

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Neringa
DAUGELAVIČIENĖ

Pirminių keratinocitų ir epidermoidinės karcinomos ląstelių atsako į fotodinaminį poveikį tyrimas

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
biochemija (N 004)

VILNIUS 2022

Disertacija rengta 2007–2011 / 2017–2018 metais Vilniaus universitete.

Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba (T-06161) ir ES struktūrinis fondas (VPI-3.1-ŠMM-08-K-001-005).

Disertacija ginama eksternu.

Mokslinė konsultantė – doc. dr. Aušra Sasnauskienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004).

Gynimo taryba:

Pirmininkas – prof. dr. Kęstutis Sužiedėlis (Nacionalinis vėžio institutas, gamtos mokslai, biochemija, N 004).

Nariai:

dr. Veronika Borutinskaitė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004),

dr. Virginija Bukelskienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004),

prof. dr. Vytautė Starkuvienė-Erfle (Heidelbergo universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004),

dr. Jonas Venius (Nacionalinis vėžio institutas, gamtos mokslai, biofizika, N 011).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2022 m. balandžio mėn. 27 d. 13 val. Vilniaus Universiteto Gyvybės mokslų centro R401 auditorijoje. Adresas: Saulėtekio al. 7, Vilnius, Lietuva, tel. +370 678 34327; el. paštas neringa.daugelaviciene@gmc.vu.lt.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus Universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

VILNIUS UNIVERSITY

Neringa
DAUGELAVICIENE

Investigation of primary keratinocytes and epidermoid carcinoma cells response to photodynamic treatment

DOCTORAL DISSERTATION

Natural sciences,
Biochemistry (N 004)

VILNIUS 2022

This dissertation was prepared between 2007–2011 / 2017–2018 at Vilnius University.

The research was supported by the Research Council of Lithuania (T-06161) and EU structural funds (VP1-3.1-ŠMM-08-K-01-005).

The dissertation is defended on an external basis.

Academic consultant:

Doc. Dr. Aušra Sasnauskienė (Vilnius University, natural sciences, biochemistry, N 004).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – Prof. Dr. Kęstutis Sužiedėlis (National Cancer Institute, natural sciences, biochemistry, N 004).

Members:

Dr. Veronika Borutinskaitė (Vilnius University, natural sciences, biochemistry, N 004).

Dr. Virginija Bukelskienė (Vilnius University, natural sciences, biochemistry, N 004).

Prof. Dr. Vytautė Starkuvienė-Erfle (Heidelberg University, natural sciences, biochemistry, N 004).

Dr. Jonas Venius (National Cancer Institute, natural sciences, biophysics, N 011).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 1 a.m. on 27th April 2022 in auditorium R401 of the Life Science Centre of Vilnius University. Address: Saulėtekio Ave. 7, Vilnius, Lithuania. Tel. +370 678 34327; e-mail: neringa.daugelaviciene@gmc.vu.lt.

The text of this dissertation can be accessed at the library of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University:

<https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

A-431	žmogaus epidermoidinės karcinomos ląstelių linija
ACTB	β -aktino genas ar jo transkriptas
AFC	7-amino-4-(trifluorometil)kumarinas
ALA	5-aminolevulino rūgštis
AlPcS _{2a}	aliuminio ftalocianino disulfonatas, turintis greta išsidėsčiusias sulfogrupes
AlPcS ₄	aliuminio ftalocianino tetrasulfonatas
AK	aktininė keratozė
β -AGA	N-acetil- β -gliukozaminidazė
BCC	bazalinių ląstelių karcinoma arba bazalioma
BSA	jaučio serumo albuminas
CASP14	prokaspazė-14
CtD	citotoksinė dozė
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindolas
DMEM	Dulbecco modifikuota Eagle terpė
DMSO	dimetilsulfoksidas
DPBS	Dulbecco buferinis druskų tirpalas
E-64d	peptidazių slopiklis (2S,3S)- <i>trans</i> -epoksisukcinilo-L-leukilamido-3-metilbutano etilo esteri
EpiLife®	pirminių keratinocitų auginimo terpė
ET	endoplazminis tinklas
FCS	fetalinis veršelio serumas
FD	fotodinaminis/-ė
HEKa	pirminiai žmogaus epidermio keratinocitai
HEPES	4-(2-hidroksietil)piperazin-1-etansulfonrūgštis
HKGS	pirminių keratinocitų auginimo terpės priedai
IL1A	interleukiną 1 α koduojantis genas ar jo transkriptas
IL-1 α	interleukinas 1 α
IVL	involutkrinas
K	neveiktos kontrolinės ląstelės
K1, 5, 10, 14, 16	keratinas 1, 5, 10, 14, 16
kDNR	kopijinė DNR (angl. <i>copy DNA</i>)
KT	kambario temperatūra
KV	kristalinis violetinis
LC3	su mikrovamzdeliais susijusio baltymo 1A/1B lengvoji grandinė 3 (angl. <i>microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3</i>)
LDL	mažo tankio lipoproteinai

MAPK	mitogeno aktyvinama kinazė (angl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
mTHPC	mezo-tetra-(3-hidroksifenil)chlorinas
MOMP	mitochondrijų išorinės membranos pralaidumas
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio bromidas
NDS	natrio dodecilsulfatas
$^1\text{O}_2$	vienypis deguonis
OR	rizikos santykis (angl. <i>Odds Ratio</i>)
PBS	buferinis druskų tirpalas
PI	pasikliautinis intervalas
PI3K	fosfatidilinozitolio 3-kinazė
PPI	baltymų tarpusavio sąveikos
RFU	santykinės fluorescencijos vienetai (angl. <i>relative fluorescence unit</i>)
ROS	aktyvios deguonies formos
SCC	plokščiųjų ląstelių karcinoma
siRNR	trumpos interferuojančios RNR (angl. <i>small interfering RNA</i>)
SN	standartinis nuokrypis
SPR baltymai	mažieji daug proline turintys baltymai (angl. <i>small proline rich proteins</i>)
TGazė 1, 3, 5	transgliutaminazė 1, 3, 5
TNF	naviko nekrozės veiksnys
VEGFA	kraujagyslių endotelio augimo veiksnį A koduojantis genas ar jo transkriptas
VEGF-A	kraujagyslių endotelio augimo veiksnys A
λ_{em}	išspinduliuotos šviesos bangos ilgis
λ_{ex}	žadinimo šviesos bangos ilgis

TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS	5
ĮVADAS.....	9
MOKSLINIS NAUJUMAS	12
GINAMIEJI TEIGINIAI.....	13
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	14
1.1. Oda ir jos sandara.....	14
1.2. Epidermio sandara ir funkcijos	15
1.3. Keratinocitų diferenciacija.....	18
1.4. Keratinocitų karcinomos	24
1.5. Fotodinaminis poveikis	26
1.6. Fotosensibilizatoriai ir jų klasifikacija	29
1.7. Ląstelių žūties tipai	33
1.8. Išgyvenimą skatinantis atsakas	44
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	48
2.1. Medžiagos	48
2.2. Fotosensibilizatoriai	48
2.3. Medžiagos ir tirpalai ląstelių kultivavimui	48
2.4. Ląstelių kultūros.....	49
2.5. Ląstelių užšaldymas	49
2.6. Ląstelių atšildymas.....	50
2.7. Inkubacija su fotosensibilizatoriais bei švitinimas.....	50
2.8. AlPcS _{2a} lokalizacijos A-431 ląstelėse vaizdinimas	51
2.9. Ląstelių gyvybingumo nustatymas.....	51
2.10. Branduolių vaizdinimas	52
2.11. N-acetil-β-gliukozaminidazės aktyvumo nustatymas	52
2.12. Kaspazės 3 aktyvumo nustatymas.....	52
2.13. Transkriptų kiekio vertinimas	53
2.14. Ląstelių transfekcija siRNR	55
2.15. Imunofermentinė analizė Western blot	55
2.16. Imunofluorescencinė mikroskopija.....	58
2.17. Imunofermentinė analizė ELISA	59
2.18. Baltymo koncentracijos nustatymas BCA metodu.....	60
2.19. Baltymų tarpusavio sąveikų tinklas	61

2.20. Statistinė analizė	61
3. REZULTATAI.....	62
3.1. Fotodinaminio poveikio reikšmė HEKa ląstelių gyvybingumui.....	63
3.2. Fotodinaminio poveikio sukelta apoptozė HEKa ląstelėse.....	65
3.3. Fotodinaminio poveikio įtaka epidermio diferenciacijos žymenų raiškai	67
3.4. Fotodinaminio poveikio reikšmė HEKa ląstelių autofagijai	74
3.5. Baltymų tarpusavio tinklo analizė.....	75
3.6. Fotodinaminio poveikio reikšmė A-431 ląstelių gyvybingumui.....	78
3.7. Fotodinaminio poveikio sukelta apoptozė A-431 ląstelėse.....	80
3.8. Fotodinaminio poveikio reikšmė autofagijai A-431 ląstelėse.....	81
3.9. Citokinų VEGF-A ir IL-1 α kiekio pokyčiai A-431 ląstelėse po fotodinaminio poveikio	82
4. REZULTATŲ APTARIMAS	86
4.1. Pirminių žmogaus epidermio keratinocitų atsakas į fotodinaminį poveikį.....	86
4.2. Epidermoidinės karcinomos ląstelių A-431 atsakas į fotodinaminį poveikį.....	91
IŠVADOS.....	94
SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION	95
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	124
PRIEDAI	149
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	152
PRANEŠIMŲ SĄRAŠAS	153
PEDAGOGINĖ VEIKLA	155
DALYVAVIMAS MOKSLINIuose PROJEKTuose.....	155
CURRICULUM VITAE	156
PADĖKA.....	157

IVADAS

Oda yra didžiausias žmogaus kūno organas ir barjeras, užtikrinantis apsaugą nuo nepalankių fizinių (mechaninių pažeidimų, ultravioletinės spinduliuotės), cheminių (alergenų, uždegimą sukeliančių medžiagų) ir biologinių (mikroorganizmų) aplinkos veiksnių. *Keratinocitai* sudaro didžiąją dalį *epidermio*, išorinio odos sluoksnio, ląstelių. Pagal keratinocitų morfologiją epidermis išskiriamas į keturis sluoksnius, giliausiame iš jų išsidėstę pamatiniai keratinocitai. Diferencijuodami pamatiniai keratinocitai migruoja į viršutinius epidermio sluoksnius, kur tampa negyvimis, bet apsauginę funkciją atliekančiomis ląstelėmis. Ši keratinocitų kelionė link odos paviršiaus yra unikali jų žūties forma, vadinama *ragėjimu*. Žalingiems aplinkos veiksniams pažeidus keratinocitus gali atsirasti mutacijos, sukeliančios odos vėžį, kuris yra viena iš labiausiai paplitusių vėžio formų pasaulyje.

Fotodinaminė (FD) terapija yra vėžio ir kai kurių kitų ligų, kurias sukelia intensyvi ląstelių proliferacija, gydymo būdas, sėkmingai taikomas gydant paviršinius odos vėžio tipus ir ikivėžinius odos susirgimus. Šis gydymo būdas pagrįstas FD poveikiu – sąveika tarp ląstelės sukaupto fotosensibilizatoriaus, šviesos ir deguonies, susidarant reaktyvioms deguonies formoms (ROS), kurios oksiduoja biomolekules. Vienypis deguonis ($^1\text{O}_2$) – dažniausiai FD poveikio metu susidaranti ROS. $^1\text{O}_2$ greitai reaguoja su biomolekulėmis ir trumpai gyvuoja, o tai riboja jo sklidimą ląstelėje. $^1\text{O}_2$ difunduoja ~ 20-100 nm spinduliu pažeisdamas biomolekules esančias greta fotosensibilizatoriaus susikaupimo vietas, todėl viduląstelinė fotosensibilizatoriaus lokalizacija yra labai svarbi. Be to, kad FD poveikis yra efektyvus vėžinių ląstelių naikinimo būdas, jis gali būti naudojamas ir tiriant ląstelių žūties mechanizmus. Naudodami skirtinguose ląstelės sanduose susikaupusius fotosensibilizatorius, galime atskleisti pažeidų lokalizacijos arba ROS susidarymo vietas reikšmę ląstelių atsakui ir sukeltam žūties keliui.

FD terapijos naudojimo klinikoje kliūtis yra ta, kad mažai žinoma apie sudėtingus molekulinis mechanizmus, lemiančius citotoksiškumą, ir dar mažiau apie veiksnus, galinčius pagerinti jo savitumą. Dažniausiai FD poveikis tiriamas vėžinėse ląstelėse. Žinoma, kad jos kaupia fotosensibilizatorių, visgi, taikant FD terapiją dažnai pažeidžiamos ir sveikos, naviką supančios, ląstelės. FD terapijos poveikis sveikoms ląstelėms vis dar menkai ištirtas, todėl šių ląstelių atsako į FD poveikį įvertinimas gali suteikti žinių, reikalingų klinikinės FD terapijos optimizavimui. Įvertinus skirtingų ląstelės organelių pažeidų reikšmę sveikų ir vėžinių ląstelių žūties

vyksmams būtų galima prognozuoti šalutinius poveikius, o tai yra svarbu kuriant naujus gydymo būdus. Šiame darbe vertinome pirminių žmogaus epidermio keratinocitų HEKa ir epidermoidinės karcinomos ląstelių A-431 atsaką į FD poveikį, sukeltą skirtingos viduląstelinės lokalizacijos fotosensibilizatorių.

Lizosomos daugelį metų buvo siejamos tik su biomolekulių skaidymu. Šiuo metu yra žinoma, kad lizosomos vaidina svarbų vaidmenį ir kituose ląstelėje vykstančiuose procesuose, įskaitant maistinių medžiagų jutimą ir energijos apykaitos kontrolę, sąveiką su kitomis ląstelių struktūromis. Lizosomų pažaidos ne tik sutrikdo skaidymo procesą, bet ir sukelia lizosomų turinio išsiliejimą, kuris suaktyvina ląstelių žūtį. Lizosomų pažaidos yra susiję su įvairiomis ląstelių žūties formomis: apoptoze, nekroptoze, piroptoze ir ferroptoze. Jos ne tik dalyvauja vėlyvose autofagijos stadijose, bet yra svarbios autofagijos reguliacijai, o pažeistos gali pačios tapti autofagijos substratu. Be to, lizosomos palaiko epidermio homeostazę ir vaidina lemiamą vaidmenį formuojant odos barjerą, kai viršutiniuose epidermio sluoksniuose palaikoma intensyvi autofagija, reikalinga organelių ir baltymų skaidymui.

Šiame darbe tyrėme ląstelių atsaką į lizosomose kaupiamus fotosensibilizatorius. Naudojome ftalocianinų darinius, kurie kaupiami skirtinguose lizosomų sanduose: lizosomų membranose kaupiamą aliuminio ftalocianiną, turintį dvi greta išsidėsčiusias sulfogrupes (AlPcS_{2a}), ir į lizosomų liumeną patenkantį aliuminio ftalocianino tetrasulfonatą (AlPcS₄). Lizosomose lokalizuotų fotosensibilizatorių FD poveikį lyginome su klinikoje taikomo, įvairiose ląstelės membranose kaupiamo mezo-tetra-(3-hidroksifenil)-chlorino (mTHPC) FD poveikiu pirminių keratinocitų diferenciacijai, apoptozei ir autofagijai.

Pastebėta, kad atsako į FD terapiją metu ne tik inicijuojama vėžinių ląstelių žūtis, bet gali padidėti naviko augimui palankių prouždegiminių ir proangiogeninių citokinų raiška. Tyrėme AlPcS_{2a} sukeltą FD poveikį epidermoidinės karcinomos ląstelių A-431 apoptozei, autofagijai bei kraujagyslių endotelio augimo veiksnio A (VEGF-A) ir uždegimą skatinančio citokino interleukino 1 α (IL-1 α) raiškai. IL-1 α yra ypatingas citokinas, atliekantis keletą funkcijų: būdamas branduolyje jis veikia kaip transkripcijos veiksnys, o ląstelės išorėje – kaip ligandas, aktyvuojantis IL-1R receptorių. Iš ankstesnių mūsų laboratorijos darbų žinodami, kad po FD poveikio padidėja VEGF-A ir IL-1 α raiška, siekėme įvertinti, ar IL-1 α reguliuoja VEGF-A raišką. IL-1 α raišką stipriausiai indukavo mTHPC-FD poveikis, todėl IL-1 α reikšmę VEGF-A raiškai vertinome po šio poveikio.

Šio **darbo tikslas** – įvertinti pirminių keratinocitų ir epidermoidinės karcinomos ląstelių atsaką į lizosomose arba įvairiose ląstelių membranose sukauptų fotosensibilizatorių sukeltą FD poveikį *in vitro*.

Uždaviniai:

1. Įvertinti pirminių žmogaus epidermio keratinocitų HEKa diferenciaciją, apoptozę ir autofagiją po fotodinaminio poveikio, sukulto naudojant šiuos fotosensibilizatorius:
 - lizosomų membranose kaupiamą ALPcS_{2a};
 - lizosomų liumene pasiskirstantį ALPcS₄;
 - įvairiose ląstelės membranose lokalizuotą mTHPC.
2. Kompiuteriniais metodais nustatyti apoptozės, autofagijos, keratinocitų diferenciacijos ir atsako į lizosomų pažaidas baltymų sąveikas.
3. Nustatyti citokinus – interleukiną 1 α ir kraujagyslių endotelio augimo veiksnį A – koduojančių transkriptų kiekio pokyčius po ALPcS_{2a}, ALPcS₄ arba mTHPC sukulto fotodinaminio poveikio pirminiuose keratinocituose HEKa.
4. Įvertinti ALPcS_{2a} fotodinaminio poveikio reikšmę apoptozei ir autofagijai žmogaus epidermoidinės karcinomos A-431 ląstelėse.
5. Įvertinti interleukino 1 α reikšmę kraujagyslių endotelio augimo veiksnio A raiškai A-431 ląstelėse po mTHPC sukulto fotodinaminio poveikio.

MOKSLINIS NAUJUMAS

Šiame darbe pirmą kartą atlikti tyrimai, apimantys įvairiose ląstelės membranose kaupiamo mTHPC, lizosomų membranose kaupiamo AlPcS_{2a}, ir į lizosomų liumeną patenkančio AlPcS₄ sukeltą FD poveikį pirminių keratinocitų gyvybingumui svarbiems vyksmams: keratinocitų diferenciacijai, apoptozei, autofagijai ir kai kurių citokinų (IL-1 α ir VEGF-A) raiškos pokyčiams.

Pirmą kartą ištirta, kad į lizosomas nukreiptas FD poveikis sukelia savitą ląstelių atsaką, kuris skiriasi nuo atsako į įvairių ląstelės membranų pažaidas. Lizosomų pažaidos sukelia apoptozę ir keratinocitų diferenciaciją, padidina autofagosomų kiekį, bet nevyksta vėlyvos autofagijos stadijos – skaidymas lizosomose. Po FD poveikio mTHPC, pirminiuose epidermio keratinocituose HEKa vyksta autofagija, apoptozė, tačiau nėra indukuojama keratinocitų diferenciacija ir neindukuojama IL-1 α ir VEGF-A raiška.

Šiame darbe buvo sudarytas baltymų tarpusavio sąveikos tinklas vertinant lizosomų pažaidų, apoptozės, keratinocitų diferenciacijos ir autofagijos baltymų sąveiką keratinocituose. Parodėme, kad K10 apjungia visus tirtus keratinocitų atsakus (Daugelaviciene *et al.*, 2021).

Mūsų laboratorijoje buvo nustatyta, jog po FD poveikio, sukkelto naudojant lizosomų viduje sukauptą AlPcS₄, A-431 ląstelėse padaugėja autofagosomų ir autofagija vyksta po silpnos poveikio dozės, tačiau didesnės poveikio dozės slopina vėlyvas autofagijos stadijas (Sasnauskienė, 2011). Šiame darbe pirmą kartą parodyta, jog po AlPcS_{2a}-FD poveikio A-431 ląstelėse autofagosomų daugėja, tačiau nevyksta vėlyvos autofagijos stadijos – skaidymas lizosomose. Taip pat, pirmą kartą parodyta, kad pirminiuose keratinocituose HEKa autofagosomų daugėja po FD poveikio sukkelto AlPcS_{2a} ir AlPcS₄, tačiau vėlyvieji autofagijos etapai, kaip ir vėžinėse ląstelėse, vyksta tik po silpnos AlPcS₄-FD poveikio dozės (Daugelaviciene *et al.*, 2021).

Pirmą kartą parodyta, kad po AlPcS_{2a}-FD poveikio, nukreipto į lizosomų membranas, A-431 ląstelėse padidėja citokinų VEGF-A ir IL-1 α transkriptų kiekis. Kartu su ankstesniais mūsų laboratorijos darbais, nustatyta, kad IL-1 α transkripto kiekis labiausiai išauga po mTHPC-FD poveikio. Vertindami IL-1 α reikšmę VEGF-A raiškai, šiame darbe mažiname IL-1 α kiekį, naudodami siRNR. Nustatėme, kad IL-1 α didina VEGF-A raišką po mTHPC-FD poveikio A-431 ląstelėse (Dabkeviciene *et al.*, 2012).

Šio darbo metu gauti rezultatai gali būti svarbūs tobulinant priešvėžinio gydymo metodus ir kuriant naujas gydymo strategijas, mažinančias šalutinius gydymo efektus.

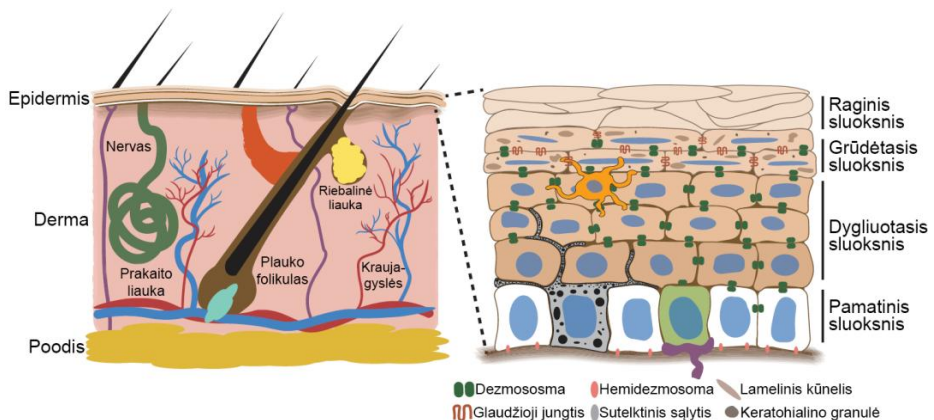
GINAMIEJI TEIGINIAI

1. Pirminių žmogaus epidermio keratinocitų HEKa apoptozę inicijuoja mTHPC, AlPcS_{2a} ir AlPcS_4 sukelti fotodinaminiai poveikiai. mTHPC fotodinaminis poveikis efektyviausiai skatina autofagijos srautą, o aliuminio ftalocianinai sukelia pirminių keratinocitų diferenciaciją ir apoptozę.
2. Remiantis baltymų sąveikos tinklu, keratinas 10 sieja apoptozės, keratinocitų diferenciacijos, autofagijos ir lizosomų pažaidų baltymus.
3. Citokinų interleukino 1α ir kraujagyslių endotelio augimo veiksnio A transkriptų kiekis nekinta po fotodinaminio poveikio pirminiuose keratinocituose.
4. AlPcS_{2a} fotodinaminis poveikis sukelia apoptozę ir didina autofagosomų kiekį, bet sutrikdo autofagijos srautą epidermoidinės karcinomos ląstelėse A-431.
5. Citokinas interleukinas 1α didina kraujagyslių endotelio augimo veiksnio A kiekį po mTHPC fotodinaminio poveikio A-431 ląstelėse.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Oda ir jos sandara

Oda – didžiausias kūno organas, kurį sudaro epidermis, pamatinė membrana, derma ir poodis su juose išsidėstančiais plaukų folikulais, riebalinėmis ir prakaito liaukomis (1.1 pav.). Poodį sudaro riebalinio audinio ląstelės – lipocitai. Ši odos dalis yra energijos saugykla, ji sušvelnina mechaninius smūgius ir izoluoja kūną nuo karščio bei šalčio (Baroni *et al.*, 2012). Dermoje aptinkami kolageną ir elastiną sintetinantys fibroblastai, už imuninį atsaką atsakingos putliosios ir dentritinės ląstelės bei plazmocitai. Pamatinė membrana jungia dermą su epidermiu, o dermoje esantis kraujagyslių tinklas aprūpina pastarąjį maisto medžiagomis (Lai-Cheong & McGrath, 2009). Dermą išraižę limfagyslės (Baroni *et al.*, 2012), taip pat joje gausu nervinių galūnėlių, kurios perduoda jutiminę informaciją centrinei nervų sistemai (Lumpkin & Bautista, 2005). Epidermis – išorinis odos sluoksnis ir pirmasis barjeras, susiduriantis su išorine aplinka.



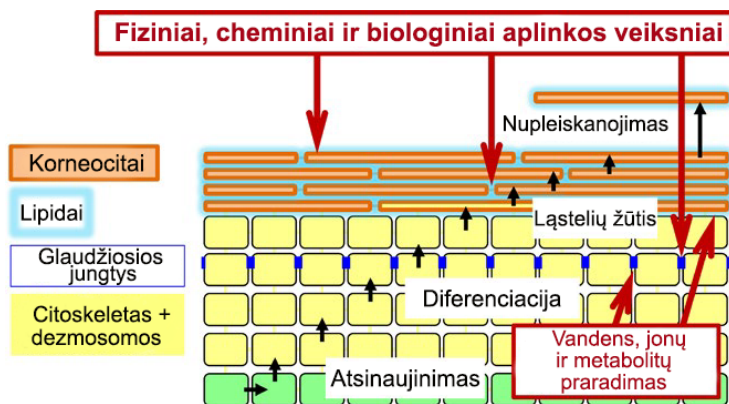
1.1 pav. Oda, jos dariniai ir epidermio sluoksniai. Oda sudaryta iš epidermio, dermos ir poodžio, su juose išsidėsčiusiais dariniais: plaukų folikulais, riebalinėmis ir prakaito liaukomis. Epidermį sudaro keratinocitai, melanocitai (pilkos), Langerhanso ląstelės (oranžinės) ir Merkelio ląstelės (žalios), kurios jungiasi prie nervų galūnėlių (violetinės), pagal (Moreci & Lechler, 2020).

Oda yra apsauginis ir jutimo organas (Eckhart & Zeeuwen, 2018; Ovaere *et al.*, 2009). Pamatiniame epidermio sluoksnyje esančios Merkelio ląstelės dalyvauja iš odos gautos jutiminės informacijos perdavime sensoriniams neuronams (Boulais & Misery, 2008; Lai-Cheong & McGrath, 2009; Van Keymeulen *et al.*, 2009). Taip pat epidermyje yra ir kitų savitas funkcijas atliekančių ląstelių, tai – melanocitai ir Langerhanso ląstelės. Melanocitai – dendritinės ląstelės, lokalizuotos pamatiniame epidermio sluoksnyje ir

plaukų folikuluose. Melanocitai nuolat sintetina pigmentą melaniną, kuris suteikia odai ir plaukams spalvą bei saugo nuo UV spinduliuotės. Langerhanso ląstelės – migruojančios antigeną pateikiančios dendritinės ląstelės, dalyvaujančios imuniniame atsake (Cumberbatch *et al.*, 2003). Nors epidermio ląstelės turi skirtingas funkcijas, jos bendradarbiaudamos sudaro vientisą organų sistemą (1.1 pav.).

1.2. Epidermio sandara ir funkcijos

Epidermis – tai daugiasluoksnis suragėjęs plokščiasis epitelis esantis arčiausiai odos paviršiaus ir suteikiantis apsaugines funkcijas odai (1.2 pav.) (Simpson *et al.*, 2011). Šis plonytis odos sluoksnis apsaugo mūsų organizmą nuo išorinių fizinių (mechaninių pažeidimų, ultravioletinės spinduliuotės), cheminių (alergenų, uždegimą sukeliančių medžiagų) ir biologinių (mikroorganizmų) veiksnių (1.2 pav.).



1.2 pav. Epidermio barjeras įvairiems aplinkos veiksniams. Schematiškai pavaizduoti pagrindiniai epidermio barjero komponentai ir keratinocitų diferenciacijos žingsniai, pagal (Eckhart & Zeeuwen, 2018).

Be to, kad jis užtikrina barjerinę funkciją, epidermis geba nuolat atsinaujinti bei dalyvauja žaizdų gijimo procesuose. Kaip šio audinio ląstelės pasidalija darbą tarp atsinaujinimo ir barjero susidarymo atliekant, iš pažiūros, antagonistines funkcijas?

Keratinocitai – pagrindinės odos epidermio ląstelės, lemiančios epidermio mechanines savybes ir yra nepaprastai svarbios palaikant odos barjero vientisumą. Keratinocitams judant iš epidermio pamatinio sluoksnio link odos paviršiaus jie diferencijuojasi: nustoja dalintis, praranda organeles, įskaitant ir branduolį, sustiprina citoskeletą bei keičia savo formą. Taip judant epidermio sluoksniais galutiniame diferenciacijos etape keratinocitai žūsta ir ši unikali programuota keratinocitų žūtis vadinama **ragėjimu**.

Keratinocitai ne tik sudaro fizinį barjerą, jie taip pat aktyviai dalyvauja palaikant audinių homeostazę, formuojant, stiprinant ir reguliuojant odos imuninį atsaką.

Didžiąją dalį, iki 95 % epidermio ląstelių sudaro keratinocitai. Kamieniniai keratinocitai gali diferencijuoti į daugybę ląstelių, sudarančių plaukų folikulus, prakaito ir riebalines liaukas, taip pat į Merkelio ląsteles. Ragėjant epidermiui, pamatinių keratinocitų grupės sąveikauja su po jais esančia derma formuojantis odos dariniams. Šie keratinocitai paprastai neprisideda prie epidermio homeostazės palaikymo. Plaukų folikulai, prakaito ir riebalinės liaukos – tai odos dariniai, kurie veikia kartu su keratinocitais užtikrindami termoreguliaciją ir apsaugodami nuo aplinkos pažeidimų.

Keratinocitų sluoksniai epidermyje

Epidermis, pagal keratinocitų morfologijos skirtumus ir savitą diferenciacijos baltymų raišką keratinocituose, išskiriamas į keturis arba penkis sluoksnius (1.2 pav.):

pamatinis sluoksnis (*lot. stratum basale*) – giliausias, arčiausiai dermos esantis sluoksnis išsidėstęs ant pamatinės membranos ir sudarytas iš vieno proliferuojančių keratinocitų sluoksnio. Pamatiniame sluoksnyje sintetinami keratinas 5 (K5) ir keratinas 14 (K14);

dygliuotasis sluoksnis (*lot. stratum spinosum*) taip vadinamas dėl ląstelių formos. Šis sluoksnis išsidėstęs virš pamatinio sluoksnio, o jį sudaro 8-10 dezmosomomis sujungtų ląstelių sluoksniai. Dygliuotajame sluoksnyje mažėja K5 ir K14 raiška, prasideda keratinocitų diferenciacijos pradžia savitų keratino 1 (K1) ir keratino 10 (K10), taip pat kaspazės-14 (CASP14) raiška. Arčiau granulinio sluoksnio pradedama involukrino (IVL), transgliutaminazių (TGazė) sintezė. Keratinocitai pradeda plokštėti;

grūdėtasis sluoksnis (*lot. stratum granulosum*) sudarytas iš 3-5 ląstelių sluoksnio. Ląstelėms judant grūdėtuju sluoksniu aukštyn prarandamos organelės ir branduolys. Pradedama profilagrino, lorikrino sintezė, aktyvuojama CASP14. Šiame sluoksnyje aptinkamos keratohialino granulės, kuriose susikaupę keratinas, lorikrinas, trichohialinas ir profilagrinas;

skaidrusis sluoksnis (*lot. stratum lucidum*) sudarytas iš 2-4 negyvų ir suplokštėjusių keratinocitų sluoksnių. Šis plonas keratinocitų sluoksnis aptinkamas tik storose delnų ir padų odoje;

raginis sluoksnis (*lot. stratum corneum*) – viršutinis epidermio sluoksnis, sudarytas iš 10-20 negyvų, tankiai užpildytų keratinu ir suplokštėjusių keratinocitų sluoksnių. Raginio sluoksnio keratinocitai vadinami **korneocitais**.

Oda atlieka gyvybiškai svarbias funkcijas, kurias užtikrina ląstelių tarpusavio sąveikos bei sąveikos su neląsteline medžiaga. Jungtys tarp ląstelių svarbios dalijantis keratinocitams, tačiau jos atlieka ir kitas funkcijas. Tarpusavyje keratinocitai jungiasi sąlyčio, glaudžiosiomis ir plyšinėmis jungtimis (Brooke *et al.*, 2012), o su neląsteline medžiaga sąveikauja hemidezmosomomis ir sutelktinio sąlyčio jungtimis (1.2 pav.).

Ląstelių tarpusavio sąveika

Sąlyčio jungtys epidermiui suteikia mechaninį tvirtumą, ląstelėms poliškumą ir yra skiriamos į du tipus – **sąaugas** ir **dezmosomas**. Sąaugos susidaro per pagalbinius baltymus sąveikaujant gretimų ląstelių aktino gijoms, o dezmosomos – sąveikaujant keratino gijoms (Simpson *et al.*, 2011). Dezmosomos jungia keratinocitus nuo pamatinio iki raginio sluoksnio. Tik diferencijuojant keratinocitams dezmosomų daugėja, reorganizuojasi tarpinės gijos su kuriomis sąveikauja dezmosomų baltymai ir raginiame sluoksnyje korneocitus jungia jau pakitę dezmosomos – vadinamos **korneodezmosomomis**. Jas sudaro kadherinai dezmostegleinas 1 ir dezmosteglakinas 1 bei pagrindinis korneodezmosomų baltymas korneodezmosinas, kuris pradedamas sintetinti grūdėtajame sluoksnyje. Pastarasis sutvirtina ryšį tarp korneocitų kadherinų, o be to yra svarbus ląstelių nupleiskanojimui (Ishida-Yamamoto *et al.*, 2011; Simpson *et al.*, 2011).

Glaudžiosios jungtys formuojasi tarp kaimyninių ląstelių grūdėtajame epidermio sluoksnyje (Niessen, 2007). Šios jungtys svarbios odos barjerinės funkcijos palaikymui, taip pat sąlygoja mažų molekulių ir jonų pernašą (Morita & Miyachi, 2003; Morita *et al.*, 2011). Klaudinai, JAM (angl. *junctional adhesion molecules*) ir okludinai – pagrindiniai transmembraniniai glaudžiųjų jungčių baltymai, sąlygojantys sąveiką tarp ląstelių (Niessen, 2007). Pastarieji jungiasi su ZO (angl. *zonula occludens*) šeimos baltymais, kurie sąveikauja su aktinu (Simpson *et al.*, 2011).

Tiosioginį ryšį tarp gretimų keratinocitų citoplazmos sąlygoja **plyšinės jungtys**, aptinkamos visuose epidermio sluoksniuose, išskyrus raginį. Plyšines jungtis sudaro koneksonai sudaryti iš šešių koneksinų. Gretimų keratinocitų koneksonai jungiasi tarpusavyje ir sudaro kanalą, kuriuo atrankiai transportuojami jonai ir kitos mažos molekulės dalyvaujančios signalo perdavime tarp ląstelių. Todėl šios jungtys tokios svarbios epidermio homeostazės palaikymui (Mese *et al.*, 2007).

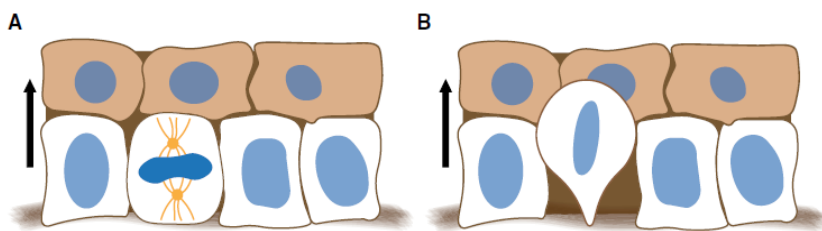
Ląstelių sąveika su neląsteline medžiaga

Sujungdamos tarpląstelinį užpildą su keratino gijomis **hemidezmosomos** užtikrina stabilų ir tvirtą pamatinio sluoksnio keratinocitų prisitvirtinimą prie pamatinės membranos (Tsuruta *et al.*, 2011). Hemidezmosomą sudaro citoplazminė baltyminė plokštelė, kuri sudaryta iš BP230 (angl. *bullous pemphigoid antigen 230*), plektino ir kt. baltymų, o prie jos jungiasi keratino tarpinės gijos. Baltyminė plokštelė taip pat sąveikauja su membraniniais hemidezmosomų baltymais, kurie jungiasi su pamatinės membranos baltymu lamininu-332 (Borradori & Sonnenberg, 1999; Tsuruta *et al.*, 2008).

Tarpląstelinį užpildą su aktino gijomis jungia **sutelktinis sąlytis**, tačiau lyginant su hemidezmosoma, ši jungtis dinamiškesnė (Tsuruta *et al.*, 2011). Ląstelės plazminėje membranoje, kur formuojasi sutelktinis sąlytis, susikaupia daug integrino molekulių ($\alpha 2 \beta 1$, $\alpha 3 \beta 1$ ar $\alpha 5 \beta 1$ integrinai), sąveikaujančių su tarpląstelinio užpildo baltymais: fibronektinu, kolagenu, lamininu ir kt. (Petit & Thiery, 2000). Minėtieji integrinai ląstelės viduje jungiasi su baltymais, sąveikaujančiais su aktinu (talinu, vinkulinu ir kt.) (Tsuruta *et al.*, 2011).

1.3. Keratinocitų diferenciacija

Pamatiniai keratinocitai – mitotiškai aktyvi ląstelių populiacija, kuri skatina epidermio vystymąsi ir homeostazę. Vystymosi metu pamatiniai keratinocitai iš pradžių dalijasi simetriškai – lygiagrečiai pamatinei membranai. Taip dalijantis padidinamas augančio embriono plotas. Diferenciaciją ir ragėjimą lemia verpstės persiorientavimas, tuomet ląstelių dalijimasis tiesiogiai generuoja virš pamatinio sluoksnio esančias dygliuotąsias ląsteles (1.3 pav. A).



1.3 pav. Keratinocitų diferenciacijos mechanizmas. (A) Diferenciacija embriogenezės metu vyksta asimetrinio dalijimosi būdu. (B) Diferenciacija homeostazės palaikymui vyksta pamatinei ląstelei atsiskiriant nuo pamatinės membranos, pagal (Moreci & Lechler, 2020).

Homeostazės palaikymas suaugus vyksta pamatinio sluoksnio ląstelėms atsiskiriant nuo pamatinės membranos, diferencijuojant ir migruojant link odos paviršiaus, taip formuojasi dygliuotosios ląstelės (1.3 pav. B). Taigi,

pamatinės ląstelės tapti dygliuotosiomis gali dviem skirtingais biologiniais keliais, tačiau yra panašios viena į kitą (Moreci & Lechler, 2020).

Žvelgdami į odą matome tik mažąją epidermio dalį – raginį sluoksnį, kuris yra keratinocitų ragėjimo arba galutinės keratinocitų diferenciacijos rezultatas (Candi *et al.*, 2005). **Ragėjimas** – unikali keratinocitų programuota žūties forma, kurios metu proliferuojantys pamatinio sluoksnio keratinocitai atkimba nuo pamatinės laminos ir pereidami dygliuotąjį bei grūdėtąjį sluoksnius apie 2 savaites keliauja link odos paviršiaus, kol pasiekia raginį sluoksnį (Fuchs & Raghavan, 2002). Pamatinio sluoksnio keratinocitams pradėjus diferencijuoti prarandamos proliferacinės savybės ir kiekviename epidermio sluoksnyje pradeda savitą diferenciacijos baltymų sintezę.

Diferencijuojant keratinocitams formuojasi **raginis apvalkalas** – netirpi baltymų struktūra, susidaranti veikiant TGazėms, pakeičianti plazminę membraną korneocituose ir veikianti kaip karkasas lipidams. 15 nm storio raginį apvalkalą sudaro kovalentiškai sujungti baltymai (10 nm) ir iš išorės prie jų prijungti lipidai (5 nm) (Eckert *et al.*, 2005).

Dygliuotajame sluoksnyje keratinocitams atkibus nuo pamatinės membranos ląstelės plokštėja, prasideda keratinocitų diferenciacija (Lippens *et al.*, 2005), kurios pradžioje inicijuojama savitų diferenciacijos baltymų K1 ir K10 (Koch & Roop, 2004), CASP14 (Denecker *et al.*, 2008) sintezė. Didėjanti viduląstelinė Ca^{2+} koncentracija lemia raginio apvalkalo struktūrinių baltymų envoplakino ir periplakino sintezę, tuoj po jų praddami sintetinti IVL bei TGazė 1 ir TGazė 5 (A. E. Kalinin *et al.*, 2002). Vis didėjant Ca^{2+} koncentracijai susidaro IVL ir envoplakino-periplakino heterotetramerai (A. Kalinin *et al.*, 2001), aktyvuotos TGazės N^{ϵ} -(γ -glutamil)lizino izopeptidiniais ryšiais sujungia IVL ir plakinus po ląstelės membrana, taip pritvirtindamos juos prie dezmosomų (Candi *et al.*, 2005). TGazės sujungia ir kitus su membrana susijusius bei dezmosomų baltymus, todėl kinta ląstelės jungčių ir griaučių sąveika (A. Kalinin *et al.*, 2001). Galiausiai IVL, periplakinas bei envoplakinas telkiami prie vidinio plazminės membranos paviršiaus ir tampa pamatu tolimesniam raginio apvalkalo formavimuisi (A. E. Kalinin *et al.*, 2002).

Grūdėtajame sluoksnyje pradami sintetinti kiti struktūriniai baltymai: lorikinas, SPR (angl. *small proline-rich protein*) baltymai (A. E. Kalinin *et al.*, 2002), profilagrinas (Candi *et al.*, 2005), repetinas, cistainas α , trichohialinas, elafinas ir kt. TGazė 3 tarpusavyje sujungia lorikriną ir SPR baltymus, o TGazė 1 jų kompleksus prijungia prie dygliuotajame sluoksnyje pradėto formuoti raginio apvalkalo (A. Kalinin *et al.*, 2001). Šiame sluoksnyje sujungiamos keratino gijos, degraduojama DNR, sunaikinamos

organelės, plazminė membrana keičiama raginiu apvalkalu ir lipidais išėjusiais iš lamelinių kūnelių (Lippens *et al.*, 2005). Epidermio *lameliniai kūneliai* kilę iš Goldžio komplekso, jie susiformuoja grūdėtajame sluoksnyje. Šiose lamelinėse pūslelėse gausu polinių lipidų, glikosfingolipidų, laisvų sterolių, fosfolipidų, cholesterolio ir kt. Didėjant viduląstinei Ca^{2+} koncentracijai lameliniai kūneliai pradeda judėti į višutinę grūdėtojo sluoksnio dalį, kur formuojasi raginio apvalkalo lipidinis sluoksnis (Candi *et al.*, 2005; Proksch *et al.*, 2008). Pasiekę viršutinę grūdėtojo sluoksnio dalį lameliniai kūneliai susilieja su plazmine membrana ir egzocitozės būdu sekretuoja savo turinį į tarpląstelinę erdvę. Išėję iš lamelinių kūnelių lipidai modifikuojami fermentų (vykstant glikosfingolipidų hidrolizei susidaro ceramidai, o iš fosfolipidų susidaro laisvos riebalų rūgštys) ir išsidėsto tarpląstelinėse lamelėse palei ląstelės paviršių. Trys pagrindinės lipidų klasės raginiame apvalkale yra ceramidai, riebalų rūgštys ir cholesterolis (Proksch *et al.*, 2008). TG1 ir TG5 prijungia ceramidus prie jau sujungtų baltymų (envoplakino, periplakino, IVL), o ceramidų riebalų rūgščių grandinės lieka membranos išorėje (Candi *et al.*, 2005). Raginis apvalkalas su ceramidais visiškai pakeičia plazminę membraną keratinocituose (Lippens *et al.*, 2005). Grūdėtajame sluoksnyje, esančiame arčiausiai raginio sluoksnio, yra stebima mitochondrijų fragmentacija, kuri gali atsirasti dėl sumažėjusio energijos poreikio ląstelėse. Grūdėtajame sluoksnyje keratinocitų transkripcijos lygis yra žymiai mažesnis, palyginus su pamatinio ar dygliuotojo sluoksnio keratinocitais (Gdula *et al.*, 2013).

Galutinė grūdėtojo sluoksnio ląstelių diferenciacija į korneocitus vadinama ragėjimu. Raginiame sluoksnyje esantys **korneocitai** – tai galutinai diferencijuoti keratinocitai, kurie yra negyvos, išplokštėję, suragėję ląstelės, sudarančios mechaninį ir vandens barjerą apsaugantį odą (Candi *et al.*, 2005). Šiame sluoksnyje toliau TG1 prijungia lorikriną bei kitus baltymus prie susidariusio baltyminio pamato, išstumiami ω -OH-ceramidai, riebalų rūgštys, cholesterolis į odos paviršių. Priešingai nei kitų žūties formų atveju, negyvos ląstelės nėra pašalinamos, o atlieka apsauginę funkciją. Ir tik pasiekę odos paviršių korneocitai nupleiskanoja (Lippens *et al.*, 2005).

Ragėjimo baltymai

TGazės – nuo Ca^{2+} koncentracijos priklausantys fermentai, katalizuojantys N^{ϵ} -(γ -glutamil)lizino izopeptininių ryšių tarp baltymų susidarymą (Candi *et al.*, 2005). Sujungti baltymai sudaro didelės molekulinės masės stabilus kompleksus, kurie jungiasi su membraniniais lipidais ir taip formuoja apsaugą nuo įvairių pažeidimų. Keturios iš devynių žmogaus TGazių

aptinkamos odoje, trys jų (TGazė 1, TGazė 3 ir TGazė 5) dalyvauja susidarant raginiam apvalkalui (Hitomi, 2005), o TGazė 2 aptinkama tik pamatinio sluoksnio keratinocituose (Candi *et al.*, 2005). TGazė 2 – tai daugiafunkcinis baltymas veikiantis kaip TGazė, GTPazė/ATPazė, baltymų kinazė ir kt., o taip pat sudarydama nekovalentinius ryšius su kitais baltymais pasižymi ir nefermentinėmis savybėmis (Nurminskaya & Belkin, 2012).

Keratinai – pagrindiniai epidermio struktūriniai baltymai priklausantys tarpinių gijų baltymų šeimai. Pagal molekulinę masę bei izoelektrinę tašką šie baltymai skirstomi į I ir II tipo keratinus. I tipo keratinai – mažesnės molekulinės masės (40-56,5 kDa) rūgštiniai ($pK_i = 4,5-5,5$) baltymai, o II tipo – didesni (53-67 kDa) ir neutralūs - šarminiai ($pK_i = 5,5-7,5$) (Jacob *et al.*, 2018). Heteropolimerai, sudaryti iš I ir II tipo keratino molekulių, epitelio ląstelių citoplazmoje formuoja dinamišką gijų tinklą, būtiną normaliam epidermio vystymuisi, jo struktūrai ir funkcijoms palaikyti (Gu & Coulombe, 2007; Koch & Roop, 2004). Žinduolių genomuose nustatyti 54 genai, koduojantys keratinus, 28 jų I tipo keratinai, o likusieji - II tipo (Hesse *et al.*, 2004). Epidermio keratinų genų mutacijos siejamos su įvairiomis audinių ligomis. Dažnai dėl šių mutacijų suyra tarpinių gijų tinklas ir tuomet net menkiausias mechaninis poveikis gali sukelti citolizę (Koch & Roop, 2004).

Savitų keratinų sintezė, kurie pasižymi skirtingomis funkcijomis, priklauso nuo audinio tipo, ląstelių diferenciacijos (Schweizer *et al.*, 2006). K5 ir K14 aptinkami epidermio pamatiniame sluoksnyje, proliferuojančiose ląstelėse, o K1 ir K10 – virš pamatinio esančiuose epidermio sluoksniuose. K1 ir K10 vieni pirmųjų baltymų, kurių sintezė indukuojama keratinocitų diferenciacijos pradžioje, todėl šie baltymai naudojami kaip diferenciacijos žymenys (Fuchs & Green, 1980; Purkis *et al.*, 1990). Įdomu tai, kad pažeistame epidermyje sutrinka K1-K10 raiška ir pradedami sintetinti K16/17-K6 kurie įprastai epidermyje nesintetinami. Pasikeitus šių baltymų raiškai nesustabdoma keratinocitų proliferacija ir migracija, kuri būtina žaizdos gijimui (X. Zhang *et al.*, 2019).

Keratinai ne tik palaiko ląstelės struktūrą, tačiau turi ir kitų funkcijų (Koch & Roop, 2004): K10 dalyvauja ląstelės ciklo stabdyme keisdama fosfatidilinozitolio 3 – kinazės (PI3K) signalo perdavimo kelią; vystantis navikui ar po mechaninių pažeidimų kinta tam tikrų keratinų sintezė (Santos *et al.*, 2002); daugėja duomenų, kad keratinai reguliuoja odos pigmentacijos procesus (Gu & Coulombe, 2007) ir kt.

IVL – vienas pirmųjų raginio apvalkalo komponentų, kuris pradedamas sintetinti dygliuotajame sluoksnyje (Eckert *et al.*, 1993) kiek vėliau nei

keratinai K1 ir K10 (Steven & Steinert, 1994). IVL vienas pagrindinių raginio apvalkalo komponentų, kuris suformuoja karkasą kitiems struktūriniais raginio apvalkalo baltymams bei lipidams (daugiausia ceramidams) (Nemes *et al.*, 1999). Žmogaus IVL turi daug glicino ir asparto aminorūgščių, jame gausu α spiralių (Candi *et al.*, 2005). IVL esantį keratinocitų citoplazmoje TGazės izopeptidiniais ryšiais prijungia prie ląstelių membranos baltymų (Eckert *et al.*, 1993).

SPR baltymai – 6-18 kDa SPR baltymų šeimą sudaro trys klasės: SPR1, SPR2 ir SPR3 (Candi *et al.*, 2005). Epidermyje aptinkami SPR1 ir SPR2 šeimos baltymai (Steinert *et al.*, 1998). SPR baltymai galvos ir uodegos domene esančiomis lizino ir glutamino aminorūgščių liekanomis jungiasi tarpusavyje arba su kitais raginio apvalkalo struktūriniais baltymais. Daugiausiai SPR jungiasi su lorikrinu, taip pat IVL, keratinu, dezmozoplakinu, envoplakinu ir kt. (Steinert *et al.*, 1998). Skirtingose kūno vietose lorikrino ir SPR baltymai visada sudaro apie 85 % bendro raginio apvalkalo baltymų kiekio, tačiau kinta jų santykis. Epidermio lankstumas ir tvirtumas priklauso nuo SPR baltymų kiekio, kuo jis didesnis, tuo epidermis tvirtesnis ir atsparesnis mechaninėms pažeidoms (Candi *et al.*, 2005).

Lorikrinas yra hidrofobinis, netirpus baltymas (Mehrel *et al.*, 1990), kuriame aptinkama daug glicino, serino ir cisteino aminorūgščių (Candi *et al.*, 2005). Ragėjimo metu lorikrinas pradedamas sintetinti grūdėtajame sluoksnyje ir kartu su profilagrinu kaupiamas keratohialino granulėse. Lorikrinas yra pagrindinis diferencijuojančių keratinocitų baltymas, sudarantis daugiau nei 70 % raginio apvalkalo baltymų (Steinert & Marekov, 1995; Yoneda *et al.*, 1992).

Profilagrinas – apie 500 kDa baltymas, kurio produktas filagrinas yra prijungiamas prie raginio apvalkalo. Profilagriną sudaro pasikartojantys filagrino domenai sujungti peptidine jungtimi. Diferenciacijos metu keratinocitams migruojant iš granulinio į raginį sluoksnį peptidinę jungtį skelia endopeptidazė (tarp jų ir CASP-14) taip susidarant atskiroms **filagrino** molekulėms (Gan *et al.*, 1990; Resing *et al.*, 1985). Filagrinui agreguojant keratino gijas susidaro keratino tinklas, kuris prijungiamas prie raginio apvalkalo. Korneocituose CASP14 ir kitos peptidazės suskaido filagriną iki aminorūgščių. Kai kurios jų yra reikalingos natūralaus drėkinimo veiksnio (angl. *natural moisturizing factor*), palaikančio odos drėkinimą, susidarymui (Hoste *et al.*, 2011).

CASP14 – cisteino peptidazių šeimos kaspazė. Nors ji ir priklauso apoptotinių baltymų šeimai, tačiau ši unikali kaspazė apoptozėje nedalyvauja. CASP14 svarbi formuojantis apsauginiam odos barjerui. Be to, jos pakitusi raiška yra pastebėta ir vėžinių susirgimų metu (Markiewicz *et*

al., 2021). Priešingai nei kitų kaspazių, CASP14 raiška nustatoma tik diferencijuojančiuose ir ragėjančiuose epidermio sluoksniuose, o aktyvi CASP14 aptinkama tik raginiame sluoksnyje (Eckhart *et al.*, 2000; Gkegkes *et al.*, 2013; Lippens *et al.*, 2000). Prokaspazė CASP14 yra 28 kDa katalitiškai neaktyvus baltymas, kurį aktyvuoja su kalikreinu susijusi peptidazė-7 (angl. *kallikrein-related peptidase-7*) skeldama į didįjį (p20) ir mažąjį (p8) subvienetus (Yamamoto *et al.*, 2012). CASP14 yra svarbi peptidazė funkcionaliam odos barjero susiformavimui. Parodyta, kad pelių odoje esant CASP14 trūkumui nesusidaro pilnaverčiai korneocitai (Hoste *et al.*, 2011). Tiriant žmogaus epidermio keratinocitų 2D kultūras CASP14 raiška nustatyta iki pilno monosluoksnio augintuose ir pradėjusiuose diferencijuoti keratinocituose. Nepaisant to, kad šiuose keratinocituose yra CASP14, šios kaspazės aktyvumas nustatytas tik 3D epidermio odos modeliuose (Kataoka *et al.*, 2013).

CASP14 dalyvauja profilagrino skaidyme į filagrinę, bei tolimesniame filagrino skaidyme iki aminorūgščių, kurios veikia kaip vienas iš natūralių drėkinamųjų veiksnių komponentų, apsaugančių odą nuo vandens praradimo (Hoste *et al.*, 2011).

Epidermio atsinaujinimas

Epidermis nuolat atsinaujina dėka homeostazės tarp proliferacijos ir diferenciacijos. Proliferacija vyksta tik pamatiniame epidermio sluoksnyje, o keratinocitų diferenciacija prasideda keratinocitams migruojant iš pamatinio sluoksnio ir baigiasi jiems pasiekus raginį sluoksnį (Blanpain & Fuchs, 2009). Proliferuojantys kamieniniai pamatinio sluoksnio keratinocitai – tai **unipotentinės kamieninės ląstelės**, palaikančios epidermio homeostazę nuolatos pakeisdamos virš pamatinio sluoksnio esančias ląsteles, kurios diferencijuoja ir po 2-3 savaičių nupleiskanoja nuo odos paviršiaus (Blanpain *et al.*, 2007). Tačiau epidermio homeostazę palaiko ne tik unipotentinės, bet ir plauko folikulo **multipotentinės kamieninės ląstelės**, kurios susitelkusios išoriniame plauko folikule esančioje nišoje, todėl jos dar vadinamos nišos ląstelėmis (Niemann & Watt, 2002) (1.2 pav.). Esant normalioms sąlygoms, plauko folikulo kamieninės ląstelės dalyvauja tik plauko folikulo atnaujinime, tačiau atsiradus pažeidimams jos juda link pažeidimo vietos ir dalyvauja atkuriant odos barjerą (Sotiropoulou & Blanpain, 2012).

Lizosomų vaidmuo keratinocitų diferenciacijoje

Palaikydami epidermio vientisumą keratinocitai diferencijuoja. Šio proceso metu keratinocituose vyksta struktūriniai pokyčiai, prarandamos

viduląstelinės organelės, įskaitant branduolį, skaidomi viduląsteliniai baltymai, tai rodo autofagijos ir lizosomų svarbą keratinocitų diferenciacijoje (Akinduro *et al.*, 2016; Yoshihara *et al.*, 2015). Lizosomos vaidina pagrindinį vaidmenį reguliuojant autofagiją. Funkcinės lizosomos yra labai svarbios ankstyvajai ir vėlyvajai epidermio diferenciacijai. Manoma, kad autofaginis ir lizosominis baltymų skaidymas yra būtinas baltymų ir organelių reorganizacijai, o keratinocitų diferenciacijos metu jis taip pat sumažina bendrą ląstelių biomasę (Monteleon *et al.*, 2018). Neseniai nustatyta, kad kalciumu indukuojant keratinocitų diferenciaciją yra skatinama lizosomų biogenezę (Mahanty *et al.*, 2019).

Atlikti tyrimai su autofagijos slopinimu rodo jos svarbą keratinocitų diferenciacijai. Nuslopinus su autofagija susijusį Atg7 geną pelėse, nustatyta sutrikusi autofagija ir odoje aptikti diferenciacijos defektai, sumažėjusi diferenciacijos dalyvaujančių baltymų (loricrino, filaggrino ir IVL) raiška (Yoshihara *et al.*, 2015). Taip pat, slopinant autofagiją ar lizosomų funkciją organotipinėje žmogaus kultūroje buvo parodyta, kad žmogaus epidermio diferenciacijai būtinas lizosomų aktyvumas (Monteleon *et al.*, 2018).

