

**VILNIAUS UNIVERSITETAS**

Aušra SASNAUSKIENĖ

**FOTODINAMINIO POVEIKIO SUKELTI  
LĄSTELIŲ ŽŪTIES VYKSMAI *IN VITRO*:  
FOTOSENSIBILIZATORIAUS LOKALIZACIJOS  
REIŠMĖ**

Daktaro disertacija

Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

Vilnius, 2011

Disertacija rengta 2006 – 2011 metais Vilniaus universitete, Gamtos mokslų fakulteto Biochemijos ir Biofizikos katedroje

Mokslinė vadovė:

prof. dr. Vida Kirvelienė (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P)

## TURINYS

SANTRUMPOS.....	4
ĮVADAS .....	7
MOKSLINIS NAUJUMAS.....	10
GINAMIEJI TEIGINIAI .....	11
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	12
1.1 Fotodinaminio poveikio principai .....	12
1.2 Ląstelių žūties tipai .....	23
1.3 Mitochondrijos ir ląstelių žūtis .....	35
1.4 Lizosomos ir ląstelių žūtis .....	41
1.5 Ląstelių atsakas į fotodinaminį poveikį.....	52
2. MEDŽIAGOS IR METODAI .....	63
2.1 Medžiagos.....	63
2.2 Ląstelių kultūros .....	64
2.3 Inkubacija su fotosensibilizatoriumi bei švitinimas .....	64
2.4 Fotosensibilizatoriaus lokalizacijos ląstelėse vaizdinimas.....	65
2.5 Ląstelių gyvybingumo testai.....	66
2.6 Ląstelių žūties kelio nustatymas dažant AO ir EtBr mišiniu.....	67
2.7 Ląstelių paviršiaus ir branduolių morfologijos vaizdinimas .....	67
2.8 Citrato sintazės aktyvumo nustatymas .....	68
2.9 N-acetil-β-gliukozaminidazės aktyvumo nustatymas .....	69
2.10 Kaspazės 3 aktyvumo nustatymas .....	69
2.11 Genų raiškos RNR lygiu nustatymas.....	70
2.12 Western blot analizė .....	72
2.13 LC3 baltymo lokalizacijos ląstelėse vaizdinimas.....	76
2.14 Ląstelių analizė tėkmės citometru .....	77
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....	79
3.1 Skirtingose ląstelės organelėse sukauptų fotosensibilizatorių sukelta ląstelių žūtis .....	79
3.2 A-431 ląstelių ciklo pokyčiai po fotodinaminio poveikio.....	92
3.3 Fotodinaminio poveikio sukelta autofagija A-431 ląstelėse .....	96
3.4 Citokinų VEGF-A, IL-1α ir transkripcijos veiksnio HIF-1 α subvieneto raiška A-431 ląstelėse po fotodinaminio poveikio .....	99
3.5 Rezultatų apibendrinimas .....	102
IŠVADOS .....	106
LITERATŪROS ŠALTINIAI .....	107
Publikacijų disertacijos tema sąrašas.....	128

## SANTRUMPOS

$\Delta\psi_m$	mitochondrijų membranos įtampa
A-431	žmogaus epidermoidinės karcinomos ląstelių linija
Ac	acetilgrupė
Ahr	arilangliavandenilių receptorius
ALA	5-aminolevulino rūgštis
BSA	jaučio serumo albuminas
ACTB	$\beta$ -aktino genas ar jo transkriptas
AFC	7-amino-4-trifluormetilkumarinas
$\beta$ -AGA	N-acetil- $\beta$ -gliukozaminidazė
AlPcS <sub>4</sub>	aliuminio (III) ftalocianino tetrasulfonatas
ALA	5-aminolevulino rūgštis
ANT	adenino nukleotidų nešiklis
AO	akridino oranžinis
BrdU	5-bromo-2'-deoksiuridinas
CD	citotoksinė dozė
CypD	ciklofilinas D
DMEM	Dulbecco modifikuota Eagle terpė
ET	endoplazminis tinklas
EtBr	etidžio bromidas, 3,8-diamin-5-etil-6-fenilfenantridino bromidas
FCS	fetalinis veršelio serumas
FDP	fotodinaminis poveikis
FDT	fotodinaminė terapija
FTP	fototoksinis poveikis
HEPES	2-[4-(2-hidroksietil)piperazin-1-il]etansulfoninė rūgštis
HIF-1	hipoksijos indukuojamas veiksnys 1
HIF-1 $\alpha$	hipoksijos indukuojamo veiksnio 1, alfa subvienetas
HIF1A	hipoksijos indukuojamo veiksnio 1, alfa subvienetą koduojantis genas ar jo transkriptas
HMGB1	branduolio baltymas <i>high-mobility group box 1</i>
IL-1 $\alpha$	interleukinas 1 $\alpha$
IL1A	interleukiną 1 $\alpha$ koduojantis genas ar jo transkriptas
IP3	inozitolio 1,4,5-trisfosfatas

kDNR	kopi DNR ( <i>copy DNA</i> )
KV	kristalinis violetinis
LC3	su mikrovamzdeliais susijusio baltymo 1 lengvoji grandinė 3 ( <i>microtubule-associated protein 1 light chain 3</i> )
LMP	lizosomų membranos pralaidumas
LT Y	lizosomų žymuo <i>LysoTracker Yellow-HCK-123</i>
MAPK	mitogeno aktyvinama baltymų kinazė
MH-22A	pelės hepatomos epiteliškų ląstelių linija
MIMP	mitochondrijų išorinės membranos pralaidumas
MNP	mitochondrijų nesavitosios poros
MT DR	mitochondrijų žymuo <i>MitoTracker DeepRed 633</i>
MT G	mitochondrijų žymuo <i>MitoTracker Green</i>
mTHPC	mezo-tetra-(3-hidroksifenil)chlorinas
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil-tetrazolio bromidas
NDS	natrio dodecilsulfatas
NPe6	N-aspartilo chlorinas e6
p21	nuo ciklinų priklausomų kinazių slopiklis 1A
P21	nuo ciklinų priklausomų kinazių slopiklį 1A koduojantis genas ar jo transkriptas
Pc4	silicio ftalocianinas ([ HOSiPcOSi(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> N-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ])
PI3K	fosfatidilinozitolio 3-kinazė
PI	propidžio jodidas
PpIX	protoporfirinas IX
Rh123	rodaminas 123, 2-(6-amin-3-imin-3H-ksanten-9-il)benzoinės rūgšties metilo esteris
ROS	aktyviosios deguonies formos
Safr	safraninas O, (3,7-diamino-2,8-dimetilo-5-fenilfenazino chloridas)
SN	standartinis nuokrypis
SRB	sulforodaminas B, 2-(3-dietilamino-6-dietilazanioidenksanten-9-il)-5-sulfo-benzensulfonatas
TNF-α	naviko nekrozės veiksnys alfa
TRAIL	ligandas, sąveikaujantis su TNF receptoriumi ir sukeliantis apoptozę ( <i>tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10</i> )

VDAC        nuo įtampos priklausomas anijonų kanalas  
VEGF-A     kraujagyslių endotelio augimo veiksnys A  
VEGFA     kraujagyslių endotelio augimo veiksnį A koduojantis genas ar jo  
              transkriptas

## IVADAS

Ląstelės žūties vyksmai yra svarbi sparčiai besivystančios gyvybės mokslų šakos - molekulinės medicinos, vienijančios biochemiją ir mediciną, - tyrimų sritis. Siekiama atskleisti biomolekulių virsmus, vykstančius pažeistoje ir žūvančioje ląstelėje. Šių žinių pagrindu kuriami nauji gydymo būdai, kurie paskatina ar nuslopina reikiamų biomolekulių raišką arba jų aktyvumą.

