

Tadeusz Kęcik, Iwona Świtka-Więclawska, Jan Kasprzak, Alfreda Graczyk
i Antoni Prątnicki

Badania doświadczalne nad przydatnością metody fotodynamicznej w diagnostyce i leczeniu czerniaka

Experimental studies on the usefulness of photodynamic method in diagnosis and treatment of melanoma

Summary. The authors present results of experimental studies on the usefulness of hematoporphyrin and laser in diagnosis and treatment of intraocular tumors. An amelanotic Greene melanoma was implanted into anterior chamber of 10 rabbits. After administration of HpD the tumor was irradiated with laser light of wavenlengths 406 nm for diagnosis and 630 nm for selective destruction of neoplastic cells. During follow-up the tumor was growing pale and its gradual shrinkage was observed. In histopathological examination multiple area of necrosis with total destruction of blood vessels were found.

Hasła: amelanotic Greene melanoma, hematoporfiryna, HpD-PDT, promieniowanie laserowe, nowotwory, diagnostyka, leczenie
Key words: amelanotic Greene melanoma, hematoporphyrin, HpD-PDT, laser radiation, tumors, diagnosis, treatment

Guzy wewnątrzgałkowe stanowią nadal jeden z poważniejszych problemów terapeutycznych. Najczęściej spotykanym i najgroźniejszym nowotworem jest czerniak. Podejrzenie czerniaka w wielu przypadkach powoduje konieczność chirurgicznego usunięcia gałki ocznej. W ostatnich latach w licznych ośrodkach onkologicznych prowadzone są intensywne prace nad wykorzystaniem hematoporfiryny i jej pochodnych do rozpoznawania i leczenia nowotworów. Podstawą tej metody zwanej także fotodynamiczną terapią nowotworów (Hematoporphyrin Derivative Photodynamic Therapy — HpD-PDT, jest wzbudzenie hematoporfiryny nagromadzonej w tkance nowotworowej światłem o odpowiedniej długości fali.

Obecnie metoda znalazła już zastosowanie praktyczne do leczenia nowotworów we wczesnym okresie choroby, bądź jako leczenie poprzedzające lub uzupełniające inne klasyczne sposoby (chirurgia, radioterapia, chemoterapia), a także do wykrywania wczesnych zmian nowotworowych. W 1961 *Lipson* opisał gromadzenie się w komórkach nowotworowych mieszaniny pochodnych porfiryńowych i określił je jako HpD.

Zauważył on, że pochodne są bardziej wychwytywane przez komórki nowotworowe niż czysta hemato-

porfiryńa. Jednak główny rozwój fototerapii z hematoporfiryną (HpD) wiąże się z nazwiskiem *Dougherty*. W połowie lat 70-tych przeprowadził on liczne próby na zwierzętach, a od 1978 r. rozpoczął leczenie u ludzi¹.

W naszym organizmie znajduje się zespół porfiryń, które spełniają ważne funkcje fizjologiczne. Wśród nich są hematoporfiryny będące pochodnymi czerwonego barwnika krwi — hemu. Ma to istotne znaczenie w ich stosowaniu, gdyż są łatwo metabolizowane przez organizm ludzki bez skutków ubocznych. Poza tym charakteryzuje je wybiórcza lokalizacja w komórkach o szybkim wzroście, włączając w to komórki nowotworowe, pośrednictwo w cytotoksycznej reakcji fotochemicznej w komórkach naświetlanych światłem o odpowiedniej długości fali, oraz możliwa do uwidocznienia fluorescencja^{3,7-9}.

Przed 5 laty w Katedrze Okulistyki Warszawskiej AM rozpoczęto badania doświadczalne nad fototerapią czerniaka. Budowa anatomiczna gałki ocznej stwarza korzystne warunki dla fototerapii, co uzasadnia zainteresowanie tą metodą diagnostyki i leczenia. Celem pracy była ocena inwazyjności zmiany przy użyciu metody fotodynamicznej oraz ustalenie optymalnych parametrów terapii.

Materiał i metodyka

Początkowo korzystaliśmy z nowotworu chomika tzw. czerniaka Bomirskiego, jednak ze względu na zbyt małe wymiary gałki tych zwierząt i gwałtowny wzrost guza model odrzucono. Następną serię badań rozpoczęto z czerniakiem mysim, którego fragmenty wszczepiano do komory przedniej oka królika. Z powodu małych różnic w regresji guza między grupą

hom te lasery nie mają sobie równych !

