Usporedba pulsed-dye laserom posredovane fotodinamske terapije i konvencionalne fotodinamske terapije u liječenju višestrukih bazocelularnih karcinoma

Čarija, Antoanela

Doctoral thesis / Disertacija

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:270567

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Splitu
Medicinski fakultet

ANTOANELA ČARIJA

USPOREDBA PULSED-DYE LASEROM POSREDOVANE FOTODINAMSKE TERAPIJE I KONVENCIONALNE FOTODINAMSKE TERAPIJE U LIJEČENJU VIŠESTRUKIH BAZOCELULARNIH KARCINOMA

Disertacija

Split, 2019.

Rad je izrađen na Klinici za kožne i spolne bolesti, Kliničkog bolničkog centra Split.

Voditeljica rada: prof. dr. sc. Neira Puizina Ivić, dr. med.

Od srca zahvaljujem svojoj istinskoj mentorici, prof. dr. sc. Neiri Puizini Ivić, na znanju i vremenu koje mi je nesebično poklanjala od mojih prvih dana u dermatologiji.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Hrvoju Zorcu, predstojniku Zavoda za laserska i atomska istraživanja i razvoj, Instituta „Ruđer Bošković“ što nam je ljubazno posudio PDT lampu, zatim mr. pharm. Asiji Petrašić na pripremi ALA kreme te prof. dr. sc. Dujomiru Marasoviću zbog kojeg je laserska terapija zaživjela na našoj Klinici. Zahvaljujem svim kolegama i zaposlenicima Klinike za kožne i spolne bolesti KBC-a Split na svesrdnoj pomoći te bolesnicima koji su sudjelovali u istraživanju.

Suprugu Vinku zahvaljujem na tehničkoj i emocionalnoj potpori i to ne samo pri izradi ovog rada.

Ljubav nije utjeha.

Ljubav je svjetlo.

F. Nietzsche

Mojoj obitelji

SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA
1. UVOD 1
1.1. Bazocelularni karcinom 1
1.1.1. Povijesne činjenice 1
1.1.2. Epidemiologija bazocelularnog karcinoma 1
1.1.3. Etiologija bazocelularnog karcinoma 2
1.1.4. Klinički oblici bazocelularnog karcinoma 3
1.1.4.1. Nodulo-ulcerativni podtip bazocelularnog karcinoma 3
1.1.4.2. Difuzni podtip bazocelularnog karcinoma 4
1.1.4.3. Površinsko-šireći (multicentrični) podtip bazocelularnog karcinoma 4
1.1.4.4. Pigmentirani podtip bazocelularnog karcinoma 5
1.1.4.5. Rjeđi klinički podtipovi (gigantski, linearni, polipoidni) 5
1.1.5. Dijagnostika bazocelularnog karcinoma 7
1.1.5.1. Dermatoskopija bazocelularnog karcinoma 7
1.1.5.2. Biopsija bazocelularnog karcinoma 8
1.1.5.3. Citologija bazocelularnog karcinoma 9
1.1.6. Patohistološki oblici bazocelularnog karcinoma 9
1.1.7. Patogeneza bazocelularnog karcinoma 11
1.1.7.1. Gen p53 12
1.1.7.2. PATCHED gen 12
1.1.8. Terapija bazocelularnih karcinoma 14
1.2. Fotodinamska terapija 17
1.2.1. Uvod i definicija fotodinamske terapije 17
1.2.2. Povijest fotodinamske terapije 18
1.2.3. Temeljni principi fotodinamske terapije 20
1.2.3.1. Fotosenzibilizatori ALA i protoporfirin IX 20
1.2.3.2. Izvori svjetla 22
1.2.3.2.1. Koherentni izvori svjetla 23
1.2.3.2.2. Nekoherentni izvori svjetla 24
1.2.3.3. Postupci koji povećavaju učinkovitost fotodinamske terapije 24
1.2.4. Mehanizam djelovanja fotodinamske terapije 25
1.2.4.1. Molekularni učinci fotodinamske terapije 25

1.2.4.2. Stanično oštećenje tijekom fotodinamske terapije 26
1.2.4.3. Učinci fotodinamske terapije na krvne žile 28
1.2.4.4. Učinci fotodinamske terapije na imunosni sustav 29
1.2.5. Indikacije i učinkovitost fotodinamske terapije 30
1.2.6. Nuspojave fotodinamske terapije 31
1.2.7. Kozmetski učinak fotodinamske terapije 32
1.3. Pulsed-dye laser 32
1.3.1. Povijest lasera 32
1.3.2. Laser i laserska zraka 33
1.3.3. Laser u dermatologiji 34
1.3.4. Pulsed-dye laser u liječenju bazocelularnog karcinoma 35
1.4. PDL-PDT u liječenju bazocelularnih karcinoma 36
1.5. Problematika istraživanja 37
2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA 38
2.1. Ciljevi istraživanja 38
2.2. Hipoteze istraživanja 38
3. ISPITANICI I POSTUPCI 39
3.1. Ispitanici 39
3.2. Postupci 39
3.3. Materijali 43
3.3.1. Pulsed-dye laser 43
3.3.2. Uređaj za fotodinamsku terapiju 44
3.3.3. Krema ALA 44
3.4. Statistički postupci 45
4. REZULTATI 47
4.1. Ispitanici 47
4.2. Procjena učinkovitosti 48
5. RASPRAVA 52
6. ZAKLJUČAK 59
7. SAŽETAK 60
8. SUMMARY 62
9. LITERATURA 63
10. ŽIVOTOPIS 77

POPIS OZNAKA I KRATICA

5-FU	5-fluorouracil
AK	aktinička keratoza
ALA	(engl. *Amino Levulinic Acid*) – aminolevulinska kiselina
AP1	aktivatorski protein 1
APC	(engl. *Antigen Presenting Cell*) – antigen prezentirajuća stanica
BCC	(engl**.** *Basal Cell Carcinoma)* – bazocelularni karcinom
BD	(engl. *Bowen Disease*) – Bowenova bolest
BR	bez regresije
COX-2	ciklooksigenaza-2
CPD	ciklobutan-pirimidinski dimer
DMSO	dimetilsulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
DR	djelomična regresija
EiE	ekskohleacija i elektrodisekcija
FC	(engl. *Field Cancerisation*) – polje kancerizacije
Fe^{2+}	dvovalentno željezo
FS	fotosenzibilizator
G-CSF	(engl. *Granulocyte Colony Stimulating Factor*) – čimbenik stimulacije granulocitnih kolonija
Hh	„Hedgehog“ signalni put
HR	(engl. *High Risk*) – visok rizik
IPL	(engl. *Intense Pulsed Light*) – IPL (laser)
kPDT	konvencionalna fotodinamska terapija (nekoherentnim svjetlom)
KTP	kalij–titanil-fosfatni laser
LASER	(engl. *Light Amplification* by *Stimulated Emission* of *Radiation*), uređaj za stvaranje laserske zrake
LED	(engl. *Light Emitting Diode*) – lampe sa svjetlosnim diodama
LR	*(*engl. *Low Risk)* – nizak rizik
MAF	(engl. *Macrophage-Activating Factor*) – čimbenik za aktivaciju makrofaga
MAL	metil aminolevulinat

MASER	(engl. *Microwave Amplification* by *Stimulated Emission* of *Radiation*) – uređaj za stvaranje mikrovalnog zračenja
MME	Mohsova mikroskopska ekscizija
MR	(engl. *Medium Risk)* – intermedialni rizik
nBCC	nodulocistični bazocelularni karcinom
NBCCS	nevoidni bazocelularni karcinomski sindrom
Nd:YAG	laser s itrij-aluminijevim granatom (YAG), oplemenjen atomima neodimija
NF-κB	nuklearni faktor κB
NK stanice	(engl. *Natural Killer cells*) – stanice ubojice
NMSC	(engl. *Non-Malanoma Skin Cancer)* – nemelanomski kožni tumor
PB	(engl. *PhotoBleaching*)
pBCC	površinsko-širući bazocelularni karcinom
PDL	pulsed-dye laser
PDL-PDT	pulsed-dye laserom posredovana fotodinamska terapija
PDT	(engl. *Photodynamic Therapy)* – fotodinamska terapija
PpIX	protoporfirin IX
PR	potpuna regresija
PTCH	„patched“ receptor
R	recidiv
ROS	reaktivni kisikovi spojevi
S_0	nepobuđeno „singlet“ stanje
S_1 i S_2	pobuđeno „singlet“ stanje
SCC	(engl. *Squamous Cell Carcinoma)* – planocelularni karcinom
SE	standardna ekscizija
SHh	*Sonic Hedgehog* lipoprotein
SMO	„smoothened“ (transmembranski receptor)
SPT	(engl. *Selective PhotoThermolysis*) – selektivna fototermoliza
T*	„triplet“ stanje
TNF	(engl. *Tumor necrosis factor*) – faktor tumorske nekroze
UV	*(*engl. *UltraViolet)* – ultraljubičaste (zrake)
VAS	vizualna analogna skala (boli)
VEGF	(engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*) – vaskularni endotelni faktor rasta

1. UVOD

Svjetlo je u Početku* iskra života na Zemlji; neophodno je za funkcioniranje čovjeka. Izmjena svjetla i tame određuje ritam života, dok rasvijetljenost i boja utječu na raspoloženje i osjećaje (1). Prije 400.000 godina čovjek je počeo koristiti vatru kao izvor svjetla i topline. Današnji razvoj izvora svjetla uključuje najnovije tehnologije, nove optičke sustave. Zbog dualne prirode svjetla, koje je i val i čestica, sjaj koji osvjetljava, ali i blještanje koje zamagljuje, ono zacjeljuje (dušu), ali i ranjava (kožu). Svjetlo svoj pečat ostavlja i u srži keratinocita uzrokujući programiranu smrt – *sunburn* stanicu – čija neadekvatna eliminacija vremenom uzrokuje pojavu bazocelularnog karcinoma (2).

1.1. BAZOCELULARNI KARCINOM

1.1.1. POVIJESNE ČINJENICE

Prvi opisi karcinoma na egipatskom papirusu datiraju još iz 2500. g. pr. Kr. Hipokrat je opazio ulcerirane i neulcerirane kožne tumore, koje je nazvao *karkinos* (*grčki - καρκινοσ* – rak), jer su ti tumori imali prstolike izdanke i nalikovali su rakovima. Celsus je kasnije za tumore koristio latinski pojam za rak, *cancer* i opisao je promjene na području lica, nosa, ušiju, usana, navodeći: „...na promjeni postoji nepravilno oticanje rubova, naoko su vidljive proširene, tortuozne vene...“ (3). Oftalmolog Jacob je 1827. g. prvi, u medicinskoj literaturi, opisao izgled i prirodu bazocelularnog karcinoma (engl. *Basal Cell Carcinoma* -BCC) (4).

1.1.2. EPIDEMIOLOGIJA BAZOCELULARNOG KARCINOMA

Tumori kože su najučestalije zloćudne promjene. Zajedno s planocelularnim karcinomom (engl. *Squamous Cell Carcinoma* – SCC) BCC se ubraja u skupinu ne-melanomskih kožnih tumora (engl. *Non-Melanoma Skin Cancer* – NMSC). Incidencija NMSC-a je 18-20 puta viša od incidencije melanoma (5). Incidencija BCC-a je 4 do 5 puta viša od SCC-a te je najčešća zloćudna neoplazma u ljudi (5). Incidencija BCC-a ovisi o zemljopisnoj regiji i nadmorskoj visini te jako varira – od 49/100.000 stanovnika u Finskoj do

*Bereshit (hebrejski-u početku) naziv za Knjigu Postanka

726/100.000 u Australiji (6). U Hrvatskoj BCC ima najvišu incidenciju naprama ostalih kožnih tumora (54,9/100.000 za muškarce i 53,9/100.000 za žene) (7).

Do nedavno, BCC se smatrao tumorom osoba u životnoj dobi višoj od 40 godina, osobito muškaraca (5). Međutim, nedavni dokazi upućuju na dramatičan porast incidencije BCC-a sa stopom porasta od 3-10 % godišnje (5), osobito u mlađih odraslih osoba (8), a posebno u žena (9).

1.1.3. ETIOLOGIJA BAZOCELULARNOG KARCINOMA

Porast incidencije BCC-a vjerojatno je posljedica kombinacije više čimbenika: povećane izloženosti ultraljubičastim (UV) zrakama ili sunčevoj svjetlosti, povećanih aktivnosti na otvorenom, promjene u stilu odijevanja, dugovječnosti, oštećenja ozonskog omotača, nasljeđa i katkada imunosupresije. Veća učestalost BCC-a u mladih žena objašnjava se čestim, dugogodišnjim nekontroliranim korištenjem solarija i intenzivnijim sunčanjem u mlađoj dobi (9).

Izlaganje UV zrakama ima važnu ulogu u nastanku BCC-a te je razumljivo da su osobe svijetle puti, plavih očiju, crvene kose s pjegama osobito sklone razvoju BCC-a (10). S druge strane, u etničkih skupina tamnije pigmentirane kože, zbog fotoprotektivnog učinka veće količine epidermalnog melanina, učestalost nastanka BCC-a je 19 puta niža nego u bijelaca (11).

Pretpostavlja se da se BCC razvija u razdoblju od 10 do 50 godina nakon oštećenja UV svjetlom (11). Kao i kod melanoma, povremena izloženost visokim dozama UV zračenja u djetinjstvu i mladosti snažan je čimbenik rizika za razvoj BCC-a. Za razliku od BCC-a, u etiologiji SCC-a važna je kronična izloženost UV zračenju u ranijim desetljećima života (12). U manje sunčanim područjima, dalje od ekvatora i na nižim nadmorskim visinama, BCC se pojavljuje u osoba starijih od 60 godina. Iznimka su osobe s genodermatozama (albinizam, *xeroderma pigmentosum*, te nevoidni bazocelularni karcinomski sindrom – NBCCS) i imunodeficijentne osobe u kojih se BCC vidi u ranijoj životnoj dobi. Bazocelularni karcinom u ranijoj životnoj dobi pojavljuje se u osoba bez genodermatoza koje žive u sunčanijim područjima, bliže ekvatoru i na višim nadmorskim visinama (5). Dodatni čimbenici rizika su izloženost arsenu, derivatima katrana (13) te prethodni BCC na trupu (14).

1.1.4. KLINIČKI OBLICI BAZOCELULARNOG KARCINOMA

Bazocelularni karcinom se pojavljuje na koži izloženoj, ali i zaštićenoj od djelovanja Sunca. Tumori nastali na izloženoj koži razlikuju se po morfologiji i biološkoj podlozi od tumora nastalih na zaštićenoj koži (15).

Glava i vrat, a osobito lice, mjesta su gdje se BCC pojavljuje u 80 % bolesnika. Za razliku od lica, dorzum šaka, iako izložen UV svjetlu, rijetko je mjesto pojavljivanja BCC-a (5, 6). Uočeno je da je gustoća pilosebacealnih ušća važna u određivanju lokalizacije i pojavnosti BCC-a, što objašnjava rijetko pojavljivanja BCC-a na dorzumima šaka (16). Rjeđa mjesta na kojima se BCC-i pojavljuju su trup (u 15-43 % slučajeva), gornji i donji udovi, a osobito rijetko ih vidimo perigenitalno, u perianalnom području, te na dlanovima i tabanima (5, 6). BCC ima veću sklonost pojavljivanja na mjestima prethodne radioterapije te se kao i SCC pojavljuje unutar starih ožiljaka ili kroničnih rana (5, 17).

Klinički izgled BCC-a je različit iako je većini zajednička prisutnost površinskih kapilara (14). Klinički se može očitovati u vidu nodulo-ulcerativnog podtipa (45-60 %), površinsko-širećeg (multifokalnog) oblika (15-35 %), difuznog podtipa (infiltrativni ili morfeiformni oblik) (4-17 %), pigmentiranog oblika (1-7 %) te kao fibroepithelioma Pinkus (5). Oko 10-40 % BCC-a mogu imati miješani klinički i histološki oblik (18).

1.1.4.1. Nodulo-ulcerativni podtip bazocelularnog karcinoma

Nodulo-ulcerativni podtip BCC-a u početku se očituje kao translucentna sitna papula, blijedo žute do ružičaste boje, biserastog odsjaja (slika 1.). Na površini su često vidljive teleangiektatičke krvne žile. Vremenom se tumor povećava, a epidermis se stanjuje i pojavljuje se središnja ulceracija. Rubovi su tipično uvrnuti prema unutra. Nodularna varijanta je često lobulirana, obično veličine do 2 cm (5).



Slika 1. *Nodulo-ulcerativni podtip BCC-a*

1.1.4.2. Difuzni podtip bazocelularnog karcinoma

Najvažnije značajke difuznih varijanti (morfeiformni oblik ili infiltrativni oblik) su loša rubna ograničenost promjene te manjak translucentnosti. Klinički tumor nalikuje ožiljku, plitak je, bjelkasto-ružičaste boje, induriran, često s erozijom i ulceracijom. Karakteriziran je sporim rastom tijekom više godina (5).

1.1.4.3. Površinsko-širećи (multicentrični) podtip bazocelularnog karcinoma

Tumori površinsko-širećeg podtipa (slika 2.) nalik su psorijatičkom plaku. Očituju se kao plitki, široki areali nepravilnog oblika, veličine nekoliko milimetara do nekoliko centimetara, ružičaste ili crvene boje, ponekad prekriveni ljuskama. Vidljiva su područja s atrofijom ili hipopigmentacijom kože. Ovaj oblik BCC-a ponekad se naziva i multifokalnim zbog izgleda prividno normalnog epidermisa između nakupina tumorskih stanica. Ovaj tip BCC-a češće se vidi na trupu i udovima, ali se također može vidjeti i na području lica ili vrata (5, 11).



Slika 2. *Površinsko-širećи podtip BCC-a*

1.1.4.4. Pigmentirani podtip bazocelularnog karcinoma

Pigmentirani BCC-i imaju crno-smeđu pigmentaciju, stoga je otežana diferencijalna dijagnoza prema malignom melanomu. Mogu sadržavati dijelove koji su tipični za BCC poput uzdignutih rubova s teleangiektazijama, manjih ulceracija, pa je time postavljanje dijagnoze olakšano. Većina promjena nalazi se na licu, iako ponekad ovaj podtip BCC-a nalazimo i na trupu i udovima, češće u osoba tamnije pigmentirane kože (5).

1.1.4.5. Rjeđi klinički podtipovi (gigantski, linearni, polipoidni)

Gigantski BCC-i su, po definiciji, oni čiji je promjer veći od 10 cm. Najčešće su smješteni na trupu te se smatraju visokorizičnima, jer oko 30 % metastazira (5). Uglavnom su posljedica bolesnikovog zanemarivanja. Uočena je povezanost s alkoholizmom i pušenjem (5, 19).

Linearni BCC-i najčešće su smješteni na vratu, vjeđi te medijalnom očnom kutu u starijih bolesnika (5).

Polipoidni BCC je rijetka varijanta. Uglavnom se vidi na vlasištu, ušima, perigenitalnom području te u starijih bolesnika (5).

Bolesnik obično opisuje promjenu koja često krvari, koja ne cijeli dulje vremensko razdoblje, koja u središnjem dijelu vlaži ili stvara povremeno krustu. Vrlo često ovim tumorima je potrebno i nekoliko mjeseci ili čak godina da bi postigli veličinu od 1 cm u promjeru. Tijek je kronično progresivan s različitom dinamikom rasta u smislu duge faze mirovanja, naizmjenično s fazama rasta. Promjene su uglavnom asimptomatske. No, ponekad bolesnici navode laganu bolnost, što je loš prognostički znak, jer ukazuje na moguću perineuralnu invaziju (20). Ako se ne liječi, zahvaća ne samo kožu, nego i okolna tkiva (mišiće, kosti, hrskavicu). Metastaze su izuzetno rijetke (0,0028 – 0,55 %) (21). Metastatski BCC se širi limfnim i hematogenim putevima. Za bolesnike s metastazom u limfnom čvoru, prosječno preživljenje je 3,6 godina, a u slučaju hematogenog širenja, na mjesta kao što su kosti, jetra i pluća, prosječno preživljenje je 8-14 mjeseci (22).

Recidive nakon provedenog liječenja vidimo u 1-8,7 % BCC-a (5), a ovise o lokalizaciji i veličini tumora, histološkom podtipu i primijenjenoj terapiji. Na osnovi navedenih značajki BCC dijelimo na tumore niskog i visokog rizika (tablica 1.) (23). Lokalizacija tumora je osobito bitna. Tako razlikujemo područje visokog rizika (engl. *High Risk* – HR) – koje uključuje površinu lica tzv. „regiju maske“ koja obuhvaća središnji dio lica, periokularno područje, vjeđu, obrve, nos, perioralno područje, usne (koža i vermilion), bradu, donju vilicu, uho, preaurikularno i retroaurikularno područje te kožu temporalnog područja. U područje visokog rizika ubrajamo i šake, stopala te genitalije. Područja intermedijalnog rizika (engl. *Intermediate Risk* – MR) su obrazi, čelo, vlasište i vrat dok su područja niskog rizika (engl. *Low Risk* – LR) trup i udovi (23, 24).

Tablica 1. *Čimbenici rizika za recidiviranje BCC-a (23)*

BCC	Nizak rizik	Visok rizik
Lokalizacija	područje LR < 20mm područje MR < 10mm područje HR < 6mm	područje LR ≥ 20mm područje MR ≥ 10mm područje HR ≥ 6mm
Rubovi	dobro definirani	slabo definirani
Primarni vs. rekurentni	primarni	rekurentni
Imunosupresija	–	+
Mjesto radioterapije	–	+
Patohistološki podtip	nodularni, superficijalni	podtipovi agresivnog rasta *
Perineuralna invazija	–	+

* *Tumori koji imaju morfeiformnu, sklerozirajuću, miješanu infiltrativnu ili mikronodularnu patohistalošku sliku*

1.1.5. DIJAGNOSTIKA BAZOCELULARNOG KARCINOMA

Dijagnoza BCC-a je obično klinička, a klinička obilježja ovise o podtipu BCC-a. Točna dijagnoza podtipa BCC-a te prepoznavanje tumora visokog ili niskog rizika ključno je za odgovarajuće liječenje i zahtijeva dodatne dijagnostičke metode kao što su dermatoskopija i biopsija kožne lezije (25).

1.1.5.1. Dermatoskopija bazocelularnog karcinoma

Dermatoskopija je neinvazivna dijagnostička metoda koja omogućuje vizualizaciju struktura epidermisa i dermisa. Ručni dermatoskop povećava 10-20 puta kožnu promjenu, a digitalni dermatoskop čak 70-100 puta (25). Dermatoskopija ima važnu ulogu u kliničkoj diferencijalnoj dijagnozi i dodatno poboljšava dijagnozu BCC-a s osjetljivošću od 98,6 % i dijagnostičkom vjerojatnosti od 99 % (26).

Dermatoskopski kriteriji za BCC (tablica 2.) uključuju nedostatak pigmentne mreže i barem jednu pozitivnu značajku koja uključuje: ulceraciju, višestruke plavo-sive kuglaste formacije (globule), strukture nalik listovima, velike plavo-sivkaste ovalne strukture, područja nalik kotačima sa žbicama te krvne žile razgranate poput grana (25). Dermatoskopske značajke nodularnog pigmentiranog BCC-a su i difuzno plavo-bijela područja s ulceracijom. Kod dermatoskopije površinsko-širećeg BCC-a vidimo sjajno bijele do crvene površine i

kratke tanke telangiektazije, dok se razgranate krvne žile u ovom podtipu viđaju rjeđe (25, 26). Prisutnost struktura nalik listovima i kratkih tankih telangiektazija, a istodobno i odsutnost plavo-sivih ovalnih struktura, razgranatih krvnih žila i ulceracija imaju snažnu prediktivnu vrijednost pri postavljanju dijagnoze površinsko-širećih BCC-a sa senzitivnošću od 81,9 % i specifičnošću od 81,8 % (26).

Tablica 2. *Dermatoskopski kriteriji za BCC (25)*

Vrste BCC-a	**Nepigmentirani BCC**	**Pigmentirani BCC**	**Površinsko-šireći BCC**
Učestalost			
Često	Nedostatak pigmentacije	Nedostatak pigmentne mreže	Sjajna bjelkasto-crvena područja
	Razgranate telangiektazije	Velike ovalne plavo-sive formacije	Kratke tanke telangiektazije
	Ulceracije	Plavo-sive kuglaste formacije	Erozije
	Kratke tanke telangiektazije	Strukture nalik listovima	Razgranate telangiektazije
		Područja nalik kotačima sa žbicama	Plavo-sive kuglaste formacije
		Razgranate telangiektazije	Strukture nalik listovima
Rijetko		Ulceracije	Velike ovalne plavo-sive formacije

Razlikovanje površinsko-širećeg podtipa BCC-a je od iznimne važnosti u kliničkoj praksi. Dijagnoza se ne bi trebala temeljiti na jednoj značajki već na skupu značajki u kombinaciji s kliničkim kontekstom. Biopsija i patohistološka analiza često su esencijalne i donose konačnu dijagnoza (26).

1.1.5.2. Biopsija bazocelularnog karcinoma

Biopsija BCC-a obično se primjenjuje za prepoznavanje histološkog podtipa BCC-a kako bi se planiralo liječenje. Ključno je prepoznati tumor visokog ili niskog rizika.

Plitka incizijska biopsija je često dovoljna. Ipak, u slučaju pigmentirane lezije gdje postoji poteškoća u razlikovanju pigmentiranih BCC-a i melanoma, potrebno je učiniti ekscizijsku biopsiju kako bi se osigurala dovoljna dubina uzorka i time olakšala dijagnoza eventualnog melanoma. „Punch“ biopsija je jednostavna metoda za dobivanje uzorka pune

debljine kože, ali je rijetko potrebna. Ključno je pravilno uzorkovanje s mjesta gdje je BCC najveće dubine ili se može uzeti više uzoraka, ukoliko je tumor velik ili ima različit izgled u različitim područjima (27).

1.1.5.3. Citologija bazocelularnog karcinoma

Citologija BCC-a pruža brzu alternativu biopsiji i korisna je u potvrđivanju dijagnoze. Istraživanje Bartona i sur. pokazalo je da je u bolesnika koji su podvrgnuti citološkoj pretrazi (ili punkciji) prije ekscizijske biopsije, citološki nalaz imao osjetljivost od 92 % u dijagnostici BCC-a s prediktivnom točnošću od 75 % (28). Ove su vrijednosti uspoređene s drugom skupinom bolesnika koji su imali incizijsku biopsiju prije ekscizije. U drugoj skupini osjetljivost u dijagnostici BCC-a bila je 100 % s prediktivnom točnošću od 96 % (28).