Šiame darbe apžvelgiame žinias, kurias sukaupėme, tirdami vėžinių ląstelių žūtį, kaip atsaką į fotodinaminį poveikį *in vitro*. Fotodinaminis poveikis – tai regimosios šviesos, ląstelės sukaupto fotosensibilizatoriaus ir deguonies sąveikos rezultatas (O'Connor et al., 2009). Dėl šios sąveikos ląstelėje susidaro aktyvios deguonies formos (ROS), kurios oksiduoja biomolekules. Jų veikla sutrinka, ir ląstelėje kyla atsakomųjų reakcijų banga, kuri gali baigtis ląstelių žūtimi. Fotodinaminis poveikis yra pagrįsta fotodinaminė terapija – veiksmingas ląstelių naikinimo būdas, taikomas gydyti vėžį ir kai kurias kitas ligas, kylančias dėl pagreitetos ląstelių proliferacijos. Fotodinaminį poveikį mes naudojome oksidaciniam stresui įvairiose ląstelės organelėse sukelti, kad būtų galima atskleisti, kokį atsaką sukelia skirtingų ląstelės organelių pažeidimas.

Aktyviosios deguonies formos (ROS) dalyvauja daugelyje ląstelės procesų fiziologinėmis ir pataloginėmis sąlygomis: ląstelės žūtyje, signalo perdavime ir kt. Dažniausiai ląstelėje susidarančios aktyviosios deguonies formos - superoksido anijonas ir vandenilio peroksidas. Manoma, jog fotodinaminio poveikio metu dažniausiai susidaro vienypis deguonis ( $^1O_2$ ) (Moan and Sommer, 1985). Kadangi spindulys, kuriuo  $^1O_2$  gali pažeisti biomolekules, skirtingų autorių duomenimis, yra 20 ar 100 nm (Hatz et al., 2008; Moan and Berg, 1991), tai fotodinaminis poveikis gali pažeisti tas ląstelės organelės, kurios yra prikaupusios fotosensibilizatoriaus. Fotosensibilizatoriaus lokalizacija ląstelėje priklauso nuo jo fizikinių ir cheminių savybių bei inkubacijos režimo.

Apoptozę sukeliančio signalo perdavime dalyvauja įvairios ląstelės struktūros: plazminė membrana, mitochondrijos, endoplazminis tinklas, lizosomos. Pastaraisiais metais tiriant ląstelių žūtį daug dėmesio skiriama skirtingų ląstelės organelių/struktūrų tarpusavio „komunikacijai“.

Šiame darbe vertinome ląstelių atsaką į skirtingose ląstelės organelėse sulaikomų fotosensibilizatorių fotodinaminį poveikį. Fotodinaminį poveikį sukėlėme naudodami šiuos fotosensibilizatorius: 1) įvairiose ląstelės organelėse: endoplazminiame tinkle, Goldžio komplekse, mitochondrijose, lizosomose kaupiamą mezo-tetra-(3-hidroksifenil)chloriną (mTHPC), kuris yra sėkmingai taikomas vėžio gydymui, 2) savitai mitochondrijose kaupiamus katijonus rodaminą 123 (Rh123) ir safraniną O (Safr) bei 3) į lizosomas patenkantį aliuminio (III) ftalocianino tetrasulfonatą (AlPcS<sub>4</sub>). Palyginome įvairiose ląstelės organelėse lokalizuoto mTHPC, savitai mitochondrijose sukaupto Safr ir lizosomose sulaikyto AlPcS<sub>4</sub> sukeltą fotodinaminį poveikį ląstelės ciklui, žūčiai, autofagijai ir kai kurių genų raiškai žmogaus epidermoidinės karcinomos A-431 ląstelėse.

Mūsų sukauptos žinios turėtų būti įdomios dviem aspektais. Pirma, atskleisti pokyčiai, vykstantys ląstelėse po fotodinaminio poveikio, leidžia patikslinti fotodinaminės terapijos režimus. Antra, lokalus fotodinaminis poveikis išryškino skirtingų ląstelės skyrių pažaidų reikšmę ląstelės žūties virsmams, kas leidžia tiksliau prognozuoti vaistų, atrankiai kaupiamų tam tikrose ląstelės organelėse, poveikį ląstelei, audiniui, organizmui.

#### Šio darbo tikslas -

įvertinti ląstelių atsaką į skirtingose ląstelės organelėse sukauptų fotosensibilizatorių ir šviesos poveikį *in vitro*.

Tikslui pasiekti buvo iškelti tokie **uždaviniai**:

- Įvertinti mitochondrijose lokalizuoto Rh123 fototoksinį poveikį pelės hepatomos MH-22A ląstelėms ir palyginti jį su įvairiose ląstelės organelėse kaupiamo mTHPC fotodinaminiu poveikiu;



- Ištirti žmogaus epidermoidinės karcinomos A-431 ląstelių gyvybingumui svarbius vyksmus (ląstelių žūtį, autofagiją, poveikį ląstelės ciklui) po fotodinaminio poveikio, naudojant šiuos fotosensibilizatorius:
  - įvairiose ląstelės membranose lokalizuotą mTHPC;
  - mitochondrijose kaupiamą lipofilinį katijoną Safr;
  - lizosomose sulaikomą AlPcS<sub>4</sub>;
- Nustatyti citokinus interleukiną 1 $\alpha$  ir kraujagyslių endotelio augimo veiksnį A bei hipoksijos indukuojamo veiksnio 1 alfa subvienetą koduojančių genų raišką RNR lygiu A-431 ląstelėse po Safr, AlPcS<sub>4</sub> ar mTHPC sukkelto fotodinaminio poveikio.

## MOKSLINIS NAUJUMAS

Šiame darbe pirmą kartą atlikti kompleksiniai tyrimai, apimantys ląstelių gyvybingumui svarbius vyksmus: apoptozę, autofagiją, poveikį ląstelės ciklui, kaip atsaką į lokalų fotodinaminį poveikį atskiroms ląstelės organelėms.

Pirmą kartą ištirtas mitochondrijų viduje kaupiamo safranino O fotodinaminis poveikis ląstelėms *in vitro*.

Naujų žinių apie mitochondrijas ir ląstelių žūties vyksmus gauta veikiant ląsteles mitochondrijų viduje sulaikomais fotosensibilizatoriais rodaminu 123 (Sasnauskiene et al., 2009a) arba safraninu O (Sasnauskiene et al., 2009b) ir šviesa. Nustatyta, kad tokio pobūdžio fotodinaminis poveikis sukelia savitą ląstelių atsaką, kuris skiriasi nuo atsako į ląstelės membranų ar lizosomų pažaidas: nestiprus poveikis (iki CD50) pažeidžia mitochondrijų užpildą, bet nesukelia ląstelių žūties. Po fotodinaminio poveikio safraninu O, žmogaus epidermoidinės karcinomos A-431 ląstelių gyvybingumas mažėja dėl ląstelės ciklo arešto, tačiau jos nežūva. Didesnės fotodinaminio poveikio dozės sukelia apoptozę.

Nors yra parodyta, jog po fotodinaminio poveikio, sukkelto naudojant lizosomose susikaupusį fotosensibilizatorių ląstelėse padaugėja autofagosomų, tačiau nėra duomenų apie tokio pobūdžio fotodinaminio poveikio reikšmę autofagijos vyksmui. Šiame darbe pirmą kartą parodyta, jog po fotodinaminio poveikio naudojant lizosomų viduje sukauptą ALPcS<sub>4</sub>, autofagosomų ląstelėse daugėja ir autofagija vyksta po silpnos poveikio dozės (CD20), tačiau po didesnių poveikio dozių (CD50 ir CD80) autofagosomų padaugėja, tačiau nevyksta galutinės autofagijos stadijos.