1.4. Keratinocitų karcinomos

Nuolatinis poreikis epidermio atsinaujinimo metu pakeisti nuo odos paviršiaus nupleiskanojusius korneocitus, sukuria naujų, diferencijuotų ląstelių poreikį, o tam turi dalintis pamatinio sluoksnio kamieninės ląstelės. Su amžiumi šie pamatiniai keratinocitai gali įgyti mutacijas, sukeliančias odos vėžį, kuris yra vienas labiausiai paplitusių pasaulyje. Dėl kancerogenų poveikio, tokių kaip UV šviesa, navikai dažniausiai formuojasi epidermyje.

Skirtingus odos vėžio tipus lemia saviti genetiniai pokyčiai. Išskiriami du pagrindiniai vėžio tipai: **bazalinių ląstelių karcinoma** (BCC) arba **bazalioma** ir **plokščiųjų ląstelių karcinoma** (SCC), kitaip vadinama **epidermoidine karcinoma**. BCC išsivysto pamatinio sluoksnio epitelio ląstelėse, o SCC išsivysto epidermio plokščiosiose epitelio ląstelėse. BCC sudaro didžiąją dalį, apie 80 %, visų keratinocitų karcinomų atvejų, o SCC nustatoma kur kas rečiau ir sudaro apie 20 % odos navikų (Choquet *et al.*, 2020).

SCC gali išsivystyti iš negydomos **aktininės keratozės** (AK) – ikivėžinio odos pakitimo, kuriam būdinga atipinių keratinocitų proliferacija (epidermio displazija). Pagrindinis AK sukeliantis veiksnys – ilgą laiką odą veikiantys UV spinduliai, kurie keratinocituose sukelia proliferacijos ir diferenciacijos, uždegimą reguliuojančių signalinių kelių pokyčius. AK ląstelėse nustatomos p53 ir kitų genų mutacijos, kurios sutrikdo apsauginius apoptozės

mechanizmus, lemiančius pakitusių keratinocitų proliferaciją (Berman & Cockerell, 2013). Nevaldoma keratinocitų proliferacija pažeidžia diferenciaciją, todėl susidaro storas epidermio raginis sluoksnis, ląstelės išlaiko branduolius. Pakitusių keratinocitų branduoliai dideli, pleomorfiniai, turi daug chromatinio granulių.

Odos vėžiui gydyti pasitelkiami įvairūs gydymo būdai: chirurgija, radioterapija, gydymas šalčiu, gydymas lazeriu, taip pat ir FD terapija. Kiekvienam pacientui parenkamas tinkamiausias gydymo būdas, priklausomai nuo įvairių veiksnių: naviko dydžio, formos, vietos, kurioje navikas išsivystė, kaip giliai navikas įsiskverbęs, o taip pat ir paciento amžiaus bei sveikatos būklės. Vienas pagrindinių gydymo būdų yra chirurginis. Tačiau, kai navikas išsivysto vietose, kurias sunku operuoti, taip pat norint išsaugoti audinius be didelių pooperacinių randų chirurginis būdas negali būti taikomas. Tokiu atveju, naudojama FD terapija ar kitas gydymo būdas. FD terapija yra mažiau invazyvus gydymo būdas nei chirurgija, specifiskesnis nei chemoterapija ir, priešingai nei radioterapija, gali būti kartojama keletą kartų.

Fotosensibilizatorių atrankumas ir šalutinis fotodinaminės terapijos poveikis

Veiksniai, turintys įtakos atrankesniai fotosensibilizatorių kaupimuisi vėžiniame audinyje yra sudėtingi ir egzistuoja kelios teorijos, pagrįstos skirtingais mechanizmais. Vieni autoriai teigia, kad fotosensibilizatorių atrankesnio kaupimosi priežastis gali būti fotosensibilizatoriaus hidrofobiškumas, lemiantis jų jungimąsi su mažo tankio lipoproteinais (LDL, angl. *low density lipoproteins*). LDL aprūpina audinius cholesteroliu, kuris reikalingas membranų susidarymui dalijantis ląstelėms. Sparčiai besidalijančios vėžinės ląstelės gali turėti didesnę cholesterolio poreikį membranos biosintzei. LDL šiuo atveju veikia kaip fotosensibilizatorių „transporteriai“, kurių vėžinės ląstelės pasisavina daugiau nei sveikos ląstelės. Taip pat, audiniai su didesniu mitoziniu aktyvumu pasižymi gausia LDL receptorių raiška ląstelių paviršiuje. Fotosensibilizatoriai geba sąveikauti su LDL receptoriais, taip patekdam į vėžinį audinį (Kwiatkowski *et al.*, 2018). Kiti autoriai teigia, kad fototoksinis FD terapijos poveikis nėra selektyvus naviko ląstelėms ir fotosensibilizatorių kaupia tiek sveikos, tiek navikinės ląstelės. Ilgainiui sveiki audiniai fotosensibilizatorių pašalina, o vėžiniai audiniai to padaryti negali dėl sutrikusio limfos nutekėjimo ir tai lemia didesnę fotosensibilizatoriaus susikaupimą vėžiniame audinyje (van Straten *et al.*, 2017).

Vėžinės ląstelės išsivysto iš sveikų organizmo ląstelių, kuomet pastarosiose susikaupę mutacijos pažeidžia normalius procesus (Fouad &

Aanei, 2017). Neseniai parodyta, kad normaliuose audiniuose yra sveikų ląstelių klonai, turintys daugybę onkogeninių pakitimų (Lee-Six *et al.*, 2019; Martincorena *et al.*, 2015). Įgytos mutacijos lemia greitesnį vėžinių ląstelių dalijimąsi, jose greičiau vyksta medžiagų apykaita, jos nebereaguoja į daugelį signalų reguliuojančių ląstelių proliferaciją ir žūtį, taip pat įgyja kitokią formą nei sveikos ląstelės ir kt. (Bertram, 2000; Fouad & Aanei, 2017).

Nepaisant kai kuriais atvejais nustatyto didesnio fotosensibilizatorių kaupimosi vėžinėse ląstelėse, fotosensibilizatoriai gali patekti ir į sveikas ląsteles (van Straten *et al.*, 2017). Klinikoje taikant FD terapiją dažniausiai apšviečiamas ne tik navikas, bet didesnis audinio plotas aplink naviką, kuriame gali būti išplitusių mikroskopinių naviko židinių, todėl pažeidžiamas ir sveikas audinys (de Visscher *et al.*, 2013). Odą gydant FD terapija gali būti sukeliama anktyvieji ir vėlyvieji šalutiniai poveikiai. Eritemos, nudegimai, skausmas, patinimai, odos niežėjimas, odos pleiskanojimas, pūlinėlinė dermatozė – dažniausi ankstyvieji šalutiniai poveikiai, pastebimi kelios valandos ar dienos po terapijos. Rečiau pasitaikančios komplikacijos – dilgėlinė, kontaktinis dermatitas fotosensibilizatoriaus veikimo vietoje ar erozinė pūlinėlinė dermatozė. Vėlyviesiems šalutiniams poveikiams po FD terapijos priskiriama hiperpigmentacija ir atsiradę randai. Taip pat, yra keletas pranešimų apie pūsulinio pemfigoido išsivystymą, FD terapijos skatinamą odos karcinogenezę (Borgia *et al.*, 2018). Taigi, taikant FD terapiją svarbu ne tik žinoti mechanizmus, sąlygojančius vėžinių ląstelių žūtį, tačiau taip pat svarbu suprasti, kokie procesai vyksta normaliose organizmo ląstelėse, esančiose sveikuose audiniuose šalia naviko.

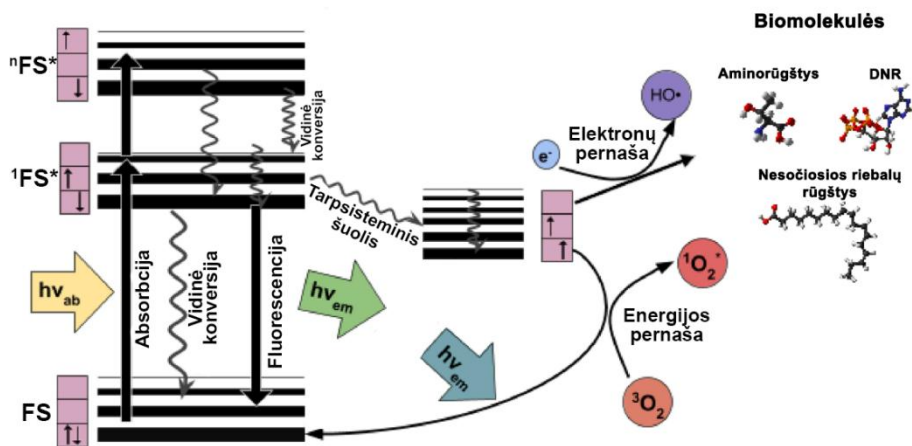
1.5. Fotodinaminis poveikis

FD poveikis – šviesos katalizuojamas procesas, kurio metu savitose ląstelės organelėse susidaranti ROS gali inicijuoti ląstelių žūties vyksmus (Kessel, 2020). Pirmieji pranešimai apie „FD efekto“ sukeltą mikroorganizmų žūtį literatūroje pasirodė dar 1900 m. Per dešimtmečius sukauptos žinios vėliau buvo pritaikytos klinikoje ir toks gydymo būdas pavadintas FD terapija (Kessel, 2019b). FD terapija – veiksmingas ląstelių naikinimo būdas, taikomas gydyti įvairiems vėžiniams susirgimams, kaip alternatyvus arba papildomas gydymas kartu su chemoterapija ir chirurgija (Gunaydin *et al.*, 2021; L. Yang *et al.*, 2017). FD terapija taip pat gydomos ligos, kurias sukelia intensyvi ląstelių proliferacija – amžinė geltonosios dėmės degeneracija, įvairūs choreoretinaliniai susirgimai, ikivėžiniai

susirgimai – AK, uždegiminės ligos – psoriazė, bakterinės ir grybelinės infekcijos (Biel, 2010; Choi *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2015; Morton & Braathen, 2018; Newman, 2016; Queiros *et al.*, 2020).

ROS susidarymo mechanizmas

FD poveikiui reikalingi trys komponentai: šviesa, fotosensibilizatorius ir deguonis. Ląstelėje sukauptą fotosensibilizatorių sužadinus tam tikro bangos ilgio šviesa, vyksta I arba II tipo fotocheminės reakcijos (Ding *et al.*, 2011).

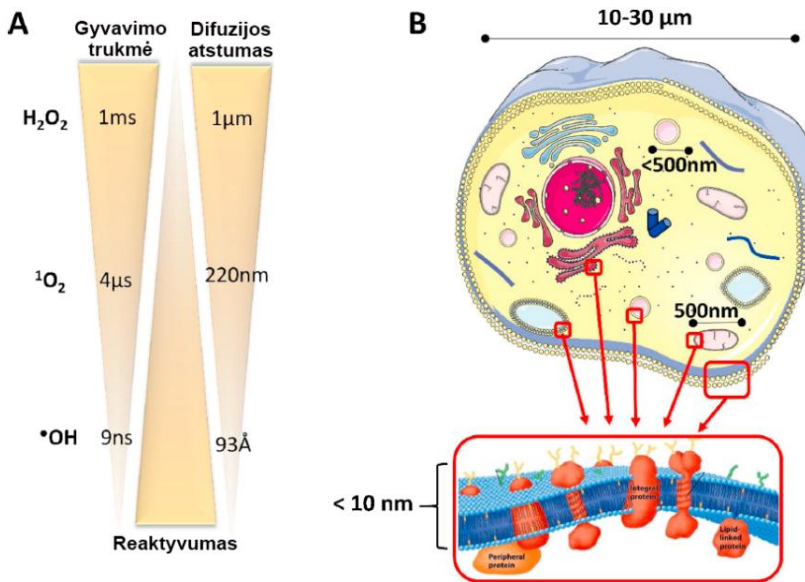


1.4 pav. ROS susidarymas FD poveikio metu. FS – fotosensibilizatorius pagrindinėje būsenoje; nFS^* – fotosensibilizatorius trumpai gyvuojančioje sužadintoje vienlypėje būsenoje; $^1FS^*$ – fotosensibilizatorius sužadintoje vienlypėje būsenoje; $^3FS^*$ – fotosensibilizatorius sužadintoje trilypėje būsenoje; 3O_2 – molekulinis deguonis; $^{\bullet}O_2^-$ – vienypis deguonis; $h\nu$ – šviesa, pagal (Martinez De Pinillos Bayona *et al.*, 2017).

Šviesos sužadintas fotosensibilizatorius iš pagrindinės būsenos pereina į trumpai gyvuojančią sužadintą vienlypę būseną, kuri pereina į sužadintą vienlypę būseną. Iš sužadintos vienlypės būsenos į pagrindinę būseną fotosensibilizatorius gali grįžti išspinduliavęs absorbuotą energiją (fluorescencija) arba gali pereiti į ilgiau gyvuojančią trilypę būseną įvykus tarpsteminiam šuoliui. Sužadintoje trilypėje būsenoje esantis fotosensibilizatorius lengviau redukuojamas ar oksiduojamas nei molekulės esančios pagrindinėje būsenoje ir turi ilgesnę gyvavimo trukmę nei esančios sužadintoje vienlypėje būsenoje. Fotosensibilizatorius iš sužadintos trilypės būsenos į pagrindinę būseną gali grįžti keliais būdais: elektronų pernaša (I tipo reakcija) arba energijos pernaša (II tipo reakcija) (1.4 pav.).

I tipo reakcijos metu fotosensibilizatorius sąveikauja su šalia esančiomis biomolekulėmis susidarant radikalams, o šiems reaguojant su 3O_2 gali susidaryti aktyvios deguonies formos (ROS) – superoksido anijonai ($O_2^{\bullet-}$),

hidroksiradikalai ($\text{OH}^\bullet$) ir vandenilio peroksidas (H_2O_2). II tipo reakcijos metu $^3\text{FS}^*$ būsenos fotosensibilizatorius tiesiogiai perduoda energiją $^3\text{O}_2$ ir susidaro trumpai gyvuojantis, tačiau itin aktyvus vienypis deguonis ($^1\text{O}_2$). Abiejų tipų reakcijos gali vykti tuo pačiu metu, o kurių ROS susidarys daugiau lemia fotosensibilizatoriaus prigimtis, atstumas tarp fotosensibilizatoriaus ir taikinio, o taip pat aplinkoje esanti deguonies koncentracija (Tsubone *et al.*, 2019; J. Zhang *et al.*, 2018). Daugelis atliktų tyrimų rodo, kad FD poveikio metu vyrauja II tipo reakcija (Fan *et al.*, 2016). Nors ląstelėse susidaręs $^1\text{O}_2$ yra itin aktyvus ir trumpai gyvuojantis, tai riboja jo pasiskirstymą ląstelėje. Susidariusio $^1\text{O}_2$ gyvavimo trukmė nusako, kokią atstumą nuo susidarymo vietos gali difunduoti sužadinta deguonies molekulė. Nustatyta, kad $^1\text{O}_2$ gyvavimo trukmė vandenyje yra 4 μs , o tai reiškia, kad jo difuzijos atstumas ribojamas iki $\sim 220\text{ nm}$ (1.5 pav. A).



1.5 pav. ROS difuzijos atstumas ir eukariotinės ląstelės matmenys. (A) Ryšys tarp ROS reaktyvumo, gyvavimo trukmės ir difuzijos atstumo ląstelėse. **(B)** Eukariotinės ląstelės, jos organelių ir ląstelės membranų matmenys, pagal (Tsubone *et al.*, 2019).

Dėl skirtingos klampos ląstelės viduje difuzija gali vykti netolygiai. Be to, $^1\text{O}_2$ gyvavimo trukmę efektyviai mažina reakcijos su biomolekulėmis, todėl $^1\text{O}_2$ ląstelėse gali oksiduoti makromolekules difuzijos spinduliu apie 20-100 nm (Di Mascio *et al.*, 2019; Redmond & Kochevar, 2006). Eukariotinių ląstelių skersmuo yra apie 10-30 μm , o ląstelės organelių (mitochondrijų, lizosomų, endoplazminio tinklo (ET)) dydis yra apie

500 nm. Ląstelės membranų storis yra < 10 nm, nesotieji fosfolipidai ir steroliai yra susidariusių ROS taikiniai (1.5 pav. B) (Tsubone *et al.*, 2019). Taigi, viduląstelinė fotosensibilizatoriaus lokalizacija yra ypatingai svarbi, nes susidaręs $^1\text{O}_2$ difunduoja nedidelius atstumus ir reaguoja tik su šalia esančiomis molekulėmis. Todėl, ROS kiekio susidarymas nenusako fotosensibilizatoriaus efektyvumo (Oliveira *et al.*, 2011).

FD proceso metu biologinėse sistemose susidarę ROS reaguoja su įvairiom biomolekulėm, daugiausiai baltymais, nukleorūgštimis ir lipidais. Visgi, baltymai yra vienas iš pagrindinių ROS taikinių. Tai lemia baltymų gausa ląstelėse (Davies, 2005), o taip pat baltymuose esančios oksidacijai jautrios aminorūgštys (Davies, 2016). Biomolekulių oksidacinės pažaidos trikdo daugelio fiziologinių procesų eigą: sustiprina uždegimines reakcijas, nuo jų priklauso ir ląstelių augimas, diferenciacija, proliferacija ir apoptozė.

1.6. Fotosensibilizatoriai ir jų klasifikacija

Fotosensibilizatoriai – vienas pagrindinių FD poveikio komponentų, kurie gali būti klasifikuojami remiantis jų chemine struktūra, tačiau dažniausiai skiriami į pirmos, antros ir trečios kartos fotosensibilizatorius.

Pirmosios kartos fotosensibilizatoriai – daugiausiai porfirino, chlorino ir bakteriochlorino dariniai, hematoporfirinas ir jo dariniai (Kou *et al.*, 2017; Kwiatkowski *et al.*, 2018). Fotofrinas – hematoporfirino darinys, vienas labiausiai ištirtų ir iki šių dienų naudojamas fotosensibilizatorius klinikoje (Abrahamse & Hamblin, 2016). Nepaisant plataus šio preparato pritaikymo, mažas cheminis grynumas, prasta skvarba į audinį, po FDT ilgai išliekantis odos jautrumas šviesai ir kt. pirmos kartos fotosensibilizatorių trūkumai paskatino naujų fotosensibilizatorių sintezę (J. Zhang *et al.*, 2018).

Antrosios kartos fotosensibilizatoriai – hematoporfirino dariniai, chlorinai, ftaliocianinai, benzoporfirinai ar jų dariniai, baktechlorino analogai ir kt. Šie fotosensibilizatoriai pasižymi geresnėmis farmakokinetinėmis charakteristikomis, mažesniu toksiškumu, aukštesniu $^1\text{O}_2$ susidarymo kvantiniu našumu ir geriau sugeria ilgųjų bangų šviesą nei pirmosios kartos fotosensibilizatoriai. Verteporfinas, temoporfinas, 5-aminolevulino rūgštis (ALA), talaporfinas ir kt. yra antrosios kartos fotosensibilizatoriai naudojami klinikoje (Kwiatkowski *et al.*, 2018).

Naujausi, trečiosios kartos fotosensibilizatoriai, sukurti prie antrosios kartos fotosensibilizatorių funkcinų grupių prijungiant įvairias nešiklio molekules, pvz. monokloninius antikūnus, monosacharidus, polimerus, liposomas, nanodaleles (Haimov-Talmoud *et al.*, 2019; Hak *et al.*, 2021; Y. Yang *et al.*, 2019) ir kt. Prijungti nešikliai pagerina fotosensibilizatoriaus

atrankumą vėžiniam audiniui sumažindami aplinkinių, sveikų audinių pažeidimus (Stajer *et al.*, 2020).

Idealaus fotosensibilizatoriaus savybės – didelis trilypės būsenos susidarymo kvantinis našumas, kuris pašvitinus užtikrina ROS susidarymą, veiksminga šviesos sugertis, itin mažas tamsinis citotoksiškumas arba jo nebuvimas. Klinikoje naudojami fotosensibilizatoriai turi pasižymėti stipria šviesos sugertimi 650-800 nm bangose, nes didėjant bangos ilgiui didėja ir šviesos skvarba į audinį. Taip pat turi būti gana greitai pašalinamas iš sveikų audinių, taip sumažinant šalutinius fototoksiškumo poveikius (Abrahamse & Hamblin, 2016). Visas šias savybes atitinkančio fotosensibilizatoriaus nėra, tačiau kuriant naujus fotosensibilizatorius bandoma priartėti prie šių savybių visumos.

Fotosensibilizatorių savybės

FD poveikio veiksmingumas, fotosensibilizatorių pasiskirstymas ląstelėje priklauso nuo fotosensibilizatoriaus savybių. Hidrofobiškumas – viena svarbiausių savybių, leidžianti numatyti molekulių gebėjimą pasiskirstymą ląstelių membranose ir dažnai koreliuojanti su vaisto fototoksiškumu. Hidrofobiškumas išreiškiamas molekulių pasiskirstymo koeficiento logaritmu tarp organinio tirpiklio *n*-oktanolio ir vandens (log Pow) (Leo, 1993). Didesnis hidrofobiškumas paprastai užtikrina geresnį fotosensibilizatoriaus patekimą į ląsteles, tačiau taip pat gali sukelti agregaciją ir mažesnį ROS susidarymą. Be to, itin hidrofobiški junginiai sunkiai patenka į ląsteles (Ben-Dror *et al.*, 2006). Amfifiliniai fotosensibilizatoriai gali difunduoti per plazminę membraną ir pasiskirstyti ląstelių organelių membranose. Priklausomai nuo hidrofiliškumo ir krūvio, fotosensibilizatoriai kaupiasi mitochondrijose, ET, lizosomose, membranose ar Goldžio komplekse, netgi branduolyje (R. Wang *et al.*, 2021).

Darbe naudoti fotosensibilizatoriai, jų lokalizacija

Šiame darbe naudoti antrosios kartos fotosensibilizatoriai: mezo-tetra-(3-hidroksifenil)chlorinas (mTHPC), aliuminio ftalocianino disulfonatas su greta išsidėsčiusiomis sulfogrupėmis (AlPcS_{2a}) ir aliuminio ftalocianino tetrasulfonatas (AlPcS₄) (1.6 pav. A).

Mezo-tetra-(3-hidroksifenil)chlorinas – mTHPC, temoporfinas arba Foscan® (vaisto komercinis pavadinimas) yra sintetinis chlorino darinys. 2001 m. Europos vaistų agentūra patvirtino Foscan® galvos ir kaklo plokščiųjų ląstelių karcinomos gydymui (Hamblin, 2020). Gydymui sušvirkščiama 0,15 mg/kg kūno svorio Foscan® dozė. Praėjus 96 val. po Foscan® injekcijos gydoma sritis apšviečiama 652 nm bangos ilgio šviesa.

Vienkartinė šviesos dozė 20 J/cm^2 (100 mW/cm^2), kai švitinimo laikas 200 sek. (EMA, 2001).

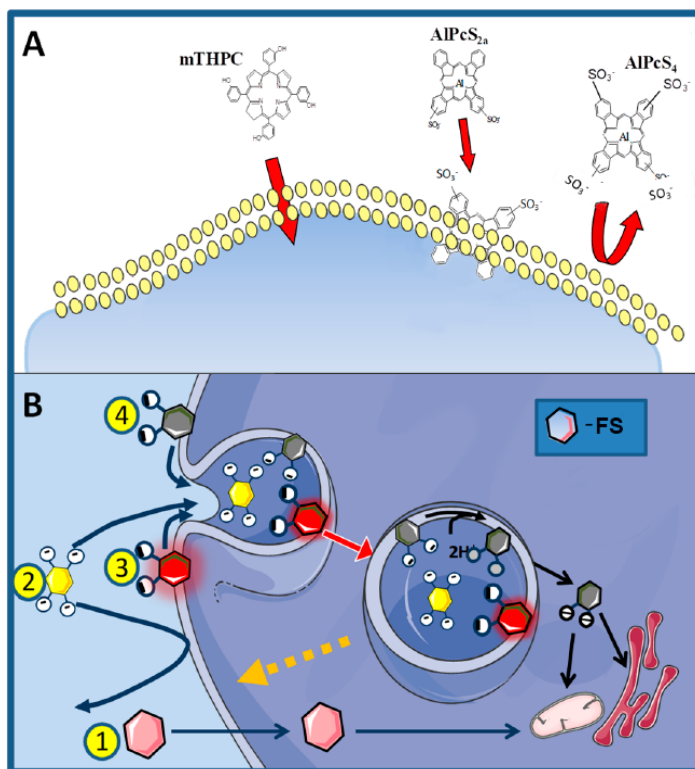
mTHPC yra labai hidrofobinis junginys, ir ši jo savybė lemia sąveiką su ląstelės membranomis. Nustatyta, kad mTHPC kaupiasi ET, goldžio komplekso, mitochondrijų ir lizosomų membranose (Marchal *et al.*, 2007; Sasnauskiene *et al.*, 2009; Teiten *et al.*, 2003), o po mTHPC-FD poveikio sukelia šių organelių pažaidas. mTHPC iki šių dienų išlieka vienu iš efektyviausių FD terapijoje naudojamų fotosensibilizatorių dėl turimų privalumų: stipriai sugeria raudonosios spektro dalies šviesą, sugerties maksimumas yra 650 nm, naudojant klinikoje pakanka mažų vaisto ir šviesos dozių, trumpo gydymo laiko pasiekti norimiems rezultatams (Senge & Brandt, 2011).

Aliuminio ftalocianino disulfonatas, su greta išsidėsčiusiomis sulfogrupėmis – AlPcS_{2a} , pasižymi stipria sugertimi 660-700 nm intervale, sugerties maksimumas yra 673 nm (Andrzejak, Santiago, *et al.*, 2011). Fotosensibilizatorius į ląsteles patenka endocitozės būdu (Prasmickaite *et al.*, 2001), kaupiasi lizosomų membranose (Berg & Moan, 1994; Hogset *et al.*, 2004). AlPcS_{2a} -FD poveikis pažeidžia lizosomų membranas ir padidina lizosomų membranų pralaidumą. Nustatyta, kad lizosomų pažeidimas gana selektyvus, kitos šalia lizosomų esančios organelės išlieka beveik nepažeistos (Hung *et al.*, 2013). Po lizosomų membranų pažeidų, lizosomų liumeno turinys išleidžiamas į ląstelių citoplazmą.

Aliuminio ftalocianino tetrasulfonatas – AlPcS_4 , pasižymi stipria sugertimi 660-700 nm intervale, sugerties maksimumas yra 680 nm. Neigiamą krūvį turinčios sulfogrupės lemia stiprų fotosensibilizatoriaus hidrofilumą bei AlPcS_4 kupinąsi lizosomose bei endosomose (Jerjes *et al.*, 2020; Q. Peng & Moan, 1995).

Iki šiol tik vienas vandenyje tirpių įvairių sulfonintų aliuminio ftalocianinų (nuo mono iki tetra) mišinys, komerciniu pavadinimu Photosens®, patvirtintas kelių vėžio tipų (plaučių, kepenų, krūties, odos ir virškinamojo trakto) gydymui Rusijoje (Brilkina *et al.*, 2019; Hamblin, 2020). Pacientų gydymui sušvirkščiama 0,5-2 mg/kg kūno svorio Photosens® dozė ir praėjus 48-72 val. po injekcijos gydoma sritis apšviečiama 670 nm bangos ilgio šviesa. Vienkartinė šviesos dozė $15\text{--}200 \text{ J/cm}^2$ ($20\text{--}1400 \text{ mW/cm}^2$) (Sokolov *et al.*, 1996). Reikia pabrėžti, kad Photosens® nebuvo patvirtintas kitose pasaulio šalyse dėl per mažo fotosensibilizatoriaus grynumo (Karges, 2022).

Fotosensibilizatoriai į ląsteles patenka difunduodami per plazminę membraną, kaip pvz. mTHPC (1.6 pav. B, 1 kelias), arba endocitozės būdu (1.6 pav. B, 2-4 keliai).

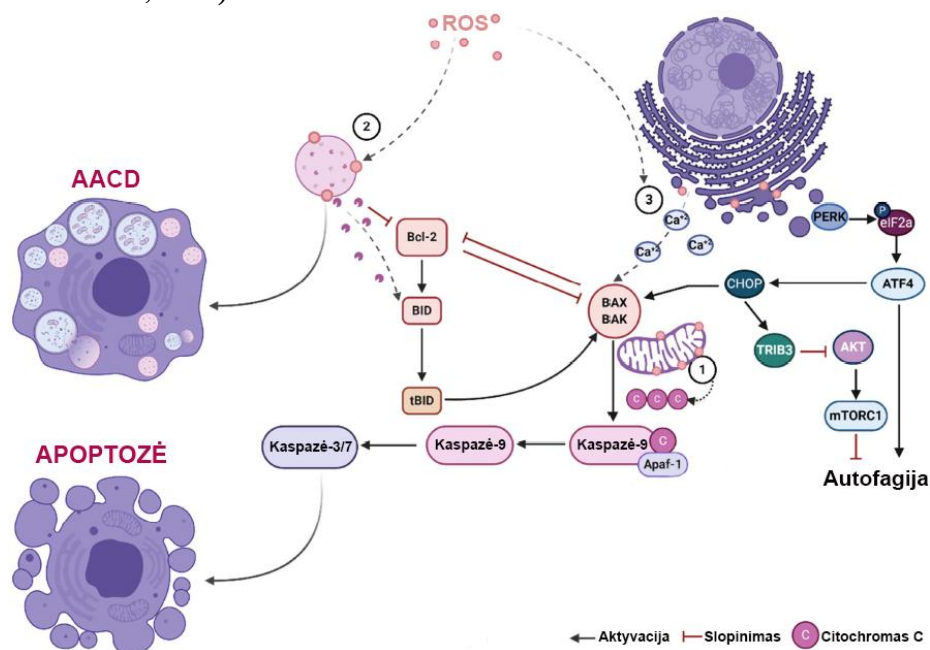


1.6 pav. Fotosensibilizatorių patekimas į ląstelę. (A) Fotosensibilizatorius turintis nedaug įkrautų funkcinių grupių (pvz. mTHPC), gali prasiskverbti per ląstelės membraną pasyvios difuzijos būdu, amfifilinis (pvz., AlPcS_{2a}) ar hidrofilinis (pvz., AlPcS₄) į ląstelės patenka endocitozės būdu. (B) Fotosensibilizatorių patekimo į ląstelę keliai. FS – fotosensibilizatorius, pagal (Jerjes *et al.*, 2020).

Porfirinų kilmės fotosensibilizatoriai su 1-2 karboksilgrupėmis į lizosomas patenka endocitozės būdu, tačiau dėl žemo lizosomų pH gali protonizuotis ir pereiti į citoplazmą (pav. 1.6 pav. B, 4 kelias). Fotosensibilizatoriai su daugiau nei dviem karboksigrupėmis arba su sulfogrupėmis, pvz. AlPcS_{2a} (1.6 pav. B, 3 kelias) ir AlPcS₄ (1.6 pav. B, 2 kelias), užtikrina jų lokalizaciją lizosomose ir endosomose. AlPcS₄ yra labai hidrofilinis, todėl į ląstelę patenka pinocitozės būdu ir išlieka endocitinių pūslelių liumene. Veikiant šviesai, pažeidžiami liumeno komponentai, o esant stiprioms pažaidoms plyšta endocitinių pūslelių membrana. AlPcS_{2a} – amfifilinis fotosensibilizatorius, kurio sulfogrupės yra išsidėstę vienoje pusėje, negalėdamas praeiti plazminės membranos, joje įsiterpia, o tuomet adsorbcinės endocitozės būdu patenka į endocitinių pūslelių membranas (Jerjes *et al.*, 2020).

1.7. Ląstelių žūties tipai

Ląstelių žūties klasifikaciją pirmą kartą pasiūlė ląstelių žūties nomenklatūros komitetas NCCD (angl. *The Nomenclature Committee on Cell Death*) 2005 m. (Kroemer *et al.*, 2005). Žinių apie ląstelių žūties mechanizmus vis daugėja, nuolat atrandami nauji mechanizmai ir signaliniai keliai. Ląstelių žūties formos tarpusavyje skiriasi savo morfologinėmis savybėmis ir/arba molekuliniiais mechanizmais. Tačiau identifikuoti žūties mechanizmą kartais gana sudėtinga, nes jie gali persidengti. Žūties klasifikacija keletą kartų buvo atnaujinta, paskutinį kartą – 2018 m. (Galluzzi *et al.*, 2018). Pirmosios NCCD klasifikacijos versijos buvo pagrįstos morfologinėmis ypatybėmis, o vėlesnėje 2012 m. versijoje klasifikacija buvo pakeista remiantis žūties molekuliniiais mechanizmais. Šioje klasifikacijoje yra ir preliminarus ragėjimo apibrėžimas (Galluzzi *et al.*, 2012). Ragėjimo metu ląstelės nėra pašalinamos, tačiau atlieka struktūrinę funkciją, palaikančią audinių formavimąsi, nes negyvos ląstelės, vadinamos korneocitais, sudaro išorinius odos sluoksnius. Nepaisant paskutinių NCCD rekomendacijų, ragėjimas dažnai vis dar priskiriamas ląstelių žūčiai (Ipponjima *et al.*, 2020; Jaeger *et al.*, 2019; Lee & Overholtzer, 2019).



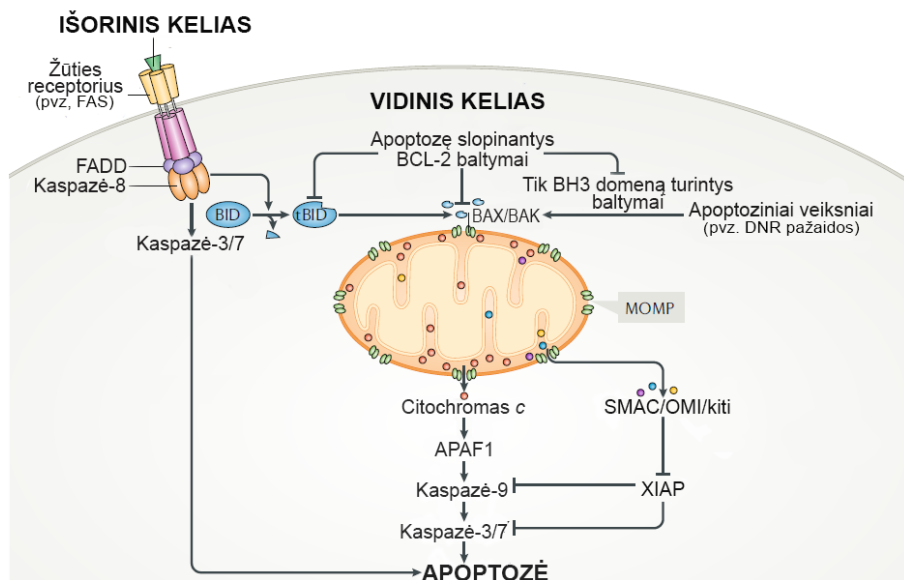
1.7 pav. Ląstelės organelių fotopažaidos. FD poveikio generuojamos reaktyviosios deguonies formos (ROS) dažniausiai pažeidžia mitochondrijų (1), lizosomų (2) ir ET (3) membranas, taip sukeldamos reguliuojamą ląstelių žūtį. AAMD – su autofagija susijusi ląstelių žūtis, pagal (Tsubone *et al.*, 2021).

FD poveikio metu ROS sukelia ląstelės homeostazės sutrikimus, kurių ląstelei nepavykus atstatyti, galiausiai sukeliami įvairūs ląstelių žūties mechanizmai. Nekrozė, apoptozė ir autofagija yra geriausiai ištirtos ir dažniausiai nustatomos žūties formos po FD poveikio (1.7 pav.), tačiau aptinkama vis daugiau naujų žūties mechanizmų, pvz. partanatos, nekroptozė, paraptozė ir kt. (Bedoui *et al.*, 2020; Fuchslocher Chico *et al.*, 2017; Miki *et al.*, 2015; Mou *et al.*, 2019; Soriano *et al.*, 2017). Kuris žūties kelias bus aktyvuotas, priklauso nuo fotosensibilizatoriaus savybių ir jo lokalizacijos ląstelėje, poveikio dozės bei ląstelių tipo.

Apoptozė

Apoptozė yra aktyvus ir energijos reikalaujantis procesas. Apoptozės metu kinta žuvančių ląstelių morfologija, jos suapvalėja, sumažėja tūris, ląstelės įtraukia pseudopodijas, o taip pat kondensuojasi chromatinas ir fragmentuojasi branduolys, pūslėja plazminė membrana. Ląstelei subyrėjus į apoptozinius kūnelius, šiuos efektyviai pasisavina kaimyninės ląstelės, turinčios fagocitinį aktyvumą arba suskaido lizosomos (Galluzzi *et al.*, 2018). Branduolio morfologiniai pokyčiai, kondensacija ir fragmentacija, yra skiriamasis bruožas, kuriuo charakterizuojama apoptozė (Cummings *et al.*, 2012). Pagrindiniai keliai, kuriais inicijuojamas šis žūties kelias: **vidinis kelias** (inicijuojamas mitochondrijų) ir **išorinis kelias** (inicijuojamas žūties receptorių) (pav. 1.8).

Svarbiausi vidinio apoptozės kelio dalyviai, atsakingi už apoptozės reguliaciją ir vykdymą, yra BCL-2 (angl. *B-cell lymphoma protein-2*) šeimos baltymai. Vidiniame apoptozės kelyje dalyvauja apoptozę slopinantys ir apoptozę skatinantys BCL-2 šeimos nariai, o pusiausvyra tarp šių dviejų baltymų grupių gali nulemti ląstelės likimą. Apoptozę skatinantys baltymai jungiasi su poras formuojančiais baltymais BAX (angl. *BCL2-associated X protein*) arba BAK (angl. *BCL-2 antagonist/killer*) ir juos aktyvuoja. Pastarieji oligomerizuojasi ir suformuoja makroporas mitochondrijų membranoje, taip sukeldami mitochondrijų išorinės membranos pralaidumo (MOMP) (angl. *mitochondrial outer membrane permeabilization*) padidėjimą (Singh *et al.*, 2019). MOMP padidėjimas yra kritinis etapas, kuomet ląstelėje prasideda negrįžtami procesai ir yra inicijuojama apoptozė (Tait & Green, 2013). Tai lemia mitochondrijų tarpmembraninių baltymų patekimą į citozolį, kur tiesiogiai arba netiesiogiai yra aktyvuojamos kaspazės. Tiesiogiai aktyvuojant kaspazes dayvauja citochromas c, kuris jungiasi prie APAF1 (angl. *apoptotic protease-activating factor 1*) susidarant apoptosomai (Singh *et al.*, 2019).



1.8 pav. Apoptozės signaliniai keliai. Apoptozė gali vykti dviem būdais: išoriniu ir vidiniu. *Išorinis kelias* apima žūties receptoriaus ligando prisijungimą prie žūties receptoriaus. *Vidinį kelią* sukelia daugybė skirtingų dirgiklių (DNR pažeidimai, mitozinis areštas ir kt.), dėl kurių suaktyvėja BCL-2 baltymai. Sukeliamas mitochondrijų išorinės membranos pralaidumas (MOMP), pagal (Bock & Tait, 2020).

Kaspazės gali būti aktyvuotos ir netiesiogiai, kai iš mitochondrijų išteklėję SMAC (angl. *second mitochondria-derived activator of caspases*) ir OMI (angl. *serine protease*) neutralizuoja kaspazės slopinančius baltymus, pvz. XIAP (angl. *X-linked inhibitor of apoptosis protein*). Šių procesų metu aktyvuojamos iniciacijos kaspazė-9 ir vykdymo kaspazės-3, -6 bei -7 (Srinivasula *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001).

Tarpląsteliniams žūties ligandams (naviko nekrozės veiksnio (TNF) (angl. *tumor necrosis factor*) superšeimos nariams) prisijungiant prie transmembraninių žūties receptorių (Fas/CD95, TNFR-1, DR3, DR4/TRAILR1 ir DR5/TRAILR2) yra aktyvuojamas išorinis apoptozės kelias. Kiekviename iš žūties receptorių yra citoplazminis „žūties domenas“, kuris atsakingas už ligando (FasL, TRAIL ir TNF α) signalo perdavimą (Galluzzi *et al.*, 2018; Schulze-Osthoff *et al.*, 1998). Susijungus receptoriui su atitinkamu ligandu, receptorių trimerizuoja ir sutelkia pritaikymo baltymus (pvz. FADD (angl. *FAS-associated death domain protein*), TRADD (angl. *TNFR-associated death domain protein*)) prie „žūties domeno“, taip suformuojamas žūtį sukeliantis signalinis kompleksas DISC (angl. *death-inducing signalling complex*) (Ashkenazi & Dixit, 1999;

Kischkel *et al.*, 1995). DISC pritraukia iniciacijos kaspazę-8 ir -10, kurios yra skeliamos susidarant aktyvioms kaspazių formoms (Schulze-Osthoff *et al.*, 1998). Tuomet aktyvios iniciacijos kaspazės aktyvuoja vykdymo kaspazes-3, -6 ir -7. „I tipo“ ląstelėms to ir pakanka, kad būtų aktyvuojamos vykdymo kaspazės (Li *et al.*, 1997), tačiau „II tipo“ ląstelėms reikalingas mitochondrijų įsitraukimas. Čia kaspazė-8 aktyvuoja baltymą BID (angl. *BH3-interacting domain death agonist*), šis – baltymą BAX arba BAK, sukeliamas MOMP. Tolesnė aktyvacija vyksta vidinio apoptozės kelio mechanizmu (X. Wang, 2001). Išorinį apoptozės kelią taip pat gali indukuoti receptoriai UNC5B (angl. *unc-5 netrin receptor B*) ir DCC (angl. *DCC netrin 1 receptor*), kurie aktyvuoja iniciacijos kaspazę-9 arba defosforilina DAPK1 (angl. *death-associated protein kinase 1*) (Bredesen *et al.*, 2004).

Apoptozė keratinocituose

Keratinocitų apoptozė svarbi reguliuojant epidermio vystymąsi ir stabdant kancerogenezę. Ši programuota ląstelių žūtis forma dalyvauja palaikant pusiausvyrą tarp keratinocitų proliferacijos ir diferenciacijos, kad išlaikytų reikiamą epidermio storį, prisideda prie raginio sluoksnio susidarymo. Taip pat apoptozė svarbi kaip ląstelių apsaugos mechanizmas, kuomet turintys mutacijų ar pažeisti (pvz. UV spinduliuotės, oksidacinės pažaidos) keratinocitai pašalinami apoptozės keliu. Todėl sutrikus apoptozei pasireiškia kai kurios odos ligos, pvz. psoriazė ir odos vėžys (Raj *et al.*, 2006).

Apoptozė ir ragėjimas turi keletą panašumų: abiejų procesų metu skaidomas branduolys ir DNR, o destruktivios ar uždegiminės reakcijos aplinkiniame audinyje nevyksta (Melino *et al.*, 2005). Tačiau yra ir skirtumų: ragėjimas vyksta visame ląstelių sluoksnyje, o apoptozė būdinga individualioms ląstelėms (Costanzo *et al.*, 2015). Taip pat apoptozė ir ragėjimas skiriasi morfologiniais požymiais, žūtis mechanizmu. Priešingai nei ragėjimas, apoptozė keratinocituose vyksta tik epidermio pamatiniame sluoksnyje, o diferencijuojančios ląstelės sukuria tvirtą mechaninį keratino gijų tinklą ir tampa vis atsparesnės apoptozei.

Ląstelėse, kuriose vyksta apoptozė susitraukia, fragmentuojasi į apoptozinius kūnelius, kuriuos pašalina kaimyninės ląstelės. Keratinocitų ragėjimas ir epidermio barjero susidarymas yra kontroliuojami procesai, kuomet visiškai sunaikinamos viduląstelinės organelės, tame tarpe ir branduolys. Organelės pradedamos skaidyti grūdėtajame sluoksnyje.

Fotodinaminis poveikis ir apoptozė

Apoptozė, kaip atsakas į FD poveikį, buvo nustatyta dar 1991 m. (Agarwal *et al.*, 1991). Žinoma, kad ROS, susidarę mitochondrijose, ET ir lizosomose efektyviai sukelia apoptozę *in vitro* ir *in vivo*. Po FD poveikio dažniausiai ląstelių žūtis inicijuojama vidiniu apoptozės keliu. Tiesiogiai apoptozės vidinis kelias indukuojamas, kai pažeidžiamos mitochondrijos, o netiesiogiai – aktyvuojant signalinius kelius po kitų ląstelės organelių pažeidų. Mitochondrijose besikaupiantys fotosensibilizatoriai siejami su apoptozę slopinančių BCL-2 šeimos baltymų pažeidimu, po kurio seka MOMP padidėjimas, citochromo *c* ištekėjimas iš mitochondrijų tarpmembraninės ertmės į citozolį ir ląstelių apoptotinio atsako indukcija (Donohoe *et al.*, 2019). BCL-2 baltymų pažeidos buvo nustatytos po FD poveikio su ALA, Pc4 (silicio ftalocianinas 4), CPO (9-kaproniloksi-2,7,12,17-tetra(metoksietil)-porficenais), mTHPC ir kt. fotosensibilizatoriais (Karmakar *et al.*, 2007; Kessel & Castelli, 2001; Xue *et al.*, 2001). Hipericinas ir redaporfinas, fotosensibilizatoriai besikaupiantys ET ir Goldžio komplekse, taip pat sukelia apoptozę. Vidinis apoptozės kelias inicijuojamas po apoptozę slopinančio BCL- x_L (angl. *B-cell lymphoma-extra large*) pažeidų (Gomes-da-Silva *et al.*, 2018; Koval *et al.*, 2010).

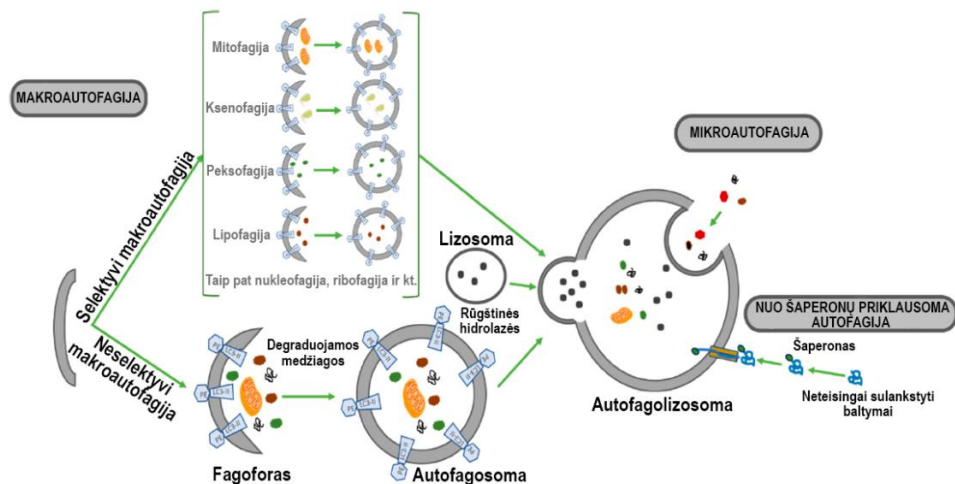
Fotosensibilizatoriams, kurie lokalizuojasi lizosomose, pažeidus lizosomų membranas, padidėja šių pralaidumas ir iš lizosomų liumeno į citozolį patenka lizosominės peptidazės. Peptidazėms hidrolizuojant citozolinį Bid baltymą susidaro tBid, kuris skatina MOMP padidėjimą ir taip aktyvuojamas vidinis apoptozės kelias (Kessel & Oleinick, 2018). Bid svarba vidinio apoptozės kelio aktyvacijai nustatyta naudojant lizosomose kaupiamą chlorino darinį NPe6, ftalocianiną Pc181 (Chiu *et al.*, 2010; Reiniers *et al.*, 2002; Wan *et al.*, 2008). Taip pat yra parodyta, kad ląsteles veikiant ftalocianinu, padidėja BCL-2 raiška, taip sustiprinama apoptozė dėl mitochondrijų pažeidimo (Almeida *et al.*, 2004).

Nors FD poveikis dažniausiai sukelia vidinio apoptozės kelio aktyvaciją, kai kurie ląstelės membranoje besikaupiantys fotosensibilizatoriai aktyvuoja išorinį apoptozės kelią. FD poveikis sąlygoja TNF šeimos ląstelių žūties ligandų sąveiką su savitais ląstelių žūties receptoriais. Vienas pagrindinių žūties receptorių, dalyvaujančių FD poveikio sukeltose apoptozėse, yra Fas receptorius. Nustatyta, kad po FD poveikio su ftalocianinu Pc4 padidėja Fas receptoriaus ir jo ligando raiška (Ahmad *et al.*, 2000). Skirtingas ląstelių linijas veikiant hipericinu taip pat indukuojamas išorinis apoptozės kelias (Almeida *et al.*, 2004; Ortel *et al.*, 2009).

Taip pat yra duomenų, kad apoptozė gali vykti vidiniu ir išoriniu keliu po FD poveikio. Nustatyta, kad po cinko ftalocianino $ZnPcS_{mix}$ -FD poveikio didėja apoptozę skatinančių BCL-2 šeimos baltymų raiška ir TNF ligando raiška (Manoto *et al.*, 2017).

Autofagija

Skiriami trys autofagijos tipai: mikroautofagija, nuo šaperonų priklausoma autofagija ir makroautofagija (ją toliau vadinsime autofagija) (1.9 pav.).



1.9 pav. Autofagijos tipai. Viduląsteliniai ląstelės komponentai į lizosomą patenka ir yra suskaidomi trimis autofagijos keliais: makroautofagija, mikroautofagija ir nuo šaperonų priklausoma autofagija, pagal (Perez-Montoyo, 2020).

Mikroautofagijos metu lizosomos membrana įlinksta apgaubdama degraduojamą medžiagą ir įtraukus ją į vidų suskaidoma lizosomos liumene. Nuo šaperonų priklausomos autofagijos metu šaperonai atpažįsta citozolinius baltymus, turinčius tikslinį motyvą, ir perneša juos prie lizosomų membranos. Autofagija gali būti selektyvi arba neselektyvi (Kissova *et al.*, 2007). Selektvios autofagijos metu savitų receptorių dėka degraduotinos molekulės, struktūros ar organelės yra atpažįstamos, atskiriamos autofagosomose, o susiliejus su lizosomomis, suskaidomos. Neselektyvios autofagijos metu, makromolekulės į autofagosomas patenka nespecifiškai (Kissova *et al.*, 2007; Zaffagnini & Martens, 2016).

Autofagija – nuo lizosomų priklausomas katabolinis procesas, kurio metu citoplazminiai komponentai apgaubiami dvigubos membranos struktūra, *autofagosoma*, o šiai susiliejus su lizosoma, degraduojami lizosomų

hidrolazių (Z. Yang & Klionsky, 2010). Autofagija paprastai laikoma ląstelių išgyvenimo/apsaugos mechanizmu, nes autofagijos metu pašalinami toksiški ar pasenę baltymai ir organelės. Skaidymo produktai yra perdirbami ir panaudojami kaip energijos bei metabolitų šaltiniai kituose procesuose (Mizushima *et al.*, 2008). Tačiau, autofagija taip pat gali lemti ląstelių žūtį, taip vadinama autofaginė ląstelių žūtis ACD (angl. *autophagic cell death*) (Galluzzi *et al.*, 2018).

Normaliomis sąlygomis ląstelėje autofagijos lygis yra nežymus. Signalai, suaktyvinantys autofaginį procesą, paprastai atsiranda dėl įvairių išorinių ir viduląstelių stresinių veiksnių, tokių kaip maistinių medžiagų ar augimo veiksnių trūkumas, hipoksija, ROS, DNR pažaidos, susidarę baltymų agregatai, pažeistos organelės ir viduląsteliniai patogenai (Kroemer *et al.*, 2010). Autofagija prasideda susidarant fagoforui – struktūra, kuri atskiria degraduotiną citoplazmos dalį. Fagoforui ilgėjant formuojasi unikali organelė – autofagosoma. Procesas baigiasi autofagosomai susiliejus su lizosoma ir susidarant autofagolizosomai, kurioje lizosominiai fermentai suskaido citoplazmos komponentus (Mizushima *et al.*, 2011) (1.9 pav.).

Normaliomis sąlygomis, kuomet autofagijos lygis nežymus, kinazė mTOR1 (angl. *target of rapamycin complex 1*) fosforilina kinazę ULK1 (arba ULK2) (angl. *Unc-51-like kinase 1*), taip ją išlaikydama neaktyvią. Esant stresinėms sąlygoms mTORC1 yra slopinama, todėl ULK1 kompleksas defosforilinamas ir aktyvuojamas. Aktyvus ULK1 kompleksas pradeda autofagijos vyksmus, kurie išskiriami į keletą etapų: iniciacija, ilgėjimas ir didėjimas, susiliejimas su lizosoma, autofagosomos turinio ir vidinės membranos skaidymas (Kaur & Debnath, 2015; Perez-Montoyo, 2020).

Iniciacija. Autofagosomų susidarymas dažniausiai prasideda greta ET, ypatingai ET-mitochondrijų kontakto vietose. Iki šiol buvo manoma, kad įvairios membranos gali būti lipidų šaltiniai autofagosomų biogenezei. Tačiau naujausi tyrimai rodo, kad dažniausiai lipidų šaltinis yra ET (Nakatogawa, 2020).

Autofagiją aktyvuojantys signalai skatina ULK1 komplekso susidarymą. Minėtą kompleksą sudaro ULK1, ATG13 (angl. *autophagy-related protein 13*), FIP200 (angl. *RB1-inducible coiled-coil protein 1*) ir ATG101 baltymai. ULK1 kompleksas fosforilina PI3K (angl. *phosphatidylinositol 3-kinase*) komplekso I (sudaryto iš PI3K, VPS34 (angl. *vacuolar protein sorting 34*), Beclin 1, ATG14, AMBRA1 (angl. *activating molecule in Beclin 1-regulated autophagy protein 1*), p115 (angl. *general vesicular transport factor*)) komponentus, taip palengvindamas autofagijos baltymų jungimąsi prie fagoforo ir autofagosomos susiformavimą. PI3K kompleksas

I skatina fosfatidilinozitolio 3-fosfato (PI3P) susidarymą membranose, dalyvaujančiose autofagosomos biogenezėje (Itakura *et al.*, 2008).

Ilgėjimas ir didėjimas. Prie PI3P jungiasi WIPI2 (angl. *WD repeat protein interacting with phosphoinositides*) ir DFCP1 (angl. *zinc- finger FYVE domain- containing protein 1*)) baltymai. WIPI2 tiesiogiai sąveikauja su ATG12–ATG5–ATG16L1 kompleksu, kuris skatina ATG8 šeimos baltymų, įskaitant LC3 (angl. *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*) ir GABARAP (angl. *GABA receptor-associated proteins*), konjugaciją su membranoje esančiu fosfatidiletanolaminu. Tai suformuojamos su membrana susietos, lipidinės baltymų formos. Pavyzdžiui, tokios konjugacijos reakcijos metu LC3-I forma paverčiama į LC3-II. Dažnai LC3-II baltymas yra naudojamas kaip autofagijos žymuo, kadangi LC3-I ir LC3-II formos skiriasi savo dydžiu, galima nesunkiai įvertinti LC3-II kiekį, kuris koreliuoja su autofagosomų kiekiu. ATG8 baltymai taip pat pritraukia baltymus, reikalingus fagoforo membranos ilgėjimui ir užsidarymui, susidarant autofagosomai (Nakatogawa, 2020).

Susiliejimas su lizosoma ir skaidymas. Fagoforo membranai suformavus beveik pilną sferą, lieka pora, kuri turi būti uždaryta, kad susidarytų autofagosoma. Prieš kelerius metus buvo parodyta, kad ESCRT (angl. *endosomal sorting complexes required for transport*) baltymų kompleksų komponentai yra aptinkami ant fagoforo membranos ir skatina jos užsidarymą (Takahashi *et al.*, 2018; Takahashi *et al.*, 2019). Susidarius autofagosomai ji pradeda bręsti. Brendimo metu nuo išorinės autofagosomos membranos yra pašalinami ATG baltymai, ir sutelkiami autofagosomos gabenimui reikalingi komponentai. Tuomet autofagosoma mikrovamzdeliais perneša degraduotiną medžiagą link lizosomos. Autofagosomai atkeliavus prie lizosomos, autofagosomos išorinė membrana susilieja su lizosoma ir susidaro autofagolizosoma. Šaliesios procese dalyvauja trys baltymų šeimos: Rab GTPazė, HOPS (angl. *homotypic fusion and protein sorting–tethering complex*) ir SNARE (angl. *N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) baltymai (Nakamura & Yoshimori, 2017).

Paskutiniame autofagijos etape rūgštinio pH aktyvuotos savitos lizosominės hidrolazės autofagolizosomoje suskaido degraduotinas medžiagas ir vidinę autofagosomų membraną (1.9 pav.). Suskaidyti produktai transportuojami atgal į citoplazmą ir naudojami ląstelėms reikmėms (Abada & Elazar, 2014; Dikic & Elazar, 2018).

Autofagijai pasibaigus iš autolizosomų vėl atsikuria funkcionalios lizosomos (Yu *et al.*, 2010).

Autofagija keratinocituose

Ragėjimo metu epidermio keratinocituose sujungiami struktūriniai baltymai, sunaikinamos organelės. Susidarę korneocitai sudaro apsauginį odos sluosnį (žr. sk. 1.2). Manoma, kad autofagija dalyvauja šiame viduląsteliniam pertvarkymo procese.