1.1.6. PATOHISTOLOŠKI OBLICI BAZOCELULARNOG KARCINOMA

Patohistološki podtip BCC-a utječe na razinu rizika i sklonost recidivu. Bazocelularni karcinom s agresivnijom histološkom slikom uključuje one s morfeiformnim, mikronodularnim, miješanim infiltrativnim ili bazoskvamoznim obilježjima u bilo kojem području tumora. U niskorizične histološke podtipove BCC-a ubrajaju se nodularni, površinsko-šireći, infundibulocistični oblik i fibroepithelioma Pinkus. U 37-43 % BCC-a postoji više histoloških tipova tumora unutar istog tumora, no uglavnom je jasno uočljiva prevlast jednog (5, 11).

Bazocelularni karcinomi su zloćudne promjene koje potječu iz pluripotentnih germinativnih stanica kože, koje se nalaze u bazalnom sloju epidermisa ili epitelnim strukturama adneksa te su obično histološki nediferencirani. Dva osnovna čimbenika utječu na histološku sliku BCC-a: (1) sposobnost njegovih stanica da se diferenciraju i proliferiraju, baš kao i kod normalnih, nepromijenjenih germinativnih bazalnih stanica u epidermisu embrija pa se mogu razvijati u folikularne, lojne, ekrine ili apokrine strukture i (2) odgovor strome, koja je potaknuta epitelnim komponentama, a može biti mucinozna, edematozna ili fibrozna (5, 29).

Karakteristična histološka značajka BCC-a je nakupina (ili gnijezdo) bazaloidnih, malih pleomorfnih stanica s velikom bazofilnom jezgrom, diskretne jezgrice i oskudne citoplazme, koje su izgubile međustanične mostove. Stanice na periferiji gnijezda imaju

sklonost slagati se u uzdužne redove na bazalnoj membrani s vrškom koji je usmjeren prema središtu otočića. Ovakav raspored stanica, poput drvene ograde, opisuje se kao palisadiranje. Mitoze su rijetke, a ako postoje normalnog su izgleda (5, 29). Okolna stroma sadrži povećani broj fibroblasta i povećanu količinu kolagena. Unutar i oko tumora može se vidjeti taloženje mucina koji se, pri obradi preparata i uklapanju u parafinski blok, skuplja i uzrokuje retrakcijski artefakt vidljiv između tumorske mase i njegove okolne strome. Također može biti prisutna središnja nekroza i ulceracija (5, 29).

Postoje brojne patohistološke varijante BCC-a. Najvažnije su: nodulocistični BCC-i, površinsko-širući BCC-i, morfeiformni BCC-i, mikronodularni BCC-i te bazoskvamozni BCC-i.

Nodulocistični BCC (nBCC) čini 75 % svih BCC-a, očituje se ograničenim nakupinama, gnijezdima bazaloidnih stanica s tipičnim palisadiranjem i retrakcijskim artefaktima.

Za razliku od nodularnog oblika površinsko-širući oblik BCC-a (pBCC) pokazuje vodoravno organizirane pupoljke bazaloidnih stanica u papilarnom dermisu koje su povezane s epidermisom. Rast je površan i centrifugalan te nema tračaka koji vode prema srednjem ili dubokom dermisu.

Palisadiranje je manje uočljivo kod ostalih navedenih varijanti čiji je rast infiltrativan. Tračci tumorskih bazaloidnih stanica morfeiformnog BCC-a prodiru duboko u dermis, što objašnjava često recidiviranje ovih tumora zbog nepotpunog uklanjanja tumorskog tkiva (5, 29). Neke studije navode da se tračci iz središnjeg dijela protežu i do 7 mm u okolno tkivo (30).

Mikronodularna varijanta BCC-a također nema izraženo palisadiranje niti retrakcijske artefakte. Bazaloidne stanice su nakupljene u sitna gnijezda koje infiltriraju dublje dijelove dermisa i subkutisa (5).

Bazoskvamozni BCC s fokalnim nakupinama neoplastičnih stanica rožnate diferencijacije također je obilježen infiltrativnim rastom i lošijom prognozom (5).

1.1.7. PATOGENEZA BAZOCELULARNOG KARCINOMA

Preklapanja BCC-a i SCC-a te fenotipska raznolikost kliničkih oblika, histoloških podtipova te različito biološko ponašanje posljedica su kompleksne interakcije čimbenika okoliša, prije svega UV svjetla i različitih uzoraka genetskih mutacija koje do danas nisu posve razjašnjene. Ovisno o trenutku (djetinjstvo, adolescencija), uzorku (intermitentan, kontinuiran), izvoru (prirodan, umjetan) i količini (kumulativna) izloženosti UV svjetlu, utjecaj UV zraka na razvoj BCC-a je kompleksan i predmet detaljnog proučavanja. Patohistološke studije navode kako nastanak BCC-a uvelike ovisi o specifičnim čimbenicima nastalim UV oštećenjem strome. U rijetkim slučajevima, kada se BCC-i pojavljuju na mjestima koja nisu izložena sunčevoj svjetlosti, drugi biološki čimbenici potiču oštećenje dermisa (31). U pokušaju popravljanja dermalnog oštećenja ponavljanjem embrionalnog folikularnog i epidermalnog razvoja, te stanice proliferiraju do karcinoma.

„Hedgehog“ (Hh) signalni put ima temeljnu ulogu u embrionalnom razvoju, u modeliranju organa i tkiva. Tijekom embriogeneze, Hh signalni put orkestrira morfogenezu epidermisa i folikula dlake uz fino podešavanje signala između epitelnih stanica i susjednih dermalnih stanica. Hh signalni put ima sličnu ulogu u kontroli rasta postnatalnih folikula dlake od multipotentnih progenitorskih stanica (32), što je ključni signal u periodičnom samoobnavljanju kože i njegovih adneksa i u organizmima odraslih osoba.

Ovaj put otkriven je na *Drosophili melanogaster* – vinskoj mušici. Mutiran Hh gen u ovih mušica, mijenja izgled embrija vinske mušice, koji je nalik ježu pokrivenom bodljama. Gen je nazvan *Hedgehog* (engl. jež). Bjelančevina Hh je izlučeni lipoprotein od kojih najvažniju ulogu ima *Sonic Hh* (SHh), jedan od tri ortologa. Bjelančevina SHh prenosi informaciju intracelularno putem „patched“ (PTCH) obitelji receptora PTCH gena (PTCH1 i PTCH2) i Gli gena (Gli1, Gli2 i Gli3) (5, 29).

Kao posljedica izlaganja različitim dozama i različitim valnim duljinama UV zračenja, oštećuje se deoksiribonukleinska kiselina (DNK) u različitim stanicama dermisa i epidermisa te i u prekursorskim stanicama BCC-a. Apsorbirano UV zračenje djeluje na susjedne pirimidinske baze, što uvjetuje stvaranje fotoprodukata: primarno ciklobutan-pirimidinskih dimera (CPD) i u manjoj mjeri pirimidin-pirimidonskih (6-4) fotoprodukata (33). CPD u kojima nastaje zamjena C-T, CC-TT baza na dipirimidinskim mjestima (tzv. mutacije s UV potpisom) uzrok su 80 % mutacija tumora kože i ne nalazimo ih u visceralnim tumorima (33). Ti fotoprodukti djeluju mutageno na umnožavanje stanice i smatraju se ciljnim mjestom

štetnog djelovanja UV zračenja. U uobičajenim uvjetima sustav popravljanja oštećenog DNK-a strogo je kontroliran enzimskim sustavom uklanjanja, tj. izrezivanja oštećenog dijela molekule DNK-a. Oštećena funkcija ovog sustava popravljanja vodi stvaranju sporadičnih mutacija što potiče promjene na nekim genima unutar ovih stanica (33, 34). Najznačajnije promjene odvijaju se na tumor supresorskim genima, od kojih su najvažniji p53 i PTCH gen. Inaktivacija ovih gena uzrokuje staničnu proliferaciju, jer omogućuje mutacijama da traju i potiču stvaranje tumora kože (35).

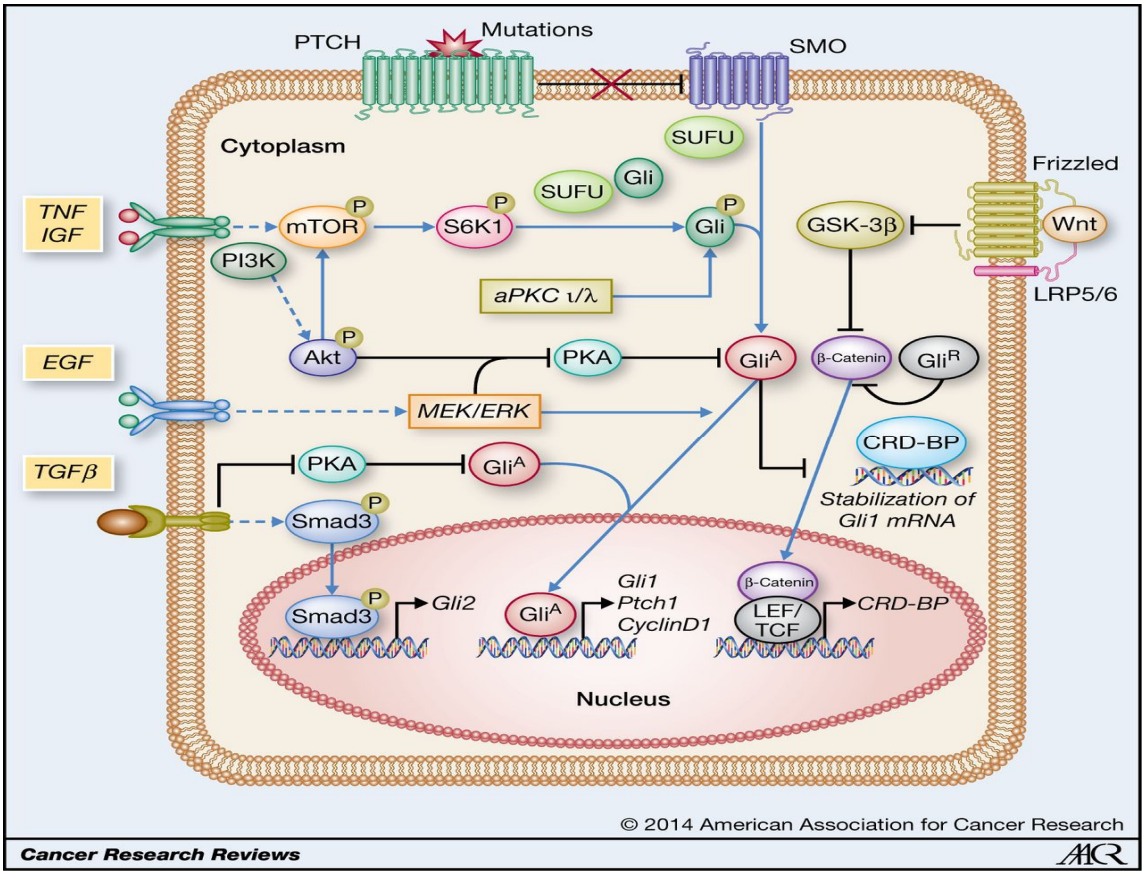
1.1.7.1. Gen p53

Najznačajnije mutacije odvijaju se na kromosomu 17 na p53 genu. Njegov produkt je bjelančevina P53 koji regulira stanični ciklus, DNK popravak i programiranu smrt stanice. U normalnoj koži, *wild type,* p53 nije moguće identificirati, međutim, prepoznaje se nakon dvosatnog izlaganja UV svjetlu, s najvećom vrijednošću nakon 24, odnosno 36 sati nakon izlaganja. Oštećenje DNK-a prilikom nezaštićenog izlaganja sunčevom svjetlu, putem fosforilacije aktivira p53, čime se pokreće mehanizam programirane stanične smrti. Mutacije na ovom genu značajne su za razvoj više od 50 % svih oblika zloćudnih tumora u ljudi (35, 36) i vide se u 90 % SCC-a i u 40-56 % sporadičnih BCC-a (13, 33). Studije na p53 negativnim homozigotnim miševima pokazale su da je za razvoj SCC-a neophodno djelovanje UV zračenja (33).

1.1.7.2. PATCHED gen

Za razliku od UV svjetlom inducirane mutacije gena p53 koji je ključan za razvoj SCC-a kao i BCC-a, mutacije u PTCH genu imaju mnogo važniju ulogu u karcinogenezi BCC-a. Mutacije na PTCH genu na kromosomu 9q22.3 imaju značajnu ulogu u razvoju nasljednog nevoidnog bazocelularnog karcinomskog sindroma (engl. *Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome – NBCCS*) – (Gorlin Goltz sindroma) te u 2/3 slučajeva sporadičnog BCC-a (13). Njegova uloga je kočenje aktivnosti gena koji potiču stanični ciklus i diferencijaciju, kao što je „Hedgehog“ gen. Gen PTCH označava veliku glikoproteinsku domenu smještenu na staničnoj membrani, koja koči aktivnost „smoothened“ (SMO) transmembranskog receptora, koji je smješten na membrani intracelularnog endosoma. On čini dio receptorskog kompleksa, čije kočenje inhibira aktivnost Hh signalnog puta. Ovaj

kompleks je receptor za izvanstaničnu signalnu molekulu *Sonic Hedgehog*. U nedostatku signalne molekule SHh, PTCH koči aktivnost SMO. Ovo kočenje ne dopušta aktivnost Hh signalnog puta (37). No, kada je Hh put aktiviran vezanjem Hh liganda na PTCH, on je zakočen i uklanja se njegovo inhibicijsko djelovanje na SMO pa nastaje njezino otpuštanje. SMO se premješta iz unutarstaničnog endosoma na staničnu membranu, gdje se aktivira transkripcijski čimbenik i Gli bjelančevina. Gli zatim ulazi u jezgru i potiče prepisivanje ciljnih gena (slika 3.) (37).



Slika 3. *Prikaz Hedgehog signalnog puta (37)*

Bazocelularni karcinom je tumor koji nastaje zbog neprestane aktivacije Hh signalnog puta bilo mutacijama koje inaktiviraju PTCH ili aktiviraju SMO (37). Hh signalni put preklapa se s brojnim drugim signalnim putevima koji moduliraju patogenezu raka. TNF-mTOR put aktivira Gli1 neovisno o SMO molekuli. IGF/PI3K/Akt put kao i signalni putevi EGFR/MEK/ERK reguliraju Gli1/2 aktivnosti. Signalizacija Wnt također modulira aktivnost Hh iako je temeljna kaskada nejasna (37).

Aberantni signalni Hh put je glavni pokretač sporadičnog BCC-a i BCC-a koji se pojavljuje u bolesnika s NBCCS-om, kao i mnogim drugim tumorima u kojima je ovaj put aktiviran. Dodatni Hh modificirajući signalni proteini kao što su mTOR, PI3K-Akt ili Wnt sposobni su modulirati rast tih tumora u netipičnom okruženju. Razumijevanje tih novih intersignalnih dijaloga može pomoći u prepoznavanju novih terapijskih ciljeva koji mogu inhibirati rast tumora (37).

1.1.8. TERAPIJA BAZOCELULARNIH KARCINOMA

Cilj liječenja BCC-a, s obzirom na njegovu učestalost ali i indolentan tijek, nije samo uklanjanje tumora u cijelosti, već i maksimalno očuvanje okolnog tkiva i funkcije mjesta na kojem se tumor nalazi te što bolji kozmetski rezultat. U liječenju BCC-a primjenjuje se širok raspon različitih terapijskih modaliteta, kirurških i nekirurških (38). Odgovarajući tijek liječenja treba odabrati temeljem kliničkih čimbenika rizika.

Kirurško liječenje može biti:

a) klasično-operativno – odstranjenje tumora u cijelosti
   - intraoperativnom (Mohsova mikroskopska ekscizija – MME) ili
   - postoperativnom histološkom procjenom rubova odstranjene promjene – standardna ekscizija (SE) ili
b) uništenje tumora bez histološke analize – kiretažom, kauterizacijom, kriokirurgijom (38).

U nekompliciranih slučajeva SE ima, nakon petogodišnjeg razdoblja praćenja, postotak izlječenja 89 % (24, 38). Ako tumorska promjena nije rizična, liječenje se obično započinje SE tumora s rubovima od 4 mm za tumore <2 cm i 10 mm za tumore >od 2 cm (24, 39). Međutim, ova metoda je neprihvatljiva u osoba s većim brojem BCC-a. Kod visokorizičnih BCC-a primjenjuje se MME koje uz intraoperativnu analizu svih rubova (lateralni rubovi – cirkumferencijalno te baza) omogućuje maksimalnu poštedu okolnog zdravog tkiva, a time i bolji kozmetski rezultat. Nakon petogodišnjeg praćenja MME ima najveću stopu izlječenja – 99 %. No, riječ je o vremenski i kadrovski zahtjevnom postupku (39).

Tumori koji nisu prikladni za kirurško odstranjenje, najčešće na područjima kože koja su teško dostupna, ili kod kojih je kirurški zahvat kozmetski neprihvatljiv, liječe se

nekirurškim pristupom, koji može biti destruktivan kao što je radioterapija, kojem se daje prednost kad je riječ o bolesnicima starijim od 60 godina (s petogodišnjom stopom učinkovitosti od 91,3 % za primarne i 90 % za rekurentne tumore), fotodinamska terapija (engl. *Photodynamic Therapy* – PDT), krioterapija (s vrlo varijabilnom stopom učinkovitosti nakon petogodišnjeg praćenja i lošim kozmetskim učinkom) te ekskohleacija i elektrodisekcija (EiE) (s petogodišnjom stopom učinkovitosti od 91-97 %) (39). No, pojedine studije navode stope recidiva nakon EiE od 19 do 27 % bolesnika (40).

Nekirurška lokalna terapija uključuje lokalnu imunoterapiju imikvimodom te lokalnim citostatikom 5-fluorouracilom (5-FU). Spomenute terapije imaju slične stope učinkovitosti nakon petogodišnjeg praćenja od 85 %, uz dobar kozmetski rezultat (39).

Nekirurška sistemska terapija uključuje vismodegib i sonidegib. Istraživanja signalnog puta u razvoju BCC-a rezultirala su sintezom lijeka vismodegiba koji blokira Hh signalni put i uspostavlja kontrolu nad tumorskim rastom. Najnovija istraživanja navode objektivan odgovor na terapiju vismodegibom od 48 % u lokalno uznapredovanog BCC-a te 33 % u metastaskog BCC-a. U bolesnika s NBCCS-om vismodegib je značajno reducirao incidenciju novih BCC-a naprama placeba, smanjio veličinu postojećih tumora te broj potrebnih kirurških ekscizija (39). Novi inhibitor Hh signalnog puta, sonidegib, pokazuje slične stope odgovora, ali i jednako izražene nuspojave kao i vismodegib te su zbog toga često razlog prekida terapije. Nuspojave se pojavljuju u prvih 6-12 mjeseci i uključuju mišićne spazme, alopeciju, gubitak osjeta okusa, mučninu, gubitak apetita i proljev. Ograničenje Hh inhibitora je i razvoj rezistencije nakon 6-22 mjeseca, koja je, čini se, vezana za klasu lijeka (39, 41).

Odgovarajući tijek liječenja treba odabrati temeljem kliničkih čimbenika rizika.

Visokorizične BCC-e liječimo SE sa širim ekscizijskim rubovima ili MME. Ukoliko je riječ o neoperabilnom bolesniku indicirana je radioterapija. Ona se može primijeniti i u pozitivnih, ali i negativnih postoperativnih rubova, ukoliko ima dokaza za perineuralnu invaziju. Iznimno mala skupina bolesnika s lokalno uznapredovalim neoperabilnim BCC-om te metastatskim BCC-om su kandidati za sistemsko liječenje inhibitorom Hh puta – danas ih nazivamo SMO inhibitorima (39).

Znatno češće se susrećemo s BCC-om niskog rizika kod kojeg je indicirana primjena SE, EiE (za područja neobrasla dlakom) ili radioterapija (za bolesnike koji nisu kandidati za kirurško liječenje te za bolesnike starije od 60. g). Ukoliko je kirurško liječenje kontraindicirano ili nepraktično, a riječ je o tumoru niskoga rizika, prije svega o pBCC-u i/ili

nBCC-u, mogu se primijeniti i druge terapijske opcije poput imikvimoda, 5-FU, intenzivnije krioterapije te PDT (38, 39).

Visokoj učestalosti BCC-a pridonosi i sklonost pojavljivanja višestrukih tumora. Procjenjuje se da će 40 do 50 % bolesnika s karcinomom bazalnih stanica razviti novi BCC (42). Višestruki BCC-i češći su u muškaraca koji su skloni razvoju sunčanih opeklina, u bolesnika kojima je prvi tumor bio površinsko-širećeg histološkog podtipa te u bolesnika s BCC-om koji se nalaze na mjestima koja nisu glava i vrat (14). Visoka učestalost BCC-a i visok rizik razvoja višestrukih primarnih tumora stavlja BCC na peto mjesto na popisu tumora s najskupljim liječenjem u Sjedinjenim Američkim Državama (43, 44).

S obzirom na uočenu pojavnost BCC-a u sve mlađih bolesnika, te veću vjerojatnost razvoja novih primarnih BCC-a ukoliko bolesnik razvije prvi BCC prije 65-e godine života (14, 45) važan cilj je pronalaženje optimalnog protokola liječenja, koji je jednak ili veći po učinkovitosti od dosada primijenjenih terapija. Važno je da je pri tome smanjena nelagodnost, smanjena potreba za anestezijom i skraćeno vrijeme provedeno u zdravstvenoj ustanovi, posebno za bolesnike s višestrukim BCC-om (23, 46). Fotodinamska terapija koristi se posljednjih 20 godina, zadovoljava prethodno navedene kriterije (21) te je modalitet liječenja kojem daju prednost liječnici i bolesnici (46).

1.2. FOTODINAMSKA TERAPIJA

1.2.1. UVOD I DEFINICIJA FOTODINAMSKE TERAPIJE

Fotodinamska terapija je terapijski postupak koji uključuje aktivaciju sistemski ili lokalno primijenjenog fotosenzibilizatora (FS) vidljivom svjetlošću kako bi se proizveli reaktivni oblici kisika koji selektivno uništavaju stanice (47).

Interakcija vidljive svjetlosti i tvari, kao što je biološko tkivo, kompleksna je a da bismo je razumjeli važno je poznavati osnove optike. Optika (*grčki. optike* – znanost o vidu) je grana fizike koja se bavi svojstvima i širenjem svjetlosti te međudjelovanjem svjetlosti i tvari (48).

Svjetlost i vid, kao i ljudska percepcija boja, su isprepleteni. Vidljiva svjetlost je elektromagnetsko zračenje koje se sastoji od vidljivoga dijela spektra, s rasponom valnih duljina od 380 do 780 nm, koje ljudsko oko razlikuje kao boje, od ljubičaste s najmanjom do crvene s najvećom valnom duljinom. No, boja nije svojstvo same svjetlosti, nego subjektivni fiziološki i psihološki odgovor čovjeka (48, 49). Izraz „svjetlost“ također se ponekad upotrebljava i za zračenje u ultraljubičastom (UV) i infracrvenom području, s kojima spektar vidljive svjetlosti graniči u svom donjem i gornjem dijelu (49).

Svjetlo ima svojstvo vala i čestice koje se naziva foton. Fotoni na nekoliko načina dolaze u interakciju s tkivom – apsorpcijom, refleksijom, raspršenjem, transmutacijom i fluorescencijom i te se interakcije mogu koristiti u medicinske svrhe. Prema Grothus – Draperovom zakonu da bi svjetlo imalo učinak na biološko tkivo treba biti apsorbirano (50). Ako dolazni foton nosi energiju koja odgovara razlici između dvije energetske razine u molekuli, energija se može apsorbirati. Prema tome, jedan atom ili jedna molekula mogu apsorbirati fotone samo određenih valnih duljina koje odgovaraju određenomu energetskom prijelazu optičkog elektrona u elektronskom omotaču. Svaka molekula posjeduje svojstven niz valnih duljina na kojima dolazi do apsorpcije (apsorpcijski spektar). Kromofora je molekula koja apsorbira vidljivu svjetlost. Valne duljine vidljivog spektra ne nalaze se u apsorpcijskom spektru vode tako da su glavne kromofore u biološkom tkivu hemoglobin i melanin (49, 51).

Stabilno osnovno stanje većine molekula naziva se „singlet“ (S_0) stanje, a karakterizirano je najnižom mogućom energijom u toj molekuli. To se postiže konfigurirajući sve elektrone na takav način da su vrtnje svih elektrona uparene. Apsorpcijom svjetla

molekula prelazi u pobuđeno nestabilno stanje (S_1 ili pak S_2 stanje), dok se smjer vrtnje elektrona ne mijenja. Pobuđena singlet stanja su nestabilna, te se vrlo brzo (tijekom nekoliko pikosekundi ili nanosekundi) vraćaju u svoje osnovno stanje. U tom kratkom vremenskom razdoblju interakcija s tkivom je minimalna – moguće je oslobađanje topline ili fluorescencija. Svojstvo oslobađanja topline koristi se u terapiji npr. hemangioma ili pigmentiranih kožnih promjena nakon primjene lasera. Lasersko svjetlo je visokog intenziteta na valnoj duljini koja se intenzivno apsorbira u hemoglobinu ili melaninu, što selektivno toplinski djeluje na tkivo koje sadrži navedene kromofore (49).

Apsorbirana energija može promijeniti i smjer vrtnje elektrona u različitim energetskim ovojnicama. To stanje naziva se triplet stanje (T*). Povratak na osnovno stabilnije stanje je, za razliku od molekula u S_1 stanju, odgođeno što omogućuje znatniju interakciju s tkivom. T* stanje je, za većinu molekula, nestabilno pobuđeno stanje s povećanom unutarnjom energijom koju karakteriziraju dvije neparne elektronske vrtnje. Kisik je jedna od rijetkih tvari čije je normalno stanje triplet stanje (49, 51). Ovo svojstvo koristi se u PDT-u. Iz navedenog je jasno da je neophodna dostupnost kisika kako bi PDT bio djelotvoran. Pobuđene molekule kisika difundiraju samo 10 do 20 nm prije nego se vrate u osnovno stanje, stoga fotosenzibilizator FS mora biti akumuliran intracelularno (predominantno u mitohondrijima) (51).