Pirmą kartą parodyta, kad po subletalus fotodinaminio poveikio, nukreipto į mitochondrijų (Safr) ar lizosomų (ALPcS<sub>4</sub>) užpildą, A-431 ląstelėse padidėja citokinų VEGF-A ir IL-1 $\alpha$  bei transkripcijos veiksnio HIF-1  $\alpha$  subvieneto genų raiška RNR lygiu.

## GINAMIEJI TEIGINIAI

- Rodamino 123 ir šviesos vidutinio stiprumo poveikis (CD40) pelės hepatomos MH-22A ląstelių mitochondrijų užpildui nesukelia ląstelių žūtis. Tokio pat stiprumo fotodinaminis poveikis, sukeltas įvairiose membranose kaupiamo mTHPC inicijuoja apoptozę.
- Žmogaus epidermoidinės karcinomos A-431 ląstelių žūtį inicijuoja visi tirtieji fotodinaminiai poveikiai: safranino O, mTHPC ar ALPcS<sub>4</sub> sukelti vyksmai, išskyrus silpno ir vidutinio stiprumo (iki CD50) fotodinaminį poveikį, sukeltą mitochondrijų viduje sukauptu safraninu O.
- Visi tirtieji fotodinaminiai poveikiai sutrikdo A-431 ląstelių ciklą, tačiau ilgalaikis poveikis (sumažėja S fazės ląstelių) ląstelės ciklui išlieka po vidutinio stiprumo (CD50) safranino O sukulto fotodinaminio poveikio, kai žuvusių ląstelių neaptikome, ir po didelio stiprumo (CD80) ALPcS<sub>4</sub> sukulto fotodinaminio poveikio, kai kilo apoptozė ir nekrozė.
- Visi tirtieji fotodinaminiai poveikiai sukelia autofagiją A-431 ląstelėse. Tačiau lizosomas pažeidžiantis ALPcS<sub>4</sub> sukeltas vidutinio stiprumo (CD50) ir stiprus (CD80) fotodinaminis poveikis nuslopina galutines autofagijos stadijas.
- Visi tirtieji fotodinaminiai poveikiai didina citokinų VEGF-A, IL-1 $\alpha$  ir transkripcijos veiksnio HIF-1  $\alpha$  subvieneto genų raišką RNR lygiu A-431 ląstelėse.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## Ląstelių atsakas į fotodinaminį poveikį: žūties priežastys ir tipai

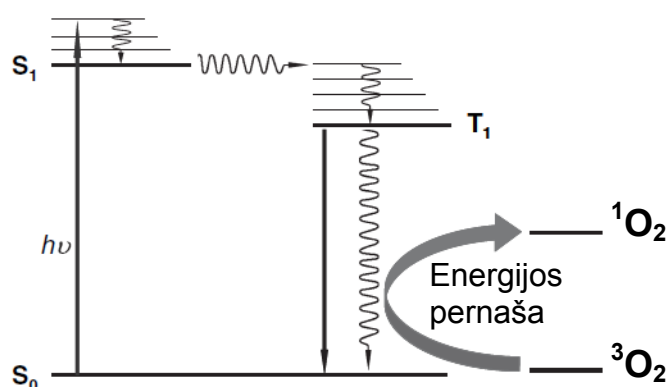
### 1.1 Fotodinaminio poveikio principai

Fotodinaminis poveikis (FDP) tai šviesos, fotosensibilizatoriaus ir deguonies sąveika, sukianti audinio pažeidimą (O'Connor et al., 2009). FDP vyksta, kai ląstelėje sukauptas fotosensibilizatorius, sužadintas tinkamo bangos ilgio šviesa, sukelia aktyviųjų deguonies formų (ROS) susidarymą. ROS inicijuoja ląstelės žūties vyksmus. FDP yra taikomas gydyti vėžį bei kitas ligas (pvz., aktinę keratozę, amžinę geltonosios dėmės degeneraciją), kurias sukelia intensyvi ląstelių proliferacija. Šis gydymo būdas vadinamas fotodinamine terapija (FDT). Pastarąjį dešimtmetį intensyviai tiriama galimybė FDT taikyti ir mikroorganizmų (bakterijų, virusų) sukeltų infekcijų gydymui. Yra parodyta, jog FDP veiksmingai naikina atsparumą antibiotikams turinčias bakterijas. Tai galėtų padėti išspręsti bakterijų daugiavaisčio atsparumo problemą (Hamblin and Hasan, 2004).

Fotodinaminio poveikio metu šviesos aktyvuotas fotosensibilizatorius iš pagrindinės būsenos ( $S_0$ ) pereina į sužadintą vienlypę būseną ( $S_1$ ). Įvykus interkombinacinei konversijai (tarpsisteminiam šuoliui), sužadintas fotosensibilizatorius iš  $S_1$  būsenos pereina į ilgiau gyvuojančią trilypę būseną ( $T_1$ ). Dėl trilypės būsenos fotosensibilizatoriaus sąveikų su kitomis molekulėmis gali susidaryti ROS (O'Connor et al., 2009).

Fotosensibilizuotos oksidacijos reakcijos pagal mechanizmą yra skirstomos į I ir II tipo reakcijas (Foote, 1968). I tipo reakcijų metu sužadintas fotosensibilizatorius reaguoja su substratu, susidarant aktyviems radikalams. Šiems radikalams reaguojant su deguonimi gali susidaryti superoksido anijonas ( $O_2^{\cdot-}$ ). Biologinėse sistemose  $O_2^{\cdot-}$  nėra labai aktyvūs, bet, veikiant superoksido dismutazei, iš jo gali susidaryti vandenilio peroksidas. Iš  $H_2O_2$  ir  $O_2^{\cdot-}$  Haber-Weiss'o ( $H_2O_2 + O_2^{\cdot-} \rightarrow OH\cdot + OH^- + O_2$ ) ar Fenton'o ( $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH\cdot + OH^-$ ) reakcijų metu gali susidaryti labai aktyvūs hidroksiradikalai ( $OH\cdot$ ). II tipo reakcijų metu trilypės būsenos fotosensibilizatorius tiesiogiai

perduoda energiją deguonies molekulei, susidarant trumpai gyvuojančiam, bet labai aktyviam vienlypiam deguoniui ( $^1\text{O}_2$ ) (1.1 pav.). Vykstant fotosensibilizacijai, gali vykti abiejų tipų reakcijos tuo pat metu. Vyraujantis reakcijų tipas labiausiai priklauso nuo fotosensibilizatoriaus prigimties ir nuo deguonies koncentracijos (Plaetzer et al., 2009). Vis dėlto vyrauja nuomonė, jog FDP metu dažniausiai vyksta II tipo reakcijos (Moan and Sommer, 1985).



1.1 pav. Vienlypio deguonies susidarymas (pagal (Hatz et al., 2008)).

Fotosensibilizatoriaus aktyvacijos bangos ilgis ir tripletinės būsenos susidarymo kvantinis našumas yra svarbiausios gydymui naudojamų fotosensibilizatorių fotofizikinės savybės. „Gero“ fotosensibilizatoriaus sugerties bangos ilgio maksimumas turi būti tarp 650 nm ir 850 nm. Tuomet bangos ilgis yra pakankamai didelis, kad šviesa galėtų prasiskverbti į audinį, o trilypės būsenos energijos pakanka  $^1\text{O}_2$  susidarymui. Didelis tarpsteminio šuolio kvantinis našumas ir ilgai gyvuojanti trilypė būsena dažniausiai lemia veiksmingas citotoksines reakcijas (Plaetzer et al., 2009).

