

Aktywność wybranych proteaz lizosomalnych wielojądrazastych granulocytów obojętnochłonnych u chorych z rogowaceniem słonecznym poddanych terapii fotodynamicznej (ALA-PDT)

The activity of selected lysosomal proteases of polymorphonuclear leukocytes in patients with actinic keratosis treated by photodynamic therapy (ALA-PDT)

Magdalena Lassota-Falczewska¹, Izabela Polak-Pacholczyk¹, Magdalena Kozłowska¹, Beata Miękoś-Zydek¹, Rafał Bartkowiak², Andrzej Kaszuba¹

¹Klinika Dermatologii i Dermatologii Dziecięcej Wydziału Wojskowo-Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, kierownik Kliniki: prof. dr hab. n. med. Andrzej Kaszuba

²Klinika Chirurgii Klatki Piersiowej, Chirurgii Ogólnej i Onkologicznej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego nr 2 w Łodzi, kierownik Kliniki: prof. dr hab. n. med. Marian Brocki

Post Dermatol Alergol 2007; XXIV, 6: 247–255

Streszczenie

Rogowacenie słoneczne jest najczęściej spotykanym stanem przednowotworowym skóry i dotyczy 50% populacji powyżej 40. roku życia. Do najbardziej skutecznych, bezinwazyjnych metod leczenia tej choroby należy terapia fotodynamiczna. Polega ona na silnym efekcie cytotoksycznym, prowadzącym do uszkodzenia organelli komórkowych, kwasów nukleinowych i struktur białkowych. Celem badań była ocena aktywności wybranych proteaz lizosomalnych (katepsyny G i katepsyn tiolowych w postaci wolnej i związanej) wielojądrazastych granulocytów obojętnochłonnych u chorych z rogowaceniem słonecznym, poddanych terapii fotodynamicznej z użyciem kwasu 5- γ -aminolewulinowego (ALA-PDT). Badania przeprowadzono u 35 osób klinicznie zdrowych i 26 pacjentów z rogowaceniem słonecznym, stosując do oznaczania enzymów metodę kolorymetryczną. Wykonano je 2-krotnie, tj. przed leczeniem i po 2. cyklu leczenia metodą ALA-PDT. Wyniki poddano analizie statystycznej. W badaniach wykonanych przed rozpoczęciem leczenia stwierdzono wyższą aktywność badanych proteaz u osób z rogowaceniem słonecznym w porównaniu z aktywnością tych enzymów u osób zdrowych. Po zastosowaniu metody ALA-PDT odnotowano zmniejszenie aktywności badanych enzymów w porównaniu z aktywnością przed leczeniem, jednakże aktywność ta nadal była wyższa niż w grupie osób zdrowych. Aktywność enzymów lizosomalnych wielojądrazastych granulocytów obojętnochłonnych, a szczególnie katepsyny G, może stanowić wskaźnik oceny postępów leczenia stanów przednowotworowych skóry przy zastosowaniu metody fotodynamicznej.

Słowa kluczowe: rogowacenie słoneczne, terapia fotodynamiczna, proteazy lizosomalne, wielojądrazaste granulocyty obojętnochłonne.

Abstract

Actinic keratosis is the most common precancerous state of the skin, observed in about 50% of the population over 40 years. The dissertation assesses the activity of chosen lysosomal proteases (cathepsin G and thiol cathepsins in free and bounded form) in patients with actinic keratosis who were given a photodynamic therapy were estimated in that work. The research was conducted on 35 clinically healthy men and women, as well as 26 patients with actinic keratosis. The research was conducted twice: before the radiation treatment and after a second cycle of ALA-PDT irradiation. The results of the research were subjected to statistical analysis. The examination conducted before the radiation treatment indicated higher activity of the examined proteases in patients with actinic keratosis, in comparison with the activity of the same enzymes in healthy individuals. After the ALA-PDT irradiation, lower

Adres do korespondencji: prof. dr hab. n. med. Andrzej Kaszuba, Klinika Dermatologii i Dermatologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, ul. Kniaziewiczza 1/5, 91-347 Łódź, tel./faks + 48 42 651 10 72

activity of the examined enzymes in patients with actinic keratosis was observed, in comparison with their activity before the irradiation. However, the activity was still higher than that observed in the healthy subjects. The activity of PMNL lysosomal enzymes, especially cathepsin G, may be an indicator considered in assessment of progress in the treatment of precancerous conditions of the skin by the photodynamic method.

Key words: actinic keratosis, photodynamic therapy, lysosomal proteases, polymorphonuclear leukocytes.

Wprowadzenie

Rogowacenie słoneczne (łac. *keratosis actinica*) należy do najczęściej spotykanych stanów przednowotworowych skóry i dotyczyć może ok. 50% populacji powyżej 40. roku życia. Ryzyko transformacji nowotworowej szacuje się na 6–25% w przypadku raka kolczystokomórkowego. Istotą *keratosis actinica* jest rozrost naskórka i zmiany w tkance łącznej podścieliska. Powstawanie tej choroby wiąże się z działaniem szkodliwych czynników fizycznych (głównie promieniowania UV), chemicznych, mechanicznych na skórę osób, u których występują określone uwarunkowania genetyczne związane z upośledzeniem procesów naprawczych DNA [1].