- absolutnie bezpieczne – ze stałym filtrem
- dające światło zielone, żółte, czerwone
- jedyny na świecie laser Yagowy bez Q switcha (plamka <4 mikrony, prowadzenie promienia poprzez mikroskop Leica)
- waga od 17 kg
- moc do 8 W pure green, 100 000 W/cm²
- wszystkie w technologii EDO
- ceny już od 23 000 \$

TOMEY

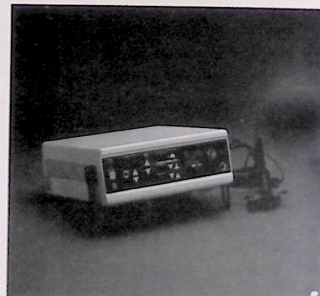
FAKOEMULSYFIKATORY
USG

APARATY DO TOPOGRAFII ROGÓWKI
SOCZEWKI WĘWNAŹRGAŁKOWE
IMPLANTY

Reprezentantem na terenie Polski jest:

ul. Królowej Jadwigi 37b/7, 30-209 Kraków
tel.: (0 12) 21 58 10, 21 63 91, 22 86 51; fax: (0 12) 21 71 46

C.XC CONSULTRONIX
LASERS

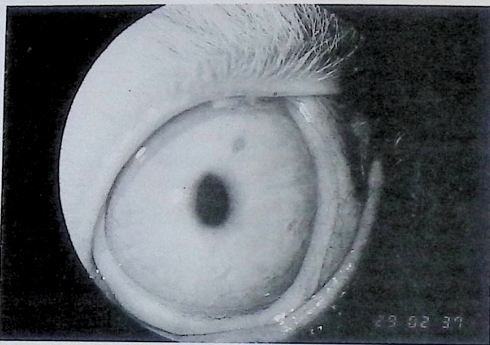


Reprint requests to:
Prof. dr hab. n. med. Tadeusz Kęcik
ul. Prosta 2/14 m. 75, 00-850 Warszawa

badaną a kontrolną ponownie zmieniono model doświadczalny.

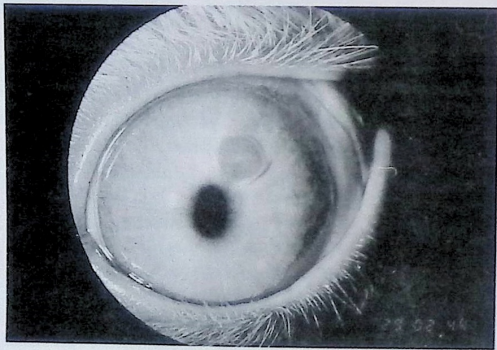
Obecnie prowadzimy serię badań z tzw. amelanotic Greene melanoma. Jest to amelanotyczna pochodna guza chomika wszczepiona do komory przedniej królika przez Greene i Harvey, a następnie wielokrotnie pasażowana w celu zmniejszenia antygenowości.

10 królikom wagi 2.5—3.5 kg wszczepiono do oka prawego w znieczuleniu ogólnym 1 mm³ amelanotic Greene melanoma. Wzrost nowotworu w postaci pojedynczego guzka obserwowano na 10-13 dzień po wszczepieniu (ryc. 1).



Ryc. 1. Obraz amelanotic Greene melanoma po wszczepieniu.

Badania rozpoczęto gdy wielkość guza na tęczówce wynosiła około 4 mm gdyż wówczas uwidaczniają się dobrze wyształcone naczynia krwionośne czerniaka (ryc. 2).



Ryc. 2. Guz z wyształconymi licznymi naczyniami krwionośnymi przez HpD-PDP.

