selectivă

1. RM Szeimies, S Ibbotson, DF Murell, D Rubel, Y Frambach, D de Berker, R Dummer, N Kerrouche, H Villemagne, A clinical study comparing methyl aminolevulinate photodynamic therapy and surgery in small superficial basal cell carcinoma (8-20 mm), with a 12-month follow-up, JEADV 2008, 22
2. ERM de Haas, HC de Vijlder, HJCM Sterenberg, HAM Neuman, DJ Robinson, Fractionated aminolevulinic acid-photodynamic therapy provides additional evidence for the use of PDT for non-melanoma skin cancer, JEADV 2008, 22
3. Photorejuvenation induced by 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy in patients with actinic keratosis: a histologic analysis. Park MY, Sohn S, Lee ES, Kim YC. J Am Acad Dermatol. 2010 Jan;62(1):85-95. Epub 2009 Nov 18.
4. Clinical, histopathological and immunohistochemical assessment of human skin field cancerization before and after photodynamic therapy. Szeimies RM, Torezan L, Niwa A, Valente N, Unger P, Kohl E, Schreml S, Babilas P, Karrer S, Festa-Neto C. Br J Dermatol. 2012 Jul;167(1):150-9. doi: 10.1111/j.1365-2133.2012.10887.x. Epub 2012 Jun 1
5. Nakaseko H, Kobayashi M, Akita Y, Tamada Y, Matsumoto Y., Histological changes and involvement of apoptosis after photodynamic therapy for actinic keratoses. Br J Dermatol. 2003 Jan;148(1):122-7
6. Bagazgoitia L, Cuevas Santos J, Juarantza A, Jaen P. Photodynamic therapy reduces the histological features of actinic damage and the expression of early oncogenic markers. Br J Dermatol 2011;165:144–51.
7. Karrer S, Bosserhoff AK, Weiderer P, Landthaler M, Szeimies RM., Influence of 5-aminolevulinic acid and red light on collagen metabolism of human dermal fibroblasts J Invest Dermatol. 2003 Feb;120(2):325-31.
8. Karrer S, Bosserhoff AK, Weiderer P, Landthaler M, Szeimies RM , Keratinocyte-derived cytokines after photodynamic therapy and their paracrine induction of matrix metalloproteinases in fibroblasts., Br J Dermatol. 2004 Oct;151(4):776-83