Stany przednowotworowe skóry łączą się z procesem starzenia, który – jak się obecnie uważa – jest wypadkową dwóch podstawowych czynników, tj. podłoża genetycznego (tzw. starzenie wewnątrzpochodne) oraz wpływu czynników środowiskowych, a zwłaszcza promieni UV (starzenie zewnątrzpochodne, *photoaging*). Istnieją dwie teorie, tłumaczące mechanizmy zachodzące w komórkach, tkankach i narządach starzejącego się organizmu – teoria zaprogramowania, związana z tzw. gerontogenami, oraz teoria stochastyczna, zakładająca, że procesy starzenia łączą się z zaburzeniami biochemicznymi, wśród których wymienia się:

- nadmierną produkcję wolnych rodników tlenowych,
- racemizację aminokwasów prowadzącą do zaburzeń czynności białek,
- nieenzymatyczną glikozylację prowadzącą do nieprawidłowego usieciowania włókien kolagenu i innych białek strukturalnych.

W wyniku tych procesów może dochodzić do wystąpienia różnorodnych zmian w organizmie człowieka, m.in. w fizjologii skóry [2].

W wyniku działania promieni UV na skórę w przebiegu przewlekłych zapalnych procesów związanych z foto-starzeniem dochodzi do miejscowej i ogólnoustrojowej aktywacji wielojądrowych granulocytów obojętnochłonnych (PMNL), odgrywających podstawową rolę w procesach obronnych organizmu. Wskutek pobudzenia PMNL uruchamia się kaskada reakcji biochemicznych, prowadzących do ich adherencji do powierzchni śródbłonka naczyń włosowatych, przemieszczania się przez ścianę naczyń z krwi do tkanek, rozpoznawania i pochłaniania cząstek opsonizowanych. Podczas tego procesu, związanego z wybuchem tlenowym, dochodzi do uwalniania pro-

duktów metabolizmu tlenowego komórki, produktów przemian biochemicznych, a także enzymów zawartych w wewnątrzkomórkowych ziarnistościach [3].

Obecnie jedną z podstawowych metod leczenia rogowacenia słonecznego jest terapia fotodynamiczna, która – jak się powszechnie uważa – w sposób bezinwazyjny prowadzi do wyleczenia nawet rozległych ognisk *keratosis actinica*.

Wykorzystywane w terapii fotodynamicznej promieniowanie UV należy do zakresu światła widzialnego (400–700 nm). Wykazuje ono różny stopień penetracji w głąb tkanek, w zależności od długości fali. Światło czerwone (>600 nm) penetruje najgłębiej, natomiast niebieskie i zielone do głębokości 2 mm.

Istotnym osiągnięciem w terapii fotodynamicznej było wprowadzenie w latach 90. ubiegłego wieku kwasu 5- γ -aminolewulinowego [4]. Kwas ten, wykorzystując drogę biosyntezy hemu, staje się po wnikięciu do komórki naturalnym prekursorem fotoaktywnej protoporfiryny IX (PpIX) [5]. Kwas 5- γ -aminolewulinowy jest substancją bezpieczną, a spektrum jego absorpcji dotyczy fal o długości 380–670 nm [6]. Miejscowa nadwrażliwość skóry po jego zastosowaniu utrzymuje się zwykle do 24 godz. [7].

Terapia fotodynamiczna (PDT) jest odmianą fotochemioterapii, w której wykorzystuje się środki światłoczułe, np. kwas 5- γ -aminolewulinowy oraz światło widzialne do wywołania selektywnego uszkodzenia i martwicy chorobowo zmienionych komórek [8].

Mechanizm działania PDT nie został jeszcze do końca poznany. Wiadomo, że wiąże się z toksycznym uszkodzeniem zmienionych chorobowo komórek, a miejscem działania PDT na poziomie komórkowym są różnorodne organelle. Najistotniejsze jednak reakcje łączą się z przekazywaniem energii ze wzbudzonego środka światłoczułego na atom tlenu cząsteczkowego, z wytworzeniem bardziej reaktywnego chemicznie tlenu singletowego. Istotą działania stanowi reakcja oksydacji błon lipidowych substratu (np. komórki nowotworowej) przez tlen singletowy, doprowadzająca do jej śmierci [9]. Reakcjom tym towarzyszy zjawisko apoptozy i niszczenie utkania naczyńowego guza [10], a zmniejszona rozpuszczalność fotosensibilizatorów i ich zatrzymywanie w obrębie zmiany nowotworowej wiąże się z obniżonym pH komórek guza [11].

Terapię fotodynamiczną wykorzystuje się w leczeniu m.in. stanów przednowotworowych, głównie *keratosis actinica* [12], leukoplakii [13], choroby Bowena [14], nie-

Tab. 1. Materiał badany

Grupy osobowe	Rozpoznanie	Płeć	Liczebność		Wiek (lata)			
			N	%	Min.–maks.	Me	\bar{x}	SD
odniesienia (O)	osoby klinicznie zdrowe	K	16	45,71	60–85	79	68,44	10,34
		M	19	54,29	54–79	68	70,32	8,18
		razem	35	100	54–85	72	69,18	9,35
badana (B)	<i>keratosis actinica</i>	K	17	65,38	61–89	81	72,57	12,03
		M	9	34,62	67–81	68	74,00	6,51
		razem	26	100	61–89	72	73,13	9,74

czerniakowych nowotworów skóry [15–17], okresu wstępnego ziarniniaka grzybiastego [18], trądziku pospolitego [19], hirsutyizmu [20], *cheilitis actinica* [21], znamienia łojowego [22], łuszczycy [23], nowotworów pęcherza moczowego i dróg moczowych, oskrzeli, przetyku, pochwy, sromu i wielu innych [24].