No, samo dio svjetlosti se apsorbira, a dio reflektira i raspršuje te ateniura. Raspršenje i refleksija s površine, ali i s različitih dubljih struktura u dermisu koristi se u dijagnostičke svrhe – pri mjerenjima laser doplerom, spektroskopijom i danas u dermatologiji sve popularnijom optičkom tomografijom (49).

1.2.2. POVIJEST FOTODINAMSKE TERAPIJE

Svjetlo se koristilo u terapijske svrhe od davnih vremena što je vidljivo u egipatskim spisima (1300. g. pr. Kr.), potom Hipokratovim spisima pa do spisa arapskog botaničara Ebn Baithara (1200. g. po. Kr) koji je uočio fotosenzibilna svojstva nekih biljaka. Razumijevanje bioloških učinaka svjetla započinje početkom 19. st. otkrićem ultraljubičastog spektra (52).

Pretpostavljalo se da UV svjetlo uzrokuje sunčane opekline i crvenilo kože, što je znanstveno potvrdio Widmark tek 1889. g. Nekoliko godina prije, Downes i Blunt otkrili su baktericidni učinak UV svjetla (52). Baktericidan učinak svjetla bio je temelj istraživanja danskog liječnika Niels Finsena koji je za svoj rad s bolesnicima s kožnom tuberkulozom

1903. g. dobio Nobelovu nagradu i danas se smatra ocem fototerapije. Tijekom 19. st. bilo je više medicinskih tekstova koji opisuju štetne posljedice nekih lijekova ili biljaka nakon izlaganja sunčevom svjetlu (49, 52).

Važna prekretnica u otkrivanju fotosenzibilizatora (FS) bio je rad neurologa Primea koji je opisao ulceracije i mjehure na suncu izloženoj koži bolesnika koji su uzimali eozin zbog epilepsije. Potom s akridinom započinje era fotodinamske terapije (52). Naime, student Oscar Raab, s namjerom da napiše doktorski rad, priključuje se timu profesora Hermanna von Tappeinera, eksperimentalnog farmakologa na Minhenskom sveučilištu. Namjera Tappeinera bila je otkriti novi antimalarik te su testirali upravo učinak akridina na protozoe. Raab je slučajno uočio da je učinak akridina na protozoe toksičniji i pri manjim dozama ukoliko je uzorak izložen svjetlu. Tada se već znalo da boje mogu apsorbirati svjetlo i taj toksičan učinak su pripisali fluorescenciji i skovan je pojam „fotodinamska reakcija“. Tappeiner zajedno s dermatologom Jesionekom provodi testiranja lokalno primijenjenim eozinom. Nakon nekoliko godina, istraživanja su zamrla zbog jake bolnosti i slabe učinkovitosti (slika 4.) (49, 52).



Slika 4a i 4b. *Bolesnica u životnoj dobi od 70 godina s višestrukim karcinomima kože lica. Promjene su infiltrirane putem injekcija i premazane eozinom, a potom su izložene djelovanju svjetla (sunčano ili svjetlo lampe) tijekom 6-8 sati dnevno, nekoliko tjedana (52)*

Hausmann 1908. g. otkriva novi fotosenzibilizator – hematoporfirin. Specijalizant Mayer-Betz je 1912. g. sam sebi injicirao 200 mg hematoporfirina i izazvao neugodnu

fotosenzitivnost sljedeća 2 mjeseca (49). No, nastavio je svoje istraživanje s njemačkim kemičarom Fischerom do pogibije 1914. g. Fischer se nastavio dalje baviti porfirijom. Upravo saznanja o porfirinima, njihovim prekursorima kao i njihovo selektivno nakupljanje u tumorskim stanicama (Policard, 1927.; Auler i Banzer 1942.) ponovno je aktualiziralo fotodinamsku terapiju (52).

Potom slijedi razdoblje pronalaženja primjerenog i netoksičnog FS-a, koji se selektivno nakuplja u tumorskom tkivu, a čiji je apsorpcijski spektar viši od 600 nm (zbog dubine prodora) i koji se relativno brzo razgrađuje (zbog kraće fotosenzibilnosti i manje nuspojava). Kennedy 1990. g. objavljuje rad o prirodnom porfirinskom prekursoru – aminolevulinskoj kiselini (ALA) koja je zbog niske molekularne mase prikladna za lokalnu primjenu (52, 53).

1.2.3. TEMELJNI PRINCIPI FOTODINAMSKE TERAPIJE

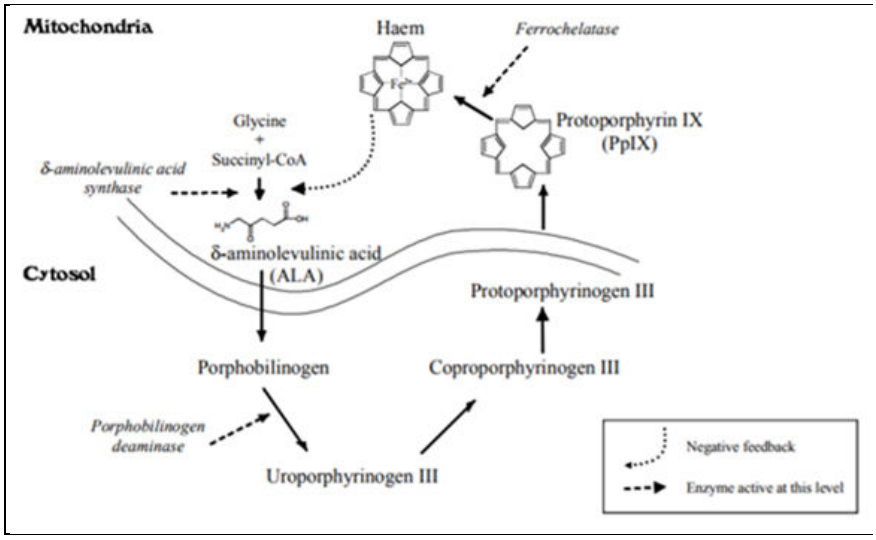
Kennedyjevim istraživanjem započinje nova era fotodinamske terapije. Više se ne aplicira egzogeni FS već ciljno tumorsko tkivo samo producira fotoaktivni protoporfirin IX – nakon administracije pro-lijeka ALA (53).

1.2.3.1. Fotosenzibilizatori ALA i protoporfirin IX

ALA je prirodan spoj, aminokiselina ravnog lanca s 5 atoma ugljika. ALA sudjeluje u sintezi hema koji se odvija dijelom u mitohondrijima, a dijelom u citosolu. Proces započinje unutar mitohondrija sintezom delta-aminolevulinske kiseline iz aminokiseline glicina i sukcinil-koenzima A iz Krebsovog ciklusa. Enzim koji katalizira ovu reakciju, ALA sintaza, ograničavajući je čimbenik u sintezi hema. On je precizno reguliran količinom unutarstaničnog željeza i koncentracijom hema. Proces se nastavlja u citosolu gdje se ukupno osam ravnih ALA molekula transformira preko nekoliko porfirinskih međuprodukata u tetrapirolni prsten protoporfirin IX (PpIX) (49). Posljednji korak u sintezi hema je ugradnja željeza (Fe^{2+}) uz pomoć enzima ferokelataze. Taj enzim ima ograničavajući utjecaj u sintezi hema. Hem se sintetizira u svim stanicama, ali intenzivnije u stanicama koje su u stadiju proliferacije, a najviše u stanicama jetre i hematopoetskog sustava (49).

Ukoliko je ALA u suvišku (kao u PDT-u) negativna povratna sprega preko ALA sintaze, (zbog manjka željeza i visoke koncentracije hema) zaobilazi se i nastavlja se sinteza

PpIX (slika 5.) (49). U tumorskim stanicama dokazana je pojačana aktivnost porfobilinogen deaminaze, što vodi kontinuiranoj sintezi PpIX (54). Pretvorba PpIX u hem, a time i njegova „razgradnja“ je smanjena zbog smanjene aktivnosti enzima ferokelataze (55). Posljedično se pojačano nakuplja PpIX u mitohondrijima tumorskih stanica.



Slika 5. *Sinteza hema. Prikazani su koraci u enzimskom procesu koji vode nakupljanju PpIX u tumorskom tkivu (49).*

U studijama se ALA koristi kao 10 – 20-tna % krema, svježe pripremljena u bolničkoj ljekarni ili pak kao gotovi tvornički preparati: flaster s 5-ALA (Alacare), BF-200 ALA (Ameluz) za crveno svjetlo te 5-ALA (Levulan) za plavo svjetlo. Levulan ALA je licencirana za upotrebu nakon 18 – 24 sata inkubacije. No, najčešće se koriste kraće inkubacije od 1 sata (56). Poluživot ALA je oko 24 sata, a lokalizirana fotosenzitivnost je prisutna do 48 sata nakon primjene (56).

Metil aminolevulinat (MAL) je esterificiran derivat ALA. Tvornički preparat pod imenom Metvix® registriran je za primjenu s crvenim svjetlom. MAL je lipofilniji te se stoga selektivnije nakuplja u neoplastičnim stanicama (47). MAL u stanicu prelazi aktivnim mehanizmima, ali i pasivnom difuzijom, što ne zahtijeva energiju i ne može se saturirati te je time učinkovit prije svega u tumorskim stanicama. Upravo bolja penetracija kroz stanične membrane može biti razlog za veću selektivnost za tumorske stanice. Ubrzo nakon penetracije MAL se demetilizira u ALA. Potom se nastavljaju isti metabolički procesi (57).

Novi FS-i se istražuju, poput spojeva s tetrapirolnom strukturom kao što su porfirini, klorini, bakterioklorini i ftalocijanini, a nekoliko spojeva je dobilo kliničko odobrenje. Istražene su i druge molekularne strukture poput sintetskih boja (fenotiazina, skvarina) i

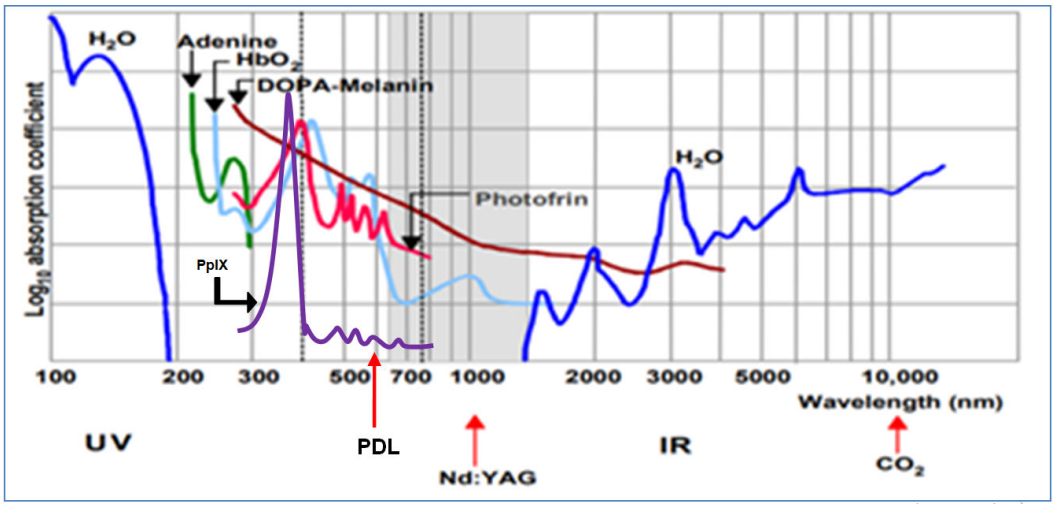
prirodnih proizvoda (hipericin, riboflavin i kurkumin), ali i FS-a sjedinjenih s protutijelima, peptidima i drugim ligandima za specifične stanične receptore (58).

Nakon isporuke FS-a, koji se pojačano akumulirao u neoplastičnom ili displastičnom tkivu i pritom se unutar stanice metabolizirao u aktivni PpIX, završava prva faza PDT-a (59).

1.2.3.2. Izvori svjetla

Drugi korak u liječenju tumora PDT-om je aktiviranje endogenog FS-a dovođenjem svjetla do ciljnog tkiva. Koriste se razni izvori svjetlosti, uključujući lampe širokog spektra, svjetleće diode i lasere (47).

Iako je maksimalna apsorpcija svjetlosti porfirina blizu 405 nm (plavo svjetlo) (slika 6.), većina kliničkih ispitivanja izvedena je primjenom crvenog svjetla s valnim duljinama od oko 630 nm, što dopušta dublje prodiranje svjetla u kožu, oko 2-3mm (49, 60).



Slika 6. *Dijagram apsorpcijskih koeficijenata i valnih duljina važnijih kormofora unutar biološkog tkiva (49).*
Spektar vidljivog svjetla nalazi se između dvije okomite isprekidane linije. Područje označeno sivom bojom predstavlja „optički prozor" tkiva, unutar kojeg je apsorpcija vode niska, a hemoglobina u padu. Apsorpcijski koeficijent melanina je unutar „optičkog prozora" visok. Prikazana je apsorpcijska krivulja dvaju fotosenzibilizatora – egzogenog Photofrina i endogenog PpIX. Prikazane su emisijske valne duljine najčešće korištenih lasera u medicini PDL (585-595nm), Nd:YAG (1064nm) i CO_2 lasera (10600nm).

Razlog tomu je što se zrake kraće valne duljine u tkivu više raspršuju nego zrake dulje valne duljine (61). Valna duljina od 630 nm nalazi se u „optičkom prozoru“ u kome je apsorpcija u hemoglobinu i vodi najmanja te se svjetlo minimalno apsorbira u drugim strukturama (49). No, definirani su i drugi vrhovi apsorpcije PpIX, pronađeni na 510, 545 i 580 nm (47).

1.2.3.2.1. Koherentni izvori svjetla

Riječ LASER je akronim za „Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation“, koja zapravo opisuje osnovni princip nastanka laserskog svjetla. Lasersko svjetlo je monokromatsko, koherentno i koncentrirano.

Monokromatska kvaliteta podrazumijeva da svjetlo sadržava samo jednu valnu duljinu ili uski raspon valnih duljina. Ovo je u suprotnosti s uobičajenim izvorima svjetlosti koji emitiraju svjetlost putem šireg raspona valnih duljina. Na primjer, normalna žarulja emitira preko velikog dijela vidljivog i infracrvenog spektra (49). Svjetlosni valovi koji dolaze iz lasera imaju jedinstvenu kvalitetu, a to je koherentnost – svi međufazni odnosi valova su u prostoru i vremenu konstantni. Laserska zraka je i koncentrirana, tj. ima minimalni kut divergencija (razilaženja zraka). To svojstvo olakšava prijenos laserskog svjetla putem optičkih vlakana na velike udaljenosti (49). U PDT-u se najčešće koriste laseri čije su valne duljine u crvenom dijelu spektra vidljive svjetlosti: Nd:YAG laseri (laseri s itrij-aluminijevim granatom (YAG), oplemenjen atomima neodimija) od 635 nm (49), diodni laseri od 633 nm (49, 62) i pulsed-dye laseri – PDL od 585 nm (63) i 595 nm (64). Laseri se ne razlikuju samo po valnoj duljini, već i po tipu zračenja koje može biti kontinuirano ili pulsno (49).

Zbog pretpostavke da laserska zraka zbog koherentnosti i monokromatičnosti može biti učinkovitija u PDT-u, provedene su komparativne studije s različitim (ne PDL-om) laserima kao izvorima svjetla za PDT. No, rezultati su bili kontradiktorni (65, 66).

Laser bi mogao biti idealan izvor svjetlosti za PDT, jer emitira specifičnu valnu duljinu koja odgovara apsorpcijskom vršku FS-a, s fokalnom preciznošću te omogućuje tretiranje malih lezija s minimalnim oštećenjem okoline unutar kratkog vremenskog razdoblja (47, 49). No ipak, u PDT-u određenih dermatoloških bolesti laseri ne pokazuju prednost nad jeftinijim i praktičnijim nekoherentnim izvorima svjetlosti (47, 63, 67).

1.2.3.2.2. Nekoherentni izvori svjetla

Prednost nekoherentnih izvora svjetla je emitiranje velikog polja zračenja koje omogućava tretiranje veće površine kože (57). Koriste se fluorescentne lampe, lampe sa svjetlećim diodama LED (engl. *Light Emitting Diode*) (49) i IPL (engl. *Intense Pulsed Light*) (68). Iako se pri primjeni fluorescentnih i ostalih lampi koriste filtri, spektar svjetlosti koje emitiraju je širok (50 – 130 nm) u halogenim, dok je kod LED lampi uži (25 nm). Stopa potpunog odgovora ALA – PDT s izvorom uskog spektra je relativno viša (85 %) u usporedbi s lampom širokog spektra (68 %) (69).

Posljednjih godina primjenjuje se vidljiva ambijentalna svjetlost u PDT s rezultatima koji nisu inferiorni naprama konvencionalnom PDT-u s nekoherentnim izvorom svjetla (70).

Neovisno o izvoru svjetla i njegovoj valnoj duljini važno je primijeniti odgovarajući dozu - „fluence“ (J/cm^2) te „iradijaciju“ tj. intenzitet svjetla (mW/cm^2). Da bi crveno svjetlo bilo učinkovito primjerena doza je oko 100 J/cm^2. No, intenzitet zračenja ne bi trebao biti previsok (od 25 do 50 mW/cm^2), jer se time prenaglo „potroši“ velika količina kisika i iscrpljuje FS, što vidimo po smanjenom intenzitetu fluorescencije FS-a tzv. *photobleachinga* (PB), čime se smanjuje učinkovitost (71, 72).

1.2.3.3. Postupci koji povećavaju učinkovitost fotodinamske terapije

Koristi se nekoliko postupaka kako bi se povećala učinkovitost PDT-a osobito pri liječenju nodularnog BCC-a ili debljih lezija. Problem PDT-a je upravo plitka penetracija u kožu što se pokušava povećati primjenom dimetilsulfoksida (DMSO) koji olakšava penetraciju ALA-e (73). Pažljivom pripremom hiperkeratotičkih tumora prije PDT-a poput nježne ekskohleacije, okluzije lezije s keratolitikom noć prije tretmana, mikrodermoabrazije ili laserske ablacije, olakšava se penetracija FS-a (74, 75). No, ne slažu se svi autori s učinkovitošću takvih postupaka (76). Priprema tumora prije PDT-a važnija je kod nodularnih BCC-ova, kod kojih se provodi tzv. *debulking* – intenzivnija, dublja ekskohleacija (77).

Slaba točka PDT-a je i potrošnja PpIX – tzv. *photobleachinga*. Uočeno je da frakcioniranje PDT-a u dva ciklusa omogućuje reoksigenaciju i ponovno stvaranje FS-a tijekom razdoblja neobasjavanja. Studije kojima se dokazala učinkovitost frakcioniranja provedene su različitim dozama i vremenskim razmacima (78, 79), ili s vrlo kratkim (60 sekundnim) intervalima neobasjavanja (80). No, studija Babilasa i sur. pokazuje da učinkovitost PDT-a ovisi o primijenjenoj dozi i da frakcioniranje ne mijenja učinkovitost

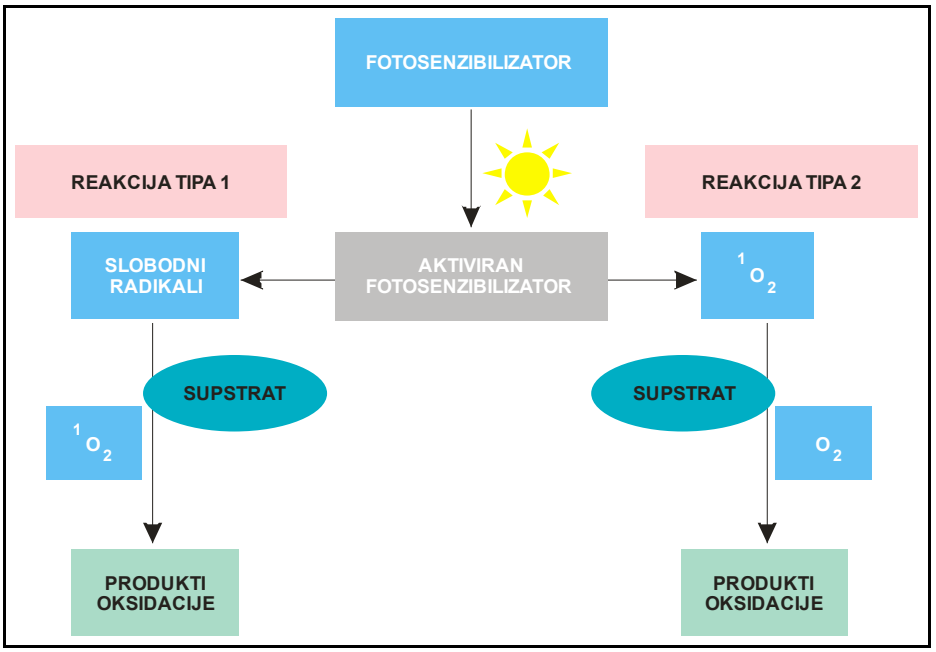
PDT-a (81). Nagli PB smatra se čimbenikom koji smanjuje učinkovitosti PDT-a i vezan je uz intenzitet (mW/cm^2) svjetla, a ne uz dozu (J/cm^2). Ukoliko je svjetlo visokog intenziteta (oko 150 mW/cm^2), nastaje prenagla fotokemijska reakcija i nagla potrošnja kisika te je nastavak fotodinamskog procesa blokiran. Osvjetljavanja svjetlom nižeg intenziteta (od 25-50 mW/cm^2) omogućuju stalan dotok kisika i time bolji učinak. No, vrijeme obasjavanja je time produljeno (82).

1.2.4. MEHANIZAM DJELOVANJA FOTODINAMSKE TERAPIJE

U PDT reakciji sudjeluju tri osnovna sastojka: molekula fotosenzibilizatora, svjetlo s odgovarajućom valnom duljinom i prisutnost kisika. Interakcija između ta tri sastojka glavni je dio učinka liječenja. Oštećenje stanica je posljedica izravnih oštećenja ili sekundarnih učinaka koji su posljedica upale ili oštećenja krvnih žila (83).

1.2.4.1. Molekularni učinci fotodinamske terapije

Kisik tj. njegovi reaktivni spojevi su osnovni izvršitelji oštećenja uzrokovanog PDT-om (slika 7.) (83). *In vitro* studijama je dokazano potpuno zaustavljanje fotodinamske reakcije u hipoksičnom tkivu (84). Hipoksija nastaje zbog oštećenja krvnih žila ili zbog „potrošnje“ lokalne koncentracije kisika u tkivu tijekom PDT-a.



Slika 7. *Reakcija tipa 1 i reakcija tipa 2 PDT-a (83)*

Nakon što svjetlo djeluje na molekulu FS-a i pobudi je, ona prelazi u pobuđeno triplet stanje. Molekula fotosenzibilizatora prenosi energiju na molekulu kisika koja prelazi u pobuđeno singlet stanje te vrlo brzo prenosi energiju na biološke strukture u neposrednoj blizini – lipide, proteine i nukleinske kiseline. FS se vraća u svoje osnovno energetsko stanje te je spreman za novi ciklus pobuđivanja svjetlom. Ova reakcija u PDT-u naziva se reakcija tipa 2. „Život" singlet kisika je kratkotrajan te učinak reaktivnog kisika ovisi o njegovoj lokalizaciji. Tip 1 reakcija odnosi se na izravno djelovanje energije pobuđene molekule FS-a na biološke strukture – predajući atom vodika i stvarajući slobodne radikale (49, 83).

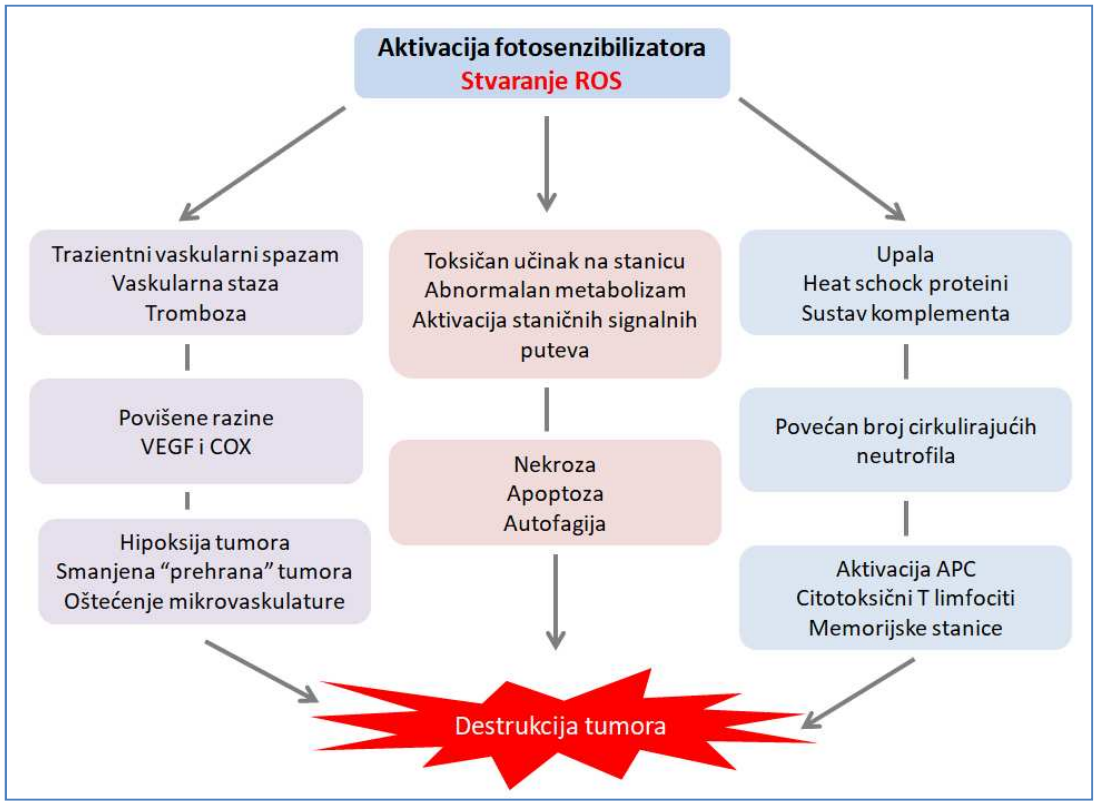
1.2.4.2. Stanično oštećenje tijekom fotodinamske terapije

Fotodinamska terapija inducira tri različite stanične smrti (slika 8.) (85, 86). Prvi tip je poznat kao nekroza, nasilni i brzi oblik degeneracije karakterizirane uništavanjem organela i poremećajem plazmatskih membrana, što uzrokuje oslobađanje unutarstaničnih sadržaja i upale. Nekroza se naziva i slučajnom smrti stanica uzrokovana fizičkim ili kemijskim oštećenjima i općenito se smatra neprogramiranim procesom, a posredovana je proteolitičkim aktivnostima (85, 86).

