

Inleiding

Fotodetectie en fotodynamische therapie worden ontwikkeld om kanker en voorlopers van kanker op te kunnen sporen (detectie) of te behandelen (therapie). Bij fotodetectie en fotodynamische therapie wordt gebruik gemaakt van stoffen die door licht geactiveerd kunnen worden, de zogenaamde fotosensitizers. Zo'n fotosensitizer kan met een injectie of een zalf toegediend worden, hetgeen het geval is bij porfyrinederivaten. Ook kan de fotosensitizer in het lichaam geproduceerd worden na toediening van een geschikte bouwsteen: zo zorgt aminolevulinezuur er voor dat het lichaam de fotosensitizer protoporfyrine IX produceert.

De ideale fotosensitizer hoopt zich selectief op in (pre)maligne weefsel (tumoren en voorlopers van tumoren). Na blootstelling aan licht met de juiste golflengte, fluoresceert de fotosensitizer en gaat een reactie aan met celbestanddelen en/of produceert reactieve zuurstofvormen. Deze reactie met celbestanddelen en de reactieve zuurstofvormen zijn verantwoordelijk voor het fotodynamische effect. Hierdoor gaat de cel dood en verdwijnt het (pre)maligne weefsel. De fluorescentie-eigenschappen kunnen gebruikt worden voor diagnose van (pre)maligne weefsel dat niet voor het blote oog zichtbaar is.

Een belangrijk nadeel van fotodetectie met fotosensitizers is dat de fotodynamische eigenschappen van de porfyrinederivaten en protoporfyrine IX kunnen leiden tot ongewenste bijwerkingen zoals langdurige lichtovergevoeligheid van de huid, en erytheem. Deze bijwerkingen kunnen te sterk zijn om deze stoffen enkel voor diagnostische doeleinden te gebruiken.

Er zijn een aantal belangrijke beperkingen van fotodynamische therapie met aminolevulinezuur. De productie van protoporfyrine IX in de (pre)maligne weefsels is niet hoog genoeg en de protoporfyrine IX productie vindt niet diep genoeg in de tumoren plaats.

Het proefschrift

Na een algemene inleiding in hoofdstuk 1, beschrijft hoofdstuk 2 de principes en het werkingsmechanisme van fotodynamische therapie met aminolevulinezuur. Ook wordt in dat hoofdstuk een overzicht gegeven van behandelingen van (kwaadaardige) huid-aandoeningen met deze therapie. Daarnaast wordt beschreven hoe bepaalde nadelen van aminolevulinezuur de therapie beperken en welke methoden er onderzocht en/of toegepast worden om de therapie te verbeteren.

De hoofdstukken 3 t/m 9 behandelen een aantal mogelijke oplossingen voor de nadelen en beperkingen van porfyrine-achtige stoffen en protoporfyrine IX bij fotodetectie en fotodynamische therapie. De experimenten en resultaten uit deze hoofdstukken zijn per onderwerp samengevat op de volgende pagina's.

Tumorlokalisatie en -ophoping van carotenoporfyrines

Carotenoporfyrines zijn een nieuw soort fotosensitizers voor de fotodetectie van (pre)-maligne afwijkingen. De carotenoporfyrines hebben dezelfde fluorescentie-eigenschappen als andere porfyrines, maar ze veroorzaken geen schade omdat ze niet reageren met zuurstof en/of celbestanddelen. Uit eerdere studies bij muizen met getransplanteerde tumoren bleek dat de carotenoporfyrines goed lokaliseren in deze tumoren en zich daar ook ophopen. In hoofdstuk 3 wordt de kinetiek en tumorlokalisatie van een nieuwe carotenoporfyrine (hexamethoxy-carotenoporfyrine) onderzocht in muizen met vroege huidkanker (ontstaan door chronische blootstelling aan UVB straling), en in ratten met afwijkingen in het gehemelte (chemisch opgewekt). Deze diervormen met zogeheten primaire tumoren zijn in deze studie gebruikt, omdat ze realistischer zijn dan het diervorm met een getransplanteerde tumor. Uit metingen van het fluorescentiesignaal van de carotenoporfyrine op de huid en het gehemelte blijkt dat deze nieuwe carotenoporfyrine inderdaad lokaliseert en zich ophoopt in de huidtumoren en in het afwijkende gedeelte van het gehemelte. Fluorescentiemicroscopiebeelden laten echter zien dat de carotenoporfyrine zich niet ophoopt in het echte (pre)maligne gebied van de huidtumoren en het gehemelte, maar op andere plaatsen in deze afwijkingen die niet gerelateerd zijn aan het (pre)maligne gebied.