Cel pracy

Celem pracy było określenie wpływu terapii fotodynamicznej (ALA-PDT) na aktywność wybranych proteaz lizosomalnych (katepsyny G i katepsyn tiolowych) wielojądrazastych granulocytów obojętnochłonnych u chorych z rogowaceniem słonecznym.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono u 61 osób podzielonych na 2 grupy:

- grupę odniesienia (O) stanowiło 35 osób klinicznie zdrowych, w wieku 54–85 lat ($68,18 \pm 9,35$ roku); w grupie tej było 19 mężczyzn w wieku 54–79 lat ($70,32 \pm 8,18$ roku) oraz 16 kobiet w wieku 60–80 lat ($68,44 \pm 10,34$ roku) (tab. 1); w grupie odniesienia nie wykazano żadnych odchyłeń od stanu prawidłowego (w przeprowadzonych wywiadach, badaniu fizykalnym i podstawowych badaniach laboratoryjnych); osoby te poddały się badaniom dobrowolnie, świadome ich celu;
- grupę badaną stanowiło 26 osób chorych z rogowaceniem słonecznym, 17 kobiet w wieku 61–89 lat ($72,57 \pm 12,03$ roku) i 9 mężczyzn w wieku 67–81 lat

($74,00 \pm 6,51$ roku) (tab. 1); czas trwania choroby u kobiet wynosił 1–12 lat ($4,31 \pm 2,91$ roku), u mężczyzn 1–10 lat ($3,5 \pm 3,39$ roku) (tab. 2.).

Rozpoznanie kliniczne we wszystkich przypadkach potwierdzono badaniem histopatologicznym.

Terapia fotodynamiczna

Grupę badaną poddano terapii fotodynamicznej, w której zastosowano 15-procentowy roztwór kwasu 5- γ -aminolewulinowego (ALA), przygotowany przez Instytut Optoelektroniki WAT w Warszawie. Przed naświetlaniem na ogniska chorobowe stosowano aplikację ALA pod opatrunkiem okluzyjnym na 12 godz. Otoczenie zmian osłaniane było pastą cynkową. Do naświetlania ognisk chorobowych używano lampy halogenowej Philips 6820P z filtrem pomarańczowym o długości fali 590–760 nm (średnio 720 nm). Czas naświetlań wynosił 15–30 min, liczba naświetlań 1–3, a dawka promieniowania przypadająca na jedno naświetlenie 125–182 J/cm².

Chorzy poddani terapii fotodynamicznej (ALA-PDT) zgłaszali się co 10–14 dni na wizyty kontrolne, podczas których określano wskazania do kolejnych naświetlań. U większości pacjentów podczas naświetlania i do 2 dni po naświetlaniu w obrębie ogniska chorobowego i w promieniu do 2 cm występował rumień, obrzęk, pieczenie, a w niektórych przypadkach sączenie treścią surowiczą. Stopniowo ogniska rogowacenia słonecznego ulegały sptaszczeniu, pozostawiając różnie nasilone, ustępujące przebarwienia. U wszystkich chorych poddanych naświetlaniom (ALA-PDT) uzyskano całkowitą remisję (24-miesięczna obserwacja po leczeniu).

Tab. 2. Czas trwania choroby

Grupa badana	Płeć	N	Czas trwania choroby (lata)			
			Min.–maks.	Me	\bar{x}	SD
<i>keratosis actinica</i>	K	17	1–12	4	4,31	2,91
	M	9	1–10	3	3,5	3,39
	Razem	26	1–12	5	4,06	3,11

Tab. 3. Aktywność katepsyny G w nadsączu lizosomalnym (enzym wolny) PMNL krwi obwodowej osób zdrowych i chorych na *keratosis actinica* (w $\mu\text{mol/mg}$ białka/godz.)

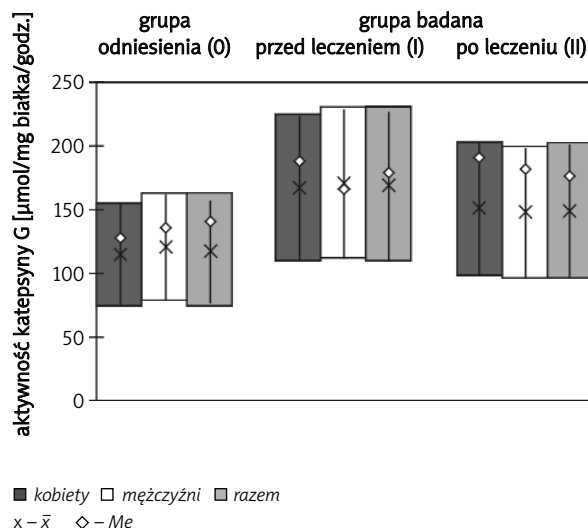
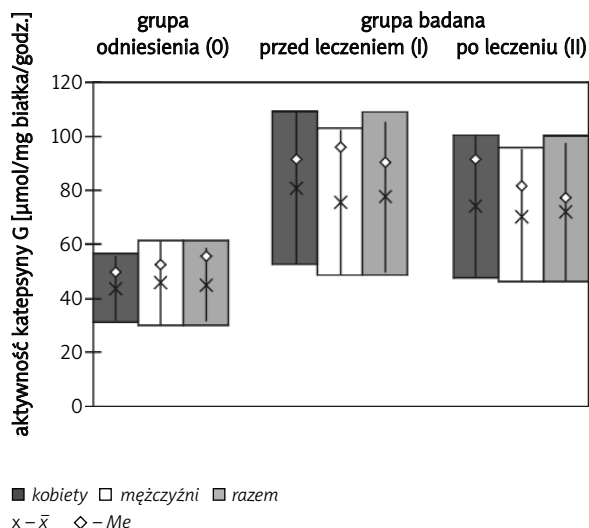
Grupy osobowe		Min.–maks.	Me	\bar{x}	SD
odniesienia (O)	K	30,98–56,52	49,87	43,75	11,77
	M	30,07–61,13	52,35	45,85	15,28
	razem	30,07–61,13	55,60	44,80	13,52
badana przed leczeniem (I)	K	51,85–108,89	91,45	80,77	27,92
	M	48,44–102,88	96,32	75,66	26,22
	razem	48,44–108,89	90,45	77,90	27,18
badana po leczeniu (II)	K	47,38–99,90	91,37	74,06	25,68
	M	45,76–95,50	81,43	70,13	24,37
	razem	45,76–99,90	77,23	72,08	25,01

