

## STUDIU PRIVIND EFICACITATEA TERAPIEI FOTODINAMICE CU ACID 5-AMINOLEVULINIC ÎN PSORIAZIS VULGAR

D. BODA\*, ADRIANA DIACONEASA\*\*, MONICA NEAGU\*\*, HARILLAQ KALESHI\*\*\*\*, L. VLĂDĂU\*\*\*\*, SANDA POPESCU\*

București

### Rezumat

Terapia fotodinamică (PDT) presupune interacția dintre un fotosensibilizator (acid 5 aminolevulinic-ALA, sau methylaminolevulinat-MAL), țesutul activat de fotosensibilizator și lumină. În diverse aplicații clinice ale PDT s-au utilizat numeroși fotosensibilizatori, precum și surse de lumină coerentă (lasere) și necoerentă (LED, lămpi). PDT poate fi o opțiune terapeutică la pacienți cu forme de psoriazis localizat, rezistente la terapiile convenționale, ce nu necesită/sau nu vor terapii sistemice. Scopul acestui studiu a fost cuantificarea efectelor *in vivo* ale terapiei ALA-PDT, la pacienți cu forma localizată de psoriazis vulgar, pe culturi de keratinocite obținute înainte și după terapia ALA-PDT, monitorizând proliferarea și apoptoza cheratinocitelor. 10 pacienți cu vârste între 20-58 de ani au fost introduși în studiu, dintre care 4 de sex feminin și 6 de sex masculin. Culturile de keratinocite umane au fost obținute la 3 zile anterior terapiei ALA-PDT și la 3 zile după terapie (10% ALA, la 2 ore de incubare, expunere la lampa OMNILUX 20 J/cm<sup>2</sup>, 16 min, 4 ședințe la interval de 7 zile). Proliferarea celulară a fost evaluată indirect prin determinarea oxidazei intracelulare - CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation kit (Promega) (Technical Bulletin #TB112). Apoptoza a fost evaluată prin testul FITC anexina și propidium iodide. Evaluarea clinică s-a făcut calculând scorurile PASI și BSA înainte și după ultima ședință ALA-PDT. Am obținut o reducere cu 52% a scorului PASI și 31% a scorului BSA, fără a obține vreo remisie completă. Reacțiile adverse, prurit, eritem, edem au fost observate doar pe suprafețele expuse. Potențialul proliferativ al cheratinocitelor în cultura după ALA-PDT este redus semnificativ iar apoptoza (celulele An+ și An+PI+) este crescută.

**Cuvinte cheie:** terapie fotodinamică, acid aminolevulinic, psoriazis, apoptoză, proliferare keratinocitară.

### Summary

Topical photodynamic therapy (PDT) involves application of a photosensitizer (5-aminolevulinic acid - ALA or methyl aminolevulinat - MAL) followed by its activation by visible light. A wide range of photosensitizer and both coherent (lasers) and non-coherent (lamps and LEDs) light sources have been used to perform PDT on the specific application. PDT may offer a treatment alternative for patients with resistant psoriasis, who do not require or want systemic therapies and have localized psoriasis. The aim of the study was to evaluate the *in vivo* effects of PDT treatment in psoriasis vulgaris, on cultured keratinocytes before and after the treatment, monitoring the keratinocytes proliferation and apoptosis. 10 patients aged between 20-58 years, 4 women and 6 men, were enrolled in the study after signing an informed consent. Human primary keratinocyte cultures were obtained 3 days before and 3 days after ALA-PDT treatment (10% ALA, 2 hours, light exposure ~ 600-700nm - Omnilux™ 20 J/cm<sup>2</sup>, 16 min, 4 sessions 7 days interval). Cellular proliferation was evaluated indirectly by intracellular oxidase determination - CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation kit (Promega) (Technical Bulletin #TB112). Apoptosis was assessed with double labelling FITC-annexin and propidium iodide. Clinical evaluation was performed by calculating PASI and BSA before the first and after the last treatment. We obtained a 52% improvement of PASI and a 31% BSA reduction, with no total clinical remission. Adverse events were observed only on exposed site. Proliferative potential after ALA-PDT is markedly reduced and apoptosis is increased (An+ cells and An+PI+ cells).

**Key words:** photodynamic therapy, aminolevulinic acid, psoriasis, apoptosis, keratinocytes proliferation.

DermatoVenerol. (Buc.), 53: 85-90

\* U.M.F. „Carol Davila” București.

