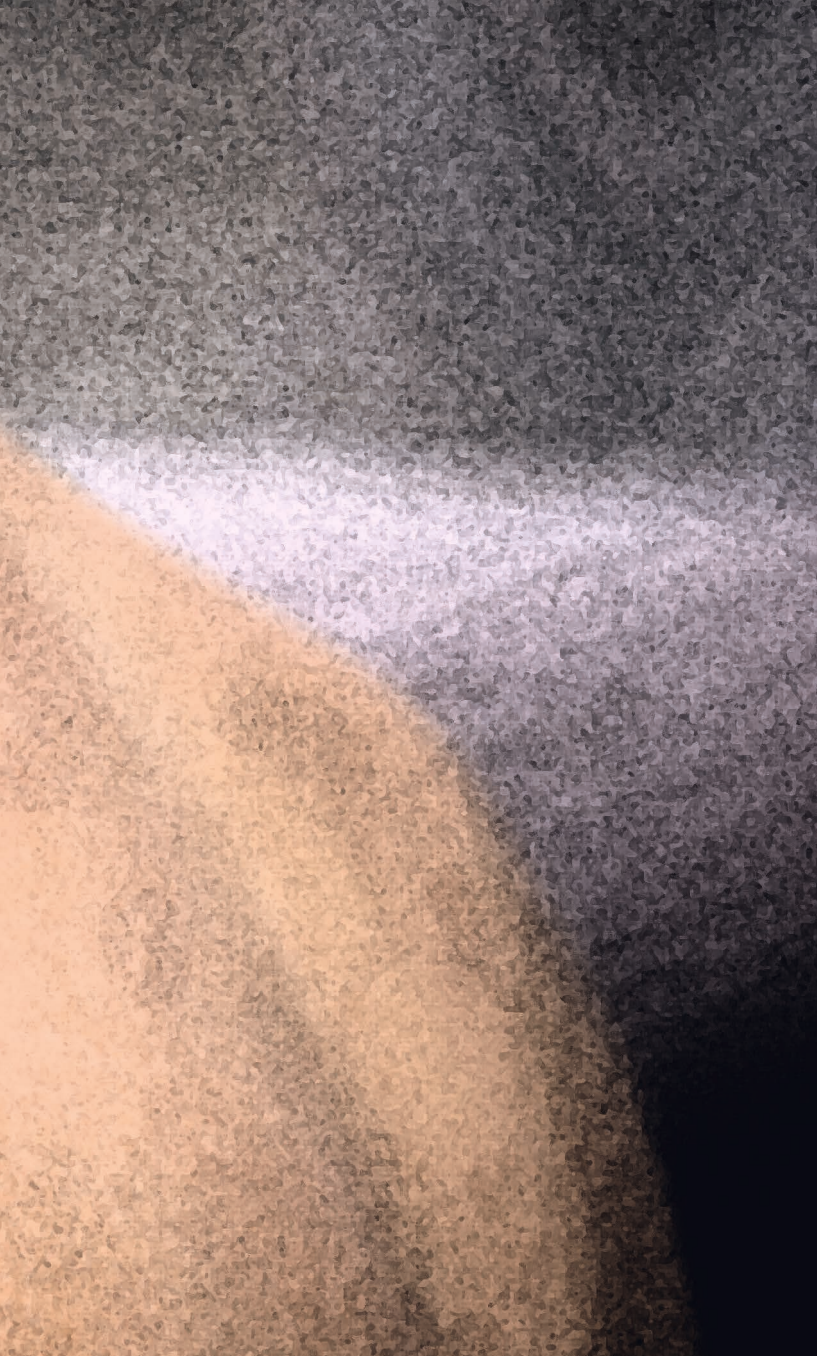




Nya terapier mot strålbiverkningar baseras på lokal justering av proteinet plasminogen

Mer än hälften av de cancerpatienter som behandlas för sin sjukdom erhåller någon form av strålbehandling. Strålning är mycket effektivt, men ger också biverkningar i form av skador på bestrålade hudområden – dermatit. Idag finns det ingen effektiv förebyggande terapi för att behandla uppkomst av radiodermatit. De strategier som används för att behandla dermatit är dessutom ineffektiva. Men nu visar ny forskning från Umeå lovande resultat vad gäller nya behandlingsstrategier och förhoppningsvis framtida läkemedel. Här beskriver forskarna **Mahsa Fallah** och **Tor Ny** de senaste rönen inom området, bland annat hur proteinet plasminogen kan användas.