Druga vrsta stanične smrti je apoptoza. Apoptoza se, za razliku od nekroze, pojavljuje u pojedinačnim stanicama, okružena je uglavnom zdravim stanicama. Očituje se skupljanjem (skvrčavanjem) stanica te promjenama u unutarstaničnim organelama koje zadržavaju svoju cjelovitost dulje vremensko razdoblje dok konačno nisu fragmentirane u više membranom omeđenih vezikula. Ta apoptotička tijela bivaju uklonjena fagocitima bez aktivacije upale. Apoptoza zahtijeva transkripcijsku aktivaciju specifičnih gena te uključuje aktivaciju endonukleaza, posljedičnu degradaciju DNK i aktivaciju kaspaza (85). Otkrivene su i druge vrste staničnih smrti, primjerice stanična smrt kao posljedica autofagije. Autofagija kao posljedica fotodinamičkog učinka ima stanično-zaštitne, ali i stanično-destruktivne funkcije (87, 88).

Obilježje oštećenog procesa autofagije je stvaranje oksidativnog stresa, koje proizlazi iz nejednakosti između stvaranja i uklanjanja slobodnih radikala te reaktivnih kisikovih spojeva (ROS). Iako je prvi ROS koji nastaje tijekom PDT-a singletni molekularni kisik, i drugi ROS-ovi su upleteni u fototoksične mehanizme PDT-a, osobito vodikov peroksid i hidroksilni radikal (reakcija tipa 1), a imaju još snažnije citotoksične učinke. Pretpostavlja se

da fotosenzibilizatori koji se nakupljaju u lizosomima mogu povećati učinkovitost PDT-a, jer onemogućavaju potencijalni zaštitni stanični put – autofagiju (88).

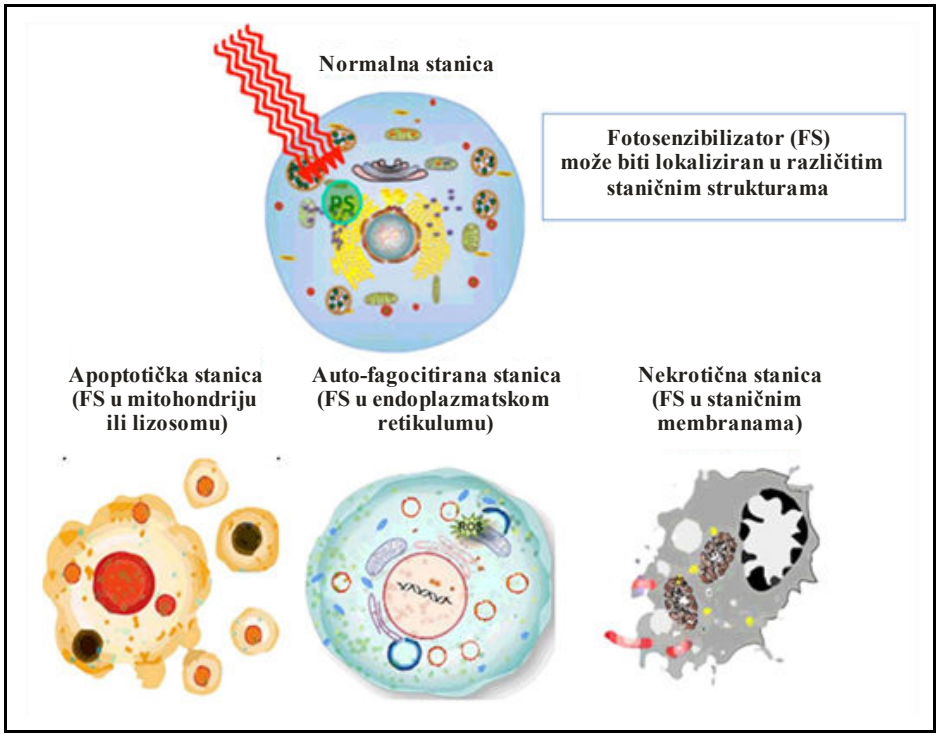


Slika 8. *Tri osnovna mehanizma protutumorskog učinka PDT-a (86)*
** kod sustavne primjene fotosenzibilizatora, VEGF- vaskularni endotelni faktor rasta, COX-2 – Ciklooksigenaza-2, APC – antigen prezentirajuće stanice, ROS – reaktivni kisikovi spojevi*

Prema tome, citotoksični učinak fotosenzibilizatora ovisi o njegovoj lokalizaciji u stanici, a lokalizacija ovisi o njegovoj lipofilnosti (slika 9.) (58). Lipofilni fotosenzibilizatori se nakupljaju u membranama stanica i staničnih organela. Fotooksidacija lipida i proteina membrane aktivira fosfolipaze koje degradiraju i oštećuju fosfolipide što uzrokuje nekrozu. Pobuđeni hidrofilni fotosenzibilizatori, koji su endocitozom i pinocitozom ušli u lizosome i endosome, oslobađaju citosol, a mogu djelovati na tubulin – strukturu važnu za staničnu diobu. Stoga hidrofilni fotosenzibilizatori uzrokuju apoptozu (49, 87).

Vrstu stanične smrti određuje i doza PDT-a. Pretpostavlja se da niže doze PDT-a uzrokuju apoptozu, dok veće doze uzrokuju nekrozu (89). Niže doze PDT-a djeluju na fotosenzibilizator unutar mitohondrija uvjetujući oslobađanje citokroma C, što aktivira kaspazu 3. Kaspaze su proteolitički enzimi odgovorni za započinjanje i provođenje apoptotičkih procesa. Fotodinamski učinak može se ostvariti selektivno smanjujući Bcl-2 –

anti – apoptotički protein, ali i mijenjajući razinu kalcija, koji djeluje na prije spomenute fosfolipaze (90). Ima dokaza o utjecaju na brojne druge stanične elemente, signale molekule (MAP-kinaze), adhezijske molekule i dr. (87).



Slika 9. *Prevladavajući oblik stanične smrti ovisi o lokalizaciji fotosenzibilizatora (58)*

Stanični odgovor na PDT je iznimno kompleksan, a ovisi i o tipu fotosenzibilizatora, dozi PDT-a, vrsti stanica te o fazi proliferacije u kojoj se stanica nalazi što je čini predodređenom za određeni tip reakcije (90).

1.2.4.3. Učinci fotodinamske terapije na krvne žile

Fotodinamska terapija ima snažan utjecaj na krvne žile uzrokujući prije svega vaskularnu stazu. Nastala hipoksija ima dvojaki učinak. Uzrokuje hipoksiju stanice i time apoptozu, ali zbog smanjenog pritoka kisika blokira daljnji fotokemijski proces. Nakon sustavne primjene fotosenzibilizatora pojavljuje se tromboza te vazokonstrikcija arteriola i manjih venula. Takav učinak se ne vidi nakon lokalne primjene fotosenzibilizatora (49).

1.2.4.4. Učinci fotodinamske terapije na imunosni sustav

Fotodinamska terapija uzrokuje akutni upalni odgovor urođenog i stečenog imunosnog sustava. Nakon PDT-a neutrofili i druge upalne stanice migriraju u ciljno područje. Potrebna je brza i snažna migracija neutrofila radi djelotvornog protutumorskog odgovora. PDT se pokazao manje učinkovit u miševa s teškom kombiniranom imunodeficijencijom (90) te snažnije učinkovit, ukoliko je miševima prije PDT-a, dodan čimbenik stimulacije granulocitnih kolonija (G-CSF) (49).

Tijekom prvih sati nakon PDT-a primijećen je porast mijeloidnih stanica, uključujući monocite i mastocite. U ranim fazama nakon PDT-a luči se TNF koji privlači neutrofile. Mobilizacija neutrofila ima ključnu ulogu u aktivaciji CD8 + T-stanica (91). Pokazalo se da se makrofazi aktiviraju i pri niskim dozama PDT-a. Makrofazi, kao i limfociti, nakon PDT-a, a putem lizofosfatidilkolina, uzrokuju stvaranje čimbenika za aktivaciju makrofaga (MAF). Nekoliko studija također je pokazalo povećanje aktivnosti stanica NK nakon PDT-a, koje pridonose protutumorskom imunosnom odgovoru (91).

Drugi mehanizam kojim PDT može izazvati akutnu upalu je putem oksidativnog stresa koji aktivira čimbenike transkripcije – nuklearni faktor κB (NF-kB) i aktivatorski protein 1 (AP1). PDT je također uključen u modulaciju komplementarnog sustava, koji uzrokuje oslobađanje proupalnih citokina (IL-6, TNF), te tromboksana, histamina, prostaglandina, leukotriena, G-CSF i čimbenika zgrušavanja. Otpuštanje tromboksana utječe na endotelne stanice, uzrokujući zatvaranje mikrovaskulature, što uzrokuje ishemiju. Citokin IL-6 utječe na stvaranje megakariocita i hematopoetskih prekursorskih stanica. Općenito, pretpostavlja se da IL-6 potiče protutumorski imunosni odgovor djelujući zajedno s TNF-om (91).

Potvrđeno je da doista postoji protutumorski imunosni odgovor nakon PDT-a. No, postoji i znatna varijabilnost tog odgovora zbog različitih parametara PDT-a, kao što je izbor FS-a, doza FS-a i svjetlosti, kao i intenzitet primijenjene svjetlosti (91).

1.2.5. INDIKACIJE I UČINKOVITOST FOTODINAMSKE TERAPIJE

Lokalni PDT je široko primijenjena neinvazivna terapija za određene nemelanomske karcinome kože, koja omogućava liječenje velikih i višestrukih lezija s izvrsnim kozmetskim učinkom. Učinkovitost PDT-a je dokazana u liječenju nehiperkeratotičkih aktiničkih keratoza (AK), Bowenove bolesti (BD), površinskog BCC-a i tankog nodularnog BCC-a. Stope recidiva nakon PDT-a jednake su postojećim terapijama, iako su veće od kirurške ekscizije kod nodularnog BCC-a. Za invazivni SCC ne preporučuje se PDT (75). Učinkovitost PDT-a ovisi i o drugim varijablama kao što je doza i intenzitet svjetla, trajanje ekspozicije, izvor svjetlosti, trajanje inkubacije FS-a i upotreba pojačivača penetracije (92, 93).

Tanke i umjereno debele AK na licu i vlasištu reagiraju na PDT nakon tri mjeseca jednako ili bolje od krioterapije, sa stopama potpune regresije od 89 do 92 %, a nakon jedne godine sa stopama od 63 do 78 %, ovisno o protokolu (75). Europske smjernice izdvajaju PDT kao terapiju za AK ukoliko su višestruke i/ili konfluirane, na mjestima otežanog cijeljenja te kada su druge lokalne terapijske mogućnosti zakazale (75).

U PDT BD-a uočena je potpuna regresija nakon 3 mjeseca u rasponu od 86 do 93 % (nakon jednog ili dva ciklusa), odnosno, 68-71 % nakon dvije godine što odgovara konvencionalnoj terapiji, ali s boljim kozmetskim učinkom (75). Smjernice preporučuju PDT kao tretman izbora za BD-ove velikih i malih površina na mjestima otežanog cijeljenja te kao dobru terapiju za velike lezije na mjestima koja dobro cijele (75).

Učinkovitost PDT-a u potpunoj regresiji BCC-a kreće se od 62 do 91 % za pBCC i 50 do 92 % za nBCC (94), a uvjetovana je, među ostalim, lokalizacijom i veličinom tumora (95).

Europske smjernice preporučuju lokalni PDT za primarne pBCC-e i tanke niskorizične nBCC-e, ali je relativno slab izbor za visokorizične BCC-e. Fotodinamska terapija može se primijeniti u liječenju nBCC-a ukoliko je kirurško liječenje relativno kontraindicirano, nepraktično ili bolesnik preferira neinvazivno liječenje (39, 75).

Osim ovih indikacija PDT se koristi i za moguću prevenciju NMSC-a u imunosuprimiranih bolesnika. PDT se može primijeniti na velikim površinama te se sve više koristi u terapiji tzv. polja kancerizacije (engl. *Field Cancerisation* – FC). Ono predstavlja biološki proces u kojem je veliki broj stanica na površini kože pogođen kancerogenim promjenama, obično na fotooštećenoj koži. Terapije usmjerene na FC imaju mogućnost liječenja i supkliničkih promjena što uzrokuje rjeđu pojavu novih klinički vidljivih tumora.

Postoje dokazi o učinkovitosti PDT-a u prevenciji AK-a i BCC-a, ali ne i za prevenciju invazivnih SCC-a (96).

Ostale indikacije za PDT, koje ne ubrajamo u područje onkologije, su akne, virusne bradavice, kožna lišmanijaza te pomlađivanje kože uz pomoć svjetla (96).

1.2.6. NUSPOJAVE FOTODINAMSKE TERAPIJE

Fotodinamska terapija se općenito dobro podnosi. Neposredno nakon liječenja često se vidi eritem i lagani edem, a nakon nekoliko dana kruste i površinske erozije. Dublje ulceracije su rijetke (97). Najznačajnija nuspojava je bol (98). Većina bolesnika u tretiranom području tijekom izlaganja svjetlu opisuje peckanje, žarenje ili „bockanje“. Razlog nastanku boli nije jasan. Moguće objašnjenje je hipertermija tkiva. Međutim, rezultati dobiveni mjerenjem infracrvenog zračenja tijekom PDT-a nisu povezivali osjećaj boli s povećanjem tjelesne temperature (99). Osjećaj boli može biti posljedica fotokemijske reakcije u tkivu, a odnosi se na prisutnost reaktivnog singlet kisika u blizini ili u živčanim završecima. Ovo je sukladno kliničkom iskustvu da vrhunac boli nastaje nakon nekoliko minuta obasjavanja kada je fotodinamska aktivnost visoka, a zatim se postupno smanjuje (98, 100). Bolove bolesnik može osjećati i tijekom nekoliko sati nakon PDT-a, a oni su posljedica nekroze, apoptoze stanica te posljedične upale (47).

Bolnost je povezana s lokalizacijom, veličinom i tipom lezije i izraženija je na licu i glavi u usporedbi s drugim dijelovima tijela (101). Bolnost je kod liječenja AK-a veća nego kod PDT-a BCC-a (101). Postoje studije o nižoj boli u MAL-PDT-u u usporedbi s ALA-PDT-om (102), kao i o različitoj razini boli ovisno o izboru svjetla te o načinu osvjetljavanja (103, 104).

Kako bi se smanjila bolnost koriste se razne metode (lokalni anestetik, premedikcija, hlađenje ventilatorom ili prskanje tretiranog područja vodom). Trenutačno ne postoji standardni protokol za ublažavanje boli tijekom PDT-a (97).

1.2.7. KOZMETSKI UČINAK FOTODINAMSKE TERAPIJE

Glavne prednosti PDT-a su niska razina invazivnosti i izvrsni kozmetski rezultati (71). Ožiljci kao posljedica PDT-a su vrlo rijetki. Rijetko (u 1 %) se vide postinflamatorne hipopigmentacije ili hiperpigmentacije (105, 106) i gubitak kose (107), koji je u PDT BCC-a češći, a ponekad i trajan (108). Nakon lokalnog PDT-a, lokalizirana fotosenzibilnost može trajati do 48 sati.

1.3. PULSED-DYE LASER

Pulsed-dye laser (PDL) zlatni je standard za liječenje kožnih vaskularnih lezija. PDL uzrokuje selektivnu fototermalnu ozljedu krvnih žila tkiva. Pulsna laserska zraka koju emitira PDL je u spektru žutog svjetla (577-600 nm) i apsorbira se u hemoglobinu u proširenim kapilarama gornjeg dermisa. Apsorbirana energija se pretvara u toplinu, uzrokujući toplinsko oštećenje i trombozu u ciljnim krvnim žilama (109).

1.3.1. POVIJEST LASERA

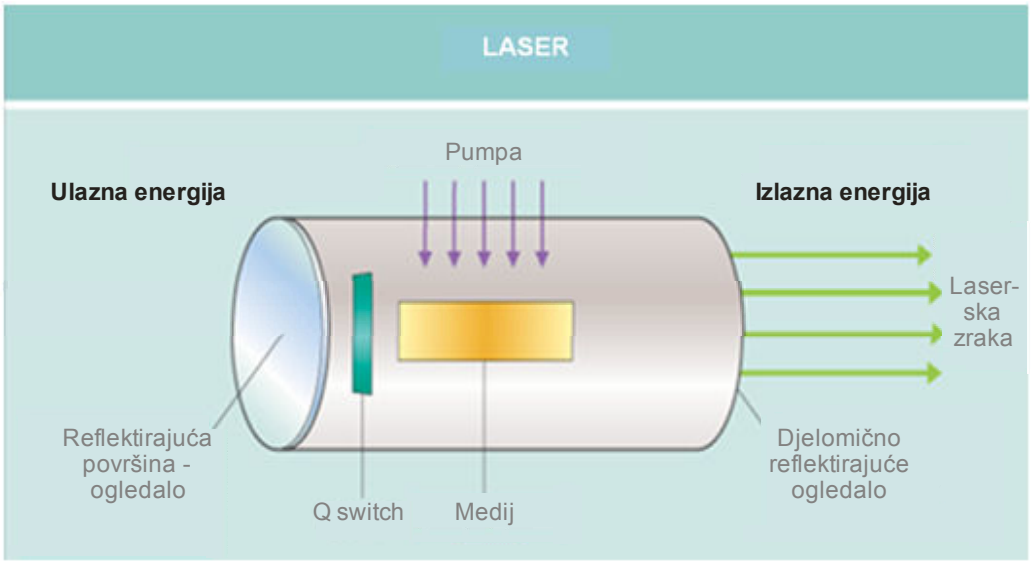
Riječ LASER je akronim za „Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation“, koja zapravo opisuje osnovni princip nastanka laserskog svjetla.

Da bismo razumjeli porijeklo laserske tehnologije, moramo se vratiti u prve godine 20. stoljeća kada su otkrića Plancka i Einsteina postavila znanstvenu osnovu za razvoj lasera (110). Max Planck je 1900. g. otkrio odnos energije i frekvencije zračenja te zaključio da se energija može emitirati ili apsorbirati samo u diskretnim „paketima“ ili dijelovima nazvanim „kvant“. Pet godina poslije Albert Einstein teoretski je opisao kako svjetlo isporučuje energiju u „paketima“, koje predstavljaju fotoni, diskretne kvantne čestice. Kasnije, 1916. g., Einstein je uveo pojam stimulirane emisije: fotoni, interakcijom s pobuđenim atomima ili molekulama, mogu stimulirati emisiju novih fotona koji imaju istu frekvenciju, fazu, polarizaciju i smjer kao i ishodišni foton. Ipak, tek 1954. g. Einsteinova teorija se počela primjenjivati u praksi. U toj godini predstavljen je MASER („Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation“), poseban uređaj za stvaranje mikrovalnog zračenja. Godine 1958. Townes i Schawalow, teoretski su dokazali da MASER-i mogu raditi u optičkim i infracrvenim područjima. Konačno, 16. svibnja 1960. g., fizičar Theodor Maiman konstruirao je prvi laser

pomoću cilindra od sintetičkog rubina, sa završetcima izrađenim od srebra kako bi reflektirali svjetlo i poslužili kao rezonator. Kao izvor svjetla ili pumpu koristio je fotografsku bljeskalicu (111). Tijekom sljedećih 50 godina, novi laserski strojevi različitih valnih duljina i karakteristika postaju dostupni u raznim područjima ljudskog djelovanja od telekomunikacija do industrije, od aeronautike do medicine (110).

1.3.2. LASER I LASERSKA ZRAKA

Svi laserski sustavi sastoje se od četiri osnovne komponente: (1) ime lasera se tvori obično po plinovitom, tekućem ili krutom mediju, koji se nalazi unutar cilindra, a može biti pobuđen odgovarajućim (2) izvorom energije („pumpom“) koji potiče medij na stimuliranu emisiju. Pobuđeni fotoni se reflektiraju u (3) ogledalima na krajevima cilindra, stvarajući tako „optičku šupljinu“ koja okružuje medij te ograničava, ali i pojačava, proces stimulirane emisije. Isti stvara specifične zrake koje se potom, putem (4) sustava isporuke, prenose do ciljnog mjesta djelovanja (slika 10.) (112).



Slika 10. *Osnovne komponente lasera (112)*

Laserske zrake su osobite po tri osnovne kvalitete (49).

Lasersko svjetlo sadrži samo jednu valnu duljinu ili vrlo uski raspon valnih duljina, tj. ono je monokromatsko. Svjetlosni valovi koji dolaze iz lasera koherentni su, odnosno u fazi, što je jedinstvena kvaliteta laserske zrake. Zbog minimalnog kuta divergencije (razilaženja

zraka), lasersko svjetlo je koncentrirano i može se lako prenositi na velike udaljenosti putem optičkih vlakana (49). Laseri mogu zračiti svjetlo u kontinuiranim i pulsnim valovima. U kontinuiranom modu, laseri proizvode konstantnu svjetlosnu zraku. Laseri koji zrače u kratkim impulsima mogu time postići vrlo velike snage u pulsu čime su učinkovitiji. Intervali između pulseva mogu biti različito dugi, čime se štiti tkivo oko ciljnog mjesta od termalnog oštećenja (112).

1.3.3. LASER U DERMATOLOGIJI

Leon Goldman, također poznat kao „otac lasera u medicini“, bio je prvi koji je 1963. g. koristio laser u dermatologiji. U svojim studijama, Goldman je izvijestio o učincima Maimanovog lasera u selektivnom uništavanju pigmentiranih struktura kože; opisao je potencijalnu uporabu rubi-lasera i inovativnog Q switched uređaja u uklanjanju tetovaža. Istraživao je upotrebu argonskog lasera u liječenju vaskularnih malformacija i CO_2 lasera za fotoeksciziju kožnih lezija (110). Samo godinu dana kasnije, Dougherty je upotrijebio laser u PDT-u (110).

Djelovanje lasera temelji se na principu selektivne fototermolize (SPT), koncepta kojeg su 1983. g. razvili Anderson i Parrish, upravo na PDL-u s namjerom učinkovitijeg liječenja *nevusa flammeusa* (113). SPT je proces selektivnog oštećenja kromofore svjetlom. Tri su osnovna preduvjeta potrebna za postizanje SPT: (1) valna duljina koja se preferencijalno apsorbira u ciljnoj strukturi, (2) trajanje izlaganja (puls) je manje ili jednako vremenu „toplinskog opuštanja“ ciljne strukture (vrijeme koje je potrebno da se ciljna struktura ohladi prenoseći toplinsku energiju okolnom tkivu) i (3) dovoljna doza zračenja (*fluence* – isporučena energija po jedinici površine – J/cm^2) kako bi se postiglo termalno oštećenje u ciljnoj strukturi (113).

Krvožilne promjene se često liječe laserima zbog njihove sposobnosti da specifično ciljaju intravaskularni oksihemoglobin. Ova endogena kromofora ima tri primarna apsorpcijska vrška unutar spektra vidljivog svjetla: 418, 542 i 577 nm. Oksihemoglobin apsorbira lasersku svjetlost koja se naknadno pretvara u toplinu i prenosi na stijenku krvne žile, uzrokujući koagulaciju i njenu okluziju. Iako vaskularni laseri uzrokuju nehomogeno termalno oštećenje unutar krvnih žila dermisa zbog različitih promjera njihovih lumena, učinkoviti su u tretmanu krvnih žila malih i velikih promjera. U kliničkoj praksi najčešće se koriste kalij–titanil-fosfatni laser (KTP, 532 nm), PDL (585-595 nm), aleksandritni laser (755

nm), diodni laser (800-810, 940 nm) i laser s krutom jezgrom koji se sastoji od štapića itrij-aluminijevog granata (YAG), oplemenjen atomima neodimija (Nd: YAG, 532 i 1064 nm) (114).

Pulsed-dye laser je vrlo učinkovit za liječenje širokog raspona vaskularnih lezija. Koristi se u liječenju kožnih promjena koje nisu primarno vaskularne prirode poput hipertrofičnih i keloidnih ožiljaka, strija, virusnih bradavica, angiofibroma te psorijaze noktiju. Noviji PDL s duljim valnim duljinama i produljenim trajanjem pulsa omogućili su dublji prodor u tkivo i veću učinkovitost (114). Zbog selektivnog djelovanja toplinsko oštećenje dermisa je ograničeno na vrlo usku subepidermalnu ili perivaskularnu zonu koagulacije te su ožiljci rijetki (109).

1.3.4. PULSED-DYE LASER U LIJEČENJU BAZOCELULARNOG KARCINOMA

Iako klinička očitovanja BCC-a mogu biti različita, zajednička im je prisutnost površinskih kapilara (115). Budući da BCC sadržava krvne žile neposredno ispod epidermisa, veličine 0,2 mm ili šire (115), PDL se posljednjih nekoliko godina primjenjuje u liječenju BCC-a, ali kao vaskularni laser (principom selektivne fototermolize), bez FS-a. Prva mala pilot studija, provedena jednokratno u 7 bolesnika laserom valne duljine od 585 nm, *fluencom* od 6,0 J/cm^2 i s trajanjem pulsa od 0,45 ms, nije bila učinkovita (116). Slična studija s jednokratnim tretmanom, također s 585 nm, bila je nedovoljno učinkovita, a potpuna regresija se vidjela u 5/9 tumora (55,6 %) (117). U naknadnim studijama bolja učinkovitost se pokušala ostvariti primjenom višestrukih tretmana. BCC-i su bili tretirani jednim prijelazom u 4-5 navrata, u razmacima od 2 do 4 tjedna. Postignuta je potpuna regresija BCC-a u 65 do 90 % slučajeva (118-123). Tran i sur. uspjeli su dovesti do potpune regresije 71 % BCC-a u samo jednom tretmanu, koristeći tehniku „naslaganih pulseva“ (impulsi su potpuno preklopljeni i apliciraju se „složeni“ jedan na drugi) (124). Ista tehnika naslaganih pulseva korištena je i u maloj studiji s visokorizičnim BCC-ima lica, ali ipak u tri navrata, s potpunom regresijom u 66 % slučajeva što je potvrđeno patohistološkom analizom (125). Nedavno je provedena jedina kontrolirana randomizirana studija na 39 bolesnika sa 100 BCC-a, s parametrima nalik prethodnim studijama s 595 nm laserom te potpunom regresijom u 78,6 % slučajeva, koja je nakon 6 mjeseci potvrđena patohistološkom analizom (126).