Susidariusių ROS gyvavimo trukmė yra vienas iš veiksnių, lemiančių atstumą, kurį ROS gali difunduoti ląstelėje. Labai aktyvios ROS, kurios gyvuoja trumpai ir veikia tik nedideliu spinduliu, reaguoja tik su greta esančiomis molekulėmis, todėl ląstelės atsakui į ROS ypatingai svarbi yra jų susidarymo vieta ląstelėje. Žinant ROS gyvavimo trukmę, difuzijos spindulys gali būti apskaičiuojamas pagal šią lygtį:  $d = \sqrt{6tD}$  ( $d$  – difuzijos spindulys;  $t$  –

gyvavimo trukmė;  $D$  – difuzijos koeficientas) (Hatz et al., 2008). Taigi, nustatčius ROS gyvavimo trukmę bei difuzijos koeficientą ląstelėse, galima apskaičiuoti difuzijos atstumą ir įvertinti, kokias ląstelės struktūras galėtų pažeisti tam tikroje ląstelės vietoje sukauptas ir ROS generuojantis fotosensibilizatorius.

### **1.1.1 Vienlypio deguonies gyvavimo trukmė ir sąveika su biomolekulėmis**

$^1\text{O}_2$  gyvavimo trukmė vertinama naudojant tiesioginius (spektroskopiniai, pvz., matuojama fosforescencija ties 1270 nm) ir netiesioginius (cheminės gaudyklės) metodus. Šiuos metodus lengva taikyti paprastose sistemose, bet sudėtinga ląstelėse. Be to, vertinant  $^1\text{O}_2$  gyvavimo trukmę ląstelėse, reikia turėti omenyje, jog registruojamą signalą gali sukelti ne tik ląstelių viduje esantis, bet ir iš ląstelių difundavęs  $^1\text{O}_2$ . Naudojant netiesioginį metodą, buvo nustatyta, jog  $^1\text{O}_2$  ląstelėse gali difunduoti tik 10 – 20 nm, kas atitiktų 10 – 40 ns gyvavimo trukmę (Moan and Berg, 1991). Šis tyrimas rėmėsi vieno porfirino sukelta kito porfirino fotosensibilizuota oksidacija, žinant vidutinį atstumą tarp šių molekulių ląstelėse. Vėlesniuose tyrimuose, vertinant  $^1\text{O}_2$  kiekį spektroskopiniu metodu, buvo nustatyta kiek didesnė gyvavimo trukmė: 30 – 180 ns (Niedre et al., 2002). Remiantis naujausiais fosforescencijos tyrimais pavienėse ląstelėse (Hatz et al., 2008), nustatyta, jog  $^1\text{O}_2$  gyvavimo trukmė ląstelėje siekia net  $\sim 3 \mu\text{s}$  ir yra beveik lygi jo gyvavimo trukmei gryname vandenyje ( $\sim 3,5 \mu\text{s}$ ). Be to, parodyta, jog  $^1\text{O}_2$  difuzijos koeficientas ląstelėse siekia  $2\text{-}4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  ir yra eile mažesnis, nei vandenyje ( $2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ), tad  $^1\text{O}_2$  molekulei ląstelės vidus yra „klampenis“, nei vanduo. Tuomet ląstelėje susidaręs  $^1\text{O}_2$  gali būti aktyvus aplinkoje, kurios erdvinis spindulys siekia  $\sim 100 \text{ nm}$ . Taigi, galimas  $^1\text{O}_2$  difuzijos atstumas yra santykinai mažas, palyginus su žinduolių ląstelių skersmeniu (10-50  $\mu\text{m}$ ), ir jo sukeltos pažeidos turėtų būti lokalizuotos greta tos vietos, kurioje yra sukauptas fotosensibilizatorius.

$^1\text{O}_2$  reaguoja su daugeliu molekulių: lipidais, baltymais, nukleorūgštimis. Manoma, jog pagrindinis taikiny yra baltymai, kadangi histidino, triptofano, metionino, cisteino ir tirozino reakcijos su  $^1\text{O}_2$  greičio konstantos siekia atitinkamai  $(3,2-9; 3-7; 1,6; 0,9 \text{ ir } 0,8) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Redmond and Kochevar, 2006). Polinesočiujų riebalų rūgščių reakcijos su  $^1\text{O}_2$  greičio konstantos yra nuo  $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  iki  $2,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Redmond and Kochevar, 2006). Polinesočiosios riebalų rūgštys ląstelėse yra labai tikėtinas membranose susidariusio  $^1\text{O}_2$  taikiny.  $^1\text{O}_2$  gali oksiduoti ir nukleorūgštis. Aktyviausiai su  $^1\text{O}_2$  reaguoja guaninas ( $k = 5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Redmond and Kochevar, 2006)). Visų šių biomolekulių oksidacija gali sukelti ląstelių atsaką.

Fotosensibilizacijos metu ROS gali ne tik tiesiogiai pažeisti ląstelių struktūras, bet ir sukelti sudėtingesnį atsaką, inicijuodamas genų raišką. Klausimas, kaip trumpai gyvuojančios ROS, pvz.,  $^1\text{O}_2$ , gali sukelti atsaką toli nuo susidarymo vietos, kol kas lieka neatsakytas. Galimi bent trys mechanizmai, kuriais  $^1\text{O}_2$  galėtų veikti signalo perdavimą: 1) tiesiogiai oksiduojami signalinio kelio komponentai; 2) susidaro oksidacijos produktai, kurie galėtų difunduoti ir reaguoti su signalinio kelio komponentais; 3) ląstelės oksidacijos-redukcijos pusiausvyra pasislenka į labiau oksiduotą būvį taip, kad yra oksiduojama daugiau signalinio kelio komponentų (Kochevar, 2004).

Fotodinaminio poveikio sukeltas oksidacinis stresas ląstelėse ir audiniuose indukuoja įvairius atsakus, kurie gali būti skirstomi į nedelsiamus (*immediate*), ankstyvuosius ir vėlyvuosius (Henderson et al., 2007). FDP poveikio metu susidariusios ROS, o ypač  $^1\text{O}_2$  „akimirksniu“ oksiduoja biomolekules: lipidus, baltymus ir kiek mažiau nukleorūgštis. Tai gali arba padidinti plazminės membranos pralaidumą ir sukelti nekrozę, arba aktyvuoti signalinius kelius, kurie per kelias minutes ar valandas gali paveikti genų raišką, aktyvuoti atsakus į stresą, reparacines reakcijas ir/arba inicijuoti ląstelių žūtį, pvz., apoptozę. Taikant FDT navikams, po šių ankstyvųjų įvykių seka antriniai vietiniai ir sisteminiai įvykiai, kuriuos sukelia navikų kraujotakos sutrikimai, uždegimas ir priešvėžinės imuninės reakcijos. Šie atsakai trunka

kelias dienas ar net savaites, ir jų pobūdis, trukmė bei eiga priklauso nuo ląstelių/naviko tipo, fotosensibilizatoriaus bei švitinimo režimo.

Eksperimentuose *in vivo* nustatyta, jog fotosensibilizatoriai kaupiasi ir naviko ląstelėse, ir jo kraujagyslėse. FDT metu navikas sunyksta ne tik dėl paties naviko ląstelių žūties, bet ir dėl to, jog yra sutrikdoma naviko kraujotaka bei aktyvuojamas imuninis atsakas (Castano et al., 2006).

### **1.1.2 Fotosensibilizatoriai ir jų klasifikacija**

Efektyvus fotosensibilizatorius turi veiksmingai sugerti fotonus (didelis šviesos sugerties koeficientas), pereiti į trilypę būseną (didelis trilypės būsenos susidarymo kvantinis našumas), o trilypė būsena turi pakankamai ilgai gyvuoti, kad įvyktų reakcijos su kitomis molekulėmis. Daugelis junginių, kurie gali pereiti į trilypę būseną, sudaryti radikalus bei ROS, turi heterociklinio makrociklo struktūrą su konjuguota dvigubųjų ryšių sistema (pvz., porfino žiedas).