Ungefär 50 procent av de cancerpatienter som behandlas för sin sjukdom får någon form av strålbehandling ensamt eller i kombination med andra terapier. Även om teknikerna för strålbehandling kontinuerligt utvecklas och förbättras drabbas många patienter av strålningsinducerade sidoeffekter på normal och icke cancerogen vävnad. Sådana biverkningar drabbar oftast vävnader med snabbt prolifererande celler, framförallt i huden, mag-tarmkanalen och benmärgen. När det gäller huden påverkas den faktiskt i någon form efter alla former av strålbehandling. Den tidigaste synliga reaktionen är erythem som inträffar hos över 90 procent av patienterna. Erythem kan senare övergå till deskvamation (avfjällning av huden) och i svårare fall även till att hudsår bildas. Strålningsinducerad dermatit är väldigt smärtsamt och påverkar patienternas livskvalitet mycket negativt och ibland medför att strålterapi inte kan fullföljas. Det finns även andra biverkning-

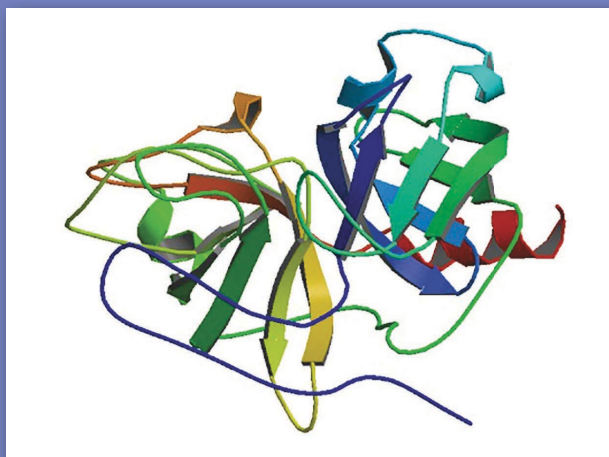
ar av strålbehandling som kan komma betydligt senare, från månader till år efter strålbehandlingen. Sådana sena biverkningar av strålbehandling kan bland annat innefatta sårbildning och även utveckling av fibros.

De terapier man idag använder för att behandla strålningsinducerade biverkningar är inte optimala. Främst används krämer med eller utan tillsats av kortikosteroider, antibiotika eller olika typer av förband. Ibland när det gäller svåra skador krävs även hudtransplantationer.

Mekanismerna för hur vanliga sår på huden bildas och läker skiljer sig mycket från hur strålningsinducerade sår bildas och läker. När det gäller vanliga hudsår orsakas sådana sår av någon form av trauma. Det kan vara ett snabbt mekaniskt, kemiskt eller värmetrauma. Läkningprocessen när det gäller dessa sår består av tre delvis överlappande faser (inflammations-, vävnadsbildnings- och vävnadsomlagringsfasen). Under fysiologiska förhållanden aktiveras och

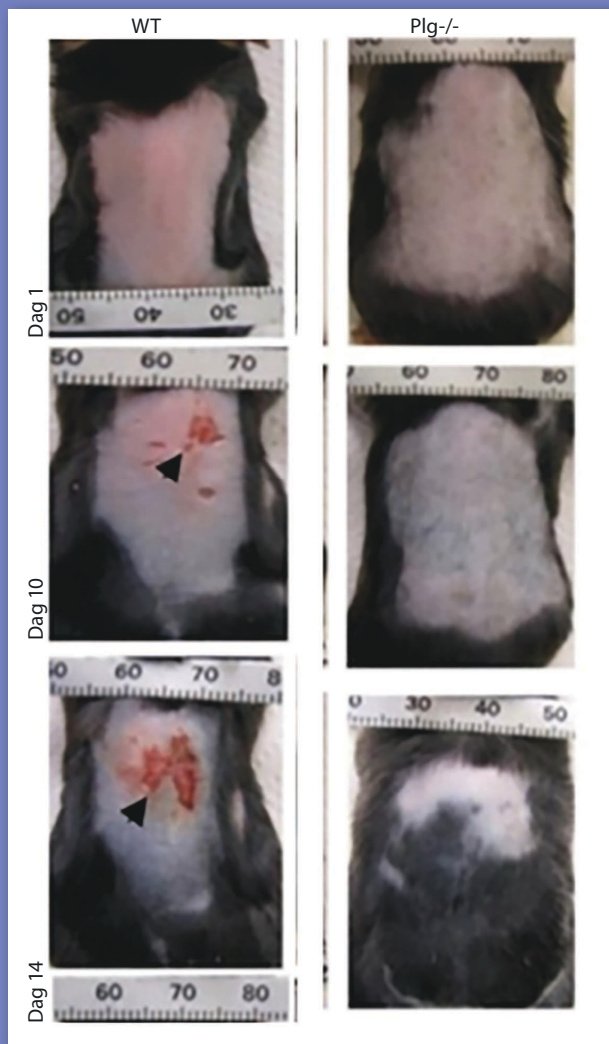
” *Mekanismerna för hur vanliga sår på huden bildas och läker skiljer sig mycket från hur strålningsinducerade sår bildas och läker.*