Temeljem mogućnosti postizanja dublje penetracije, kombinirani su PDL i Nd:YAG laser, koji su također višestrukim tretmanima doveli do potpune regresije u 55,8 % slučajeva (127).

1.4. PDL-PDT U LIJEČENJU BAZOCELULARNIH KARCINOMA

Iako je maksimalna apsorpcija svjetlosti PpIX u spektru plavog svjetla, preferira se korištenje nižeg apsorpcijskog vrška u crvenom dijelu spektra vidljivog svjetla, jer dublje prodire u kožu (49, 60). Definirani su i drugi vrhovi apsorpcije PpIX, pronađeni na 510, 545 i 580 nm (47). PDL se koristio i kao izvor svijetla za PDT (PDL-PDT), jer se njegova valna duljina (585-595 nm) nalazi u jednom od nižih apsorpcijskih vrškova PpIX, u žutom dijelu spektra vidljivog svjetla.

Usporedna studija učinkovitosti različitih klinički korištenih izvora svjetlosti, uključujući lasere, otkrila je da sve vidljive valne duljine dobro aktiviraju PpIX (92), a PDL inducira blagu, ali primjetnu fotodinamičku reakciju, koja se može pripisati djelovanju svjetla na fotosenzibilizator (128). Rezultati studija na eksperimentalnim modelima pokazuju da PDT s PDL-om ima izraženiji učinak na krvne žile od PDL ili PDT kada se primjenjuju samostalno te da PDL-PDT treba vrednovati kao alternativnu terapijsku opciju za liječenje kožnih promjena s izraženim krvnim žilama (129).

Pulsed-dye laser kao izvor svjetla za PDT (PDL-PDT) primijenjen je u liječenju AK-a (64) i aktiničkog heilitisa (130) te BD-a (131). PDL-PDT se uspješno koristio i u liječenju intraoralne leukoplakije (132). Studije učinkovitosti PDL-PDT-a u terapiji akne su oprečne (133-135). Vrlo mali broj studija uspoređivao je kliničku učinkovitost PDL-PDT s konvencionalnim PDT-om nekoherentnim svjetlom (kPDT) i to samo u liječenju AK-a i BD-a (63, 67, 136) te akne (137). Samo je jedna mala pilot studija na 6 bolesnika uspoređivala ova dva terapijska modaliteta u liječenju BCC-a (138).

1.5. PROBLEMATIKA ISTRAŽIVANJA

Liječenje bolesnika s višestrukim BCC-ima kože, raspoređenih na više anatomskih područja, može biti izazovno. Fotodinamska terapija može biti dugotrajan terapijski postupak, osobito ako se izvodi u više navrata. Stoga bi bilo prikladnije tretirati višestruke niskorizične BCC-e PDL-PDT-om, jer to zahtijeva znatno manje vremena (ukupno 3-5 minuta). Bol tijekom faza osvjetljenja prepreka je široj primjeni PDT-a (47). S druge strane, bol zabilježena u bolesnika tijekom liječenja PDL-PDT-om značajno je manja (63).

Temeljem ovih zapažanja, pretpostavlja se kako bi jedan tretman PDL-PDT-om korišten s postavkama nalik onima korištenih u prethodno objavljenim PDL-PDT studijama, ali s većom širinom pulsa i s „tri prolaza“, mogao biti jednako učinkovit kao liječenje kPDT-om, jer kombinira učinke fotodinamske terapije i selektivne fototermolize.

Višestruki BCC-i opterećuju zdravstveni sustav te postoji potreba za terapijskim modalitetom, odgovarajućim za BCC-e niskog rizika, koji će smanjiti invazivnost i neugodu bolesniku, ali i vrijeme boravka u zdravstvenoj ustanovi.

Iako PDL-PDT zadovoljava spomenute preduvjete, ne postoje studije o učinkovitosti PDL-PDT u liječenju BCC-a, osim male pilot studije na 6 bolesnika. Ujedno, nije jasno pruža li ta metoda jednaku dobrobit kao i zlatni standard – kPDT, kada je riječ o dobroj učinkovitosti, povoljnom kozmetskom učinku te niskoj razini boli. Ne postoje radovi koji su analizirali utjecaj tumorskih značajki (veličinu tumora te lokalizaciju) na učinkovitost PDL-PDT-a.

2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

2.1. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja sukladni su problematici istraživanja:

Glavni cilj istraživanja:

- Usporediti učinkovitost PDL-PDT-a s učinkovitošću kPDT-a u liječenju BCC-a, primijenjenih na istim bolesnicima s višestrukim BCC-ima (intraindividualna studija).

Sporedni ciljevi istraživanja:

- Usporediti razinu bolnosti tijekom PDL-PDT-a s boli tijekom kPDT-a, primijenjenih na istim bolesnicima s višestrukim BCC-ima (intraindividualna studija).
- Usporediti kozmetski učinak PDL-PDT-a s kozmetskim učinkom kPDT-a, primijenjenih na istim bolesnicima s višestrukim BCC-ima (intraindividualna studija).
- Analizirati utjecaj veličine tumora te lokalizacije tumora na učinkovitost PDL-PDT-a i kPDT-a.

2.2. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

1. PDL-PDT jednako je učinkovit u liječenju BCC-a kao i konvencionalan PDT.

2. Pri liječenju BCC-a, kozmetski učinak PDL-PDT-a jednak je kozmetskom učinku konvencionalnog PDT-a.

3. Bolnost PDL-PDT terapije u liječenju BCC-a je manja nego u konvencionalnom PDT-u.

4. Veća površina BCC-a kao i njegova periferna lokalizacija imaju negativan utjecaj na učinkovitost PDL-PDT-a i konvencionalog PDT-a.

3. ISPITANICI I POSTUPCI

3.1. ISPITANICI

U studiju su uključeni bolesnici s patohistološki potvrđenim višestrukim BCC-ima koji su došli na pregled u ambulantu Klinike za kožne i spolne bolesti, KBC-a Split, kojima bi terapija izbora bila fotodinamska terapija (prigodan uzorak). Istraživanje je intraindividualno (oba terapijska modaliteta se primjenjuju na različitim tumorima istog bolesnika) kako bi se bolje analizirali bolnost i kozmetski učinak.

Kriteriji uključivanja bolesnika u studiju su:

- bolesnik s najmanje dva BCC-a
- bolesnik kojem su biopsijom dokazani bazocelularni karcinomi nodularnog ili površinsko-širećeg podtipa
- bolesnik u životnoj dobi višoj od 18 godina sa spremnošću da slijedi terapijski protokol i naknadne kontrole

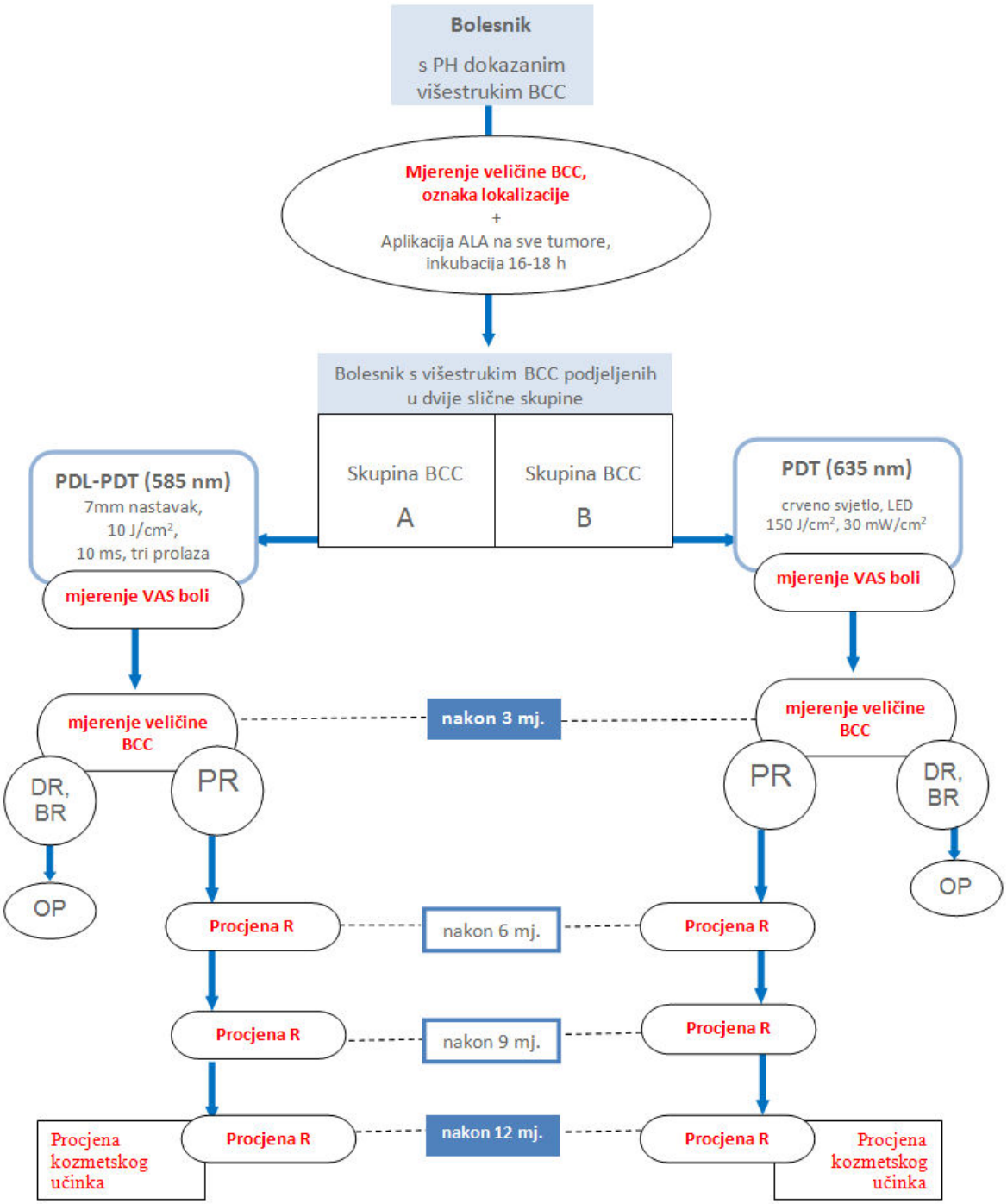
Kriteriji isključenja su:

- dojilje i trudnice
- jako pigmentiran BCC
- dijagnosticirana porfirija

U istraživanje je uključeno 15 bolesnika s ukupno 62 BCC-a.

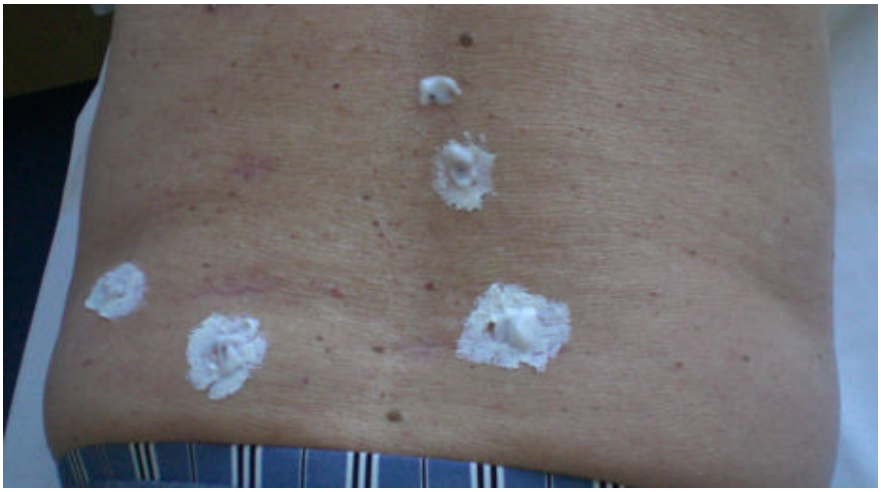
3.2. POSTUPCI

Bolesnici uključeni u studiju liječeni su u Klinici za kožne i spolne bolesti, KBC-a Split, primjenom postojećih uređaja i materijala. Po prijemu, bolesnicima su izmjerene površine tumora i na mapi su označene njihove lokalizacije (slika 11.). Mjerenje površine tumora (u mm^2) obavilo se precrtavajući ga na transparentan milimetarski papir, a procijenilo se brojanjem kvadratića.



Slika 11. *Hodogram istraživanja (BCC – bazocelularni karcinom, ALA – aminolevulinska kiselina, PDT – fotodinamska terapija, PDL-PDT – fotodinamska terapija posredovana pulsed-dye laserom, PR – potpuna regresija, DR – djelomična regresija, BR – bez regresije, R – recidiv)*

Potom se s površine tumora uklonila eventualna krusta te je nježno sastrugana površina tumora tupom stranom skalpela. Na tumor je ravnomjerno nanesen sloj 20 %-tne ALA kreme u debljini od oko 1 mm (slika 12.). Kremom je prekrivena površina tumora, ali



Slika 12. *Aplikacija ALA kreme*

i rub zdrave kože u širini od 5-10 mm. Tumori su zatim prekriveni slojem plastične folije i potom slojem aluminijske folije nepropusne za svjetlo. Krema ALA je pripremljena u bolničkoj ljekarni neposredno prije aplikacije. Nakon inkubacije 20 %-tnom ALA kremom od 16 do 18 sati, osvjetljavanje se izvršilo sljedećeg jutra (slika 13.).



Slika 13. *BCC nakon inkubacije ALA kremom, a neposredno prije tretmana kPDT-om*

Svi bolesnici su imali dva ili više tumora. Tumori su razvrstani u dvije skupine slične veličine. Jedna skupina BCC-a tretirala se 585 nm PDL-om sa 7 mm nastavkom i dozom od 10 J/cm^2 i s trajanjem pulsa od 10 ms. Laserske tretmane tehnikom „tri prolaza“ proveo je uvijek isti dermatolog. Ukupno vrijeme tretmana bilo je oko 3-5 minuta. Tijekom tretmana primjenjivalo se i hlađenje rashlađenim zrakom. Tretirani BCC-i su potom ponovno obloženi svjetlonepropusnim okluzivnim prijevojem.

Potom se tretirala druga skupina BCC-a LED lampom s crvenim svjetlom (635 nm) pri ukupnoj dozi od 150 J/cm^2 i intenzitetom od 30 mW/cm^2. Ukupno vrijeme liječenja bilo je oko 65 minuta (slika 14.). Neposredno nakon oba terapijska modaliteta bolesnici su ocjenjivali intenzitet boli – vizualnom analognom skalom boli (VAS), od 0 do 10, pri čemu je 0 bez boli, a 10 najjača bol.



Slika 14. *Bolesnica s dva BCC-a: jedan tretiran PDL-PDT-om (lividni halo) a jedan kPDT-om*

Mjera primarnog ishoda je potpuna regresija BCC-a nakon 3. i 12. mjeseca. Kliničke procjene provodile su se i u 6., 9. i 12. mjesecu. Tretirano područje je identificirano uz pomoć mape, u pojedinih bolesnika i kliničkim fotografijama. Procjenu je u 3. mjesecu nakon tretmana vršio iskusni dermatološki onkolog koji je bio „zaslijepljen“ i ocjenjivao je odgovor kao: 1) potpuna regresija (PR), 2) djelomična regresija (DR) >50 %, 3) djelomična regresija <50 % i 4) bez regresije (R). Bolesnici s potpunom regresijom i dalje su se pratili u 6., 9. i 12. mjesecu kako bi se uočio povrat bolesti. Tumori koji su u 3. mjesecu djelomično regredirali ili nisu pokazivali znakove regresije nisu se više pratili, nego se učinila biopsija i ukoliko se potvrdio recidiv, operativno su tretirani. „Zaslijepljeni“ ispitivač procjenjivao je i kozmetski učinak obje terapije u 12. mjesecu nakon terapije. Kozmetski učinak se ocjenjivao kao: 1) izvrsno – gotovo nalik okolnoj koži, 2) dobro – blagi eritem ili blaga hipo/hiperpigmentacija, 3) prihvatljivo – izrazit eritem ili hipo/hiperpigmentacija i 4) loše – stvaranje ožiljka.

3.3. MATERIJALI

3.3.1. PULSED-DYE LASER

Jedna skupina BCC-a tretirana je 585 nm PDL-om (Cynergy, Cynosure, Westford, MA, USA) (slika 15.a) 7 mm nastavkom i dozom (*fluence*) od 10 J/cm^2 i trajanjem pulsa od 10 ms.

Laserske tretmane je provodio uvijek isti dermatolog i to tehnikom „tri prolaza“ koja podrazumijeva da tretman uvijek počinje na gornjem lijevom kutu lezije i napreduje prema desno, a zatim dolje. Zmijolikim kretnjama pokrije se cijela lezija i oko 5 mm izvan klinički evidentnog ruba tumora, uz 10 % preklapanja. To se ponavlja na isti način još dva puta. Ukupno vrijeme trajanja tretmana je oko 3-5 minuta. Istovremeno primjenom lasera tretirano područje se i hladi rashlađenim zrakom („Cryo 6“, Zimmer Elektromedizin, Njemačka) (slika 15.b).



Slika 15. *a) PDL-Cynergy, Cynosure; b) Cryo 6; c) kPDT- MediLED 4 PDD i PDT*

3.3.2. UREĐAJ ZA FOTODINAMSKU TERAPIJU

Druga skupina BCC-a tretirana je kPDT-om crvenim nekoherentnim svjetlom (635 nm) uz pomoć aparata sa svjetlećim diodama (LED) (MediLED 4 PDD i PDT, Zavod za laserska i atomska istraživanja i razvoj, Institut „Ruđer Bošković“, Zagreb, Hrvatska) (slika 15.c), pri ukupnoj dozi od 150 J/cm^2 i intenzitetom od 30 mW/cm^2. Ukupno vrijeme liječenja bilo je 65 minuta.

3.3.3. KREMA ALA

Krema ALA je pripremljena u bolničkoj ljekarni neposredno prije primjene. Sastoji se od 20 % 5-ALA-hidroklorida (Medac, Hamburg, Njemačka) u masnoj podlozi (Belobaza, Belupo, Koprivnica, Hrvatska), 2 % dimetilsulfoksida (DMSO) i 2 % etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) (Titriplex III, Merck, Njemačka). Tumori su inkubirani ALA kremom 16 – 18 sati, a osvjetljenje je izvedeno sljedećeg jutra.

3.4. STATISTIČKI POSTUPCI

Važno je istaknuti kako su za analizu primarnog ishoda liječenja uzorak – tumori, a ne bolesnici.

Kako bi odredili optimalnu veličinu uzorka (tumora) za ovo istraživanje u kojem se želi dokazati ili opovrgnuti da je PDL-PDT (ispitivani terapijski modalitet) jednako učinkovit ili bolje rečeno, nije bitno lošiji od zlatnog standarda – kPDT-a (kontrola), potrebno je koristiti izračun za veličinu uzorka za studije neinferiornosti.

Učinkovitost kPDT-a u potpunoj regresiji bazocelularnog karcinoma je varijabilna i kreće se od 62 do 91 % za pBCC te 50 do 92 % za nBCC (9). Prema rezultatima sistematskog pregleda i metaanalize sveukupni PR bazocelularnog karcinoma je 84 % nakon 12 mjeseci od provedenog kPDT-a (139).

Učinkovitost PDL-PDT-a je teško procijeniti. Postoji samo jedna mala pilot studija na 6 velikih BCC-a koji su samo djelomično regredirali. Potpunih regresija nije bilo (138).

Zbog kliničke sličnosti uzete su u obzir i kliničke studije terapijskog učinka PDL-PDT-a na *in situ* planocelularnim karcinomima (Bowenova bolest). Stopa potpunih regresija varirala je od 60 (131) do 82 % (67). Zbog različitog kliničkog izgleda aktiničkih keratoza (hiperkeratoza, manjak krvnih žila) koje bi mogle interferirati s mehanizmom djelovanja PDL-PDT-a, studije učinkovitosti PDL-PDT-a na aktiničkim keratozama nisu uzete u obzir.

S obzirom na to da PDL-PDT može biti lošiji od kPDT-a, a da još uvijek bude učinkovit, važno je odrediti marginu neinferiornosti. Maksimalna vrijednost te margine je razlika stopa PR kontrole (kPDTa) i placeba. Tijekom ovog istraživanja kontrolna skupina nije bila placebo skupina, jer je riječ o malignom tumoru. Kao stopa učinkovitosti placeba može se uzeti broj BCC-a koji su spontano regredirali nakon uzete djelomične biopsije u svrhu dijagnoze tumora, koja iznosi 20 % (140). S obzirom na varijabilnost u učinkovitosti PDT-a pretpostavlja se kako je klinički opravdana margina neinferiornosti od 25 %.

Optimalna veličina uzorka je 27 tumora po skupini, uz pretpostavljenu očekivanu stopu odgovora za skupinu tretiranu PDL-PDT-om od 84 %, a za skupinu tretiranu kPDT-om 84 %, uz marginu neinferiornosti od 25 % i za 80 % snagu istraživanja. To ukupno čini 54 tumora (141).

Za statističku analizu korišten je program SPSS verzija 20 (IBM Corp., Armonk, N.Y., USA). Od deskriptivnih metoda koristio se prikaz apsolutnog i relativnog broja za

kategorijske vrijednosti, a srednja vrijednost i standardna devijacija ili medijan i interkvartilni raspon za kontinuirane numeričke varijable.

Učinkovitost PDL-PDT-a naprama kPDT-a u liječenju BCC-a, je procijenjena u 3. i 12. mjesecu, a iskazana je kvalitativnom varijablom – PR naprama DR+BR+R. Za statističku analizu ovih binarnih podataka upotrebljavao se χ^2- test i Fisherov test.

Razina bolnosti tijekom PDL-PDT-a u odnosu na bol pri kPDT-u procijenila se poredbenom varijablom –VAS skalom boli (0 – 10) mjerenom neposredno nakon intervencije. Kozmetski učinak PDL-PDTa naprama kPDT procijenio se samo na tumorima s PR-om u 12. mjesecu nakon intervencije i iskazan je poredbenom varijablom (1 – 4). Bolnost i kozmetski učinak vezani su za samog bolesnika i predstavljaju parne varijable te se u analizi koristio dvostrani Wilcoxon signed-rank test.

Sekundarni ishodi povezanosti lokalizacije tumora i veličine tumora s učinkom (PR) u 12. mjesecu za oba terapijska modaliteta (PDL-PDT i kPDT) analizirani su logističkom regresijom s učinkom terapija (u 12. mjesecu) kao ovisnom varijablom te lokalizacijom i površinom tumora kao prediktora.

Razina $P<0,05$ izabrana je za određivanje statističke značajnosti u svim analizama.

4. REZULTATI

4.1. ISPITANICI

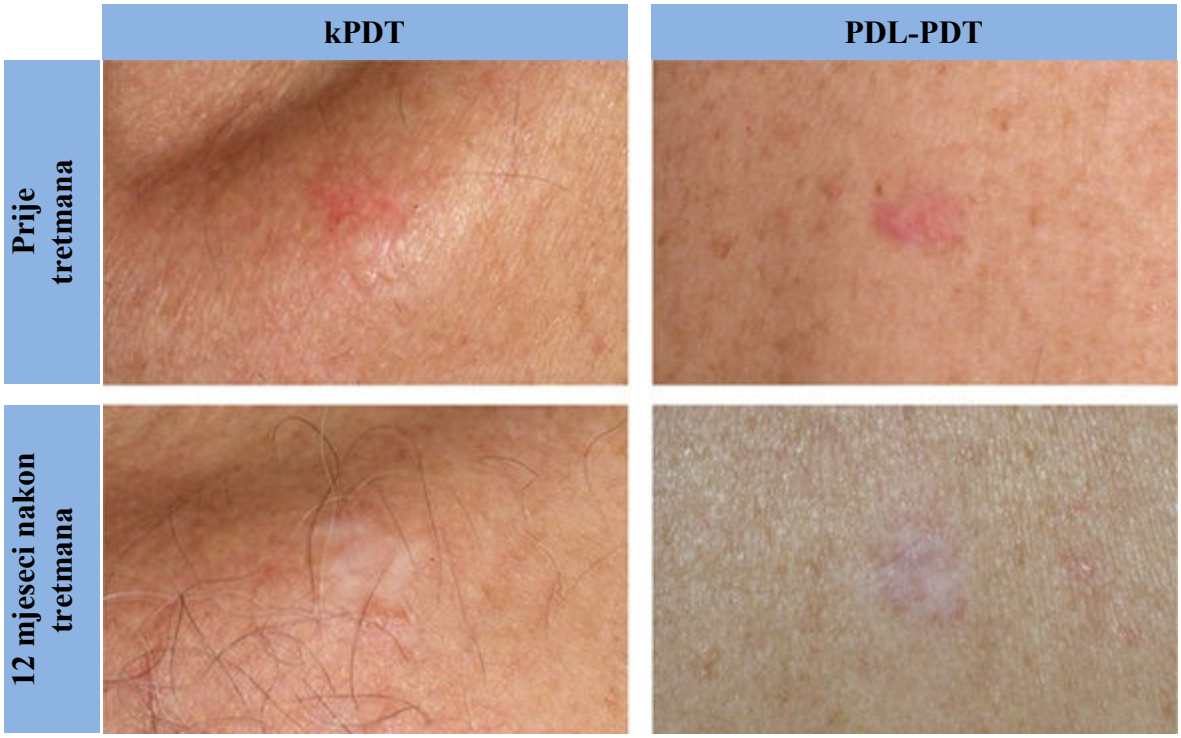
U istraživanje je bilo uključeno 15 bolesnika (dvije žene i 13 muškaraca) s dva ili više patohistološki potvrđenih BCC-a, (pBCC ili nBCC), koji su bili voljni pratiti protokol istraživanja koji je trajao jednu godinu. Njihova dob je bila u rasponu od 55 do 78 godina, s medijanom od 71 godine. Svi bolesnici bili su Fitzpatrick II i III tip kože. Ukupan broj BCC-ova analiziranih u 15 bolesnika bio je 62 (srednja vrijednost od 4,1, raspon 2 – 9, tumora po bolesniku). Obradili smo 50 (81 %) BCC-ova površinsko-širećeg podtipa i 12 (19 %) nodularnog podtipa. Bilo je 53 (85 %) tumora koji su se nalazili na trupu i devet (15 %) na udovima i vratu. Medijan površine tumora bio je 75 mm^2 (raspon: 15-1200 mm^2). Većina tumora, njih 92 % (57/62) je bila veličine manje od 200 mm^2, dok je oko 70 % tretiranih tumora bilo veličine do 100 mm^2. Osnovna obilježja BCC-a i njihova raspodjela među modalitetima liječenja sažeta su u tablici 3.