Gebruik van aminolevulinezuur esters voor fotodetectie en fotodynamische therapie in de huid

Een mogelijke oorzaak voor het feit dat in de tumoren de productie van protoporfyrine IX uit aminolevulinezuur niet hoog genoeg is en niet in het diepere gedeelte van de tumor plaats vindt, is dat aminolevulinezuur niet diep genoeg de huid in penetreert. Aminolevulinezuur esters zijn ontwikkeld als mogelijke oplossing voor dit probleem. Zij zijn afgeleid van aminolevulinezuur en door hun structuur zouden zij beter de huid in kunnen penetreren en daarmee zorgen voor een protoporfyrine IX productie die hoger si en dieper in de tumor plaatsvindt. Vele studies hebben al laten zien dat een aantal aminolevulinezuur esters succesvol kunnen zijn in het verhogen van de protoporfyrine IX productie in gekweekte cellen.

Voor de experimenten in dit proefschrift is gebruik gemaakt van zogenaamde haarloze en naakte muizen. Deze muizen hebben nauwelijks tot geen haar groeien op hun huid, waardoor hun huid lijkt op die van een mens.

Protoporfyrine IX productie in normale huid

Uit resultaten in hoofdstuk 4 blijkt dat in het geval dat aminolevulinezuur pentyl ester gedurende 30 minuten aangebracht geweest is, de productie van protoporfyrine IX in normale huid van haarloze muizen ongeveer hetzelfde is als in het geval van

aminolevulinezuur. De resultaten in hoofdstuk 5 laten zien dat ook aminolevulinezuur hexyl ester de protoporfyrine IX productie in normale naakte muizenhuid niet of nauwelijks verhoogt ten opzichte van aminolevulinezuur. Verschillende omstandigheden waaronder aminolevulinezuur en aminolevulinezuur hexyl ester aangebracht kunnen worden zijn onderzocht, namelijk variatie in de tijd van aanbrengen, verschillende concentraties, de toevoeging van een stof die penetratie door de hoornlaag (buitenste laagje van de huid) bevordert, en de invloed van het verwijderen van de hoornlaag met plakband voorafgaand aan het aanbrengen van aminolevulinezuur hexyl ester en aminolevulinezuur. Alleen wanneer aminolevulinezuur hexyl ester en aminolevulinezuur gedurende 24 uur aangebracht zijn, zorgt de aminolevulinezuur hexyl ester voor een iets hogere protoporfyrine IX productie dan aminolevulinezuur. Wanneer ze korter aangebracht worden, dan is de protoporfyrine IX productie bij aminolevulinezuur esters lager dan bij aminolevulinezuur. Uit de experimenten met de penetratiebevorderaar en de huid met verwijderde hoornlaag blijkt dat de hoornlaag een belangrijke barrière vormt voor aminolevulinezuur en aminolevulinezuur hexyl ester. De protoporfyrine IX productie is (sterk) verhoogd in het geval dat de penetratiebevorderaar is toegevoegd of de hoornlaag verwijderd was. Ondanks de toevoeging van de penetratiebevorderaar is de protoporfyrine IX productie bij aminolevulinezuur hexyl ester lager dan bij aminolevulinezuur. In de huid zonder hoornlaag is de protoporfyrine IX productie bij aminolevulinezuur en aminolevulinezuur hexyl ester gelijk. In het geval van aminolevulinezuur hexyl ester is het verschil in protoporfyrine IX productie tussen de huid zonder hoornlaag en de gewone huid dus groter dan in het geval van aminolevulinezuur. Dit geeft aan dat aminolevulinezuur hexyl ester langzamer dan aminolevulinezuur door de hoornlaag de huid ingaat.