Nustatyta, kad žinduolių embriono vystymosi metu, formuojantis granuliniam epidermio sluoksniui, didėja autofagijos žymenų raiška. Tačiau autofagijos procesas vyksta nuolat, ne tik vystantis epidermiui, bet ir epidermio diferenciacijos metu. Parodyta, kad diferencijuojančiuose keratinocituose vyksta nukleofagija (Akinduro *et al.*, 2016) bei mitofagija (Moriyama *et al.*, 2014). Ipponjima ir kt. atliktų tyrimų metu, buvo patvirtinta, kad mitochondrijos kolokalizuoja su autofagosomomis, tai patvirtina, jog mitochondrijos yra skaidomos autofagijos proceso metu (Ipponjima *et al.*, 2020). Taip pat, nesenai atlikti tyrimai rodo, kad autofagija yra inicijuojama galutinės keratinocitų diferenciacijos stadijoje, kai ląstelės tampa atsparios apoptozei. Šio proceso metu, padidėjus Golžio kompleksui, susidaro pirminės lizosomos, o branduolys pradeda kondensuotis. Stebimas autofagosomų formavimasis, pirmiausia fagocituojamas ET, o po to seka ir branduolio autofagija. Dėl šios selektyvios autofagijos dauguma citoplazminių organelių yra suardomos, tačiau struktūriniai baltymai lieka nepakitę (Koenig *et al.*, 2020). Autofaginis ir lizosominis baltymų skaidymas būtinas ne tik baltymų ir organelių reorganizacijai keratinocitų diferenciacijos metu, tačiau tai taip pat sumažina bendrą ląstelių biomasę (Monteleon *et al.*, 2018). Autofagija taip pat yra aktyvi nagų ir plaukų keratinocitų ragėjimo metu (Jaeger *et al.*, 2019; Yoshihara *et al.*, 2015).

Žinoma, kad lizosomos yra labai svarbios autofagijos reguliacijai. Lizosomų biogenezę ir keratinocitų diferenciaciją gali skatinti ET stresas. Šio proceso metu daugėja lizosomų ir yra aktyvinama keratinocitų autofagija (Mahanty *et al.*, 2019).

Fotodinaminis poveikis ir autofagija

FD poveikis gali sukelti autofagiją (Domagala *et al.*, 2018; Kessel & Reiners, 2007), kuri, priklausomai nuo ląstelių tipo, fotosensibilizatoriaus lokalizacijos ir FD poveikio dozės, veikia kaip ląstelių apsaugos mechanizmas. Užuoat skatinusi ląstelių žūtį, autofagija dažnai yra paskutinis ląstelių bandymas susidoroti su oksidaciniu stresu ir išgyventi. Keli *in vitro* ir *in vivo* tyrimai parodė, kad autofagija vyksta kartu su reguliuojama žūtimi (apoptoze, nekroptoze, nekroze, partanatos) ir čia veikia kaip apsauginis

mechanizmas. Tačiau esant stiprioms pažeidoms po FD poveikio autofagija gali indukuoti ir ląstelių žūtį (Martins *et al.*, 2020).

Autofagija saugo ląsteles nuo oksidacinio streso, kurį sukelia ALA, chlorofilinas e4, chlorofilinas-f, hipericinas, fotofrinai, protoporfirinas IX, verteporfirinas ir kiti fotosensibilizatoriai FD poveikio metu. Tokiu atveju, autofagijos slopinimas padeda įveikti ląstelių prisitaikymą ar atsparumą oksidaciniam stresui (Martins *et al.*, 2020). Parodyta, kad veikiant ląsteles fotosensibilizatoriais, kurie kaupiasi mitochondrijose ir ET, autofagija veikia kaip apsaugos mechanizmas (Andrzejak, Price, *et al.*, 2011). Po ATG5 ar ATG7 tildymo, autofagija sutrinka ir FD poveikio efektyvumas padidėja. Tačiau veikiant ląsteles fotosensibilizatoriais, besikaupiančiais lizosomose, ATG5 raiškos tildymas neduoda jokio efekto. Manoma, kad FD poveikio metu pažeidus lizosomas negali vykti ląsteles apsauganti autofagija, todėl esant tai pačiai FD poveikio dozei kaip ir mitochondrijų fotopažeidų atveju, lizosomų fotopažeidimas gali būti letalias (Reiners *et al.*, 2002; Tsubone *et al.*, 2017). Priešingai, ATG7 slopinimas mažina fototoksinį atsaką (Kessel, 2020). FD poveikio metu pažeidus lizosomas, į citozolį išteka lizosominės hidrolazės (katepsinai), kurios skelia BID ir taip aktyvuoja apoptozę (Kessel *et al.*, 2000). Nutildžius ATG7, stabdomas didelių molekulių (pvz. katepsinų) išėjimas iš pažeistų lizosomų (Andrzejak, Price, *et al.*, 2011).

FD poveikis sukelia autofagiją vėžinėse ląstelėse, slopindamas mTOR signalinį kelią arba aktyvuodamas AMPK (angl. *AMP-activated kinase*) kelią. Nuslopinus mTOR, autofagija inicijuojama aktyvuojant ULK1 kompleksą. AMPK taip pat gali aktyvuoti ULK1 kompleksą (Dewaele *et al.*, 2011; Qian *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2020). FD poveikis sustiprina ir HIF-1 α /VIMP1 sukeliamą autofagiją. Taip pat yra ir kitų FD poveikio indukuojamų signalinių kelių galinčių reguliuoti autofagijos mechanizmus, pvz. NF κ B ir MAPK1/3 (Martins *et al.*, 2020).

Autofagija gali apsaugoti ląsteles ir padėti pašalinti pažeistas molekules (Dewaele *et al.*, 2011), tačiau jei yra sukeliamas intensyvi autofagija arba sutrikdomas autofagijos srautas (angl. *autophagic flux*), gali būti inicijuota ląstelių žūtis. Ląstelių žūties nomenklatūros komitetas siūlo tokią ląstelių žūtį, kai autofagija skatina ląstelių žūtį, vadinti nuo autofagijos priklausoma ląstelių žūtimi (ADCD) (angl. *autophagy-dependent cell death*) (Galluzzi *et al.*, 2018). Norint identifikuoti šio tipo žūtį, nepakanka padidėjusio autofagijos srauto ar autofagosomų susidarymo įrodymų. Tai reikia patvirtinti įvertinant autofagijos reikšmę ląstelių išgyvenimui, nuslopinus autofagijos molekules siRNR, shRNR, arba CRISPR / Cas9. Autofagija taip pat gali skatinti ir kitus ląstelių žūties kelius, pvz. apoptozės ar nekrotozės, tokiu atveju žūtis vadinama – autofagijos sukelta ląstelių žūtimi (AMCD)

(angl. *autophagy-mediated cell death*). Fotopažaidų metu gali būti inicijuojama AMCD kartu su apoptoze.

Yra išskiriama dar viena – su autofagija susijusi ląstelių žūtis (AACD) (angl. *autophagy-associated cell death*), kuri gali vykti kartu su kuria nors kita ląstelių žūtimi, pvz apoptoze, arba atskirai. AACD metu sutrikdomas autofagijos srautas. Skirtingai nuo AACD, AMCD metu autofagija dalyvauja apoptozės procese. Priklausomai nuo poveikio dozės, fotosensibilizatoriaus fizikinių, cheminių savybių ir viduląstelinio pasiskirstymo, gali būti inicijuota AACD arba AMCD (Martins *et al.*, 2020). Buvo parodyta, kad ląsteles veikiant vidutine ir stipria mTHPC-FD poveikio dozėmis sukeliamas skirtingas autofagijos atsakas. Ląsteles veikiant vidutine FD poveikio doze vyksta nežymi apoptozė ir nustatytas autofagijos suintensyvėjimas, o didelės FD poveikio dozės, pažeisdamos autofaginio mechanizmo baltymus, sukelia autofagiją, susijusią su apoptozės požymių aktyvavimu (Lange *et al.*, 2019).

Kai fotosensibilizatoriai, kurie lokalizuojasi lizosomose, po FD poveikio sumažina funkcionalių lizosomų skaičių arba jas visiškai suardo, ar sutrikdo lizosomų susiliejimą su autofagosomomis, aktyvuojama AACD (Martins *et al.*, 2020). Po nestiprių lizosomų fotopažaidų, autofagija (lizofagija) atkuria pusiausvyrą ląstelėje ir ląstelė išgyvena. Tokia mažų dozių sukelta autofagija gali lengvai pereiti į AACD, ypač tuomet, kai kartu indukuojami mitochondrijų membranos pažeidimai (Martins *et al.*, 2019).

Nekrozė

Negrižtamas ląstelių pažeidimas ir ląstelių žūtis dėl patologinių procesų yra vadinama *nekroze*. NCCD komitetas nekroze rekomenduoja vadinti ląstelių žūties formą, kuomet nenustatoma apoptozei ar autofagijai būdingų požymių ir nekrozinį ląstelių sunaikinimo procese nedalyvauja fagocitai ir lizosomos (Galluzzi *et al.*, 2018). Nekrozę sukelia išoriniai veiksniai, pvz., infekcija, toksinai ir fiziniai pažeidimai. Šiai žūčiai būdingi ląstelių pokyčiai: išbrinkusios organelės, padidėjęs ląstelės tūris, plazminės membranos plyšimas ir viduląstelių organelių praradimas, nors chromatinio kondensacija nevyksta, tačiau DNR suskaidoma atsitiktinėse vietose. Nekrozės metu ląstelių turiniui ištekęs į tarpląstelinę ertmę sukeliamas imuninis atsakas ir uždegimas, kurio metu aktyvuojamos imuninės sistemos ląstelės.

Anksčiau nekrozė buvo laikyta atsitiktine ląstelių žūties forma, tačiau dabar jau žinoma, kad nekrozė gali būti reguliuojama, tokia reguliuojama nekrozė yra vadinama *nekroptoze* (Galluzzi & Kroemer, 2008). Nekroptozė pasireiškia panašiomis morfologinėmis savybėmis kaip ir nekrozė. Pagrindinės nekroptozės signalo perdavime dalyvaujančios molekulės – su

receptoriais sąveikaujančios baltymų kinazės RIP1 ir RIP3 (angl. *receptor-interacting protein*) (Pasparakis & Vandenabeele, 2015).

Nekrozė keratinocituose

Nekroziniai keratinocitai yra svarbūs histopatologiniai žymenys, būdingi tam tikrų ligų sukeltiems odos pažeidimams, įskaitant plokščiąjį kerpligę, transplantu prieš šeimininką ligą (angl. *graft versus host disease*), psoriazė ir kt. (Cloutier *et al.*, 2020). Nustatyta, kad didelės dozės UVB spinduliuotės sukelia keratinocitų nekrozę (Mammone *et al.*, 2000).

Nekrozė ir fotodinaminis poveikis

Nekrozę dažniausiai sukelia stiprios FD poveikio dozės ir plazminėje membranoje kaupiami fotosensibilizatoriai (van Straten *et al.*, 2017). Klinikiniu požiūriu, FD terapijos gydymo dozės turėtų būti tokios, kurios indukuoja ląstelių žūties formas nesukeliančias uždegiminių reakcijų, pvz. apoptozę.

1.8. Išgyvenimą skatinantis atsakas

FD poveikio indukuotos ROS taip pat sukelia atsaką, kuris padeda vėžinėms ląstelėms susidoroti su oksidaciniu stresu ir ląstelių pažeidimais bei yra ląstelių išgyvenimo mechanizmo dalis. FD terapijos metu dažniausiai bandoma sustabdyti tam tikrą signalinį kelią, kuris būdingas tik vėžinėms ląstelėms. Tačiau terapijos metu ląstelės, kuriose indukuojami išgyvenimą skatinantys keliai, gali išlikti ir tapti dar atsparesnėmis, agresyvesnėmis bei invaziškesnėmis (Bazak *et al.*, 2017; Solban *et al.*, 2006).

Vėžinių ląstelių išgyvenimas po FD terapijos yra siejamas su mažiausiai penkiais tarpusavyje susijusiais keliais, kurių tarpininkai yra transkripcijos veiksniai, dalyvaujantys šiuose procesuose: (1) antioksidaciniame atsake – NRF2 (angl. *nuclear factor E2-related factor 2*), (2) hipoksiniame išgyvenimo atsake – HIF-1 (angl. *hypoxia-inducible factor 1*), (3) prieš uždegiminiame ir angiogeniniame atsake – NF-κB (angl. *nuclear factor κB*), (4) proteotoksinio streso atsake – HSF1 (angl. *heat shock factor 1*) ir transkripcijos veiksniai susiję su UPR (angl. *unfolded protein response*), (5) esant ūmiam atsakui į stresą – AP-1 baltymo (angl. *activating protein 1*) transkripcijos veiksmų šeima (Broekgaarden *et al.*, 2015). Ląstelių išgyvenimą skatinančių kelių aktyvijoje dalyvaujantys transkripcijos veiksniai, pvz. HIF-1, NF-κB transkripcijos veiksniai, indukuoja prouždegiminių citokinų ir augimo veiksmų, tarp jų ir VEGF-A, raišką vėžinėse ląstelėse (Ferrario *et al.*, 2000; Kawczyk-Krupka *et al.*, 2018; Korbelik, 2009).

VEGF-A laikomas pagrindiniu angiogenezės ir naviko augimą skatinančiu veiksmu, o dauguma vėžiui gydyti patvirtintų vaistų blokuoja VEGF-A signalinį kelią, taip slopindami naviko augimą (Ferrara & Adamis, 2016; Kopetz *et al.*, 2010; Maj *et al.*, 2016). Yra parodyta, kad atsako į FD terapiją metu padidėja VEGF-A raiška *in vitro* ir *in vivo* (Bhuvanewari *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2008; Uehara *et al.*, 2001), o tai galėtų skatinti naviko atsinaujinimą. Padidėjusio VEGF-A baltymo kiekio po FD terapijos slopinimui pradėtas naudoti angiogeninės terapijos ir FD terapijos derinys, kai sumažėjusi proangiogeninių baltymų raiška sustiprina FD terapijos citotoksinį poveikį navikui (Gallagher-Colombo *et al.*, 2012; C. L. Peng *et al.*, 2018).

Naviko vietose yra gausu citokinių ir jie gali turėti įtakos vėžinio proceso vystymuisi, taip pat naviko reakcijai į gydymą. Žinoma, kad FD navikų terapija moduliuoja citokinių sintezę ne tik vėžinėse, bet ir su jomis susijusiose ląstelėse, esančiose vėžiniame audinyje (Gollnick *et al.*, 2003). Citokinai ir uždegiminis atsakas į FD terapijos sukeltas pažeidimas gali sumažinti gydymo veiksmingumą.

Citokinai yra nedideli tirpūs baltymai, tarpininkaujantys imuninių ir neimuninių ląstelių sąveikose. Prouždegiminiai citokinai taip pat yra stiprūs angiogenezės indukcijos ir palaikymo veiksniai. Vienas iš ypatingą reikšmę angiogenezei turinčių citokinių yra interleukinas-1 (IL-1). Jau seniai žinoma, kad IL-1 yra pagrindinis imuniteto ir uždegimo tarpininkas, o sutrikusi jo reguliacija siejama su naviko atsiradimu ir progresavimu (Kimura *et al.*, 2007; Voronov *et al.*, 2014). Parodyta, kad padidėjusi IL-1 šeimos citokinių IL-1 α ir IL-1 β raiška skatina naviko invazyvumą ir metastazes, skatindamas angiogeninių genų ir augimo veiksmų raišką. IL-1 slopikliai jau yra patvirtinti ir naudojami gydant kai kurias autoimunines ligas ir šiuo metu yra tiriami ikiklinikinių ir žmogaus klinikinių vėžio tyrimų metu (Litmanovich *et al.*, 2018). Nors IL-1 α ir IL-1 β sintetinami kaip pirmtakai (proIL-1 α ir pro-IL-1 β) (apie 31 kDa), o vėliau proteolizės metu susidaro sekretuojami baltymai (17 kDa), biologiškai aktyvus yra tik proIL-1 α . Taip pat, IL-1 α ir IL-1 β sąveikauja su ląstelių paviršiaus receptoriais IL-1R1 (angl. *IL-1 type 1 receptor*) ir sukelia identiškus biologinius atsakus. Tačiau nepaisant šių panašumų, IL-1 α ir IL-1 β turi ir skirtumų. Šie citokinai yra skirtingų genų produktai, ir jų sekų homologija yra tik 20-30 %. Kitaip nei IL-1 α , kuris sintetinamas esant homeostazei, IL-1 β indukuojamas ir sekretuojamas tik esant uždegimui. Be to, skiriasi IL-1 α ir IL-1 β raiškos bei aktyvacijos procesai, todėl jie turi skirtingą biologinį ir fiziologinį poveikį daugeliui ligų, ypač vėžiui (Di Paolo & Shayakhmetov, 2016). IL-1 α mažiau ištirtas nei jo homologas IL-1 β .

Žinoma, kad IL-1 šeimos citokinai tiesiogiai ir netiesiogiai skatina angiogenezę indukuodami proangiogeninius veiksnius, tokius kaip VEGF-A (Fahey & Doyle, 2019). Nustatyta, kad IL-1 α stimuliuoja VEGF-A sekreciją žmogaus periferinio kraujo vienbranduolėse ląstelėse PBMNC (Salven *et al.*, 2002). Tyrimų kaip IL-1 α susijęs su naviko progresavimu ir metastazėmis nėra daug, tačiau aišku, kad IL-1 α gali skatinti vėžio progresavimą (Voronov *et al.*, 2018). Parodyta, kad yra reikšmingas ryšys tarp IL-1 α raiškos ir metastazių išsivystymo galvos ir kaklo plokščialąsteline karcinoma sergantiems pacientams (Leon *et al.*, 2015). IL-1 α skatina naviko invazyvumą ir metastazes. Pastebėta, kad naviko ląstelėse, kuriose daugiau IL-1 α yra padidėjusi angiogenezė, limfangiogenezė ir limfmazgių metastazės, nes jose kaip atsakas į IL-1 α skatinama VEGF-A gamyba (Watari *et al.*, 2014).

Po FD terapijos IL-1 šeimos citokinų raiškos pokyčiai nėra plačiai ištirti. FD terapija gydytuose navikuose pastebėti IL-1 β raiškos pokyčiai, kuriuose dažniausiai šio citokino raiška padidėja, didėjant angiogenezę skatinančių veiksnių raiškai (Cecic & Korbelik, 2002; Ferrario *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2002). Nustatyta, kad hipericinu sensibilizuoti žmogaus nosiaryklės navikai sintetina IL-1 α ir IL-1 β , kurie sukelia uždegiminį atsaką FD terapija gydytose naviko ląstelėse (Koon *et al.*, 2010). Mūsų laboratorijoje taip pat pastebėta, kad mTHPC indukuotas FD poveikis skatina IL-1 α ir VEGF-A raišką *in vitro*.

Keratinocitai ir IL-1 α

IL-1 α yra konstitutyviai ekspresuojamas esant homeostazei daugelyje ląstelių tipų sveikuose audiniuose. Jo raiška didėja reaguojant į augimo veiksnius ir prouždegiminius ar su stresu susijusius dirgiklius. IL-1 α baltymo kiekis įvairiuose ląstelių tipuose skiriasi, tačiau barjerinės ląstelės, tokios kaip endotelio ir epitelio ląstelės, ekspresuoja didelius šio citokino kiekius esant homeostazei (Bersudsky *et al.*, 2014; Garlanda *et al.*, 2013). Keratinocitai atsakingi ne tik už odos barjerinę funkciją, jie dalyvauja imuniniame atsake ir yra pagrindinės odos ląstelės gaminančios citokinus (Grone, 2002). Vyrauja IL-1 α , nes jis yra sintetinamas kaip biologiškai aktyvus pirmtakas proIL-1 α , o IL-1 β yra neaktyvios pirmtako formos (Mizutani *et al.*, 1991). UVB spinduliuotė, forbolio esteriai ir kt. didina IL-1 α raišką keratinocituose, o ilgalaikis UVB spinduliuotės ir toksinių cheminių medžiagų poveikis yra susijęs su lėtiniu uždegimu, kuris prisideda prie odos vėžio vystymosi (Magcwebaba *et al.*, 2012).

Duomenų apie IL-1 α raišką po FD terapijos sveikuose keratinocituose nepavyko rasti, bet yra paskelbta keletas darbų apie FD terapijos poveikį

citokino IL-1 α raiškai nevėžinėse ląstelėse. FD terapijos pažeistos plaučių epitelio ląstelės išskiria didelius biologiškai aktyvaus IL-1 α kiekius, kur jis veikia kaip fibroblastų stimulatorius (Suwara *et al.*, 2014; Tracy *et al.*, 2012). Kadangi IL-1 α yra dvigubos funkcijos prouždegiminis citokinas, jo pokyčiai prognozuojant priešvėžinio poveikio efektus gali būti reikšmingi.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos

Tritonas X-100 – oksifenoldekaetilenglikolio eteris (Ferak), CHAPS – [(3-cholamidopropil)dimetilamonio]-1-propan-sulfonatas (Roth), DTT – ditiotreitolis (Roth). Kitos darbe naudotos medžiagos ir reagentai – Sigma, jei nepažymėta kitaip.

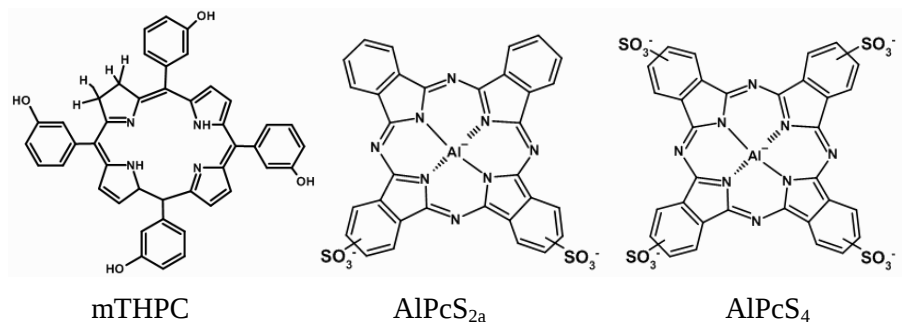
2.2. Fotosensibilizatoriai

mTHPC (m-tetra(3-hidroksifenil)-chlorinas) – prof. R.Bonett'o (Londono universitetas, Didžioji Britanija) dovana. Pradinis 1 mg/ml mTHPC tirpalas paruoštas 96 % etanolyje.

AlPcS_{2a} (aliuminio ftalocianino disulfonatas su greta išsidėsčiusiomis sulfogrupėmis) (Frontier Scientific). Pradinis 5 mg/ml AlPcS_{2a} tirpalas paruoštas AlPcS_{2a} ištirpinus 0,1 M NaOH ir atskiedus PBS iki reikiamos koncentracijos.

AlPcS₄ (aliuminio ftalocianino tetrasulfonato) (Frontier Scientific) pradinis 5 mg/ml tirpalas paruoštas PBS.

Visi fotosensibilizatorių pradiniai tirpalai buvo laikomi tamsoje, -20° C temperatūroje. Eksperimentams pradiniai tirpalai buvo skiedžiami ląstelių inkubavimo terpėje. Fotosensibilizatorių struktūros pateiktos 2.1 paveiksle.



2.1 pav. Darbe naudotų fotosensibilizatorių cheminės struktūros.

2.3. Medžiagos ir tirpalai ląstelių kultivavimui

PBS buferinis druskų tirpalas (pH 7,3): 171,1 mM NaCl, 3,35 mM KCl, 1,84 mM KH₂PO₄ ir 10,14 mM NaH₂PO₄, ištirpinta ddH₂O ir autoklavuotas.

DPBS buferinis druskų tirpalas (pH 7,3): 136,9 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 1,47 mM KH₂PO₄, 8,12 mM NaH₂PO₄, 0,9 mM CaCl₂ ir 0,83 mM MgSO₄, ištirpinta ddH₂O ir autoklavuotas.

EDTA tirpalas: 0,985 mM EDTA, ištirpinta PBS buferiniame druskų tirpale.

Tripsino tirpalas: 0,5 mg/mL tripsino ištirpinta EDTA tirpale.

2-[4-(2-hidroksietil)piperazin-1-il]etansulfoninė rūgštis (HEPES).

Dimetilsulfoksidas (DMSO).

Ląstelių kultivavimo flakonai, lėkštelės ir plokštelės, sterilios pipetės, kriogeniniai mėgintuvėliai (Thermo Scientific arba TPP).

2.4. Ląstelių kultūros

HEKa – pirminiai žmogaus epidermio keratinocitai (angl. *primary human epidermal keratinocytes*), išskirti iš suaugusio žmogaus odos, buvo įsigyti iš Gibco (Thermo Scientific, kat. nr. C0055C). Monosluoksnį sudarančios ląstelės kultivuotos EpiLife® pirminių keratinocitų auginimo terpėje be serumo su HKGS terpės priedais (0,2 % jaučio hipofizės ekstrakto, 5 µg/ml jaučio insulino, 0,18 µg/ml hidrokortizono, 5 µg/ml jaučio transferino, 0,2 ng/ml žmogaus epiderminio augimo faktoriaus), 0,15 mM Ca^{2+} , 10 µg/ml gentamicino ir 0,25 µg/ml amfotericino B (visi tirpalai iš Gibco), 37 °C temperatūroje ir 5 % CO_2 bei 95 % drėgmės atmosferoje. HEKa ląstelės kultivuotos iki 70-80 % konfluentiško ir tuomet persėtos atkeliant 0,025 % tripsino/0,02 % EDTA tirpalu. FD poveikio eksperimentai atlikti su trečio ir ketvirto pasažo HEKa ląstelių kultūra, pasiekusia 60-80 % konfluentišumą.

A-431 – žmogaus epidermoidinės karcinomos ląstelės (ATCC®, kat. nr. CRL-1555™). Monosluoksnį sudarančios ląstelės kultivuotos DMEM terpėje su 5 % FCS, pridėjus 100 U/ml penicilino, 100 µg/ml streptomicino (visi iš Biochrom AG), 2 mM glutamino ir 10 mM HEPES, 37 °C temperatūroje ir 5 % CO_2 bei 95 % drėgmės atmosferoje. Ląstelės kultivuotos iki 80-90 % konfluentiško ir tuomet persėtos atkeliant 0,025 % tripsino/0,02 % EDTA tirpalu.

2.5. Ląstelių užšaldymas

HEKa ląstelės šaldytos paruoštoje naudoti Synth-a-Freeze™ terpėje su 10 % DMSO, skirtoje pirminių ląstelių šaldymui (Thermo Scientific). Atkeltos ląstelės suskaičiuotos, nucentrifuguotos, suspenduotos 10^6 ląst./ml 4 °C Synth-a-Freeze™ terpėje ir išpilstytos į kriogeninius mėgintuvėlius, kurie perkelti į -80 °C temperatūros šaldiklį. Po 48 val., ilgalaikiem saugojimui, ląstelės perkeltos į skystą azotą.

A-431 ląstelės šaldytos FCS su 10% DMSO. Atkeltos ląstelės suskaičiuotos, nucentrifuguotos, suspenduotos 10^6 ląst./ml 4°C FCS su 10 %

DMSO ir išpilstytos į kriogeninius mėgintuvėlius, kurie perkelti į -80 °C temperatūros šaldiklį. Po 48 val., ilgalaikiam saugojimui, ląstelės perkeltos į skystą azotą.

2.6. Ląstelių atšildymas

HEKa ir A-431 ląstelės atšildytos inkubuojant 2 min. 37 °C temperatūros vandens vonelėje. Atšildytų ląstelių suspensija sulašinta į auginimo terpę su priedais, nucentrifuguota. Nupylus supernatantą ląstelės suspenduotos auginimo terpėje su priedais, augintos 37 °C temperatūroje ir 5 % CO₂ bei 95 % drėgmės atmosferoje. Praėjus 24 val. pakeista augimo terpė.

2.7. Inkubacija su fotosensibilizatoriais bei švitinimas

Inkubacijai su fotosensibilizatoriais HEKa išsėtos 1×10^4 cm², A-431 ląstelės – 2×10^4 cm² tankiu. 30 val. po išsėjimo, ląstelės praplautos PBS ir inkubuotos 18 val., atitinkamai EpiLife® terpėje be priedų arba DMEM terpėje be FCS, pridėjus 0,1 µg/ml mTHPC (Dabkevičienė *et al.*, 2012; Hadjira *et al.*, 1996), 10 µg/ml AlPcS_{2a} (Prasmickaitė *et al.*, 2004; Prasmickaitė *et al.*, 2002; Vikdal *et al.*, 2013) arba 20 µg/ml AlPcS₄ (Gomes *et al.*, 1999; Labanauskiene *et al.*, 2009; Moan *et al.*, 1994). Ląstelės inkubuotos tamsoje 37 °C temperatūroje ir 5 % CO₂ bei 95 % drėgmės atmosferoje. Po inkubacijos, ląstelės praplautos PBS, pridėta atitinkamai EpiLife® terpė su priedais arba DMEM terpė su FCS. AlPcS_{2a} atveju, praėjus 2 val., terpė buvo dar kartą pakeičiama. Ląstelės švitintos diodiniu šviesos šaltiniu UNIMELA-1 (Vilniaus universiteto Lazerinių tyrimų centras), kurio spinduliuotės $\lambda = 660 \pm 5$ nm (16 mW/cm²). Ląstelių švitinimo trukmė nurodyta 2.1 lentelėje. Toliau ląstelės inkubuotos 4-24 val. tamsoje 37 °C temperatūroje ir 5 % CO₂ atmosferoje.

2.1 lentelė. Ląstelių švitinimo trukmė ir ją atitinkanti dozė

A-431 ląstelės	CtD25	CtD50	CtD80
mTHPC	30 s (0,48 kJ/m ²)	1 min (0,92 kJ/m ²)	3 min (2,88 kJ/m ²)
AlPcS _{2a}	4 min (5,76 kJ/m ²)	8 min (11,52 kJ/m ²)	12 min (17,28 kJ/m ²)
AlPcS ₄	3 min (3,84 kJ/m ²)	4 min (5,76 kJ/m ²)	6 min (8,64 kJ/m ²)
HEKa ląstelės	CtD25	CtD50	CtD80
mTHPC	10 s (0,16 kJ/m ²)	20 s (0,32 kJ/m ²)	30 s (0,48 kJ/m ²)
AlPcS _{2a}	0,5 min (0,48 kJ/m ²)	3 min (2,88 kJ/m ²)	4 min (3,84 kJ/m ²)
AlPcS ₄	1 min (0,92 kJ/m ²)	2 min (1,92 kJ/m ²)	4 min (3,84 kJ/m ²)

2.8. AlPcS_{2a} lokalizacijos A-431 ląstelėse vaizdinimas

Fotosensibilizatoriaus AlPcS_{2a} ir lizosomoms savito žymens kolokalizacijai nustatyti į A-431 ląstelių inkubavimo terpę pridėta 75 nm lizosomų žymens LysoTracker Yellow-HCK-123 (Molecular Probes), ląstelės inkubuotos 1 val. Fluorescencija vaizdinta lazeriniu skenuojamuoju mikroskopu Leica SP5, naudojant 63× vandens imersijos objektyvą HCX PL APO CS, kurio NA 1,2. Fotosensibilizatorių AlPcS_{2a} ir AlPcS₄ fluorescencija stebėta $\lambda_{ex} = 633$ nm, $\lambda_{em} = 640-690$ nm, o lizosomų žymens LysoTracker Yellow-HCK-123, $\lambda_{ex} = 488$ nm, $\lambda_{em} = 494-605$ nm.

2.9. Ląstelių gyvybingumo nustatymas

Po FD poveikio ląstelės inkubuotos 24 val. ir vertintas ląstelių gyvybingumas.

MTT metodas

Metodas pagrįstas MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio bromido) redukcija iki violetinės spalvos produkto 1-(4,5-dimetiltiazol)-3,5-difenilformazano.

Ląstelės praplautos DPBS, užpilta DPBS skiestu 0,2 mg/ml MTT tirpalu ir inkubuota 2 val. 37 °C temperatūroje. Po inkubavimo MTT tirpalas pašalintas, o dėl gyvybingų ląstelių oksidoreduktazių veiklos susidaręs violetinės spalvos dažas ekstrahuotas 100% izopropanoliu. Supernatanto sugertis matuota 570 nm bangos ilgyje spektrofotometru Asys UVM340 (Denizot & Lang, 1986).

KV metodas

Metodas pagrįstas kristalinio violetinio (KV) dažo prisijungimu prie baltymų ir DNR.

Ląstelės praplautos 0,9 % NaCl tirpalu ir 10 min. fiksuotos 96 % etanoliu. Užfiksuotos ląstelės dažytos 0,05 % KV tirpalu 20 % etanolyje. Po 30 min. dažas nupiltas, ląstelių monosluksnis 5 kartus praplautas vandeniu ir dažas ištirpintas 0,1 % acto rūgšties tirpalu 50 % etanolyje. 585 nm sugertis matuota spektrofotometru Asys UVM340 (Ito, 1984).

Abiem metodais įvertintas gyvybingumo sumažėjimas išreikštas citotoksine doze (CtD), kuri apskaičiuota pagal formulę:

$$CtD(\%) = 100 - \left(\frac{OD_{po\,FDP}}{OD_K} \times 100 \right)$$

OD – optinis tankis; K – neveiktos kontrolinės ląstelės.

Apibrėžėme, kad CtD25 atitinka iki 25 % ląstelių gyvybingumo sumažėjimą, CtD50 – iki 50 % ir CtD80 – iki 80 %. Reikiamai CtD pasiekti ląstelės švitintos tam tikrą laiką atitinkama švitinimo doze (2.1 lentelė).

2.10. Branduolių vaizdinimas

Ląstelių branduoliai vertinti praėjus 6 ir 24 val. po švitinimo. Gyvų A-431 ląstelių branduoliai vizualizuoti 30 min. dažant 5 µg/ml of Hoechst 33342 (Molecular Probes) 37 °C. Fiksuotų HEKa ląstelių branduoliai vizualizuoti 15 min. dažant DAPI (4',6-diamidino-2'-fenilindolo dihidrochloridu) (Invitrogen) KT.

Ląstelės vaizdintos Olympus AX70 mikroskopu, naudojant 60× aliejaus imersijos objektyvą UPlanFl, kurio NA 1,25, filtrų kubą WU ($\lambda_{\text{ex}} = 330\text{--}385\text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 420\text{ nm}$), vaizdus registruojant CCD kamera Orca (Hamamatsu). Branduolių vaizdai analizuoti FIJI programa. Ląstelių branduoliai, įskaitant apoptozinius, buvo suskaičiuoti atsitiktinai pasirinkus 10-15 nepersidengiančių matymo laukų viename mėginyje, kaip aprašyta anksčiau (Cummings & Schnellmann, 2004). Apoptozinėmis buvo laikomos ląstelės su fragmentuotais branduoliais arba sutankėjusiu chromatinu ir/arba branduoliu. Apoptozinių branduolių dalis buvo išreikšta procentais nuo bendro ląstelių skaičiaus.

2.11. N-acetil-β-gliukozaminidazės aktyvumo nustatymas

N-acetil-β-gliukozaminidazės aktyvumas A-431 ląstelėse matuotas iš karto po ląstelių švitinimo. Ląstelės praplautos PBS ir užpildtos 200 µl lizavimo buferio (0,1% Tritono X-100 100 mM Na acetato buferiniame tirpale, pH 4,6) ir surinktos guminiu grandikliu. Kiuvetėje sumaišyta 100 µl ląstelių lizato ir 400 µl substrato tirpalo (2 mM *p*-nitrofenilo-N-acetilo-β-gliukozaminido 100 mM Na acetato buferiniame tirpale, pH 4,6). Mišinys inkubuotas 2 val. 37 °C temperatūroje, tuomet reakcija sustabdyta į kiuvetes įpilant 500 µl šalto 0,5 M Na₂CO₃ tirpalo. *p*-Nitrofenoliui būdinga 410 nm sugertis matuota spektrofotometru Perkin Elmer λ20, kaip aprašyta anksčiau (Beaufay *et al.*, 1974). N-acetil-β-gliukozaminidazės aktyvumas išreikštas procentais, lyginant su FD neveiktomis ląstelėmis.

2.12. Kaspazės 3 aktyvumo nustatymas

Kaspazės 3 aktyvumo matavimui naudotas rinkinys „Caspase-3 Cellular Activity Assay Kit PLUS“ (Biomol). Metodas pagrįstas fluorescencinio dažo 7-amino-4-trifluorometilkumarino (AFC) atskėlimu nuo peptido Ac-DEVD-AFCC-galo. Atskėlus AFC nuo substrato, padidėja jo 510 nm

fluorescencijos intensyvumas. Fermento aktyvumas matuotas praėjus 0, 2, 4, 6, 8 ir 24 val. po švitinimo, pagal gamintojo rekomenduotą protokolą.

Kaspazės 3 aktyvumas matuotas prikibusiose ir atkilusiose ląstelėse. Atkilusios ląstelės surinktos su ląstelių kultivavimo terpe. Prikibusios ląstelės atkeltos nuo kultivavimo indo paviršiaus naudojant 0,05 % tripsino/0,02 % EDTA tirpalą. Atkeltų ląstelių suspensija sumaišyta su surinktomis atkilusiomis ląstelėmis kultivavimo terpėje ir centrifuguota 10 min., $1000 \times g$, $4^{\circ}C$. Pašalinus supernatantą, ląstelės praplautos PBS, suskaičiuotos. Dar kartą nucentrifuguotos ląstelės suspenduotos tokiaame lizės buferio tūryje (50 mM HEPES, pH 7,4, 0,1 % CHAPS (Roth), 1 mM DTT (Roth), 0,1 mM EDTA), kad ląstelių koncentracija būtų 10^7 ląst./ml. Ląstelės lizuojamos 5 min. leduose. Citozolio ekstraktas gautas 10 min. centrifuguojant $10000 \times g$, $4^{\circ}C$. Į 96 šulinėlių matavimo plokštelės (Labsystems) šulinėlį įpilta 80 μ l matavimo buferio (50 mM HEPES, pH 7,4, 100 mM NaCl, 0,1% CHAPS, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 10 % glicerolio), 10 μ l citozolio ekstrakto ir 10 μ l kaspazei savito substrato (0,2 mM). AFC būdinga fluorescencija matuota 60 min., kas 3 min., fluoroskanu Ascent FL (Labsystems), $\lambda_{ex} = 390$ nm, $\lambda_{em} = 510$ nm.

Pagal gautus duomenis nubrėžta kreivė, ordinačių ašyje atidėjus santykinius fluorescencijos vienetus (SFV), abscisių – laiką (min.). Iš tiesės lygties apskaičiuotas kreivės nuokrypis. Fermento DEVDazinis aktyvumas apskaičiuotas pagal lygtį:

$$\text{DEVDazinis aktyvumas} \left(\frac{\text{pmol}}{\text{min}} \right) = \frac{\text{Kreivės nuokrypis} \left(\frac{\text{SFV}}{\text{min}} \right)}{\text{Perskaičiavimo koeficientas} \left(\frac{\mu\text{M}}{\text{SFV}} \right)} \times \text{Reakcijos tūris} (\mu\text{l})$$

Perskaičiavimo koeficientas yra lygus 1/kreivės nuokrypio, gauto iš AFC kalibracinės kreivės, ordinačių ašyje atidėjus SFV, o abscisių ašyje – skirtingas AFC standarto koncentracijas (μ M). Kaspazės aktyvumas (pmol/min) išreikštas pmol/min/ 10^5 ląstelių.

2.13. Transkriptų kiekio vertinimas

RNR išskyrimas

RNR skirta iš prikibusių ir atkilusių ląstelių. Atkilusios ląstelės surinktos su ląstelių kultivavimo terpe. Prikibusios ląstelės atkeltos nuo kultivavimo indo paviršiaus naudojant 0,05 % tripsino/0,02 % EDTA tirpalą. Atkeltų ląstelių suspensija sumaišyta su surinktomis atkilusiomis ląstelėmis kultivavimo terpėje ir centrifuguota 10 min., $1000 \times g$, $4^{\circ}C$. Nucentrifuguotos ląstelės praplautos PBS ir suskaičiuotos. Ląstelių suspensijos tūris, kuriame buvo 1×10^6 ląstelių, centrifuguotas 10 min., $1000 \times g$, $4^{\circ}C$. Iš surinktų ląstelių RNR skirta tuoj pat arba ląstelių nuosėdos

buvo laikomos -70 °C. RNR skirta „RNA Isolation Kit Purescript®“ (Gentra Systems) rinkiniu, pagal gamintojo rekomendacijas. Išskirtos RNR kokybė ir kiekis vertintas 1 % agaroziniame gelyje ir spektrofotometriškai nustatant OD_{260/280} santykį. Išskirta RNR buvo laikoma -70 °C.

kDNR sintezė

kDNR (angl. *cDNA*, *copy DNA*) sintezei naudotas „RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit“ rinkinys (Thermo Scientific). kDNR sintetinta naudojant atsitiktinius heksamerus, pagal gamintojo rekomendacijas, termocikleryje Mastercycler (Eppendorf).

Kiekybinė PGR

Kiekybinės PGR metu susidaręs produktas buvo nustatomas naudojant SYBR Green dažą. Tiriamų *IL1A*, *VEGFA* genų raiška vertinta pagal geno *ACTB* raišką. Pradmenys pasirinkti naudojant programą Primer3 ant egzono-egzono ribos, taip išvengiant genominės DNR amplifikacijos.

Reakcijos tūris 20 µl: 1,6 µl 3 kartus skiestos kDNR, po 1 µl tiesioginio ir atvirkštinio pradmens (10 µM) (Metabion), 10 µl SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) ir 6,4 µl vandens. Reakcija vykdyta 96 šulinėlių PGR plokštelėse (Applied Biosystems) Mastercycler ep realplex (Eppendorf) termocikleryje, pradmenų sekos pateiktos 2.2 lentelėje.

Genų raiškos pokytis vertintas $\Delta\Delta C_t$ metodu. Tiriamajame mėginyje santykinis transkripto kiekis, išreikštas kartais, palyginus su kontrolinėmis ląstelėmis, apskaičiuotas pagal formulę:

Transkripto pokytis kartais,
lyginant su kontrole $= 2^{-\Delta\Delta C_t}$,

$$\Delta\Delta C_t = \left(\frac{C_{t \text{ tiriamojo transkripto}}}{C_{t \text{ ACTB}}} \right)_{\text{po FDP}} - \left(\frac{C_{t \text{ tiriamojo transkripto}}}{C_{t \text{ ACTB}}} \right)_K$$

C_t (angl. *cycle threshold*) – ciklų skaičius, kai registruojamas fluorescencijos signalas viršija slenkstinę vertę (foninę fluorescenciją); K – kontrolinės neveiktos ląstelės.

Rezultatai pateikti kaip genų raiškos pokyčiai, išreikšti kartais, pagal *ACTB* geno raišką, palyginus su kontrole (FD poveikiu neveiktomis ląstelėmis), trijų matavimų vidurkis $\pm$ SN.

2.2 lentelė. Oligonukleotidinių pradmenų sekos

Geno pav.	Geno sekos nr.	Tiesioginio pradmens seka (5'→3')	Atvirkštinio pradmens seka (5'→3')
<i>ACTB</i>	NM_001101	ACAGAGCCTCGCCTTTGC	CATCATCCATGGTGAGCTG
<i>ILA</i>	NM_000575.3	GCTGCTGAAGGAGATGCCTGA	CAGACCTACGCCTGGTTTTTC
<i>VEGFA</i>	NM_001025366.2	CCCACTGAGGAGTCCAACAT	TTCTTTGGTCTGCATTACATT

2.14. Ląstelių transfekcija siRNA

A-431 ląstelės transfekcijai mažomis interferuojančiomis RNR (siRNA) (*small interfering RNA*) išsėtos $2,5 \times 10^4$ ląst./cm² tankiu, DMEM terpėje su 5 % FCS, 2 mM glutamino, be antibiotikų. Transfekcija siRNA atlikta praėjus 24 val. po ląstelių išsėjimo, pagal gamintojo rekomendacijas (Invitrogen). Ląstelės transfektuotos 4-6 val., iki pridėdant į terpę mTHPC. siRNA sekos slopinančios *IL1-A* geno (genų bako Nr. NM_000575) raišką (IL-siRNA) ir siRNA, kuri nesavita jokiam žmogaus genui (NK-siRNA), nurodytos 2.3 lentelėje. siRNA chemiškai susintetintos MWG Biotech AG.

2.3 lentelė. Mažų interferuojančių RNR (siRNA) sekos

siRNA	siRNA seka
NK-siRNA	5' AGGUAGUGUAAUCGCCUUGdTdT 3'
IL-siRNA ₁₁₄₅	5' CAUCCAAGCUUACCUUCAAdTdT 3'
IL-siRNA ₁₂₆₀	5' CGCCAAUGACUCAGAGGAAdTdT 3'
IL-siRNA ₁₅₄₃	5' GCCCAAGAUGAAGACCAACdTdT 3'

Nuo ląstelių pašalinta inkubacijos terpė, 2 kartus praplauta 37 °C temperatūros PBS. Transfekcijos metu ląstelės buvo pasiekę 60-80 % konfluentiškumą. Kiekvienai lėkštei paruoštas transfekcijos mišinys – siRNA ir Lipofectamine 2000 (Thermo Scientific) transfekcijos reagento kompleksas: 100 pmol siRNA skiesta 250 ml OptiMEM I terpės (Thermo Scientific). Švelniai sumaišyta. Taip pat paruoštas 5 ml transfekcijos reagento su 250 ml OptiMEM I terpės mišinys, kuris inkubuotas 5 min. KT. Tuomet tarpusavyje sumaišyti abu mišiniai: OptiMEM I terpėje atskiesta siRNA ir OptiMEM I terpėje atskiestas transfekcijos reagentas. Švelniai sumaišyta ir inkubuota 20 min. KT. Po inkubacijos susidarę siRNA ir transfekcijos reagento kompleksai sulašinti ir tolygiai paskirstyti lėkštelėse su ląstelėmis.

2.15. Imunofermentinė analizė Western blot

Baltyminių mėginių paruošimas

Baltyminiai mėginiai ruošti iš prikibusių ir atkilusių ląstelių. Atkilusios ląstelės surinktos su ląstelių kultivavimo terpe. Prikibusios ląstelės atkeltos nuo kultivavimo indo paviršiaus naudojant 0,05 % tripsino/0,02 % EDTA tirpalą. Atkeltų ląstelių suspensija sumaišyta su surinktomis atkilusiomis ląstelėmis kultivavimo terpėje ir centrifuguota 10 min., 1000 × g, 4 °C. Pašalinus supernatantą, ląstelės praplautos PBS ir suskaičiuotos. Dar kartą nucentrifuguotos ląstelės suspenduotos tokia RIPA buferio (50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Tritono X-100, 1 % natrio deoksicholato, 1 mM PMSF, 1 μM leupeptino ir 0,01 μM aprotinino) tūryje,

kad ląstelių koncentracija būtų 10^7 ląst./ml. Ląstelės lizuotos 30 min. leduose 5 min., centrifuguotos $14000 \times g$, $4^\circ C$. Po centrifugavimo surinktas supernatantas, kuriame nustatyta baltymų koncentracija BCA metodu (žr.sk. 2.18).

NDS elektroforezė denatūravimo sąlygomis

Baltymų lizatai, kuriuose buvo 30-70 μg baltymo, sumaišyti su $6 \times$ baltymų užnešimo buferiu (30 % glicerolis, 10% NDS, 0,012 % bromfenolio mėlis, 0,6 M DTT ir 0,35 M Tris-HCl, pH 6,8), inkubuoti 4 min. $90^\circ C$ vandens vonelėje ir atvėsinti leduose.

Baltymų elektroforezė atlikta NDS-poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis. Poliakrilamidinis gelis suformuotas užsluoksniuojant 4% koncentruojamąjį gelį ant 12 % skiriamąjo gelio. 12 % skiriamąjo gelio sudėtis: 6 ml 30 % akrilamido/0,8 % bisakrilamido tirpalo, 3,75 ml Tris-HCl (1,5 M) su 0,4% NDS (pH 8,8), 5,25 ml H_2O , 50 μl amonio persulfato (10 %) ir 10 μl TEMED. 4 % koncentruojamojo gelio sudėtis: 0,65 ml 30 % akrilamido/0,8 % bisakrilamido tirpalo, 1,25 ml Tris-HCl (0,5 M) su 0,4 % NDS (pH 6,8), 3,05 ml H_2O , 25 μl amonio persulfato (10 %) ir 5 μl TEMED.

Baltymų elektroforezė leista pripildžius elektroforezės aparatą NDS elektroforezės buferiu: 24,76 mM Tris (Roth), 191,8 mM glicino (Roth), 3,47 mM NDS. Elektroforezė vykdyta 1 val. esant 80 V įtampai (baltymai sukcentruojami 4 % gelio sluoksnyje) ir 3 val. esant 120 V įtampai (baltymai frakcionuojami 12 % gelio sluoksnyje).

Baltymų pernešimas ant nitroceliuliozinės membranos

Baltymai iš poliakrilamidinio gelio pernešti ant 0,45 μm nitroceliuliozinės (BioRad) membranos naudojant pusiau sauso pernešimo aparatą V20-SDB (SCIE-PLAS). Pernešimo buferio sudėtis: 1,3 mM NDS, 48 mM Tris (Roth), 39 mM glicino (Roth), 15 % izopropanolio. Ant pernešimo buferiu sudrėkintos anodinės aparato dalies dėti trys pernešimo buferyje sudrėkinti 1 mm ilgesni ir platesni už gelį Whatman™ 3 MM popieriaus lapeliai. Ant jų uždėti tokio pat dydžio pernešimo buferyje sudrėkinta nitroceliuliozinė membrana, o ant jos – gelis. Ant gelio dėti dar trys pernešimo buferyje sudrėkinti Whatman 3 MM popieriaus lapeliai. Stikline lazdele išstumti tarp sluoksnių susidarę oro burbuliukai ir uždėtas pernešimo buferiu sudrėkintas katodinis dangtis. Pernešimas vykdytas 1 val. 15 min., esant 1 mA/cm^2 srovei.

Baltymų detekcija

Po baltymų pernešimo nitroceliuliozinė membrana 1 val. inkubuota TBS/T buferyje (50 mM Tris, pH 8, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20 (Roth)) su 5 % BSA (Roth) KT. Tuomet membrana per naktį inkubuota $4^\circ C$

temperatūroje pirminių antikūnų tirpale, atskiedus reikiamu santykiu TBS/T buferyje su 5 % BSA (2.4 lentelė).

2.4 lentelė. Pirminiai antikūnai naudoti baltymų detekcijai

Nustatomas baltymas	Skiedimas	Antikūno kat.nr.	Gamintojas
Kaspazė 3 (Casp 3)	1: 1000	sc-271759	Santa Cruz Biotechnology
LC3	1: 1000	PM036	MBL
Keratinas 10 (K10)	1: 50000	ab76318	Abcam
Involukrinas (IVL)	1: 1000	ab68	Abcam
Prokaspazė-14 (CASP14)	1: 1000	ab45415	Abcam
β-aktinas	1: 1000	sc8432	Santa Cruz Biotechnology

Po inkubacijos membrana plauta 15 min. ir 2 kartus po 5 min. TBS/T buferiu ir 2 val. inkubuota antrinių antikūnų tirpale, skiedžiant santykiu 1:10000 TBS/T buferyje su 5 % BSA 4 °C temperatūroje. K10, CASP14 ir LC3 nustatyti naudojant su šarmine fosfataze konjuguotą antrinį antikūną prieš triušio IgG (kat.nr. GWB-C11A72, GenWay Biotech), o IVL ir β-aktinas – naudojant su šarmine fosfataze konjuguotą antrinį antikūną prieš pelės IgG (kat.nr. sc-2008, Santa Cruz Biotechnology), arba β-aktinas nustatomas naudojant su krienų peroksidaze konjuguotą antrinį antikūną prieš pelės IgG (kat.nr. sc-2031, Santa Cruz Biotechnology), o LC3 – naudojant su krienų peroksidaze konjuguotą antrinį antikūną prieš triušio IgG (kat.nr. sc-2030, Santa Cruz Biotechnology). Membrana plauta 15 min. ir 2 kartus po 5 min. TBS/T buferiu. Prieš baltymų vaizdinimą membrana nuplauta dH₂O ir išdžiovinta.

Baltymai vizualizuoti naudojant ECL chemiliuminescencinius reagentus (Amersham Biosciences). Membrana 1 min. drėkinta ECL reagentų mišiniu. Fotojuosta Medical X-ray Film General Purpose Blue (Kodak) ant membranos eksponuota 0,5-30 min. Kitu atveju, baltymų vizualizavimui naudotas NBT/BCIP reagentas (nitro-mėlynojo tetrazolis ir 5-brom-4-chlor-3'-indolilfosfatas) (Thermo Scientific). Membrana inkubuota su 66 μl NBT (50 mg/ml, ruošiamas 70 % dimetilformamide), 33 μl BCIP (50 mg/ml, ruošiamas 100 % dimetil-formamide) ir 10 ml substratinio buferio (0,1 M Tris, 0,1 NaCl, 0,005 M MgCl₂, pH 9,5). Inkubuojama purtant KT, kol išryškėja juostelės. Reakcija sustabdyta membraną perkeliant į vonelę su dH₂O ir membrana išdžiovinta.

Baltymų juostelių intensyvumas vertintas FIJI programa (Schneider *et al.*, 2012). Santykinis baltymo kiekis apskaičiuotas pagal formulę:

$$\text{Santykinis baltymo kiekis} = \frac{(\text{Tiriamajo baltymo juostelės tankis} / \beta\text{-aktino juostelės tankis})_{\text{po FDP}}}{(\text{Tiriamajo baltymo juostelės tankis} / \beta\text{-aktino juostelės tankis})_{\text{K}}}$$

K – kontrolinės neveiktos ląstelės.

Autofaginio srauto įvertinimas

Norint nustatyti nuo lizosomų priklausomą skaidymą, iš karto po FD poveikio į ląstelių auginimo terpę buvo pridėti lizosomų peptidazių slopikliai E64d (10 mg/ml) ir pepstatinas A (10 mg/ml). Autofaginio srauto skaičiavimui naudotas LC3-II kiekio skirtumas tarp mėginių su lizosomų proteazės inhibitoriais ir be jų:

$$\text{Autofagijos srauto pokytis} = \frac{\left(\left(\frac{\text{LC3-II juostelės tankis}}{\beta\text{-aktino juostelės tankis}} \right)^{+PI} - \left(\frac{\text{LC3-II juostelės tankis}}{\beta\text{-aktino juostelės tankis}} \right)^{-PI} \right)_{\text{po FDP}}}{\left(\left(\frac{\text{LC3-II juostelės tankis}}{\beta\text{-aktino juostelės tankis}} \right)^{+PI} - \left(\frac{\text{LC3-II juostelės tankis}}{\beta\text{-aktino juostelės tankis}} \right)^{-PI} \right)_K}$$

PI – peptidazių slopikliai; K – kontrolinės neveiktos ląstelės.

2.16. Imunofluorescencinė mikroskopija

Imunofluorescencinės mikroskopijos analizei ląstelės augintos ant dengiamųjų stiklelių 9 cm² lėkštelėse. Praėjus 6 arba 24 val. po švitinimo, nuo ląstelių pašalinta inkubavimo terpė ir 2 kartus praplauta PBS. Ląstelės 10 min. fiksuotos 4 % paraformaldehidu PBS buferiniame tirpale 4 °C temperatūroje, 3 kartus po 5 min. plautos PBS. Ląstelės pralaidintos 3 min. inkubuojant su 0,1 % Tritono X-100 PBS buferiniame tirpale 4 °C temperatūroje ir kartą greitai praplautos tuo pačiu tirpalu.

Tolesni etapai atlikti KT. Fiksuotos ir permeabilizuotos ląstelės inkubuotos blokavimo tirpale (0,5 % BSA PBS buferiniame tirpale) 15 min. Po blokavimo, ląstelės 30 min. inkubuotos pirminio antikūno prieš LC3 ar K10 (2.4 lentelė) tirpale, skiestu blokavimo tirpalu, santykiu, atitinkamai 1:350 ar 1:100. Ląstelės tris kartus po 5 min. plautos PBS ir 30 min. inkubuotos su antriniu antikūnu prieš triušio IgG (NL005, R&D Systems), skiestu blokavimo tirpalu, santykiu 1:200. Ląstelės plautos PBS tris kartus po 5 min.

Branduoliams dažyti fiksuotos ląstelės inkubuotos 300 nM DAPI (Invitrogen) PBS buferiniame tirpale 3 min. Dengiamieji stikleliai su antikūnu ir DAPI žymėtomis ląstelėmis padengti DakoCytomation Fluorescent Mounting medium (Dako) ir uždėti ant objektinių stiklelių. Paruošti mėginiai laikyti 4 °C temperatūroje, tamsoje.

DAPI ir NL637 fluorescencija registruota lazeriniu skenuojamuoju mikroskopu Leica SP5, naudojant 63× HCX PL APO lambda blue aliejaus imersijos objektyvą, NA 1,4, atitinkamai $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 420\text{-}535 \text{ nm}$ ir $\lambda_{\text{ex}} = 633 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 640\text{-}680 \text{ nm}$.