Figur 1



Figur 1. Kristallstruktur av den humana plasminogenmolekylen katalytiska domän. (X. Wang et al. Journal of Molecular Biology)

Figur 2



Figur 2. Plasmaproteinet plasminogen krävs för att radiodermatit skall kunna utvecklas. Representativa bilder på hud från bestrålade möss av olika genotyper. Vänster panel (WT) är möss med normal nivå av plasminogen i cirkulationen. Höger panel (Plg -/-) är möss som saknar plasminogen i cirkulationen. Bilderna visar att radiodermatit utvecklas efter 10 dagar hos WT möss men att de möss som saknar plasminogen inte utvecklar några hudskador. Svarta pilar indikerar radiodermatit. (Fallah et al. Cell death & disease 2018).

termineras dessa tre läkningsfaser genom en koordinerad verkan av ett stort antal olika signalmolekyler som cytokiner, kemokiner och tillväxtfaktorer som tillsammans styr denna komplicerade biologiska process. Onormal aktivering eller terminering av någon av dessa faser kan resultera i att läkningsprocessen avstannar och att kroniska sår utvecklas. När det gäller bildning av strålningsinducerad dermatit eller strålningsinducerade hudskador är processen delvis annorlunda. Dessa sår utvecklas mer över tid och är orsakade av en oxidativ stress som orsakas av strålningen följt av ett kraftigt utbrott av inflammation som sedan ofta leder till en bristfällig vävnadsomlagring.

DE MOLEKYLÄRA MEKANISMERNA

De molekylära mekanismerna som orsakar strålningsinducerade hudskador är ej i detalj kända. Den huvudsakliga mekanismen bakom sådana skador är att strålningen ger brott på DNA-strängarna vilket främst sker i snabbt växande celler. Även reaktiva oxidativa radikaler (ROS) som induceras av strålningen anses vara viktiga för att starta utvecklingen av strålningsinducerade vävnadsskador. Strålningen och dess effekter leder också till att en mycket kraftig inflammationsreaktion startas upp. Utbrottet av den kraftiga inflammationen är en av de viktigaste orsakerna till att strålningsinducerade hudskador uppstår. Den kraftiga inflammationen är även orsak till att den efterkommande normala reparationen av hudskadorna undertrycks (Singh et al., 2016). Strålningen orsakar också skador på endotelceller i huden vilket leder till att kapillärer skadas, med ett reducerat blodflöde som följd (Denham et al., 2002). Även fibroblasterna i huden skadas av strålningen vilket bland annat leder till en defekt kollagensyntes med fibrosutveckling som följd (Dormand et al., 2005).

DÄRFÖR KRÄVS PLASMINOGEN

Plasminogen är ett pro-enzym som produceras i levern och utsöndras till cirkulationen i ganska höga koncentrationer (0,2 mg/ml). Se figur 1.

För att plasminogen skall vara verksamt krävs att plasminogenmolekylen aktiveras till sin aktiva form plasmin. Detta utförs av så kallade plasminogenaktivatörer och utförs genom en proteolytisk klyvning av plasminogenmolekylen. Plasmin som då bildas är ett aktivt protease som har många olika funktioner bland annat i den vaskulära fibrinolysen där plasmin löser upp fibrinkoagel som bildas i vår cirkulation (Chapin et al., 2015).