Tab. 3a. Aktywność katepsyny G (enzym związany) w lizosomach PMNL krwi obwodowej osób zdrowych i chorych na *keratosis actinica* (w $\mu\text{mol/mg}$ białka/godz.)

Grupy osobowe		Min.–maks.	Me	\bar{x}	SD
odniesienia (O)	K	74,31–154,61	127,80	114,46	39,15
	M	78,24–162,46	135,50	120,35	41,11
	razem	74,31–162,46	140,21	117,61	40,35
badana przed leczeniem (I)	K	108,97–223,93	188,40	166,45	56,48
	M	111,76–229,52	165,45	170,64	57,88
	razem	108,97–229,52	178,80	168,80	57,28
badana po leczeniu (II)	K	98,30–201,60	190,65	150,45	51,15
	M	96,54–199,06	181,30	147,80	50,26
	razem	96,54–201,60	175,45	148,90	50,91

Tab. 3b. Analiza statystyczna wyników. Test t-Studenta dla prób niezależnych (t) oraz zależnych (T)

Porównywane grupy	KATEPSYNA G enzym wolny, nadsącz lizosomalny		KATEPSYNA G enzym związany, lizosomy		
	wartość testu	poziom znamienności różnic	wartość testu	poziom znamienności różnic	
0 – K vs M	t=-1,34	p>0,05	t=-2,18	p>0,05	
I – K vs M	t=1,99	p>0,05	t=-2,01	p>0,05	
II – K vs M	t=1,65	p>0,05	t=1,48	p>0,05	
0 vs I	K	t=-4,99	p<0,001	t=-4,72	p<0,01
	M	t=-4,80	p<0,001	t=-5,13	p<0,001
	razem	t=-4,69	p<0,01	t=-5,43	p<0,001
0 vs II	K	t=-4,01	p<0,01	t=-3,45	p<0,05
	M	t=-4,06	p<0,01	t=-3,01	p<0,05
	razem	t=-4,13	p<0,01	t=-3,19	p<0,05
I vs II	K	t=2,18	p>0,05	t=3,02	p<0,05
	M	t=2,31	p>0,05	t=3,55	p<0,05
	razem	t=2,19	p>0,05	t=3,48	p<0,05



Ryc. 1. Aktywność katepsyny G w nadsączu lizosomalnym (enzym wolny) wielojądrczystych granulocytów obojętnochłonnych (PMNL) krwi obwodowej osób zdrowych i chorych na *keratosis actinica* (w µmol/mg białka/godz.)

Ryc. 1a. Aktywność katepsyny G w lizosomach (enzym związany) wielojądrczystych granulocytów obojętnochłonnych (PMNL) krwi obwodowej osób zdrowych i chorych na *keratosis actinica* (w µmol/mg białka/godz.)

Izolowanie PMNL i oznaczanie enzymów lizosomalnych

Krew do badań pobierano na czczo, w warunkach jałowych, z żyły zgięcia łokciowego w ilości 20 ml. Neutrofile izolowano wg metody Farrantego i Thonga w modyfikacji Zemana i wsp. [25]. Do izolacji użyto Gradisolu G.

Następnie metodą kolorymetryczną, używając estru aminokwasowego-2-naftolu jako substratu, oznaczano aktywność katepsyny G [26] i katepsyn tiolowych [26] (w µmol/mg białka/godz.) w lizosomach i nadsączu lizosomalnym wielojądrczystych granulocytów obojętnochłonnych krwi obwodowej osób zdrowych i chorych z *keratosis actinica*.

Badania w grupie odniesienia (osób zdrowych) przeprowadzono jednorazowo, natomiast w grupie badanej (osób chorych) 2-krotnie, tj. przed rozpoczęciem leczenia i po 2. cyklu leczenia metodą ALA-PDT.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej, wykorzystując test t-Studenta do prób niezależnych (t) oraz zależnych (T).

Wyniki badań

W badaniach aktywność katepsyny G (enzym wolny) w nadsączu lizosomalnym wielojądrczystych granulocytów obojętnochłonnych krwi obwodowej w grupie badanej (*keratosis actinica*) przed leczeniem w porównaniu z grupą odniesienia, u kobiet i mężczyzn oddzielnie, a także w całej grupie osobowej była statystycznie wyższa (odpowiednio $p < 0,001$; $p < 0,01$) (tab. 3. i 3b., ryc. 1).