Tablica 3. *Osnovna obilježja BCC-a i njihova raspodjela među terapijskim opcijama*

	kPDT	PDL-PDT
BCC-i	28	34
Površina tumora		
Prosječna površina tumora po bolesniku (mm^2) (SD)	255,4 (290,2)	216 (154,3)
BCC < 100 mm^2	19	24
BCC 100–200 mm^2	6	8
BCC > 200 mm^2	3	2
Podtip BCC-a		
Površinsko-širući	22	28
Nodularni	6	6
Lokalizacija		
Centralna (prsa/trbuh/leđa)	27	26
Periferna (vrat/ruka/noga)	1	8

4.2. PROCJENA UČINKOVITOSTI

U nastavku istraživanja bolesnici su se pratili godinu dana. Analiziran je odgovor na liječenje u 3. i 12. mjeseci nakon tretmana (slika 16.). Rezultati su sažeti u tablici 4.



Slika 16. *Prikaz učinka kPDT-a i PDL-PDT-a na dva BCC-a istog bolesnika*

Tri mjeseca nakon kPDT-a, 22/28 (79 %) BCC-a je potpuno regrediralo, dok je preostalih šest (21 %) regrediralo djelomično. U skupini od 34 BCC-a tretirana PDL-PDT-om, nakon 3 mjeseca, 25 (74 %) potpuno je regrediralo, a devet (26 %) djelomično. Od ukupno 15 tumora s djelomičnom regresijom, tri su bila nodularnog podtipa. Tri mjeseca nakon terapije, BCC-i s DR-om nisu više praćeni već su liječeni drugim modalitetima, uglavnom kirurškim. Tumori s PR-om praćeni su godinu dana. Tijekom tog 12-mjesečnog razdoblja u 6 tumora (u 5 bolesnika) uočeni su recidivi (pet u 9. mjesecu praćenja i jedan u 12. mjesecu). Jedan od tih tumora bio je tretiran kPDT-om, a pet tumora s uočenim recidivom bilo je tretirano PDL-PDT-om. Uglavnom su bili smješteni na trupu. U 12. mjesecu stopa potpune regresije tumora liječenih kPDT-om bila je 21/28 (75 %, 95 % interval pouzdanosti 0,55-0,89) i 20/34 (59 %, 95 % CI 0,41-0,75) za tumore tretirane PDL-PDT-om.

Tablica 4. *Ishodi liječenja u 3. i 12. mjesecu razdoblja praćenja*

		Ukupno	*kPDT (%)	*PDL-PDT(%)
n = tretirani BCCi		62	28	34
Ishod nakon				
3 mjeseca				
	PR	47	22 (79)	25 (74)
	DR	15	6 (21)	9 (26)
12 mjeseci				
	PR	41	21 (75)	20 (59)
	R	6	1 (4)	5 (15)

* *% tumora od ukupnog broja tumora proučavanih za relevantnu terapijsku opciju. PR = potpuna regresija; DR = djelomična regresija; R = recidiv.*

Za daljnju analizu podatci o učincima liječenja nakon 12 mjeseci praćenja podijeljeni su u dvije skupine: uspješno liječenje, tj. potpuna regresija (PR = ukupno 41) i neuspješno liječenje, tj. djelomična regresija (DR) i recidiv (R) (ukupno n = 21). Analizirali smo povezanost između učinkovitosti (PR, DR i R) kao ovisnih varijabli i prediktora (lokalizacija, površina tumora, terapijski modaliteti).

Pronašli smo *cut-off* vrijednost površine BCC-a za učinkovitost ROC analizom (AUC: 0,73; 95 % CI 0,59-0,87; P = 0,003) od 95 mm^2 i podijelili tumore u dvije kategorije (≤ 95 mm^2 ili > 95 mm^2). U skupini tumora s neuspjehom liječenja (DR + R) postojala su četiri puta više periferno smještena tumora (ruka, noga, vrat) ($\chi 2$ = 3,5; P = 0,062) na razini značajnosti od 94 % i 2,4 puta više tumora s površinom > 95 mm^2 ($\chi 2$ = 9,6, P = 0,002) nego u skupini tumora s potpunom regresijom (tablica 5.).

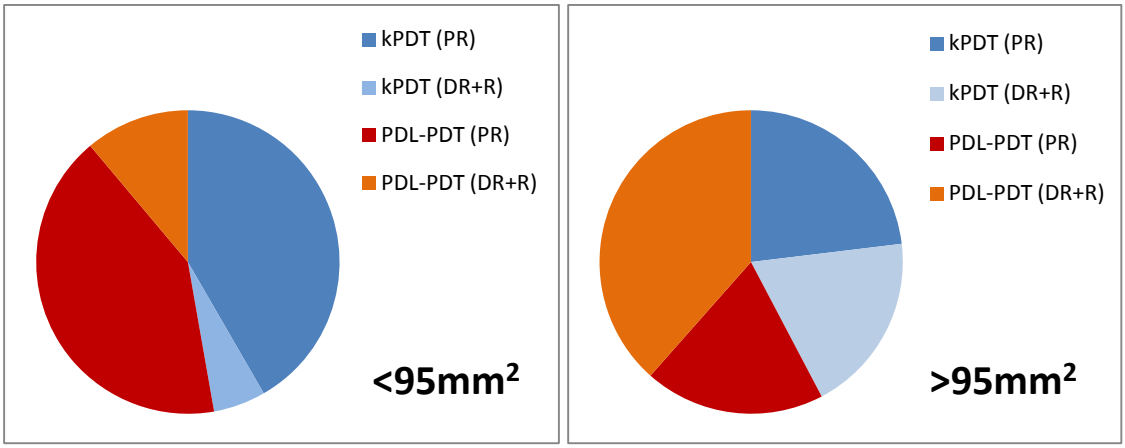
Tablica 5. *Broj BCC-a (%) analiziranih po varijablama: lokalizacija, površina i terapijski modalitet, OR (95 % CI) u odnosu na učinkovitost*

		Učinkovitost		P^+	OR (95% CI)	P*
		Uspješna terapija = PR	Neuspješna terapija = DR + R			
Lokalizacija	Centralna**	38 (93)	15 (71)	0,062	5,1 (1,1–23)	0,035
	Periferna	3 (7)	6 (29)			
Površina (mm^2)	≤ 95**	30 (73)	6 (29)	0,002	6,8 (2–22)	0,001
	> 95	11 (27)	15 (71)			
Terapijski modalitet	kPDT**	21 (51)	7 (33)	0,285	2,1 (0,7–6,3)	0,184
	PDL-PDT	20 (49)	14 (67)			

*$^+\chi 2$ test; * Logistička regresija; ** referentna razina; PR = potpuna regresija; DR = djelomična regresija; R = recidiv; CI =engl. confidence interval – interval pouzdanosti; OR = engl. odds ratio.- omjer vjerojatnosti*

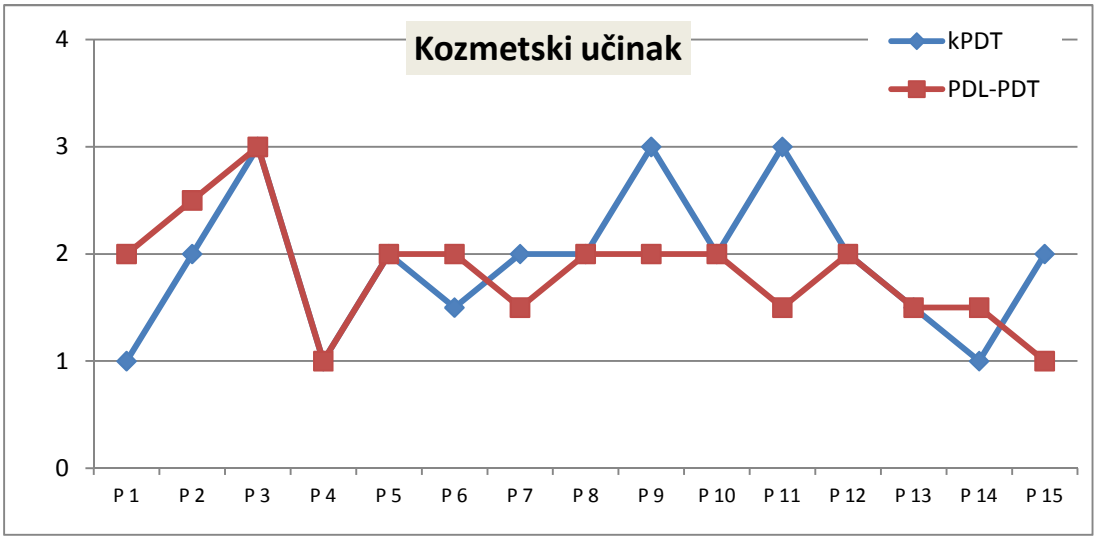
Nismo pronašli statistički značajnu povezanost između učinkovitosti i dviju metoda liječenja ($\chi 2 = 1,14$; $P = 0,285$). Univarijatna logistička regresija pokazala je da su tumori koji su bili smješteni periferno imali pet puta veću vjerojatnost razvoja neuspjeha liječenja (PR + R) od tumora koji su se nalazili centralno. Tumori s površinom > 95 mm^2 imali su sedam puta veću vjerojatnost razvoja neuspjeha liječenja (PR + R) od onih tumora s površinom ≤ 95 mm^2 (tablica 5.).

Multivarijatna logistička regresija s učinkovitošću kao zavisnom varijablom i lokalizacijom, površinom tumora i terapijskim modalitetima kao prediktorima potvrđuju povezanost površine tumora s učinkovitošću (omjer vjerojatnosti – OR 7,6, 95 % CI 1,9-31, $P = 0,004$).



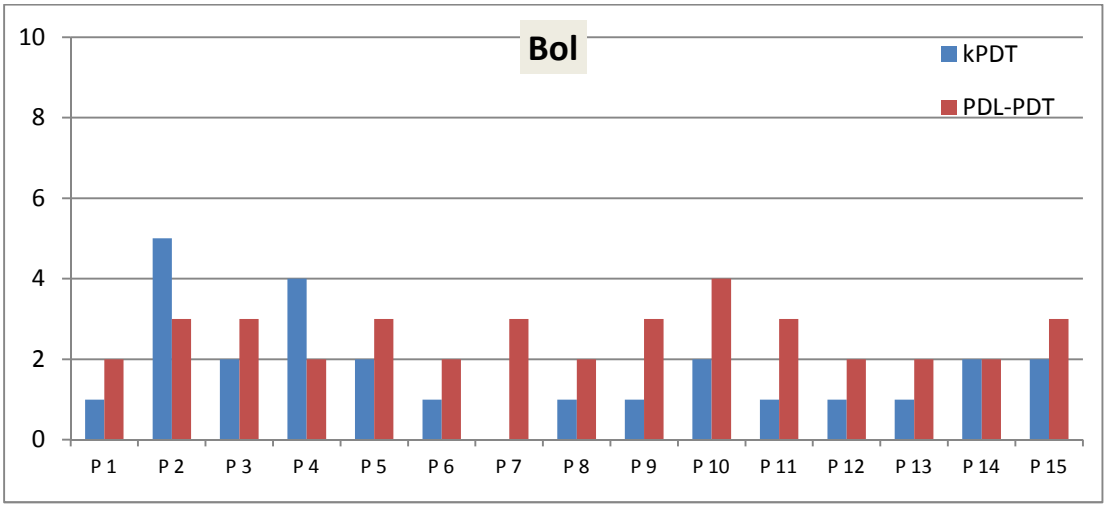
Grafikon 1. *Učinak terapija na tumorima a) < od 95 mm^2 i b) tumorima > od 95 mm^2*

U daljnjoj analizi, korištenjem Fisherovog egzaktnog testa, nije postojala statistički značajna povezanost učinkovitosti dvaju modaliteta liječenja za tumore ≤ 95 mm^2 ($P = 0,662$) niti za tumore > 95 mm^2 ($P = 0,426$). Oba terapijska modaliteta su bila jednako učinkovita u malim i velikim tumorima (grafikon 1.).



Grafikon 2. *Kozmetski učinak (od 1 do 4) terapijskih modaliteta po bolesniku*

Bol i kozmetski učinak analizirani su pomoću Wilcoxonovog signed-rank testa. Kozmetski učinak BCC-a s PR-om, nakon 12 mjeseci praćenja, procijenio je istraživač koji je bio „zaslijepljen". U mjerilu od 1 do 4, medijan za obje terapije bio je 2 (Z = 0,302; P = 0,763) (grafikon 2.), dok je u VAS skali boli (od 0 – 10) prosječni rezultat boli za kPDT bio 1,7 (± 1,3), a za PDL-PDT 2,6 (± 0,67) (Z = 1,97, P = 0,049) (grafikon 3.)



Grafikon 3. *Intenzitet boli (VAS skala boli od 0 do 10) po bolesniku i terapijskom modalitetu*

5. RASPRAVA

Ova studija je pokazala da PDL-PDT, u usporedbi s kPDT-om, ima primjetan učinak u liječenju niskorizičnih BCC-ova.

Tri mjeseca nakon terapije, potpuna regresija uočena je u 79 % BCC-a tretiranih kPDT-om i 74 % BCC-a liječenih PDL-PDT-om. Stopa potpunih regresija ostvarena kPDT-om u 3. mjesecu praćenja, jednaka je skupnoj vjerojatnosti potpunih regresija od 79 % 15 prethodnih (randomiziranih i nerandomiziranih) studija kPDT-a u liječenju pBCC-a koje su analizirane u metaanalizi Roozebooma i sur. (139). Ne postoje kontrolirane studije s kojima bismo mogli usporediti našu stopu potpunih regresija BCC-a nakon PDL-PDT-a, osim male pilot studije (138) na 6 bolesnika s velikim pBCC-ima (srednjeg promjera 3,5 cm). U toj pilot studiji tumori su tretirani MAL-om kao fotosenzibilizatorom i 595 nm-PDL laserom i s postavkama PDL-a koji ne izazivaju vaskularne učinke i purpuru. Niti jedan od šest tretiranih BCC-a nije potpuno regredirao. Nasuprot tome, PDL-PDT je u liječenju AK-a i BD-a učinkovit u 60-90 % (63, 64, 67, 131).

Namjera našeg istraživanja bila je iskoristiti potencijal PDL-a kao izvora svjetlosti koji ima fotodinamski učinak, ali i učinak selektivne fototermolize koje ima kao vaskularni laser, čime bi se postigla učinkovitost usporediva s učinkovitošću kPDT-a, ali i ukinula potreba za višestrukim tretmanima. Svojstvo SPT PDL-a koje on ima kao vaskularni laser koristilo se u liječenju BCC-a, s učinkovitošću od 65 do 90 %, ali su bili potrebni višestruki tretmani (117-120, 122, 123). Autori tih studija koristili su PDL s valnom duljinom od 595 nm i različitim postavkama. Doze zračenja su se kretale od 6,5 J/cm^2 do 15 J/cm^2, a širina pulsa od 1,5 do 3 ms, dok većina nije koristila hlađenje. Te postavke su odabrane kako bi se uzrokovala SPT malih krvnih žila (<0,1 mm) površinskog dermisa (109, 116). Histokemijska analiza Hohenleutnera i sur. potvrđuje da su takve postavke PDL-a mogle uzrokovati i epidermalno oštećenje koje je u korelaciji sa sadržajem melanina (109, 118), što posljedično dovodi do slabijeg prodora laserske zrake u dermis. Hohenleutner i sur. ističu kako bi se sa širinom pulsa od 10 ms postigla koagulacija većih krvnih žila (jer je to bliže „vremenu opuštanja“ krvnih žila širih lumena) te dublji prodor laserske zrake u dermis. Postavke PDL-a u našem istraživanju su uvijek bile iste, bez obzira na podtip BCC-a, njegovu veličinu ili lokalizaciju. Purpura je uočena u većini bolesnika. Odabrana je doza, koja izaziva purpuru, kako bi djelovala na veće krvne žile. Naime, već okom, a osobito dermatoskopijom, uočljive razgranate krvne žile dijagnostički su kriterij BCC-a (s osjetljivošću od 96,1 % i specifičnošću

od 90,6 %) (115). Širine su >0,2 mm i smještene su neposredno ispod epidermisa (115). Dozom zračenja od 10 J/cm^2 i širinom pulsa od 10 ms, osigurana je fotokoagulacija krvnih žila >0,2mm, dok manje krvne žile ostaju nepromijenjene i tako donose dovoljno kisika potrebnog za fotodinamski učinak PDL-PDT. Ovu pretpostavku podržavaju studije koje navode kako krvne žile promjera 0,11 mm optimalno reagiraju na zračenje s trajanjem pulsa od 6 ms (142) i da s duljim trajanjem pulsa manje krvne žile ostaju neoštećene (143). Dulje trajanje pulsa omogućuje i dulji učinak svjetla na fotosenzibilizator.

Od prvih neuspjelih pokušaja – jednokratne – primjene PDL-a u terapiji BCC-a (116, 117) pomak je napravila studija Trana i sur. koja je uspoređivala dvije različite postavke PDL-a: jednu s tehnikom „višestrukih prolaza“, a drugu sličnih postavki PDL-a, ali s tehnikom „naslaganih pulseva“. Postignuta je 71 % potpuna regresija BCC-a i SCC-a nakon jednokratnog tretmana pomoću 595 nm-PDL-a tehnikom „naslaganih pulseva“. U podskupini tumora koji su tretirani tehnikom „višestrukih prolaza“ (dva prolaza), samo je 25 % tumora uklonjeno (124).

Za razliku od prethodno spomenute studije, mi smo primijenili tehniku „višestrukih prolaza“ (sveukupno tri), a ne tehniku „naslaganih pulseva“ i tako produžili učinak PDT svjetla na fotosenzibilizator, ali i frakcionirali osvjetljenje. Studije su pokazale kako frakcioniranje osvjetljenja u trajanju od 60 sekundi uzrokuje bolje razaranje tumora u usporedbi s kontinuiranim osvjetljavanjem pri istoj terapijskoj dozi. Ti prekidi tijekom razdoblja osvjetljavanja omogućuju difundiranje kisika u ciljnu stanicu čime se pojačava fotodinamski učinak PDL-PDT-a (80). Smatramo da metoda „naslaganih pulseva“ pojačava fototermalni učinak PDL-a, dok tehnika „višestrukih prolaza“ poboljšava fotodinamski učinak PDL-PDT. Stoga smo korištenjem navedenih postavki, tehnikom „tri prolaza“, s PDL-PDT-om postigli stopu potpune regresije od 74 % BCC-a, usporedivu sa 79 % potpune regresije PDT-a objavljenoj u metaanalizi (139), korištenjem samo jednog tretmana.

Pretpostavljamo da je to zbog sinergističkog djelovanja fotodinamskog učinka PDL-a na PpIX selektivno nakupljenog u tumorskim stanicama BCC-a, s fototermalnim učinkom koju PDL ostvaruje na krvne žile BCC-a. Sinergistički učinak također je nađen u *in vivo* istraživanju na eksperimentalnom modelu (144), gdje je kombinacija PDT i PDL rezultirala znatno većom vaskularnom ozljedom nego što je primijećeno (127 % više) u PDT i (47 % više) u PDL. Naknadne studije potvrdile su ne samo veću učinkovitost PDL-PDT-a u fotokoagulaciji krvnih žila, nego i trajniji učinak u odnosu na samostalnu primjenu PDL-a ili PDT-a (129). Pretpostavili su kako bi to mogla biti posljedica: (1) oštećenja stanične stijenke

endotelnih stanica inducirano PDT-om, što rezultira poboljšanom fotokoagulacijom PDL-a i/ili (2) poboljšane fotokoagulacije malih krvnih žila tipično otpornih na PDL, koje zbog PDT-om inducirane vazodilatacije postaju osjetljive na PDL (129).

S druge strane studija Karres i sur. pokazala je kako PDL sam nije imao terapijski učinak na AK (63), jer ne sadrži klinički uočljive krvne žile. No, primijenjen zajedno s PDT-om ostvario je značajan učinak, što je dokazano i u drugoj kliničkoj studiji (64). U tim studijama se primarno koristilo svojstvo PDL-a kao izvora svjetla koje inducira fotodinamski učinak. Naime, PDL može djelovati na endogeni fotosenzibilizator PpIX i prouzročiti primjetnu PDT reakciju (128), koja je usporediva s crvenim izvorima svjetlosti (92). No, studija koja je ispitivala učinak PDL-a na ALA pokazala je da PDL s 585 nm valnom duljinom imaju znatno veći citotoksični učinak nego 595 nm-PDL (63). Ova činjenica može objasniti veću učinkovitost PDL-PDT-a u našem istraživanju nego u pilot studiji Fernandez – Guarino i sur., gdje je korišten 595 nm-PDL.

Svi BCC-i s potpunom regresijom, praćeni su 12 mjeseci nakon terapije. Do 12. mjeseca praćenja, primijećen je jedan recidiv u kPDT skupini (4 %) i pet u PDL-PDT skupini (15 %). Veća stopa recidiva u PDL-PDT skupini mogla bi se objasniti činjenicom da prilikom obasjavanja PDL-om, PB u koži postupno opada od epidermisa do srednjih i dubokih dijelova dermisa, dok je kod osvjetljenja LED svjetlom ujednačeno (145). Naša stopa recidiva nakon kPDT-a od 4 % manja je od skupne 1-godišnje stope recidiva PDT-a od 10,3 % u metaanalizi Wang i sur. (146). Razlog manjeg broja recidiva može biti dvojak: (1) jer je fotosenzibilizator difundirao dovoljno duboku u kožu i (2) jer se nije prenaglo razgradio. Naime, na svim tumorima prije tretmana su primijenjene tehnike koje olakšavaju prodor fotosenzibilizatora: 1) vrlo blagom ekskohleacijom površine tumora i 2) ALA krema je sadržavala DMSO (74). Nagla razgradnja fotosenzibilizatora tzv. *photobleaching* i posljedična nagla potrošnja kisika u tkivu čimbenici su koji smanjuju učinkovitosti PDT-a, a vezani su uz visok intenzitet (150 mW/cm^2) svjetla. Izvori svjetla s intenzitetom oko $30mW/cm^2$ (kakvu koristimo u Klinici za kožne i spolne bolesti) osiguravaju dobru oksigenaciju i veću djelotvornost, ali i dulje vrijeme osvjetljavanja. Upravo trajanje procedure kPDT-a, malo više od jednog sata je negativna strana terapije.

Ne postoji prospektivna studija s jednogodišnjim praćenjem učinkovitosti i recidiva PDL-PDT-a s kojom možemo usporediti našu stopu recidiva nakon PDL-PDT-a.

Učinkovitost, definirana kao potpuna regresija nakon jedne godine praćenja, za kPDT bila je 75 % (95 % CI 0,55-0,89) i 59 % za PDL-PDT (95 % CI 0,41-0,75). Nismo našli

statistički značajnu razliku u učinkovitosti ovih dvaju terapijskih modaliteta. Ipak, postoji mogućnost da smo propustili otkriti postojanje klinički značajne razlike u jednogodišnjoj stopi potpunih regresija ovih dviju metoda liječenja zbog relativno malog uzorka. Da bi PDL-PDT proglasili doista neinferiornom terapijom naprama kPDT, potrebno je provesti veću studiju neinferiornosti, a rezultati naše studije mogu dati postavke za izračun veličine uzorka.

Ujedno, studije s nešto drugačijim PDL-PDT postavkama ili pak s višestrukim tretmanima mogu pokazati nižu stopu recidiva te manji broj djelomičnih regresija. Broj BCC-ova koji su djelomično regredirali bio je podjednako raspoređen između dvije metode liječenja. Prevladavale su DR >50 %, što pokazuje da bi obje terapije imale bolje rezultate uz protokol liječenja s višestrukim tretmanima. Većina PDT tretmana u svijetu se ipak provodi primjenjujući dva ili više tretmana čime se osiguravaju veće stope učinkovitosti (46, 73, 108, 147, 148)

Naše istraživanje pokazalo je da u skupini BC-ova s neuspjehom liječenja (djelomična regresija + recidiv) postoji više periferno smještenih tumora (ruka / noga / vrat). Mali broj studija analiziralo je lokalizaciju BCC-a kao mogućeg statistički značajnog prediktora neuspjeha liječenja. Dvije studije nisu uočile kako lokalizacija utječe na stopu potpunih regresija (108, 147), dok su dvije druge studije izdvojile vlasište i lice (149), te udove (ruke, noge) kao lokalizacije na kojima je neuspjeh liječenja češći (95). Kao mogući razlog neuspjeha navedena je pretpostavka da tumori smješteni na fotoeksponiranim dijelovima tijela imaju molekularne mehanizme koji su otporniji na PDT (95). Zanimljivo je da studije PDT-a u liječenju AK-a također izdvajaju one lokalizirane na udovima rezistentnijim na terapiju (150).

U skupini tumora s neuspjehom liječenja bilo je više BCC-a > 95 mm^2. Multivarijatnom analizom smo dokazali postojanje korelacije veće površine tumora s učinkovitošću u BBC-a većih od 95 mm^2. Slabiji odgovor na PDT u tumorima veće površine zabilježili su i drugi autori (79, 151, 152). Druga važna činjenica je da su oba terapijska modaliteta u našem istraživanju bila jednako učinkovita i kod malih i kod velikih tumora.