Under senare år har vår forskargrupp visat att plasminogen även har en viktig funktion när det gäller aktivering och kontroll av kroppens inflammationsförsvar. Våra studier har visat att plasminogen har en viktig regulatorisk funktion både när det gäller initiering och terminering av de inflammatoriska faserna (Li et al., 2005; Shen et al., 2014). Våra studier har även visat att plasminogen påskyndar läkningsprocessen av både akuta och diabetiska sår (Shen et al., 2012; Sulniute et al., 2016).

Eftersom ett kraftigt utbrott av inflammation är en av de viktigaste orsakerna till att strålningsinducerade hudskador uppstår och våra studier i andra system hade visat att plas-

minogen är en viktig inflammatorisk regulator valde vi att undersöka vilken funktion plasminogen har när det gäller utveckling och läkning av strålningsinducerade hudskador.

Med stöd från Cancerfonden startade vi ett prekliniskt forskningsprojekt där vi bestrålade normala wild-typs möss (WT) som har alla gener intakta samt möss där genen för plasminogen inaktiverats (plg-deficienta) möss. De båda musstammarna bestrålades med samma stråldos (15Gy) vid ett tillfälle. Som visas i figur 2 utvecklar de normala WT-mössen en hudskada redan efter 10 dagar som förvärras till ett sår efter 14 dagar. Mössen som saknade plasminogen var däremot i princip resistent mot utvecklingen av radio-dermatit och ingen hudskada kunde ses även efter 14 eller efter 21 dagar (Fallah et al., 2018). Våra fortsatta studier av den molekylära mekanismen bakom plasminogenets effekt har visat att plasminogen är en viktig signalmolekyl i huden som efter bestrålning upp-reglerar uttrycket av många olika gener och då främst gener som är involverade i aktivering av och kontroll av inflammationen.

NYA TÄNKBARA LÄKEMEDELSKANDIDATER

Eftersom inflammation är en viktig orsak till att strålnings-inducerade hudskador uppstår och plasminogen aktiverar inflammationen vore en substans som inhiberar plasminogenaktivering en ny tänkbar läkemedelskandidat för att förhindra bildning av strålningsinducerade vävnadsskador.

Tranexansyra (TXA) och epsilon-aminocaproic acid (EACA) är två substanser som används kliniskt för att behandla blödningar som verkar genom att inhibera plasminogenaktivering. I experiment på möss har vi visat att behandling med TXA förhindrar att en skadlig inflammation induceras efter bestrålning. Denna behandling resulterade också i en dramatisk minskning av radiodermatit-utvecklingen hos normala WT-möss.

I figur 3 beskrivs mekanismen för hur plasminogen medverkar till att den skadliga inflammationen induceras och hur detta kan förhindras med TXA.

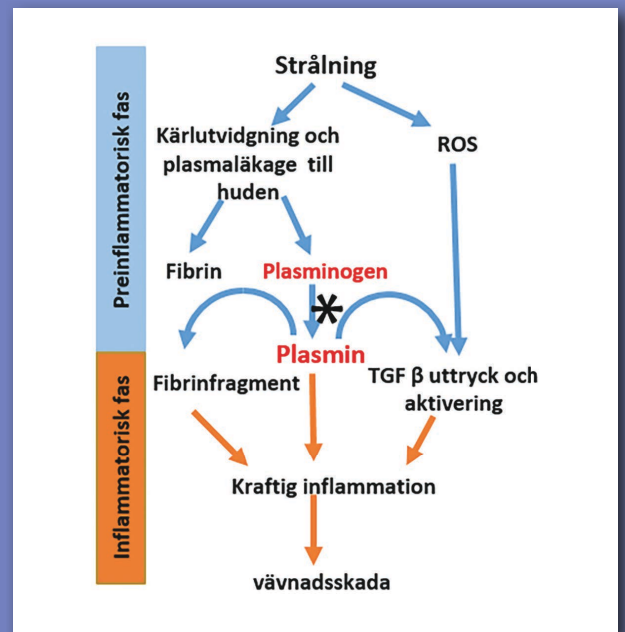
Behandling med TXA före eller under strålbehandlingen kan därför bli en ny strategi för att förhindra uppkomst av strålnings-inducerade vävnadsskador hos patienter.