Aktywność katepsyny G (enzym wolny) w nadsączu lizosomalnym wielojądrczystych granulocytów obojętnochłon-

nych krwi obwodowej w grupie badanej (*keratosis actinica*) po leczeniu, w porównaniu z grupą odniesienia u kobiet i mężczyzn oddzielnie, a także w całej grupie była statystycznie znamienna wyższa ($p < 0,01$) (tab. 3. i 3b., ryc. 1).

Aktywność katepsyny G (enzym wolny) w nadsączu lizosomalnym wielojądrczystych granulocytów obojętnochłonnych krwi obwodowej w grupie badanej (*keratosis actinica*) przed leczeniem w porównaniu z jej aktywnością po leczeniu była wyższa, jednak różnica ta nie była znamienna statystycznie ($p > 0,05$) (tab. 3. i 3b., ryc. 1).

Aktywność katepsyny G (enzym związany) w lizosomach wielojądrczystych granulocytów obojętnochłonnych krwi obwodowej w grupie badanej (*keratosis actinica*) przed leczeniem w porównaniu z grupą odniesienia u kobiet była znamienne statystycznie wyższa ($p < 0,01$), także u mężczyzn i w całej grupie badanej ($p < 0,001$) (tab. 3a. i 3b., ryc. 1a).

Aktywność katepsyny G (enzym związany) w lizosomach wielojądrczystych granulocytów obojętnochłonnych krwi obwodowej w grupie badanej (*keratosis actinica*) po leczeniu, w porównaniu z grupą odniesienia u kobiet i mężczyzn oddzielnie, a także w całej grupie była znamienne statystycznie wyższa ($p < 0,05$) (tab. 3a. i 3b., ryc. 1a).

Aktywność katepsyny G (enzym związany) w lizosomach wielojądrczystych granulocytów krwi obwodowej w grupie badanej (*keratosis actinica*) przed leczeniem w porównaniu z aktywnością po leczeniu była znamienne statystycznie wyższa ($p < 0,05$) (tab. 3a. i 3b., ryc. 1a).

Aktywność katepsyn tiolowych (enzymy wolne i związane) w nadsączu lizosomalnym i lizosomach wielojądrczystych granulocytów obojętnochłonnych krwi obwodowej w grupie badanej (*keratosis actinica*) zarówno przed lecze-

Tab. 4. Aktywność katepsyn tiolowych w nadsączu lizosomalnym (enzymy wolne) PMNL krwi obwodowej osób zdrowych i chorych na *keratosis actinica* (w $\mu\text{g}/\text{mg}$ białka/godz.)

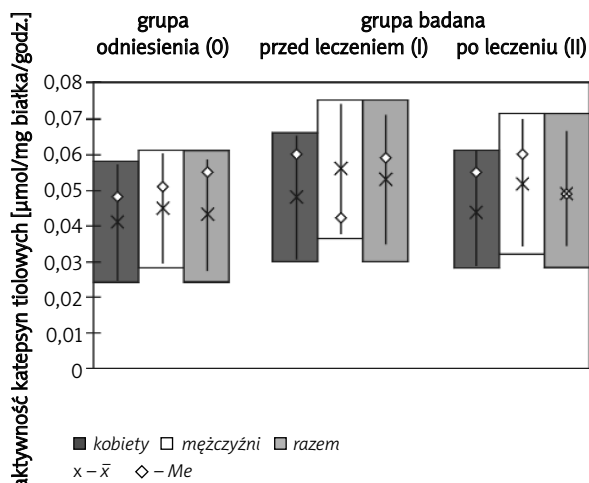
Grupy osobowe		Min.–maks.	Me	\bar{x}	SD
odniesienia (O)	K	0,024–0,058	0,048	0,041	0,016
	M	0,028–0,061	0,051	0,045	0,015
	razem	0,024–0,061	0,055	0,043	0,015
badana przed leczeniem (I)	K	0,030–0,066	0,060	0,048	0,017
	M	0,036–0,075	0,042	0,056	0,018
	razem	0,030–0,075	0,059	0,053	0,018
badana po leczeniu (II)	K	0,028–0,061	0,055	0,044	0,015
	M	0,032–0,072	0,060	0,052	0,018
	razem	0,028–0,072	0,049	0,049	0,017

Tab. 4a. Aktywność katepsyn tiolowych w lizosomach (enzymy związane) PMNL krwi obwodowej osób zdrowych i chorych na *keratosis actinica* (w $\mu\text{g}/\text{mg}$ białka/godz.)

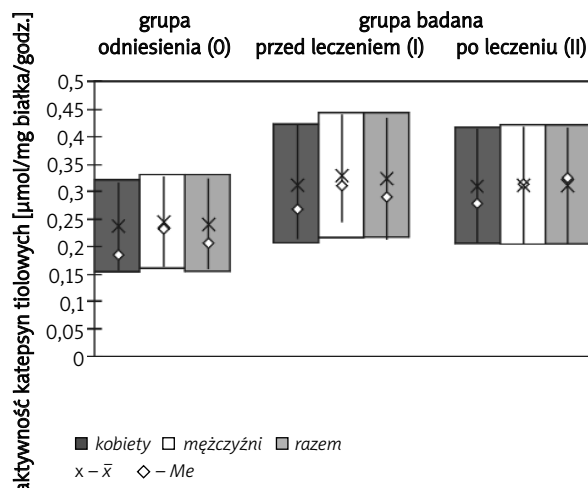
Grupy osobowe		Min.–maks.	Me	\bar{x}	SD
odniesienia (O)	K	0,154–0,320	0,185	0,236	0,080
	M	0,160–0,331	0,234	0,244	0,082
	razem	0,154–0,331	0,207	0,241	0,081
badana przed leczeniem (I)	K	0,206–0,423	0,266	0,314	0,106
	M	0,216–0,442	0,312	0,329	0,111
	razem	0,216–0,442	0,288	0,323	0,109
badana po leczeniu (II)	K	0,204–0,416	0,278	0,310	0,104
	M	0,203–0,419	0,314	0,312	0,106
	razem	0,203–0,419	0,327	0,311	0,105