Fotosensibilizatoriai yra klasifikuojami į porfirinus ir neporfirinus (O'Connor et al., 2009). Porfirinų kilmės fotosensibilizatoriai yra skirstomi į pirmos, antros ir trečios kartos fotosensibilizatorius. Pirmosios kartos fotosensibilizatoriams priklauso hematoporfirinas (Hp), hematoporfirino darinys (HpD) ir fotofrinas. Fotofrinas taikomas klinikose nuo 1993 m. ir yra daugiau nei 120 šalių patvirtintas gydyti šlapimo pūslės, skrandžio, gimdos kaklelio, stemplės, plaučių ir bronchų vėžį (Juzeniene et al., 2007). Antrosios kartos fotosensibilizatoriai buvo pradėti naudoti siekiant išvengti kai kurių pirmosios kartos fotosensibilizatorių trūkumų: cheminio nevienalytiškumo (porfirinų mišinys), ilgai išliekančio odos jautrumo šviesai bei mažos ilgujų bangų šviesos sugerties, lemiančios nepakankamą šviesos skvarbą į audinį. Antrosios kartos fotosensibilizatoriai yra chemiškai vienalytės medžiagos: chlorinai, ftalocianinai, benzoporfirinai, naftalocianinai, bakteriochlorinai, purpurinai, porficenai, feoforbidai ir t. t., stipriai sugeriančios 650-850 nm šviesą, pasižyminčios aukštu  $^1\text{O}_2$  susidarymo kvantiniu našumu ir fotojautrumą sukeliančios tik trumpam laikui (Juzeniene et al., 2007). Trečiosios kartos



fotosensibilizatoriai - tai antrosios kartos fotosensibilizatoriai, konjuguoti ar kitaip susieti su nešiklio molekulėmis (monokloniniais antikūnais, liposomomis ar polimerais), kurios atrankiai sulaikomos vėžiniame audinyje. Šiame darbe naudoti fotosensibilizatoriai yra antrosios kartos fotosensibilizatoriai, kai kurie jų yra naudojami gydymui.

Viena iš būtinų fotosensibilizatoriaus savybių – jis turi patekti į ląstelę. Fotosensibilizatoriaus patekimą ir lokalizaciją ląstelėse lemia jo fizikinės ir cheminės savybės: lipofiliškumas, elektrinis krūvis, bei inkubacijos režimas (ląstelių tipas, inkubacijos su fotosensibilizatoriumi trukmė).

### **1.1.3 Fotosensibilizatorių lipofiliškumas**

Hidrofobiniai junginiai patenka į ląsteles ir jose telkiasi, pasyviai pasiskirstydami membranose. Pasiskirstymo koeficientas vandens-oktanolio mišinyje ( $\log P$ , *partition coefficient*) yra vienas iš parametrų, leidžiančių prognozuoti hidrofobinių vaistų gebą tirpti membranose.  $\log P$  - tai junginio neutralių molekulių koncentracijų santykio *n*-oktanolio ir vandens fazėse logaritmas. Matuojant  $\log P$  junginiams, kurie gali jonizuotis, parenkamas toks vandeninės fazės pH, kad jonizacija būtų kuo mažesnė. Tuo tarpu, pasidalijimo koeficientas ( $\log D$ , *distribution coefficient*) yra visų junginio formų (jonizuotų ir nejonizuotų) koncentracijų sumos santykio abiejose fazėse logaritmas. Todėl dydis  $\log D$  nepriklauso nuo pH.

Lyginant panašios struktūros molekules, pasiskirstymo ir pasidalijimo koeficientai gerai koreliuoja su fotosensibilizatoriaus geba jungtis prie liposomų; tuo tarpu skirtingos prigimties molekulėms tai ne visuomet būdinga (Keczynski et al., 2002). Fotosensibilizatoriaus hidrofobiškumas dažnai koreliuoja ir su fototoksiškumu, ypač panašios prigimties molekulėms. Tiriant keletą modifikuotų ALPcS<sub>4</sub> darinių, kuriuose viena sulfogrupė buvo pakeista skirtingo ilgio alifatine grandine, nustatyta, jog hidrofiliškesni junginiai sunkiau patenka į ląsteles ir pasižymi mažesniu fototoksiškumu (Allen et al., 2002). Tačiau ši tendencija galioja tam tikrame intervale - labai hidrofobiški junginiai sunkiai patenka į ląsteles (Ben-Dror et al., 2006). Tam neprieštarauja

ir bendra farmakologinė Lipinski'o „penkių taisyklė“, teigianti, jog vaistas, kurio log  $P$  yra didesnis už 5, sunkiai pateks į ląstelę (Lipinski et al., 2001).

Patekimą į membranas labai palengvina molekulės amfifiliškumas. Tuomet hidrofobinė molekulės dalis įsiterpia į membraną, o krūvį turinti dalis lieka membranos paviršiuje (Kepczynski et al., 2002). Vienas iš amfifilinių molekulių pavyzdžių tai mitochondrijose kaupiamos medžiagos, vadinamos delokalizuotais katijonais. Šios molekulės turi du bendrus struktūrinius bruožus: 1) molekulės pagrindas yra hidrofobinės prigimties molekulė su hidrofiliniu, elektrinį krūvį turinčiu centru; 2)  $\pi$  elektronų krūvio tankis driekiasi per tris ar daugiau atomų. Tai lemia teigiamo krūvio tankio pasiskirstymą tarp dviejų ar daugiau atomų, t. y. teigiamo krūvio delokalizaciją. Abu šie struktūriniai bruožai yra būtini delokalizuotų katijonų kaupimui mitochondrijų užpilde. Pakankamas lipofiliškumas bei teigiamo krūvio delokalizacija sumažina laisvosios energijos pokytį, pereinant iš vandeninės fazės į hidrofobinę, ir sudaro sąlygas delokalizuotiems katijonams lengvai pereiti membranas. Jie patenka į ląsteles ir kaupiami mitochondrijose dėl plazminės membranos įtampos, neigiamos ląstelės viduje, ir dar didesnio vidinės mitochondrijų membranos įtampos, neigiamos mitochondrijų viduje (Weissig et al., 2004).

#### **1.1.4 Fotosensibilizatorių lokalizacija ląstelėse**

Fotosensibilizatoriai gali kauptis įvairiose ląstelės vietose. Priklausomai nuo fotosensibilizatoriaus prigimties, inkubacijos protokolo, ląstelių tipo, fotosensibilizatorius gali arba savitai lokalizuotis kokioje nors vienoje organelėje, arba kauptis keliose ląstelės vietose. Hidrofobiniai fotosensibilizatoriai į ląstelę patenka pasyvios difuzijos būdu, tuo tarpu hidrofiliniai – vykstant endocitozei.

Daugelis klinikiniams ir ikiklinikiniams tyrimams naudojamų fotosensibilizatorių: fotofrinas, mTHPC, endogeniniai porfirinai yra hidrofobiniai ir kaupiasi membraninėse ląstelės struktūrose (mitochondrijose, lizosomose, plazminėje membranoje, endoplazminiame tinkle, Goldžio

komplekse). Tačiau yra ir keletas gydymo požiūriu perspektyvių hidrofilinių fotosensibilizatorių: sulfoninti porfirinai ir ftalocianinai bei N-aspartilo chlorinas e6 (NPe6). Nors hidrofiliniai fotosensibilizatoriai į ląsteles patenka endocitozės keliu, kai kurie iš jų dėl hidrofobinių žiedų sistemos gali jungtis ir prie membranų (Reiners et al., 2010).