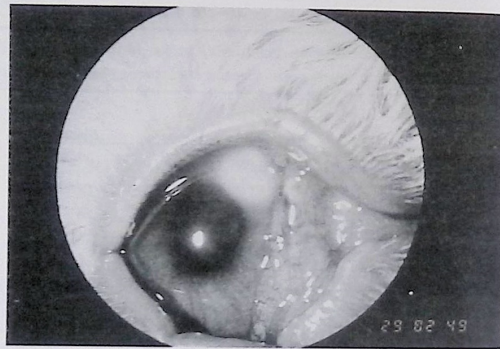
Przyjęto następujący plan badań. Wszystkie króliki podzielono na 3 grupy. Pierwszą przeznaczono do leczenia hematoporfiryną i promieniowaniem laserowym. Królikom grupy drugiej podano tylko hematoporfirynę i nie naświetlano promieniowaniem laserowym, natomiast królikom grupy trzeciej naświetlano guz bez uprzedniego podania hematoporfiryny. Królikom grupy I i II podano dożylnie 10 mgHpD/kg wagi ciała. Dla oczyszczenia zdrowych tkanek ze związku króliki przebywały przez 24 godz. w ciemności.

W celu dokładnej lokalizacji guza użyto promieniowanie w paśmie 406nm uzyskane za pomocą filtra 03FIV002 firmy Melles Griot i lampy Tungseña. Dla poprawy warunków obserwacji zastosowano filtr Nr03fcg098 odcinający promieniowanie poniżej 580 nm. Stwierdzono wyraźną czerwoną fluorescencję tkanki nowotworowej.

W celach leczniczych zastosowano czerwoną wiązkę promieniowania o długości fali 630nm z lasera He-Ne, lub barwnikowego. Króliki grupy I i II naświetlano przez 15 min. wiązką o gęstości mocy 100-150mW/cm² obejmującą cały guz i 1mm otaczającej zdrowej tęczówki.

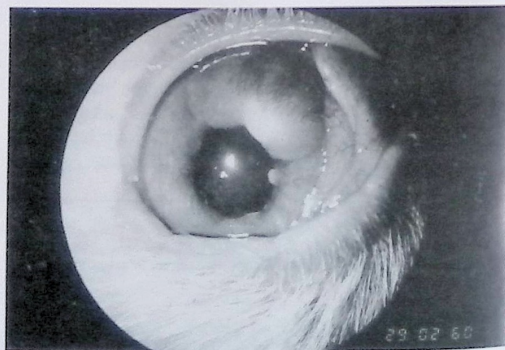
Wyniki

W grupie I, a więc leczonej, już po 24 godz. od fototerapii zaobserwowano obrzęk, zblednięcie nowotworu oraz wylewy krwawe. Naczynia krwionośne guza uległy całkowitej destrukcji (ryc. 3).



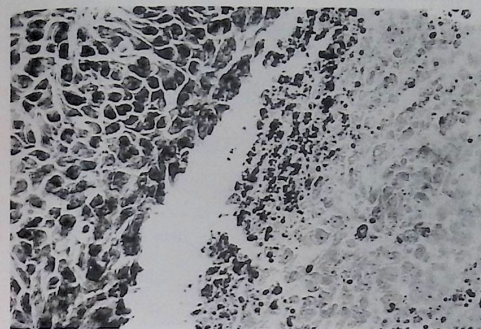
Ryc. 3. Całkowita destrukcja naczyń guza po fototerapii.

Początkowo wystąpiło też częściowe przymglenie rogówki, które uległo przejaśnieniu w okresie 8-10 dni. Po tym czasie następował rozwój licznych guzków satelitarnych, których szybki wzrost powodował przysłanianie nowotworu leczonego (ryc. 4).

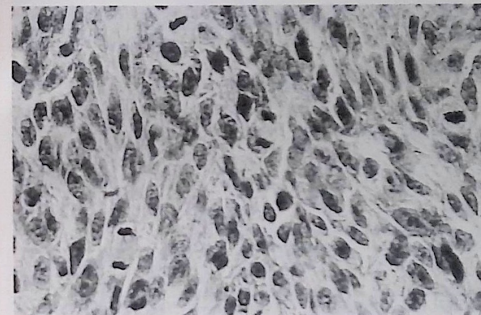


Ryc. 4. Szybki wzrost guzów satelitarnych z jasnym guzem centralnym w centrum.

W kontrolnej grupie II i III zarejestrowano znaczną progresję guza w ciągu 12-14 dni od wszczepienia, prowadzącą do perforacji gałki (ryc. 5 i 6).



Ryc. 5. Obraz histopatologiczny guza leczonego z rozległymi ogniskami martwicy. Barwienie H-E, pow. ob. 1x250.



Ryc. 6. Obraz histopatologiczny guza kontrolnego. Barwienie H-E pow. ob. 1x400.