K10 turinčios ląstelės taip pat buvo vizualizuotos EVOS FL Auto vaizdinimo sistema (Life Technologies), DAPI $\lambda_{\text{ex}} = 357 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 447 \text{ nm}$,

NL637 $\lambda_{\text{ex}} = 628 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 692 \text{ nm}$. DAPI žymėti branduoliai ir K10 turinčios ląstelės skaičiuotos naudojant FIJI programą. Analizuojant kiekvieną mėginį, buvo suskaičiuota 10-15 atsitiktinai parinktų nepersidengiančių matymo laukų (mažiausiai 100 ląstelių viename matymo lauke). Įvertinus fluorescencijos intensyvumą, kiekvieno mėginio K10 turinčios ląstelės buvo suskirstytos į dvi kategorijas: silpno 15-2500 RFU ($K10^{\text{low}}$) ir stipraus $> 2500 \text{ RFU}$ ($K10^{\text{high}}$) fluorescencijos intensyvumo. Kai ląstelėje K10 fluorescencijos intensyvumas buvo mažesnis nei 15 RFU, tokia ląstelė buvo laikoma kaip neturinti K10. Keratinocitų dalis su $K10^{\text{low}}$ ir $K10^{\text{high}}$ buvo išreikšta procentais nuo bendro ląstelių skaičiaus.

2.17. Imunofermentinė analizė ELISA

Imunofermentiniam metodui naudota A-431 lastelių inkubavimo terpė buvo surinkta į mėgintuvėlius ir centrifuguota 10 min. $1000 \times g$, 4°C . Supernatantas užšaldytas -80°C temperatūroje, jeigu tuoj pat nenaudotas baltymų raiškos tyrimams.

Ląstelių lizatai ruošti iš prikibusių ir atkilusių ląstelių. Atkilusios ląstelės surinktos su ląstelių kultivavimo terpe. Prikibusios ląstelės atkeltos nuo kultivavimo indo paviršiaus naudojant 0,05 % tripsino/0,02 % EDTA tirpalą. Atkeltų ląstelių suspensija sumaišyta su surinktomis atkilusiomis ląstelėmis kultivavimo terpėje ir centrifuguota 10 min., $1000 \times g$, 4°C . Po centrifugavimo ląstelės suspenduotos 4°C PBS, skaičiuotos ir dar kartą nusodintos centrifuguojant. Ląstelės suspenduotos tokia lizės buferio (50 mM Tris- HCl, pH 7,4, 1 % NP-40, 0,25 % Nadeoksicholatas, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) tūryje, kad ląstelių koncentracija būtų 5×10^6 last./ml ir 15 min. lizuotos leduose. Peptidazių slopikliai (1 mM PMSF, 1 mM NaF, 1 $\mu\text{g/ml}$ aprotininas, 1 $\mu\text{g/ml}$ leupeptinas) į lastelių lizės buferį dėti kiekvieną kartą prieš lastelių lizavimą. Supernatantas grynintas centrifuguojant 15 min. $14000 \times g$, 4°C . Supernatantas užšaldytas -80°C temperatūroje, jeigu tuoj pat nenaudotas baltymų raiškos tyrimams.

Į 96 šulinėlių plokštelės Maxisorp (Nunc) šulinėlius įpilta po 50 μl pirminių antikūnų prieš žmogaus VEGF-A ar IL-1 α (2,0 $\mu\text{g/ml}$) (R&D Systems) tirpalo skiesto PBS. Plokštelė su pirminiais antikūnais inkubuota $+4^\circ\text{C}$ temperatūroje per naktį. Po inkubacijos plokštelės šulinėliai 3 kartus plauti PBS su 0,05 % Tween 20. Po plovimo, į plokštelės šulinėlius piltas PBS su 2 % BSA ir inkubuota 1 val. 37°C temperatūroje. Po inkubacijos plokštelės šulinėliai plauti PBS buferiniu tirpalu su 0,05 % Tween 20. IL-1 α baltymo kiekio A-431 lastelėse nustatymui į plokštelės šulinėlius įpilta po 50 μl antigeno tirpalo (skiesto PBS su 2 % BSA):

- lastelių inkubavimo terpės, skiestos 2 ir 4 kartus;
- lastelių lizato, skiesto 100, 200, 400 kartų;
- 250-15,625 pg/ml žmogaus rekombinantinio IL-1 α baltymo.

VEGF-A baltymo kiekio A-431 lastelėse nustatymui į plokštelės šulinėlius įpilta po 50 μ l antigeno tirpalo (skiesto PBS su 2 % BSA):

- lastelių inkubavimo terpės, skiestos 2 ir 4 kartus;
- lastelių lizato, skiesto 50, 10, 20 kartų;
- 1000-62,5 pg/ml žmogaus rekombinantinio VEGF-A baltymo.

Antigeno tirpalai inkubuota 1,5 val. 37 °C temperatūroje. Nupylus antigeno tirpalą, plokštelės šulinėliai plauti PBS su 0,05 % Tween 20. Į šulinėlius įpilta po 50 μ l antrinių, prieš žmogaus VEGF-A (50,0 ng/ml) ar IL-1 α (12,5 ng/ml), biotinu žymėtų antikūnų (R&D Systems) tirpalo skiesto PBS. Plokštelė su antriniais antikūnais inkubuota 2 val. 37 °C temperatūroje. Nupylus antrinių antikūnų tirpalą, plokštelės šulinėliai plauti PBS su 0,05 % Tween 20. Į šulinėlius įpilta 50 μ l streptavidino ir šarminės fosfatazės konjugato tirpalo (Amersham Biosciences) skiesto 10 mM HEPES, pH 7,5/0,15 M NaCl/0,1 % Tween 20 buferiu santykiu 1:1000 ir inkubuota 40 min., 37 °C temperatūroje. Streptavidino ir šarminės fosfatazės konjugato tirpalas nupiltas. Plokštelės šulinėliai plauti šarminės fosfatazės plovimo buferiu: 10 mM HEPES, pH 7,5, 0,15 M NaCl, 0,1 % Tween 20. Į šulinėlius įpilta po 50 μ l *p*-nitrofenolio fosfato tirpalo (3 mM) substratiniame buferyje: 100 mM dietanolaminas, mM MgCl₂ $\times$ 6 H₂O, pH 9,5) ir inkubuota tamsoje per naktį KT. Spavinės reakcijos metu susidariusio produkto sugertis matuojama 405 nm bangos ilgyje ASYS UVM 340 plokštelių skaitytuvu. Pagal gautus duomenis brėžta standartinio baltymo kreivė, ordinatėse atidedant optinio tankio vienetų, abscisėse – standartinio baltymo koncentracijas. Iš kalibracinės kreivės apskaičiuotas tirto baltymo kiekis (ng/ml), kuris normalizuotas milijonui lastelių. Baltymų koncentracija lizatuose nustatyta BCA metodu (žr.sk. 2.18).

2.18. Baltymo koncentracijos nustatymas BCA metodu

BCA metodas pagrįstas kompleksų sudarymo reakcija, kurios metu šarminėje terpėje bicinchonino rūgšties natrio druska (BCA-Na₂) sudaro violetinės spalvos kompleksinius junginius su Cu⁺ jonais. Pastarieji susidaro Biureto reakcijos metu baltymams sąveikaujant su Cu²⁺.

Baltymų kiekio matavimui į kiuvetę įpilta 5 μ l supernatanto, gauto lizuojant ląsteles, 45 μ l RIPA buferio ir 950 μ l BCA reagento (50 dalių bicinchonino rūgšties tirpalo ir 1 dalis 4 % CuSO₄ $\times$ 5H₂O). Mišinys inkubuotas 30 min 37 °C. Kiuvetės atvėsinus iki KT, spektrofotometru

Perkin Elmer λ 20 matuota 562 nm sugertis. Baltymo kiekis nustatytas pagal kalibracinę kreivę, gautą naudojant 100-900 $\mu\text{g/ml}$ BSA tirpalą. Atlikta pagal (Smith *et al.*, 1985).

2.19. Baltymų tarpusavio sąveikų tinklas

Baltymų tarpusavio sąveikų tinklui (PPI) (angl. *Protein-protein interaction network*) sudaryti naudojome informaciją iš kuruojamų duomenų bazių: IntAct (Orchard *et al.*, 2014), IMEx (Orchard *et al.*, 2012), UniProt ("UniProt: a worldwide hub of protein knowledge," 2019) and MIN (Licata *et al.*, 2012). PPI tinklą sudarėme naudodami informaciją iš visų keturių duomenų bazių, atrinkus žmogaus baltymus. Į tinklą įtraukti tik baltymai, kurių raiška keratinocituose nustatyta eksperimentiškai (Thul & Lindskog, 2018). Tinklo vizualizavimui ir analizei naudota „CytoScape“ programa ir jos įskiepis „NetworkAnalyzer“ (Shannon *et al.*, 2003). Tinklo elementų įtaką tinklui vertinome remdamiesi dviem parametrais: tarpusavio centriškumu (angl. *betweenness centrality*) ir vidutinio to elemento jungčių skaičiumi su likusiais tinklo elementais.

2.20. Statistinė analizė

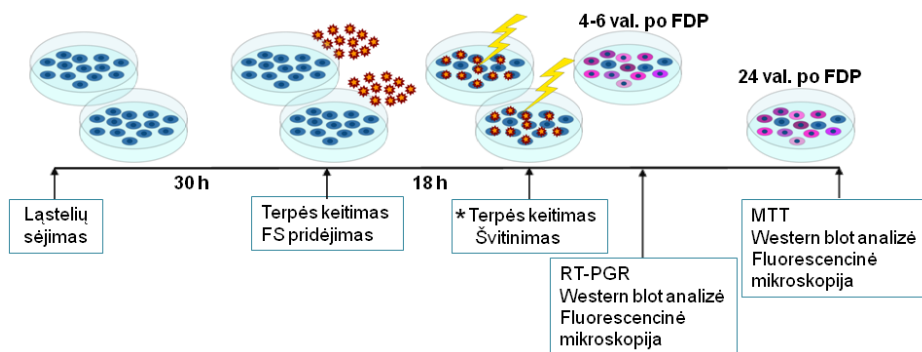
Duomenų analizei ir pateikimui naudojome R i386 3.6.3 ir SigmaPlot 11 programas.

Citotoksiškumo analizei buvo naudota tiesinė regresinė analizė siekiant įvertinti ryšį tarp CtD ir šviesos dozės. β -N-acetilgliukozaminidazės ir kaspazės 3 aktyvumo vertinimui naudojome neporinį Stjudento t testą. HEKa ląstelių apoptozės ir diferenciacijos vertinimui kintamieji buvo pateikti procentais. Chi kvadrato (χ^2) testai buvo atlikti siekiant įvertinti skirtumą tarp K10^{low} ir K10^{high} ląstelių grupių. Norint įvertinti FD poveikį K10 fluorescencijos pokyčiams, buvo apskaičiuotas šansų santykis (OR, angl. *Odds Ratio*). Duomenys statistškai reikšmingi, kai $p < 0,05$.

3. REZULTATAI

Šiame darbe tyrėme, kaip skiriasi pirminių keratinocitų ir vėžinių epidermoidinės karcinomos ląstelių atsakas į FD poveikį, sukeltą skirtingos viduląstelinės lokalizacijos fotosensibilizatorių. Fotosensibilizatorių kaupimosi vieta ląstelėse priklauso nuo jų lipofiliškumo/hidrofiliškumo ir krūvio (žr. sk. 1.6.2). Vertinome pirminių epidermio keratinocitų HEKa ir epidermoidinės karcinomos ląstelių A-431 atsaką į FD poveikį, sukeltą naudojant fotosensibilizatorius, kurie kaupiami įvairiose ląstelės membranose – mTHPC, lizosomų membranose – AlPcS_{2a} bei lizosomų liumene – AlPcS₄. Kadangi lizosomos yra ypatingai svarbios ląstelių žūties signalo perdavimui ir keratinocitų diferenciacijai, lyginome lizosomų membranose ir liumene savitai kaupiamų fotosensibilizatorių poveikį ląstelėms.

Klinikoje naudojamo mTHPC sukeltas FD poveikis vėžinėms ląstelėms yra gana plačiai ištirtas, todėl siekėme nustatyti, kokį atsaką mTHPC-FD poveikis sukelia pirminiuose keratinocituose. Vėžinių ląstelių fiziologija skiriasi nuo sveikų ląstelių, todėl sveikų ląstelių atsako į FD poveikį įvertinimas gali suteikti žinių, reikalingų klinikinės FD terapijos optimizavimui. Tyrimams naudojome iš vėžinio epidermio ląstelių išvestą vėžinę žmogaus epidermoidinės karcinomos ląstelių liniją A-431 ir pirminius suaugusio žmogaus epidermio keratinocitus HEKa. FD poveikis atliktas pagal 3.1 paveiksle pavaizduotą schemą.



3.1 pav. FD poveikio eksperimentų schema. Praėjus 30 val. nuo ląstelių išsėjimo, kultivavimo terpė keičiama terpe su 0,1 µg/ml mTHPC, 10 µg/ml AlPcS_{2a} ar 20 µg/ml AlPcS₄ ir ląstelės inkubuojamos 18 val. tamsoje. Po inkubacijos terpė su fotosensibilizatoriumi keičiama į terpę su priedais, atitinkamai HEKa arba A-431 ląstelėms. Ląstelės švitinamos ir laikomos CO₂ inkubatoriuje tamsoje. FS – fotosensibilizatorius. *AlPcS_{2a} atveju, praėjus 2 val., terpė buvo dar kartą pakeičiama.

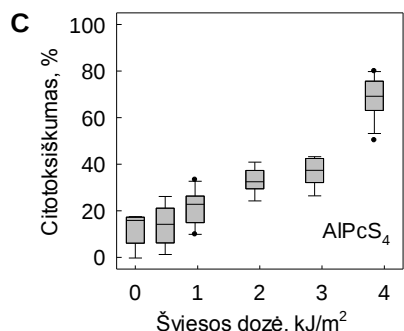
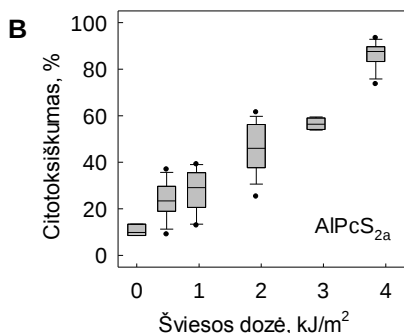
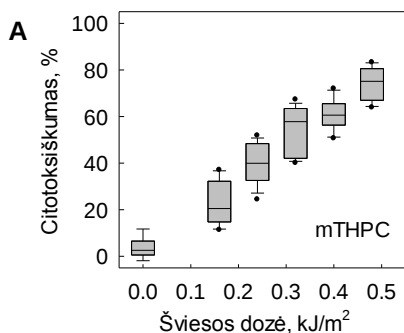
Fotodinaminio poveikio reikšmė pirminiams žmogaus epidermio keratinocitams HEKa

3.1. Fotodinaminio poveikio reikšmė HEKa ląstelių gyvybingumui

Šioje darbo dalyje tyrėme šviesos ir įvairiose ląstelės membranose lokalizuoto mTHPC bei savitai lizosomose kaupiamų ALPcS_{2a} ir ALPcS₄ citotoksiškumą pirminiams žmogaus epidermio keratinocitams.

FD poveikio sukeltas citotoksiškumas priklauso ir nuo fotosensibilizatoriaus koncentracijos, ir nuo šviesos dozės. Remiantis ankstesniais mūsų laboratorijos darbais, fotosensibilizatorių koncentracijos šiame darbe buvo naudojamos tokios, kurios ląsteles veikiant vienu fotosensibilizatoriumi nesukeltų ląstelėms toksiškumo. Citotoksiškumą ląstelėms sukėlėme naudodami skirtingas šviesos dozes. Dažnai susiduriama su problema, kad citotoksiškumas, kurį sukelia pasirinktos šviesos dozės, eksperimentų metu varijuoja. Ši problema apsunkina ir skirtingų citotoksinio poveikio lygių (pvz., CtD25, CtD50, CtD80) pasirinkimą tolimesniems eksperimentams. Jei citotoksiškumą skaičiuojame tik kaip taškinį įvertį, neįvertiname, kad naudojant pasirinktas skirtingo stiprumo dozes, citotoksiškumo vertės atliekant eilę eksperimentų gali persidengti. Skaičiuojant numatomo citotoksiškumo pasikliautinuosius intervalus galim įvertinti tikimybę, kad atsakas naudojant skirtingas dozes nepersidengs. Taigi, naudodami tiesinę regresinę analizę atsirinkome tris šviesos dozes, kurias taikant įvertintų citotoksiškumų 95 % pasikliautinieji intervalai nepersidengė.

FD poveikio sukeltą citotoksiškumą pirminiuose keratinocituose HEKa vertiname MTT metodu, praėjus 24 val. po švitinimo (3.2, A-C pav.). Apibrėžėme, kad CtD25 atitinka iki 25 % ląstelių gyvybingumo sumažėjimą, CtD50 – iki 50 % ir CtD80 – iki 80 %. Kaip jau minėjome, šviesos dozes, atitinkančias CtD25, CtD50 ir CtD80, parinkome taikant regresijos analizę, todėl buvo galima įvertinti reikalingas šviesos dozes ir jų 95 % pasikliautinuosius intervalus. Pasirinktų šviesos dozių citotoksiškumo 95 % pasikliautinieji intervalai nepersidengė (3.2, D-F pav.). Atsižvelgdami į šiuos duomenis, tolimesniems tyrimams su HEKa ląstelėmis naudojome pasirinktas šviesos dozes, atitinkančias CtD25, CtD50 ir CtD80.



D $CtD (mTHPC) = 1,89 + 152,4x; R^2 = 0,87$

CtD	Apskaičiuota šviesos dozė (kJ/m²)	Poveikio šviesos dozė (kJ/m²)	Numatomas citotoksiškumas (%)
25	0,15 (0,11-0,19)	0,16	26 (24-29)
50	0,31 (0,26-0,37)	0,32	51 (49-53)
80	0,51 (0,44-0,58)	0,48	75 (72-78)

E $CtD (AlPcS_{2a}) = 14,5 + 17,9x; R^2 = 0,91$

CtD	Apskaičiuota šviesos dozė (kJ/m²)	Poveikio šviesos dozė (kJ/m²)	Numatomas citotoksiškumas (%)
25	0,58 (0,34-0,87)	0,48	23 (20-26)
50	1,98 (1,63-2,40)	1,92	49 (47-51)
80	3,65 (3,17-4,24)	3,84	83 (80-87)

F $\ln (CtD(AlPcS_4)) = 2,77 + 0,37x; R^2 = 0,92$

CtD	Apskaičiuota šviesos dozė (kJ/m²)	Poveikio šviesos dozė (kJ/m²)	Numatomas citotoksiškumas (%)
25	1,21 (0,87-1,63)	0,96	23 (21-25)
50	3,09 (2,56-3,73)	2,88	47 (44-50)
80	4,36 (3,70-5,16)	3,84	66 (60-74)

3.2 pav. FD poveikio citotoksiškumas HEKa ląstelėms. mTHPC-FD (**A**) AlPcS_{2a}-FD (**B**) ir AlPcS₄-FD (**C**) poveikių citotoksiškumo priklausomybė nuo šviesos dozės nustatyta MTT metodu, praėjus 24 val. po švitinimo. mTHPC-FD (**D**), AlPcS_{2a}-FD (**E**) ir AlPcS₄-FD poveikio (**F**) apskaičiuota šviesos dozė ir pasirinkta šviesos dozė, kuri buvo naudota poveikiui sukelti. Pateiktas apskaičiuotų verčių vidurkis (95% PI). HEKa ląstelės inkubuotos 18 val. į auginimo terpę pridėjus 0,1 μg/ml mTHPC, 10 μg/ml AlPcS_{2a} ar 20 μg/ml AlPcS₄. Pakeitus terpę ląstelės švitintos dozėmis, kurios nurodytos paveikslų D–F lentelėje. CtD – citotoksinė dozė. Grafikuose: stačiakampio riba, artimiausia ordinačių ašies nulinei reikšmei, žymi 25-tą procentilį; stačiakampyje esanti linija žymi 50-tą procentilį (medianą); stačiakampio riba, tolimiausia ordinačių ašies nulinei reikšmei, žymi 75-tą procentilį; stačiakampio apatinis ir viršutinis brūkšniai žymi 10-tą ir 90-tą procentilius; juodi taškai – už duomenų aibės 10-to ir 90-to procentilių ribos esančios reikšmės.

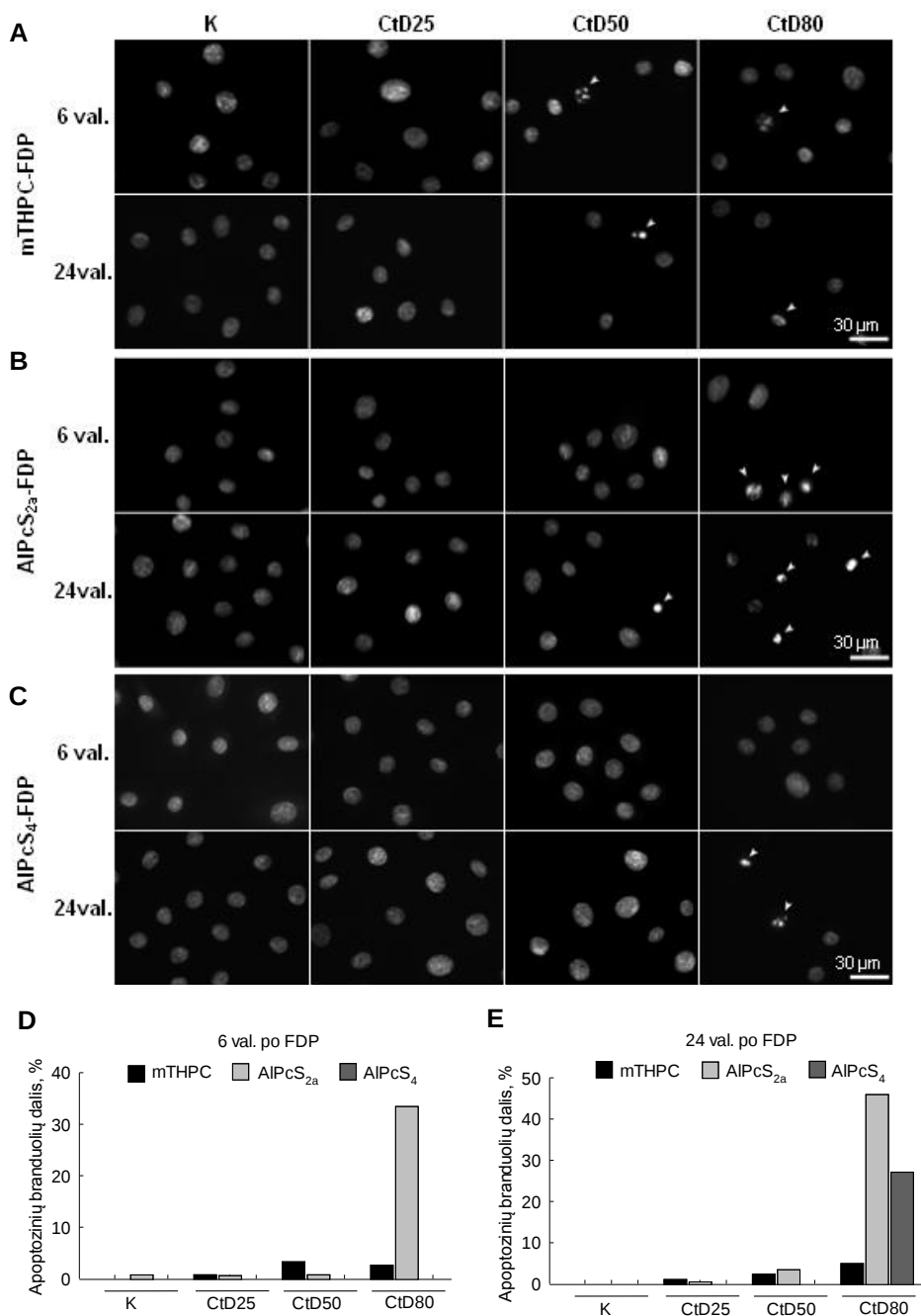
mTHPC-FD poveikis ląstelėms buvo daug stipresnis nei neigiamai įkrautų AlPcS_{2a} ir AlPcS_4 sukeltas FD poveikis. Ląstelių gyvybingumo mažėjimas buvo pasiektas esant mažesnėms mTHPC koncentracijoms ir žymiai mažesnėms švitinimo dozėms nei darbe naudotų aliuminio ftalocianinų atveju. Taigi, pirminių keratinocitų citotoksinis atsakas į neutralų lipofilinį mTHPC buvo stipresnis, o tarpusavyje lyginant aliuminio ftalocianinus, AlPcS_{2a} -FD poveikis buvo citotoksiškesnis nei AlPcS_4 sukeltas FD poveikis.

3.2. Fotodinaminio poveikio sukelta apoptozė HEKa ląstelėse

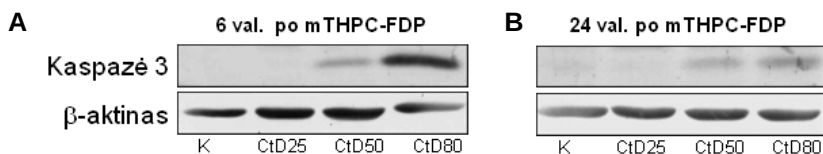
Pirmiausia vertinome apoptozę patyrusių ląstelių kiekį po FD poveikio HEKa ląstelėse. Apoptozinėmis laikėme ląsteles su apoptozei būdingais branduolių morfologijos pokyčiais: branduolio fragmentacija bei chromatinio kondensacija ir /arba branduolio kondensacija (Cummings & Schnellmann, 2004; Cummings *et al.*, 2012). Ląstelės, turinčios apoptozei būdingus branduolių morfologinius pokyčius, buvo skaičiuojamos praėjus 6 ir 24 val. po skirtingų FD poveikio dozių (3.3 pav. A-C).

Kontrolinėje ląstelių grupėje buvo pastebėta tik 0–0,5 %, o po mTHPC sukulto FD poveikio nustatėme iki 6 % apoptozinių branduolių (3.3 pav. A, D-E). Žinoma, kad mTHPC-FD poveikis sukelia gana stiprią apoptozę (Lange *et al.*, 2019; Sasnauskiene *et al.*, 2009) ir tai, kad mes aptikome tiek nedaug apoptozinių branduolių, paskatino mus papildomai ištirti kaspazės 3 raišką Western blot analizės metodu po šio poveikio. Nustatėme kaspazės 3 aktyvaciją keratinocituose po mTHPC sukulto FD poveikio (3.4 pav.). Manome, kad nedidelis apoptozinių branduolių skaičius buvo stebėtas todėl, kad po mTHPC-FD poveikio didelė dalis apoptozinių ląstelių atkilo nuo kultivavimo indo paviršiaus. Apoptozinius branduolius galėjome įvertinti tik ląstelėse, kurios liko prikibę prie kultivavimo indo paviršiaus.

Praėjus 24 val. po AlPcS_{2a} -FD poveikio, esant CtD50 nustatyta 5,3 % apoptozinių branduolių, o po 6 ir 24 val., esant CtD80 dozei aptikta dar daugiau apoptozinių branduolių, atitinkamai 35,9 % ir 46,4 % (3.3 pav. B, D-E). AlPcS_4 sukeltas FD poveikis apoptozei būdingus morfologinius pokyčius indukavo tik praėjus 24 val. po CtD80, tuo metu buvo nustatyta 23 % apoptozinių branduolių (3.3 pav. C, D-E). Aliuminio ftalocianinų poveikį galėjome palyginti tik praėjus 24 val. po FD poveikio esant CtD80, kai po AlPcS_4 -FD poveikio aptikome apoptozinių branduolių. Nustatėme, kad statistiškai reikšmingai daugiau apoptozinių ląstelių buvo po AlPcS_{2a} -FD nei AlPcS_4 -FD poveikio (OR = 2,3, $p = 0,006$).



3.3 pav. Apoptozei būdingi pokyčiai pirminių keratinocitų branduoliuose po FD poveikio. DAPI dažyti branduoliai praėjus 6 ir 24 val. po mTHPC-FD (A), AIPcS_{2a}-FD (B) ir AIPcS₄-FD poveikio (C). Apoptozinių branduolių procentinė dalis praėjus 6 (D) ir 24 val. (E) po FD poveikio. K – neveiktos kontrolinės ląstelės. CtD – citotoksinė dozė. Rodyklės nurodo branduolius su apoptozinėmis savybėmis. Skalės ilgis – 30 μ m.



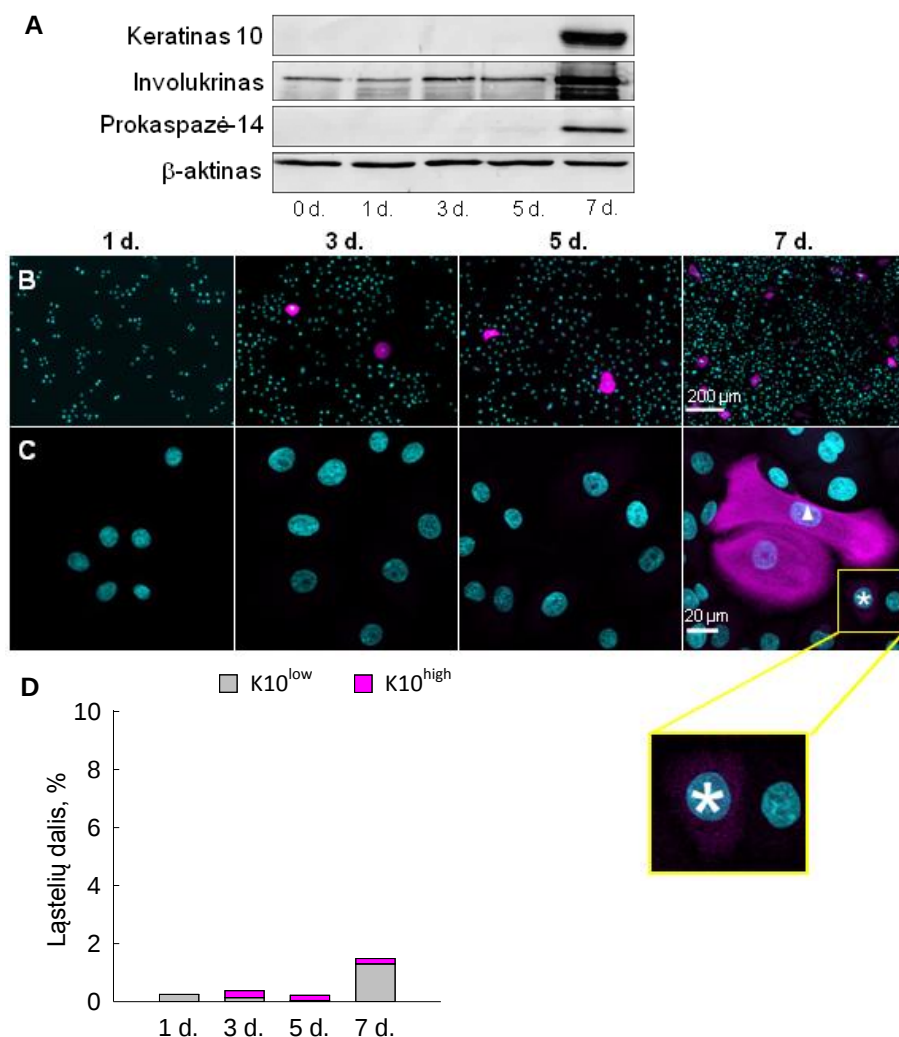
3.4 pav. Kaspazės 3 aktyvacija pirminiuose keratinocituose po mTHPC sukulto FD poveikio. Western blot analizė atlikta praėjus 6 (A) ir 24 val. (B) po mTHPC-FD poveikio. K – neveiktos kontrolinės ląstelės. CtD – citotoksinė dozė.

Taigi, nustatėme, kad visi tirti fotodinaminiai poveikiai sukėlė apoptozę HEKa ląstelėse. Lyginant aliumino ftalocianus tarpusavyje, ALPcS_{2a} sukeltas FD poveikis pirminiuose keratinocituose apoptozę indukavo stipriau nei ALPcS₄-FD poveikis.

3.3. Fotodinaminio poveikio įtaka epidermio diferenciacijos žymenų raiškai

FD poveikio įtaka epidermio diferenciacijai mažai tirta, todėl norėjome įvertinti kokią reikšmę turi mTHPC, ALPcS_{2a} ir ALPcS₄-FD poveikiai pirminių keratinocitų diferenciacijai. Diferenciacijai stebėti pasirinkome ankstyvosios keratinocitų diferenciacijos žymenis: keratiną 10 (K10), involukriną (IVL) ir prokaspazę-14 (CASP14). Žinoma, kad keratinocitų diferenciaciją galima indukuoti kultivuojant pirminius keratinocitus iki pilno monosluoksniu, tuomet kontaktai tarp ląstelių inicijuoja ląstelės ciklo stabdymą ir diferenciaciją (Kolly *et al.*, 2005; Poumay & Pittelkow, 1995). Taigi, pradžioje tyrėme 7 dienas kultivuotų HEKa ląstelių diferenciacijos žymenų raišką, kuomet ląstelių augimas priartėja prie pilno monosluoksniu.

Atlikus Western blot analizę, pirmiausia stebėjome CASP14 raišką 5 dienas augintuose keratinocituose, kuri suintensyvėjo 7-tą auginimo dieną. Be to, 7-tą dieną išaugo ir K10 kiekis. IVL sintezė keratinocituose buvo stebima jau nuo pirmos keratinocitų auginimo dienos, o 7-tą dieną – IVL raiška pastebimai padidėjo (3.5 pav. A). Fiziologiškai epidermyje IVL sintezė prasideda dygliuotajame sluoksnyje (arčiau granulinio sluoksniu), tačiau keratinocitų kultūroje *in vitro* IVL sintetinamas nuolat, jį galima aptikti ir pamatiniuose keratinocituose (Ishida-Yamamoto *et al.*, 1997; Watt *et al.*, 1987).

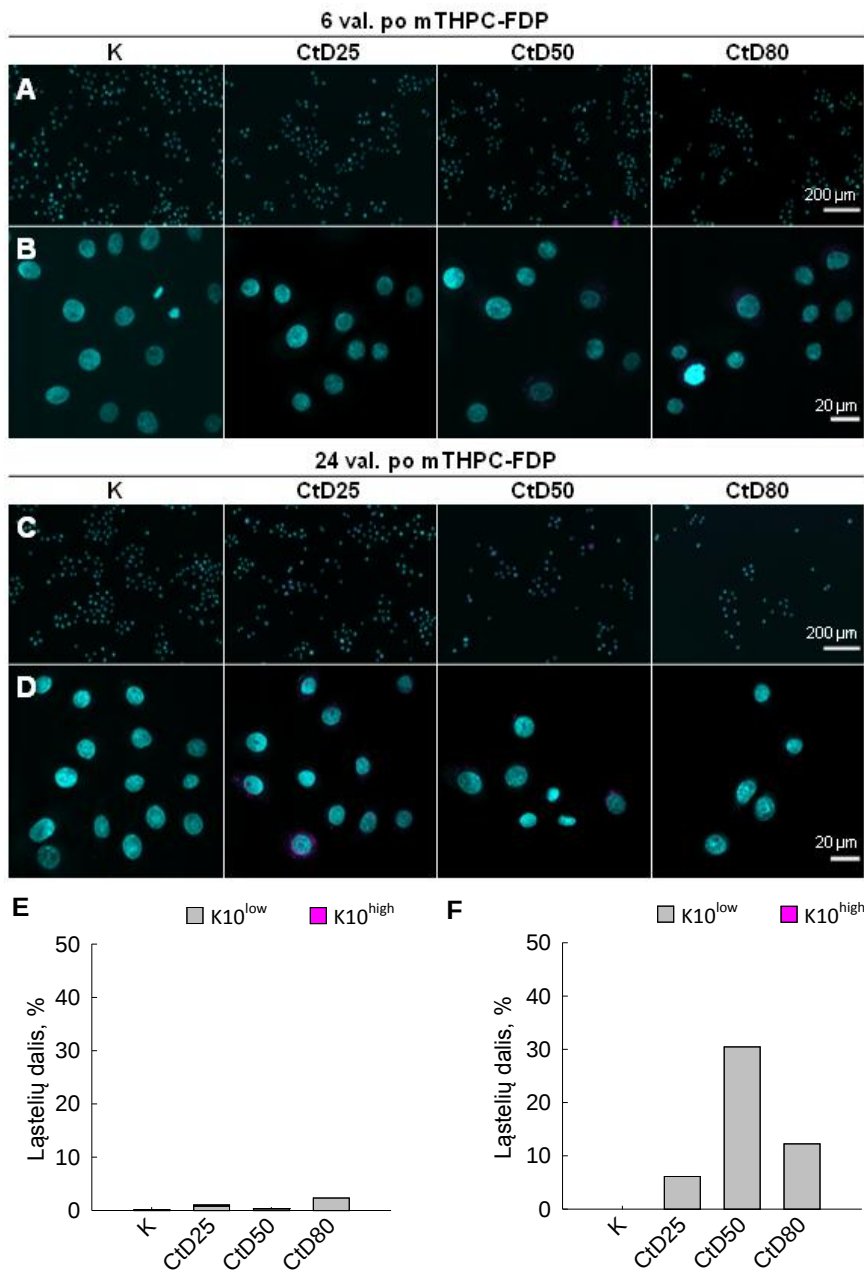


3.5 pav. Pirminių žmogaus epidermio keratinocitų diferenciacija kultūroje. Keratinocitų diferenciacijos žymenų – keratino 10 (K10), involukrino (IVL) ir prokaspazės-14 (CASP14) – raiška buvo įvertinta Western blot analize (**A**) arba imunofluorescencine mikroskopija (**B**, **C**) nurodytais laiko momentais po išsėjimo. Keratinocitų dalis su silpna (K10^{low}) ir stipria (K10^{high}) K10 fluorescencija buvo išreikšta procentais nuo bendro ląstelių skaičiaus (**D**). Branduoliai, žymėti DAPI – žalsvai mėlyna spalva, K10 imunofluorescencija – rožinė spalva. * žymi K10^{low}, ▲ žymi K10^{high} ląsteles. Norint vizualizuoti K10^{low} ir K10^{high} fluorescencijos intensyvumo ląsteles tame pačiame regėjimo lauke, pasirinktas gama faktorius, lygus 0,6.

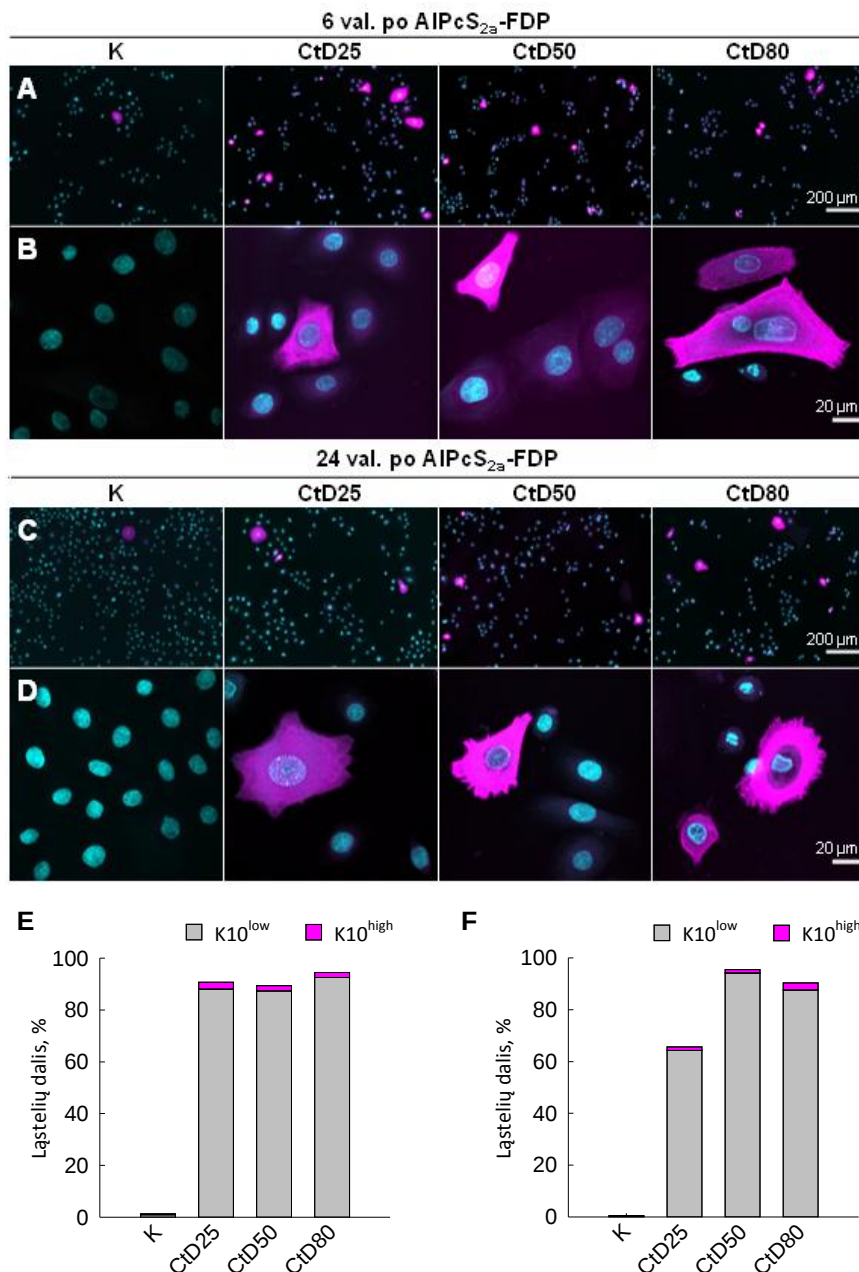
Įvertinę diferenciacijos žymenų raišką po HEKa auginimo monosluoksnyje, atlikome keratinocitų Western blot analizę po FD poveikio, tačiau šiuo metodu K10 raiškos nustatyti mums nepavyko. Kadangi, FD poveikis gali sukelti baltymų sąsiuvas (Pattison *et al.*, 2012; Wright *et al.*,

2003), manome, kad kaip tik jos ir trukdė aptikti K10 atliekant Western blot analizę. Todėl toliau K10 raišką tyrėme imunofluorescencinės mikroskopijos metodu. Imunofluorescencinė analizė atskleidė, kad monosluoksnyje 7 dienas kultivuotoje keratinocitų kultūroje yra tik maža dalis K10 ekspresuojančių ląstelių: 1-5-tą dienomis K10 turinčių ląstelių buvo 0,2–0,4 %, o 7-tą dieną – 1,5 % (3.5 pav. D). Tirdami K10 fluorescenciją pastebėjome, kad skirtingose to paties mėginio ląstelėse K10 fluorescencijos intensyvumo lygis svyravo nuo silpno (15 RFU) iki stipraus (> 2500 RFU). Atsižvelgdami į K10 fluorescencijos intensyvumą, keratinocitus suskirstėme į dvi grupes: ląstelės su silpna K10 fluorescencija ($K10^{low}$) ir ląstelės su stipria K10 fluorescencija ($K10^{high}$). Pirmiausia pagal K10 fluorescencijos intensyvumą suskirstėme keratinocitus mėginiuose, kuriuose juos auginome iki monosluoksniu 7 dienas. Nustatėme, kad šiuose mėginiuose $K10^{low}$ ląstelių buvo 1,3 %, o $K10^{high}$ – 0,2 % (3.5 pav. D). Kadangi, norėjome įvertinti FD poveikį keratinocitų diferenciacijai, atsaką į FD poveikį tyrėme 3 ar 4 dienas augintuose pirminiuose keratinocituose be savaiminės diferenciacijos požymių.

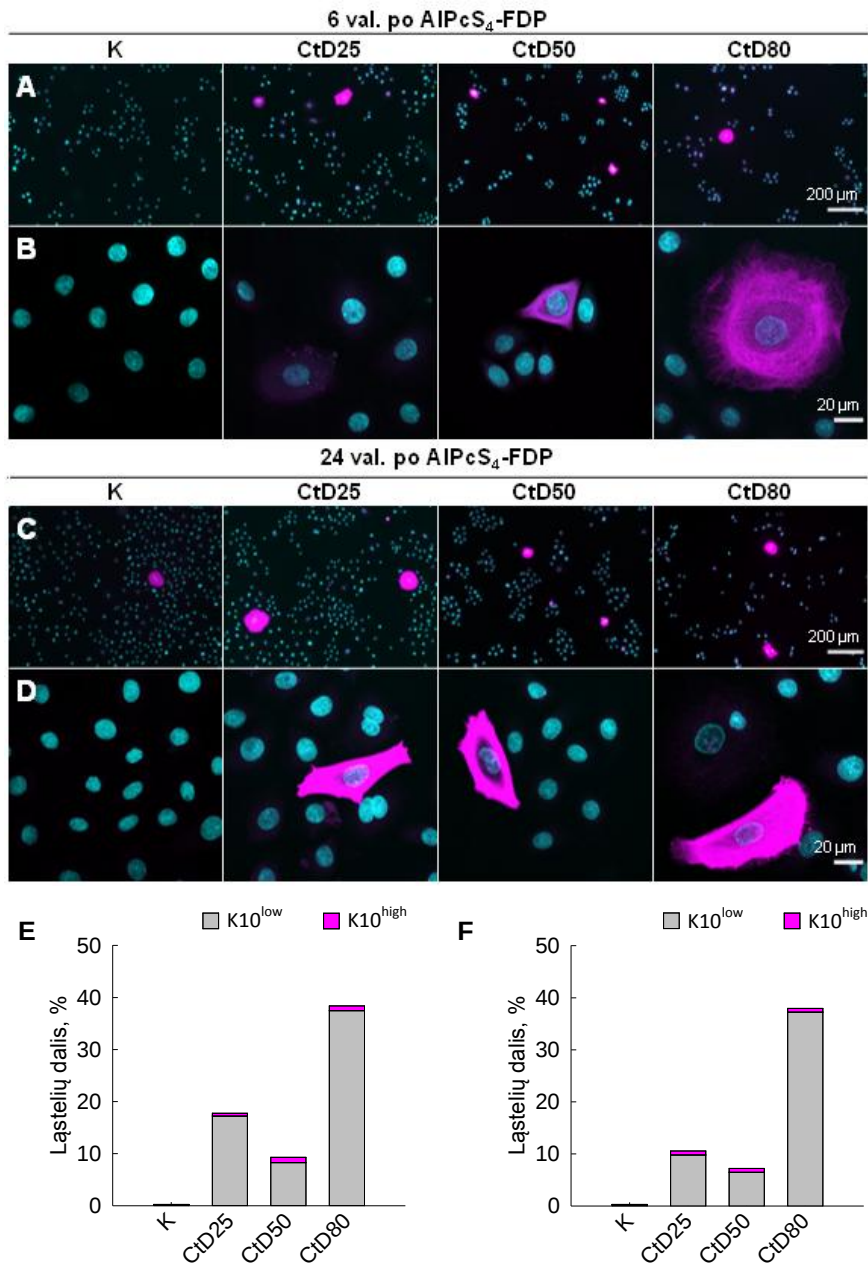
Imunofluorescencinės mikroskopijos nuotraukų analizė parodė, kad K10 raiška keratinocituose padidėjo po mTHPC-FD, $AlPcS_{2a}$ -FD ir $AlPcS_4$ -FD poveikių (3.6-3.8 pav. A-D). Atlikus statistinę duomenų analizę, nustatėme, kad po FD poveikio K10 raiška reikšmingai padidėjo lyginant su neveiktomis kontrolinėmis ląstelėmis ($p < 0,001$) (1 pr. 1 lentelė, eilutės Nr. 1, 4, 7, 10, 13, 16). Reikšmingo padidėjimo nebuvo nustatyta vieninteliu atveju – po mTHPC-FD poveikio esant CtD50 dozei, praėjus 6 val. po poveikio. K10 turinčių ląstelių reikšmingai padaugėjo lyginant skirtingas $AlPcS_{2a}$ -FD poveikio dozes: CtD80 su CtD25 ar CtD50 praėjus 6 val. po poveikio bei CtD50 su CtD25 ar CtD80 praėjus 24 val. po poveikio (1 pr. 1 lentelė, eilutė Nr. 6, 14). $AlPcS_4$ sukeltas FD poveikis reikšmingai padidino K10 turinčių ląstelių skaičių esant CtD80, lyginant su CtD25 ar CtD50, abiejuose laiko taškuose (1 pr. 1 lentelė, eilutė Nr. 7-9, 16-18).



3.6 pav. mTHPC-FD poveikis sukelia keratino 10 raišką pirminiuose žmogaus keratinocituose. K10 buvo stebėtas imunofluorescencinės mikroskopijos metodu, praėjus 6 (**A, B**) ir 24 (**C, D**) val. po FD poveikio. Keratinocitų dalis su silpna ($K10^{low}$) ir stipria ($K10^{high}$) K10 fluorescencija praėjus 6 (**E**) ir 24 (**F**) val. po mTHPC-FD poveikio buvo išreikšta procentais nuo bendro ląstelių skaičiaus. Skalės ilgis: A, C – 200 μm , B, D – 20 μm . K – neveiktos kontrolinės ląstelės. CtD – citotoksinė dozė. DAPI – žalsvai mėlyna spalva, keratino 10 imunofluorescencija – rožinė spalva. Norint vizualizuoti $K10^{low}$ ir $K10^{high}$ tame pačiame regėjimo lauke, pasirinktas gama faktorius, lygus 0,6.



3.7 pav. AIPcS_{2a} sukeltas FD poveikis stipriai indukuoja keratino 10 raišką pirminiuose žmogaus keratinocituose. K10 buvo stebėtas imunofluorescencinės mikroskopijos metodu, praėjus 6 (A, B) ir 24 (C, D) val. po FD poveikio. Keratinocitų dalis su silpna (K10^{low}) ir stipria (K10^{high}) K10 fluorescencija praėjus 6 (E) ir 24 (F) val. po AIPcS_{2a} sukulto FD poveikio buvo išreikšta procentais nuo bendro ląstelių skaičiaus. Skalės ilgis: A, C - 200 μ m, B, D - 20 μ m. K – neveiktos kontrolinės ląstelės. CtD – citotoksinė dozė. DAPI – žalsvai mėlyna spalva, keratino 10 imunofluorescencija – rožinė spalva. Norint vizualizuoti K10^{low} K10^{high} tame pačiame regėjimo lauke, pasirinktas gama faktorius, lygus 0,6.



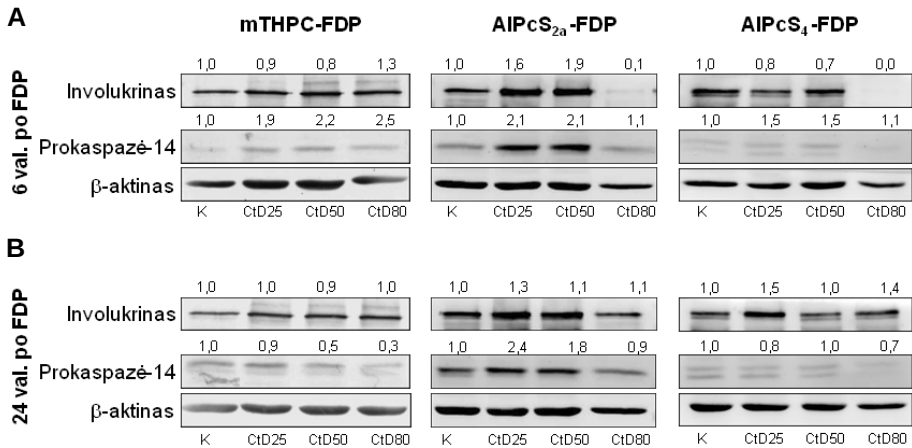
3.8 pav. AIPcS₄-FD poveikis indukuoja keratino 10 raišką esant CtD80. Keratinas 10 (K10) buvo stebėtas imunofluorescencinės mikroskopijos metodu, praėjus 6 (**A, B**) ir 24 (**C, D**) val. po FD poveikio. Keratinocitų dalis su silpna (K10^{low}) ir stipria (K10^{high}) K10 fluorescencija praėjus 6 (**E**) ir 24 (**F**) val. po AIPcS₄ sukkelto FD poveikio buvo išreikšta procentais nuo bendro ląstelių skaičiaus. Skalės ilgis: A, C - 200 μ m, B, D - 20 μ m. K – neveiktos kontrolinės ląstelės. CtD – citotoksinė dozė. DAPI – žalsvai mėlyna spalva, keratino 10 imunofluorescencija – rožinė spalva. Norint vizualizuoti K10^{low} K10^{high} tame pačiame regėjimo lauke, pasirinktas gama faktorius, lygus 0,6.

Lyginant tas pačias skirtingai lokalizuotų fotosensibilizatorių citotoksiškumo dozes, po AlPcS_{2a} sukulto FD poveikio nustatėme daugiausiai K10 turinčių ląstelių ($p < 0,001$) (1 pr. 2 lentelė). K10 raiška po lizosomų liumeno pažaidas sukeliančio AlPcS_4 -FD poveikio buvo reikšmingai didesnė, lyginant su ląstelių membranas pažeidžiančiu mTHPC-FD poveikiu ($p < 0,0001$) (1 pr. 2 lentelė), išskyrus CtD50 praėjus 24 val. po švitinimo (1 pr. 2 lentelė, eilutė Nr. 9).

K10 turinčius keratinocitus suskirstėme į K10^{low} ir K10^{high} grupes, kurias lyginome tarpusavyje po vienodų citotoksinių dozių, sukeltų ląsteles veikiant skirtingais fotosensibilizatoriais praėjus 6 ir 24 val. po FD poveikio. Nustatėme, kad K10^{low} ir K10^{high} keratinocitų dažnis statistškai patikimai skiriasi ląsteles veikiant CtD25 ir CtD50 dozėmis ($p < 0,001$) (1 pr. 3 lentelė, 1, 2, 4 ir 5 eilutės). Po bet kurio iš naudotų FD poveikių K10^{high} ląstelių yra nedaug, lyginant su K10^{low} ląstelėmis. Mažiausiai K10^{high} ląstelių buvo aptikta po mTHPC-FD poveikio praėjus 6 val. po švitinimo, o praėjus 24 val. po šio poveikio – K10^{high} ląstelių visai neaptikome (3.6 pav. E-F). Nors praėjus 6 val. po poveikio mTHPC ląstelių su K10 raiška skaičius padidėjo reikšmingai, tačiau po skirtingų dozių apskaičiavome, kad K10^{low} ląstelių buvo mažiau nei 3 %, o K10^{high} ląstelių – mažiau nei 0,2 %. Skirtingai nei mTHPC, abu lizosomomose kaupiami fotosensibilizatoriai efektyviau sukėlė K10 raišką, o lyginant tarpusavyje, AlPcS_{2a} sukeltas FD poveikis buvo žymiai efektyvesnis nei AlPcS_4 -FD poveikis abiem laiko momentais ($p < 0,001$, 1 pr. 4 lentelė). Lyginant visus naudojamus fotosensibilizatorius, AlPcS_{2a} sukeltas FD poveikis efektyviausiai indukavo K10 raišką.

Diferenciacijos žymenų IVL ir CASP14 raišką tyrėme atlikdami Western blot analizę (3.9 pav.). Kiekybiškai įvertinus IVL kiekį praėjus 6 val. po AlPcS_{2a} -FD poveikio nustatyta, kad lyginant su kontrole, šio baltymo padaugėjo daugiau nei 1,5 karto CtD25 (1,6 karto) ir CtD50 (1,9 karto) dozėmis veiktose ląstelėse (3.9 pav. A). IVL kiekis sumažėjo beveik iki nulio CtD80 veiktose ląstelėse naudojant abu aliuminio ftalocianinus. IVL yra struktūrinis keratinocitų raginio apvalkalo baltymas, kuris keratinocitų ragėjimo metu yra sujungiamas su kitais struktūriniais baltymais, tokiais kaip periplakinas, envoplakinas ir kt. FD poveikio inicijuotos keratinocitų diferenciacijos metu IVL galėjo būti sujungtas su kitais keratinocitų struktūriniais baltymais, be to, pats FD poveikis lemia baltymų sąsiuvas. Manome, kad dėl šių sąsiuvų IVL ir kitų baltymų kompleksai negalėjo efektyviai išsifracionuoti vykdant elektroforezę. CASP14 raiškos padidėjimas buvo stebėtas po visų mTHPC-FD poveikio dozių praėjus 6 val. po švitinimo (CtD25: 1,9 karto, CtD50: 2,2 ir CtD80:

2,5 karto) (3.9 pav. A). Abu aliuminio ftalocianinai sukėlė CASP14 padidėjimą CtD50 ir CtD80 dozėmis veiktuose keratinocituose, praėjus 6 val. po švitinimo: 2,1 karto po AlPcS_{2a}-FD poveikio ir 1,5 karto po AlPcS₄-FD poveikio. Praėjus 24 val. po poveikio, CASP14 padidėjimas išliko tik keratinocituose, veiktuose CtD25 ir CtD50 AlPcS_{2a}-FD poveikio dozėmis, atitinkamai 2,4 ir 1,8 karto (3.9 pav. B). Lyginant visus naudotus fotosensibilizatorius, AlPcS_{2a} sukeltas FD poveikis efektyviausiai indukavo IVL ir CASP14 raišką.