Het feit dat aminolevulinezuur hexyl ester langzamer de huid ingaat komt overeen met resultaten uit eerdere studies. In die studies werd gevonden dat als aminolevulinezuur lange tijd op een klein stukje huid van een muis aangebracht is, er ook protoporfyrine IX geproduceerd wordt in organen en huid buiten het gebied waar aminolevulinezuur aangebracht is. Deze bevinding geeft aan dat aminolevulinezuur door de hoornlaag en de rest van huid heen opgenomen wordt in de bloedbaan en vervolgens er voor zorgt dat er protoporfyrine IX geproduceerd wordt in andere organen en huid buiten het gebied waar aminolevulinezuur aangebracht is. In het geval van aminolevulinezuur esters vindt er geen protoporfyrine IX productie plaats buiten het stukje huid waar ze aangebracht zijn. Dit duidt aan dat aminolevulinezuur esters niet of in veel mindere mate door de huid heen gaan en dus waarschijnlijk ook in veel mindere mate door de hoornlaag heen gaan. Hoofdstuk 6 gaat dieper in op het fenomeen van protoporfyrine IX productie buiten het stukje huid waar aminolevulinezuur aangebracht wordt. In dit hoofdstuk is onderzocht of de protoporfyrine IX productie buiten het toedieningsgebied van aminolevulinezuur afhangt van de concentratie van het aminolevulinezuur, de duur van de toedieningstijd, de aanwezigheid van een penetratiebevorderaar, de

aanwezigheid van de hoornlaag, of het gebruik van een aminolevulinezuur ester. Protoporfyrine IX fluorescentie buiten het stukje huid waar aminolevulinezuur aangebracht is treedt alleen op wanneer het 24 uur lang aangebracht wordt (de hoeveelheid protoporfyrine IX is afhankelijk van de concentratie van het aminolevulinezuur) of nadat het aangebracht is op huid zonder hoornlaag. Deze resultaten bevestigen dat er protoporfyrine IX productie buiten het toedieningsgebied van aminolevulinezuur plaatsvindt, maar alleen tijdens of na specifieke omstandigheden waaronder aminolevulinezuur aangebracht wordt. Dit effect speelt derhalve niet of nauwelijks een rol in klinische situaties, waar de toediening van aminolevulinezuur relatief kort is, en mogelijk een penetratiebevorderaar toegevoegd is of een aminolevulinezuur ester gebruikt wordt.

Protoporfyrine IX productie in (pre)maligne huid

De bevinding dat aminolevulinezuur esters niet substantieel de protoporfyrine IX productie verhogen in normale huid, betekent niet per se dat de aminolevulinezuur esters geen geschikte stoffen zouden zijn voor fotodynamische therapie. Dit blijkt uit experimenten in hoofdstuk 4, waarbij gebruik gemaakt is van haarloze muizen met normale, gezonde huid en van haarloze muizen waarvan de huid chronisch blootgesteld geweest is aan UVB straling. Door de chronische blootstelling aan UVB straling (ook aanwezig in zonlicht) zijn er op de huid van deze muizen (pre)maligne afwijkingen ontstaan. De huid rondom de zichtbare afwijkingen ziet er normaal uit, maar is toch al afwijkend van, en dikker dan gezonde huid die niet chronisch blootgesteld is aan UVB straling. In normale haarloze muizenhuid waarop aminolevulinezuur pentyl ester aangebracht geweest is, zijn de protoporfyrine IX hoeveelheden ongeveer even groot als huid waarop aminolevulinezuur aangebracht geweest is. In de kleine (pre)maligne afwijkingen op de huid van de muizen die chronische blootgesteld geweest waren aan UVB straling, wordt na verloop van tijd meer protoporfyrine IX gemeten wanneer aminolevulinezuur pentyl ester aangebracht geweest is dan wanneer aminolevulinezuur aangebracht geweest is. In de huid rondom de zichtbare afwijkingen wordt meer protoporfyrine IX geproduceerd wanneer aminolevulinezuur pentyl ester aangebracht geweest is dan wanneer aminolevulinezuur aangebracht geweest is. Deze verschillen tussen aminolevulinezuur en aminolevulinezuur pentyl ester resulteren in een hogere ratio van protoporfyrine IX fluorescentie tussen (pre)maligne weefsel en normale huid voor aminolevulinezuur pentyl ester dan voor aminolevulinezuur. Dit zou betekenen dat fotodynamische therapie mogelijk selectiever zou zijn met een aminolevulinezuur ester dan met aminolevulinezuur. Echter, de fluorescentiemicroscopiebeelden tonen aan dat de hogere protoporfyrine IX hoeveelheden voor aminolevulinezuur pentyl ester zich bevinden in de hoornlaag van de afwijkingen en de daaromheen gelegen afwijkende huid en dat is niet het gedeelte van de huid wat door fotodynamische therapie behandeld wordt.