Smatramo da je i veličina tumora razlog neučinkovitosti PDL-PDT-a u pilot studiji Fernandez-Guarino i sur.

Pojedini autori navode debljinu tumora i histološki podtip BCC-a kao važne prediktore uspješnosti terapije (nBCC je negativni prediktor, dok pBCC-i imaju veće stope potpunih recidiva) (95, 153). Mi se u istraživanju nismo odlučili koristiti te histološke parametre kao moguće prediktore, zbog nepouzdanosti nalaza biopsije u procjeni debljine i histološkog

podtipa cijele lezije, na osnovi incizijske biopsije. Naime 37-43 % BCC-a sadrži više histoloških podtipova tumora unutar istog tumora iako je uglavnom jasno uočljiva prevlast jednog (5, 11). No, takva saznanja imaju važnu kliničku primjenu te bi stoga bilo važno u procjeni podtipa koristiti korelaciju kliničke slike, dermatoskopske slike te patohistološog nalaza biopsije. Osiguranjem pouzdane diferencijalne dijagnoze podtipa BCC-a temeljene na toj korelaciji, a ne samo na incizijskoj biopsiji, mogao bi se koristiti kao prediktor u kliničkim istraživanjima.

Akutna bol povezana s PDT-om najizraženija je nuspojava terapije. Iako je bol u PDL-PDT-u bila veća nego u kPDT-u (2,6 naprama 1,7), obje vrijednosti su bile niske na vizualnoj analognoj skali boli (u rasponu od 0 do 10). Razina boli kPDT u našem istraživanju bila je niža od intenziteta boli (2,30 do 4,38) opisanih u drugim studijama (100, 101, 154-156). Bol se povezuje s izvorom svjetlosti (156), intenzitetom primijenjenog svjetla (103), lokalizacijom tumora (glava > trupa), veličinom i vrstom tumora (AK > BCC) (101) te odabirom fotosenzibilizatora (ALA > MAL) (157), ali ne sa spolom i dobi bolesnika. Niže vrijednosti boli u kPDT-u u našoj studiji mogu se objasniti nižim intenzitetom primijenjenog svjetla (30 mW/cm^2), jer je ta povezanost također opisana u drugim ispitivanjima (103, 156), ali i činjenicom da su tumori bili smješteni na trupu. Razina boli PDL-PDT u našoj studiji je niska i nalazi se unutar raspona boli (1,5-3,2) koje su opisane u prethodnim studijama PDL-PDT-om, ali u liječenju AK-a i BD-a (63, 64, 67), što bi se moglo objasniti pulsnom prirodom izvora svjetlosti (104) i kraćim izlaganjem (63). Rad Togsverd-Bo i sur. (145) opisuje količinu *photobleachinga* nastalog nakon razgradnje fotosenzibilizatora, nakon primjene različitih izvora svjetlosti i zaključuje da LED proizvodi znatno veći FB u usporedbi s PDL-om što bi također moglo objasniti niži osjet boli tijekom osvjetljavanja PDL. Niska razina boli pri PDL-PDT-u u našem istraživanju je mogla, makar dijelom, biti povezana s primjenom hlađenja hladnim zrakom, kako je to potvrđeno u jednoj PDT pilot studiji (158). Za razliku od svih dosad objavljenih studija gdje je bol pri PDL-PDT-u bila statistički značajno niža od boli pri kPDT-u, bol pri PDL-PDT-u u našem istraživanju je veća od boli pri kPDT-u. Razlog tomu može biti: 1) nešto viša bol PDL-PDT-a zbog primjene purpuričkih postavki i/ili 2) iznimno niska bol pri kPDT-u.

Bol je subjektivna varijabla te može jako varirati od bolesnika do bolesnika. Intraindividualne studije boli u PDT-u iznimno su rijetke, a naša je prva takva objavljena s bolesnicima s BCC-om.

Prednost PDT-a je upravo izvrstan kozmetski učinak. Eritem i edem su bili vidljivi u gotovo svih bolesnika neposredno nakon kPDT-a, a kod većine bolesnika nakon PDL-PDT-a bila je prisutna i purpura. U većine su se tijekom sljedećih dana razvijale i fine erozije i kruste, koje bi u 2 – 3 tjedna zacijelile bez ožiljka. S obzirom na mehanizam djelovanja PDL-a kao vaskularnog lasera te moguću epidermalnu leziju mogli smo očekivati intenzivnije hiperpigmentacije ili hipopigmentacije. No, one su bile rijetke. Ožiljci su rijetki kod kPDT-a i PDL-PDT-a i u našem istraživanju ih nismo uočili. U obje metode liječenja, promatrani kozmetski učinci bili su uglavnom ocijenjeni kao izvrsni (34 %) ili dobri (49 %).

Ograničenja i nedostatci studije

Ograničenja studije su relativno mali uzorak kako bi se dovoljnom snagom potvrdila neinferiornost PDL-PDT-a, 12-mjesečno razdoblje praćenja i manjak histološke potvrde potpune regresije BCC-a.

Iako je izračun uzorka tumora učinjen uzimajući u obzir da je riječ o studiji neinferiornosti, istraživanje bi imalo veću snagu s nešto većim uzorkom. Uzimajući u obzir da su nam ispitanici bolesnici s multiplim BCC-evima, kojih nema jako puno i da je riječ o prospektivnoj studiji koja traje jednu godinu, veći uzorak bi iznimno produžio trajanje istraživanja. S druge strane, upravo činjenica da je riječ o interindividualnoj studiji gdje se dvije terapijske metode ispituju na istom bolesniku naša studija je dobila na kliničkoj snazi (jer su maksimalno anulirane zbunjujuće varijable) iako se to statistički ne uočava. Naime, učinkovitost ispitivanih terapijskih modaliteta ovisi o fizikalnim svojstvima izvora svjetla, ali i o odgovoru samog bolesnika na terapiju. Intraindividualno ispitivanje je osobito bitno u procjeni bolnosti i kozmetskog učinka PDT-a bilo s koherentnim svjetlom bilo s PDL svjetlom.

Iako neke smjernice preporučuju praćenje od 12 mjeseci nakon tretmana (159), poželjna su 5-godišnja praćenja. No, i u studiji s najduljim objavljenim praćenjem od 10 godina navodi se kako 2/3 recidiva nastaje u prvoj godini praćenja (160) te smo stava da je to dovoljno vrijeme za procjenu učinkovitosti jedne nove metode.

U našoj studiji nije bilo histološke potvrde potpune regresije tumora. Odgovor na liječenje bio je temeljen na kliničkoj evaluaciji, reflektirajući tako svakodnevnu kliničku praksu. Ujedno smo mišljenja da dodatna invazivna dijagnostika, odnosno incizijska biopsija, nije dovoljno pouzdana u isključenju ostatnog tumorskog tkiva.

U nekoliko bolesnika uključenih u studiju, razmještaj BCC-a u pojedinih bolesnika te naknadno podjela u dvije slične skupine, kako bi se BCC-i tada mogli tretirati bilo kojom od ispitivanih opcija liječenja, nije bila moguća. Stoga, studija nije bila randomizirana.

6. ZAKLJUČAK

Ovo istraživanje pokazalo je da je PDL-PDT učinkovit u liječenju BCC-a niskog rizika, da ima slične kozmetske prednosti kao kPDT te je povezan s niskom razinom boli.

PDL-PDT je valjana opcija za liječenje bolesnika s višestrukim BCC-ovima niskog rizika, smještenih u više od jednog anatomskog područja, osobito na leđima te ukoliko su površine manje od 1 $cm^{2.}$. Važna prednost ove metode je što zahtijeva znatno manje vremena od konvencionalnog PDT-a.

Viša stopa recidiva u 12. mjesecu praćenja, nakon jednokratne primjene PDL-PDT-a naprama stope recidiva jednokratno primijenjenog kPDT-a, opravdava daljnje studije s nešto drugačijim PDL-PDT postavkama ili višekratnim tretmanima koji bi mogli spriječiti recidive. Kako nema studija o učinkovitosti PDL-PDT-a u liječenju BCC-a naša studija daje novi znanstveni doprinos i temelj za daljnja istraživanja na tom polju.

Konvencionalan PDT ostaje standard liječenja. Ovo istraživanje, daje i novi uvid u drugačiji način primjene konvencionalnog PDT-a. Studijom potvrđujemo i učinkovitost jednokratne, nefrakcionirane primjene PDT svjetla s visokom dozom svjetla (150 J/cm^2), a niskim intenzitetom (30 mW/cm^2), što je opisano samo u malobrojnim studijama.

S obzirom na visoku pojavnost BCC-a, važna je činjenica da su oba terapijska modaliteta, a osobito PDL-PDT, sukladna nastojanju pronalaženja terapije minimalne invazivnosti i bolnosti koje manje opterećuju zdravstveni sustav i smanjuju vrijeme boravka ili učestale dolaske u zdravstvenu ustanovu.

7. SAŽETAK

Bazocelularni karcinom je iznimno čest, spororastući, lokalno invazivni, maligni epidermalni tumor kože koji nastaje iz bazalnih keratinocita. Najzastupljeniji histološki podtipovi su nodularni i površinsko-širući BCC. Zbog visoke učestalosti BCC-a važan cilj je pronalaženje optimalnog protokola liječenja, koji je jednak ili veći po učinkovitosti od dosada primijenjenih terapija, a da pri tome smanjuje nelagodnost bolesniku i potrebu za anestezijom te skraćuje vrijeme provedeno u zdravstvenoj ustanovi, posebno za bolesnike s višestrukim BCC-om. Fotodinamska terapija primjenjuje se u liječenju BCC-a niskog rizika. Pri tome se aktivira fotosenzibilizator, aminolevulinska kiselina vidljivom svjetlošću (nekoherentnim svjetlom) kako bi se proizveli reaktivni oblici kisika koji selektivno uništavaju stanice tumora. Bolovi koje bolesnik može osjećati tijekom fotodinamske terapije posljedica su nekroze, apoptoze stanica te posljedične upale. Koriste se razni izvori svjetlosti. Većina kliničkih ispitivanja je izvedena primjenom crvenog svjetla s valnim duljinama od oko 630 nm, što dopušta dublje prodiranje svjetla u kožu. No, definirani su i drugi niži vrhovi apsorpcije, pronađeni na 510, 545 i 580 nm. Pulsed-dye laser s koherentnim svjetlom valne duljine od 585 nm inducira blagu, ali primjetnu fotodinamičku reakciju. Budući da BCC sadržava krvne žile neposredno ispod epidermisa, veličine 0,2 mm ili šire, PDL se primjenjivao za liječenje BCC-a, ali kao vaskularni laser (principom selektivne fototermolize), bez fotosenzibilizatora. Fotodinamska terapija može biti dugotrajan terapijski postupak, osobito ako se izvodi u više navrata kao u bolesnika s višestrukim BCC-evima. Stoga bi bilo prikladnije tretirati višestruke niskorizične BCC-e fotodinamskom terapijom posredovanom PDL-om (PDL-PDT), jer to zahtijeva znatno manje vremena (ukupno 3 – 5 minuta). Pretpostavili smo da bi primjenom PDL-a sa specifičnim postavkama i u kombinaciji s fotosenzibilizatorom (ALA) postigli sinergistički učinak dva svojstva PDL-a: fotodinamski učinak te učinak selektivne fototermolize koje PDL ima kao vaskularni laser. Time bismo ostvarili učinkovitost usporedivu s učinkovitošću konvencionalnog PDT-a.

U ovoj studiji usporedili smo jednokratan tretman PDL-PDT-om s konvencionalnim PDT-om u liječenju BCC-a u smislu učinkovitosti, kozmetskog učinka i razine boli u bolesnika s višestrukim BCC-ima. Studija je intraindividualna, odnosno dva terapijska modaliteta primjenjivala su se na različitim tumorima istog bolesnika.

Istraživanje je bilo prospektivno, kontrolirano, intraindividualno i za istraživača zaslijepljeno. Provedeno je na 15 bolesnika sa 62 BCC-a. Višestruki tumori na pojedinačnom

bolesniku podijeljeni su u dvije slične skupine i tretirani s kPDT-om (630 nm, nekoherentno LED svjetlo, intenzitetom od 30 mW/cm^2 i ukupnom dozom od 150 J/cm^2) i s 585 nm-PDL-PDT-om (nastavkom od 7 mm, dozom od 10 J/cm^2, trajanjem pulsa od 10 ms, s 10 % preklapanja i s tri prolaza uz hlađenje hladnim zrakom).

Primarni ishod istraživanja je učinkovitost, odnosno potpuna regresija BCC-a u 3. i 12. mjesecu nakon intervencija. Sekundarni ishodi su usporedba razine boli tijekom PDL-PDT-a s boli tijekom kPDT-a te kozmetskog učinka (procjenjenog od zaslijepljenog ispitivača) u 12. mjesecu nakon intervencija primijenjenih na istim bolesnicima s višestrukim BCC-ima (intraindividualna studija). Analiziran je i utjecaj veličine tumora te lokalizacije tumora na učinkovitost PDL-PDT-a i kPDT-a.

Nije bilo značajnih razlika u terapijskom učinku između dva tretmana (P = 0,285). Potpuna regresija BCC-a nakon 3-mjesečnog praćenja vidjela se u 79 % BCC-a tretiranih kPDT-om i 74 % BCC-a tretiranih PDL-PDT-om. U 12. mjesecu potpuna regresija BCC-a tretiranih kPDT-om bila je 75 % (95 % CI 0,55-0,89) u usporedbi s 59 % (95 % CI 0,41-0,75) za područja tretirana PDL-PDT-om. Obje terapije pokazuju niske prosječne vrijednosti boli: 1,7 za kPDT i 2,6 za PDL-PDT (P = 0,049) te sličan kozmetski učinak (P = 0,763).

Zaključno, jednokratno liječenje s tri prolaza PDL-PDT-om djelotvorno je u liječenju niskorizičnih BCC-a, ali je stopa recidiva viša nego u konvencionalnog PDT-a. PDL-PDT je povezan s niskom razinom boli, ima slične kozmetske prednosti kao kPDT, ali zahtijeva znatno kraće vrijeme liječenja te je prikladan za liječenje bolesnika s višestrukim BCC-ima.

8. SUMMARY

Comparison of pulsed-dye laser-mediated photodynamic therapy and conventional photodynamic therapy in the treatment of multiple basal cell carcinomas

Conventional photodynamic therapy (kPDT) is used in the treatment of low risk basal cell carcinomas (BCC). Conventional PDT involves the activation of photosensitizer with visible red light to produce reactive oxygen species that selectively destroy the tumour cells. Pulsed Dye Laser (PDL) induces mild but noticeable photodynamic response. PDT can be a time-consuming procedure. Multiple low-risk BCCs could be treated with PDL as the source of light for PDT (PDL-PDT), as this requires significantly less time.

In this prospective, controlled, intra-individual, investigator-blinded study we compared a single treatment of PDL-PDT with kPDT for BCCs in terms of efficacy, aesthetic outcome, and pain in patients with multiple BCCs. It was conducted on 15 patients with 62 BCCs. The BCCs on an individual patient were divided into two similarly-sized groups and treated with kPDT and PDL-PDT. Primary outcomes were complete BCC regression at months 3. and 12. Secondary outcomes were pain immediately after treatment, aesthetic outcome, evaluated by a blinded investigator and influence of tumor size and tumor localization on the efficacy of PDL-PDT and kPDT.

The study showed that a single treatment with PDL-PDT is effective in clearing BCCs, but the recurrence rate is higher than in case of conventional PDT. PDL-PDT is associated with low treatment related pain and has similar cosmetic advantages.

9. LITERATURA

1. Knez I. Effects of colour of light on nonvisual psychological processes. J Environ Psychol. 2001; 21(2):201-8.
2. Erb P, Ji J, Wernli M, Büchner SA. Apoptosis and Cancerogenesis of Basal Cell and Squamous Cell Carcinoma. U: Reichrath J, ur: Molecular Mechanisms of Basal Cell and Squamous Cell Carcinomas. Boston, MA: Springer US; 2006. str. 108-14.
3. Crouch HE. History of basal cell carcinoma and its treatment. J R Soc Med. 1983;76(4):302-6.
4. Jacob A. Observations respecting an ulcer of peculiar character, which attacks the eye-lids and other parts of the face. Dublin Hosp Rep. 1827;4:232–9.
5. Calonje E, Brenn T, Lazar A, McKee PH. McKee's pathology of the skin: with clinical correlations. 4. izd. Elsevier/Saunders; 2012. str.1803.
6. Chinem VP, Miot HA. Epidemiologia do carcinoma basocelular. An Bras Dermatol. 2011;86(2):292-305.
7. Lipozencic J, Celic D, Strnad M, Toncic RJ, Pasic A, Rados J i sur. Skin cancers in Croatia, 2003-2005: epidemiological study. Coll Antropol. 2010;34(3):865–9.
8. Karagas MR, Zens MS, Li Z, Stukel TA, Perry AE, Gilbert-Diamond D i sur. Early-onset basal cell carcinoma and indoor tanning: a population-based study. Pediatrics. 2014;134(1):e4-12.
9. Ferrucci LM, Cartmel B, Molinaro AM, Leffell DJ, Bale AE, Mayne ST. Indoor tanning and risk of early-onset basal cell carcinoma. J Am Acad Dermatol. 2012;67(4):552-62.
10. Goldberg LH. Basal cell carcinoma. Lancet. 1996;347(9002):663-7.
11. Roewert-Huber J, Lange-Asschenfeldt B, Stockfleth E, Kerl H. Epidemiology and aetiology of basal cell carcinoma. Br J Dermatol. 2007;157(Suppl 2):47-51.
12. Leiter U, Eigentler T, Garbe C. Epidemiology of skin cancer. Adv Exp Med Biol. 2014;810:120-40.
13. Crowson AN. Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. Modern pathology. 2006;19 (Suppl 2):S127-47.
14. Kiiski V, de Vries E, Flohil SC, Bijl MJ, Hofman A, Stricker BH i sur. Risk factors for single and multiple basal cell carcinomas. Arch Dermatol. 2010;146(8):848-55.

15. Crowson AN, Magro CM, Kadin ME, Stranc M. Differential expression of the bcl-2 oncogene in human basal cell carcinoma. Hum Pathol. 1996;27(4):355-9.
16. Graham PG, McGavran MH. Basal-cell carcinomas and sebaceous glands. Cancer. 1964;17:803-6.
17. Karagas MR, McDonald JA, Greenberg ER, Stukel TA, Weiss JE, Baron JA i sur. Risk of basal cell and squamous cell skin cancers after ionizing radiation therapy. For The Skin Cancer Prevention Study Group. J Natl Cancer Inst. 1996;88(24):1848-53.
18. Madan V, Lear JT, Szeimies RM. Non-melanoma skin cancer. Lancet. 2010;375(9715):673-85.
19. Desmond B, Boudreaux L, Young J. A rare case of super giant basal cell carcinoma. JAAD Case Rep. 2015;1(5):280-2.
20. Yosipovitch G, Mills KC, Nattkemper LA, Feneran A, Liang TH, Lowenthal BM i sur. Association of Pain and Itch With Depth of Invasion and Inflammatory Cell Constitution in Skin Cancer: Results of a Large Clinicopathologic Study. JAMA Dermatol. 2014;150(11):1160-6.
21. Clark CM, Furniss M, Mackay-Wiggan JM. Basal cell carcinoma: an evidence-based treatment update. Am J Clin Dermatol. 2014;15(3):197-216.
22. McCusker M, Basset-Seguin N, Dummer R, Lewis K, Schadendorf D, Sekulic A i sur. Metastatic basal cell carcinoma: Prognosis dependent on anatomic site and spread of disease. Eur J Cancer. 2014;50(4):774-83.
23. Miller SJ, Alam M, Andersen J, Berg D, Bichakjian CK, Bowen G i sur. Basal cell and squamous cell skin cancers. J Natl Compr Canc Netw. 2010;8(8):836-64.
24. Kauvar ANB, Cronin TJ, Roenigk R, Hruza G, Bennett R. Consensus for nonmelanoma skin cancer treatment: basal cell carcinoma, including a cost analysis of treatment methods. Dermatol Surg. 2015;41(5):550-71.
25. Mackiewicz-Wysocka M, Bowszyc-Dmochowska M, Strzelecka-Węklar D, Dańczak-Pazdrowska A, Adamski Z. Basal cell carcinoma – diagnosis. Contemp Oncol (Pozn). 2013;17(4):337-42.
26. Wozniak-Rito A, Zalaudek I, Rudnicka L. Dermoscopy of basal cell carcinoma. Clin Exp Dermatol. 2018;43(3):241-7.
27. Nischal U, Nischal K, Khopkar U. Techniques of skin biopsy and practical considerations. J Cutan Aesthet Surg. 2008;1(2):107-11.

28. Barton K, Curling OM, Paridaens AD, Hungerford JL. The role of cytology in the diagnosis of periocular basal cell carcinomas. Ophthalmic Plast Reconstr Surg. 1996;12(3):190-4.

29. Cockerell CJ, Tran KT, Carucci J, Tierney E, Lang P, Maize Sr JC i sur. Basal cell carcinoma. U: Rigel DS, Robinson JK, Ross MI, Friedman R, Cockerell CJ, Lim H, Stockfleth E, ur. Cancer of the Skin. 2 izd. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011, str. 99-124.

30. Salasche SJ, Amonette RA. Morpheaform basal-cell epitheliomas. A study of subclinical extensions in a series of 51 cases. J Dermatol Surg Oncol. 1981;7(5):387-94.

31. Epstein EH. Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog. Nat Rev Cancer. 2008;8(10):743-54.

32. Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun TT, Lavker RM. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. Cell. 2000;102(4):451-61.

33. Oak A, Athar M, Yusuf N, Elmets C. UV and Skin: Photocarcinogenesis. U: Krutmann J, Merk HF, ur. Environment and Skin. Düsseldorf: Springer; 2018. str. 67-103.

34. Young LC, Listgarten J, Trotter MJ, Andrew SE, Tron VA. Evidence that dysregulated DNA mismatch repair characterizes human nonmelanoma skin cancer. Br J Dermatol. 2008;158(1):59-69.

35. Lacour JP. Carcinogenesis of basal cell carcinomas: genetics and molecular mechanisms. Br J Dermatol. 2002;146 (Suppl 61):17-9.

36. Auepemkiate S, Boonyaphiphat P, Thongsuksai P. p53 expression related to the aggressive infiltrative histopathological feature of basal cell carcinoma. Histopathology. 2002;40(6):568-73.

37. Athar M, Li C, Kim AL, Spiegelman VS, Bickers DR. Sonic hedgehog signaling in basal cell nevus syndrome. Cancer Res. 2014;74(18):4967-75.

38. Telfer NR, Colver GB, Morton CA. Guidelines for the management of basal cell carcinoma. Br J Dermatol. 2008;159(1):35-48.

39. Bichakjian CK, Olencki T, Aasi SZ, Alam M, Andersen JS, Berg D i sur. Basal Cell Skin Cancer, Version 1.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. J Natl Compr Canc Netw. 2016;14(5):574-97.

40. Julian C, Bowers PW, Pritchard C. A comparativ*e study of the effects of disposable and Volkmann spoon curettes in the treatment of basal cell carcinoma. Br J Dermatol. 2009;161(6):1407-9.
41. Danial C, Sarin KY, Oro AE, Chang AL. An Investigator-Initiated Open-Label Trial of Sonidegib in Advanced Basal Cell Carcinoma Patients Resistant to Vismodegib. Clin Cancer Res. 2016;22(6):1325-9.
42. Karagas MR, Stukel TA, Greenberg ER, Baron JA, Mott LA, Stern RS. Risk of subsequent basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma of the skin among patients with prior skin cancer. Skin Cancer Prevention Study Group. JAMA. 1992;267(24):3305-10.
43. Housman TS, Feldman SR, Williford PM, Fleischer AB, Jr., Goldman ND, Acostamadiedo JM i sur. Skin cancer is among the most costly of all cancers to treat for the Medicare population. J Am Acad Dermatol. 2003;48(3):425-9.
44. Miller DL, Weinstock MA. Nonmelanoma skin cancer in the United States: incidence. J Am Acad Dermatol. 1994;30(5 Pt 1):774-8.
45. Milan T, Pukkala E, Verkasalo PK, Kaprio J, Jansen CT, Koskenvuo M, et al. Subsequent primary cancers after basal-cell carcinoma: A nationwide study in Finland from 1953 to 1995. Int J Cancer. 2000;87(2):283-8.
46. Cosgarea R, Susan M, Crisan M, Senila S. Photodynamic therapy using topical 5-aminolaevulinic acid vs. surgery for basal cell carcinoma. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2013;27(8):980-4.
47. Issa MC, Manela-Azulay M. Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation. An Bras Dermatol. 2010;85(4):501-11.
48. Wikipedija - suradnici. Optika [Internet]. Wikipedija, Slobodna enciklopedija; [ažurirano 02.09.2016; pristupljeno 16.08.2017.]. Dostupno na: //hr.wikipedia.org/w/index.php?title =Optika&oldid=4768098.
49. Wang, I. Photodynamic therapy and laser-based diagnostic studies of malinant tumours [disertacija]. Lund: Lund University Hospital; 1999.
50. Baron ED, Suggs AK. Introduction to photobiology. Dermatol Clin. 2014;32(3):255-66.
51. Aveline BM. Primary processes in photosensitization mechanisms. U: Calzavara-Pinton P, Szeimies RM, Ortel B, ur. Photodynamic Therapy and Fluorescence

Diagnosis in Dermatology; Comprehensive Series in Photosciences. 2: Elsevier; 2001. Str. 17-37.