Kadangi fotosensibilizatoriai kaupiami ląstelės dalyse, kuriose gali vykti pradiniai ląstelių žūties vyksmai, tikėtina, kad ląstelės žūčiai svarbios ląstelės dalies fotopajaudos veiksmingai sukels ląstelių žūtį. Yra priimta manyti, jog mitochondrijose pasiskirstę fotosensibilizatoriai yra veiksmingesni už fotosensibilizatorius lokalizuotus kitose ląstelės vietose (Oleinick et al., 2002). Teigiamą krūvį turintys fotosensibilizatoriai (tokie kaip Rh123) gali kauptis mitochondrijose dėl vidinės mitochondrijų membranos įtampos, neigiamos mitochondrijų viduje. Yra nustatyta jog neutralūs (tokie kaip silicio ftalocianinas Pc4) ar neigiamą krūvį turintys (tokie kaip fotofrinai) fotosensibilizatoriai taip pat gali kauptis mitochondrijose. Gali būti, jog lemiantis tokios lokalizacijos veiksnys yra šių fotosensibilizatorių sąveika su mitochondrijų komponentais. Ilgą laiką buvo manoma, jog Pc4 gali jungtis prie lipido kardiolipino, kurio yra mitochondrijų vidinėje membranoje. Tačiau pastaraisiais metais nustatyta, jog nors Pc4 sukeltas FDP ir oksiduoja kardiolipiną, tačiau šis lipidas nelemia Pc4 lokalizacijos mitochondrijose (Rodriguez et al., 2010). Yra parodyta, jog porfirinai, ypač protoporfirinas IX (PpIX), gali jungtis prie periferinio benzodiazepino receptoriaus (hidrofobinis išorinės mitochondrijų membranos baltymas, vienas iš spėjamų mitochondrijų nesavitosios poros komponentų) (Verma et al., 1998). Deja, kol kas dar nėra nustatyta, kaip ir kodėl viena ar kita ląstelės vieta pritraukia fotosensibilizatorių.

### **1.1.5 Šiame darbe naudoti fotosensibilizatoriai**

#### **Mezo-tetra(3-hidroksifenil)chlorinas (mTHPC)**

mTHPC - tai amfifilinis chlorino darinys. Jo  $\log P = 5,5$  (1.1 lent.), t. y. didesnis už 5, tačiau Lipinski'o taisyklė šiam junginiui netaikytina, nes jo

molekulėje esančios hidroksigrupės suteikia šiam junginiui amfifilinį pobūdį. Yra parodyta, jog mTHPC fotodinaminį poveikį daugiausia lemia II tipo reakcijos, kurių metu susidaro  $^1\text{O}_2$  (Melnikova et al., 1999). Didelis mTHPC privalumas yra tas, jog jis stipriai sugeria raudonosios spektro dalies šviesą, o sugerties maksimumas yra ties 652 nm (Bonnett et al., 1989). mTHPC (vaisto komercinis pavadinimas - Foscan<sup>®</sup>) yra vienas veiksmingiausių šiuo metu klinikoje naudojamų fotosensibilizatorių. mTHPC fotodinaminė terapija 2001 m. ES, Norvegijoje ir Islandijoje buvo patvirtinta galvos ir kaklo vėžio gydymui (Juzeniene et al., 2007).

### **2-(6-amino-3-imino-3H-ksanten-9-il)benzoinės rūgšties metilo esteris (Rh123, rodaminas 123)**

Rh123 yra turbūt geriausiai žinomas mitochondrijose kaupiamas junginys, kuris nuo pat jo pirmojo pritaikymo 1982 m. (Chen et al., 1982) plačiai naudojamas kaip palyginus netoksiškas junginys mitochondrijoms dažyti gyvose ląstelėse. Buvo nustatyta, jog *in vitro* ilgai inkubuojant karcinomas ir normalias epitelines ląsteles su Rh123, atrankiai žūva karcinomos ląstelės (Lampidis et al., 1983). Be to, buvo parodyta, jog ir kiti delokalizuoti katijonai, pvz., šiame darbe naudotas safraninas O (Safr), taip pat atrankiai naikina karcinomos ląsteles *in vitro* (Lampidis et al., 1985). Tai vyksta todėl, kad karcinomos ląstelėms, palyginus su normaliomis epitelinėmis ląstelėmis, būdinga didesnė plazminės ir mitochondrijų membranos įtampa (Davis et al., 1985), todėl karcinomos ląstelės ir sukaupia tokius delokalizuotų katijonų kiekius, kurie ląstelėms būna toksiški. Vėlesniuose tyrimuose buvo pastebėta, kad bent jau dalinai, šių junginių atrankumą karcinomos ląstelėms lemia ir tai, jog delokalizuotus katijonus atpažįsta ir iš ląstelių išneša daugiavaistį atsparumą lemiantis P-glikoproteinas (Ramu and Ramu, 1993), kurį turi tyrimuose naudotos normalios epitelinės ląstelės (Kurtoglu and Lampidis, 2009).

Rh123 fototoksiškumas yra gana mažas. Tai aiškinama nedideliu, o kai kurių autorių duomenimis nuliniu,  $^1\text{O}_2$  susidarymo kvantiniu našumu (1.1 lent.). Rh123 fototoksiškumas gali būti padidintas, į molekulės sudėtį įterpus

Br atomų. Bromintų rodamino darinių (4,5-dibromorodamino metilo esterio ir 4,5-dibromorodamino n-butilo esterio)  $^1\text{O}_2$  kvantinis našumas yra žymiai didesnis (0,3 – 0,5), kas matyt, lemia ir didesnę fototoksiškumą (Pal et al., 1996). Dibromintas rodamino darinys patvirtintas JAV gydyti pacientus *ex vivo*, sergančius chroniška mieloidine leukemija ([photobiology.info](http://photobiology.info)). Įvedus pakaitus (pvz., Br), pakinta (padidėja) ne tik  $^1\text{O}_2$  susidarymo kvantinis našumas, bet ir kitos savybės, tarp jų ir lipofiliškumas. Yra parodyta, jog katijoniniai fotosensibilizatoriai yra atrankiai fototoksiški vėžinėms ląstelėms, o tai priklauso ir nuo jų lipofiliškumo/hidrofiliškumo (Lacerda et al., 2005). Lipofiliškesni junginiai gali kauptis ne tik mitochondrijose, bet ir kitose lipofilinėse ląstelės struktūrose, pvz., 2,4,5,7-tetrabromorodaminas 123 kaupiamas Goldžio komplekse (Ogata et al., 2003). Tuomet nebelieka atrankumo, nulemta mitochondrijų įtampos skirtumų vėžinėse ir nevėžinėse ląstelėse. Kai kurių tyrimų duomenimis, katijoninių fotosensibilizatorių atrankumas mitochondrijoms būna didžiausias, kai fotosensibilizatoriaus log *P* reikšmė yra intervale tarp 0,2 (Rh123) ir 20 (RhBr<sub>3</sub>) (Lacerda et al., 2005).

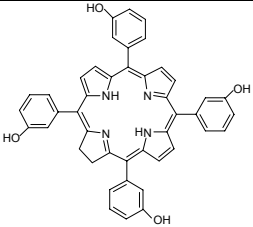
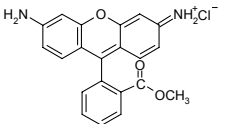
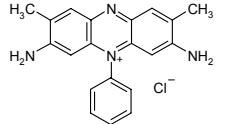
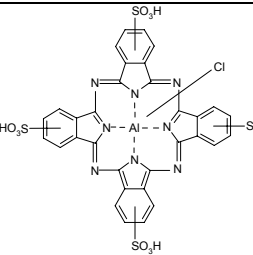
### **3,7-diamino-2,8-dimetilo-5-fenilfenazino chloridas (Safr, Safraninas O)**

Safr mūsų buvo pasirinktas fotosensibilizatoriumi kaip mitochondrijose kaupiamas delokalizuotas katijonas, kuriam būdingas didelis  $^1\text{O}_2$  generacijos kvantinis našumas (1.1 lent.). Safr yra dažnai naudojamas mitochondrijų membranos įtampai nustatyti (Akerman and Wikstrom, 1976).