Uit de fluorescentiemicroscopiebeelden kan ook nog het volgende afgeleid worden. De hoeveelheden protoporfyrine IX in het (pre)maligne weefsel zijn hoger dan in de normale huid (bij aminolevulinezuur en aminolevulinezuur pentyl ester). Deze verschillen zijn echter niet zo groot als op basis van de metingen van het protoporfyrine IX fluorescentiesignaal aan de levende muizen verwacht werd. Dit kan verklaard worden door het feit dat (pre)maligne huid dikker is dan normale huid. Juist in het verdikte gedeelte bevindt zich het grootste deel van de hoeveelheid protoporfyrine IX. Dit betekent dat bij levende muizen de dikte van de huid ook bijdraagt aan de hoogte van het fluorescentiesignaal van protoporfyrine IX.

Penetratie van aminolevulinezuur en aminolevulinezuur esters door huid

Penetratie door normale huid

De resultaten van hoofdstuk 4 en 5 lieten zien dat de protoporfyrine IX productie in de huid met gebruik van aminolevulinezuur esters niet zo hoog was als verwacht werd op basis van eerdere studies met gekweekte cellen. In hoofdstuk 7 is onderzocht op geïsoleerde stukjes muizenhuid of de oorzaak zou kunnen liggen in onbekende verschillen in de huidpenetratie-eigenschappen van aminolevulinezuur en aminolevulinezuur esters. De resultaten geven inderdaad aan dat de penetratie (door de geïsoleerde stukjes huid heen) hoger is voor aminolevulinezuur dan voor aminolevulinezuur methyl ester en aminolevulinezuur hexyl ester. Dit resultaat komt overeen met eerdere resultaten (onder andere in hoofdstuk 6) die lieten zien dat aminolevulinezuur, maar niet een aminolevulinezuur ester, zodanig veel (door de huid heen) in de bloedbaan opgenomen wordt dat protoporfyrine IX productie geïnduceerd wordt buiten het stukje huid waar het aangebracht wordt.

Uit experimenten waarin aminolevulinezuur en aminolevulinezuur esters aangebracht werden op geïsoleerde muizenhuid waarvan de hoornlaag dunner gemaakt was (met behulp van plakband), bleek dat de penetratie door die huid heen ongeveer 100 maal (bij aminolevulinezuur) tot 200 maal (bij aminolevulinezuur esters) hoger is dan door normale huid. Deze resultaten bevestigen eerdere bevindingen (in onder andere hoofdstukken 5 en 6) dat de hoornlaag een belangrijke barrière is voor aminolevulinezuur en aminolevulinezuur esters.

Penetratie door (pre)maligne huid

Reeds lang is bekend dat na toediening van aminolevulinezuur op huid met premaligne afwijkingen zoals Bowen's disease en actinische keratose, of oppervlakkige maligne afwijkingen zoals plaveiselcel carcinomen en basaalcel carcinomen, er meer protoporfyrine IX in deze afwijkingen geproduceerd wordt dan in de omliggende normale huid. Men heeft al vaak gesuggereerd of aangenomen dat dit veroorzaakt wordt doordat de

penetratie-eigenschappen van de hoornlaag van deze (pre)maligne afwijkingen anders zijn dan van de hoornlaag van normale huid. Daardoor zou aminolevulinezuur sneller en met grotere hoeveelheden de afwijkingen binnendringen en dus zorgen voor meer protoporfyrine IX in de afwijkingen dan in de omliggende normale huid. De studie beschreven in hoofdstuk 8 presenteert voor de eerste keer resultaten die deze hypothese bevestigen. De penetratie van aminolevulinezuur door geïsoleerde stukjes haarloze muizenhuid is in dit hoofdstuk getest in normale huid, in huid met een (gedeeltelijk) verwijderde hoornlaag (met behulp van plakband), en in huid die verdikt is met premaligne cellen door chronische blootstelling aan UVB straling. Het laatste type huid is een voorloper van huid met (pre)maligne afwijkingen en staat model voor de boven beschreven premaligne en maligne huidafwijkingen, want deze afwijkingen kunnen ontstaan in een chronisch aan de zon (dus ook aan UVB straling) blootgestelde huid. De penetratie van aminolevulinezuur door de muizenhuid met premaligne afwijkingen is hoger dan door de normale huid, maar lager dan door de huid zonder hoornlaag. Dit geeft aan dat de barrière-eigenschappen van de hoornlaag minder effectief zijn in een chronisch UVB bestraalde huid dan in een normale huid, maar nog wel effectiever dan in een huid waarvan de hoornlaag (gedeeltelijk) verwijderd is.