LOKAL BEHANDLING FÖRBÄTTRAR

För närvarande finns inga biologiska läkemedel som påskyndar eller förbättrar läkningen av redan uppkomna strålbiverkningar när sådana väl har uppstått. Våra studier på läkning av andra typer av sår i möss har visat att plasminogen har en viktig roll och stimulerar läkning av såväl brännsår som kroniskt diabetiska sår (Shen et al., 2012; Sulniute et al., 2016). Vi initierade därför studier av plasminogenets roll för läkning av strålningsinducerade sår.

Våra studier i möss har visat att när strålningsinducerade hudskador väl har uppstått karakteriseras dessa av en kraftig infiltration av neutrofiler, hög fibrin-deposition samt högt uttryck av pro-inflammatoriska och pro-fibrotiska faktorer (Fallah et al., 2020). Vi har upptäckt att lokal injektion av plasminogen runt redan uppkomna strålnings-inducerade sår hos WT-möss leder till en dramatisk förbättring av läkningsprocessen (Fallah et al., 2020). Vi fann

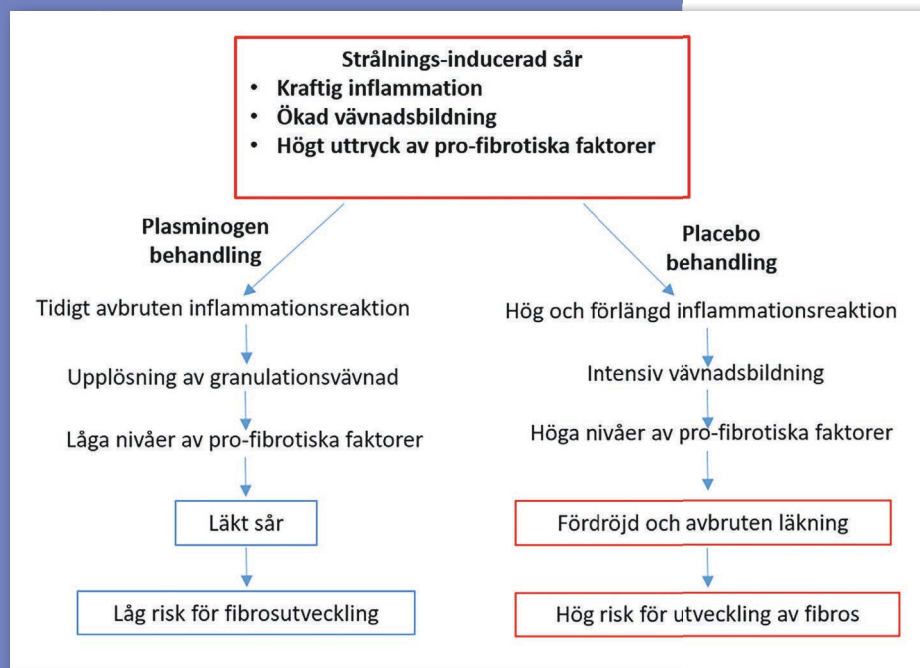
Figur 3



Figur 3. Modell som beskriver plasminogenets funktion när det gäller utveckling av strålnings-inducerade hudskador. Figuren visar att plasminogen har en central plats i utvecklingen av hudskador. Stjärnmarkeringen i figuren indikerar var man genom att behandla med TXA eller EACA kan förhindra påslag av den kraftiga inflammationen och därigenom att radiodermatit inte utvecklas. (Fallah et al. Cell death & disease 2018).