\*\* S.C.U.C. „Grigore Alexandrescu” București.

\*\*\* Institutul „Victor Babeș” București.

\*\*\*\* Spitalul „Colentina” București.

## Introducere

### *Terapia fotodinamică în dermatologie*

Terapia fotodinamică (*phodynamic therapy* - PDT) constă în combinarea unui agent fotosensibilizant și a luminii vizibile în vederea distrugerii selective a celulelor tumorale sau a țesuturilor proliferative. Substanțele fotosensibilizante pot fi porfirine, chlorine, ftalocianine sau precursori de tipul acidului 5-aminolevulinic (5-ALA) și derivați ai săi. Sub acțiunea luminii cu lungime de undă adecvată, substanța fotosensibilizantă decade din starea stabilă eliberând astfel compuși toxici, în special specii reactive de oxigen, care distrug cu precădere țesutul bolnav. Acumularea selectivă a substanței fotoactive în celulele țintă se explică prin mai multe mecanisme: transport membranar aberant, activitate crescută a enzimelor din ciclul de sinteză al hem, biodisponibilitatea fierului, proprietăți ale stratului cornos, penetrare și distribuție tisulară variabilă. În dermatologie, se preferă terapia topică cu substanță care penetrează ușor stratul cornos și se acumulează preferențial în tegument. Cei mai utilizați compuși aprobați pentru PDT în multe țări, sunt acidul 5-aminolevulinic (ALA) și derivatul său metilat (metil-aminolevulinat). 5-ALA a fost introdus din anul 1982 și folosit cu succes în tratarea tumorilor cutanate. ALA induce sinteza de protoporfirină IX (PpIX) în celulele încărcate cu acest compus (11). Sursele de lumină utilizate pentru activarea compușilor fotosensibilizanți pot fi sursele de lumină coerentă (lasere) sau de lumină non-coerentă (lămpi și LED). Lumina albastră realizează o penetrare superficială, pe când cea roșie una mai profundă, permițând astfel o diversitate a aplicațiilor terapeutice (5). Fotodistrugerea se realizează prin două tipuri de mecanisme - un mecanism direct care determină deteriorarea celulară ireversibilă (apoptoză sau necroză) și un mecanism indirect care afectează componentele vasculare și ale sistemului imun.

În prezent PDT cu 5-ALA este aprobată pe scară largă pentru tratamentul keratozelor actinice, epiteliomului bazocelular superficial și al bolii Bowen. Rezultate promițătoare s-au obținut și în tratamentul altor dermatoze: psoriazis vulgar, sarcoidoză, sclerodermie localizată, acnee vulgară, condyloma acuminatum,

veruci vulgare, epidermodysplasia verruciformis, precum și în procedee de reîntinerire cutanată (1).

### *PDT în tratamentul psoriazisului vulgar*

Psoriazisul este o afecțiune cutanată cronică, neinfecțioasă, care prezintă o componentă inflamatorie și proliferativă și este determinată genetic. Răspândirea acestei maladii este largă, cu o incidență la nivelul întregului glob între 1,5 și 4%. Fiziopatologic, caracteristicile leziunii sunt hiperproliferarea și diferențierea anormală a keratinocitelor, infiltratul inflamator însoțit de modificări la nivelul vascularizației cutanate. Bazele moleculare ale patogeniei psoriazisului nu sunt elucidate în totalitate. Studiile realizate pe familii și gemeni monoziagoți au confirmat implicarea componentei genetice în etiopatogenia psoriazisului. Totuși, pentru ca boala să se exprime, este nevoie de prezența unor factori *trigger* (cum ar fi infecții, medicamente, stress, traumatism fizic asupra pielii). Actual, psoriazisul este considerat o boală cu determinism plurifactorial, care pentru a se exprima clinic necesită prezența unor factori genetici și de mediu.

Boala are evoluție cronică, cu afectarea importantă a calității vieții. Impactul asupra stării de sănătate este unul major, din această cauză un arsenal de opțiuni terapeutice este adoptat pentru majoritatea pacienților. Opțiunile terapeutice cuprind tratamentul topic keratolitic, emolient, reductor, sistemic imunomodulator, fototerapie, până la noile terapii biologice cu rezultate bune, dar care sunt costisitoare și uneori sunt urmate de recăderi la întreruperea tratamentului.