52. Szeimies RM, Dräger J, Abels C, Landthaler M. History of photodynamic therapy in dermatology. U: Calzavara-Pinton P, Szeimies RM, Ortel B, ur. Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnosis in Dermatology; Comprehensive Series in Photosciences. 2: Elsevier; 2001. str. 3-15.
53. Kennedy JC, Pottier RH, Pross DC. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. J Photochem Photobiol B. 1990;6(1-2):143-8.
54. Leibovici L, Schoenfeld N, Yehoshua HA, Mamet R, Rakowsky E, Shindel A i sur. Activity of porphobilinogen deaminase in peripheral blood mononuclear cells of patients with metastatic cancer. Cancer. 1988;62(11):2297-300.
55. el-Sharabasy MMH, el-Waseef AM, Hafez MM, Salim SA. Porphyrin metabolism in some malignant diseases. Br J Cancer. 1992;65(3):409-12.
56. Nestor MS, Gold MH, Kauvar AN, Taub AF, Geronemus RG, Ritvo EC i sur. The use of photodynamic therapy in dermatology: results of a consensus conference. J Drugs Dermatol. 2006;5(2):140-54.
57. Calzavara-Pinton PG, Venturini M, Sala R. Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: Photochemistry and photobiology. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2007;21(3):293-302.
58. Abrahamse H, Hamblin MR. New photosensitizers for photodynamic therapy. Biochem J. 2016;473(4):347-64.
59. Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? Photochem Photobiol. 1992;55(1):145-57.
60. Szeimies RM, Morton CA, Sidoroff A, Braathen LR. Photodynamic therapy for non-melanoma skin cancer. Acta Derm Venereol. 2005;85(6):483-90.
61. Moseley H. Total effective fluence: a useful concept in photodynamic therapy. Laser Med Sci. 1996;11(2):139-43.
62. Lim HS. Development and optimization of a diode laser for photodynamic therapy. Laser Ther. 2011;20(3):195-203.
63. Karrer S, Baumler W, Abels C, Hohenleutner U, Landthaler M, Szeimies RM. Long-pulse dye laser for photodynamic therapy: investigations in vitro and in vivo. Lasers Surg Med. 1999;25(1):51-9.

64. Alexiades-Armenakas MR, Geronemus RG. Laser-mediated photodynamic therapy of actinic keratoses. Arch Dermatol. 2003;139(10):1313-20.

65. Oseroff AR, Shieh S, Frawley NP, Cheney R, Blumenson LE, Pivnick EK i sur. Treatment of diffuse basal cell carcinomas and basaloid follicular hamartomas in nevoid basal cell carcinoma syndrome by wide-area 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. Arch Dermatol. 2005;141(1):60-7.

66. de Vijlder HC, Sterenborg HJ, Neumann HA, Robinson DJ, de Haas ER. Light fractionation significantly improves the response of superficial basal cell carcinoma to aminolaevulinic acid photodynamic therapy: five-year follow-up of a randomized, prospective trial. Acta Derm Venereol. 2012;92(6):641-7.

67. Kim BS, Kim JY, Song CH, Kim HY, Lee WJ, Lee SJ i sur. Light-emitting diode laser versus pulsed dye laser-assisted photodynamic therapy in the treatment of actinic keratosis and Bowen's disease. Dermatol Surg. 2012;38(1):151-3.

68. Zheng W, Wu Y, Xu X, Gao X, Chen HD, Li Y. Evidence-based review of photodynamic therapy in the treatment of acne. Eur J Dermatol. 2014;24(4):444-56.

69. Szeimies RM, Radny P, Sebastian M, Borrosch F, Dirschka T, Krahn-Senftleben G i sur. Photodynamic therapy with BF-200 ALA for the treatment of actinic keratosis: results of a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study. Br J Dermatol. 2010;163(2):386-94.

70. See JA, Shumack S, Murrell DF, Rubel DM, Fernandez-Penas P. Consensus recommendations on the use of daylight photodynamic therapy with methyl aminolevulinate cream for actinic keratoses in Australia. 2016;57(3):167-74.

71. Babilas P, Schreml S, Landthaler M, Szeimies RM. Photodynamic therapy in dermatology: state-of-the-art. Photodermatol Photoimmunol Photomed. 2010;26(3):118-32.

72. Wang KK, Cottrell WJ, Mitra S, Oseroff AR, Foster TH. Simulations of measured photobleaching kinetics in human basal cell carcinomas suggest blood flow reductions during ALA-PDT. Lasers Surg Med. 2009;41(9):686-96.

73. Christensen E, Skogvoll E, Viset T, Warloe T, Sundstrom S. Photodynamic therapy with 5-aminolaevulinic acid, dimethylsulfoxide and curettage in basal cell carcinoma: a 6-year clinical and histological follow-up. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2009;23(1):58-66.

74. Soler AM, Warloe T, Tausjo J, Berner A. Photodynamic therapy by topical aminolevulinic acid, dimethylsulphoxide and curettage in nodular basal cell carcinoma: a one-year follow-up study. Acta Derm Venereol. 1999;79(3):204-6.

75. Morton CA, Szeimies RM, Sidoroff A, Braathen LR. European guidelines for topical photodynamic therapy part 1: treatment delivery and current indications - actinic keratoses, Bowen's disease, basal cell carcinoma. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2013;27(5):536-44.

76. Moseley H, Brancaleon L, Lesar AE, Ferguson J, Ibbotson SH. Does surface preparation alter ALA uptake in superficial non-melanoma skin cancer in vivo? Photodermatol Photoimmunol Photomed. 2008;24(2):72-5.

77. Christensen E, Mørk C, Foss OA. Pre-Treatment Deep Curettage Can Significantly Reduce Tumour Thickness in Thick Basal Cell Carcinoma While Maintaining a Favourable Cosmetic Outcome When Used in Combination with Topical Photodynamic Therapy. J Skin Cancer. 2011; doi:10.1155/2011/240340.

78. Middelburg TA, Van Zaane F, De Bruijn HS, Van Der Ploeg-van den Heuvel A, Sterenborg HJ, Neumann HA i sur. Fractionated illumination at low fluence rate photodynamic therapy in mice. Photochem Photobiol. 2010;86(5):1140-6.

79. de Haas ER, de Vijlder HC, Sterenborg HJ, Neumann HA, Robinson DJ. Fractionated aminolevulinic acid-photodynamic therapy provides additional evidence for the use of PDT for non-melanoma skin cancer. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV. 2008;22(4):426-30.

80. Iinuma S, Schomacker KT, Wagnieres G, Rajadhyaksha M, Bamberg M, Momma T i sur. In vivo fluence rate and fractionation effects on tumor response and photobleaching: photodynamic therapy with two photosensitizers in an orthotopic rat tumor model. Cancer Res. 1999;59(24):6164-70.

81. Babilas P, Schacht V, Liebsch G, Wolfbeis OS, Landthaler M, Szeimies RM i sur. Effects of light fractionation and different fluence rates on photodynamic therapy with 5-aminolaevulinic acid in vivo. Br J Cancer. 2003;88(9):1462-9.

82. Henderson BW, Busch TM, Vaughan LA, Frawley NP, Babich D, Sosa TA i sur. Photofrin photodynamic therapy can significantly deplete or preserve oxygenation in human basal cell carcinomas during treatment, depending on fluence rate. Cancer Res. 2000;60(3):525-9.

83. Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. Nat Rev Cancer. 2003;3(5):380-7.

84. Henderson BW, Fingar VH. Relationship of tumor hypoxia and response to photodynamic treatment in an experimental mouse tumor. Cancer Res. 1987;47(12):3110-4.

85. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 1972;26(4):239-57.

86. Li W, Ma Q, Wu E. Perspectives on the Role of Photodynamic Therapy in the Treatment of Pancreatic Cancer. Int J Photoenergy. 2012, doi:10.1155/2012/637429.

87. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part two—cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2005;2(1):1-23.

88. Kessel D. Subcellular Targets for Photodynamic Therapy: Implications for Initiation of Apoptosis and Autophagy. J Natl Compr Canc Netw. 2012;10 (Suppl 2):S56-9.

89. Plaetzer K, Kiesslich T, Krammer B, Hammerl P. Characterization of the cell death modes and the associated changes in cellular energy supply in response to AlPcS4-PDT. Photochem Photobiol Sci. 2002;1(3):172-7.

90. Calzavara-Pinton PG, Szeimies RM, Ortel B, ur. Photodynamic therapy and fluorescence diagnosis in dermatlogy. 1 izd. Amsterdam: Elsevier; 2001.

91. Anzengruber F, Avci P, de Freitas LF, Hamblin MR. T-cell mediated anti-tumor immunity after photodynamic therapy: Why does it not always work and how can we improve it? Photochem Photobiol Sci. 2015;14(8):1492-509.

92. Sayre RM, Dowdy JC, Gottschalk RW. Comparative effectiveness of clinically used light sources for cutaneous protoporphyrin IX-based photodynamic therapy. J Cosmet Laser Ther. 2011;13(2):63-8.

93. Puizina-Ivic N, Zorc H, Vanjaka-Rogosic L, Miric L, Persin A. Fractionated illumination improves the outcome in the treatment of precancerous lesions with photodynamic therapy. Coll Antropol. 2008;32 (Suppl 2):67-73.

94. Brightman L, Warycha M, Anolik R, Geronemus R. Do lasers or topicals really work for nonmelanoma skin cancers? Semin Cutan Med Surg. 2011;30(1):14-25.

95. Fantini F, Greco A, Del Giovane C, Cesinaro AM, Venturini M, Zane C i sur. Photodynamic therapy for basal cell carcinoma: clinical and pathological determinants of response. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2011;25(8):896-901.

96. Morton CA, Szeimies RM, Sidoroff A, Braathen LR. European guidelines for topical photodynamic therapy part 2: emerging indications--field cancerization, photorejuvenation and inflammatory/infective dermatoses. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2013;27(6):672-9.

97. Ericson MB, Wennberg A-M, Larkö O. Review of photodynamic therapy in actinic keratosis and basal cell carcinoma. Ther Clin Risk Manag. 2008;4(1):1-9.

98. Kennedy JC, Pottier RH. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. J Photochem Photobiol B. 1992;14(4):275-92.

99. Orenstein A, Kostenich G, Tsur H, Kogan L, Malik Z. Temperature monitoring during photodynamic therapy of skin tumors with topical 5-aminolevulinic acid application. Cancer Lett. 1995;93(2):227-32.

100. Ericson MB, Sandberg C, Stenquist B, Gudmundson F, Karlsson M, Ros AM i sur. Photodynamic therapy of actinic keratosis at varying fluence rates: assessment of photobleaching, pain and primary clinical outcome. Br J Dermatol. 2004;151(6):1204-12.

101. Grapengiesser S, Ericson M, Gudmundsson F, Larko O, Rosen A, Wennberg AM. Pain caused by photodynamic therapy of skin cancer. Clin Exp Dermatol. 2002;27(6):493-7.

102. Kasche A, Luderschmidt S, Ring J, Hein R. Photodynamic therapy induces less pain in patients treated with methyl aminolevulinate compared to aminolevulinic acid. J Drugs Dermatol. 2006;5(4):353-6.

103. Zeitouni NC, Paquette AD, Housel JP, Shi Y, Wilding G, Foster TH i sur. A Retrospective Review of Pain Control by a Two-Step Irradiance Schedule During Topical ALA-Photodynamic Therapy of Non-melanoma Skin Cancer. Lasers Surg Med. 2013;45(2):89-94.

104. Warren CB, Karai LJ, Vidimos A, Maytin EV. Pain Associated with Aminolevulinic Acid-Photodynamic Therapy of Skin Disease. J Am Acad Dermatol. 2009;61(6):1033-43.

105. Monfrecola G, Procaccini EM, D'Onofrio D, Roberti G, Liuzzi R, Staibano S i sur. Hyperpigmentation induced by topical 5-aminolaevulinic acid plus visible light. J Photochem Photobiol B. 2002;68(2-3):147-55.

106. Moseley H, Ibbotson S, Woods J, Brancaleon L, Lesar A, Goodman C i sur. Clinical and research applications of photodynamic therapy in dermatology: experience of the Scottish PDT Centre. Lasers Surg Med. 2006;38(5):403-16.
107. Babilas P, Landthaler M, Szeimies RM. Photodynamic therapy in dermatology. Eur J Dermatol. 2006;16(4):340-8.
108. Morton CA, Whitehurst C, McColl JH, Moore JV, MacKie RM. Photodynamic therapy for large or multiple patches of bowen disease and basal cell carcinoma. Arch Dermatol. 2001;137(3):319-24.
109. Hohenleutner U, Hilbert M, Wlotzke U, Landthaler M. Epidermal damage and limited coagulation depth with the flashlamp-pumped pulsed dye laser: a histochemical study. J Invest Dermatol. 1995;104(5):798-802.
110. Gianfaldoni S, Tchernev G, Wollina U, Fioranelli M, Roccia MG, Gianfaldoni R i sur. An Overview of Laser in Dermatology: The Past, the Present and … the Future (?). Open Access Maced J Med Sci. 2017;5(4):526-30.
111. Maiman TH. Stimulated Optical Radiation in Ruby. Nature. 1960;187(4736):493-4.
112. Bolognia J, Jorizzo JL, Schaffer JV. Dermatology. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012.
113. Anderson RR, Parrish JA. Selective photothermolysis: precise microsurgery by selective absorption of pulsed radiation. Science. 1983;220(4596):524-7.
114. Husain Z, Alster TS. The role of lasers and intense pulsed light technology in dermatology. Clin Cosmet Investig Dermatol. 2016;9:29-40.
115. Kreusch JF. Vascular patterns in skin tumors. Clin Dermatol. 2002;20(3):248-54.
116. Allison KP, Kiernan MN, Waters RA, Clement RM. Pulsed dye laser treatment of superficial basal cell carcinoma: realistic or not? Lasers Med Sci. 2003;18(2):125-6.
117. Ballard CJ, Rivas MP, McLeod MP, Choudhary S, Elgart GW, Nouri K. The pulsed dye laser for the treatment of basal cell carcinoma. Lasers Med Sci. 2011;26(5):641-4.
118. Campolmi P, Mavilia L, Bonan P, Cannarozzo G, Lotti TM. 595 nm pulsed dye laser for the treatment of superficial basal cell carcinoma. Lasers Med Sci. 2005;20(3-4):147-8.
119. Campolmi P, Troiano M, Bonan P, Cannarozzo G, Lotti T. Vascular based non conventional dye laser treatment for basal cell carcinoma. Dermatol Ther. 2008;21(5):402-5.

120. Shah SM, Konnikov N, Duncan LM, Tannous ZS. The effect of 595 nm pulsed dye laser on superficial and nodular basal cell carcinomas. Lasers Surg Med. 2009;41(6):417-22.

121. Konnikov N, Avram M, Jarell A, Tannous Z. Pulsed dye laser as a novel non-surgical treatment for basal cell carcinomas: response and follow up 12-21 months after treatment. Lasers Surg Med. 2011;43(2):72-8.

122. Minars N, Blyumin-Karasik M. Treatment of Basal Cell Carcinomas with Pulsed Dye Laser: A Case Series. J Skin Cancer. 2012;2012:286480.

123. Shahshahani M, Ehsani A, Noormohammadpour P, Kamiab Hesary K, Gholamali F. 595nm pulsed dye laser: an alternative to treat basal cell carcinomas. J Lasers Med Sci 2011; 2(3):98-102.

124. Tran HT, Lee RA, Oganesyan G, Jiang SB. Single treatment of non-melanoma skin cancers using a pulsed-dye laser with stacked pulses. Lasers Surg Med. 2012;44(6):459-67.

125. Alonso-Castro L, Rios-Buceta L, Boixeda P, Paoli J, Moreno C, Jaen P. The effect of pulsed dye laser on high-risk basal cell carcinomas with response control by Mohs micrographic surgery. Lasers Med Sci. 2015;30(7):2009-14.

126. Karsai S, Friedl H, Buhck H, Junger M, Podda M. The role of the 595-nm pulsed dye laser in treating superficial basal cell carcinoma: outcome of a double-blind randomized placebo-controlled trial. Br J Dermatol. 2015;172(3):677-83.

127. Jalian HR, Avram MM, Stankiewicz KJ, Shofner JD, Tannous Z. Combined 585 nm pulsed-dye and 1,064 nm Nd:YAG lasers for the treatment of basal cell carcinoma. Lasers Surg Med. 2014;46(1):1-7.

128. Strasswimmer J, Grande DJ. Do pulsed lasers produce an effective photodynamic therapy response? Lasers Surg Med. 2006;38(1):22-5.

129. Channual J, Choi B, Osann K, Pattanachinda D, Lotfi J, Kelly KM. Vascular Effects of Photodynamic and Pulsed Dye Laser Therapy Protocols. Lasers Surg Med. 2008;40(9):644-50.

130. Alexiades-Armenakas MR, Geronemus RG. Laser-mediated photodynamic therapy of actinic cheilitis. J Drugs Dermatol. 2004;3(5):548-51.

131. Britton JE, Goulden V, Stables G, Stringer M, Sheehan-Dare R. Investigation of the use of the pulsed dye laser in the treatment of Bowen's disease using 5-aminolaevulinic acid phototherapy. Br J Dermatol. 2005;153(4):780-4.

132. Shafirstein G1, Friedman A, Siegel E, Moreno M, Bäumler W, Fan CY i sur. Using 5-aminolevulinic acid and pulsed dye laser for photodynamic treatment of oral leukoplakia. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2011;137(11):1117-23.

133. Passeron T, Khemis A, Ortonne JP. Pulsed dye laser-mediated photodynamic therapy for acne inversa is not successful: a pilot study on four cases. J Dermatolog Treat. 2009;20(5):297-8.

134. Orringer JS, Sachs DL, Bailey E, Kang S, Hamilton T, Voorhees JJ. Photodynamic therapy for acne vulgaris: a randomized, controlled, split-face clinical trial of topical aminolevulinic acid and pulsed dye laser therapy. J Cosmet Dermatol. 2010;9(1):28-34.

135. Garcia-Morales I, Harto A, Fernandez-Guarino M, Jaen P. Photodynamic therapy for acne: use of the pulsed dye laser and methylaminolevulinate. Actas Dermosifiliogr. 2010;101(9):758-70.

136. Kessels JP, Nelemans PJ, Mosterd K, Kelleners-Smeets NW, Krekels GA, Ostertag JU. Laser-mediated Photodynamic Therapy: An Alternative Treatment for Actinic Keratosis? Acta Derm Venereol. 2016;96(3):351-4.

137. Haedersdal M, Togsverd-Bo K, Wiegell SR, Wulf HC. Long-pulsed dye laser versus long-pulsed dye laser-assisted photodynamic therapy for acne vulgaris: A randomized controlled trial. J Am Acad Dermatol. 2008;58(3):387-94.

138. Fernandez-Guarino M, Harto A, Jaen P. Pulsed dye laser does not seem as effective as red light in Basal cell carcinoma mal-pdt: a small pilot study. J Skin Cancer. 2012;2012:396481.

139. Roozeboom MH, Arits AH, Nelemans PJ, Kelleners-Smeets NW. Overall treatment success after treatment of primary superficial basal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis of randomized and nonrandomized trials. Br J Dermatol. 2012;167(4):733-56.

140. Swetter SM, Boldrick JC, Pierre P, Wong P, Egbert BM. Effects of biopsy-induced wound healing on residual basal cell and squamous cell carcinomas: rate of tumor regression in excisional specimens. J Cutan Pathol. 2003;30(2):139-46.

141. Sealed Envelope Ltd. Power calculator for binary outcome non-inferiority trial. Dostupno na: https://www.sealedenvelope.com/power/binary-noninferior.

142. Li D, Chen B, Wu WJ, Wang GX, He YL, Ying ZX. Experimental study on the vascular thermal response to visible laser pulses. Lasers Med Sci. 2015;30(1):135-45.

143. Kimel S, Svaasand LO, Hammer-Wilson M, Schell MJ, Milner TE, Nelson JS i sur. Differential vascular response to laser photothermolysis. J Invest Dermatol. 1994;103(5):693-700.

144. Kelly KM, Kimel S, Smith T, Stacy A, Hammer-Wilson MJ, Svaasand LO i sur. Combined photodynamic and photothermal induced injury enhances damage to in vivo model blood vessels. Lasers Surg Med. 2004;34(5):407-13.

145. Togsverd-Bo K, Idorn LW, Philipsen PA, Wulf HC, Hædersdal M. Protoporphyrin IX formation and photobleaching in different layers of normal human skin: Methyl- and hexylaminolevulinate and different light sources. Exp Dermatol. 2012 Oct;21(10):745-50.

146. Wang H, Xu Y, Shi J, Gao X, Geng L. Photodynamic therapy in the treatment of basal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. Photodermatol Photoimmunol Photomed. 2015;31(1):44-53.

147. Szeimies RM, Ibbotson S, Murrell DF, Rubel D, Frambach Y, de Berker D i sur. 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. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2008;22(11):1302-11.

148. Arits AH, Mosterd K, Essers BA, Spoorenberg E, Sommer A, De Rooij MJ i sur. Photodynamic therapy versus topical imiquimod versus topical fluorouracil for treatment of superficial basal-cell carcinoma: a single blind, non-inferiority, randomised controlled trial. Lancet Oncol. 2013;14(7):647-54.

149. Vinciullo C, Elliott T, Francis D, Gebauer K, Spelman L, Nguyen R i sur. Photodynamic therapy with topical methyl aminolaevulinate for 'difficult-to-treat' basal cell carcinoma. Br J Dermatol. 2005;152(4):765-72.

150. Morton C, Campbell S, Gupta G, Keohane S, Lear J, Zaki I i sur. Intraindividual, right-left comparison of topical methyl aminolaevulinate-photodynamic therapy and cryotherapy in subjects with actinic keratoses: a multicentre, randomized controlled study. Br J Dermatol. 2006;155(5):1029-36.

151. Souza CS, Felicio LB, Ferreira J, Kurachi C, Bentley MV, Tedesco AC i sur. Long-term follow-up of topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy diode laser single session for non-melanoma skin cancer. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2009;6(3-4):207-13.

152. Horn M, Wolf P, Wulf HC, Warloe T, Fritsch C, Rhodes LE i sur. Topical methyl aminolaevulinate photodynamic therapy in patients with basal cell carcinoma prone to complications and poor cosmetic outcome with conventional treatment. Br J Dermatol. 2003;149(6):1242-9.

153. Morton CA, MacKie RM, Whitehurst C, Moore JV, McColl JH. Photodynamic therapy for basal cell carcinoma: effect of tumor thickness and duration of photosensitizer application on response. Arch Dermatol. 1998;134(2):248-9.

154. Wiegell SR, Stender IM, Na R, Wulf HC. Pain associated with photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid or 5-aminolevulinic acid methylester on tape-stripped normal skin. Arch Dermatol. 2003;139(9):1173-7.

155. Kuijpers DI, Thissen MR, Thissen CA, Neumann MH. Similar effectiveness of methyl aminolevulinate and 5-aminolevulinate in topical photodynamic therapy for nodular basal cell carcinoma. J Drugs Dermatol. 2006;5(7):642-5.

156. van Oosten EJ, Kuijpers DI, Thissen MR. Different pain sensations in photodynamic therapy of nodular basal cell carcinoma Results from a prospective trial and a review of the literature. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2006;3(1):61-8.

157. Wiegell SR, Skiveren J, Philipsen PA, Wulf HC. Pain during photodynamic therapy is associated with protoporphyrin IX fluorescence and fluence rate. Br J Dermatol. 2008;158(4):727-33.

158. Pagliaro J, Elliott T, Bulsara M, King C, Vinciullo C. Cold air analgesia in photodynamic therapy of basal cell carcinomas and Bowen's disease: an effective addition to treatment: a pilot study. Dermatol Surg. 2004;30(1):63-6.

159. Braathen LR, Szeimies RM, Basset-Seguin N, Bissonnette R, Foley P, Pariser D i sur. Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer: an international consensus. International Society for Photodynamic Therapy in Dermatology, 2005. J Am Acad Dermatol. 2007;56(1):125-43.

160. Christensen E, Mork C, Skogvoll E. High and sustained efficacy after two sessions of topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy for basal cell carcinoma: a prospective, clinical and histological 10-year follow-up study. Br J Dermatol. 2012;166(6):1342-8.

10. ŽIVOTOPIS

Antoanela Čarija rođena je 1970. g. Godine 1996. diplomirala je na Medicinskom fakultetu Zagreb – Studij u Splitu. Do 2001. g. radila je kao liječnica opće medicine u Bolu. Sredinom 2001. g. završila je poslijediplomski stručni studij – Ultrazvuk u gastroenterohepatologiji – Medicinskog fakulteta u Zagrebu. Krajem 2001. g. započela je specijalizaciju iz dermatovenerologije, tijekom koje je i završila poslijediplomski studij iz dermatovenerologije. Od 2005. g. radi kao specijalist dermatovenerolog na Klinici za kožne i spolne bolesti KBC-a Split. Godine 2006. izabrana je u suradničko zvanje naslovnog asistenta na Katedri za dermatovenerologiju Medicinskog fakulteta Split, a od 2011. radi kao vanjski suradnik i na Sveučilišnom odjelu zdravstvenih studija Sveučilišta u Splitu. Godine 2009. upisuje doktorski poslijediplomski studij „Medicina utemeljena na dokazima“.

Od 2006. g., nakon dvotjedne edukacije u Pragu, radi s laserima u Ambulanti za kozmetologiju i lasersku terapiju. Tijekom 2014. g. završila je stručnu edukaciju na Klinici za radiologiju KBC-a Split – kabinet za kolor dopler krvnih žila – te tu metodu od sredine 2014. primjenjuje u flebološkoj ambulanti Poliklinike za kožne i spolne bolesti KBC-a Split. U svibnju 2014. g. započela je subspecijalizaciju iz dermatološke onkologije. Subspecijalistički ispit je položila u rujnu 2016. g. i od tada radi i kao subspecijalistica dermatološke onkologije. Sudjelovala je kao glavni istraživač u dvije kliničke studije te aktivno na brojnim međunarodnim i domaćim kongresima i simpozijima te je autor i koautor više znanstvenih radova. Sudjelovala je u edukaciji liječnika opće medicine u područjima flebologije i dermatoskopije, kako u klasičnim tako i u telemedicinskim tečajevima. Od 2006. g. do danas sudjeluje i u nastavi studenata medicine (dermatologija, izborni predmet korektivna dermatologija i kozmetologija), dentalne medicine, sestrinstva, porodništva te studenata medicine na engleskom jeziku. Radi u ambulantama – flebologija, kozmetologija i laserska terapija, dermatoskopija i dermatološka onkologija, u ambulanti za biološku terapiju te u dermatokirurškoj ambulanti. Član je Hrvatskog dermatovenerološkog društva i IDS-a (International Dermoscopy Society).

Aktivno govori engleski i njemački jezik, a talijanski pasivno.

Udata je i ima dvoje djece.