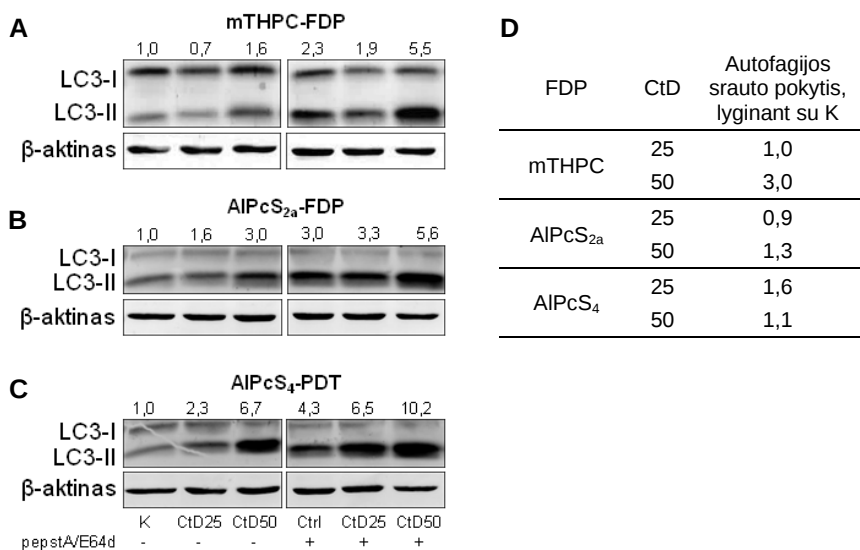


3.9 pav. Involukrino (IVL) ir prokaspazės-14 (CASP14) raiškos pokyčiai pirminiuose keratinocituose po mTHPC, AlPcS_{2a} ir AlPcS₄ sukulto FD poveikio. IVL ir CASP14 raiška buvo vertinta atlikus Western blot analizę praėjus 6 (A) ir 24 (B) val. po FD poveikio. Skaičiai virš baltymo juostelių nurodo juostelės integruoto tankio vertes normalizuotas β-aktinui, kurios pateikiamos kaip santykinis kiekis, lyginant su kontrole. K – neveiktos kontrolinės ląstelės. CtD – citotoksinė dozė.

3.4. Fotodinaminio poveikio reikšmė HEKa ląstelių autofagijai

Atlikti tyrimai rodo, kad autofagija yra inicijuojama kaip atsakas į FD poveikį vėžinėse ląstelėse (Lange *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2020). FD poveikio įtaką autofagijai vertiname pagal susidariusio LC3-II baltymo kiekį. Autofagijos metu citozolinis LC3-I virsta membraniniu, su fosfatidiletanolaminu konjuguotu LC3-II. Paskutinėse autofagijos stadijose autofagosomos susilieja su lizosomomis, o autofagolizosomų turinį skaido lizosomų hidrolazės (Yoshii & Mizushima, 2017).

Western blot analizė parodė, kad mTHPC-FD, AlPcS_{2a}-FD ir AlPcS₄-FD poveikiai lemia LC3-II baltymo formos kiekio didėjimą praėjus 24 val. po švitinimo (3.10 pav. A-C).



3.10 pav. Autofagija keratinocituose po FD poveikio. LC3 baltymo Western blot analizė praėjus 24 val. po mTHPC-FD (**A**), AIPcS_{2a}-FD (**B**) ir AIPcS₄-FD (**C**) poveikių. Autofagijos srauto įvertinimui buvo naudojami lizosomų peptidazių slopikliai E64d (10 mg/ml) ir pepstatinas A (10 mg/ml). LC3-II baltymo kiekis normalizuotas pagal β-aktiną, o skaičiai virš baltymo juostelių nurodo santykinį kiekį, lyginant su kontrole. Autofagijos srautas po FD poveikio buvo nustatytas kaip skirtumas tarp LC3-II kiekio su lizosomų peptidazių slopikliais ir be jų (**D**). K – neveiktos kontrolinės ląstelės. CtD – citotoksinė dozė.

Kaip buvo minėta anksčiau, LC3-II susikaupimas gali būti sukeltas intensyvesnio autofagosomų susidarymo arba sumažėjusio autofagosomų skaidymo. Naudojant peptidazių slopiklius, pepstatiną A ir E64d, blokuojančius autolizosomų turinio skaidymą, kiekybiškai vertinome autofagijos srautą. Autofagijos srautas buvo nustatytas po mTHPC sukkelto FD poveikio, esant CtD50 dozei – tai rodo padidėjus LC3-II kiekis po poveikio peptidazių slopikliais (3.10 pav. A, D). AIPcS₄-FD poveikis silpnai sukėlė autofagijos srautą CtD25 doze veiktuose keratinocituose, tuo tarpu po AIPcS_{2a}-FD poveikio autofaginio srauto nenustatėme. Apibendrinant galime pasakyti, kad mTHPC sukeltas FD poveikis efektyviausiai sukėlė autofagijos srautą keratinocituose.

3.5. Baltymų tarpusavio tinklo analizė

Šiame darbe tyrėme FD poveikio sukeltą HEKa ląstelių diferenciaciją, apoptozę ir autofagiją. Nustatėme, kad pirminiuose keratinocituose FD poveikio sukeltos pažaidos po lizosomose sukauptų AIPcS_{2a} ir AIPcS₄ FD poveikiai efektyviau sukėlė apoptozę ir diferenciaciją, lyginant su mTHPC

sukeltu FD poveikiu (3.3, 3.6-3.8 pav.). Tuo tarpu mTHPC-FD poveikis stipriausiai indukavo autofagijos srautą (3.10 pav.).

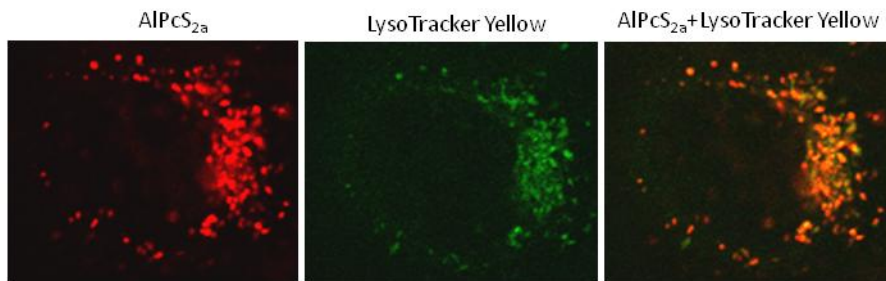
Siekėme ištirti su lizosomų pažeidimais susijusių veiksmų, apoptozinių efektorių, savitų keratinocitų diferenciacijos bei autofagijos veiksmų sąveiką baltymų lygmenyje. Pirmiausia, literatūroje atrinkome informaciją apie baltymus, kurie svarbūs minėtiems procesams. Tuomet, sudarėme autofagijai, diferenciacijai ir apoptozei svarbių baltymų sąrašą, į kurį įtraukėme efektorinės kaspazės, savitus lizosomų Ca^{2+} jutiklius, pažeidų atsako baltymus (*angl. damage response proteins*) ir baltymus, susijusius su autofagija (3 pr. 1 lentelė). Reikėtų pabrėžti, kad baltymų tarpusavio sąveikos gali būti tiesioginės ir netiesioginės (pvz. reguliacija per genų raišką, baltymų raiškos valdymas ir kt.). Pavieniui, nemaža dalis šių baltymų sąveikauja tiesiogiai vienas su kitu, todėl šiame darbe norėjome įdėmiau pažvelgti į baltymų tarpusavio sąveikų tinklą. Signalinių ir efektorinių baltymų bei jų veikimo sekų nustatymui, naudojome prieinamomis duomenų bazėmis ir sudarėme baltymų tarpusavio sąveikos (PPI) (*angl. protein-protein interactions*) tinklą (3.11 pav.). Daugumos mūsų analizuotų baltymų sąveikos nustatytos naudojant biocheminius metodus (pvz., Co-IP (*angl. Co-immunoprecipitation*), TAP (*angl. tandem affinity purification*) ar kitus). Tik nedidelė dalis sąveikų buvo užfiksuota naudojant didesnėmis klaidomis pasižyminčius metodus, pavyzdžiui, mielių dviejų hibridų sistemas.

Stebėjome daugybę K10 sąveikų su apoptozės molekulinio mechanizmo baltymais per efektorines kaspazes (pvz. K10 CASP7 per NEDD8); diferenciacijai būdingas kaspazes (K10-CASP14 per WTAP) ir autofagijos efektorius (tiesioginė K10 sąveika su GABARAP, GABARAPL1 / 2 ir LC3). Be to, kai kuriuos K10 sąveikos partnerius galima priskirti baltymams, dalyvaujantiems atsake į lizosomų pažeidimą. FD poveikio sukeltos lizosomų membranų ar liumeno pažeidimas gali būti detektuojamas per galektinus, nes jie yra į citozolį eksponuoti lizosominių glikanų jutikliai. Mūsų sudarytame tinkle galektinas-1, -3 ir -8 sudarė sąveikas su kitais lizosomų pažeidų mechanizmo baltymais, taip pat su keratinocitų diferenciacijai savita CASP14. Ši analizė parodė, kad K10 apjungia visus tris tirtus ląstelių atsakus: keratinocitų diferenciaciją, apoptozę ir autofagiją.

Fotodinaminio poveikio reikšmė žmogaus epidermoidinės karcinomos ląstelėms A-431

3.6. Fotodinaminio poveikio reikšmė A-431 ląstelių gyvybingumui

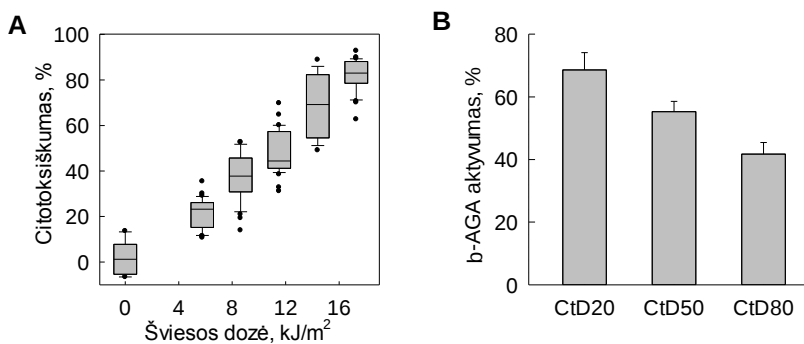
Šiame darbe tyrėme lizosomų membranose kaupiamo AlPcS_{2a}-FD poveikį žmogaus epidermoidinės karcinomos ląstelėms A-431. Ląstelių atsaką į AlPcS_{2a}-FD poveikį lyginome su lizosomų liumene lokalizuoto AlPcS₄ bei membraninėse ląstelių struktūrose lokalizuoto mTHPC sukeltu FD poveikiu, kuris yra aprašytas mūsų laboratorijos darbuose (Dabkevičienė, 2010; Sasnauskienė, 2011). Pirmiausia, įvertinome AlPcS_{2a} kaupimąsi A-431 ląstelėse. Šio fotosensibilizatoriaus lokalizacija A-431 ląstelėse sutapo su lizosomų žymens LysoTracker Yellow-HCK-123 lokalizacija (3.12 pav.), taip pat kaip ir lizosomų liumene kaupiamo AlPcS₄ atveju (Sasnauskienė, 2011).



3.12 pav. AlPcS_{2a} lokalizacija A-431 ląstelėse. AlPcS_{2a} ir lizosomų žymens LysoTracker Yellow-HCK-123 būdinga fluorescencija. Ląstelės 18 val. inkubuotos su 10 µg/ml AlPcS_{2a} ir 1 val. su 75 nm LysoTracker Yellow-HCK-123. AlPcS_{2a} – raudona spalva, lizosomų žymuo LysoTracker Yellow-HCK-123 – žalia spalva, kolokalizacija – geltona /oranžinė spalva.

Tolimesniems tyrimams FD poveikiai buvo atliekami pagal tyrimo schemą pateiktą 2.1 paveiksle. Pirmiausia, įvertinome kokį citotoksiškumą A-431 ląstelėms sukelia FD poveikis naudojant lizosomų membranose sukauptą AlPcS_{2a}.

Nustatėme, kad AlPcS_{2a} veiksmingai mažino A-431 ląstelių gyvybingumą, kurį vertinome MTT metodu, praėjus 24 val. po švitinimo (3.13 pav. A). Švitinant ląsteles 4 min. ląstelių gyvybingumo mažėjimas buvo 22 %, 8 min. – 48 %, o 12 min. – 82 %. Apibrėžėme, kad citotoksiškumas (CtD), kai žūsta 20 % ląstelių – CtD20 atitinka ląstelių švitinimą 4 min., CtD50 – 8 min. ir CtD80 – 12 min.



3.13 pav. Pokyčiai A-431 ląstelėse po AlPcS_{2a} sukulto FD poveikio. (A) AlPcS_{2a} sukulto FD poveikio citotoksiškumo priklausomybė nuo šviesos dozės nustatyta MTT metodu, praėjus 24 val. po švitinimo. A-431 ląstelės inkubuotos 18 val. į auginimo terpę pridėjus 10 µg/ml AlPcS_{2a}. Grafike A: stačiakampio riba, artimiausia ordinačių ašies nulinei reikšmei, žymi 25-tą procentilį; stačiakampyje esanti linija žymi 50-tą procentilį (medianą); stačiakampio riba, tolimiausia ordinačių ašies nulinei reikšmei, žymi 75-tą procentilį; stačiakampio apatinis ir viršutinis brūkšniai žymi 10-tą ir 90-tą procentilius; juodi taškai – už duomenų aibės 10-to ir 90-to procentilių ribos esančios reikšmės. **(B)** N-acetil-β-gliukozaminidazės (β-AGA) aktyvumas po AlPcS_{2a}-FD poveikio. Fermento aktyvumas matuotas iš karto po švitinimo. CtD – citotoksinė dozė.

Tuo tarpu, AlPcS₄-FD poveikio atveju, mažesnės švitinimo dozės sukėlė tą patį citotoksiškumą: 3 min. – 26 %, 4 min. – 53 %, o 6 min. – 81 % (Sasnauskienė, 2011). mTHPC-FD poveikio citotoksiškumas tirtas ankstesniuose laboratorijos darbuose, todėl pasiekti tolesniems eksperimentams reikalingas CtD25, CtD50 ir CtD80 dozės, A-431 ląstelės švitinome 0,5, 1 ir 1,5 min. (Dabkevičienė, 2010; Sasnauskienė *et al.*, 2009).

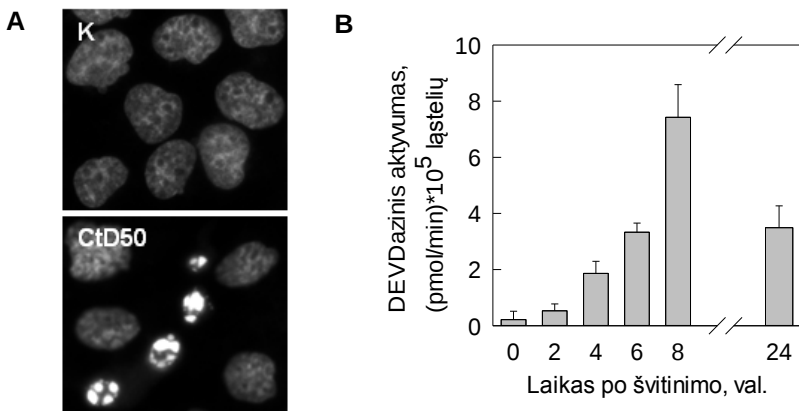
Kadangi šiame darbe tyrėme AlPcS_{2a}-FD poveikį, pažeidžiantį lizosomų membranas, iš karto po poveikio vertinome lizosomoms savito fermento β-N-acetilgliukozaminidazės (β-AGA) aktyvumą, kuris atspindi pirmines FD poveikio sukeltas pažaidas. Fermento aktyvumą nustatėme pagal β-AGA katalizuojamą *p*-nitrofenolio nuskėlimą nuo *p*-nitrofenilo-N-acetilo-β-gliukozaminido.

Fermento aktyvumą lyginome su pokyčiais po AlPcS₄-FD poveikio, kuris buvo nustatytas ankstesniame darbe (Sasnauskienė, 2011). AlPcS_{2a}-FD poveikis reikšmingai ($p < 0,001$) sumažino β-AGA aktyvumą: CtD20 dozė beveik 30 %, CtD50 – 45 %, o CtD80 – 55 %. AlPcS₄-FD poveikis reikšmingai ($p < 0,001$) sumažino šio fermento aktyvumą veikiant CtD50 arba CtD80 dozėmis, atitinkamai 30 % ir beveik 50 % (Sasnauskienė, 2011). Lyginant aliuminio ftalocianinus, nustatėme, kad AlPcS_{2a} reikšmingai ($p < 0,05$) stipriau mažino fermento aktyvumą nei AlPcS₄ visose dozėse.

Gauti rezultatai rodo, kad AlPcS_{2a}-FD poveikis veiksmingai mažino A-431 ląstelių gyvybingumą. Taip pat AlPcS_{2a} sukeltas FD poveikis mažino β -AGA aktyvumą A-431 ląstelėse, atspindintį lizosomų pažaidas.

3.7. Fotodinaminio poveikio sukelta apoptozė A-431 ląstelėse

Apoptozė vyraujanti ląstelių žūtis po FD poveikio, todėl pirmiausia vertinome apoptozei būdingus požymius po AlPcS_{2a} ir lyginome su mTHPC, bei AlPcS₄ sukeltų FD poveikių. mTHPC ir AlPcS₄ sukelti FD poveikiai veiksmingai inicijuoja A-431 ląstelių apoptozę – vyksta apoptozei būdingi ląstelių morfologijos (ląstelės susitraukia), chromatinio pokyčiai (kondensuojasi ir fragmentuojasi chromatinas), ir padidėja kaspazė 3 būdingas DEVDazinis aktyvumas (Sasnauskienė, 2011). DEVDazinį aktyvumą naudojome vertinti apoptoziniam aktyvumui ląstelėse, kaip kaspazės 3 aktyvumo rodiklį.



3.14 pav. Apoptozei būdingi požymiai A-431 ląstelėse po AlPcS_{2a} sukulto FD poveikio. (A) Ląstelių branduolių morfologija. Praėjus 5 val. po FD poveikio, ląstelės inkubuotos su Hoechst 33342. Fluorescencija registruota mikroskopu Olympus AX70. **(B)** DEVDazinis aktyvumas po FD poveikio. K - neveiktos kontrolinės ląstelės. CtD - citotoksinė dozė.

Nustatėme, kad po lizosomų membranose kaupiamo AlPcS_{2a} sukulto FD poveikio vyko apoptozei būdingi ląstelių morfologijos ir chromatinio pokyčiai (3.14 pav. A) bei buvo aktyvuota kaspazė 3 (3.14 pav. B). AlPcS_{2a}-FD poveikiu veiktose A-431 ląstelėse kaspazės 3 aktyvumas buvo didesnis iki 5,5 karto lyginant su ankstesniame darbe (Sasnauskienė, 2011) nustatytu fermentiniu aktyvumu po lizosomų liumeno pažaidas sukeliančio AlPcS₄-FD poveikio visuose tirtuose laiko taškuose, tačiau statistiškai reikšmingas

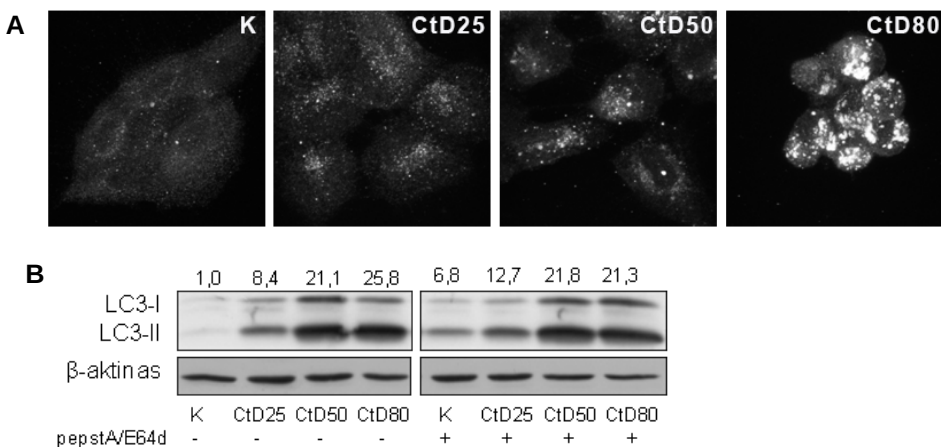
fermentinio aktyvumo padidėjimas buvo nustatytas tik 6 val. po švitinimo ($p < 0,05$).

Taigi, FD poveikis, sukeltas naudojant lizosomų membranose kaupiamą AlPcS_{2a}, veiksmingai inicijavo apoptozę A-431 ląstelėse.

3.8. Fotodinaminio poveikio reikšmė autofagijai A-431 ląstelėse

Kadangi lizosomos yra svarbios autofagijai, lizosomų membranų pažeidimas po FD poveikio gali sutrikdyti šį procesą. Tyrime kokią reikšmę AlPcS_{2a}-FD poveikis turi autofagijai A-431 ląstelėse.

Imunofluorescencinės mikroskopijos metodu nustatėme LC3 baltymo pasiskirstymą A-431 ląstelėse po AlPcS_{2a}-FD poveikio (3.15 pav. A). Mūsų naudotas antikūnas atpažįsta abi LC3 baltymo formas: LC3-I ir LC3-II. 3.15 A paveiksle matome po AlPcS_{2a} sukulto FD poveikio ląstelėse susikaupusį LC3 baltymą. Nuotraukose esančios ryškiai fluorescuojančios baltymo sankaupos, greičiausiai, atitinka baltymo LC3-II kaupimąsi autofaginėse membranose.



3.15 pav. Autofagija A-431 ląstelėse po AlPcS_{2a} sukulto FD poveikio. LC3 baltymo imunofluorescencinė (**A**) ir Western blot (**B**) analizė praėjus 24 val. po AlPcS_{2a}-FD poveikio. Autofagijos srautas buvo įvertintas naudojant lizosomų peptidazių slopiklius E64d (10 mg/ml) ir pepstatiną A (10 mg/ml). LC3-II baltymo kiekis normalizuotas pagal β-aktiną, o kiekybinės vertės pateikiamos kaip pokytis, lyginant su kontrole. Autofagijos srautas po FD poveikio buvo nustatytas kaip skirtumas tarp LC3-II kiekio su lizosomų peptidazių slopikliais ir be jų. K – neveiktos kontrolinės ląstelės. CtD – citotoksinė dozė.

Western blot analizė parodė, kad AlPcS_{2a} sukeltas FD poveikis lemia LC3-II baltymo formos kiekio didėjimą praėjus 24 val. po švitinimo

(3.15 pav. B). LC3-II kiekio didėjimas gali būti susijęs su gausesniu autofagosomų susidarymu arba su sumažėjusiu autofagosomų skaidymu. Todėl svarbu nustatyti ar vyksta autofagijos srautas, kuris atitinka LC3-II baltymo degradaciją lizosomose. Autofagijos srautas buvo nustatytas įvertinus LC3-II baltymo kiekį, pridėjus ir nepridėjus peptidazių slopiklių, pepstatino A ir E64d, kurie blokuoja autolizosomų turinio skaidymą.

A-431 ląstelėse pažeidus lizosomų membranas AlPcS_{2a}-FD poveikiu, stebėjome autofagosomų kiekio didėjimą (3.15 pav. A) bei LC3-II baltymo sankauptį susidarymą (3.15 pav. B). Ląstelėse, paveiktose peptidazių slopikliais, LC3-II baltymo nepadaugėjo, lyginant su ląstelėmis be slopiklių. Tai rodo, kad skaidymas lizosomose yra sutrikęs.

Anksčiau mūsų laboratorijoje nustatyta, kad mTHPC-FD poveikio (Sasnauskiene *et al.*, 2009) ir AlPcS₄-FD poveikio (Sasnauskienė, 2011) didina autofagosomų kiekį ląstelėse: lyginant su neveiktomis ląstelėmis, ląstelėse po FD poveikio padaugėjo LC3-II baltymo. Tačiau poveikis autofagijos srautui buvo skirtingas. Ląstelėse su peptidazių slopikliais, po mTHPC-FD poveikio CtD50 ir CtD80 dozių, LC3-II baltymo padaugėjo. Pažeidus lizosomų liumeną AlPcS₄-FD poveikiu, nedidelis autofagijos srautas vyksta esant tik silpniausiai poveikio dozei.

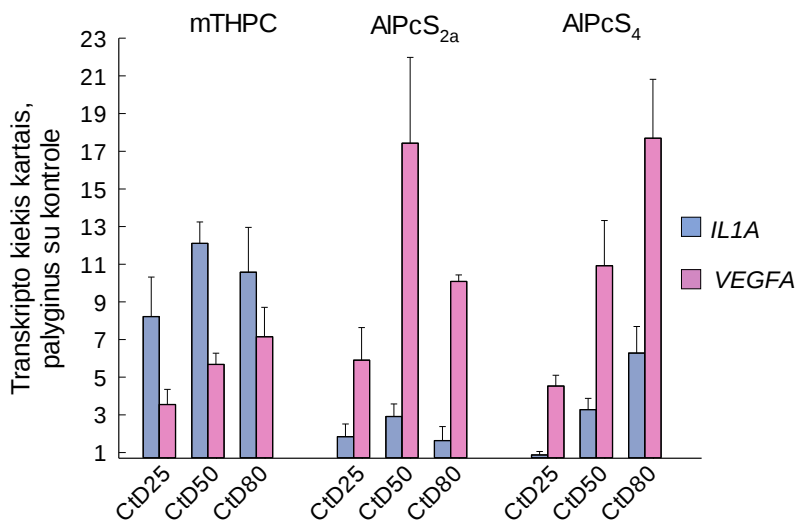
Atlikus eksperimentus bei lyginant juos su anksčiau mūsų laboratorijoje atliktais tyrimais, galime teigti, kad lizosomose sukaupti fotosensibilizatoriai didina autofagosomų kiekį, tačiau sutrikdo autofagijos srautą, tikėtina, kad FD poveikio pažeistos lizosomos neužtikrina vėlyvų autofagijos etapų.

3.9. Citokinų VEGF-A ir IL-1 α kiekio pokyčiai A-431 ląstelėse po fotodinaminio poveikio

VEGFA ir IL1A transkriptų kiekio pokyčiai po FD poveikio

FD poveikis sukelia oksidacinį stresą, kuris lemia citokinų raiškos pokyčius vėžinėse ląstelėse (Ferrario *et al.*, 2005; Gollnick *et al.*, 2003). Mūsų laboratorijoje tiriant mTHPC-FD poveikio sukeltus genų raiškos pokyčius, buvo nustatyta padidėjusi VEGFA ir IL1A genų raiška. Vertinome VEGF-A ir IL-1 α citokinus koduojančių transkriptų kiekius po FD poveikio. Jei transkriptų kiekio santykis ląstelėse po FD poveikio ir neveiktose kontrolinėse ląstelėse viršijo 2 kartus, skirtumas buvo laikomas reikšmingu. Šviesos poveikis arba neapšvitintų naudotų fotosensibilizatorių poveikis VEGFA ir IL1A transkriptų kiekiams A-431 ląstelėse nebuvo reikšmingas. Praėjus 4 val. po švitinimo, nustatyta tiriamų genų indukcija, todėl tolimesniems genų raiškos tyrimams buvo pasirinktas šis laikas. mTHPC-FD poveikis sukėlė reikšmingą VEGFA ir IL1A transkriptų kiekio padidėjimą

(Dabkevičienė, 2010). Šių citokinų transkriptų kiekiai taip pat padidėjo A-431 ląstelėse po savitai lizosomų liumene sukaupto AlPcS_4 sukulto FD poveikio (Sasnauskienė, 2011). Šiame darbe tyrėme, kokią reikšmę citokinų VEGF-A ir IL-1 α genų raiškai A-431 ląstelėse turi lizosomų membranose sukauptas AlPcS_{2a} ir lyginome su lizosomų liumene sukaupto AlPcS_4 bei ląstelių membraninėse struktūrose sukaupto mTHPC-FD poveikiu.



3.16 pav. VEGFA ir IL1A transkriptų pokyčių priklausomybė nuo poveikio stiprumo A-431 ląstelėse, praėjus 4 val. po AlPcS_{2a} . VEGFA ir IL1A transkriptų pokyčių priklausomybė A-431 ląstelėse, praėjus 4 val. po mTHPC (Dabkevičienė, 2010) ir AlPcS_4 (Sasnauskienė, 2011) sukulto FD poveikio, duomenys iš ankstesnių darbų. CtD – citotoksinė dozė.

Nustatėme, jog praėjus 4 val. po AlPcS_{2a} -FD poveikio, VEGFA transkripto kiekis A-431 ląstelėse padidėjo (3.16 pav.). Po mTHPC-FD poveikio VEGFA transkripto kiekis padidėja apie 3-7 kartus. Aliuminio ftalocianinai VEGFA raišką indukavo stipriau nei mTHPC. Daugiausiai VEGFA raiška išaugo po AlPcS_{2a} sukulto FD poveikio – iki 18 kartų. Priešingos tendencijos buvo stebėtos tiriant IL1A transkriptų pokyčius: po mTHPC sukulto FD poveikio šio citokino transkriptų kiekis išaugo iki 12 kartų, po AlPcS_4 – iki 6 kartų, o mažiausiai IL1A raiška padidėjo po AlPcS_{2a} – tik iki 3 kartų.

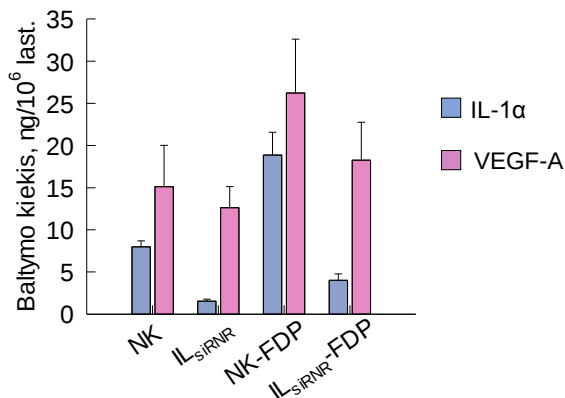
Reikia pabrėžti, kad tirdami VEGFA ir IL1A transkriptų kiekius pirminiuose keratinocituose po mTHPC, AlPcS_{2a} ir AlPcS_4 FD poveikių nustatėme, kad šių citokinų raiška nekito.

VEGF-A ir IL-1 α baltymų kiekis po mTHPC sukkelto fotodinaminio poveikio

Kaip jau buvo minėta literatūros apžvalgoje (1.8 sk.) prouždegiminiai citokinai yra stiprūs angiogenezės indukcijos ir palaikymo veiksniai. Vienas iš ypatingą reikšmę angiogenezei turinčių citokinų yra IL-1 α . Norėjome nustatyti ar IL-1 α stimuliuoja VEGF-A sekreciją. Kadangi, *IL1A* transkripto kiekis pirminiuose keratinociuose nekito po visų darbe naudotų fotosensibilizatorių, o labiausiai išaugo po mTHPC-FD poveikio A-431 ląstelėse, todėl IL-1 α įtaką *VEGFA* raiškai tyrėme A-431 ląstelėse po mTHPC-FD poveikio. Pirmiausia įsitikinome ar citokinų IL-1 α ir VEGF-A baltymo pokyčiai A-431 ląstelėse po mTHPC-FD poveikio atitinka nustatytą padidėjusią *IL1A* ir *VEGFA* raišką transkripto lygiu. Baltymo kiekiai ląstelėse ir jų kultivavimo terpėse buvo vertinti praėjus 6 ir 24 val. po švitinimo. Remiantis standartinėmis kreivėmis, žmogaus VEGF-A ir IL-1 α ELISA aptikimo ribos buvo, atitinkamai, 62 ir 8 pg/ml. Eksperimento pakartojimų variacijos koeficientai neviršijo 15 %. Atlikti baltymo raiškos tyrimai patvirtino gautus transkriptų tyrimo rezultatus: palyginti su neveiktomis kontrolinėmis ląstelėmis, FD poveikis sukėlė statistškai reikšmingą IL-1 α baltymo kiekio padidėjimą tiek ląstelių lizatuose CtD40 ($p = 0,012$) ir CtD70 ($p < 0,001$) dozėse, tiek ląstelių auginimo terpėje CtD40 ($p < 0,001$) ir CtD70 ($p < 0,001$) dozėse, praėjus 24 val. po FD poveikio. VEGF-A kiekis taip pat padidėjo ląstelių auginimo terpėje ir priklausė nuo dozės (CtD70 vs CtD40: $p = 0,002$ praėjus 6 val. po FD poveikio ir $p < 0,001$ praėjus 24 val. po FD poveikio). 24 val. po FD poveikio, ląstelių veiktų CtD70 VEGF-A koncentracijos padidėjimas terpėje buvo mažesnis nei ląstelių, veiktų CtD40 ($p < 0,001$). Priešingai nei ląstelių kultivavimo terpėje, ELISA metodu VEGF-A baltymo A-431 ląstelių lizatuose apčiuopti nepavyko (Dabkevičienė, 2010). Nustačius baltymų kiekį po mTHPC sukkelto FD poveikio, tolesnis mūsų uždavinys buvo nustatyti citokino IL-1 α svarbą VEGF-A baltymo raiškai, kurią tyrėme mažindami IL-1 α kiekį A-431 ląstelėse.

IL-1 α kiekį mažiname slopinami *IL1A* geno raišką mažomis interferuojančiomis RNR (siRNR). Ląsteles transfekavome trimis skirtingomis *IL1A* raišką slopinančiomis chemiškai susintetintomis siRNR: IL-siRNR₁₁₄₅, IL-siRNR₁₂₆₀ ir IL-siRNR₁₅₄₃. ELISA metodu vertinome IL-1 α baltymo raišką ląstelėse, transfekuotose *IL1A* slopinančiomis siRNR lyginant su ląstelėmis, veiktomis žmogaus genomo sekoms nesavita siRNR (NK). Ryškiausią baltymo kiekio sumažėjimą (apie 80 %) nustatėme

ląstelėse, transfekuotose IL-siRNR₁₁₄₅ ir ją naudojome tolesniems eksperimentams (3.17 pav.).



3.17 pav. *IL1A* slopinančios siRNR poveikis VEGF-A baltymo kiekiui A-431 ląstelių terpėje pokyčiui 24 val. po mTHPC-FD poveikio. NK – kontrolinės ląstelės veiktos *IL1A* neslopinančia siRNR, IL_{siRNR} – ląstelės veiktos *IL1A* slopinančia siRNR, NK-FDP – kontrolinės ląstelės veiktos *IL1A* neslopinančia siRNR po mTHPC-FD poveikio, IL_{siRNR}-FDP – kontrolinės ląstelės veiktos *IL1A* slopinančia siRNR po mTHPC-FD poveikio.

Nuslopinus *IL1A*, tyrėme baltymo IL-1α kiekį bei VEGF-A raiškos pokytį esant CtD40 po mTHPC-FD poveikio ląstelėse su sumažintu IL-1α kiekiu. VEGF-A raišką tyrėme praėjus 24 val. po FD poveikio (3.17 pav). Nustatėme, kad ląstelėse su sumažintu IL-1α kiekiu VEGF-A baltymo sekrecija sumažėjo A-431 ląstelėse tiek neveiktose, tiek ir veiktose mTHPC sukeltu FD poveikiu. Statistiškai reikšmingai VEGF-A baltymo sekrecija sumažėjo tik ląstelėse po FD poveikio ($p = 0,01$) (3.17 pav.).

Apibendrinami tyrimų rezultatus galime pasakyti, kad mTHPC sukeltas FD poveikis stimuliuoja VEGF-A ir IL-1α gamybą A-431 ląstelėse, o IL-1α yra vienas veiksnių, skatinančių VEGF-A raišką.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

4.1. Pirminių žmogaus epidermio keratinocitų atsakas į fotodinaminį poveikį

Šiame darbe siekėme įvertinti žmogaus pirminių keratinocitų HEKa ir epidermoidinės karcinomos A-431 ląstelių atsaką į FD poveikį, sukeltą skirtingos viduląstelinės lokalizacijos fotosensibilizatorių: įvairiose ląstelės membranose pasiskirstančio mTHPC ir lizosomose besikaupiančių ALPcS_{2a} ir ALPcS₄. FD poveikiu yra pagrįsta FD terapija – veiksmingas ląstelių naikinimo būdas, taikomas gydyti vėžį ir kai kurias kitas ligas, kylančias dėl pagreitetų ląstelių proliferacijos. Be to, kad FD poveikis yra vėžinių ląstelių naikinimo būdas, tai yra ir priemonė, kuri leidžia tirti ląstelių žūties kelius (Kessel, 2019a). FD poveikio metu biologinėse sistemose susidarę ROS reaguoja su įvairiomis biomolekulėmis, kurių oksidacinės pažeistos trikdo daugelio fiziologinių procesų eigą sustiprindamos uždegimines reakcijas, kurios keičia ląstelių augimą, diferenciaciją, proliferaciją ir žūtį. Šiame darbe tyrėme FD poveikio sukeltą oksidacinio streso skirtingose ląstelės organelėse inicijuojamus ląstelių žūties vyksmus pirminiuose žmogaus epidermio keratinocituose HEKa ir vėžinėse epidermoidinės karcinomos A-431 ląstelėse.

Vėžinių ląstelių fiziologija skiriasi nuo sveikų organizmo ląstelių. Vėžinių ląstelių mutacijos lemia greitesnę dalijimąsi, greitesnę medžiagų apykaitą, taip pat vėžinės ląstelės dažnai nebereaguoja į daugelį signalų, reguliuojančių ląstelių proliferaciją ir žūtį, įgyja skirtingą formą nei sveikos ląstelės ir kt. (Fouad & Aanei, 2017). Nepaisant nustatyto fotosensibilizatorių atrankumo vėžinėms ląstelėms (Kwiatkowski *et al.*, 2018), klinikoje taikant FD terapiją dažnai pažeidžiamos ir aplink naviką esančios sveikos ląstelės (van Straten *et al.*, 2017). FD terapijos metu dažniausiai apšviečiamas ne tik navikas, bet didesnis audinio plotas aplink naviką, kuriame gali būti išplitusių mikroskopinių naviko židinių, todėl dažnai būna pažeidžiamas ir sveikas audinys (de Visscher *et al.*, 2013). Sveikų ląstelių atsakas į FD poveikį yra mažai ištirtas, o jo apibūdinimas galėtų padėti pagerinti klinikinę FD terapiją ir įvertinti galimus šalutinius efektus.

mTHPC – klinikoje naudojamas fotosensibilizatorius, kaupiamas įvairiose ląstelių membranose (Marchal *et al.*, 2007; Sasnauskiene *et al.*, 2009; Teiten *et al.*, 2003), kurio poveikis vėžinėms ląstelėms gana gerai ištirtas, o kokį atsaką mTHPC-FD poveikis sukelia sveikose ląstelėse, yra mažai žinoma. ALPcS_{2a} – lizosomų membranose (Berg & Moan, 1994;

Hogset *et al.*, 2004), o AlPcS_4 – lizosomų liumene (Jerjes *et al.*, 2020; Q. Peng & Moan, 1995) kaupiami fotosensibilizatoriai. Lizosomos – organelės, kurios reguliuoja signalų perdavimą ir skaidymą epidermio diferenciacijos metu, jos gali dalyvauti apoptozės indukcijoje bei vėlyvuose endocitozės ir autofagijos etapuose (Ballabio & Bonifacio, 2020; Inpanathan & Botelho, 2019; Lawrence & Zoncu, 2019; Trivedi *et al.*, 2020). Mes tyrėme lizosomų fotopažaidų įtaką keratinocitų žūties vyksmams. Palyginome pirminių keratinocitų atsaką į lizosomų pažaidas, kurias sukėlė AlPcS_{2a} -FD ir AlPcS_4 -FD poveikiai, su mTHPC-FD poveikio sukeltu oksidaciniu stresu įvairiose ląstelių membranose.

Keratinocitams yra būdinga savita žūties forma – ragėjimas (Eckhart *et al.*, 2013), todėl norėjome nustatyti ne tik dažniausiai įvardijamus žūties vyksmus po FD poveikio, bet ir įvertinti FD poveikio įtaką šiam unikaliai žūties keliui. Kadangi FD poveikį pirminiuose keratinocituose HEKa sukėlėme naudodami mTHPC, AlPcS_{2a} ir AlPcS_4 fotosensibilizatorius, todėl šiame darbe galėjome palyginti keratinocitų diferenciacijos požymius, inicijuotus FD poveikio sukeltų oksidacinių pažaidų, kurių pirminis taikinytis yra įvairios ląstelės membranos ir lizosomos. Šiame darbe pirmą kartą parodėme, kad FD poveikio sukeltos lizosomų pažaidos indukuoja pirminių keratinocitų HEKa ankstyvąją diferenciaciją.

Nustatėme, kad mūsų darbe naudoti fotosensibilizatoriai citotoksiškai veikia pirminius keratinocitus HEKa. Lyginant naudotus fotosensibilizatorius, panašus ląstelių gyvybingumo sumažėjimas buvo pasiektas esant mažesnėms mTHPC koncentracijoms ir žymiai mažesnėms švitinimo dozėms nei aliuminio ftalocianinų atveju.

Ląstelių žūtis, kurią sukelia FD poveikis, vyksta skirtingais mechanizmais. Apoptozė yra vyraujantis atsakas į FD poveikį, tačiau gali būti stebimos ir kitos ląstelės žūties formos: nekrozė, nekroptozė, paraptozė. Žūties kelias priklauso nuo daugelio veiksnių: fotosensibilizatoriaus lokalizacijos ląstelėje, FD poveikio dozės, ląstelės tipo ir kt. (Bacellar *et al.*, 2015; Kessel & Oleinick, 2018). Keratinocitams apoptozė yra svarbi palaikant proliferacijos homeostazę, taip pat ji veikia kaip apsauginis mechanizmas, kai pažeisti keratinocitai sunaikinami apoptozės būdu po UV spindulių poveikio ar oksidacinių pažaidų (Raj *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2021). Mūsų tyrimai parodė, kad po įvairiose organelėse sukaupto mTHPC ir savitai lizosomose lokalizuotų aliuminio ftalocianinų FD poveikių pažeisti pirminiai keratinocitai žūsta apoptozės keliu. Vertinant apoptozinių branduolių kiekį, aliuminio ftalocianinai apoptozę indukavo stipriau, o lyginant aliuminio ftalocianinus tarpusavyje, nustatėme, kad AlPcS_{2a} yra stipresnis apoptozės induktorius.

Yra žinoma, kad fotosensibilizatoriai, kurie kaupiami mitochondrijose, paprastai veiksmingai indukuoja apoptozę, tačiau nustatyta ir lizosomų svarba apoptozėje (Kessel & Oleinick, 2018). ALPcS_{2a} į ląstelę patenka endocitozės būdu ir kaupiasi lizosomų membranose. Kuomet ALPcS_{2a} sukeltas FD poveikis pažeidžia lizosomų membranas, iš lizosomų išteka funkciškai nepažeistos lizosomų liumeno peptidazės, lemiančios citoplazminio apoptozę skatinančio baltymo Bid skėlimą (Chiu *et al.*, 2010; Reiners *et al.*, 2002). Šiame darbe parodėme, kad ALPcS_{2a}-FD poveikis sukelia apoptozę pirminiuose žmogaus epidermio keratinocituose. ALPcS₄-FD poveikis sukelia lizosomų liumeno komponentų, įskaitant ir hidrolazes, fotooksidaciją. Nustatyta, kad į pastarąjį panašiomis fizikinėmis ir cheminėmis savybėmis pasižymintis fotosensibilizatorius mezotetra(4-sulfonatofenil)porfirinas (TPPS₄) prieš endocitinių membranų plyšimą inaktyvuoja lizosomų fermentus vėžinėse ląstelėse (Reiners *et al.*, 2010). Kaip ir kiti (Crous *et al.*, 2019; Plaetzer *et al.*, 2002), mes taip pat pastebėjome apoptozės požymius ALPcS₄ veiktoje HEKa ląstelėse.

UV spinduliuotė nuolat sukelia odos pažeidimus, todėl keratinocitų apoptozė svarbi stabdant kancerogenezę. Tačiau taip pat nustatyta, kad nestipri UV spidulių dozė, kuri nesukelia apoptozės, skatina keratinocitų diferenciaciją. Tai taip gali būti odos savisaugos mechanizmas, alternatyvus apoptozei, kai pažeistos ląstelės suragėja ir nupleiskanoja nuo odos paviršiaus (de Pedro *et al.*, 2018). FD poveikis keratinocitų diferenciacijai yra mažai ištirtas, todėl šiame darbe siekėme palyginti skirtingos viduląstelinės lokalizacijos fotosensibilizatorių inicijuotą keratinocitų diferenciaciją. Epidermio diferenciacijos metu, keratinocitai nustoja dalintis ir kiekvienoje diferenciacijos stadijoje pradeda sintetinti savitus diferenciacijos žymenis. Pamatiniam proliferuojančiam sluoksniui būdingą K5 ir K14 pakeičia K1 ir K10, kurie yra vieni pirmųjų baltymų aptinkami pradedančiuose diferencijuoti keratinocituose, tuoj po jų pradedama CASP14 ir IVL sintezė (Costanzo *et al.*, 2015; Denecker *et al.*, 2008; Rousselle P., 2017). Galutinės keratinocitų diferenciacijos metu keratinocituose susikaupia daugybė struktūrinių baltymų, tokių kaip lorikrinas, filagrinas ir maži prolino turintys baltymai (Eckhart *et al.*, 2013; Nithya *et al.*, 2015). Šiame darbe siekėme užčiuopti diferenciacijos pradžią, todėl diferenciacijai stebėti pasirinkome ankstyvosios diferenciacijos žymenis – K10, CASP14 ir IVL. Didžiausią keratinocitų diferenciacijos žymenų raišką stebėjome po ALPcS_{2a}-FD poveikio sukeltų lizosomų membranų pažeidų. K10 baltymo kiekis buvo reikšmingai didesnis po ALPcS_{2a}-FD poveikio lyginant su ALPcS₄-FD ar mTHPC-FD poveikiais. K10 yra vienas pagrindinių keratinocitų diferenciacijos žymenų, tiesiogiai susijęs

su diferenciacijos eiga. Nustatyta, kad didelis K10 kiekis koreliuoja su ląstelių morfologijos pokyčiais būdingais epidermio diferenciacijai – keratinocitų plokštėjimu ir paviršiaus ploto didėjimu (Barrandon & Green, 1985; Ipponjima *et al.*, 2020; Lippens *et al.*, 2005; Simpson *et al.*, 2011). Mūsų gauti rezultatai parodė, kad lizosomų pažaidos po $\text{AlPcS}_4\text{-FD}$ ir $\text{AlPcS}_{2a}\text{-FD}$ poveikių indukuoja diferenciaciją pirminiuose keratinocituose, o mTHPC atveju buvo aptiktos tik kelios ląstelės, pasižyminčios dideliu K10 kiekiu.

FD poveikis gali sukelti ne tik apoptozę, bet ir autofagiją – procesą, kuris yra svarbus pažeistų ląstelės komponentų skaidymui lizosomose ir lemia ląstelių išgyvenimą arba žūtį (Domagala *et al.*, 2018; Garg *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2020). Keratinocitai žūsta savita forma, jie diferencijuoja ir galiausiai ragėja. Nors keratinocitų ragėjimo mechanizmas dar nėra pakankamai ištirtas, manoma, kad lizosomos atlieka itin svarbų vaidmenį šiame procese. Keratinocitų diferenciacijos metu vyksta sudėtingi struktūriniai persitvarkymai, įskaitant baltymų pokyčius kartu su bendros ląstelių biomasės mažėjimu. Tai rodo, kad keratinocitų diferenciacijos metu vykstančiai baltymų ir organelių reorganizacijai yra būtina autofagija ir skaidymas lizosomose (Monteleon *et al.*, 2018). Autofagijos indukciją pirminiuose keratinocituose nustatėme pagal LC3-II baltymo kiekį, kuris koreliuoja su autofagosomų skaičiumi (Yoshii & Mizushima, 2017). Padidėjęs LC3-II kiekis buvo nustatytas pirminiuose keratinocituose po mTHPC sukeltų ląstelių membranų pažaidų ir po AlPcS_{2a} arba AlPcS_4 lizosomų pažaidų. Tačiau pats LC3-II baltymas yra skaidomas autofagijos metu, o ši savybė yra naudojama autofagijos intensyvumui arba srautui nustatyti. mTHPC yra žinomas autofagijos induktorius po FD poveikio vėžinėse ląstelėse (Lange *et al.*, 2019; Sasnauskiene *et al.*, 2009). Pirminiuose keratinocituose po mTHPC-FD poveikio nustatėme LC3-II kaupimąsi pridėjus lizosominių peptidazių slopiklių ir tai rodo vykstantį autofagijos srautą – skaidymą autolizosomose. $\text{AlPcS}_{2a}\text{-FD}$ ir $\text{AlPcS}_4\text{-FD}$ poveikiai taip pat padidino LC3-II baltymo kiekį pirminiuose keratinocituose, lyginant su neveiktomis ląstelėmis, tačiau autofagijos srautą stebėjome tik esant silpnam $\text{AlPcS}_4\text{-FD}$ poveikiui. Lizosomų pažaidos, priklausomai nuo pažeidimo stiprumo, gali sukelti lizosomų pralaidumą arba jų plyšimą (Reiners *et al.*, 2010). Tikėtina, kad vėlyvoji autofagijos stadija – degradacija lizosomose, yra sutrikusi po aliuminio ftalocianinų sukeltų lizosomų pažaidų dėl funkcionalių lizosomų stokos. Didžiausias autofagijos srautas pirminiuose keratinocituose buvo nustatytas po mTHPC sukulto FD poveikio.

Norėdami atskleisti apoptozės, diferenciacijos, autofagijos ir lizosomų pažaidų baltymų sąveiką po FD poveikio pirminiuose keratinocituose, sudarėme baltymų tarpusavio sąveikos (PPI) (angl. *protein-protein interactions*) tinklą. FD poveikis skatina ROS susidarymą, o vienas iš ląstelių atsako kelių į tai yra kalcio signalinio kelio aktyvinimas (Gorlach *et al.*, 2015). Yra parodyta, kad įvairūs fotosensibilizatoriai, naudojami FD poveikiui sukelti, didina citozolinio Ca^{2+} kiekį ir tai siejama su ląstelių žūtimi ar išgyvenamumu (Castano *et al.*, 2005; S. L. Hu *et al.*, 2014). Epidermio diferenciacijos metu citozolinio Ca^{2+} koncentracijos augimas ypač svarbus – indukuoja savitų diferenciacijos žymenų raišką (Bikle *et al.*, 2012; Elias *et al.*, 2002; Tu *et al.*, 2012). Taigi, naudodamiesi sudarytu PPI baltymų sąveikų tinklu, pastebėjome, kad pvz. mukolipinas-1 (MCOLN1) – ROS jutiklis ir pagrindinis Ca^{2+} išleidimo kanalas, esantis lizosomų membranoje, prie likusio tinklo jungiasi per galektiną-3 (X. Zhang *et al.*, 2016). Galektinai yra svarbūs lizosomų pažaidų signalo perdavimui ir yra reikalingi autofagijos iniciacijai (Jia *et al.*, 2018; Shin & Zoncu, 2018), ląstelių adhezijai, proliferacijai ir žūčiai (Perillo *et al.*, 1998), o taip pat ir keratinocitų diferenciacijai (Sarafian *et al.*, 2006). Įdomu tai, kad K10 sujungia galektinų šeimos baltymus su kitais tinklo elementų klasteriais. Remdamiesi gauto PPI tinklo rezultatais, galime daryti išvadą, kad K10 yra centrinis tinklo elementas, apjungiantis atsaką į lizosomų pažaidas, diferenciaciją, autofagiją ir apoptozę. PPI tinklai suteikia galimybę tik prognozuoti baltymų funkcijas ir sąveikas, todėl baltymų sąveikų rezultatų patvirtinimas pirminiuose keratinocituose HEKa po FD poveikio būtų vertingas rezultatas.

Mūsų gauti rezultatai atskleidė, kad pirminių keratinocitų atsakas į skirtingos lokalizacijos fotosensibilizatorių sukeltas ląstelių pažaidas buvo skirtingas. mTHPC sukeltas FD poveikis, pažeidžiantis ląstelių membranas, skatino autofagijos srautą. Lizosomines pažaidas sukeliantys aliuminio ftalocianinai buvo efektyvesni indukuojant pirminių keratinocitų diferenciaciją ir apoptozę. Lizosomų membranų pažaidos naudojant AlPcS_{2a} efektyviau sukėlė keratinocitų diferenciaciją ir apoptozę, lyginant su lizosomų liumene veikiančiu AlPcS_4 . Apibendrinus gautus rezultatus, galime daryti išvadą, kad nepaisant lizosomų svarbos keratinocitų diferenciacijai, FD poveikio sukeltos lizosomų pažaidos efektyviai sukelia pirminių keratinocitų diferenciaciją.

4.2. Epidermoidinės karcinomos ląstelių A-431 atsakas į fotodinaminį poveikį

Šiame darbe tyrėme lizosomų membranose kaupiamo AlPcS_{2a} sukulto FD poveikio inicijuotus ląstelių žūties vyksmus vėžinėse epidermoidinės karcinomos A-431 ląstelėse. Ląstelių atsaką į AlPcS_{2a}-FD poveikį lyginome su lizosomų liumene kaupiamo AlPcS₄ bei ląstelių membranose lokalizuoto mTHPC sukeltu FD poveikiu, kurie yra aprašyti ankstesniuose mūsų laboratorijos darbuose (Dabkevičienė, 2010; Sasnauskienė, 2011).

Ilgą laiką buvo manoma, kad veiksmingiausiai apoptozę sukelia mitochondrijose ir ET kaupiami fotosensibilizatoriai, tačiau dabar jau yra nemažai duomenų, kad lizosomose kaupiami fotosensibilizatoriai taip pat veiksmingai sukelia apoptozę (Galluzzi *et al.*, 2014; W. Hu *et al.*, 2016; Kessel & Oleinick, 2018; Reiners *et al.*, 2002). Mūsų rezultatai rodo, kad AlPcS_{2a}-FD poveikis pažeisdamas lizosomų membranas taip pat indukuoja apoptozę A-431 ląstelėse. Be to, nustatėme, kad AlPcS_{2a} efektyviau sukelia apoptozę, nei lizosomų liumeną pažeidžiantis AlPcS₄-FD poveikis. Po lizosomų membranų pažeidimo sukeliančio AlPcS_{2a}-FD poveikio, DEVDazinis aktyvumas reikšmingai padidėjo, lyginant su lizosomų liumene veikiančio AlPcS₄-FD poveikiu, kuris buvo nustatytas ankstesniame darbe (Sasnauskienė, 2011).

Kitas atsakas į ląstelių pažeidimą po FD poveikio yra autofagija, kurios vaidmuo FD proceso metu yra nevienareikšmis. Autofagija gali veikti kaip apsaugos mechanizmas (Domagala *et al.*, 2018; Kessel *et al.*, 2006), tačiau gali būti ir ląstelių žūtį skatinantis kelias (Reiners *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2020). Autofagija FD poveikio metu yra svarbus ląstelinis mechanizmas, pašalinantis ROS pažeistas organeles ir negrįžtamai oksiduotus citozolinius baltymus, linkusius sudaryti sąsiuvas (Nystrom, 2005). Kėlėme klausimą, ar pažeidus lizosomų membranas FD proceso metu vyksta autofagija? Nustatėme, kad AlPcS_{2a}-FD poveikis inicijuoja LC3-II baltymo kiekio didėjimą, reiškiantį autogafosomų susidarymą, tačiau vėlyvos autofagijos stadijos – autofagosomų skaidymas lizosomose – po šio FD poveikio nevyksta. Mūsų rezultatus patvirtina neseniai paskelbti rezultatai, kad į AlPcS_{2a} panašiomis fizikinėmis ir cheminėmis savybėmis panašus amfifilinis fotosensibilizatorius mezotetrafenilchloro disulfonatas (TPCS_{2a}), besikaupiantis endosomų ir lizosomų membranose, indukuoja autofaginį atsaką, tačiau slopina autofagijos srautą (Weisheit *et al.*, 2021). Ląsteles veikiant su lizosomų liumeną pažeidžiančiu ftalocianinu AlPcS₄, autofaginis srautas vyko tik po silpnos citotoksinio poveikio dozės (Sasnauskienė, 2011). Taigi tikėtina, kad vėlyvos autofagijos stadijos nevyksta ląstelėse,

kuriose FD poveikis pažeidžia lizosomų membranas, taip pat molekules, nuo kurių priklauso autofagosomų sąlyje su lizosomomis bei pačias lizosomų peptidazes.

FD poveikio sukeltas oksidacinis stresas keičia ir citokinų raišką vėžinėse ląstelėse (Falk-Mahapatra & Gollnick, 2020; Nath, 2019 #697; Morais *et al.*, 2021)}. Mūsų laboratorijoje pastebėjus, kad mTHPC indukuotas FD poveikis skatina *IL1A* ir *VEGFA* raišką A-431 ląstelėse, tyrėme šių genų raišką po AlPcS_{2a}-FD poveikio. Lizosomų membranose susikaupęs AlPcS_{2a} didina *IL1A* ir *VEGFA* transkriptų kiekį. Lyginant su mTHPC ir AlPcS₄ poveikiais, AlPcS_{2a} daugiausiai didina proangiogeninio VEGF-A, o įvairiose ląstelės organelėse sukauptas mTHPC stipriausiai indukavo prouždegiminio citokino IL-1 α transkripto kiekį. Reikia pabrėžti, kad IL-1 α turi keletą funkcijų: jis gali jungtis prie ląstelės paviršiaus receptoriaus ir taip inicijuoti signalo perdavimą, taip pat IL-1 α turi branduolio lokalizacijos seką ir gali veikti branduolyje kaip transkripcijos veiksnys (Baker *et al.*, 2019; Dinarello, 2018). Norėdami ištirti IL-1 α reikšmę VEGF-A sintezei, mažiname ir didiname IL-1 α baltymo raišką mTHPC-FD poveikiu veiktose A-431 ląstelėse. Chemiškai susintetintomis siRNR slopinome *IL1A*, tokiu būdu sumažindami IL-1 α baltymo raišką. Rekombinantinis IL-1 α , pridėtas į ląstelių auginimo terpę, reikšmingai didina VEGF-A raišką FD poveikiu neveiktose ląstelėse, ir ląstelėse po mTHPC-FD poveikio (Dabkevičienė, 2010). Gauti siRNR tildymo rezultatai parodė, kad IL-1 α yra vienas veiksnių, skatinančių VEGF-A raišką.