Experiența actuală acumulată pe plan mondial recomandă PDT ca metodă alternativă de tratament în psoriazisul vulgar, rezervată în special cazurilor rezistente la terapie, care nu necesită, nu doresc sau nu pot urma tratament sistemic (7). În ce privește modul de acțiune, Bissonnette et al. (2) au demonstrat inducerea apoptozei limfocitelor T în unele plăci de psoriazis după PDT cu ALA administrat oral. Fransson și Ros (6) au remarcat normalizarea markerilor de proliferare și diferențiere, inclusiv citokeratină 16 și filagrină, în keratinocitele de la nivelul plăcilor de psoriazis după 2-5 tratamente PDT cu ALA topic. Populațiile limfocitare

dermale CD4(+) și CD8(+) au fost de asemenea în scădere substanțială. În ce privește modul de aplicare al PDT în psoriazis, ALA topic pare mai sigur decât ALA sistemic, cu efecte adverse limitate la locul de aplicare: eritem, senzație de arsură și prurit în primele 72 de ore după aplicare. Este necesară decaparea prealabilă a leziunilor cu scumă groasă (3). Robinson et al. (14) propunea regimul terapeutic cu ședințe repetate, de energie mai scăzută – 2-8 j/cm<sup>2</sup>. Radakovic-Fijan et al (12) au evaluat comparativ trei protocoale terapeutice cu ALA topic și iradiere cu lumină 600-740 nm cu fluențe diferite în trei loturi de studiu (5, 10 și 20 j/cm<sup>2</sup>). După ședințe repetate (de 3 ori pe săptămână, în total 12 ședințe sau mai puține în caz de dispariție a leziunilor), PSI (psoriasis severity index) a arătat o scădere de 59% în grupul cu 20 j/cm<sup>2</sup>, față de 49% respectiv 46% în grupurile cu 10 j/cm<sup>2</sup> și 5 j/cm<sup>2</sup>. Diferența de eficacitate a fost semnificativ statistic mai mare în grupul cu 20 j/cm<sup>2</sup>.

### Obiectivul studiului

Terapia fotodinamică reprezintă o opțiune promițătoare în psoriazis, cu puține reacții adverse (reprezentate în principal de eritem și senzație de arsură locală) și mai puțin costisitoare în comparație cu terapia biologică, dar care necesită în continuare evaluări privind mecanismele de acțiune, protocoalele de aplicare și cunoscerea eficacității. În acest sens am realizat un studiu care a urmărit cuantificarea efectelor clinice ale terapiei fotodinamice asupra pacienților cu psoriazis vulgar, forma sporadică localizată, precum și a efectelor în model experimental utilizând culturi primare de keratinocite obținute de la pacienții luați în studiu, evaluându-se potențialul apoptotic și proliferativ înainte și după instituirea PDT.

### Material și metodă

S-au selectat pacienți cu psoriazis vulgar forma în plăci. Criterii de includere în studiu: adulți cu vârste între 18-60 ani, cu psoriazis vulgar, forma în plăci; diagnosticul de psoriazis să fie confirmat prin examen histo-patologic; scor PASI < 8, BSA (body surface area) 10-20% (fără a lua în considerare leziunile de la nivelul capului); eșec la cel puțin alte două metode terapeutice;

fără alte tratamente în ultimile 3 luni (cu excepția keratoliticelor și emolientelor, a căror utilizare a fost încurajată); fără patologie asociată care să contraindica PDT.

Pe baza criteriilor de includere, dintre pacienții Clinicii Dermatologie II, Spitalul Clinic Colentina, în perioada ianuarie 2007 - noiembrie 2007, s-a selectat un lot de 10 pacienți, cu următoarele caracteristici: 6 bărbați și 4 femei; vârste cuprinse între 20 și 58 de ani.

Lotul de pacienți constituit a fost tratat printr-un protocol de terapie ALA-PDT după cum urmează: s-a utilizat ALA 10% topic la nivelul tuturor leziunilor cu excepția feței, timp de incubare de 2 ore, apoi expunere la radiație luminoasă ~ 600-700nm (Omnilux™) la o fluență de 20 J/cm<sup>2</sup>, 16 min tratament, 4 ședințe de tratament la interval de 7 zile.