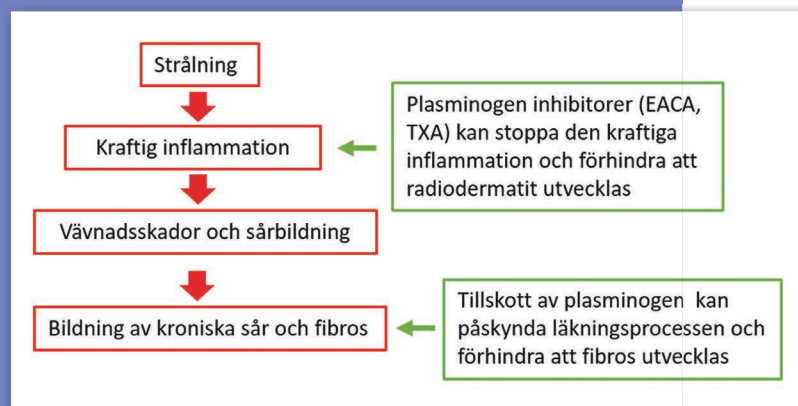
” Eftersom inflammation är en viktig orsak till att strålningsinducerade hudskador uppstår och plasminogen aktiverar inflammationen vore en substans som inhiberar plasminogenaktivering en ny tänkbar läkemedelskandidat för att förhindra bildning av strålningsinducerade vävnadsskador.

Figur 4



Figur 4. Mekanism för läkning av radiodermatit med och utan tillsats av plasminogen. (Fallah et al. Cell death & disease 2020).

Figur 5



Figur 5. Schematisk bild över mekanismen som leder till bildandet av strålningsinducerade hudskador samt hur man genom att justera nivåer av plasminogen kan förhindra utvecklandet av strålningsinducerade biverkningar. Genom att behandla med TXA eller EACA kan man förhindra att strålbiverkningar uppstår. När hudskador väl har uppstått kan man genom att lokalt behandla med plasminogen påskynda läkningen samt minska risken för att kroniska sår och fibros utvecklas.

att plasminogenbehandling av dessa sår minskar inflammationen och bildningen av granulationsvävnad och snabbar på reepitheliseringen och utmognad av kollagen.

Våra detaljstudier där vi undersöker vilka gener som är uttryckta under fysiologisk sårhäkning och läkning av strålbiverkningar har visat att plasminogen verkar på gennivå och ändrar uttrycket av ett stort antal gener. Plasminogen nedreglerar uttrycket av vissa gener och uppreglerar uttrycket av andra. Dessa gener ingår i olika signaltransduktionsvägar och sammantaget leder detta till minskad inflammation och förbättrad om-lagring av granulationsvävnad. Många av de faktorer som nedregleras av plasminogen är också

pro-fibrotiska vilket vi tror kommer att leda till mindre fibrosbildning (Fallah et al. 2020). I strålningsinducerade sår med kraftig inflammation styr plasminogen om läkningsprocessen så att den påskyndas och blir mer lik normal fysiologisk läkning. Därmed minskar också risken för att skadan ska utvecklas till fibros.

Sammantaget gör detta plasminogen till en attraktiv läkemedelskandidat för behandling av radiodermatit hos cancerpatienter. I figur 4 beskrivs hur plasminogenbehandling skulle kunna användas för att påskynda läkning av radiodermatit.

TVÅ OLIKA STRATEGIER

Plasmaproteinet plasminogen har både en skadlig och nyttig verkan när det gäller uppkomst och utveckling av strålbiverkningar. Våra studier i möss har visat att proteinet plasminogen krävs för att strålningsinducerade skador på huden ska uppstå. Men när en sådan skada väl har uppstått leder en lokal administration av plasminogen till att läkningsprocessen påskyndas. För närvarande finns inga biologiskt aktiva läkemedel på marknaden som förhindrar uppkomst av strålnings-inducerade sidoeffekter eller som stimulerar en minskning av strålinducerad dermatit. I figur 5 beskrivs hur man genom att justera nivån av plasminogen har två nya terapimöjligheter för att minska biverkningar i form av skador på bestrålade hudområden.

I våra fortsatta studier avser vi studera de molekylära mekanismerna bakom effekten av plasminogen samt att välja optimal dos och tid för behandlingar. Vi avser också att studera om dessa behandlingar påverkar cancercellernas strålkänslighet. Den långsiktiga målsättningen med projektet är naturligtvis att slutföra de prekliniska studier som krävs för att en ansökan om kliniska prövningar ska kunna

••• biverkningar

lämnas in till Läkelmedelverket vilket skulle kunna leda till två nya behandlingsmetoder för att minska strål-inducerade biverkningar.