Tab. 4b. Analiza statystyczna wyników. Test t-Studenta dla prób niezależnych (t) oraz zależnych (T)

Porównywane grupy	KATEPSYNY TIOLOWE enzymy wolne, nadsącz lizosomalny		KATEPSYNY TIOLOWE enzymy związane, lizosomy		
	wartość testu	poziom znamierności różnic	wartość testu	poziom znamierności różnic	
0 – K vs M	t=-0,75	p>0,05	t=-0,93	p>0,05	
I – K vs M	t=-0,99	p>0,05	t=-0,88	p>0,05	
II – K vs M	t=-0,88	p>0,05	t=-0,25	p>0,05	
0 vs I	K	t=-1,44	p>0,05	t=-2,04	p>0,05
	M	t=-1,52	p>0,05	t=-1,96	p>0,05
	razem	t=-1,56	p>0,05	t=-2,17	p>0,05
0 vs II	K	t=-0,69	p>0,05	t=-1,89	p>0,05
	M	t=-0,88	p>0,05	t=-1,94	p>0,05
	razem	t=-0,75	p>0,05	t=-1,97	p>0,05
I vs II	K	t=1,01	p>0,05	t=1,08	p>0,05
	M	t=0,93	p>0,05	t=1,23	p>0,05
	razem	t=1,18	p>0,05	t=1,35	p>0,05



Ryc. 2. Aktywność katepsyn tiolowych w nadsączu lizosomalnym (enzymy wolne) wielojądrazastych granulocytów obojętnochłonnych (PMNL) krwi obwodowej osób zdrowych i chorych na *keratosis actinica* (w $\mu\text{g}/\text{mg}$ białka/godz.)



Ryc. 2a. Aktywność katepsyn tiolowych w lizosomach (enzymy związane) wielojądrazastych granulocytów obojętnochłonnych (PMNL) krwi obwodowej osób zdrowych i chorych na *keratosis actinica* (w $\mu\text{g}/\text{mg}$ białka/godz.)

niem, jak i po, w porównaniu z grupą odniesienia u kobiet i mężczyzn oddzielnie, a także w całej grupie osobowej była wyższa, jednakże różnicy znamiennej statystycznie nie wykazano ($p > 0,05$) (tab. 4., 4a., 4b., ryc. 2., 2a.).

Aktywność katepsyn tiolowych (enzym wolny i związany) w grupie badanej (*keratosis actinica*) przed leczeniem, w porównaniu z aktywnością po leczeniu była również wyższa, jednakże różnic znamienych statystycznie nie wykazano ($p > 0,05$) (tab. 4., 4a., 4b., ryc. 2., 2a.).

Omówienie wyników

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono badań dotyczących aktywności enzymów lizosomalnych wielojądrazastych granulocytów obojętnochłonnych u chorych ze stanami przednowotworowymi skóry, leczonych metodą fotodynamiczną. Również doniesienia nt. aktywności enzymatycznej PMNL w przebiegu różnych chorób skóry i ich leczenia tą metodą należą do nielicznych.

W badaniach prowadzonych przez Ruszczaka i wsp., u osób z uogólnionymi postaciami łuszczycy pospolitej wykazano zmniejszoną aktywność katepsyny G i normalizację jej poziomu po leczeniu za pomocą naświetlań metodą PUVA (psoraleny i promieniowanie UVA) [27].

Oceniano również aktywność katepsyny G w atopowym zapaleniu skóry zarówno przed, jak i po naświetlaniach UVA. W badaniach wykazano, że zmniejszenie aktywności tej proteazy występuje po naświetlaniu średnimi dawkami UVA i towarzyszy poprawie stanu miejscowego [28].

Wykazanie w badaniach własnych znamiennej wyższej aktywności katepsyny G w PMNL krwi obwodowej u chorych z *keratosis actinica* w porównaniu z niezacz-

nie podwyższoną aktywnością katepsyn tiolowych może świadczyć o udziale tego enzymu w procesach fotostarzenia skóry i rozwoju nowotworów.

Jednocześnie zaobserwowano korzystny wpływ naświetlań metodą ALA-PDT ognisk rogowacenia słonecznego na normalizację aktywności katepsyny G (spadek aktywności) i katepsyn tiolowych, mimo że aktywność tych enzymów pozostawała po leczeniu nadal na stosunkowo wysokim poziomie.

Opisywano niską aktywność katepsyny G w płynie wysiękowym w przewlekłe utrzymujących się owrzodzeniach i wysoki jej poziom w płynie pochodzącym ze świeżo powstałych ran [29].