La 6 pacienți s-au recoltat biopsii cutanate, de la nivelul unei leziuni țintă în prealabil alese, localizată preferabil la nivelul brațe sau antebrate, înainte și la 3 zile după ultima ședință de terapie. Keratinocitele umane au fost izolate din biopsii de 3-6mm<sup>2</sup> înainte și după aplicarea terapiei, după un protocol adaptat utilizând 5 metodologii (4,8,9,10,13). Pentru testarea viabilității celulelor separate din biopsii s-a utilizat kitul CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Technical Bulletin #TB163, Promega). De asemenea în paralel s-a utilizat pentru testarea viabilității testul excluziei cu Tripán blue. Pentru a decela capacitatea proliferativă a keratinocitelor cultivate s-a utilizat un test indirect de cuantificare a oxidazelor intracelulare, prin testul reducerii sării de MTS, CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation kit (Promega) (Technical Bulletin #TB112), test care cuantifică activitatea proliferativă prin cuantificarea numărului de celule viabile din cultura celulară respectivă. Evaluarea proceselor apoptotice timpurii s-a realizat cu sistemul *Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit I* (BD Pharmingen). Pentru a diferenția stadiile apoptozei și necrozei, se utilizează în același sistem de detecție anexina V-FITC (Ann) și iodura de propodiu (PI) care este un colorant vital celular. Astfel celulele vii sunt dublu negative (Ann-/PI-), celulele aflate în apoptoza timpurie sunt Ann+/PI-, iar celulele care sunt în apoptoza târzie sau moarte sunt dublu pozitive (Ann+/PI+).



Fig. 1. Pacient VP, leziuni coate înainte de PDT



Fig. 2. Pacient VP, leziuni coate la 48 h după prima ședință PDT



Fig. 3. Pacient VP la 5 zile după a treia ședință PDT

Evaluarea clinică a pacienților s-a făcut inițial și la 1-3 zile după fiecare ședință PDT, prin calcularea PASI și BSA.

## Rezultate

Se vor discuta două categorii de rezultate: răspunsul terapeutic la ALA-PDT, cuantificat clinic prin efectele asupra PASI și BSA; efectele

PDT la nivel celular, reflectate prin modificarea potențialului proliferativ și apoptotic al keratinocitelor cultivate de la nivelul leziunilor de psoriazis, martori ai mecanismelor prin care ALA-PDT își exercită efectul terapeutic.

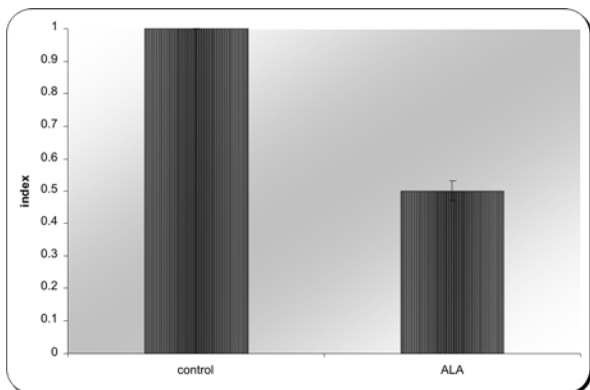
Detaliem pozele înainte și după terapia ALA-PDT la 2 din pacienții cu psoriazis vulgar, forma sporadică localizată.

După cele 4 ședințe ALA-PDT, PASI s-a îmbunătățit în medie cu 52%, iar BSA s-a redus în medie cu 31%. La niciun pacient nu s-a înregistrat remisiune totală. Unul dintre pacienții aflați în studiu nu a tolerat tratamentul din cauza senzației de arsură intensă și a eritemului, efectuând numai prima ședință de terapie. Un grad de eritem postterapeutic și senzație de arsură a fost înregistrat la toți pacienții, dar nu s-au înregistrat alte reacții adverse.

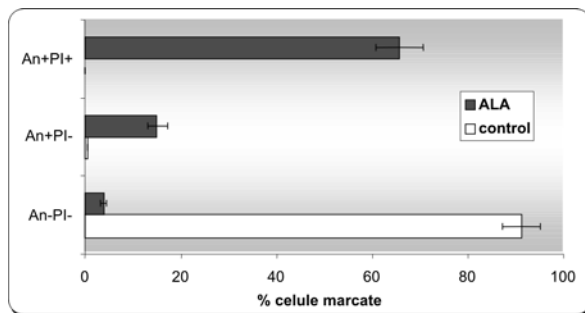
Capacitatea proliferativă a keratinocitelor primare post ALA-PDT este evident mai scăzută față de keratinocitele din leziunile inițiale (control). După 7-8 zile de la izolarea keratinocitelor din biopsiile cutanate supuse tratamentului, keratinocitele primare își pierd capacitatea proliferativă și nu mai pot fi menținute în cultură. Determinările funcționale au fost realizate în primele 72-96 h de la izolare.