### **Aluminio (III) ftalocianino tetrasulfonatas (AlPcS<sub>4</sub>)**

Sulfoninti aliuminio ftalocianinai yra vandenyje tirpūs antros kartos fotosensibilizatoriai, pasižymintys stipria sugertimi 660-700 nm intervale,  $\lambda_{\text{max}} = 680$  nm. Neigiamą krūvį turinčios sulfogrupės lemia ryškų molekulės hidrofiliškumą, o centrinis aliuminio jonas lemia ilgai gyvuojančią tripletinę būseną ir didelį  $^1\text{O}_2$  susidarymo našumą (Dubuc et al., 2008). AlPcS<sub>n</sub> (komercinis pavadinimas Photosense), įvairių sulfonintų aliuminio ftalocianinų (nuo mono iki tetra) mišinys, yra bandomas klinikiniuose tyrimuose (Trushina et al., 2008).

1.1 lentelė. Darbe naudotų fotosensibilizatorių savybės

Fotosensibilizatorius	Struktūrinė formulė	Lipofiliškumas, log <i>P</i>	<sup>1</sup> O <sub>2</sub> sudarymo kvantinis našumas, Φ, (žadinimo bangos ilgis)	Lokalizacija ląstelėje
<b>mTHPC</b>		5,5 (Cunderlikova et al., 2004); 5,42* (Kecpczynski et al., 2002).	0,7 (355 nm) (Bourre et al., 2003); 0,31 (>610 nm) (Redmond and Gamlin, 1999).	Endoplazminis tinklas ir Goldžio kompleksas (Marchal et al., 2007; Teiten et al., 2003); mitochondrijos (Kirveliėne et al., 2003; Sasnauskiene et al., 2009b; Triesscheijn et al., 2004); Chen, 2000 #2; Yow, 2000 #5}; lizosomos (Leung et al., 2002).
<b>Rh123</b>		-0,62 ( <i>P</i> = 0,24) (Trapp and Horobin, 2005); 0,18** (Bunting, 1992).	<sup>1</sup> O <sub>2</sub> neaptikta (Pal et al., 1996); 0,01 (514 nm) (Bunting, 1992); 0,03 (355 arba 532 nm) (Bunting, 1992).	Mitochondrijos (Johnson et al., 1980).
<b>Safr</b>		0,25** (Bunting, 1992)	0,24 (514 nm) (Bunting, 1992); 0,14 (355 arba 532 nm) (Bunting, 1992).	Mitochondrijos (Sasnauskiene et al., 2009b).
<b>AlPcS<sub>4</sub></b>		1*** (Berg et al., 1989)	0,39 (630 nm) (Fernandez et al., 1997); 0,3 (347 nm) (Keir et al., 1987).	Lizosomos (Moan et al., 1994; Peng et al., 1991).

\* log *D*; \*\* dažo dalis, prisijungusi prie nekvėpuojančių mitochondrijų; \*\*\* pasiskirstymo koeficientas vandens ir Tritono X-114 mišinyje.

## 1.2 Ląstelių žūties tipai

Remiantis ląstelių žūties nomenklatūros komiteto (*The Nomenclature Committee on Cell Death*) pasiūlymais (Kroemer et al., 2009) ląstelė laikoma žuvusia kai: 1) ląstelė praranda plazminės membranos integralumą (plazminė membrana yra pažeista), kas *in vitro* nustatoma pagal propidžio jodido ar kito panašaus dažo patekimą į ląsteles; 2) ląstelė ir jos branduolys, subyra į vadinamuosius apoptozinius kūnelius; 3) *in vivo* žuvusią ląstelę ar jos fragmentus „praryja“ gretimos ląstelės. Minėto komiteto siūlymu šiuo metu yra išskiriama dvylika ląstelės žūties tipų. Keturi pagrindiniai yra gana gerai ištirti. Tai apoptozė, nekrozė, autofagija ir ragėjimas. Kiti yra būdingi savitoms ląstelėms arba vyksta retais atvejais - mitozinė katastrofa, anoikis, ekscitotoksiškumas, Wallerian degeneracija, paraptozė, piroptozė, pironekrozė ir entozė. Pastaraisiais metais apibūdinti dar keli žūties tipai: netozė ir parthanatos (Galluzzi et al., 2011). Pagrindinių ląstelės žūties tipų morfologiniai ir biocheminiai požymiai pateikti 1.2 lent.

### 1.2.1 Apoptozė

Terminas „apoptozė“ buvo įvestas 1972 m. (Kerr et al., 1972). Autoriai ne tik pasiūlė terminą, žymintį savitą ląstelių žūties tipą, bet pabrėžė ir apoptozės, kaip vieno pagrindinių biologinių reiškinių, svarbą.

Vykstant apoptozei, ląstelė suapvalėja, įtraukia pseudopodijas, sumažėja ląstelės tūris, kondensuojasi chromatinas ir fragmentuojasi branduolys, ląstelės organelės dažniausiai nepakinta arba pakinta nežymiai, pūslėja plazminė membrana (nors jos vientisumas išlaikomas iki galutinių apoptozės stadijų), o *in vivo* apoptozines ląsteles praryja fagocitai. Nors yra keletas apoptozės tipų, inicijuojamų skirtingais keliais, žūvančių ląstelių morfologija yra panaši.

Išskirtiniausias apoptozės bruožas – tai branduolio kondensacija ir fragmentacija, kas nėra būdinga kitoms žūties formoms (Taylor et al., 2008). Apoptozės metu vyksta ir intensyvi branduolio DNR hidrolizė, susidarant trumpiems fragmentams, kurių dydis artimas 200 bp ar jų kartotiniui. Yra

priimta, jog apoptozės metu citoplazmos organelės nepakinta ar pakinta nežymiai. Vis dėlto jų pakyčius galima pastebėti, tik jie būna kur kas subtilesni nei, pavyzdžiui, nekrozės atveju: fragmentuojasi Goldžio kompleksas, endoplazminis tinklas ir mitochondrijos. Apoptozei labai svarbios kaspazės ir BCL2 šeimos baltymai.

### **Kaspazės**

Kaspazės tai cisteino peptidazės (žmogus turi 11 kaspazių), hidrolizuojančios substratus po Asp liekanos. Kaspazės sintetamos kaip profermentai, kurie aktyvuojami gavus apoptozinį signalą. Kaspazės sudaro trys pagrindiniai domenai: prodomenas bei didysis (p20) ir mažasis (p10) kataliziniai subvienetai. Didžiajame domene yra katalizinio centro Cys. Iniacijos kaspazių prodomenuose yra vietos, kuriomis kaspazė gali sąveikauti su kitomis signalinėmis molekulėmis: CARD (*caspase-recruitment domain*) domenas ir DED (*death-effector domain*) domenas. Iniacijos kaspazės aktyvuojamos suartėjus kelioms prokaspazių molekulėms oligomeriniuose signaliniuose kompleksuose (apoptosomoje mitochondrinio kelio atveju ir DISC baltymų komplekse, kuris susidaro prisijungus ligandui prie žūties receptoriaus, išorinio kelio atveju). Susidariusios aktyvios iniacijos kaspazės (kaspazė 8, kaspazė 9 ir kt.) hidrolizuodamos vykdyto prokaspazės, jas aktyvuoja: nuo prokaspazių yra nuskeliamas prodomenas ir atskiriami aktyvią vykdyto kaspazę sudarantys p20 ir p10 subvienetai. (Degterev and Yuan, 2008). Taip susidaro kaspazė 3, kaspazė 7 ir kt. Aktyvioms vykdyto kaspazėms suskaidžius savitas sekas turinčius struktūrinius ir reguliacinius baltymus, įvyksta daugelis apoptozei būdingų morfologinių ir biocheminių pokyčių.