Taigi, tiek į lizosomų membranas (AlPcS_{2a}), tiek į lizosomų liumeną (AlPcS₄) nukreiptas FD poveikis sukelia apoptozę ir inicijuoja autofagosomų susidarymą, taip pat didina *VEGFA* ir *IL1A* transkriptų kiekį A-431 ląstelėse. Kaip nustatyta anksčiau, į įvairių organelių membranas nukreiptas mTHPC-FD poveikis inicijuoja apoptozę, tačiau, priešingai nei aliuminio ftalocianinų atveju, vyksta ir autofaginis srautas. mTHPC sukeltas FD poveikis didina VEGF-A ir IL-1 α transkriptų ir baltymų kiekį, o IL-1 α yra vienas iš veiksnių, skatinančių VEGF-A raišką epidermoidinės karcinomos ląstelėse A-431.

Apibendrinami galime pasakyti, jog po visų tirtų FD procesų buvo nustatyta apoptozė HEKa ir A-431 ląstelėse. Autofagosomų kiekį atspindintis LC3-II baltymo kiekis padidėjo pirminiuose keratinocituose ir vėžinėse ląstelėse po mTHPC ir aliuminio ftalocianinų sukulto FD poveikio, o didžiausias autofagijos srautas nustatytas po mTHPC-FD poveikio. CtD25 AlPcS₄-FD poveikio dozė indukavo silpną autofagijos srautą, o vėlyvos

autofagijos stadijos nevyko po AlPcS_{2a} -FD poveikio tiek pirminiuose keratinocituose, tiek ir epidermoidinės karcinomos ląstelėse.

Nors lizosomos dalyvauja keratinocitų diferenciacijos procese pašalinant branduolius ir kitas organeles, šiame darbe tirtas lizosomas pažeidžiantis aliuminio ftalocianinų FD poveikis slopina autofagijos srautą, tačiau šis poveikis inicijuoja pirminių keratinocitų diferenciaciją.

IŠVADOS

1. Piminių žmogaus epidermio keratinocitų HEKa atsakas į fotodinaminį poveikį priklauso nuo fotosensibilizatoriaus:
 - lizosomose kaupiamų ALPcS_{2a} ir ALPcS₄ inicijuotas fotodinaminis poveikis inicijuoja keratinocitų diferenciaciją, tuo tarpu įvairiose ląstelės membranose lokalizuoto mTHPC sukeltas fotodinaminis kartinocitų diferenciacijos neindukuoja;
 - ALPcS_{2a}, ALPcS₄ ar mTHPC sukeltas fotodinaminis poveikis inicijuoja apoptozę ir didina autofagosomų kiekį, tačiau autofagijos srautas vyksta tiksliai po mTHPC fotodinaminio poveikio ir silpnos ALPcS₄ fotodinaminio poveikio dozės.
2. Remiantis sudarytu baltymų sąveikų tinklu keratinas 10 susieja kai kuriuos apoptozės, autofagijos, keratinocitų diferenciacijos ir atsako į lizosomų pažaidas baltymus.
3. mTHPC, ALPcS_{2a} ar ALPcS₄ sukeltas fotodinaminis poveikis nekeičia citokinų interleukino 1 α ir kraujagyslių endotelio augimo veiksnio A transkriptų kiekio pirminiuose keratinocituose.
4. Lizosomų membranose kaupiamo ALPcS_{2a} fotodinaminis poveikis inicijuoja žmogaus epidermoidinės karcinomos ląstelių A-431 apoptozę ir didina autofagosomų kiekį, tačiau autofagijos srautas nevyksta.
5. Interleukinas 1 α skatina kraujagyslių endotelio augimo veiksnio A raišką po mTHPC sukulto fotodinaminio poveikio A-431 ląstelėse.

SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION

LIST OF ABBREVIATIONS

A-431	human epidermoid carcinoma cells
ACTB	β -actin gene or transcript
AFC	7-amino-4-trifluoromethylcoumarin
AlPcS _{2a}	aluminum phthalocyanine disulfonate, sulfonated on two adjacent isoindole units
AlPcS ₄	aluminum phthalocyanine tetrasulfonate
β -AGA	β -N-acetylglucosaminidase
BSA	bovine serum albumin
CASP14	procaspase-14
CI	confidence intervals
CtD	cytotoxic dose
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco modified Eagle medium
EpLife®	medium of primary human keratinocytes
FBS	fetal bovine serum
HEKa	primary human epidermal keratinocytes
<i>IL1A</i>	interleukin 1 α gene or transcript
IL-1 α	interleukin 1 α
IVL	involucrin
K1, 5, 10, 14	keratin 1, 5, 10, 14
kDNR	copy DNA
KV	crystal violet
mTHPC	m-tetra(3-hydroxyphenyl)-chlorin
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)diphenyltetrazolium bromide
PDT	photodynamic treatment
PPI	protein-protein interactions
PS	photosensitizer
ROS	reactive oxygen species
¹ O ₂	singlet oxygen
OR	Odds ratio
RFU	relative fluorescence unit
siRNR	small interfering RNA
SD	standard deviation
<i>VEGFA</i>	vascular endothelial growth factor A gene or transcript
VEGF-A	vascular endothelial growth factor A
λ_{em}	emission wavelengths
λ_{ex}	excitation wavelengths

INTRODUCTION

Skin is the largest organ of the human body, guarding against adverse physical (mechanical damage, ultraviolet radiation), chemical (allergens, inflammatory substances), and biological (microorganisms) environmental factors. *Keratinocytes* are the main cells of the epidermis, the outermost layer of the skin. By crossing distinct layers of the epidermis, keratinocytes undergo differentiation resulting in a unique form of cell death, termed *cornification*. Dead keratinocytes become an integral part of the epidermis and provide the waterproof barrier. The epidermis is subject to many external environmental factors that cause mutations, which accumulate and eventually lead to keratinocyte carcinogenesis. Skin cancer is one of the most common form of cancer worldwide.

Photodynamic therapy is a treatment modality for cancer and other diseases caused by cellular overgrowth. The photodynamic effect involves the interaction of light, a photosensitizer (PS), and molecular oxygen. Irradiation of cells can cause cell death when reactive oxygen species (ROS) form at the site of the PS accumulation. Singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) is the most common ROS formed during photodynamic treatment (PDT). $^1\text{O}_2$, a reactive and short-lived excited state of molecular oxygen, rapidly reacts with biomolecules close to the site of the PS accumulation. The subcellular localization of the PS is important as $^1\text{O}_2$ can diffuse $\sim 20\text{-}100$ nm from the site of its generation. Thus, the ability of PSs to create photodamage at specific subcellular sites can help to determine the importance of targeted damage site for cell death initiation.

The response to photodynamic therapy has been most extensively studied in cancer cells, and the effects of photodynamic therapy on non-cancerous cells are still poorly characterized. In this work, we have studied the response of primary human epidermal keratinocytes HEKa and epidermoid carcinoma cells A-431 to PDT induced by PSs accumulated to different subcellular sites.

Lysosomes have long been known to have a crucial role in degrading and recycling extracellular and intracellular material. Recently it has become clear that lysosomes have an important role in other cellular processes, including the control of energy metabolism, nutrient sensing, and interactions with other cellular structures. Lysosomal damage disrupts intracellular clearance and results in the leakage of lysosomal content by triggering cell death pathways, including apoptosis, pyroptosis, necroptosis, and ferroptosis. Lysosomes are also involved in the final stages of autophagy and can become substrates of autophagy when damaged. Moreover,

lysosomes regulate the signaling and degradation required for epidermal differentiation, and they play a key role in skin barrier formation.

We have studied response to PDT induced by aluminum phthalocyanine disulfonate (AlPcS_{2a}), which accumulates to lysosomal membranes, and aluminum phthalocyanine tetrasulfonate (AlPcS₄), which concentrates in the lumen of lysosomes. We have compared the response of primary keratinocytes to lysosomal photodamage, and cellular membranes photodamage evoked by m-tetra(3-hydroxyphenyl)-chlorin (mTHPC), which diffusely localizes to cellular membranes.

Photodynamic therapy also induces the expression of proangiogenic and proinflammatory cytokines. We investigated apoptosis, autophagy, and expression of endothelial growth factor A (VEGF-A) and inflammatory cytokine interleukin 1 α (IL-1 α) in epidermoid carcinoma cells A-431 after PDT induced by AlPcS_{2a}. IL-1 α is a 'dual function' cytokine. It acts as a cytokine and as a transcription factor in the nucleus. Overexpression of VEGF-A and IL-1 α has already been recorded; we aimed to assess the IL-1 α effect on VEGF-A expression.

The aim of the dissertation was to evaluate the response of primary keratinocytes and epidermoid carcinoma cells to photodynamic treatment induced by photosensitizers localized to lysosomes and different cellular membranes *in vitro*.

Towards this aim, **the following main tasks of the dissertation have been formulated:**

1. To compare the effects of photodynamic treatment on primary human epidermal keratinocytes differentiation, apoptosis, autophagy, and the expression of IL-1 α , VEGF-A following lysosomal photodamage induced by AlPcS_{2a} and AlPcS₄, and cellular membrane photodamage caused by mTHPC.
2. To perform computational analysis to identify protein-protein interactions between keratinocyte differentiation-specific, apoptotic, autophagic, and lysosome damage-associated response.
3. To evaluate changes in transcript levels of interleukin 1 α and vascular endothelial growth factor A after photodynamic treatment in primary human epidermal keratinocytes induced by mTHPC, AlPcS_{2a}, and AlPcS₄.
4. To determine AlPcS_{2a}-induced photodynamic treatment effects on apoptosis and autophagy in human epidermoid carcinoma cells A-431.

5. To assess the interleukin 1α effect on the vascular endothelial growth factor A expression after mTHPC photodynamic treatment in A-431 cells.

SCIENTIFIC NOVELTY

For the first time, primary human epidermal keratinocytes response to PDT induced by mTHPC, AlPcS_{2a}, and AlPcS₄, were investigated. The study results revealed that lysosomal photodamage induces apoptosis, keratinocyte differentiation and increases the number of autophagosomes – however, the final stage of autophagy is impaired after lysosomal photodamage. Meanwhile, mTHPC-mediated PDT induces autophagy and apoptosis in primary keratinocytes but does not induce keratinocyte differentiation. Furthermore, no statistically significant changes in IL- 1α and VEGF-A expression we observed in primary keratinocytes after PDT.

Constructed protein-protein interaction network revealed an interplay between keratinocyte differentiation, apoptosis, autophagy, and lysosomal damage response after PDT in primary keratinocytes. Our findings suggest that K10 is the central hub connecting these processes (Daugelaviciene *et al.*, 2021).

Our previous studies have demonstrated that the number of autophagosomes increases after lysosome lumen-targeted AlPcS₄-PDT in A-431 cells. However, the final stage of autophagy occurs only at low doses of AlPcS₄-PDT (Sasnauskienė, 2011). In this work, we demonstrated that AlPcS_{2a}-PDT resulted in an increased amount of autophagosomes, but PDT blocked the final stages of autophagy in A-431 cells. In addition, our results revealed that the number of autophagosomes increases in primary keratinocytes after PDT induced by AlPcS_{2a} and AlPcS₄. However, the final stages of autophagy occur only after the low dose of AlPcS₄-PDT, as was observed in epidermoid carcinoma A-431 cells.

Photodamage to lysosomal membranes by AlPcS_{2a} induced an increase of the VEGF-A and IL- 1α expression in A-431 cells. Compared to previous works (Dabkevičienė, 2010; Sasnauskienė, 2011), it was found that the amount of IL- 1α transcript is highest after the exposure to mTHPC-FD treatment. To find out the role of IL- 1α for the expression of VEGF-A in this work, we inhibited IL- 1α expression by siRNA and found that IL- 1α is one of the factors regulating VEGF-A expression after mTHPC-PDT (Dabkevičienė *et al.*, 2012). The results obtained in this work may be significant in improving the method of anti-cancer treatment and in developing a new treatment strategy that reduces the side effects of the treatment.

STATEMENTS TO BE DEFENDED

1. Apoptosis is initiated after mTHPC-, AlPcS_{2a}-, and AlPcS₄-mediated photodynamic treatment in primary keratinocytes. Cellular membranes damaging mTHPC photodynamic treatment promote autophagic flux. Lysosomal photodamage induced by aluminum phthalocyanines is more effective in evoking differentiation and apoptosis.
2. Based on the protein-protein interactions network, keratin 10 is at the center of keratinocyte differentiation, apoptosis, autophagy, and lysosomal damage in primary keratinocytes.
3. Photodynamic treatment induced by mTHPC, AlPcS_{2a}, and AlPcS₄ does not affect the transcript levels of IL-1 α and VEGF-A cytokines in primary keratinocytes.
4. AlPcS_{2a} photodynamic treatment induces apoptosis and increases the number of autophagosomes but impairs the autophagic flux in epidermoid carcinoma cells A-431.
5. Cytokine IL-1 α increases VEGF-A expression after mTHPC photodynamic treatment in A-431 cells.

MATERIALS AND METHODS

DMEM, FCS, and streptomycin were obtained from Biochrom AG. Primary keratinocyte growth medium EpiLife® and supplement (HKGS) kit were from Gibco. Culture flasks, Petri dishes were from Nunc or TPP. Other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich unless indicated otherwise.

Photosensitizers. m-tetra(3-hydroxyphenyl)-chlorin (**mTHPC**) (a gift of R. Bonnett Queen Mary University of London) was dissolved in ethanol at 1 mg/ml for stock solution. Aluminum phthalocyanine disulfonate (**AlPcS_{2a}**) (Frontier Scientific) stock solution was obtained by dissolving AlPcS_{2a} in 0.1 M NaOH and diluting it in PBS to a final concentration of 5 mg/ml. A stock solution of aluminum phthalocyanine tetrasulfonate (**AlPcS₄**) (Frontier Scientific) was made by dissolving in PBS to a final concentration of 5 mg/ml. The solutions of all PSs were stored at -20 °C in the dark. All experiments were performed using dilutions of the stock solutions with the cell incubation media.

Cell culture. **A-431** human squamous cell carcinoma cells (ATCC®, cat. no. CRL-1555™) were cultured in DMEM supplemented with 5 % FBS, 100 U/mL penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2 mM glutamine, and 5 mM HEPES. **HEKa** primary *human epidermal keratinocytes* (Thermo Scientific, cat. no. C0055C) isolated from adult skin were obtained from Gibco. Cells were cultured in EpiLife® medium with 0.15 mM of Ca²⁺, supplemented with HKGS. PDT experiments were conducted with subconfluent HEKa cells at the 3rd or 4th passage. Cells cultured at 37 °C in a humidified atmosphere with 5 % CO₂.

Photochemical treatment of cells. 30 h after cell seeding, the cells were washed twice with DPBS, and HKGS-free EpiLife® for HEKa cells or FCS-free DMEM for A-431 cells, containing 0.1 µg/ml of mTHPC (Dabkeviciene *et al.*, 2012; Hadjira *et al.*, 1996), 10 µg/ml AlPcS_{2a} (Prasmickaite *et al.*, 2004; Prasmickaite *et al.*, 2002; Vikdal *et al.*, 2013) or 20 µg/ml AlPcS₄ (Gomes *et al.*, 1999; Labanauskiene *et al.*, 2009; Moan *et al.*, 1994) was added for 18 h. The cells were incubated in the dark at 37 °C in 5 % CO₂ atmosphere. After incubation, the cells were washed twice with DPBS, and DMEM containing 10 % FCS or HKGS-supplemented EpiLife® was added. For AlPcS_{2a}-PDT, the cells were incubated for 2 h after the additional medium change. The cells were illuminated with the LED array UNIMELA-1 (Vilnius University Laser Research Center) at $\lambda = 660 \pm 5$ nm (16 mW/cm²) for 5 s to 12 min (Table 1), incubated in the dark at 37 °C in 5 % CO₂ atmosphere for 4-24 h.

Colocalization. For colocalization studies of AlPcS_{2a}, A-431 cells grown on coverslips were incubated with 10 µg/ml of AlPcS_{2a} for 18 h. After incubation, 75 nM LysoTracker Yellow-HCK Yellow-HCK-123 (Molecular Probes) was added to the incubation medium for 1 h. Fluorescence was visualized using Leica SP5 confocal microscope, excitation/emission wavelengths were 405/420-535 nm and 633/640-680 nm, respectively.

MTT viability assay and cytotoxicity (CtD). 24 h after PDT the cell incubation medium was replaced with 0.2 mg/ml MTT in DPBS, and the cells were incubated for 2 h at 37 °C. After the MTT solution was discarded, the cell-attached dye was dissolved in isopropanol. The optical density of the supernatant was then recorded at 570 nm (Denizot & Lang, 1986).

The loss of MTT staining was expressed as cytotoxic dose (CtD). For HEKa cells, PDT-induced CtD was achieved by light exposure for the time indicated in Table 1.

Table 1. Time of light exposure and corresponding doses.

A-431 cells	CtD25	CtD50	CtD80
mTHPC	30 s (0.48 kJ/m ²)	1 min (0.92 kJ/m ²)	3 min (2.88 kJ/m ²)
AlPcS _{2a}	4 min (5.76 kJ/m ²)	8 min (11.52 kJ/m ²)	12 min (17.28 kJ/m ²)
AlPcS ₄	3 min (3.84 kJ/m ²)	4 min (5.76 kJ/m ²)	6 min (8.64 kJ/m ²)
HEKa cells	CtD25	CtD50	CtD80
mTHPC	10 s (0.16 kJ/m ²)	20 s (0.32 kJ/m ²)	30 s (0.48 kJ/m ²)
AlPcS _{2a}	0,5 min (0.48 kJ/m ²)	3 min (2.88 kJ/m ²)	4 min (3.84 kJ/m ²)
AlPcS ₄	1 min (0.92 kJ/m ²)	2 min (1.92 kJ/m ²)	4 min (3.84 kJ/m ²)

Nuclear morphology analysis. DAPI-stained cells were visualized using an epi-fluorescence microscope Olympus AX70. WU filter cube (excitation/emission wavelengths, BP330-385 nm/LP420 nm) was used for fluorescence detection. The images were recorded with a CCD camera Orca (Hamamatsu). Cells displaying nuclear fragmentation, chromatin condensation, and/or nuclear condensation were assigned as apoptotic. Primary keratinocyte nuclei, including the apoptotic ones, were counted in 10-15 randomly selected non-overlapping visual fields per sample as described previously (Cummings & Schnellmann, 2004).

β-N-acetylglucosaminidase activity. After washing with PBS, the cells were lysed in lysis buffer (0.1 % Triton X-100 in 100 mM of sodium acetate, pH 4.6). 100 µl of lysate was mixed with 400 µl of substrate solution (2 mM *p*-nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminide solution in 100 mM of sodium acetate, pH 4.6). After incubation for 2 h at 37 °C, 500 µl of ice-cold 0.5 M Na₂CO₃ were added. Absorption at 410 nm was registered by spectrophotometer Perkin Elmer λ20.

Caspase-3 activity. Caspase-3 Cellular Activity Assay Kit PLUS (AK-703) (Biomol) was used. The assay is based on the cleavage of the specific

fluorogenic peptide substrate (Ac-DEVD-AFC). Sample cells were harvested at various times postexposure and treated according to the manufacturer's instructions. Fluorescence of AFC, which was proportional to the DEVD-ase activity in the cell lysates, was recorded on fluoroscan Ascent FL (Labsystems) at excitation/emission wavelengths of 390/510 nm, respectively.

Immunofluorescence analysis. Cells were fixed in 4 % *p*-formaldehyde for 10 min and permeabilized with 0.1 % Triton X-100 in PBS for 3 min at 4 °C. Thereafter, all incubation steps were performed at room temperature. Cells were incubated in blocking solution (0.5 % BSA in PBS) for 15 min. Primary anti-LC3 antibodies (PM036, MBL) were diluted at 1:350, primary anti-keratin 10 antibodies (ab76318, Abcam) at 1:100 in blocking solution and incubated for 30 min. After incubation, secondary anti-rabbit antibodies labeled with IgG-NL637 (NL005, R&D Systems) were added for 30 min. For the staining of nuclei, cells were incubated with 300 nM DAPI (Invitrogen) in PBS. For cell morphology analysis, DAPI and NL637 were visualized using Leica SP5 confocal microscope, excitation/emission wavelengths were 405/420–535 nm and 633/640–680 nm, respectively.

For the analysis of K10-positive cells, the cells were imaged using EVOS FL Auto Imaging System (Life Technologies), excitation/emission wavelengths: DAPI 357/447 nm, NL637 628/692 nm. DAPI-stained nuclei and K10-positive cells were counted using FIJI software. For the analysis of each sample, 10-15 randomly selected non-overlapping visual fields were counted. Based on fluorescence intensity, K10-positive cells in each sample were divided into two categories: low 15-2500 RFU ($K10^{\text{low}}$) and high >2500 RFU ($K10^{\text{high}}$) fluorescence intensity. Cells with K10 fluorescence intensity less than 15 RFU were considered K10-negative.

Western blotting. Cells after PDT were lysed for 30 min on ice in RIPA buffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 1 % sodium deoxycholate, and Protease Inhibitor Cocktail (10^7 cell/ml). Then lysates were centrifuged for 5 min at $14000 \times g$ at 4 °C. Protein concentration was determined by the BCA method. Protein samples were subjected to 12 % SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane (BioRad) by semidry blotting. The membranes were blocked with 5 % BSA in TBST for 1 h at room temperature, then probed with anti-keratin 10 (ab76318, Abcam), anti-involucrin (ab68, Abcam), anti-caspase-3 (sc-271759, Santa Cruz Biotechnology), anti-LC3 (PM036, MBL), or anti- β -actin antibodies (sc8432, Santa Cruz Biotechnology) in 5 % BSA in TBST overnight at 4 °C. Membrane-bound primary antibodies of K10, CASP14, and LC3 were detected by alkaline phosphatase-conjugated secondary anti-

rabbit IgG antibodies (GWB-C11A72, GenWay Biotech). The antibodies of IVL and β -actin were detected by anti-mouse IgG secondary antibodies conjugated to alkaline-phosphatase (sc-2008, Santa Cruz Biotechnology). Secondary antibodies were diluted in 5 % BSA in TBST, and membranes were incubated for 2 h at 4 °C. Antibody binding was visualized using NBT/BCIP reagent (nitro-blue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3'-indolyl phosphate, Thermo Scientific). Densitometric analysis was performed on scanned immunoblots using FIJI software (Schneider *et al.*, 2012).

Evaluation of autophagic flux. To determine the lysosome-dependent degradation, lysosomal protease inhibitors, E64d (10 mg/ml) and pepstatin A (10 mg/ml), were added to the culture medium immediately after PDT. The difference in the amount of LC3-II between the samples with and without lysosomal protease inhibitors was used to evaluate the level of autophagic flux.

Quantitative RT-PCR (qRT-PCR). The cells were detached from the substratum by 0.025 % trypsin and washed once with TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4 in DEPC-treated water). Total RNA was isolated from 2×10^6 cells using the total RNA isolation kit Purescript® (Gentra Systems). cDNA for qPCR was synthesized using RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's protocol. qPCR reactions were performed on ABI Prism® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems), using SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). The thermal profile was as follows: 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min, and 40 cycles of 95 °C for 15 s, 60 °C for 1 min. Expression of *VEGFA* and *IL1A* was normalized to *ACTB*. Results were analyzed by the Relative Standard Curve Method.

Silencing of *IL1A*. Small interfering RNA (siRNA) targeted to *IL1A* (GenBank: NM_000575) 5'CAUCCAAGCUUACCUUCAAdTdT3' (*IL1A*-siRNA) and negative control 5' AGGUAGUGUAAUCGCCUUGdTdT 3' (NK-siRNA), which had a scrambled sequence with no significant homology to any human mRNA (scrambled siRNA), were purchased from MWG Biotech AG. The cells were seeded in DMEM supplemented with 5 % FBS, 2 mM glutamine, and without antibiotics. After 24 h, transfection was performed: 0.5 ml Opti-MEM (Thermo Scientific) was premixed with 0.5 μ l (50 pmol) siRNA and 2.5 μ L Lipofectamine™ 2000 (Thermo Scientific), and the mixture was added to 0.5 ml of the cell culture. At 6 h after transfection, the cells were washed twice with DPBS, and PDT (0.1 μ g/ml mTHPC, 96 mJ/cm²) was performed.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The culture medium was centrifuged to pellet cell debris. Supernatants were collected and stored

at -80 °C; cells were washed, pelleted, counted, and resuspended in ice-cold lysis buffer containing 1x peptidase inhibitor cocktail (Thermo Scientific) 5×10^6 cells/ml. After 20 min, the lysates were centrifuged, the supernatants were collected, and the samples were stored at -80 °C. Sandwich ELISA for VEGF-A and IL-1 α was carried out using monoclonal capture antibodies (MAB293 or MAB200, respectively; R&D systems), biotinylated polyclonal detection antibodies (BAF293 or BAF200; R&D systems), recombinant human proteins (293-VE or 200-LA; R&D systems) as the standard and streptavidin alkaline phosphatase (Amersham Biosciences) as the secondary reagent. ELISA was carried out according to the manufacturer's protocol. Serial two-fold dilutions of the reference material in parallel with three or two consecutive dilutions of the samples were made in duplicates. The color development was induced by adding the substrate buffer supplemented with 1 mg/ml of p-nitrophenylphosphate (Serva Electrophoresis). The absorbance at 405 nm was detected with a microplate reader Sunrise (Tecan). Results were corrected for 10^6 cells.

Protein-protein interaction (PPI) networks. Information on physical PPIs for the PPI network was acquired from the curated PPI databases: IntAct (Orchard *et al.*, 2014), IMEx (Orchard *et al.*, 2012), UniProt ("UniProt: a worldwide hub of protein knowledge," 2019), and MIN (Licata *et al.*, 2012). The final network unifying the interactions collected from different databases was constructed after filtering out non-human proteins. Only the proteins expressed in keratinocytes (Thul & Lindskog, 2018) were used to construct the PPI network. The networks were visualized and analyzed using CytoScape (Shannon *et al.*, 2003). The network was analyzed using the NetworkAnalyzer plugin: the importance of nodes to the network was assessed using the value of betweenness centrality and average shortest path between the nodes.

Statistical analysis. Data were analyzed and presented using R i386 3.6.3 software and SigmaPlot 11.0 software. For cytotoxicity, variables were expressed as medians with interquartile ranges. Linear regression analysis was used to evaluate the relationship between CtD and light exposure. For apoptosis and differentiation of primary keratinocytes, variables were presented as percentages. Chi-square (χ^2) tests were performed to evaluate the difference between K10^{low} and K10^{high} cell categories. To assess the effect size of PDT on changes in K10 fluorescence, the odds ratio (OR) was calculated. The data of the two groups were analyzed using a t-test. Statistical significance was accepted with a *p*-value < 0.05.

RESULTS

Primary adult epidermal keratinocytes HEKa and human epidermoid carcinoma cell line A-431 derived from cancer epidermal cells were used for the experiments. PDT was performed according to the scheme shown in Figure 1.

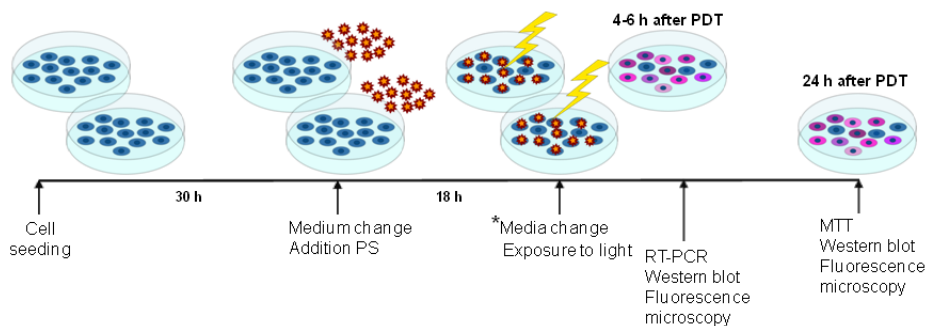


Fig. 1. Schedule for PD treatment experiments. 30 h after cell seeding, the culture medium was replaced with a medium containing 0.1 g/ml mTHPC, 10 $\mu\text{g/ml}$ AlPcS_{2a}, or 20 $\mu\text{g/ml}$ AlPcS₄, and cells were incubated for 18 h in the dark. After incubation, the cells were washed, and HKGS-supplemented EpiLife® or DMEM containing 10 % FCS was added. The cells were exposed to light and incubated in the dark at 37 °C in 5 % CO₂ atmosphere. * For AlPcS_{2a}-PDT, the cells were incubated for 2 h after the additional medium change.

Effects of PDT on human primary epidermal keratinocytes HEKa

The PDT effects on cancer cells have been extensively studied, the effects on normal cells remain poorly understood to date. Thus, characterization of normal cells responses to PDT could contribute to the improvement of clinical photodynamic therapy.

The cytotoxic effect of PDT was evaluated using mTHPC, AlPcS_{2a}, or AlPcS₄ at 24 h post-exposure in primary keratinocytes HEKa (Fig. 2A-C).

We defined CtD25 as corresponding to 25 % decrease of cell viability,

CtD50 – to 50 % and CtD80 – to 80 %. Light exposure doses for the treatment corresponding to CtD25, CtD50, and CtD80 were selected using regression analysis to estimate required light exposure doses and their 95 % confidence intervals (Fig. 2E-G). Predicted cytotoxicity of selected light exposure doses had non-overlapping 95 % CI. Further studies were performed using selected light exposure doses corresponding to CtD25, CtD50, and CtD80.

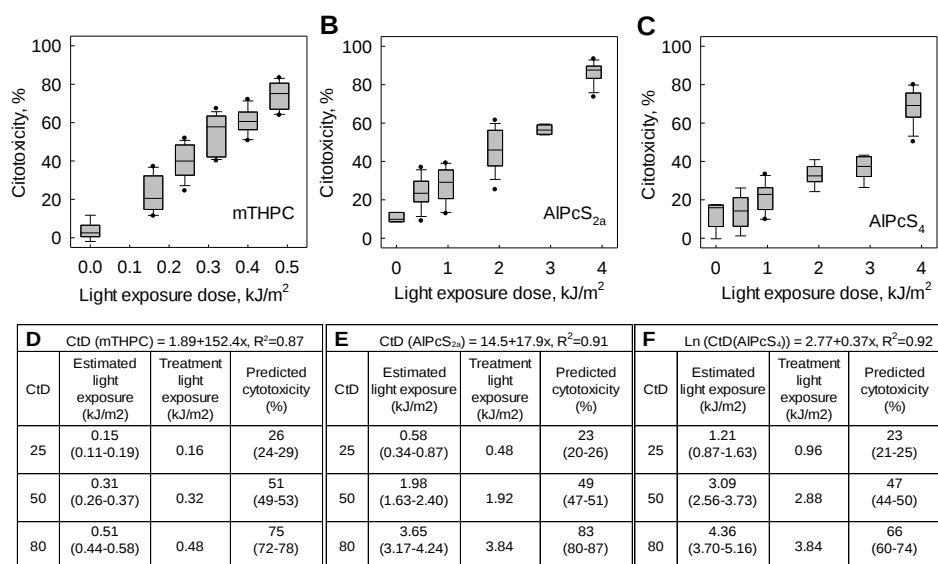


Fig. 2. Cytotoxic effect of the photodynamic treatment in primary keratinocytes. The cytotoxicity of light dose-dependent mTHPC-PDT (A), AlPcS_{2a}-PDT (B), and AlPcS₄-PDT (C) were assessed by an MTT assay 24 h post-exposure. Estimated light exposure dose and selected light exposure dose for treatment were defined for mTHPC-PDT (D), AlPcS_{2a}-PDT (E), and AlPcS₄-PDT (F). Estimated values are presented as mean (95 % CI). Keratinocytes were incubated for 18 h with 0.1 µg/ml of mTHPC, 10 µg/ml of AlPcS_{2a} or 20 µg/ml of AlPcS₄, and the cells were exposed to LED array ($\lambda=660\pm5$ nm) at a light intensity of 16 W/m² for total doses indicated in E–G. Cells harvested at 6 h and/or 24 h after light exposure were used for analysis.

The cytotoxic response of primary keratinocytes to neutral lipophilic mTHPC was more pronounced than negatively charged aluminum phthalocyanines, and AlPcS_{2a}-PDT was more cytotoxic than AlPcS₄-PDT.

Cell death mediated by PDT can occur through different mechanisms. PDT-induced apoptosis has been documented as the predominant type of cell death. However, the induction of other cell death pathways and autophagy upregulation is also detected after PDT, depending on the subcellular localization of PS, the dose of PDT, and the type of the cell (Bacellar *et al.*, 2015; Kessel & Oleinick, 2018).

Apoptotic cell death was determined by analyzing changes in nuclear morphology at 6 h and 24 h after PDT (Fig. 3A-C). mTHPC-PDT induced up to 6 % of apoptotic nuclei (Fig. 3A). Additionally, we examined the expression of caspase-3 by Western blot analysis, and the results showed activation of caspase-3 in keratinocytes after mTHPC-PDT.

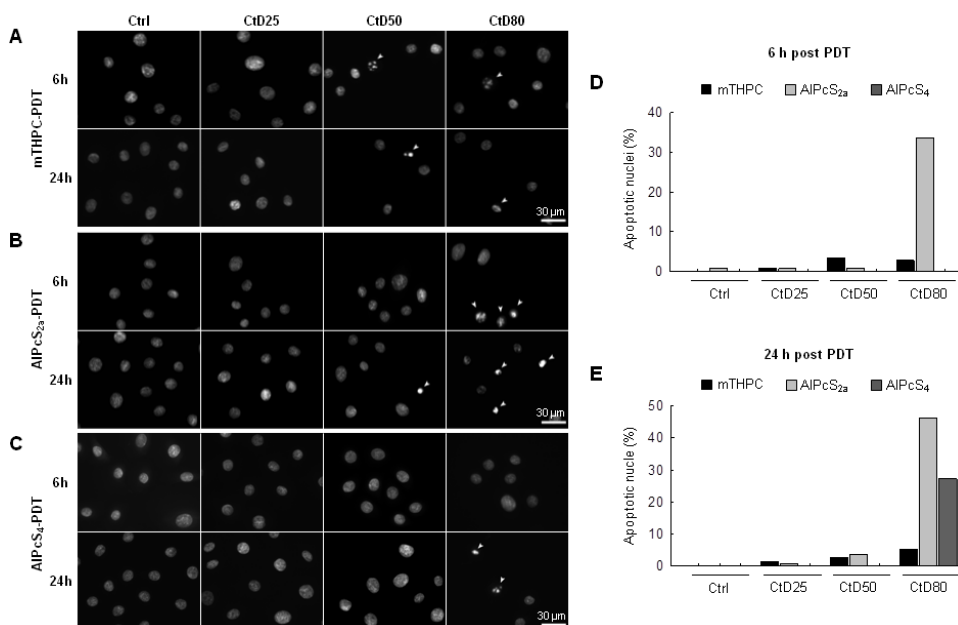


Fig. 3. Nuclear hallmarks of apoptosis after PDT in primary keratinocytes. Morphology of the DAPI-stained nuclei after mTHPC-PDT (A), AlPcS_{2a}-PDT (B), and AlPcS₄-PDT (C) at 6 h and 24 h of light exposure. The percentage of apoptotic nuclei at 6 h (D) and 24 h (E) after PDT. Arrows indicate nuclei with apoptotic features. Scale bars equal 30 μ m.

AlPcS_{2a}-PDT increased the number of apoptotic nuclei to 5.3 % after CtD50 at 24 h post-exposure. After CtD80, even more apoptotic nuclei were detected at both time points, 35.9 % and 46.4 %, respectively (Fig. 3B). AlPcS₄-PDT induced increase of 23 % apoptotic nuclei only after CtD80 at 24 h post-irradiation (Fig. 3C). PDT mediated by aluminum phthalocyanines induced apoptosis in primary keratinocytes. Significantly more apoptotic nuclei were detected after AlPcS_{2a}-PDT compared to AlPcS₄-PDT at CtD80 dose at 24 h post-irradiation (OR = 2.3, p = 0.006).

Keratinocytes differentiation after PDT-induced oxidative stress was assessed by evaluating the expression of epidermal differentiation markers: keratin 10 (K10), involucrin (IVL), and procaspase-14 (CASP14). Primary keratinocyte differentiation can be induced by the confluence of keratinocyte culture. We monitored the expression of differentiation markers of HEKa cells cultured for 7 days. Western blot analysis revealed the expression CASP14 on day 5 of keratinocyte culture, followed by the expression of K10 on day 7, while IVL synthesis in keratinocytes was observed from day 1 (Fig. 4A).

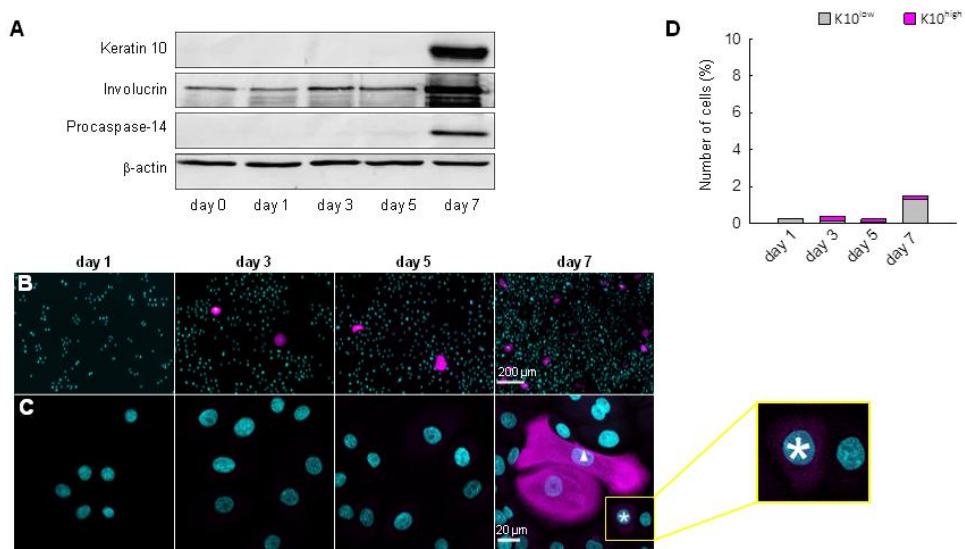


Fig. 4. Primary human epidermal keratinocytes undergo differentiation by day 7 in culture. The expression of markers of keratinocytes differentiation – keratin 10 (K10), involucrin (IVL), and procaspase-14 (CASP14) – were assessed by Western blot (A) or immunofluorescence microscopy (B, C) at the indicated time points after plating. The number of keratinocytes with low (K10^{low}) and high (K10^{high}) fluorescence level of K10 relative to total cell number (D). Cyan – nuclei labeled with DAPI, magenta – keratin 10 immunofluorescence. * indicates K10^{low}, ▲ indicates K10^{high} cells. To visualize both K10^{low} and K10^{high} in the same field of view, gamma setting was set to 0.6.

K10 expression we evaluated by immunofluorescence microscopy. Immunofluorescence analysis of keratinocytes cultured in monolayer for 7 days revealed a low amount of K10-positive cells (Fig. 4D), and we also observed that the level of K10 fluorescence intensity varied in the same sample. Depending on K10 fluorescence intensity at the single-cell level, we categorized keratinocytes into two groups: cells with a low level of K10 fluorescence (K10^{low}) and cells with a high level of K10 fluorescence (K10^{high}). We determined 1.3 % of K10^{low} cells and 0.2 % of K10^{high} cells on day 7 in keratinocytes cultured in monolayer (Fig. 4D).

Immunofluorescence microscopy revealed that PDT mediated by mTHPC, AlPcS_{2a}, and AlPcS₄ in keratinocytes upregulated the expression of K10 (Fig. 5A-D, 6A-D and 7A-D). The level of K10 significantly increased after PDT compared to control ($p < 0.001$), except for CtD50 mTHPC-PDT at 6 h post-exposure.

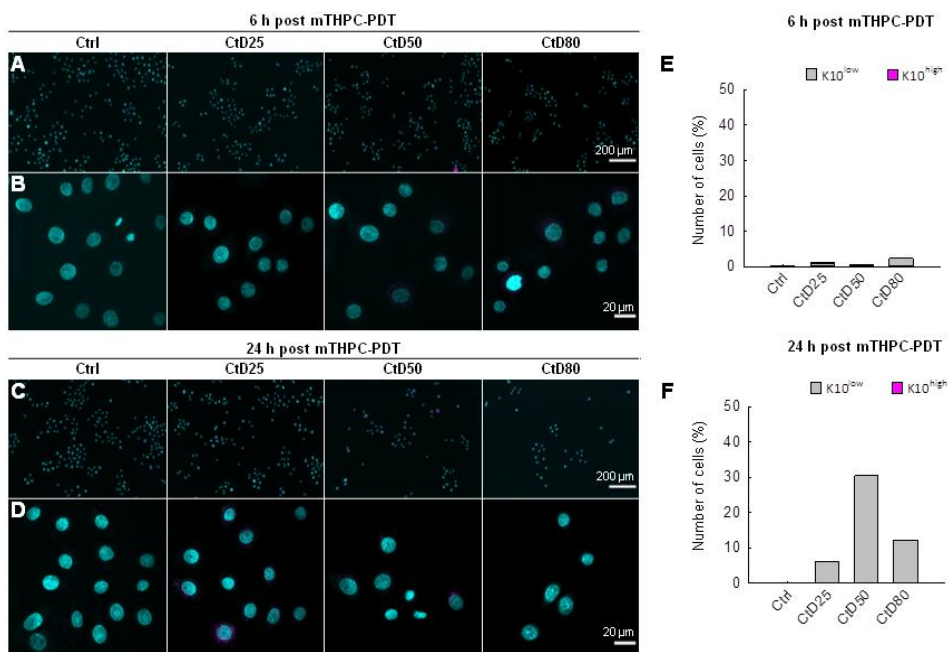


Fig. 5. mTHPC-PDT induces a low level of keratin 10 expression in primary human keratinocytes. The cells were treated as described in Fig. 1. The expression of keratin 10 (K10) was assessed by immunofluorescence microscopy at 6 h (**A, B**) and 24 h (**C, D**) post-PDT. The number of keratinocytes with low (K10^{low}) and high (K10^{high}) fluorescence level of K10 at 6 h (**E**) and 24 h (**F**) after mTHPC-PDT was quantified to total cell number. Scale bars: A, C – 200 μ m, B, D – 20 μ m. Cyan – DAPI-labeled nuclei, magenta – K10 immunofluorescence. To visualize both K10^{low} and K10^{high} in the same field of view, gamma setting was set to 0.6.

Comparing different AlPcS_{2a}-PDT doses, significantly more K10-positive cells were observed after CtD80 (vs. CtD25 and CtD50) at 6 h post-exposure as well as after CtD50 and CtD80 (vs. CtD25) at 24 h post-exposure. AlPcS₄-PDT significantly increased the number of K10-positive cells at CtD80 (vs. CtD25 and CtD50) at 6 h and 24 h post-PDT.

Comparing the same CtDs of different PSs, we observed the highest amount of K10 expressing cells after AlPcS_{2a}-PDT ($p < 0.001$). K10 expression after AlPcS₄-PDT was higher compared to mTHPC-PDT ($p < 0.0001$), except CtD50 at 24 h post-exposure.

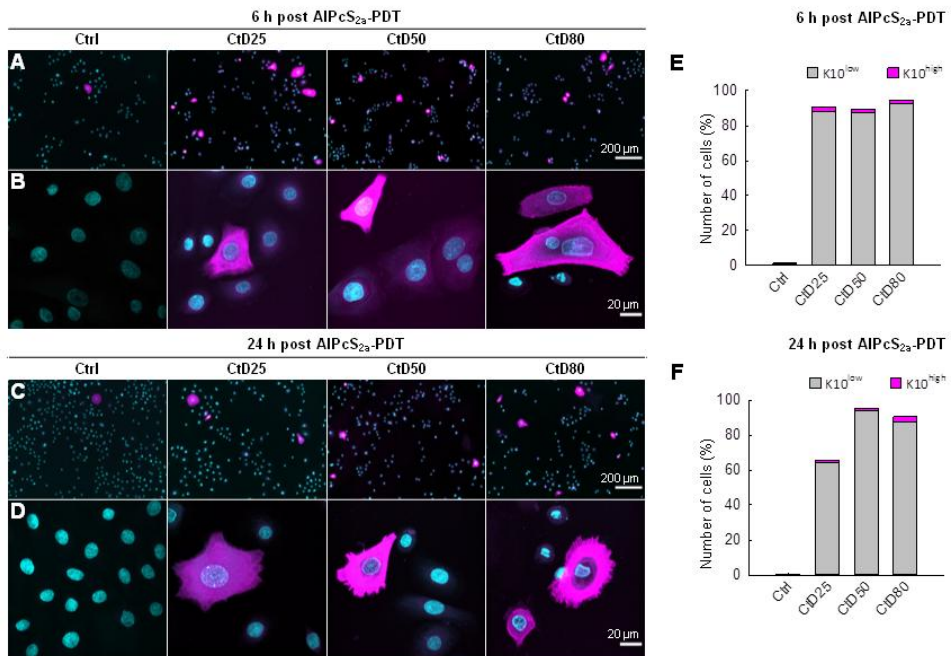


Fig. 6. AlPcS_{2a}-PDT strongly induces keratin 10 expression in primary human keratinocytes. The cells were treated as described in Fig. 1. The expression of keratin 10 (K10) was assessed by immunofluorescence microscopy at 6 h (A, B) and 24 h (C, D) post-PDT. The number of keratinocytes with low (K10^{low}) and high (K10^{high}) fluorescence level of K10 at 6 h (E) and 24 h (F) after AlPcS_{2a}-PDT was quantified to total cell number. Scale bars: A, C – 200 μ m, B, D – 20 μ m. Cyan – DAPI-labeled nuclei, magenta – K10 immunofluorescence. To visualize both K10^{low} and K10^{high} in the same field of view, gamma setting was set to 0.6.

Categorization of K10-positive keratinocytes after PDT revealed that the frequency of K10^{low} and K10^{high} keratinocytes significantly differed comparing PSs used with the same cytotoxic dose (CtD25 or CtD50) at both time points ($p < 0.001$). After each type of PDT tested, we detected only a small number of K10^{high} cells compared to K10^{low} cells (Fig. 5E-F). While there was an increase of K10-expressing cells 6 h after mTHPC-PDT, there was less than 3 % of K10^{low} cells and less than 0.2 % K10^{high} cells. Lysosome-targeted PSs induced K10^{high} expression more efficiently, and AlPcS_{2a}-PDT was significantly more efficient than AlPcS₄-PDT while inducing K10 expression at both time points ($p < 0.001$). Comparing all the PSs used, AlPcS_{2a} induced K10 expression most efficiently.

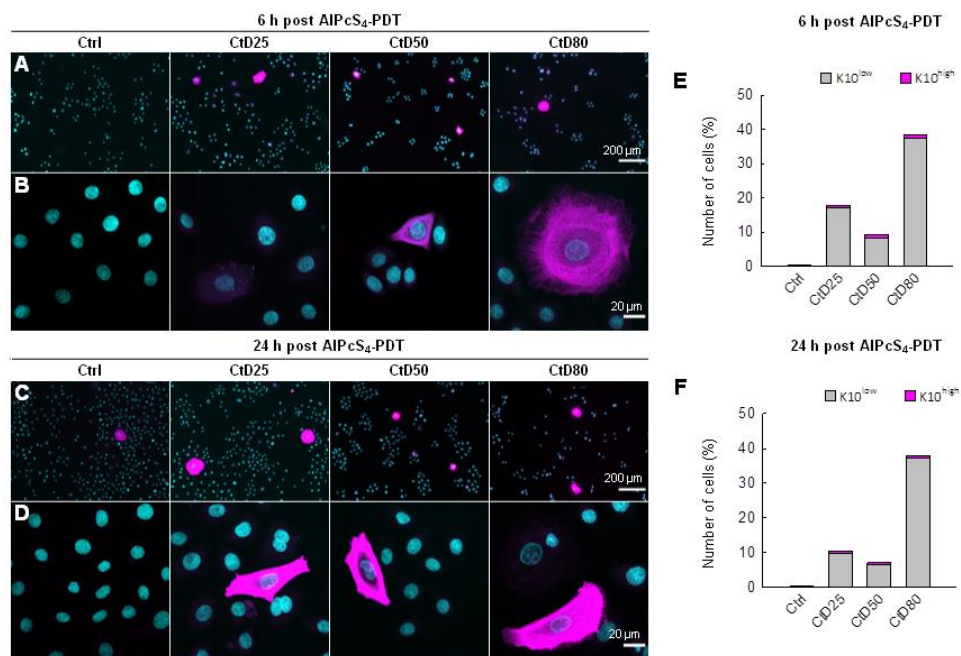


Fig. 7. AlPcS₄-PDT induces a high level of keratin 10 expression in primary human keratinocytes at CtD80. The cells were treated as described in Fig. 1. The expression of keratin 10 (K10) was assessed by immunofluorescence microscopy at 6 h (A, B) and 24 h (C, D) post-PDT. The number of keratinocytes with low (K10^{low}) and high (K10^{high}) fluorescence level of K10 at 6 h (E) and 24 h (F) after AlPcS₄-PDT was quantified to total cell number. Scale bars: A, C – 200 μ m, B, D – 20 μ m. Cyan – DAPI-labeled nuclei, magenta – K10 immunofluorescence. To visualize both K10^{low} and K10^{high} in the same field of view, gamma setting was set to 0.6.

Western blot analysis was used to determine the expression levels of differentiation markers IVL and CASP14. AlPcS_{2a}-PDT induced a greater than a 1.5-fold increase of IVL protein at CtD25 and CtD50 at 6 h after, compared to control (Fig. 8A).

CASP14 increase was determined after all CtDs for mTHPC-PDT at 6 h after irradiation (Fig. 8A). Both aluminum phthalocyanines induced an increase of CASP14 at CtD50 and CtD80 at 6 h post-exposure. The increase of CASP14 was registered only in keratinocytes treated with CtD25 and CtD50 at 24 h after AlPcS_{2a}-PDT (Fig. 8B). Comparing all PDTs used in this study, AlPcS_{2a}-PDT induced the expression of IVL and CASP14 most efficiently. It has been reported that autophagy could be induced by PDT in cancer cell lines (Lange *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2020).

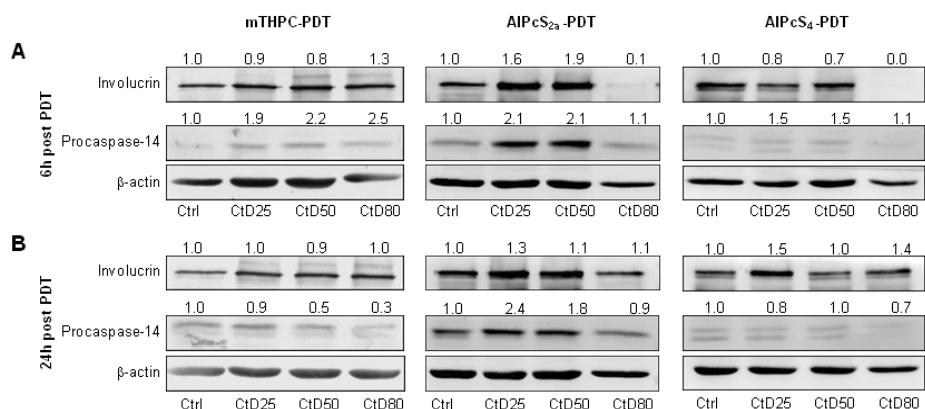


Fig. 8. Changes in expression of involucrin (IVL) and procaspase-14 (CASP14) in primary keratinocytes following PDT, mediated by mTHPC, AIPcS_{2a}, and AIPcS₄. The cells were treated as described in Fig. 1. Expression of IVL and CASP14 was assessed by Western blot analysis at 6 h (A) and 24 h (B) post-PDT. Numbers indicate quantitative values of the band's integrated density normalized to β-actin and are presented as fold changes relative to control.

To elucidate the extent of autophagy after mTHPC-, AIPcS_{2a}-, and AIPcS₄-PDT in primary keratinocytes, we analyzed the accumulation of LC3-II, a lipidated form of LC3-I, indicating the number of autophagosomes. Western blot analysis revealed that either PDT leads to the increase of LC3-I lipidation at 24 h after light exposure (Fig. 9A-C).

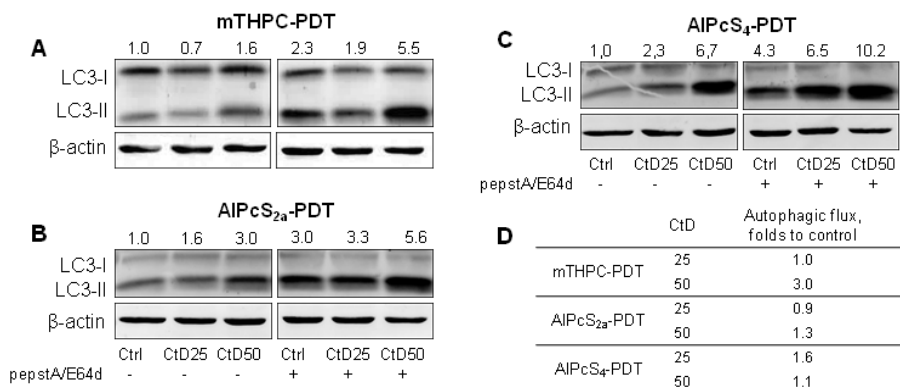


Fig. 9. Autophagy levels in primary keratinocytes following PDT. The cells were treated as described in the legend of Fig. 1. Western blot analysis of LC3-II expression was performed at 24 h after mTHPC-PDT (A), AIPcS_{2a}-PDT (B), and AIPcS₄-PDT (C). Lysosomal protease inhibitors E64d (10 mg/ml) and pepstatin A (10 mg/ml) were used to estimate autophagic flux. Numbers of quantitative values of the LC3-II levels normalized to β-actin are presented as fold changes relative to control. The autophagic flux after PDT was determined as the difference between LC3-II levels with and without lysosomal protease inhibitors (D).

LC3-II accumulation after pre-treatment with protease inhibitors pepstatin A and E64d was detected after mTHPC-PDT at CtD50, indicating autophagic flux. AlPcS₄-PDT weakly induced autophagic flux at CtD25, and we did not detect autophagic degradation activity after AlPcS_{2a}-PDT. In conclusion, mTHPC was the strongest inducer of autophagic flux.

In this study, after investigation of PDT-induced differentiation, apoptosis, and autophagy of the HEKa cells, we can conclude that the damage induced by the light exposure of lysosome-localizing AlPcS_{2a} and AlPcS₄ evoked apoptosis and differentiation more efficiently in primary HEKa compared to mTHPC-PDT (Fig. 3, 5-7). Meanwhile, mTHPC-PDT induced autophagic flux in keratinocytes most efficiently (Fig. 9).

We aimed to investigate the interplay between lysosome damage-associated factors, apoptotic effectors, keratinocyte differentiation-specific, as well as autophagic machinery at the molecular level. We compiled a list of proteins with reported importance for the aforementioned processes. Many of these proteins are known to interact directly with each other. Therefore we aimed to investigate their physical interactions. Consequently, we constructed a network of protein-protein interactions (PPIs) reported in publicly available databases to determine the putative signal and effector proteins as well as the sequence of their operation (Fig.10).

We observed multiple K10 interactions to apoptotic machinery through effector caspases, differentiation-specific caspases, and the effectors of autophagy. Moreover, some interaction partners of K10 can be involved in the transduction of the lysosomal damage response. Photodamage to lysosomes is sensed using, for example, galectins, which are the sensors of lysosomal glycans exposed to the cytosol. In the PPI network, galectin-1, -3, and -8 form a functional submodule with other proteins in the lysosomal damage pathway, as well as differentiation-specific CASP14. Altogether, interactions with K10 connected all the cellular pathways we investigated: keratinocyte differentiation, apoptosis, and autophagy.