Invloed van de huidtemperatuur tijdens toediening van aminolevulinezuur

Naast het gebruik van veresterd aminolevulinezuur zijn er vele andere mogelijkheden die onderzocht worden of al toegepast worden om fotodetectie en fotodynamische therapie met aminolevulinezuur te verbeteren. Eén van die mogelijkheden is om de huidtemperatuur tijdens de topicale toediening van aminolevulinezuur te verhogen. In hoofdstuk 9 is onderzocht wat de invloed van de huidtemperatuur tijdens de toediening van aminolevulinezuur is op de penetratie van aminolevulinezuur door de huid heen en op de protoporfyrine IX productie in de huid. De resultaten van experimenten met geïsoleerde stukjes muizenhuid laten duidelijk zien dat de penetratie van aminolevulinezuur door de huid heen hoger is bij een hogere huidtemperatuur. De experimenten met proefpersonen laten zien dat er in een gezonde mensenhuid meer protoporfyrine IX wordt geproduceerd bij hogere huidtemperaturen.

Conclusies

De studies met de carotenoporfyrine en met aminolevulinezuur en aminolevulinezuur pentyl ester hebben aangetoond dat het uitermate belangrijk is om fluorescentie-microscopie deel uit te laten maken van studies waarin nieuwe fotodiagnostische stoffen onderzocht worden voor detectie van (voorlopers van) tumoren.

Bij de metingen van het protoporfyrine IX fluorescentiesignaal bij levende muizen met of zonder (pre)maligne afwijkingen is de hoogte van het signaal niet alleen afhankelijk van de hoeveelheid protoporfyrine IX, maar ook van de dikte van de huidlaag waar de protoporfyrine IX zich bevindt.

Wat betreft nieuwe of aangepaste fotosensitizers voor fotodetectie, kan geconcludeerd worden dat de nieuwe carotenoporfyrine niet lokaliseert in (pre)maligne weefsels in de diersmodellen met primaire tumoren. Het gebruik van aminolevulinezuur pentyl ester resulteert in lagere protoporfyrine IX concentraties in normale huid en ongeveer gelijke protoporfyrine IX concentraties in (pre)maligne weefsel in vergelijking met aminolevulinezuur. Dit leidt tot een betere protoporfyrine IX ratio tussen (pre)maligne weefsel en normale huid voor aminolevulinezuur pentyl ester dan voor aminolevulinezuur. Hierdoor is een betere fotodetectie van (pre)maligne afwijkingen mogelijk met minder ongewenste fotodynamische bijwerkingen.

Tegen de verwachting in was de door aminolevulinezuur hexyl ester opgewekte protoporfyrine IX productie in de huid niet of nauwelijks hoger dan bij aminolevulinezuur. Hiervoor zou de lagere penetratie van aminolevulinezuur esters de huid in (mede)verantwoordelijk kunnen zijn. Dit komt ook overeen met de bevinding dat onder bepaalde toedieningscondities protoporfyrine IX productie plaats kan vinden buiten het opbrenggebied van aminolevulinezuur, hetgeen niet het geval is bij aminolevulinezuur hexyl ester.

De snelheid waarmee aminolevulinezuur de huid in penetreert is bij huid met (pre)maligne afwijkingen hoger dan bij normale huid. Dit verschil kan (gedeeltelijk) verantwoordelijk zijn voor de hogere protoporfyrine IX productie in deze afwijkingen.

Verhoging van de huidtemperatuur bevordert de penetratie van aminolevulinezuur de huid in en de protoporfyrine IX productie in de huid. Deze benadering zou daarom gebruikt kunnen worden ter verbetering van fotodynamische therapie met aminolevulinezuur.