Herrmann i wsp. wykazali wprost proporcjonalną zależność między aktywnością katepsyny G a poziomem fibrynogenu u chorych z zawałem mięśnia sercowego czy udarem mózgu [30].

Woźniak i wsp. oceniali aktywność arylosulfatazy, katepsyny D i fosfatazy kwaśnej w potwierdzonych histopatologicznie rakach płaskonabłonkowych płuc. Autorzy ci uznali, iż wyniki badań dowodzą, że zwiększona aktywność enzymów lizosomalnych może być przydatna w diagnostyce i monitorowaniu tych nowotworów [31].

Tappel przedstawił hipotezę, że wydzielane w przewodach mlecznych gruczołu piersiowego na drodze egzocytozy enzymy lizosomalne wpływają na rozwój raka piersi. Na uaktywnienie enzymów lizosomalnych oddziałują czynniki ryzyka rozwoju raka sutka, takie jak estrogeny, promieniowanie ultrafioletowe, skażenie środowiska czy dieta. Ocena aktywności enzymów lizosomalnych w nowotworach piersi może być wykorzystywana do badań przesiewowych [32]. Ten sam autor zaobserwował udział enzymów

lizosomalnych w inicjowaniu raka gruczołu krokowego i możliwości wykorzystania tych enzymów w podobnych badaniach [33].

Liaudet-Coopman i wsp. wskazują na udział katepsyny D w procesie angiogenezy, stymulacji proliferacji komórek nowotworowych i hamowaniu ich apoptozy. Katepsyna D pełni funkcję mediatora w indukowanej apoptozie, a jej aktywność proteolityczna wyzwalana jest w tym mechanizmie. W nowotworach piersi jest markerem źle prognozującym, ściśle związanym z rozprzestrzenianiem się przerzutów [34].

Badania własne wskazują na udział katepsyn, a w szczególności katepsyny G, w procesach prowadzących do rozwoju stanów przednowotworowych i nowotworów skóry i możliwość wykorzystania oznaczeń ww. enzymów do monitorowania rozwoju tych procesów i korzystnych wyników leczenia.

Levicar i wsp. opisują zwiększone wydzielanie katepsyn B, D i L w guzach ośrodkowego układu nerwowego, dotychczas najlepiej zbadane w oponiakach i gwiaździakach [35].

Altorjay i wsp. zwracają uwagę na wzrost aktywności katepsyny B, α -mannozydazy i dipeptydylopeptydazy u chorych z gruczolakorakami połączenia przełykowo-żółtkowego w porównaniu z aktywnością tych enzymów u osób zdrowych. Autorzy wykazują statystyczną korelację między aktywnością ww. enzymów a stopniem zróżnicowania nowotworu i stopniem zajęcia węzłów chłonnych. Opisują niższą ich aktywność w guzach wężej zróżnicowanych, bez przerzutów i u tych chorych, którzy przeżyli 2 i więcej lat po interwencji chirurgicznej [36].

Wyniki badań własnych potwierdzają rolę wielojądrowych granulocytów obojętnochłonnych w patogenezie najczęstszego stanu przednowotworowego skóry, jakim jest rógowacenie słoneczne. Ocena aktywności enzymatycznej PMNL w przebiegu leczenia metodą fotodynamiczną z wykorzystaniem kwasu aminolewulinowego może służyć monitorowaniu terapii i kontroli możliwego nawrotu (wznowy) procesu chorobowego.

Praca finansowana przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi w ramach działalności statutowej Nr 503-5064-1.