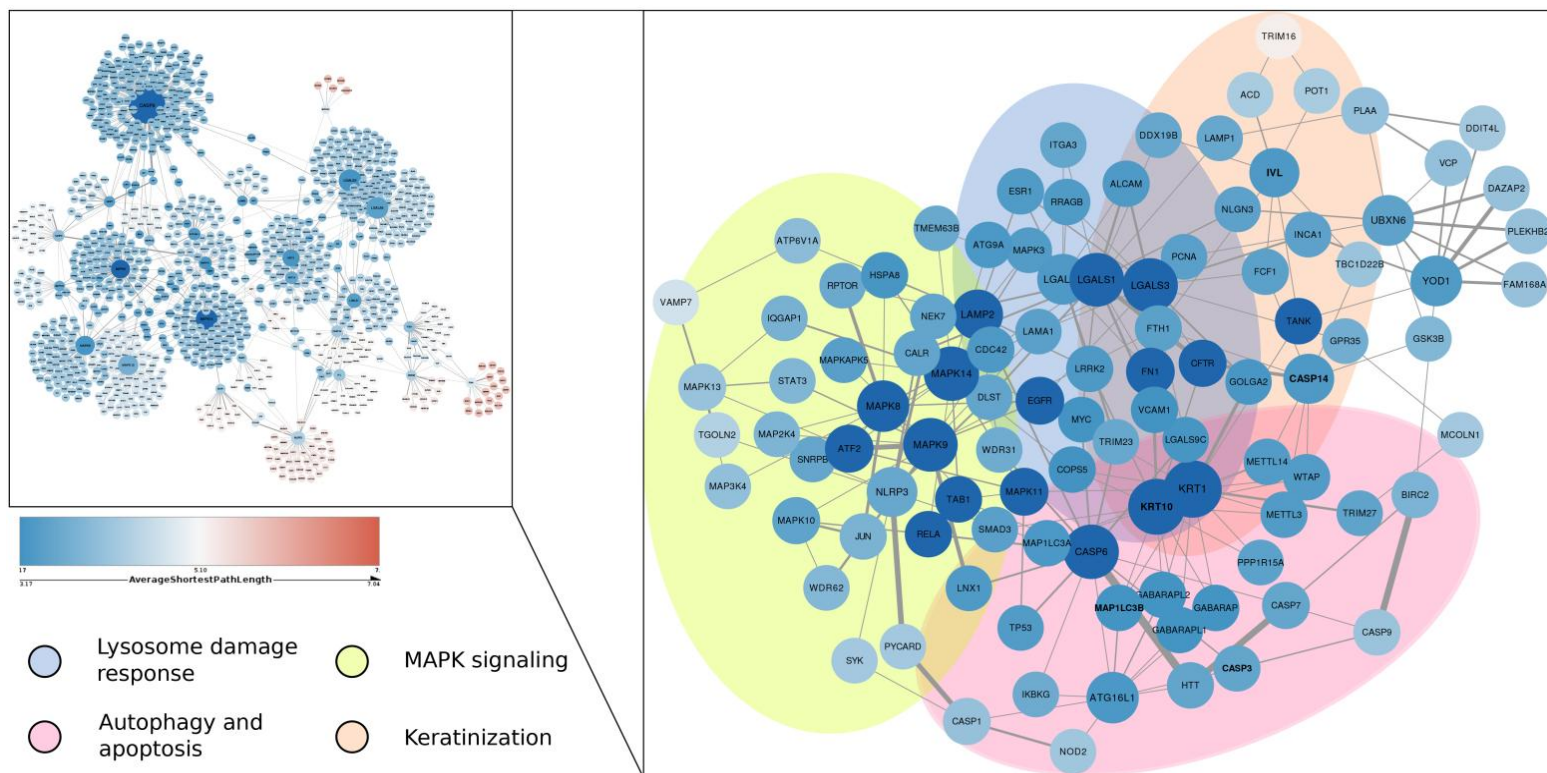


Fig. 10. Network of physical protein-protein interactions (PPIs) of proteins, participating in the PDT-induced stress response (left) and an excerpt is showing the main PPIs of interest and their known functions (right). The proteins listed in Table S5 were used as seed nodes for the protein-protein interaction network as described in Materials and Methods. The thickness of edges (the lines connecting nodes) is proportional to the number of experimental studies reporting the interaction between these nodes. The size of nodes is proportional to the number of edges the node possesses. The color of nodes represents the metric of the average shortest path length.

Effects of PDT on human epidermoid carcinoma cells A-431

In A-431 cells, AlPcS_{2a} colocalizes with the lysosomal marker LysoTracker Yellow-HCK-123 (Fig. 11A). The cytotoxic effect of PDT we evaluated at 24 h post-exposure (Fig. 11B).

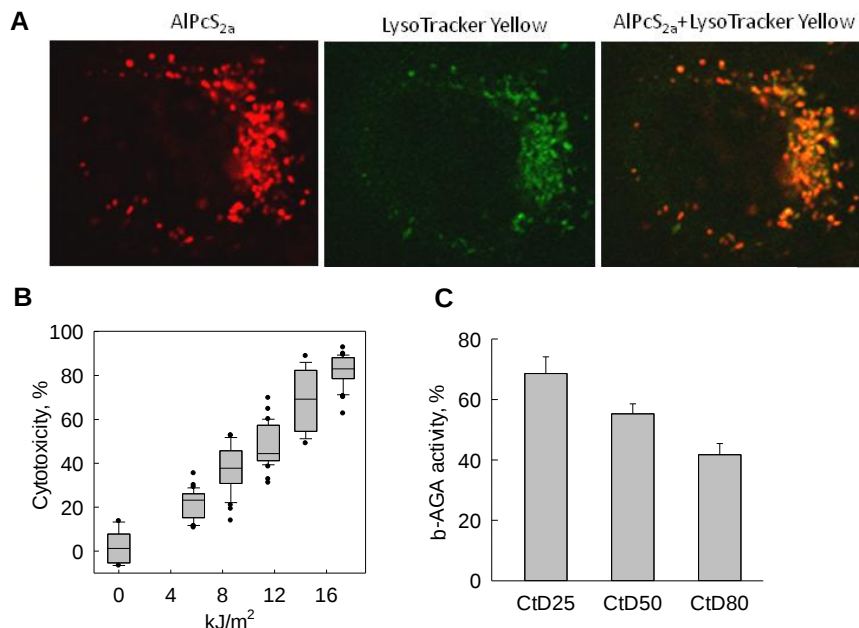


Fig. 11. Cellular localization of AlPcS_{2a} and effect of AlPcS_{2a}-PDT in A-431 cells. (A) Fluorescence pattern of AlPcS_{2a} (10 µg/ml for 18 h) and LysoTracker Yellow (75 nm). (B) Cell viability at 24 h post-exposure as assessed by an MTT assay. (C) β-N-acetylglucosaminidase activity after in PDT-treated cells. The activity of β-N-acetylglucosaminidase was determined immediately after light exposure.

By light exposure for 4 min, the decrease in cell viability was about 22 %, for 8 min – 48 %, and 12 minutes – 82 %. Therefore, we defined that CtD25 corresponds to cell irradiation for 4 min, CtD50 for 8 min, and CtD80 for 12 min.

To evaluate the damage to lysosome membranes, we assayed the activity of β-N-acetylglucosaminidase. AlPcS_{2a}-mediated PDT significantly ($p < 0.001$) reduced activity of the lysosomal enzyme β-N-acetylglucosaminidase: CtD25 dose by almost 30 %, CtD50 by 45 %, and CtD80 by 55 % (Fig. 11C).

AlPcS_{2a}-PDT induced apoptosis, as determined by changes in nuclear morphology (condensation and fragmentation) (Fig. 12A) and caspase-3 activation (DEVDase activity) (Fig. 12B).

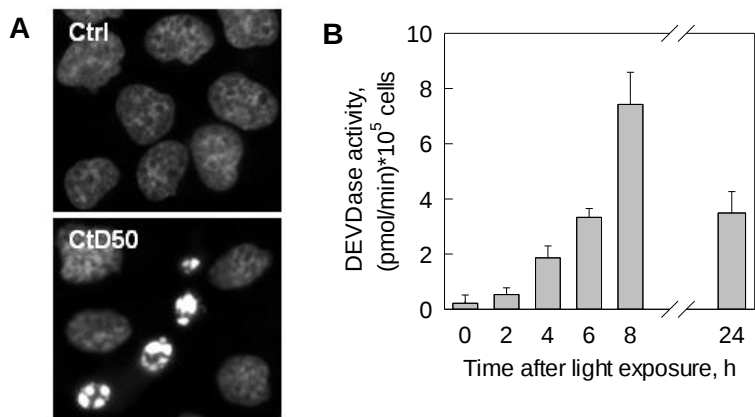


Fig. 12. Hallmarks of AlPcS_{2a}-PDT induced apoptosis in A-431 cells. (A) Morphology of the Hoechst 33342-stained nuclei after AlPcS_{2a}-PDT at 5 h after light exposure. **(B)** DEVDase activity at CtD50 after AlPcS_{2a}-PDT. CtD - cytotoxic dose.

To determine the lysosome-dependent degradation, we used lysosomal enzyme inhibitors pepstatin A and E64d. Western blot analysis revealed that AlPcS_{2a}-PDT increased LC3-II amount 24 h after light exposure (Fig. 13). We did not detect autophagic degradation activity after AlPcS_{2a}-PDT.

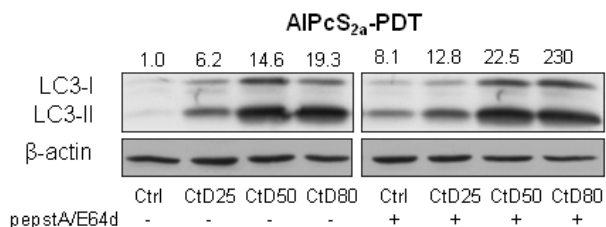


Fig. 13. Autophagy in A-431 cells after AlPcS_{2a}-PDT. Western blot analysis of LC3-II expression was performed 24 h after AlPcS_{2a}-PDT. Lysosomal protease inhibitors E64d (10 mg/ml) and pepstatin A (10 mg/ml) were used to estimate autophagic flux. Numbers of quantitative values of the LC3-II levels normalized to β-actin are presented as fold changes relative to control. CtD – cytotoxic dose.

PDT induces oxidative stress, which intervenes in the expression of cytokines in tumor cells. Our study revealed a significant up-regulation of VEGF and IL-1α in the human epidermoid carcinoma A-431 cells. The expression of VEGF-A and IL-1α genes (*VEGF* and *IL1A*, respectively) after

PDT was determined by assessing the amount of their transcripts at the RNA level. mTHPC-PDT induced significant expression of *VEGF* and *IL1A* (Dabkevičienė, 2010). The expression of these cytokines was also increased in A-431 cells after the photodynamic effects of AlPcS₄ accumulated in the lumen of lysosomes (Sasnauskienė, 2011). In this study, we investigated the expression of cytokines *VEGF* and *IL1A* in A-431 cells after photodamage to lysosomal membranes by AlPcS_{2a}.

AlPcS_{2a}-PDT induced the significant overexpression of *VEGFA* expression in A-431 cells. Comparing all the PSs, AlPcS_{2a} induced *VEGFA* expression most efficiently, up to 18-fold. The same cells were tested for PDT-induced changes in the *IL1A* expression in comparison with untreated control cells. The highest amount of the *IL1A* transcript, up to 12-fold, was registered after mTHPC-PDT.

It should be noted that expression of *VEGFA* and *IL1A* did not change in primary keratinocytes after mTHPC, AlPcS_{2a}, and AlPcS₄ induced PDT.

In this study, we investigated the possible involvement of IL-1 α in the regulation of the VEGF-A secretion in A-431 cells. As *IL1A* transcript expression was more pronounced after mTHPC-PDT, the IL-1 α effect on the VEGF-A expression was assessed following mTHPC-PDT. *IL1A* and *VEGFA* transcript expression changes were confirmed in A-431 cells after mTHPC-PDT at the protein level by ELISA. Protein levels in cells and their culture media were determined at 6 h and 24 h after irradiation (Dabkevičienė, 2010). The involvement of IL-1 α in the regulation of the VEGF-A secretion in A-431 cells we investigated by silencing *IL1A*. In PDT-untreated cells, *IL1A*-siRNA reduced the IL-1 α amount by 80 % in comparison with the cells treated with scrambled siRNA (Fig. 14).

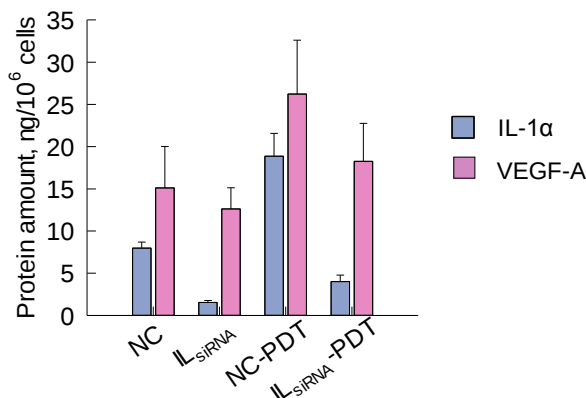


Fig. 14. Effects of IL1A-siRNA on VEGF-A secretion in untreated and mTHPC-PDT treated A-431 cells. The cells were harvested at 4 h postirradiation. NC – negative control (scrambled siRNA), IL_{siRNA} – cells transfected with IL1A-siRNA; PDT – mTHPC-PDT treated cells. CtD – cytotoxic dose.

The amount of VEGF-A was lowered after *IL1A* silencing as well, but the decline was insignificant. We registered a 20 % decrease in VEGF-A concentration in the culture medium of the cells with IL1A-siRNA in comparison with the cells treated with scrambled siRNA ($p = 0.125$). In the PDT-treated cells with IL1A-siRNA, the amount of IL-1 α and VEGF-A fell by 80 % and 30 %, respectively, compared to PDT-treated cells incubated with scrambled siRNA. The decrease in VEGF-A was significant ($p = 0.01$). These results suggest that IL-1 α contributes to VEGF production, especially in PDT-treated cells.

DISCUSSION

PDT effects on cancer cells have been extensively studied, but the effects on normal cells remain poorly understood to date. Thus, the characterization of normal cells responses to PDT could improve clinical photodynamic therapy.

Primary human epidermal keratinocytes HEKa, skin cells that undergo a specific programmed cell death, known as cornification (Eckhart *et al.*, 2013), were used to investigate cell responses induced by oxidative stress induced by PSs with different subcellular localizations. Cell death mediated by PDT can occur through different mechanisms. PDT-induced apoptosis has been documented as the predominant type of cell death. However, the induction of other cell death pathways and autophagy upregulation is also

detected after PDT, depending on the subcellular localization of PS, the dose of PDT, and the type of the cell (Bacellar *et al.*, 2015; Kessel & Oleinick, 2018).

Lysosomes regulate the signaling and degradation required for epidermal differentiation, and they play a key role in skin barrier (Mahanty *et al.*, 2019; Monteleon *et al.*, 2018). Lysosomal damage trigger cell death pathways, including apoptosis, pyroptosis, necroptosis, and ferroptosis formation (Zhu *et al.*, 2020). They are also involved in the final stages of autophagy. We investigated the cellular response of primary keratinocytes to lysosomal photodamage, induced by AlPcS_{2a}- and AlPcS₄-PDT, and compared to oxidative stress-mediated by mTHPC-PDT that damages diverse cellular membranes.

Our results demonstrated that mTHPC induced similar phototoxicity at lower concentrations and lower light exposure doses than PDT mediated by aluminum phthalocyanines in primary keratinocytes. All used PSs induced apoptotic response, and the highest amount of apoptotic cells was detected after PDT mediated by AlPcS_{2a}. Some studies report lysosomal participation in apoptosis after AlPcS_{2a}-PDT permeabilization of lysosomal membranes and release of lysosomal lumen proteases leading to the cleavage of cytoplasmic pro-apoptotic protein Bid (Chiu *et al.*, 2010; Reiniers *et al.*, 2002). AlPcS₄-PDT is known to cause photo-oxidation of lysosome lumen proteolytic enzymes. Consistently with the previous studies (Crous *et al.*, 2019; Plaetzer *et al.*, 2002), we detected apoptotic features in AlPcS₄-treated keratinocytes.

Damaged keratinocytes are eliminated by apoptosis after exposure to UV radiation or oxidative damage. Our studies confirmed that HEKa undergoes apoptosis after PDT. However, most interesting was the effect of PDT on keratinocyte differentiation, as it is still poorly investigated. In our study, keratinocyte differentiation was studied by analyzing keratinocyte differentiation markers: K10, IVL, and CASP14. The upregulation of keratinocyte differentiation markers was observed after lysosomal membranes photodamage by AlPcS_{2a}-PDT, and the increase of K10 protein after AlPcS_{2a}-PDT was significantly higher compared to AlPcS₄- or mTHPC-PDT. Some reports outline that the K10 level increases with the progress of differentiation. It has been demonstrated that the K10^{high} level correlates with cellular morphology changes specific for epidermal differentiation (Barrandon & Green, 1985; Lippens *et al.*, 2005; Simpson *et al.*, 2011). Our results indicated that lysosomal photodamage by AlPcS₄-PDT and AlPcS_{2a}-PDT induced epidermal differentiation, while mTHPC only sparsely induced K10^{high} cells.

ROS generation after the PDT using the PSs included in our study has been published before (Chen *et al.*, 2014; Gijssens *et al.*, 2002; Lange *et al.*, 2019). PDT-generated ROS induces apoptosis; however, it can also induce autophagy (Kiffin *et al.*, 2006). We have determined the level of autophagy in primary keratinocytes by monitoring the level of LC3-II protein, which correlates with the number of autophagosomes (Yoshii & Mizushima, 2017). An elevated amount of LC3-II was detected in keratinocytes after either PDT was used. However, LC3-II itself is degraded in lysosomes, and this feature is used to determine the autophagic degradation activity – autophagic flux. The accumulation of LC3-II in the presence of lysosomal protease inhibitors indicates autophagic flux. mTHPC is a known inducer of autophagy after PDT (Lange *et al.*, 2019; Sasnauskiene *et al.*, 2009). We observed the efficient autophagic flux after mTHPC-PDT in primary keratinocytes as well. Depending on the extent of photodamage, lysosomes can induce lysosomal permeabilization or full rupture (Reiners *et al.*, 2010). Due to the lack of functional lysosomes, the final stage of autophagy is likely to be impaired after aluminum phthalocyanines-induced lysosomal photodamage. Our study demonstrated that each type of PDT tested in primary keratinocytes increased the number of autophagosomes. We observed the highest level of autophagic flux after mTHPC-PDT.

The PPI network was constructed to reveal the molecular interplay between apoptosis, differentiation, and autophagy after PDT in primary keratinocytes. ROS generation plays a key role in PDT, and a typical response of cells to ROS is calcium signaling (Gorlach *et al.*, 2015). It has been demonstrated that PDT using a wide range of PSs and various cell types *in vitro* increases the levels of intracellular Ca^{2+} , and this has been associated with cell death or survival (Castano *et al.*, 2005; S. L. Hu *et al.*, 2014). Furthermore, during epidermal differentiation, intracellular Ca^{2+} induces the expression of differentiation-specific genes (Bikle *et al.*, 2012; Elias *et al.*, 2002; Tu *et al.*, 2012). Using our PPI network, we observed that, e.g., ROS sensor and the principal Ca^{2+} release channel on the lysosomal membrane mucolipin-1 (MCOLN1) (X. Zhang *et al.*, 2016) connected to the rest of the network through galectin-3. Galectins are critical elements of lysosomal damage signal transduction and are required for initiation of lysosome-specific autophagy (Jia *et al.*, 2018; Shin & Zoncu, 2018), cell adhesion, proliferation, and death (Perillo *et al.*, 1998), as well as differentiation of keratinocytes (Sarafian *et al.*, 2006). Interestingly, K10 serves as a link connecting galectin family proteins to other functional submodules in the network (Fig. 9). Overall, these findings suggest that K10 is the major hub connecting lysosomal damage response, differentiation,

autophagy, and apoptosis. *In vitro* validation of observed protein-protein interactions in primary keratinocytes after PDT would be a valuable confirmation of our modeling results.

Our results revealed a differential response of primary keratinocytes to photodamage induced by PSs with different localizations: cellular membranes damaging mTHPC-PDT promoted autophagic flux, aluminum phthalocyanines inducing lysosomal photodamage were more effective in evoking differentiation and apoptosis. Photodamage to lysosomal membranes by AlPcS_{2a} induced epidermal differentiation and apoptosis more efficiently than lysosomal lumen targeted AlPcS₄. K10 is at the center of the observed relationship of PDT-induced differentiation, apoptosis, and autophagy of the primary keratinocytes at the molecular level. It suggests the central role of K10 in cell fate decisions. We conclude that despite the importance of lysosomes for keratinocyte differentiation, PDT-induced lysosomal photodamage efficiently triggers the differentiation of primary keratinocytes.

This study examined the AlPcS_{2a}-PDT effect on epidermoid carcinoma cells A-431 and compared it with previously studied AlPcS_{2a}-PDT and mTHPC-PDT. Our results suggest that AlPcS_{2a}-PDT by damaging lysosomal membranes induced apoptosis in A-431 cells, and PDT mediated by AlPcS_{2a} is more effective in inducing apoptosis than the lysosomal lumen-damaging AlPcS₄.

Both apoptosis and autophagy can occur after PDT. Autophagy is considered a cytoprotective mechanism (Kessel *et al.*, 2006). However, it has also been observed as a cell death mechanism in response to PDT (Reiners *et al.*, 2010). Our results revealed that AlPcS_{2a}-PDT induced an increase in the amount of LC3-II protein, indicating the formation of autophagosomes, but the final stages of autophagy, the degradation of autophagosomes, does not occur. In our previous studies, lysosomal lumen-damaging AlPcS₄-PDT induced autophagic flux only after PDT at a low dose (Sasnauskienė, 2011). The impaired autophagic response is likely to occur in cells with photodamaged lysosomal membranes, lysosomal proteases, or molecules on which depend autophagosome-lysosome fusion.

PDT-induced oxidative stress also alters the expression of cytokines in cancer cells. Previously in our laboratory, we determined the increase of *IL1A* and *VEGFA* expression after mTHPC-PDT in A-431 cells. In this study, we examined the expression of these cytokines after AlPcS_{2a}-PDT. PDT-mediated by AlPcS_{2a} localized to lysosomal membranes increased the amount of *IL1A* and *VEGFA* transcripts. Compared to mTHPC-PDT and

AlPcS₄-PDT, the highest increase of proangiogenic *VEGF-A* was detected after AlPcS_{2a}-PDT, and the highest amount of the anti-inflammatory cytokine IL-1 α transcript was observed after cellular membranes localized mTHPC-PDT.

It should be noted that IL-1 α is a 'dual' function cytokine: it can bind to the cell surface receptor and initiate signal transduction, and the same cytokine has a nuclear localization sequence where it acts as a transcription factor (Baker *et al.*, 2019; Dinarello, 2018). To investigate the role of IL-1 α in *VEGF-A* synthesis, we reduced and increased the expression of IL-1 α protein in mTHPC-PDT A-431 cells. We reduced *IL1A* with chemically synthesized siRNAs, thereby reducing IL-1 α protein expression. Recombinant IL-1 α added to the cell culture medium significantly increased *VEGF-A* expression in PDT-untreated or PDT-treated cells (Dabkevičienė, 2010). This finding supported the suggestion that IL-1 α is one of the factors promoting *VEGF-A* expression.

PDT mediated by photosensitizers localized to lysosomal membranes (AlPcS_{2a}) and lysosomal lumen (AlPcS₄) induce apoptosis and initiate autophagosome formation, as well as increase the amount of *VEGFA* and *IL1A* transcripts in A-431 cells. PDT mediated by mTHPC localized to cellular membranes initiates apoptosis, but in contrast to aluminum phthalocyanines, it also induces autophagic flux. mTHPC-PDT increases the expression of *VEGF-A* and IL-1 α transcripts and proteins. IL-1 α is one of the factors promoting *VEGF-A* expression in A-431 cells.

Summing up, apoptosis was detected in HEKa and A-431 cells after each studied PDT. The amount of LC3-II protein, correlating with the number of autophagosomes, was increased in primary keratinocytes and cancer cells after mTHPC- and aluminum phthalocyanine-induced PDT. The strongest autophagic flux was detected after mTHPC-PDT, and AlPcS₄-PDT induced a weak autophagic flux at CtD25. The final stages of autophagy did not occur after AlPcS_{2a}-PDT in both primary keratinocytes and epidermoid carcinoma cells.

Although lysosomes are involved in the process of keratinocyte differentiation, the PDT damaging effect of aluminum phthalocyanines inhibits autophagic flux but triggers differentiation of primary keratinocytes.

CONCLUSIONS

1. The effect of photodynamic treatment of primary human epidermal keratinocytes depends on photosensitizer:
 - photodynamic treatment mediated by AlPcS_{2a} and AlPcS₄ photosensitizers localized to lysosomes induces differentiation of primary keratinocytes, whereas mTHPC-mediated photodynamic treatment – does not;
 - photodynamic treatment of primary human epidermal keratinocytes mediated by AlPcS_{2a} localized in lysosomal membranes, AlPcS₄ accumulated to the lysosomal lumen, and mTHPC distributed at cellular membranes initiates apoptosis and increases the number of autophagosomes; however, the autophagic flux occurs only after mTHPC-PDT and a low dose of AlPcS₄-PDT.
2. Based on the protein-protein interactions network, keratin 10 connects proteins of apoptosis, keratinocyte differentiation, autophagy, and lysosomal damage.
3. Photodynamic treatment of primary human epidermal keratinocytes mediated by mTHPC, AlPcS_{2a}, or AlPcS₄ does not change the transcript levels of cytokines *VEGFA* and *IL1A*.
4. Photodynamic treatment of human epidermoid carcinoma A-431 cells mediated by AlPcS_{2a} initiates apoptosis and increases the number of autophagosomes, but autophagic flux is not observed.
5. IL1- α stimulates the expression of VEGF-A after mTHPC-mediated photodynamic treatment in human epidermoid carcinoma A-431 cells.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abada, A., Elazar, Z. (2014). Getting ready for building: signaling and autophagosome biogenesis. *EMBO Rep*, 15(8), 839-852. doi:10.15252/embr.201439076
2. Abrahamse, H., Hamblin, M. R. (2016). New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem J*, 473(4), 347-364. doi:10.1042/BJ20150942
3. Agarwal, M. L., Clay, M. E., Harvey, E. J., Evans, H. H., Antunez, A. R., Oleinick, N. L. (1991). Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells. *Cancer Res*, 51(21), 5993-5996.
4. Ahmad, N., Gupta, S., Feyes, D. K., Mukhtar, H. (2000). Involvement of Fas (APO-1/CD-95) during photodynamic-therapy-mediated apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *J Invest Dermatol*, 115(6), 1041-1046. doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00147.x
5. Akinduro, O., Sully, K., Patel, A., Robinson, D. J., Chikh, A., McPhail, G., et al. (2016). Constitutive Autophagy and Nucleophagy during Epidermal Differentiation. *J Invest Dermatol*, 136(7), 1460-1470. doi:10.1016/j.jid.2016.03.016
6. Almeida, R. D., Manadas, B. J., Carvalho, A. P., Duarte, C. B. (2004). Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta*, 1704(2), 59-86. doi:10.1016/j.bbcan.2004.05.003
7. Andrzejak, M., Price, M., Kessel, D. H. (2011). Apoptotic and autophagic responses to photodynamic therapy in 1c1c7 murine hepatoma cells. *Autophagy*, 7(9), 979-984. doi:10.4161/auto.7.9.15865
8. Andrzejak, M., Santiago, M., Kessel, D. (2011). Effects of endosomal photodamage on membrane recycling and endocytosis. *Photochemistry and Photobiology*, 87(3), 699-706. doi:10.1111/j.1751-1097.2011.00890.x
9. Ashkenazi, A., Dixit, V. M. (1999). Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol*, 11(2), 255-260. doi:10.1016/s0955-0674(99)80034-9
10. Bacellar, I. O., Tsubone, T. M., Pavani, C., Baptista, M. S. (2015). Photodynamic Efficiency: From Molecular Photochemistry to Cell Death. *Int J Mol Sci*, 16(9), 20523-20559. doi:10.3390/ijms160920523
11. Baker, K. J., Houston, A., Brint, E. (2019). IL-1 Family Members in Cancer; Two Sides to Every Story. *Front Immunol*, 10, 1197. doi:10.3389/fimmu.2019.01197
12. Ballabio, A., Bonifacino, J. S. (2020). Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 21(2), 101-118. doi:10.1038/s41580-019-0185-4
13. Baroni, A., Buommino, E., De Gregorio, V., Ruocco, E., Ruocco, V., Wolf, R. (2012). Structure and function of the epidermis related to

- barrier properties. *Clin Dermatol*, 30(3), 257-262. doi:10.1016/j.clindermatol.2011.08.007
14. Barrandon, Y., Green, H. (1985). Cell size as a determinant of the clone-forming ability of human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(16), 5390-5394. doi:10.1073/pnas.82.16.5390
 15. Bazak, J., Fahey, J. M., Wawak, K., Korytowski, W., Girotti, A. W. (2017). Bystander effects of nitric oxide in anti-tumor photodynamic therapy. *Cancer Cell Microenviron*, 4(1). doi:10.14800/ccm.1511
 16. Beaufay, H., Amar-Costesec, A., Feytmans, E., Thines-Sempoux, D., Wibo, M., Robbi, M., *et al.* (1974). Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. I. Biochemical methods. *J Cell Biol*, 61(1), 188-200. doi:10.1083/jcb.61.1.188
 17. Bedoui, S., Herold, M. J., Strasser, A. (2020). Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 21(11), 678-695. doi:10.1038/s41580-020-0270-8
 18. Ben-Dror, S., Bronshtein, I., Wiehe, A., Roder, B., Senge, M. O., Ehrenberg, B. (2006). On the correlation between hydrophobicity, liposome binding and cellular uptake of porphyrin sensitizers. *Photochemistry and Photobiology*, 82(3), 695-701. doi:10.1562/2005-09-01-RA-669
 19. Berg, K., Moan, J. (1994). Lysosomes as photochemical targets. *Int J Cancer*, 59(6), 814-822.
 20. Berman, B., Cockerell, C. J. (2013). Pathobiology of actinic keratosis: ultraviolet-dependent keratinocyte proliferation. *J Am Acad Dermatol*, 68(1 Suppl 1), S10-19. doi:10.1016/j.jaad.2012.09.053
 21. Bersudsky, M., Luski, L., Fishman, D., White, R. M., Ziv-Sokolovskaya, N., Dotan, S., *et al.* (2014). Non-redundant properties of IL-1alpha and IL-1beta during acute colon inflammation in mice. *Gut*, 63(4), 598-609. doi:10.1136/gutjnl-2012-303329
 22. Bertram, J. S. (2000). The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med*, 21(6), 167-223. doi:10.1016/s0098-2997(00)00007-8
 23. Bhuvaneswari, R., Gan, Y. Y., Soo, K. C., Olivo, M. (2009). The effect of photodynamic therapy on tumor angiogenesis. *Cell Mol Life Sci*, 66(14), 2275-2283. doi:10.1007/s00018-009-0016-4
 24. Biel, M. A. (2010). Photodynamic therapy of bacterial and fungal biofilm infections. *Methods Mol Biol*, 635, 175-194. doi:10.1007/978-1-60761-697-9_13
 25. Bikle, D. D., Xie, Z., Tu, C. L. (2012). Calcium regulation of keratinocyte differentiation. *Expert Rev Endocrinol Metab*, 7(4), 461-472. doi:10.1586/eem.12.34
 26. Blanpain, C., Fuchs, E. (2009). Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(3), 207-217. doi:10.1038/nrm2636

27. Blanpain, C., Horsley, V., Fuchs, E. (2007). Epithelial stem cells: turning over new leaves. *Cell*, 128(3), 445-458. doi:10.1016/j.cell.2007.01.014
28. Bock, F. J., Tait, S. W. G. (2020). Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 21(2), 85-100. doi:10.1038/s41580-019-0173-8
29. Borgia, F., Giuffrida, R., Caradonna, E., Vaccaro, M., Guarneri, F., Cannavo, S. P. (2018). Early and Late Onset Side Effects of Photodynamic Therapy. *Biomedicines*, 6(1). doi:10.3390/biomedicines6010012
30. Borradori, L., Sonnenberg, A. (1999). Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *J Invest Dermatol*, 112(4), 411-418. doi:10.1046/j.1523-1747.1999.00546.x
31. Boulais, N., Misery, L. (2008). The epidermis: a sensory tissue. *Eur J Dermatol*, 18(2), 119-127. doi:10.1684/ejd.2008.0348
32. Bredesen, D. E., Mehlen, P., Rabizadeh, S. (2004). Apoptosis and dependence receptors: a molecular basis for cellular addiction. *Physiol Rev*, 84(2), 411-430. doi:10.1152/physrev.00027.2003
33. Brilkina, A. A., Dubasova, L. V., Sergeeva, E. A., Pospelov, A. J., Shilyagina, N. Y., Shakhova, N. M., *et al.* (2019). Photobiological properties of phthalocyanine photosensitizers Photosens, Holosens and Phthalosens: A comparative in vitro analysis. *J Photochem Photobiol B*, 191, 128-134. doi:10.1016/j.jphotobiol.2018.12.020
34. Broekgaarden, M., Weijer, R., van Gulik, T. M., Hamblin, M. R., Heger, M. (2015). Tumor cell survival pathways activated by photodynamic therapy: a molecular basis for pharmacological inhibition strategies. *Cancer Metastasis Rev*, 34(4), 643-690. doi:10.1007/s10555-015-9588-7
35. Brooke, M. A., Nitoiu, D., Kelsell, D. P. (2012). Cell-cell connectivity: desmosomes and disease. *J Pathol*, 226(2), 158-171. doi:10.1002/path.3027
36. Candi, E., Schmidt, R., Melino, G. (2005). The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(4), 328-340. doi:10.1038/nrm1619
37. Castano, A. P., Demidova, T. N., Hamblin, M. R. (2005). Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2(1), 1-23. doi:10.1016/S1572-1000(05)00030-X
38. Cecic, I., Korbelik, M. (2002). Mediators of peripheral blood neutrophilia induced by photodynamic therapy of solid tumors. *Cancer Lett*, 183(1), 43-51. doi:10.1016/s0304-3835(02)00092-7
39. Chen, H., Xiao, L., Anraku, Y., Mi, P., Liu, X., Cabral, H., *et al.* (2014). Polyion complex vesicles for photoinduced intracellular delivery of amphiphilic photosensitizer. *J Am Chem Soc*, 136(1), 157-163. doi:10.1021/ja406992w

40. Chiu, S. M., Xue, L. Y., Lam, M., Rodriguez, M. E., Zhang, P., Kenney, M. E., *et al.* (2010). A requirement for bid for induction of apoptosis by photodynamic therapy with a lysosome- but not a mitochondrion-targeted photosensitizer. *Photochemistry and Photobiology*, 86(5), 1161-1173. doi:10.1111/j.1751-1097.2010.00766.x
41. Choi, Y. M., Adelzadeh, L., Wu, J. J. (2015). Photodynamic therapy for psoriasis. *J Dermatolog Treat*, 26(3), 202-207. doi:10.3109/09546634.2014.927816
42. Choquet, H., Ashrafzadeh, S., Kim, Y., Asgari, M. M., Jorgenson, E. (2020). Genetic and environmental factors underlying keratinocyte carcinoma risk. *JCI Insight*, 5(10). doi:10.1172/jci.insight.134783
43. Cloutier, J. M., Hsi, A., Camacho, C., Lazova, R. (2020). Necrotic Keratinocytes Are Common in Psoriasis and Have a Predilection to the Upper Epidermis: A Quantitative and Comparative Analysis. *Am J Dermatopathol*, 42(1), 20-23. doi:10.1097/DAD.0000000000001444
44. Costanzo, A., Fausti, F., Spallone, G., Moretti, F., Narcisi, A., Botti, E. (2015). Programmed cell death in the skin. *Int J Dev Biol*, 59(1-3), 73-78. doi:10.1387/ijdb.150050ac
45. Crous, A., Sundar, S., Kumar, D., Abrahamse, H. (2019). Effect of dose responses of hydrophilic aluminium (III) phthalocyanine chloride tetrasulphonate based photosensitizer on lung cancer cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 194, 96-106. doi:10.1016/j.jphotobiol.2019.03.018
46. Cumberbatch, M., Dearman, R. J., Griffiths, C. E., Kimber, I. (2003). Epidermal Langerhans cell migration and sensitisation to chemical allergens. *APMIS*, 111(7-8), 797-804. doi:10.1034/j.1600-0463.2003.11107811.x
47. Cummings, B. S., Schnellmann, R. G. (2004). Measurement of cell death in mammalian cells. *Curr Protoc Pharmacol*, Chapter 12, Unit 12 18. doi:10.1002/0471141755.ph1208s25
48. Cummings, B. S., Wills, L. P., Schnellmann, R. G. (2012). Measurement of cell death in Mammalian cells. *Curr Protoc Pharmacol*, Chapter 12, Unit12 18. doi:10.1002/0471141755.ph1208s56
49. Dabkevičienė, D. (2010). *Citotoksinių poveikių skatinama citokinų VEGFA ir IL-1α raiška in vitro ir in vivo.* (Daktaro disertacija.), Vilniaus universitetas, Vilnius.
50. Dabkevičienė, D., Sasnauskienė, A., Leman, E., Kvietkauskaitė, R., Daugelavičienė, N., Stankevičius, V., *et al.* (2012). mTHPC-mediated photodynamic treatment up-regulates the cytokines VEGF and IL-1α. *Photochemistry and Photobiology*, 88(2), 432-439. doi:10.1111/j.1751-1097.2011.01062.x
51. Daugelavičienė, N., Grigaitis, P., Gasiule, L., Dabkevičienė, D., Neniskyte, U., Sasnauskienė, A. (2021). Lysosome-targeted

- photodynamic treatment induces primary keratinocyte differentiation. *J Photochem Photobiol B*, 218, 112183. doi:10.1016/j.jphotobiol.2021.112183
52. Davies, M. J. (2005). The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta*, 1703(2), 93-109. doi:10.1016/j.bbapap.2004.08.007
 53. Davies, M. J. (2016). Protein oxidation and peroxidation. *Biochem J*, 473(7), 805-825. doi:10.1042/BJ20151227
 54. de Pedro, I., Alonso-Lecue, P., Sanz-Gomez, N., Freije, A., Gandarillas, A. (2018). Sublethal UV irradiation induces squamous differentiation via a p53-independent, DNA damage-mitosis checkpoint. *Cell Death Dis*, 9(11), 1094. doi:10.1038/s41419-018-1130-8
 55. de Visscher, S. A., Melchers, L. J., Dijkstra, P. U., Karakullukcu, B., Tan, I. B., Hopper, C., *et al.* (2013). mTHPC-mediated photodynamic therapy of early stage oral squamous cell carcinoma: a comparison to surgical treatment. *Ann Surg Oncol*, 20(9), 3076-3082. doi:10.1245/s10434-013-3006-6
 56. Denecker, G., Ovaere, P., Vandenabeele, P., Declercq, W. (2008). Caspase-14 reveals its secrets. *J Cell Biol*, 180(3), 451-458. doi:10.1083/jcb.200709098
 57. Denizot, F., Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*, 89(2), 271-277. doi:10.1016/0022-1759(86)90368-6
 58. Dewaele, M., Martinet, W., Rubio, N., Verfaillie, T., de Witte, P. A., Piette, J., *et al.* (2011). Autophagy pathways activated in response to PDT contribute to cell resistance against ROS damage. *J Cell Mol Med*, 15(6), 1402-1414. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01118.x
 59. Di Mascio, P., Martinez, G. R., Miyamoto, S., Ronsein, G. E., Medeiros, M. H. G., Cadet, J. (2019). Singlet Molecular Oxygen Reactions with Nucleic Acids, Lipids, and Proteins. *Chem Rev*, 119(3), 2043-2086. doi:10.1021/acs.chemrev.8b00554
 60. Di Paolo, N. C., Shayakhmetov, D. M. (2016). Interleukin 1alpha and the inflammatory process. *Nat Immunol*, 17(8), 906-913. doi:10.1038/ni.3503
 61. Dikic, I., Elazar, Z. (2018). Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19(6), 349-364. doi:10.1038/s41580-018-0003-4
 62. Dinarello, C. A. (2018). Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev*, 281(1), 8-27. doi:10.1111/imr.12621
 63. Ding, H., Yu, H., Dong, Y., Tian, R., Huang, G., Boothman, D. A., *et al.* (2011). Photoactivation switch from type II to type I reactions by electron-rich micelles for improved photodynamic therapy of cancer

- cells under hypoxia. *J Control Release*, 156(3), 276-280. doi:10.1016/j.jconrel.2011.08.019
64. Domagala, A., Stachura, J., Gabrysiak, M., Muchowicz, A., Zagodzón, R., Golab, J., *et al.* (2018). Inhibition of autophagy sensitizes cancer cells to Photofrin-based photodynamic therapy. *BMC Cancer*, 18(1), 210. doi:10.1186/s12885-018-4126-y
 65. Donohoe, C., Senge, M. O., Arnaut, L. G., Gomes-da-Silva, L. C. (2019). Cell death in photodynamic therapy: From oxidative stress to anti-tumor immunity. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 1872(2), 188308. doi:10.1016/j.bbcan.2019.07.003
 66. Eckert, R. L., Sturniolo, M. T., Broome, A. M., Ruse, M., Rorke, E. A. (2005). Transglutaminase function in epidermis. *J Invest Dermatol*, 124(3), 481-492. doi:10.1111/j.0022-202X.2005.23627.x
 67. Eckert, R. L., Yaffe, M. B., Crish, J. F., Murthy, S., Rorke, E. A., Welter, J. F. (1993). Involucrin - Structure and Role in Envelope Assembly. *Journal of Investigative Dermatology*, 100(5), 613-617. doi:10.1111/1523-1747.Ep12472288
 68. Eckhart, L., Declercq, W., Ban, J., Rendl, M., Lengauer, B., Mayer, C., *et al.* (2000). Terminal differentiation of human keratinocytes and stratum corneum formation is associated with caspase-14 activation. *J Invest Dermatol*, 115(6), 1148-1151. doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00205.x
 69. Eckhart, L., Lippens, S., Tschachler, E., Declercq, W. (2013). Cell death by cornification. *Biochim Biophys Acta*, 1833(12), 3471-3480. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.06.010
 70. Eckhart, L., Zeeuwen, P. (2018). The skin barrier: Epidermis vs environment. *Exp Dermatol*, 27(8), 805-806. doi:10.1111/exd.13731
 71. Elias, P. M., Ahn, S. K., Denda, M., Brown, B. E., Crumrine, D., Kimutai, L. K., *et al.* (2002). Modulations in epidermal calcium regulate the expression of differentiation-specific markers. *J Invest Dermatol*, 119(5), 1128-1136. doi:10.1046/j.1523-1747.2002.19512.x
 72. EMA. (2001). European Medicines Agency: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/foscanepar-product-information_lt.pdf. 2022
 73. Fahey, E., Doyle, S. L. (2019). IL-1 Family Cytokine Regulation of Vascular Permeability and Angiogenesis. *Front Immunol*, 10, 1426. doi:10.3389/fimmu.2019.01426
 74. Falk-Mahapatra, R., Gollnick, S. O. (2020). Photodynamic Therapy and Immunity: An Update. *Photochemistry and Photobiology*, 96(3), 550-559. doi:10.1111/php.13253
 75. Fan, W., Huang, P., Chen, X. (2016). Overcoming the Achilles' heel of photodynamic therapy. *Chem Soc Rev*, 45(23), 6488-6519. doi:10.1039/c6cs00616g

76. Ferrara, N., Adamis, A. P. (2016). Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 15(6), 385-403. doi:10.1038/nrd.2015.17
77. Ferrario, A., Fisher, A. M., Rucker, N., Gomer, C. J. (2005). Celecoxib and NS-398 enhance photodynamic therapy by increasing in vitro apoptosis and decreasing in vivo inflammatory and angiogenic factors. *Cancer Res*, 65(20), 9473-9478. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1659
78. Ferrario, A., von Tiehl, K. F., Rucker, N., Schwarz, M. A., Gill, P. S., Gomer, C. J. (2000). Antiangiogenic treatment enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary carcinoma. *Cancer Res*, 60(15), 4066-4069.
79. Fouad, Y. A., Aanei, C. (2017). Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res*, 7(5), 1016-1036.
80. Fuchs, E., Green, H. (1980). Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell*, 19(4), 1033-1042. doi:10.1016/0092-8674(80)90094-x
81. Fuchs, E., Raghavan, S. (2002). Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nature Reviews Genetics*, 3(3), 199-209. doi:10.1038/Nrg758
82. Fuchslocher Chico, J., Saggau, C., Adam, D. (2017). Proteolytic control of regulated necrosis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1864(11 Pt B), 2147-2161. doi:10.1016/j.bbamcr.2017.05.025
83. Gallagher-Colombo, S. M., Maas, A. L., Yuan, M., Busch, T. M. (2012). Photodynamic therapy-induced angiogenic signaling: consequences and solutions to improve therapeutic response. *Isr J Chem*, 52(8-9), 681-690. doi:10.1002/ijch.201200011
84. Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Kroemer, G. (2014). Organelle-specific initiation of cell death. *Nat Cell Biol*, 16(8), 728-736. doi:10.1038/ncb3005
85. Galluzzi, L., Kroemer, G. (2008). Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell*, 135(7), 1161-1163. doi:10.1016/j.cell.2008.12.004
86. Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., et al. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*, 25(3), 486-541. doi:10.1038/s41418-017-0012-4
87. Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., et al. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*, 19(1), 107-120. doi:10.1038/cdd.2011.96
88. Gan, S. Q., McBride, O. W., Idler, W. W., Markova, N., Steinert, P. M. (1990). Organization, structure, and polymorphisms of the human profilaggrin gene. *Biochemistry*, 29(40), 9432-9440. doi:10.1021/bi00492a018

89. Garg, A. D., Maes, H., Romano, E., Agostinis, P. (2015). Autophagy, a major adaptation pathway shaping cancer cell death and anticancer immunity responses following photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci*, 14(8), 1410-1424. doi:10.1039/c4pp00466c
90. Garlanda, C., Dinarello, C. A., Mantovani, A. (2013). The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*, 39(6), 1003-1018. doi:10.1016/j.immuni.2013.11.010
91. Gdula, M. R., Poterlowicz, K., Mardaryev, A. N., Sharov, A. A., Peng, Y., Fessing, M. Y., *et al.* (2013). Remodeling of three-dimensional organization of the nucleus during terminal keratinocyte differentiation in the epidermis. *J Invest Dermatol*, 133(9), 2191-2201. doi:10.1038/jid.2013.66
92. Gijssens, A., Derycke, A., Missiaen, L., De Vos, D., Huwyler, J., Eberle, A., *et al.* (2002). Targeting of the photocytotoxic compound AlPcS4 to Hela cells by transferrin conjugated PEG-liposomes. *Int J Cancer*, 101(1), 78-85. doi:10.1002/ijc.10548
93. Gkegkes, I. D., Aroni, K., Agrogiannis, G., Patsouris, E. S., Konstantinidou, A. E. (2013). Expression of caspase-14 and keratin-19 in the human epidermis and appendages during fetal skin development. *Arch Dermatol Res*, 305(5), 379-387. doi:10.1007/s00403-013-1319-8
94. Gollnick, S. O., Evans, S. S., Baumann, H., Owczarczak, B., Maier, P., Vaughan, L., *et al.* (2003). Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation. *Br J Cancer*, 88(11), 1772-1779. doi:10.1038/sj.bjc.6600864
95. Gomes-da-Silva, L. C., Zhao, L., Bezu, L., Zhou, H., Sauvat, A., Liu, P., *et al.* (2018). Photodynamic therapy with redaporfin targets the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *EMBO J*, 37(13). doi:10.15252/embj.201798354
96. Gomes, E. R., Cruz, T., Lopes, C. F., Carvalho, A. P., Duarte, C. B. (1999). Photosensitization of lymphoblastoid cells with phthalocyanines at different saturating incubation times. *Cell Biol Toxicol*, 15(4), 249-260. doi:10.1023/a:1007615813184
97. Gorlach, A., Bertram, K., Hudecova, S., Krizanov, O. (2015). Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol*, 6, 260-271. doi:10.1016/j.redox.2015.08.010
98. Grone, A. (2002). Keratinocytes and cytokines. *Vet Immunol Immunopathol*, 88(1-2), 1-12. doi:10.1016/s0165-2427(02)00136-8
99. Gu, L. H., Coulombe, P. A. (2007). Keratin function in skin epithelia: a broadening palette with surprising shades. *Curr Opin Cell Biol*, 19(1), 13-23. doi:10.1016/j.jceb.2006.12.007
100. Gunaydin, G., Gedik, M. E., Ayan, S. (2021). Photodynamic Therapy for the Treatment and Diagnosis of Cancer-A Review of the Current Clinical Status. *Front Chem*, 9, 686303. doi:10.3389/fchem.2021.686303

101. Hadjira, R., Jean-Louis, M., Nadia, Z., Dominique, L., Sophie, M., Carole, R., *et al.* (1996). *Cellular uptake kinetics and photodynamic activity of meso-tetrahydroxyphenylchlorin (mTHPC)*. Paper presented at the Proc.SPIE.
102. Haimov-Talmoud, E., Harel, Y., Schori, H., Motiei, M., Atkins, A., Popovtzer, R., *et al.* (2019). Magnetic Targeting of mTHPC To Improve the Selectivity and Efficiency of Photodynamic Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces*, 11(49), 45368-45380. doi:10.1021/acsami.9b14060
103. Hak, A., Ravasaheb Shinde, V., Rengan, A. K. (2021). A review of advanced nanoformulations in phototherapy for cancer therapeutics. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 33, 102205. doi:10.1016/j.pdpdt.2021.102205
104. Hamblin, M. R. (2020). Photodynamic Therapy for Cancer: What's Past is Prologue. *Photochemistry and Photobiology*, 96(3), 506-516. doi:10.1111/php.13190
105. Hesse, M., Zimek, A., Weber, K., Magin, T. M. (2004). Comprehensive analysis of keratin gene clusters in humans and rodents. *Eur J Cell Biol*, 83(1), 19-26. doi:10.1078/0171-9335-00354
106. Hitomi, K. (2005). [Protein modification by transglutaminase]. *Seikagaku*, 77(6), 552-558.
107. Hogset, A., Prasmickaite, L., Selbo, P. K., Hellum, M., Engesaeter, B. O., Bonsted, A., *et al.* (2004). Photochemical internalisation in drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 56(1), 95-115. doi:10.1016/j.addr.2003.08.016
108. Hoste, E., Kemperman, P., Devos, M., Denecker, G., Kezic, S., Yau, N., *et al.* (2011). Caspase-14 is required for filaggrin degradation to natural moisturizing factors in the skin. *J Invest Dermatol*, 131(11), 2233-2241. doi:10.1038/jid.2011.153
109. Hu, S. L., Du, P., Hu, R., Li, F., Feng, H. (2014). Imbalance of Ca²⁺ and K⁺ fluxes in C6 glioma cells after PDT measured with scanning ion-selective electrode technique. *Lasers Med Sci*, 29(3), 1261-1267. doi:10.1007/s10103-014-1518-3
110. Hu, W., Ma, H., Hou, B., Zhao, H., Ji, Y., Jiang, R., *et al.* (2016). Engineering Lysosome-Targeting BODIPY Nanoparticles for Photoacoustic Imaging and Photodynamic Therapy under Near-Infrared Light. *ACS Appl Mater Interfaces*, 8(19), 12039-12047. doi:10.1021/acsami.6b02721
111. Hung, Y. H., Chen, L. M., Yang, J. Y., Yang, W. Y. (2013). Spatiotemporally controlled induction of autophagy-mediated lysosome turnover. *Nat Commun*, 4, 2111. doi:10.1038/ncomms3111
112. Inpanathan, S., Botelho, R. J. (2019). The Lysosome Signaling Platform: Adapting With the Times. *Front Cell Dev Biol*, 7, 113. doi:10.3389/fcell.2019.00113

113. Ipponjima, S., Umino, Y., Nagayama, M., Denda, M. (2020). Live imaging of alterations in cellular morphology and organelles during cornification using an epidermal equivalent model. *Sci Rep*, 10(1), 5515. doi:10.1038/s41598-020-62240-3
114. Ishida-Yamamoto, A., Igawa, S., Kishibe, M. (2011). Order and disorder in corneocyte adhesion. *J Dermatol*, 38(7), 645-654. doi:10.1111/j.1346-8138.2011.01227.x
115. Ishida-Yamamoto, A., Kartasova, T., Matsuo, S., Kuroki, T., Iizuka, H. (1997). Involucrin and SPRR are synthesized sequentially in differentiating cultured epidermal cells. *J Invest Dermatol*, 108(1), 12-16. doi:10.1111/1523-1747.ep12285611
116. Itakura, E., Kishi, C., Inoue, K., Mizushima, N. (2008). Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol Biol Cell*, 19(12), 5360-5372. doi:10.1091/mbc.E08-01-0080
117. Ito, M. (1984). Microassay for studying anticellular effects of human interferons. *J Interferon Res*, 4(4), 603-608. doi:10.1089/jir.1984.4.603
118. Jacob, J. T., Coulombe, P. A., Kwan, R., Omary, M. B. (2018). Types I and II Keratin Intermediate Filaments. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 10(4). doi:10.1101/cshperspect.a018275
119. Jaeger, K., Sukserree, S., Zhong, S., Phinney, B. S., Mlitz, V., Buchberger, M., et al. (2019). Cornification of nail keratinocytes requires autophagy for bulk degradation of intracellular proteins while sparing components of the cytoskeleton. *Apoptosis*, 24(1-2), 62-73. doi:10.1007/s10495-018-1505-4
120. Jerjes, W., Theodossiou, T. A., Hirschberg, H., Hogset, A., Weyergang, A., Selbo, P. K., et al. (2020). Photochemical Internalization for Intracellular Drug Delivery. From Basic Mechanisms to Clinical Research. *J Clin Med*, 9(2). doi:10.3390/jcm9020528
121. Jia, J., Abudu, Y. P., Claude-Taupin, A., Gu, Y., Kumar, S., Choi, S. W., et al. (2018). Galectins Control mTOR in Response to Endomembrane Damage. *Mol Cell*, 70(1), 120-135 e128. doi:10.1016/j.molcel.2018.03.009
122. Jiang, F., Zhang, X., Kalkanis, S. N., Zhang, Z., Yang, H., Katakowski, M., et al. (2008). Combination therapy with antiangiogenic treatment and photodynamic therapy for the nude mouse bearing U87 glioblastoma. *Photochemistry and Photobiology*, 84(1), 128-137. doi:10.1111/j.1751-1097.2007.00208.x
123. Kalinin, A., Marekov, L. N., Steinert, P. M. (2001). Assembly of the epidermal cornified cell envelope. *J Cell Sci*, 114(Pt 17), 3069-3070.
124. Kalinin, A. E., Kajava, A. V., Steinert, P. M. (2002). Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope. *Bioessays*, 24(9), 789-800. doi:10.1002/bies.10144

125. Karges, J. (2022). Clinical Development of Metal Complexes as Photosensitizers for Photodynamic Therapy of Cancer. *Angew Chem Int Ed Engl*, 61(5), e202112236. doi:10.1002/anie.202112236
126. Karmakar, S., Banik, N. L., Patel, S. J., Ray, S. K. (2007). 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy suppressed survival factors and activated proteases for apoptosis in human glioblastoma U87MG cells. *Neurosci Lett*, 415(3), 242-247. doi:10.1016/j.neulet.2007.01.071
127. Kataoka, S., Hattori, K., Date, A., Tamura, H. (2013). Human keratinocyte caspase-14 expression is altered in human epidermal 3D models by dexamethasone and by natural products used in cosmetics. *Arch Dermatol Res*, 305(8), 683-689. doi:10.1007/s00403-013-1359-0
128. Kaur, J., Debnath, J. (2015). Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16(8), 461-472. doi:10.1038/nrm4024
129. Kawczyk-Krupka, A., Kwiatek, B., Czuba, Z. P., Mertas, A., Latos, W., Verwanger, T., et al. (2018). Secretion of the angiogenic factor VEGF after photodynamic therapy with ALA under hypoxia-like conditions in colon cancer cells. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 21, 16-18. doi:10.1016/j.pdpdt.2017.10.020
130. Kessel, D. (2019a). Apoptosis, Paraptosis and Autophagy: Death and Survival Pathways Associated with Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 95(1), 119-125. doi:10.1111/php.12952
131. Kessel, D. (2019b). Photodynamic Therapy: A Brief History. *J Clin Med*, 8(10). doi:10.3390/jcm8101581
132. Kessel, D. (2020). Photodynamic therapy: apoptosis, paraptosis and beyond. *Apoptosis*, 25(9-10), 611-615. doi:10.1007/s10495-020-01634-0
133. Kessel, D., Castelli, M. (2001). Evidence that bcl-2 is the target of three photosensitizers that induce a rapid apoptotic response. *Photochemistry and Photobiology*, 74(2), 318-322. doi:10.1562/0031-8655(2001)074<0318:etbitt>2.0.co;2
134. Kessel, D., Luo, Y., Mathieu, P., Reiners, J. J., Jr. (2000). Determinants of the apoptotic response to lysosomal photodamage. *Photochemistry and Photobiology*, 71(2), 196-200. doi:10.1562/0031-8655(2000)071<0196:dotart>2.0.co;2
135. Kessel, D., Oleinick, N. L. (2018). Cell Death Pathways Associated with Photodynamic Therapy: An Update. *Photochemistry and Photobiology*, 94(2), 213-218. doi:10.1111/php.12857
136. Kessel, D., Reiners, J. J., Jr. (2007). Apoptosis and autophagy after mitochondrial or endoplasmic reticulum photodamage. *Photochemistry and Photobiology*, 83(5), 1024-1028. doi:10.1111/j.1751-1097.2007.00088.x