Fig. 4, 5. Pacient NS cu leziuni pe fețele de extensie al membrului superior înainte de PDT și la 5 zile după prima ședință PDT



Capacitatea proliferativă a keratinocitelor izolate din biopsii cutanate supuse terapiei ALA-PDT



Gradul de apoptoză al culturilor celulare după terapia cu ALA-PDT este modificat față de control. Astfel, se constată o creștere marcantă a procentului de celule An+ (apoptoza timpurie) și An+PI+ (apoptoza târzie sau necroză).

Familia de fotosensibilizatori testată (ALA), nu interferă cu activitatea topoizomerazelor I și II, enzime implicate în replicarea ADN. Este posibil ca efectele înregistrate privind activarea căilor de apoptoză să nu fie legate de efectul direct asupra acizilor nucleici, ci să fie declanșate de mecanisme membranare și/sau mitocondriale.

### Concluzii

Rezultatele clinice și studiile de biologie celulară sunt convergente în sensul recomandării PDT cu ALA topic ca și metoda terapeutică promițătoare în psoriazis. Indicația majoră o constituie cazurile cu forme limitate, dar rezistente la tratament și cu impact major psihosocial asupra pacienților. Sunt necesare studii controlate ulterioare pentru evaluarea diverselor protocele terapeutice în ce privește eficacitatea și limitarea efectelor adverse.

Intrat în redacție: 26 mai 2008

## Bibliografie

1. Babilas P, Karrer S, Sidoroff A, Landthaler M, Szeimies RM. Photodynamic therapy in dermatology-an update. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2005;21:142-9.
2. Bissonnette R, Tremblay J, Juzenas P et al. (2002) Systemic Photodynamic Therapy with ALA induces apoptosis in lesional T cell lymphocytes of psoriatic plaques. *J Investig Dermatol* 119:77-83.
3. Boehnke W, Sterry W, Kaufmann R. (1994) Treatment of psoriasis by topical photodynamic therapy with polychromatic light. *Lancet* 343:801.
4. Boyce ST, *Methods in Molecular Medicine: Tissue Engineering Methods and Protocols*, Morgan JR, Yarmush ML (Eds.), vol. 18, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 365-388, 1999.
5. Brancalion L, Moseley H. Laser and Non-laser Light Sources for Photodynamic Therapy. *Laser Med Sci* 2002;17:173-186.
6. Fransson J, Ros A. (2005) Clinical and immunohistochemical evaluation of psoriatic plaques treated with topical 5-ALA PDT. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* 21:326-323.
7. Goldman MP, Dover JS, Alam M. *Photodynamic Therapy*, second edition, 2008 Elsevier Inc.
8. Gragnani A, Morgan JR, Ferreira LM. Experimental model of cultured keratinocytes. *Acta Cir Bras*, 2003 Vol 18 Special Edition, <http://www.scielo.br/acb>.
9. Green H, Kehinde O, Thomas J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci* 1979;76:5665-9.
10. Green H. Cultured cells for the treatment of disease: The successful growth of human skin cells in culture has made it possible to restore epidermis after severe burns and other forms of damage. *Sci Am* 1991 265(5); 96-102.
11. Kennedy JC, Marcus SL, Pottier RH. Photodynamic therapy (PDT) and photodiagnosis (PD) using endogenous photosensitization induced by 5-aminolevulinic acid (ALA): mechanisms and clinical results. *J Clin Laser Med Surg* 1996;14:289-304.
12. Radakovic-Fijan S, Blecha-Thalhammer U, Schleyer V et al. (2005) Topical ALA PDT as a treatment option for psoriasis? Results of a randomized, observer blinded study. *Br J Dermatol* 152:279-283.
13. Radu E, Simionescu O, Regalia T, Dumitrescu D, Popescu LM. Stem cells (p63+) in keratinocyte cultures from human adult skin, *JCMM*, 2002, 6(4):593-8.
14. Robinson D, Collins P, Stringer M et al. (1999) Improved response of plaque psoriasis after multiple treatments with topical ALA-PDT. *Acta Dermato - Venerologica* 79:451-455.
15. Technical Bulletin #TB112, CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation kit, Promega Corporation.
16. Technical Bulletin #TB163, CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit, Promega Corporation.