Piśmiennictwo

1. Polak-Pacholczyk I, Kaszuba A. Terapia fotodynamiczna stanów przednowotworowych i nieczerniakowych nowotworów skóry. W: Choroby i nowotwory skóry wywołane promieniowaniem ultrafioletowym. Kaszuba A, Zieliński KW (red.). Wyd. Adi, Łódź 2004; 91-101.
2. Majewski S. Starzenie się skóry. Choroby i nowotwory skóry wywołane promieniowaniem ultrafioletowym. W: Choroby i nowotwory skóry wywołane promieniowaniem ultrafioletowym. Kaszuba A, Zieliński KW (red.), Wyd. Adi, Łódź 2004; 21-8.
3. Zeman K. Współczesne poglądy na rolę granulocytów obojętnochłonnych (neutrofilów) w procesach zapalnych. *Immunol Pol* 1993; 18: 3-21.
4. Osiecka BJ, Ziółkowski P, Woźniak Z i wsp. Miejscowe zastosowanie kwasu aminolewulinowego w leczeniu nowotworów złośliwych skóry. *Acta Bio-Opt Inform Med* 2001; 7: 73-7.
5. Collins P, Robinson DJ, Stringer MR, et al. The variable response of plaque psoriasis after a single treatment with topical 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. *Br J Dermatol* 1997; 137: 743-9.
6. Jeffes EW, McCullough JL, Weinstein GD, et al. Photodynamic therapy of actinic keratosis with topical 5-aminolevulinic acid. *Arch Dermatol* 1997; 133: 727-32.
7. Fink-Puches R, Wolf P, Kerl H. Photodynamic therapy of superficial basal cell carcinoma by instillation of aminolevulinic acid and irradiation with visible light. *Arch Dermatol* 1997; 133: 1494-5.
8. Stables GI. Photodynamic therapy in dermatology. *J Dermatol Treat* 1999; 10: 213-9.
9. Ziółkowski P, Milach J. Porfiryne jako fotouczulacze – ich zastosowanie w leczeniu i rozpoznawaniu nowotworów. *Mag Med* 1992; 2-3: 11-3.
10. Agarwal R, Korman NJ, Mohan RR, et al. Apoptosis is an early event during phthalocyanine photodynamic therapy induced ablation of chemically induced squamous papillomas in mouse skin. *Photochem Photobiol* 1996; 63: 547-52.
11. Spicer MS, Goldberg DJ. Lasery w dermatologii. Program samokształcenia. *J Am Acad Dermatol* 1997; test 10: 110-25.
12. Kurwa HA, Yong-Gee SA, Markey AC, et al. A comparison of photodynamic therapy with topical 5-fluorouracil in the treatment of actinic keratoses. *Br J Dermatol* 1998; 139: 74.
13. Kawczyk-Krupka A, Wiczkowski A, Adamek M, Sieroń A. Terapia fotodynamiczna i jej znaczenie immunomodulujące w leczeniu chorób skóry i leukoplakii jamy ustnej. *Acta Bio-Opt Inform Med* 2001; 7: 67-72.
14. Cochito M, Campos Lopes JM, Leite L. Topical photodynamic therapy in a case of Bowen's disease of the face. *Skin Cancer* 1996; 11: 215-8.
15. Ibbotson SH. Topical 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy for the treatment of skin conditions other than non-melanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 2002; 146: 178-88.
16. Hürlimann AF, Hänggi G, Panizzon RG. Photodynamic therapy of superficial basal cell carcinomas using topical 5-aminolevulinic acid in a nanocolloid lotion. *Dermatology* 1998; 197: 248-54.
17. Stables GI, Stringer MR, Robinson DJ, Ash DV. Large patches of Bowen's disease treated by topical aminolevulinic acid photodynamic therapy. *Br J Dermatol* 1997; 136: 957-60.
18. Wolf P, Fink-Puches R, Ceroni L, Kerl H. Photodynamic therapy for mycosis fungoides after topical photosensitization with 5-aminolevulinic acid. *J Am Acad Dermatol* 1994; 31: 678-80.
19. Meffert H, Gaunitz K, Gutewort T, Amlong UJ. Therapy of acne with visible light decreased irradiation time by using a blue-light high energy lamp. *Dermatol Monatsschr* 1990; 176: 597-603.
20. Grossman M, Wimberly J, Dwyer P. PDT for hirsutism. *Lasers Surg Med* 1995; 57: 44.
21. Stender IM, Wulf HC. Photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid in the treatment of actinic cheilitis. *Br J Dermatol* 1996; 135: 454-6.
22. Dierickx CC, Goldenhersh M, Dwyer P, et al. Photodynamic therapy for nevus sebaceus with topical delta-aminolevulinic acid. *Arch Dermatol* 1999; 135: 637-40.
23. Collins P, Robinson DJ, Stringer MR, et al. The variable response of plaque psoriasis after a single treatment with topical 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. *Br J Dermatol* 1997; 137: 743-9.
24. Robak T. Leczenie fotodynamiczne nowotworów. *Pol Tyg Lek* 1992; 47: 24-26, 558-61.
25. Zeman K, Tchórzewski H, Majewska E i wsp. Prosta i szybka metoda równoczesnej izolacji z krwi obwodowej wysoce

- oczyszczonych limfocytów i granulocytów obojętnochłonnych. *Immunol Pol* 1988; 23: 217-24.
26. Barret AI. *Lysosomes a Laboratory Handbook*. Dingle IT (ed.). North-Holand, Amsterdam 1972; 46-135.
27. Ruszczak Z, Czarnecki M, Bienias L. Photochemotherapie und activität lysosomaler enzyme in Blutserum bei psoriasiskranken. *Dermatol Monatsschr* 1984; 170: 573.
28. Brecukman F, von Kobyletzki G, Avermaete A, et al. Modulation of cathepsin G expression in severe atopic dermatitis following medium dose UVA 1 phototherapy. *BMC Dermatol* 2002; 2: 1-5.
29. Weckroth M, Vaheri A, Lauharanta J, et al. Matrix metalloproteinases, gelatinase and collagenase, in chronic leg ulcers. *J Invest Dermatol* 1996; 106: 1119-24.
30. Herrmann SM, Funke-Kaiser H, Schmidt-Petersen K, et al. Characterization of polymorphic structure of cathepsin G gene: role in cardiovascular and cerebrovascular diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1538-43.
31. Woźniak A, Drewa T, Rozwodowska M, et al. Activity of some lysosomal enzymes in serum and in tumors of patients with squamous cell lung carcinoma. *Neoplasma* 2002; 49: 10-5.
32. Tappel A. Lysosomal enzymes and initiation of breast cancer. *Med Hypotheses* 2005; 64: 288-9.
33. Tappel A. Lysosomal and prostatesomal hydrolytic enzymes and redox processes and initiation of prostate cancer. *Med Hypotheses* 2005; 64: 1170-2.
34. Liaudet-Coopman E, Beaujouin M, Derocq D, et al. Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis. *Cancer Lett* 2006; 237: 167-79.
35. Levicar N, Strojnik T, Kos J, et al. Lysosomal enzymes, cathepsin in brain tumour invasion. *J Neurooncol* 2002; 58: 21-32.
36. Altorjay A, Paal B, Sohar N, et al. Significance and prognostic value of lysosomal enzyme activities measured in surgically operated adenocarcinomas of the gastroesophageal junction and squamous cell carcinomas of the lower third of esophagus. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5751-6.