137. Kessel, D., Vicente, M. G., Reiners, J. J., Jr. (2006). Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy. *Lasers Surg Med*, 38(5), 482-488. doi:10.1002/lsm.20334
138. Kiffin, R., Bandyopadhyay, U., Cuervo, A. M. (2006). Oxidative stress and autophagy. *Antioxid Redox Signal*, 8(1-2), 152-162. doi:10.1089/ars.2006.8.152
139. Kim, M., Jung, H. Y., Park, H. J. (2015). Topical PDT in the Treatment of Benign Skin Diseases: Principles and New Applications. *Int J Mol Sci*, 16(10), 23259-23278. doi:10.3390/ijms161023259
140. Kimura, Y. N., Watari, K., Fotovati, A., Hosoi, F., Yasumoto, K., Izumi, H., *et al.* (2007). Inflammatory stimuli from macrophages and cancer cells synergistically promote tumor growth and angiogenesis. *Cancer Sci*, 98(12), 2009-2018. doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00633.x
141. Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., *et al.* (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*, 14(22), 5579-5588.
142. Kissova, I., Salin, B., Schaeffer, J., Bhatia, S., Manon, S., Camougrand, N. (2007). Selective and non-selective autophagic degradation of mitochondria in yeast. *Autophagy*, 3(4), 329-336. doi:10.4161/auto.4034
143. Koch, P. J., Roop, D. R. (2004). The role of keratins in epidermal development and homeostasis--going beyond the obvious. *J Invest Dermatol*, 123(5), x-xi. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.23495.x
144. Koenig, U., Robenek, H., Barresi, C., Brandstetter, M., Resch, G. P., Groger, M., *et al.* (2020). Cell death induced autophagy contributes to terminal differentiation of skin and skin appendages. *Autophagy*, 16(5), 932-945. doi:10.1080/15548627.2019.1646552
145. Kolly, C., Suter, M. M., Muller, E. J. (2005). Proliferation, cell cycle exit, and onset of terminal differentiation in cultured keratinocytes: pre-programmed pathways in control of C-Myc and Notch1 prevail over extracellular calcium signals. *J Invest Dermatol*, 124(5), 1014-1025. doi:10.1111/j.0022-202X.2005.23655.x
146. Koon, H. K., Lo, K. W., Leung, K. N., Lung, M. L., Chang, C. C., Wong, R. N., *et al.* (2010). Photodynamic therapy-mediated modulation of inflammatory cytokine production by Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells. *Cell Mol Immunol*, 7(4), 323-326. doi:10.1038/cmi.2010.4
147. Kopetz, S., Hoff, P. M., Morris, J. S., Wolff, R. A., Eng, C., Glover, K. Y., *et al.* (2010). Phase II trial of infusional fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab for metastatic colorectal cancer: efficacy and circulating angiogenic biomarkers associated with therapeutic resistance. *J Clin Oncol*, 28(3), 453-459. doi:10.1200/JCO.2009.24.8252
148. Korbely, M. (2009). Complement upregulation in photodynamic therapy-treated tumors: Role of Toll-like receptor pathway and

- NFkappaB. *Cancer Lett*, 281(2), 232-238. doi:10.1016/j.canlet.2009.02.049
149. Kou, J., Dou, D., Yang, L. (2017). Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications. *Oncotarget*, 8(46), 81591-81603. doi:10.18632/oncotarget.20189
 150. Koval, J., Mikes, J., Jendzelovsky, R., Kello, M., Solar, P., Fedorocko, P. (2010). Degradation of HER2 receptor through hypericin-mediated photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 86(1), 200-205. doi:10.1111/j.1751-1097.2009.00639.x
 151. Kroemer, G., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Peter, M. E., Vaux, D., Vandenabeele, P., *et al.* (2005). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ*, 12 Suppl 2, 1463-1467. doi:10.1038/sj.cdd.4401724
 152. Kroemer, G., Marino, G., Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*, 40(2), 280-293. doi:10.1016/j.molcel.2010.09.023
 153. Kwiatkowski, S., Knap, B., Przystupski, D., Saczko, J., Kedzierska, E., Knap-Czop, K., *et al.* (2018). Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed Pharmacother*, 106, 1098-1107. doi:10.1016/j.biopha.2018.07.049
 154. Labanauskiene, J., Satkauskas, S., Kirveliėne, V., Venslauskas, M., Atkocius, V., Didziapetriėne, J. (2009). Enhancement of photodynamic tumor therapy effectiveness by electroporation in vitro. *Medicina (Kaunas)*, 45(5), 372-377.
 155. Lai-Cheong, J. E., McGrath, J. A. (2009). Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine*, 37(5), 223-226. doi:10.1016/j.mpmed.2009.03.002
 156. Lange, C., Lehmann, C., Mahler, M., Bednarski, P. J. (2019). Comparison of Cellular Death Pathways after mTHPC-mediated Photodynamic Therapy (PDT) in Five Human Cancer Cell Lines. *Cancers (Basel)*, 11(5). doi:10.3390/cancers11050702
 157. Lawrence, R. E., Zoncu, R. (2019). The lysosome as a cellular centre for signalling, metabolism and quality control. *Nat Cell Biol*, 21(2), 133-142. doi:10.1038/s41556-018-0244-7
 158. Lee-Six, H., Olafsson, S., Ellis, P., Osborne, R. J., Sanders, M. A., Moore, L., *et al.* (2019). The landscape of somatic mutation in normal colorectal epithelial cells. *Nature*, 574(7779), 532-537. doi:10.1038/s41586-019-1672-7
 159. Lee, Y., Overholtzer, M. (2019). After-Death Functions of Cell Death. *Yale J Biol Med*, 92(4), 687-694.
 160. Leo, A. J. (1993). Calculating log Poct from structures. *Chem Rev*, 93(4), 1281-1306. doi:10.1021/cr00020a001
 161. Leon, X., Bothe, C., Garcia, J., Parreno, M., Alcolea, S., Quer, M., *et al.* (2015). Expression of IL-1alpha correlates with distant metastasis in

- patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 6(35), 37398-37409. doi:10.18632/oncotarget.6054
162. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., *et al.* (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91(4), 479-489. doi:10.1016/s0092-8674(00)80434-1
 163. Licata, L., Briganti, L., Peluso, D., Perfetto, L., Iannuccelli, M., Galeota, E., *et al.* (2012). MINT, the molecular interaction database: 2012 update. *Nucleic Acids Res*, 40(Database issue), D857-861. doi:10.1093/nar/gkr930
 164. Lippens, S., Denecker, G., Ovaere, P., Vandenabeele, P., Declercq, W. (2005). Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification. *Cell Death Differ*, 12 Suppl 2, 1497-1508. doi:10.1038/sj.cdd.4401722
 165. Lippens, S., Kockx, M., Knaapen, M., Mortier, L., Polakowska, R., Verheyen, A., *et al.* (2000). Epidermal differentiation does not involve the pro-apoptotic executioner caspases, but is associated with caspase-14 induction and processing. *Cell Death Differ*, 7(12), 1218-1224. doi:10.1038/sj.cdd.4400785
 166. Litmanovich, A., Khazim, K., Cohen, I. (2018). The Role of Interleukin-1 in the Pathogenesis of Cancer and its Potential as a Therapeutic Target in Clinical Practice. *Oncol Ther*, 6(2), 109-127. doi:10.1007/s40487-018-0089-z
 167. Lumpkin, E. A., Bautista, D. M. (2005). Feeling the pressure in mammalian somatosensation. *Curr Opin Neurobiol*, 15(4), 382-388. doi:10.1016/j.conb.2005.06.005
 168. Magcwebaba, T., Riedel, S., Swanevelder, S., Bouic, P., Swart, P., Gelderblom, W. (2012). Interleukin-1 α Induction in Human Keratinocytes (HaCaT): An In Vitro Model for Chemoprevention in Skin. *J Skin Cancer*, 2012, 393681. doi:10.1155/2012/393681
 169. Mahanty, S., Dakappa, S. S., Shariff, R., Patel, S., Swamy, M. M., Majumdar, A., *et al.* (2019). Keratinocyte differentiation promotes ER stress-dependent lysosome biogenesis. *Cell Death Dis*, 10(4), 269. doi:10.1038/s41419-019-1478-4
 170. Maj, E., Papiernik, D., Wietrzyk, J. (2016). Antiangiogenic cancer treatment: The great discovery and greater complexity (Review). *Int J Oncol*, 49(5), 1773-1784. doi:10.3892/ijo.2016.3709
 171. Mammone, T., Gan, D., Collins, D., Lockshin, R. A., Marenus, K., Maes, D. (2000). Successful separation of apoptosis and necrosis pathways in HaCaT keratinocyte cells induced by UVB irradiation. *Cell Biol Toxicol*, 16(5), 293-302. doi:10.1023/a:1026746330146
 172. Manoto, S. L., Houreld, N., Hodgkinson, N., Abrahamse, H. (2017). Modes of Cell Death Induced by Photodynamic Therapy Using Zinc Phthalocyanine in Lung Cancer Cells Grown as a Monolayer and Three-Dimensional Multicellular Spheroids. *Molecules*, 22(5). doi:10.3390/molecules22050791

173. Marchal, S., Francois, A., Dumas, D., Guillemin, F., Bezdetnaya, L. (2007). Relationship between subcellular localisation of Foscan (R) and caspase activation in photosensitised MCF-7 cells. *Br J Cancer*, 96(6), 944-951. doi:10.1038/sj.bjc.6603631
174. Markiewicz, A., Sigorski, D., Markiewicz, M., Owczarczyk-Saczonek, A., Placek, W. (2021). Caspase-14-From Biomolecular Basics to Clinical Approach. A Review of Available Data. *Int J Mol Sci*, 22(11). doi:10.3390/ijms22115575
175. Martincorena, I., Roshan, A., Gerstung, M., Ellis, P., Van Loo, P., McLaren, S., *et al.* (2015). Tumor evolution. High burden and pervasive positive selection of somatic mutations in normal human skin. *Science*, 348(6237), 880-886. doi:10.1126/science.aaa6806
176. Martinez De Pinillos Bayona, A., Mroz, P., Thunshelle, C., Hamblin, M. R. (2017). Design features for optimization of tetrapyrrole macrocycles as antimicrobial and anticancer photosensitizers. *Chem Biol Drug Des*, 89(2), 192-206. doi:10.1111/cbdd.12792
177. Martins, W. K., Belotto, R., Silva, M. N., Grasso, D., Suriani, M. D., Lavor, T. S., *et al.* (2020). Autophagy Regulation and Photodynamic Therapy: Insights to Improve Outcomes of Cancer Treatment. *Front Oncol*, 10, 610472. doi:10.3389/fonc.2020.610472
178. Martins, W. K., Santos, N. F., Rocha, C. S., Bacellar, I. O. L., Tsubone, T. M., Viotto, A. C., *et al.* (2019). Parallel damage in mitochondria and lysosomes is an efficient way to photoinduce cell death. *Autophagy*, 15(2), 259-279. doi:10.1080/15548627.2018.1515609
179. Mehrel, T., Hohl, D., Rothnagel, J. A., Longley, M. A., Bundman, D., Cheng, C., *et al.* (1990). Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin. *Cell*, 61(6), 1103-1112. doi:10.1016/0092-8674(90)90073-n
180. Melino, G., Knight, R. A., Nicotera, P. (2005). How many ways to die? How many different models of cell death? *Cell Death Differ*, 12 Suppl 2, 1457-1462. doi:10.1038/sj.cdd.4401781
181. Mese, G., Richard, G., White, T. W. (2007). Gap junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol*, 127(11), 2516-2524. doi:10.1038/sj.jid.5700770
182. Miki, Y., Akimoto, J., Moritake, K., Hironaka, C., Fujiwara, Y. (2015). Photodynamic therapy using talaporfin sodium induces concentration-dependent programmed necroptosis in human glioblastoma T98G cells. *Lasers Med Sci*, 30(6), 1739-1745. doi:10.1007/s10103-015-1783-9
183. Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M., Klionsky, D. J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451(7182), 1069-1075. doi:10.1038/nature06639
184. Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, Y. (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 27, 107-132. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154005

185. Mizutani, H., Black, R., Kupper, T. S. (1991). Human keratinocytes produce but do not process pro-interleukin-1 (IL-1) beta. Different strategies of IL-1 production and processing in monocytes and keratinocytes. *J Clin Invest*, 87(3), 1066-1071. doi:10.1172/JCI115067
186. Moan, J., Berg, K., Anholt, H., Madslien, K. (1994). Sulfonated aluminium phthalocyanines as sensitizers for photochemotherapy. Effects of small light doses on localization, dye fluorescence and photosensitivity in V79 cells. *Int J Cancer*, 58(6), 865-870. doi:10.1002/ijc.2910580620
187. Monteleon, C. L., Agnihotri, T., Dahal, A., Liu, M., Rebecca, V. W., Beatty, G. L., et al. (2018). Lysosomes Support the Degradation, Signaling, and Mitochondrial Metabolism Necessary for Human Epidermal Differentiation. *J Invest Dermatol*, 138(9), 1945-1954. doi:10.1016/j.jid.2018.02.035
188. Morais, J. A. V., Almeida, L. R., Rodrigues, M. C., Azevedo, R. B., Muehlmann, L. A. (2021). The induction of immunogenic cell death by photodynamic therapy in B16F10 cells in vitro is effected by the concentration of the photosensitizer. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 35, 102392. doi:10.1016/j.pdpdt.2021.102392
189. Moreci, R. S., Lechler, T. (2020). Epidermal structure and differentiation. *Curr Biol*, 30(4), R144-R149. doi:10.1016/j.cub.2020.01.004
190. Morita, K., Miyachi, Y. (2003). Tight junctions in the skin. *J Dermatol Sci*, 31(2), 81-89. doi:10.1016/s0923-1811(03)00038-0
191. Morita, K., Miyachi, Y., Furuse, M. (2011). Tight junctions in epidermis: from barrier to keratinization. *Eur J Dermatol*, 21(1), 12-17. doi:10.1684/ejd.2010.1192
192. Moriyama, M., Moriyama, H., Uda, J., Matsuyama, A., Osawa, M., Hayakawa, T. (2014). BNIP3 plays crucial roles in the differentiation and maintenance of epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 134(6), 1627-1635. doi:10.1038/jid.2014.11
193. Morton, C. A., Braathen, L. R. (2018). Daylight Photodynamic Therapy for Actinic Keratoses. *Am J Clin Dermatol*, 19(5), 647-656. doi:10.1007/s40257-018-0360-y
194. Mou, Y., Wang, J., Wu, J., He, D., Zhang, C., Duan, C., et al. (2019). Ferroptosis, a new form of cell death: opportunities and challenges in cancer. *J Hematol Oncol*, 12(1), 34. doi:10.1186/s13045-019-0720-y
195. Nakamura, S., Yoshimori, T. (2017). New insights into autophagosome-lysosome fusion. *J Cell Sci*, 130(7), 1209-1216. doi:10.1242/jcs.196352
196. Nakatogawa, H. (2020). Mechanisms governing autophagosome biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 21(8), 439-458. doi:10.1038/s41580-020-0241-0
197. Nemes, Z., Marekov, L. N., Fesus, L., Steinert, P. M. (1999). A novel function for transglutaminase 1: attachment of long-chain omega-

- hydroxyceramides to involucrin by ester bond formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(15), 8402-8407.
198. Newman, D. K. (2016). Photodynamic therapy: current role in the treatment of chorioretinal conditions. *Eye (Lond)*, 30(2), 202-210. doi:10.1038/eye.2015.251
 199. Niemann, C., Watt, F. M. (2002). Designer skin: lineage commitment in postnatal epidermis. *Trends Cell Biol*, 12(4), 185-192. doi:S0962892402022638
 200. Niessen, C. M. (2007). Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol*, 127(11), 2525-2532. doi:10.1038/sj.jid.5700865
 201. Nithya, S., Radhika, T., Jeddy, N. (2015). Loricrin - an overview. *J Oral Maxillofac Pathol*, 19(1), 64-68. doi:10.4103/0973-029X.157204
 202. Nurminskaya, M. V., Belkin, A. M. (2012). Cellular functions of tissue transglutaminase. *Int Rev Cell Mol Biol*, 294, 1-97. doi:10.1016/B978-0-12-394305-7.00001-X
 203. Nystrom, T. (2005). Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J*, 24(7), 1311-1317. doi:10.1038/sj.emboj.7600599
 204. Oliveira, C. S., Turchiello, R., Kowaltowski, A. J., Indig, G. L., Baptista, M. S. (2011). Major determinants of photoinduced cell death: Subcellular localization versus photosensitization efficiency. *Free Radic Biol Med*, 51(4), 824-833. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.023
 205. Orchard, S., Ammari, M., Aranda, B., Breuza, L., Briganti, L., Broackes-Carter, F., *et al.* (2014). The MIntAct project--IntAct as a common curation platform for 11 molecular interaction databases. *Nucleic Acids Res*, 42(Database issue), D358-363. doi:10.1093/nar/gkt1115
 206. Orchard, S., Kerrien, S., Abbani, S., Aranda, B., Bhate, J., Bidwell, S., *et al.* (2012). Protein interaction data curation: the International Molecular Exchange (IMEx) consortium. *Nat Methods*, 9(4), 345-350. doi:10.1038/nmeth.1931
 207. Ortel, B., Shea, C. R., Calzavara-Pinton, P. (2009). Molecular mechanisms of photodynamic therapy. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 14, 4157-4172. doi:10.2741/3520
 208. Ovaere, P., Lippens, S., Vandenabeele, P., Declercq, W. (2009). The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. *Trends Biochem Sci*, 34(9), 453-463. doi:10.1016/j.tibs.2009.08.001
 209. Pasparakis, M., Vandenabeele, P. (2015). Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*, 517(7534), 311-320. doi:10.1038/nature14191
 210. Pattison, D. I., Rahmanto, A. S., Davies, M. J. (2012). Photo-oxidation of proteins. *Photochem Photobiol Sci*, 11(1), 38-53. doi:10.1039/c1pp05164d

211. Peng, C. L., Lin, H. C., Chiang, W. L., Shih, Y. H., Chiang, P. F., Luo, T. Y., *et al.* (2018). Anti-angiogenic treatment (Bevacizumab) improves the responsiveness of photodynamic therapy in colorectal cancer. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 23, 111-118. doi:10.1016/j.pdpdt.2018.06.008
212. Peng, Q., Moan, J. (1995). Correlation of distribution of sulphonated aluminium phthalocyanines with their photodynamic effect in tumour and skin of mice bearing CaD2 mammary carcinoma. *Br J Cancer*, 72(3), 565-574. doi:10.1038/bjc.1995.375
213. Perez-Montoyo, H. (2020). Therapeutic Potential of Autophagy Modulation in Cholangiocarcinoma. *Cells*, 9(3). doi:10.3390/cells9030614
214. Perillo, N. L., Marcus, M. E., Baum, L. G. (1998). Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *J Mol Med (Berl)*, 76(6), 402-412. doi:10.1007/s001090050232
215. Petit, V., Thiery, J. P. (2000). Focal adhesions: structure and dynamics. *Biol Cell*, 92(7), 477-494. doi:10.1016/s0248-4900(00)01101-1
216. Plaetzer, K., Kiesslich, T., Krammer, B., Hammerl, P. (2002). Characterization of the cell death modes and the associated changes in cellular energy supply in response to ALPcS4-PDT. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 1(3), 172-177. doi:10.1039/b108816e
217. Poumay, Y., Pittelkow, M. R. (1995). Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins. *J Invest Dermatol*, 104(2), 271-276. doi:10.1111/1523-1747.ep12612810
218. Prasmickaite, L., Hogset, A., Berg, K. (2001). Evaluation of different photosensitizers for use in photochemical gene transfection. *Photochemistry and Photobiology*, 73(4), 388-395. doi:10.1562/0031-8655(2001)073<0388:eodpfu>2.0.co;2
219. Prasmickaite, L., Hogset, A., Olsen, V. M., Kaalhus, O., Mikalsen, S. O., Berg, K. (2004). Photochemically enhanced gene transfection increases the cytotoxicity of the herpes simplex virus thymidine kinase gene combined with ganciclovir. *Cancer Gene Ther*, 11(7), 514-523. doi:10.1038/sj.cgt.7700720
220. Prasmickaite, L., Hogset, A., Selbo, P. K., Engesaeter, B. O., Hellum, M., Berg, K. (2002). Photochemical disruption of endocytic vesicles before delivery of drugs: a new strategy for cancer therapy. *Br J Cancer*, 86(4), 652-657. doi:10.1038/sj.bjc.6600138
221. Proksch, E., Brandner, J. M., Jensen, J. M. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol*, 17(12), 1063-1072.
222. Purkis, P. E., Steel, J. B., Mackenzie, I. C., Nathrath, W. B., Leigh, I. M., Lane, E. B. (1990). Antibody markers of basal cells in complex epithelia. *J Cell Sci*, 97 (Pt 1), 39-50.

223. Qian, H. R., Shi, Z. Q., Zhu, H. P., Gu, L. H., Wang, X. F., Yang, Y. (2017). Interplay between apoptosis and autophagy in colorectal cancer. *Oncotarget*, 8(37), 62759-62768. doi:10.18632/oncotarget.18663
224. Queiros, C., Garrido, P. M., Maia Silva, J., Filipe, P. (2020). Photodynamic therapy in dermatology: Beyond current indications. *Dermatol Ther*, 33(6), e13997. doi:10.1111/dth.13997
225. Raj, D., Brash, D. E., Grossman, D. (2006). Keratinocyte apoptosis in epidermal development and disease. *J Invest Dermatol*, 126(2), 243-257. doi:10.1038/sj.jid.5700008
226. Redmond, R. W., Kochevar, I. E. (2006). Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen. *Photochemistry and Photobiology*, 82(5), 1178-1186. doi:10.1562/2006-04-14-IR-874
227. Reiners, J. J., Jr., Agostinis, P., Berg, K., Oleinick, N. L., Kessel, D. (2010). Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. *Autophagy*, 6(1), 7-18. doi:10.4161/auto.6.1.10220
228. Reiners, J. J., Jr., Caruso, J. A., Mathieu, P., Chelladurai, B., Yin, X. M., Kessel, D. (2002). Release of cytochrome c and activation of pro-caspase-9 following lysosomal photodamage involves Bid cleavage. *Cell Death Differ*, 9(9), 934-944. doi:10.1038/sj.cdd.4401048
229. Resing, K. A., Dale, B. A., Walsh, K. A. (1985). Multiple copies of phosphorylated filaggrin in epidermal profilaggrin demonstrated by analysis of tryptic peptides. *Biochemistry*, 24(15), 4167-4175. doi:10.1021/bi00336a053
230. Rousselle P., G. E., Neveux Y. . (2017). *Markers of Epidermal Proliferation and Differentiation*: Springer, Cham.
231. Salven, P., Hattori, K., Heissig, B., Rafii, S. (2002). Interleukin-1alpha promotes angiogenesis in vivo via VEGFR-2 pathway by inducing inflammatory cell VEGF synthesis and secretion. *FASEB J*, 16(11), 1471-1473. doi:10.1096/fj.02-0134fje
232. Santos, M., Paramio, J. M., Bravo, A., Ramirez, A., Jorcano, J. L. (2002). The expression of keratin k10 in the basal layer of the epidermis inhibits cell proliferation and prevents skin tumorigenesis. *J Biol Chem*, 277(21), 19122-19130. doi:10.1074/jbc.M201001200M201001200
233. Sarafian, V., Jans, R., Poumay, Y. (2006). Expression of lysosome-associated membrane protein 1 (Lamp-1) and galectins in human keratinocytes is regulated by differentiation. *Arch Dermatol Res*, 298(2), 73-81. doi:10.1007/s00403-006-0662-4
234. Sasnauskiene, A., Kadziauskas, J., Vezelyte, N., Jonusiene, V., Kirveliėne, V. (2009). Apoptosis, autophagy and cell cycle arrest following photodamage to mitochondrial interior. *Apoptosis*, 14(3), 276-286. doi:10.1007/s10495-008-0292-8
235. Sasnauskienė, S. (2011). *Fotodinaminio poveikio sukelti ląstelių žūties vyksmai in vitro: fotosensibilizatoriaus lokalizacijos reikšmė* (Daktaro disertacija), Vilniaus universitetas, Vilnius.

236. Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, 9(7), 671-675. doi:10.1038/nmeth.2089
237. Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., Peter, M. E. (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem*, 254(3), 439-459. doi:10.1046/j.1432-1327.1998.2540439.x
238. Schweizer, J., Bowden, P. E., Coulombe, P. A., Langbein, L., Lane, E. B., Magin, T. M., *et al.* (2006). New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol*, 174(2), 169-174. doi:10.1083/jcb.200603161
239. Senge, M. O., Brandt, J. C. (2011). Temoporfin (Foscan(R), 5,10,15,20-tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin)--a second-generation photosensitizer. *Photochemistry and Photobiology*, 87(6), 1240-1296. doi:10.1111/j.1751-1097.2011.00986.x
240. Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., *et al.* (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*, 13(11), 2498-2504. doi:10.1101/gr.123930313/11/2498
241. Shin, H. R., Zoncu, R. (2018). Finding Sugar in the Pantry: How Galectins Detect and Signal Lysosomal Damage. *Mol Cell*, 70(1), 5-7. doi:10.1016/j.molcel.2018.03.017
242. Simpson, C. L., Patel, D. M., Green, K. J. (2011). Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(9), 565-580. doi:10.1038/nrm3175
243. Singh, R., Letai, A., Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20(3), 175-193. doi:10.1038/s41580-018-0089-8
244. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., *et al.* (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150(1), 76-85. doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7
245. Sokolov, V., Chissov, V., Yakubovskaya, R., Aristarkhova, E., Filonenko, E., Belous, T., *et al.* (1996). *Photodynamic therapy (PDT) of malignant tumors by photosensitizer photosens: results of 45 clinical cases* (Vol. 2625): SPIE.
246. Solban, N., Selbo, P. K., Sinha, A. K., Chang, S. K., Hasan, T. (2006). Mechanistic investigation and implications of photodynamic therapy induction of vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Cancer Res*, 66(11), 5633-5640. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0604
247. Song, C., Xu, W., Wu, H., Wang, X., Gong, Q., Liu, C., *et al.* (2020). Photodynamic therapy induces autophagy-mediated cell death in human colorectal cancer cells via activation of the ROS/JNK signaling pathway. *Cell Death Dis*, 11(10), 938. doi:10.1038/s41419-020-03136-y

248. Soriano, J., Mora-Espi, I., Alea-Reyes, M. E., Perez-Garcia, L., Barrios, L., Ibanez, E., *et al.* (2017). Cell Death Mechanisms in Tumoral and Non-Tumoral Human Cell Lines Triggered by Photodynamic Treatments: Apoptosis, Necrosis and Parthanatos. *Sci Rep*, 7, 41340. doi:10.1038/srep41340
249. Sotiropoulou, P. A., Blanpain, C. (2012). Development and homeostasis of the skin epidermis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(7), a008383. doi:10.1101/cshperspect.a008383
250. Srinivasula, S. M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., *et al.* (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature*, 410(6824), 112-116. doi:10.1038/35065125
251. Stajer, A., Kajari, S., Gajdacs, M., Musah-Eroje, A., Barath, Z. (2020). Utility of Photodynamic Therapy in Dentistry: Current Concepts. *Dent J (Basel)*, 8(2). doi:10.3390/dj8020043
252. Steinert, P. M., Candi, E., Kartasova, T., Marekov, L. (1998). Small proline-rich proteins are cross-bridging proteins in the cornified cell envelopes of stratified squamous epithelia. *J Struct Biol*, 122(1-2), 76-85. doi:10.1006/jsbi.1998.3957
253. Steinert, P. M., Marekov, L. N. (1995). The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodi peptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. *J Biol Chem*, 270(30), 17702-17711. doi:10.1074/jbc.270.30.17702
254. Steven, A. C., Steinert, P. M. (1994). Protein-Composition of Cornified Cell Envelopes of Epidermal-Keratinocytes. *Journal of Cell Science*, 107, 693-700.
255. Sun, J., Cecic, I., Parkins, C. S., Korbelik, M. (2002). Neutrophils as inflammatory and immune effectors in photodynamic therapy-treated mouse SCCVII tumours. *Photochem Photobiol Sci*, 1(9), 690-695. doi:10.1039/b204254a
256. Suwara, M. I., Green, N. J., Borthwick, L. A., Mann, J., Mayer-Barber, K. D., Barron, L., *et al.* (2014). IL-1 α released from damaged epithelial cells is sufficient and essential to trigger inflammatory responses in human lung fibroblasts. *Mucosal Immunol*, 7(3), 684-693. doi:10.1038/mi.2013.87
257. Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., Takahashi, R. (2001). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell*, 8(3), 613-621. doi:10.1016/s1097-2765(01)00341-0
258. Tait, S. W., Green, D. R. (2013). Mitochondrial regulation of cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(9). doi:10.1101/cshperspect.a008706
259. Takahashi, Y., He, H., Tang, Z., Hattori, T., Liu, Y., Young, M. M., *et al.* (2018). An autophagy assay reveals the ESCRT-III component

- CHMP2A as a regulator of phagophore closure. *Nat Commun*, 9(1), 2855. doi:10.1038/s41467-018-05254-w
260. Takahashi, Y., Liang, X., Hattori, T., Tang, Z., He, H., Chen, H., *et al.* (2019). VPS37A directs ESCRT recruitment for phagophore closure. *J Cell Biol*, 218(10), 3336-3354. doi:10.1083/jcb.201902170
 261. Tang, Z., Tong, X., Huang, J., Liu, L., Wang, D., Yang, S. (2021). Research progress of keratinocyte-programmed cell death in UV-induced Skin photodamage. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 37(5), 442-448. doi:10.1111/phpp.12679
 262. Teiten, M. H., Bezdetnaya, L., Morliere, P., Santus, R., Guillemin, F. (2003). Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are the preferential sites of Foscan localisation in cultured tumour cells. *Br J Cancer*, 88(1), 146-152. doi:10.1038/sj.bjc.6600664
 263. Thul, P. J., Lindskog, C. (2018). The human protein atlas: A spatial map of the human proteome. *Protein Sci*, 27(1), 233-244. doi:10.1002/pro.3307
 264. Tracy, E. C., Bowman, M. J., Henderson, B. W., Baumann, H. (2012). Interleukin-1alpha is the major alarmin of lung epithelial cells released during photodynamic therapy to induce inflammatory mediators in fibroblasts. *Br J Cancer*, 107(9), 1534-1546. doi:10.1038/bjc.2012.429
 265. Trivedi, P. C., Bartlett, J. J., Pulinilkunnil, T. (2020). Lysosomal Biology and Function: Modern View of Cellular Debris Bin. *Cells*, 9(5). doi:10.3390/cells9051131
 266. Tsubone, T. M., Baptista, M. S., Itri, R. (2019). Understanding membrane remodelling initiated by photosensitized lipid oxidation. *Biophys Chem*, 254, 106263. doi:10.1016/j.bpc.2019.106263
 267. Tsubone, T. M., Martins, W. K., Franco, M. S. F., Silva, M. N., Itri, R., Baptista, M. S. (2021). Cellular compartments challenged by membrane photo-oxidation. *Arch Biochem Biophys*, 697, 108665. doi:10.1016/j.abb.2020.108665
 268. Tsubone, T. M., Martins, W. K., Pavani, C., Junqueira, H. C., Itri, R., Baptista, M. S. (2017). Enhanced efficiency of cell death by lysosome-specific photodamage. *Sci Rep*, 7(1), 6734. doi:10.1038/s41598-017-06788-7
 269. Tsuruta, D., Hashimoto, T., Hamill, K. J., Jones, J. C. (2011). Hemidesmosomes and focal contact proteins: functions and cross-talk in keratinocytes, bullous diseases and wound healing. *J Dermatol Sci*, 62(1), 1-7. doi:10.1016/j.jdermsci.2011.01.005
 270. Tsuruta, D., Kobayashi, H., Imanishi, H., Sugawara, K., Ishii, M., Jones, J. C. (2008). Laminin-332-integrin interaction: a target for cancer therapy? *Curr Med Chem*, 15(20), 1968-1975.
 271. Tu, C. L., Crumrine, D. A., Man, M. Q., Chang, W., Elalieh, H., You, M., *et al.* (2012). Ablation of the calcium-sensing receptor in keratinocytes impairs epidermal differentiation and barrier function. *J Invest Dermatol*, 132(10), 2350-2359. doi:10.1038/jid.2012.159

272. Uehara, M., Inokuchi, T., Sano, K., ZuoLin, W. (2001). Expression of vascular endothelial growth factor in mouse tumours subjected to photodynamic therapy. *Eur J Cancer*, 37(16), 2111-2115. doi:10.1016/s0959-8049(01)00243-x
273. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. (2019). *Nucleic Acids Res*, 47(D1), D506-D515. doi:10.1093/nar/gky1049
274. Van Keymeulen, A., Mascré, G., Youseff, K. K., Harel, I., Michaux, C., De Geest, N., *et al.* (2009). Epidermal progenitors give rise to Merkel cells during embryonic development and adult homeostasis. *J Cell Biol*, 187(1), 91-100. doi:10.1083/jcb.200907080
275. van Straten, D., Mashayekhi, V., de Bruijn, H. S., Oliveira, S., Robinson, D. J. (2017). Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions. *Cancers (Basel)*, 9(2). doi:10.3390/cancers9020019
276. Vikdal, M., Weyergang, A., Selbo, P. K., Berg, K. (2013). Vascular endothelial cells as targets for photochemical internalization (PCI). *Photochemistry and Photobiology*, 89(5), 1185-1192. doi:10.1111/php.12126
277. Voronov, E., Carmi, Y., Apte, R. N. (2014). The role IL-1 in tumor-mediated angiogenesis. *Front Physiol*, 5, 114. doi:10.3389/fphys.2014.00114
278. Voronov, E., Dinarello, C. A., Apte, R. N. (2018). Interleukin-1 α as an intracellular alarmin in cancer biology. *Semin Immunol*, 38, 3-14. doi:10.1016/j.smim.2018.10.006
279. Wan, Q., Liu, L., Xing, D., Chen, Q. (2008). Bid is required in NPe6-PDT-induced apoptosis. *Photochemistry and Photobiology*, 84(1), 250-257. doi:10.1111/j.1751-1097.2007.00248.x
280. Wang, R., Li, X., Yoon, J. (2021). Organelle-Targeted Photosensitizers for Precision Photodynamic Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces*, 13(17), 19543-19571. doi:10.1021/acsami.1c02019
281. Wang, X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, 15(22), 2922-2933.
282. Watari, K., Shibata, T., Kawahara, A., Sata, K., Nabeshima, H., Shinoda, A., *et al.* (2014). Tumor-derived interleukin-1 promotes lymphangiogenesis and lymph node metastasis through M2-type macrophages. *PLoS One*, 9(6), e99568. doi:10.1371/journal.pone.0099568
283. Watt, F. M., Boukamp, P., Hornung, J., Fusenig, N. E. (1987). Effect of growth environment on spatial expression of involucrin by human epidermal keratinocytes. *Arch Dermatol Res*, 279(5), 335-340. doi:10.1007/BF00431227
284. Weisheit, S., Wegner, C. S., Ailte, I., Radulovic, M., Weyergang, A., Selbo, P. K., *et al.* (2021). Inhibiting autophagy increases the efficacy of low-dose photodynamic therapy. *Biochem Pharmacol*, 194, 114837. doi:10.1016/j.bcp.2021.114837

285. Wright, A., Hawkins, C. L., Davies, M. J. (2003). Photo-oxidation of cells generates long-lived intracellular protein peroxides. *Free Radic Biol Med*, 34(6), 637-647. doi:10.1016/s0891-5849(02)01361-8
286. Xue, L. Y., Chiu, S. M., Oleinick, N. L. (2001). Photochemical destruction of the Bcl-2 oncoprotein during photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4. *Oncogene*, 20(26), 3420-3427. doi:10.1038/sj.onc.1204441
287. Yamamoto, M., Miyai, M., Matsumoto, Y., Tsuboi, R., Hibino, T. (2012). Kallikrein-related peptidase-7 regulates caspase-14 maturation during keratinocyte terminal differentiation by generating an intermediate form. *J Biol Chem*, 287(39), 32825-32834. doi:10.1074/jbc.M112.357467
288. Yang, L., Zhang, S., Ling, X., Shao, P., Jia, N., Bai, M. (2017). Multilayer photodynamic therapy for highly effective and safe cancer treatment. *Acta Biomater*, 54, 271-280. doi:10.1016/j.actbio.2017.03.012
289. Yang, Y., Wang, L., Cao, H., Li, Q., Li, Y., Han, M., *et al.* (2019). Photodynamic Therapy with Liposomes Encapsulating Photosensitizers with Aggregation-Induced Emission. *Nano Lett*, 19(3), 1821-1826. doi:10.1021/acs.nanolett.8b04875
290. Yang, Z., Klionsky, D. J. (2010). Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol*, 12(9), 814-822. doi:10.1038/ncb0910-814
291. Yoneda, K., Hohl, D., McBride, O. W., Wang, M., Cehrs, K. U., Idler, W. W., *et al.* (1992). The human loricrin gene. *J Biol Chem*, 267(25), 18060-18066.
292. Yoshihara, N., Ueno, T., Takagi, A., Oliva Trejo, J. A., Haruna, K., Suga, Y., *et al.* (2015). The significant role of autophagy in the granular layer in normal skin differentiation and hair growth. *Arch Dermatol Res*, 307(2), 159-169. doi:10.1007/s00403-014-1508-0
293. Yoshii, S. R., Mizushima, N. (2017). Monitoring and Measuring Autophagy. *Int J Mol Sci*, 18(9). doi:10.3390/ijms18091865
294. Yu, L., McPhee, C. K., Zheng, L., Mardones, G. A., Rong, Y., Peng, J., *et al.* (2010). Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature*, 465(7300), 942-946. doi:10.1038/nature09076
295. Zaffagnini, G., Martens, S. (2016). Mechanisms of Selective Autophagy. *J Mol Biol*, 428(9 Pt A), 1714-1724. doi:10.1016/j.jmb.2016.02.004
296. Zhang, J., Jiang, C., Figueiro Longo, J. P., Azevedo, R. B., Zhang, H., Muehlmann, L. A. (2018). An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. *Acta Pharm Sin B*, 8(2), 137-146. doi:10.1016/j.apsb.2017.09.003

297. Zhang, X., Cheng, X., Yu, L., Yang, J., Calvo, R., Patnaik, S., *et al.* (2016). MCOLN1 is a ROS sensor in lysosomes that regulates autophagy. *Nat Commun*, 7, 12109. doi:10.1038/ncomms12109
298. Zhang, X., Yin, M., Zhang, L. J. (2019). Keratin 6, 16 and 17-Critical Barrier Alarmin Molecules in Skin Wounds and Psoriasis. *Cells*, 8(8). doi:10.3390/cells8080807
299. Zhu, S. Y., Yao, R. Q., Li, Y. X., Zhao, P. Y., Ren, C., Du, X. H., *et al.* (2020). Lysosomal quality control of cell fate: a novel therapeutic target for human diseases. *Cell Death Dis*, 11(9), 817. doi:10.1038/s41419-020-03032-5

PRIEDAI

1 priedas. Pirminių keratinocitų HEKa, kuriuose nustatyta K10 baltymo raiška, statistinis vertinimas.

1 pr. 1 lentelė. Šansų santykis tarp K10 turinčių ir K10 neturinčių keratinocitų pagal fotosensibilizatoriaus skirtingas CtD dozes, praėjus 6 ir 24 val. po FD poveikio. Ref. žymi grupę su kuria lyginama OR analizėje.

	Eil. nr.	Kintamasis 6 val. po FDP	CtD25	CtD50	CtD80
mTHPC	1	K, ref.	2,5, $p = 0,04$ *	0,8, $p = 0,98$ n.s	5,6, $p < 0,001$ ***
	2	CtD25, ref.	-	0,358, $p = 0,014$ n.s	2,3, $p = 0,005$ **
	3	CtD50, ref.	-	-	6,3, $p < 0,001$ ***
AIPcS _{2a}			CtD25	CtD50	CtD80
	4	K, ref.	2301, $p < 0,001$ ***	1986, $p < 0,001$ ***	4032, $p < 0,001$ ***
	5	CtD25, ref.	-	0,86 $p = 0,181$ n.s.	1,8, $p < 0,001$ ***
AIPcS ₄	6	CtD50, ref.	-	-	2,0, $p < 0,001$ ***
			CtD25	CtD50	CtD80
	7	K, ref.	50,6, $p < 0,001$ ***	24, $p < 0,001$ ***	146, $p < 0,001$ ***
mTHPC	8	CtD25, ref.	-	0,48, $p < 0,001$ ***	2,9, $p < 0,001$ ***
	9	CtD50, ref.	-	-	6,1, $p < 0,001$ ***
AIPcS _{2a}		Kintamasis 24 val. po FDP	CtD25	CtD50	CtD80
	10	K, ref.	19, $p < 0,001$ ***	128, $p < 0,001$ ***	41, $p < 0,001$ ***
	11	CtD25, ref.	-	6.7, $p < 0,001$ ***	2.1, $p < 0,001$ ***
AIPcS ₄	12	CtD50, ref.	-	-	0.32, $p < 0,001$ ***
			CtD25	CtD50	CtD80
	13	K, ref.	559, $p < 0,001$ ***	6272, $p < 0,001$ ***	2744, $p < 0,001$ ***
mTHPC	14	CtD25, ref.	-	11,2, $p < 0,001$ ***	4,9, $p < 0,001$ ***
	15	CtD50, ref.	-	-	0,44, $p < 0,001$ ***
			CtD25	CtD50	CtD80
AIPcS ₄	16	K, ref.	34, $p < 0,001$ ***	23, $p < 0,001$ ***	178, $p < 0,001$ ***
	17	CtD25, ref.	-	0,66, $p < 0,001$ ***	5,2, $p < 0,001$ ***
	18	CtD50, ref.	-	-	7,9, $p < 0,001$ ***

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ ***; $p < 0.001$; n.s. - statistiškai nereikšminga.

1 pr. 2 lentelė. Šansų santykis tarp K10 turinčių ir K10 neturinčių keratinocitų veiktų skirtingais fotosensibilizatoriais. Ref. žymi grupę OR analizėje su kuria lyginama.

Eil. nr.	Kintamasis 6 val. po FDP	AlPcS _{2a} _CtD25	AlPcS ₄ _CtD25
1	mTHPC _CtD25, ref.	925, $p < 0,001^{***}$	20, $p < 0,001^{***}$
2	AlPcS ₄ _CtD25, ref.	46, $p < 0,001^{***}$	-
		AlPcS _{2a} _CtD50	AlPcS ₄ _CtD50
3	mTHPC _CtD50, ref.	2232, $p < 0,001^{***}$	27, $p < 0,001^{***}$
4	AlPcS ₄ _CtD50, ref.	83, $p < 0,001^{***}$	-
		AlPcS _{2a} _CtD80	AlPcS ₄ _CtD80
5	mTHPC _CtD80, ref.	717, $p < 0,001^{***}$	26, $p < 0,001^{***}$
6	AlPcS ₄ _CtD80, ref.	28, $p < 0,001^{***}$	-
	Kintamasis 24 val. po FDP	AlPcS _{2a} _CtD25	AlPcS ₄ _CtD25
7	mTHPC _CtD25, ref.	29, $p < 0,001^{***}$	1.8, $p < 0,001^{***}$
8	AlPcS ₄ _CtD25, ref.	16, $p < 0,001^{***}$	-
		AlPcS _{2a} _CtD50	AlPcS ₄ _CtD50
9	mTHPC _CtD50, ref.	49, $p < 0,001^{***}$	0.18, $p < 0,001^{***}$
10	AlPcS ₄ _CtD50, ref.	277, $p < 0,001^{***}$	-
		AlPcS _{2a} _CtD80	AlPcS ₄ _CtD80
11	mTHPC _CtD80, ref.	67, $p < 0,001^{***}$	4.4, $p < 0,001^{***}$
12	AlPcS ₄ _CtD80, ref.	15, $p < 0,001^{***}$	-

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01^{***}$; $p < 0.001$; n.s. - statistiškai nereikšminga.

1 pr. 3 lentelė. Citotoksinio poveikio sukeltas reikšmingumas tarp K10^{low} ir K10^{high} fluorescencijos intensyvumo. Statistinei analizei naudotas χ^2 testas.

Eil. nr.	6 val. po FDP	K10 ^{low}	K10 ^{high}	p value	Eil. Nr.	24 val. po FDP	K10 ^{low}	K10 ^{high}	p value
1	CtD25				4	CtD25			
	mTHPC	13	3	**		mTHPC	113	0	***
	AlPcS _{2a}	1768	53	0,001		AlPcS _{2a}	1216	27	<0,001
	AlPcS ₄	478	15			AlPcS ₄	493	41	
2	CtD50				5	CtD50			
	mTHPC	9	1	***		mTHPC	211	0	***
	AlPcS _{2a}	1760	41	<0,001		AlPcS _{2a}	1849	26	<0,001
	AlPcS ₄	116	14			AlPcS ₄	125	14	
3	CtD80				6	CtD80			
	mTHPC	55	0	n.s.		mTHPC	41	0	n.s.
	AlPcS _{2a}	1487	31	(0,48)		AlPcS _{2a}	1472	46	(0,17)
	AlPcS ₄	572	14			AlPcS ₄	800	16	

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01^{***}$; $p < 0.001$; n.s. - statistiškai nereikšminga.

1 pr. 4 lentelė. Šansų santykis tarp K10^{high} ir K10 neturinčių keratinocitų. Ref. žymi grupę OR analizėje su kuria lyginama.

Eil. nr.	Kintamasis 6 val. po FDP	OR	p value	Eil. nr.	Kintamasis 6 val. po FDP	OR	p value
1	AIPcS _{2a} _CtD25 AIPcS ₄ _CtD25, ref.	43,6	*** <0,001	4	AIPcS _{2a} _CtD25 AIPcS ₄ _CtD25, ref.	9,9	*** <0,001
2	AIPcS _{2a} _CtD50 AIPcS ₄ _CtD50, ref.	17,5	*** <0,001	5	AIPcS _{2a} _CtD50 AIPcS ₄ _CtD50, ref.	60,1	*** <0,001
3	AIPcS _{2a} _CtD80 AIPcS ₄ _CtD80, ref.	23,6	*** <0,001	6	AIPcS _{2a} _CtD80 AIPcS ₄ _CtD80, ref.	17,1	*** <0,001

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ ***; $p < 0.001$; n.s. - statistiškai nereikšminga.

2 priedas. Pradiniai baltymų tarpusavio sąveikų tinklo baltymai.

2 pr. 1 lentelė. Baltymų tarpusavio sąveikų tinklo pradiniai baltymai.

Genas	UniProtKB	Literatūros šaltinis (DOI)
ATG16L1	Q676U5	10.1016/j.cub.2017.11.012
CASP1	P29466	10.1155/2020/9571490
CASP14	P31944	Ši disertacija
CASP3	F8WF39	10.1111/j.1365-2230.2011.04315.x
CASP6	P55212	10.1074/jbc.M600536200
CASP7	P55210	10.1111/j.1365-2230.2011.04315.x
CASP9	P55211	10.1074/jbc.M600536200
IVL	P07476	Ši disertacija
KRT10	P13645	Ši disertacija
LAMP2	P13473	10.1016/j.jmb.2019.08.010
LGALS1	P09382	10.1016/j.cub.2017.11.012
LGALS3	P17931	10.1080/15548627.2017.1307487
LGALS8	O00214	10.1016/j.molcel.2018.03.009
LGALS9	O00182	10.1016/j.molcel.2018.03.009
MCOLN1	Q9GZU1	10.1080/15548627.2020.1739442
NLRP3	Q96P20	10.1093/intimm/dxr110
PLAA	Q9Y263	10.1016/j.cub.2017.11.012
TRIM16	Q95361	10.1080/15548627.2017.1307487
UBXD1	Q9BZV1	10.1016/j.cub.2017.11.012
VAMP7	P51809	10.1073/pnas.1702615114
YOD1	Q5VVQ6	10.1016/j.cub.2017.11.012
MAPK11	Q15759	10.1515/med-2018-0029
MAPK14	Q16539	10.1515/med-2018-0029
MAPK13	O15264	10.1515/med-2018-0029
MAPK12	P53778	10.1515/med-2018-0029
MAPK8	P45983	10.1515/med-2018-0029
MAPK9	P45984	10.1515/med-2018-0029
MAPK10	P53779	10.1515/med-2018-0029

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

DISERTACIJOS RENGIMUI NAUDOTŲ PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

1. **N. Daugelavičienė**, P. Grigaitis, L. Gasiule, D. Dabkevičienė, U. Neniskyte, A. Sasnauskiene. Lysosome-targeted photodynamic treatment induces primary keratinocyte differentiation, *J Photochem Photobiol B*, 218 (2021) 112183. [doi:10.1016/j.jphotobiol.2021.112183](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2021.112183)

2. D. Dabkevičienė, A. Sasnauskiene, E. Leman, R. Kvietkauskaitė, **N. Daugelavičienė**, V. Stankevicius, V. Jurgelevicius, B. Juodka, V. Kirveliėnė. mTHPC-mediated photodynamic treatment up-regulates the cytokines VEGF and IL-1α, *Photochem Photobiol*, 88 (2012) 432-439. [doi:10.1111/j.1751-1097.2011.01062.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2011.01062.x)

KITOS PUBLIKACIJOS

1. A. Sasnauskiene, J. Kadziauskas, **N. Vezelyte**, V. Jonusiene, V. Kirveliėnė. Apoptosis, autophagy and cell cycle arrest following photodamage to mitochondrial interior, *Apoptosis*, 14 (2009) 276-286.

2. A. Sasnauskiene, J. Kadziauskas, **N. Vezelyte**, V. Jonusiene, V. Kirveliėnė. Damage targeted to the mitochondrial interior induces autophagy, cell cycle arrest and, only at high doses, apoptosis, *Autophagy* 5 (2009) 743-744.

PRANEŠIMŲ SĄRAŠAS

DISERTACIJOS RENGIMUI NAUDOTŲ PRANEŠIMŲ SĄRAŠAS

1. **N. Daugelavičienė**, A. Sasnauskienė, U. Neniskytė, D. Dabkevičienė (2021). Visualization of keratin 10 positive cell subgroups in primary keratinocytes. 11th international meeting on Visualizing Biological Data (VIZBI), EMBL virtual conference.
2. **N. Daugelavičienė**, S. Butkytė, A. Sasnauskienė, V. Kirvelienė (2014). Hallmarks of cornification, apoptosis and autophagy: primary keratinocytes HEKa vs A-431 cells. Gordon Research Conferences: Autophagy in Stress, Development & Disease. Italy. 163 4.
3. **N. Daugelavičienė**, S. Butkytė, A. Sasnauskienė, V. Kirvelienė (2014). Keratinocytes response to photodynamic therapy: cornification, apoptosis, autophagy (2014). XIIIth International Conference of Lithuanian Biochemical Society, Lithuania.
4. **N. Daugelavičienė**, S. Butkytė, A. Sasnauskienė, V. Kirvelienė (2014). Hallmarks of cornification, apoptosis and autophagy in photodynamically treated primary keratinocytes HEKa vs carcinoma A-431 cells. 22nd Euroconference on Apoptosis Cell Death & Rejuvenation. Greece.
5. **N. Vezelytė**, A. Sasnauskienė, V. Kirvelienė (2010). Photodynamic treatment targeted to lysosomes. XI International Meeting of Lithuanian Biochemical Society „LBS 50“, Tolia: Proceedings and Program, p. 60.
6. **N. Vezelytė**, A. Sasnauskienė, V. Kirvelienė (2009). Cell death induced by photodynamic treatment targeted to lysosomes. 17th Euroconference on Apoptosis, Paris: Proceedings and Program, p. 292.

KITI PRANEŠIMAI

1. A. Sasnauskiene, **N. Daugelaviciene**, J. Kadziauskas, V. Kirveliene (2011). Cell death induced by photodamage to different cellular compartments. 19th Euroconference on Apoptosis, Stockholm: Programme and abstract book, p. 223.
2. **N. Vėželytė**, A. Sasnauskienė, V. Kirvelienė (2009). Cell death induced by photodynamic treatment targeted to lysosomes // 17th ECDO Euroconference, Paris, France, September 23-26, Abstract book, P-237.
3. A. Sasnauskienė, **N. Vėželytė**, J. Kadziauskas, V. Kirvelienė (2008). Photodynamic damage to mitochondrial interior induces cell growth inhibition followed by extensive apoptosis // Apoptosis World 2008. From mechanisms to applications, Luxembourg, January 23-26, Proceedings and Program, p. 488.
4. A. Sadauskaitė, **N. Vėželytė**, U. Sūdžiuvienė, V. Jurgelevičius, V. Kirvelienė (2007). Cytokine expression following oxidative damage to different subcellular compartments // ELSO 2007 Conference, Dresden, Germany, September 1-4, Proceedings, p. 66.

PEDAGOGINĖ VEIKLA

1. Laboratorinių darbų “Molekulinės biologijos laboratoriniai darbai” vedimas molekulinės biologijos bakalauro studijų studentams, 2018 – 2021.
2. Kurso “Įvadas į molekulinės biologijos laboratorijos darbus” laboratorinių darbų ir pratybų vedimas molekulinės biologijos bakalauro studijų studentams, paskaitų skaitymas, 2018 – iki dabar.
3. Laboratorinių darbų „Biochemijos laboratoriniai darbai“ vedimas Molekulinės biologijos bakalauro studijų studentams, 2020 - 2021.

DALYVAVIMAS MOKSLINIUOSE PROJEKTUOSE

1. VPI-3.1-ŠMM-08-K-001-005, “Biotechnologija ir biofarmacija: fundamentiniai ir taikomieji tyrimai”, žmogiškųjų išteklių plėtros veiksmų programos projektas iš ES struktūrinių fondų lėšų, 2012 – 2014.
2. T-06161, “p21 reikšmės ląstelių žūties keliui tyrimas: genų tildymo metodai”, finansuojanti institucija VMSF, 2006.

CURRICULUM VITAE

Neringa Daugelavičienė

1982-07-05

8 678 34327, neringa.daugelaviciene@gmc.vu.lt

IŠSILAVINIMAS

- 2007–2010 / **Doktorantūros studijos** (Gamtos mokslai, Biochemija),
2017–2018 Vilniaus Universitetas, Gamtos mokslų fakultetas, Biochemijos
ir biofizikos katedra / Vilniaus Universitetas, Gyvybės mokslų
centras, Biomokslų institutas. Disertacijos pavadinimas
„Pirminių keratinocitų ir epidermoidinės karcinomos ląstelių
atsako į fotodinaminį poveikį tyrimas“
- 2004–2006 **Magistro studijos** (Fiziniai mokslai, Biochemija), Vilniaus
Universitetas, Gamtos mokslų fakultetas, Biochemijos ir
biofizikos katedra. Darbo pavadinimas „p21 raiška ir jos
tildymas fotosensibilizuotose A431 ląstelėse“
- 2000–2004 **Bakalauro studijos** (Fiziniai mokslai, Biochemija), Vilniaus
Universitetas, Chemijos mokslų fakultetas, Biochemijos ir
biofizikos katedra. Darbo pavadinimas „Tetrahymena pyriformis
1-ojo transliacijos elongacijos faktoriaus β ir γ subvienetų
rekombinantinių baltymų gryninimas ir analizė“

DARBINĖ VEIKLA

- 2021–iki dabar **Jaunesnioji mokslo darbuotoja**, Vilniaus universitetas,
Gyvybės mokslų centras, EMBL partnerystės institutas
Jaunesnioji asistentė, Vilniaus universitetas, Gyvybės
mokslų centras, Biomokslų institutas
- 2018–2021 **Jaunesnioji mokslo darbuotoja / Jaunesnioji asistentė**,
Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras, Biomokslų
institutas
- 2013–2014 **Jaunesnioji mokslo darbuotoja**, Vilniaus universitetas,
Biochemijos ir molekulinės biologijos katedra
- 2010–2011 / **Jaunesnioji mokslo darbuotoja**, Vilniaus universitetas,
2006–2007 Biochemijos ir biofizikos katedra
- 2007–2020 **Laboratorijos specialistė**, SK Impeks Medicinos
diagnostikos centras, Molekulinės diagnostikos laboratorija

PADĖKA

Yra tiek daug žmonių, kuriems tariu nuoširdų ačiū! Be jūsų ši disertacija nebūtų išvydusi dienos šviesos.

Pirmiausia esu dėkinga savo pirmajai darbo vadovei prof. dr. Vidai Kirvelienei už suteiktą galimybę tyrinėti ir pažinti ląstelių pasaulį bei vadovavimą, už galimybę tobulėti bei patirtį, kurią įgijau doktorantūros metu. Dėkoju už perimtą vadovavimo estafetę doc. dr. Aušrai Sasnauskienei. Ačiū už naudingus patarimus ir pagalbą ruošiant disertaciją, už padėsinimus, kantrybę, palaikymą ir šiltus pokalbius.

Taip pat, labai noriu padėkoti doc.dr. Daivai Dabkevičienei ir dr. Urtei Neniškytei už begalinį palaikymą, tikėjimą, bendradarbiavimą, vertingus patarimus, paskatinimus, diskusijas ir pagalbą ruošiant publikaciją bei disertaciją. Ačiū už nuoširdžius pokalbius ir draugystę.

Ačiū dr. Liepai Gasiulei už pagalbą eksperimentuose.

Pranui Grigaičiui už pagalbą nepasiklysti baltymų sąveikų tinkluose ir bendradarbiavimą ruošiant publikaciją.

Už palaikymą, pokalbius ir mielus prisiminimus esu dėkinga doc.dr. Violetai Jonušienei, Vidai Piskarskienei, doc.dr. Sofijai Sasnauskienei ir Vilmantei Žitkutei.

Ačiū BTI Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriui už suteiktą galimybę naudotis EVOS FL vaizdinimo sistema.

Olgai Černyšovai už galimybę derinti doktorantūrą su darbu SK Impeks „Medicinos ir diagnostikos centre“, nuoširdžius pokalbius, palaikymą ir tikėjimą.

Labai dėkoju tėvams, savo ir vyro šeimoms bei draugams už palaikymą, paskatinimus, meilę, buvimą šalia, o taip pat už žinojimą, kad nepavykus eksperimentams, laikas praleistas su jumis visada buvo ir bus nuostabus.

Ypatingos padėkos mano mylimiausiems: Audriui bei doktorantūros metu gimusioms mažosioms „disertacijoms“ – Smiltei ir Adui. Ačiū, kad išmokėt kantrybės, supratimo kas yra besąlyginė meilė ir laimė, už galimybę derinti doktorantūrą ir buvimą žmona bei mama.

Ačiū visiems, kad buvot šalia, kai buvo sunku ir džiaugėtės kartu, kai pavyko!

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
Tiražas 15 egz.