” *Våra studier i möss har visat att proteinet plasminogen krävs för att strålning-inducerade skador på huden ska uppstå. Men när en sådan skada väl har uppstått leder en lokal administration av plasminogen till att läkningsprocessen påskyndas.*

Fotnot: Forskningen i Tor Nys forskningsgrupp stöds av Cancerfonden, Cancerforskningsfonden Norrland, Lions Cancerforskningsfond samt Familjen Erling Persons Stiftelse. Detta projekt var ett samarbete med Bertil Lundskog Inst. För Medicinsk Biovetenskap (Patologi), samt Michael Johansson och Michael Blomqvist, Inst. för strålvvetenskaper, alla tillhörande Umeå Universitet.

Referenser:

Chapin, J. C., & Hajjar, K. A. (2015). Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood reviews*, 29(1), 17-24. doi:10.1016/j.blre.2014.09.003

Denham, J. W., & Hauer-Jensen, M. (2002). The radiotherapeutic injury--a complex 'wound'. *Radiother Oncol*, 63(2), 129-145.

Dormand, E. L., Banwell, P. E., & Goodacre, T. E. (2005). Radiotherapy and wound healing. *Int Wound J*, 2(2), 112-127. doi:10.1111/j.1742-4801.2005.00079.x

Fallah, M., Shen, Y., Brodén, J., Bäckman, A., Lundskog, B., Johansson, M., et al. (2018). Plasminogen activation is required for the development of radiation-induced dermatitis. *Cell Death Dis*, 9(11), 1051. doi:10.1038/s41419-018-1106-8

Fallah, M., Viklund, E., Bäckman, A., Brodén, J., Lundskog, B., Johansson, M., et al. (2020). Plasminogen is a master regulator and a potential drug candidate for the healing of radiation wounds. *Cell Death Dis*, 11(3), 201-201. doi:10.1038/s41419-020-2397-0

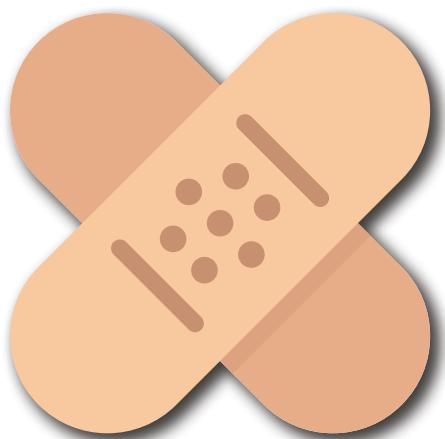
Li, J., Ny, A., Leonardsson, G., Nandakumar, K. S., Holmdahl, R., & Ny, T. (2005). The Plasminogen Activator/Plasmin System Is Essential for Development of the Joint Inflammatory Phase of Collagen Type II-Induced Arthritis. *The American Journal of Pathology*, 166(3), 783-792. doi:https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62299-7

Shen, Y., Guo, Y., Wilczynska, M., Li, J., Hellström, S., & Ny, T. (2014). Plasminogen initiates and potentiates the healing of acute and chronic tympanic membrane perforations in mice. *Journal of Translational Medicine*, 12(1), 5. doi:10.1186/1479-5876-12-5

Shen, Y., Guo, Y. Z., Mikus, P., Sulniute, R., Wilczynska, M., Ny, T., et al. (2012). Plasminogen is a key proinflammatory regulator that accelerates the healing of acute and diabetic wounds. *Blood*, 119(24), 5879-5887. doi:10.1182/blood-2012-01-407825

Singh, M., Alavi, A., Wong, R., & Akita, S. (2016). Radiodermatitis: A Review of Our Current Understanding. *Am J Clin Dermatol*, 17(3), 277-292. doi:10.1007/s40257-016-0186-4

Sulniute, R., Shen, Y., Guo, Y. Z., Fallah, M., Ahlskog, N., Ny, L., et al. (2016). Plasminogen is a critical regulator of cutaneous wound healing. *Thrombosis and Haemostasis*, 115(5), 1001-1009. doi:10.1160/Th15-08-0653



MAHSA FALLAH, POST-DOC, INSTITUTIONEN FÖR MEDICINSK KEMI OCH BIOFYSIK, UMEÅ UNIVERSITET, MAHSA.FALLAH@UMU.SE



TOR NY, SENIORPROFESSOR, INSTITUTIONEN FÖR MEDICINSK KEMI OCH BIOFYSIK, UMEÅ UNIVERSITET, TOR.NY@UMU.SE