W badaniach histopatologicznych w grupie leczonej stwierdzono liczne ogniska martwicy świadczące o destrukcji guza, a w grupie kontrolnej guz wypełniał cały przedni odcinek i prowadził do perforacji.

Omówienie

Procesy utleniania fotodynamicznego materiałów biologicznych wymagają 3 podstawowych składników: sensybilizatora czyli barwnika, tlenu, oraz światła o odpowiedniej długości fali^{2,8}.

Pod wpływem światła hematoporfiryna ulega licznym przemianom. Wykazuje ona intensywność absorpcji w 5 pasmach, największą — w paśmie o długości fali 400nm tzw. paśmie Soretta. W tej części widma absorpcja jest intensywniejsza niż w pozostałych pasmach, tj. 500nm, 530nm, 570nm, 630nm^{4,7}.

Dla fotowzbudzenia w celach diagnostycznych korzystniejszą jest używać światła o długości fali około 400nm, co odpowiada najsilniejszemu pasmu absorpcji. Dla celów leczniczych wykorzystuje się światło o długości fali około 630nm, gdyż przepuszczalność tkanki wzrasta wraz ze wzrostem długości fali światła absorbowanego^{4,5}. Skierowanie wiązki laserowej na wysyceny hematoporfiryną guz powoduje efekt cytotoksyczny. W wyniku reakcji cząsteczek tlenu z pobudzonym przez napromieniowanie sensybilizatorem powstaje w komórkach czerniaka tzw. tlen singletowy. Tlen wzbudzony do stanu atomowego jest bardzo aktywny chemicznie i powoduje zniszczenie komórki nowotworowej¹⁰.

Przedstawione badania traktujemy jako pilotowe. Mają one na celu opanowanie techniki pasażu, dobranie dawki hematoporfiryny dającej największy efekt cytotoksyczny oraz dobranie czasu, sposobu naświetlania i dawki światła laserowego tak, aby uzyskać niezbędną energię wystarczającą do zniszczenia wszystkich komórek nowotworowych w guzie bez uszkodzenia tkanek otaczających.

Wnioski

Fototerapia z HpD jest perspektywiczną metodą rozszerzającą możliwości diagnostyczne i lecznicze czerniaka. Uzyskane wyniki stwarzają przesłanki do jej klinicznego zastosowania.

Piśmiennictwo

1. Berns M.W.: Hematoporphyrin Derivative Photoradiation Therapy. *Lasers in Surgery and Medicine* 1-4 (1984).
2. Bonnett R.: Tumor Photochemotherapy. *Spectrum* 218: 8-10 (1989).
3. Dougherty T.J., Kaufman J.E., Goldfarb A., Weishaupt K.R., Boyle D., Mittleman A.: Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Research* 38: 2628-2635 (1978).
4. Freeman R.G., Troll D.: Hematoporphyrin photosensitization of rabbit eye to visible light. *Arch. Ophthalmol.* 78: 766-768 (1967).
5. Gomer Ch. J., Doiron D.R., Les White et al.: Hematoporphyrin derivative photoradiation induced damage to normal and tumor tissue of the pigmented rabbit eye. *Current Eye Research* 3: 229-237 (1984).
6. Henderson B.W., Waldow S.M., Mang T.S., Potter W.R., Malone P.B., Dougherty T.J.: Tumor destruction and kinetics of tumor cell death in two experimental mouse tumors following photodynamic therapy. *Cancer Research* 45: 572-576 (1985).
7. Kinsey J.H., Cortese D.A., Moses H.L., Ryan R.J., Branum E.L.: Photodynamic effect of hematoporphyrin derivative as a function of optical spectrum and incident energy density. *Cancer Research* 41: 5020-5026 (1981).
8. Stenkiewicz A., Graczyk A., Stanowski E.: Fotodynamiczna metoda rozpoznawania i terapii nowotworów. *Problemy biocybernetyki i inżynierii biomedycznej* 2: 377-394 (1990).
9. Tse D.T., Dutton J.J., Weingeist et al.: Hematoporphyrin photoradiation therapy for intraocular and orbital malignant melanoma. *Arch. Ophthalmol.* 102: 833-838 (1984).
10. Weishaupt K.R., Gomer Ch.J., Dougherty T.J.: Identification of singlet as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. *Cancer Research* 36: 2326-2329 (1976).

Praca wpłynęła: 22.01.1993.