### **BCL2 šeimos baltymai**

Baltymų BCL2 (*B-cell lymphoma protein-2*) šeima skirstoma į tris klases: 1) apoptozę slopinančius (BCL2, BCLXL, MCL1 ir pan.), kurie turi visus keturis BCL2 homologijos domenus (BH1-BH4); 2) apoptozę sukeliančius (BAX ir BAK) daugiadomenius (*multidomain*), turinčius BH1,



BH2 ir BH3 homologijos domenais, ir 3) apoptozę sukeliančius tiksliai BH3 domeną turinčius (*BH3-only*) baltymus (BID, BIM, BAD, NOXA, PUMA).

Apoptozę slopinantys BCL2 šeimos baltymai (tokie kaip BCL2, BCLXL) slopina daugiadomenių apoptozę sukeliančių baltymų BAX ir BAK aktyvumą (Youle and Strasser, 2008). Nuo šio slopinančio poveikio BAX ir BAK baltymus gali „išvaduoti“ vien tiksliai BH3 domeną turintys baltymai, prisijungdami prie apoptozę slopinančių BCL2 šeimos baltymų (Willis et al., 2007).

Vien tiksliai BH3 domeną turintys baltymai (pvz., BID) sukelia apoptozę sąveikaudami su daugiadomeniais apoptozę sukeliančiais BCL2 šeimos baltymais (BAX, BAK) (Youle and Strasser, 2008). Manoma, kad apoptozę sukeliančių daugiadomenių baltymų BH1, BH2 ir BH3 domenai sudaro hidrofobinį plyšį, kuris gali sąveikauti su BH3 domenu, esančiu vien tiksliai BH3 domeną turinčiuose baltymuose (Degterev and Yuan, 2008). Pakitus BAX ir BAK baltymų konformacijai, padidėja išorinės mitochondrijų membranos pralaidumas (Youle and Strasser, 2008).

Yra nustatyti du pagrindiniai keliai, kuriais inicijuojama apoptozė: vidinis (mitochondrinis) kelias ir išorinis kelias. Abu šie keliai susilieja, aktyvavus vykdymo kaspazės: kaspazę 3 ir kaspazę 7.

### **Vidinis kelias**

Vidinį kelią gali aktyvuoti įvairūs vystymosi signalai ir citotoksiniai poveikiai virusinė infekcija, DNR pažeidimas, augimo veiksnių pašalinimas. Vidinio kelio pagrindinis įvykis - mitochondrijų išorinės membranos pralaidumo (MIMP) padidėjimas, lemiantis mitochondrijų tarpmembraninių baltymų patekimą į citozolį. Iš mitochondrijų tarpmembraninės erdvės išteka citochromas c, SMAC/DIABLO, OMI/HTRA2, AIF (*apoptosis-inducing factor*), endonukleazė G (Taylor et al., 2008). Citochromas c išteka iš mitochondrijų dviem etapais: pirmiausiai jis atsikabina (jei yra prisikabinęs, nes dalis citochromo c yra laisva) nuo kardiolipino, esančio vidinėje mitochondrijų membranoje, ir tik po to, perėjęs išorinę mitochondrijų

membraną (pvz., pro BAX sudaromą kanalą), patenka į citozolį (Ott et al., 2002).

Citozolyje, esant ATP (geriau dATP), citochromas c jungiasi prie APAF1 (*apoptotic protease-activating factor 1*) ir sukelia pastarojo konformacijos pokyčius bei oligomerizaciją. Susidaro kaspazių aktyvacijos platforma - daugianaris baltymų kompleksas, vadinamas apoptosoma (Zou et al., 1999). Apoptosoma pritraukia, dimerizuoja ir aktyvuoja iniciacijos kaspazę 9, kuri aktyvuoja vykdymo kaspazes 3 ir 7, nuskeldama prodomeną nuo atitinkamų prokaspazių. Nustatyta, jog kaspazių aktyvacijai svarbus citochromo c oksidacinis-redukcinis būvis – kaspazes aktyvuoja tik oksiduotas citochromas c (Brown and Borutaite, 2008). Be to, pastaraisiais metais nustatyta, jog kaspazė 9 yra valdoma fosforiliniu, veikiant augimo veiksmų aktyvuotoms baltymų kinazėms (ERK1/2, PKA), hiperosmosinio streso aktyvuotai PKC $\zeta$  ar mitozės metu CDK1-ciklinui B1 (Allan and Clarke, 2009). Pavyzdžiui, mitozės metu CDK1-ciklino B1 kompleksas, o interfazės metu ERK1/2 fosforilina kaspazės 9 Thr125 ir taip nuslopina jos aktyvumą.

Iš mitochondrijų ištekėję kaspazių aktyvatoriai SMAC ir OMI blokuoja baltymui XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) būdingą kaspazių slopinimą (Tait and Green, 2010). AIF išteka iš mitochondrijų lėtai, kadangi inkaru yra prisitvirtinęs prie vidinės mitochondrijų membranos. Aktyvūs kalpainai padeda AIF atsikabinti nuo vidinės mitochondrijų membranos (Polster et al., 2005). Iš mitochondrijų ištekėjęs AIF nešamas į branduolį, kur sukelia DNR fragmentaciją bei chromatino kondensaciją (Norberg et al., 2010). Kadangi antioksidatoriai slopina AIF sukeltą žūtį, manoma, jog AIF atsipalaidavimui iš mitochondrijų svarbu ROS (Lee et al., 2005). Iš mitochondrijų tarpmembraninės ertmės ištekėjusi ir į branduolį patekusi endonukleazė G skaido DNR į oligonukleosomas (Galluzzi et al., 2008a). Parodyta, jog neuronuose H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sukeltas oksidacinis stresas indukuoja nuo endonukleazės G priklausomą ląstelių žūtį (Higgins et al., 2009). Taigi, padidėjus mitochondrijų išorinės membranos pralaidumui, kai kaspazės nėra aktyvuotos, iš mitochondrijų ištekėję AIF ir endonukleazė G gali sukelti nuo

kaspazių nepriklausomą ląstelių žūtį. Mitochondrijų išorinės membranos pralaidumas yra griežtai valdomas. Čia ypač svarbios apoptozę slopinančių ir apoptozę skatinančių BCL2 šeimos baltymų sąveikos (Tait and Green, 2010).

### **Išorinis kelias**

Išorinis kelias aktyvuojamas, žūties ligandams, tokiems kaip FasL ar TNF $\alpha$ , prisijungus prie atitinkamų žūties receptorių, esančių ląstelės išorėje. Tuomet citozolyje esantys receptorių fragmentai pritraukia pritaikymo baltymus, kaip FADD (*FAS-associated death domain protein*), kurie, savo ruožtu, pritraukia keletą kaspazės 8 molekulių ir taip sukelia kaspazės 8 autoaktyvaciją. Aktyvi kaspazė 8 proteoliziškai aktyvuoja vykdymo kaspazes 3 ir 7, taip sukeldama kitų kaspazių aktyvaciją, jų substratų hidrolizę bei ląstelės žūtį (Tait and Green, 2010).

Vadinamosiose I tipo ląstelėse kaspazės 8 sukeltos vykdymo kaspazių aktyvacijos pakanka apoptozei vykti, ir nedalyvaujant mitochondrijoms. Kai kuriais atvejais išorinis kelias susilieja su vidiniu keliu, kai kaspazė 8 hidrolizuoja citozolinį BID baltymą (tik BH3 domeną turintis baltymas, *BCL2 homology 3 (BH3)-interacting domain death agonist*) (Luo et al., 1998). Taip susidaręs tBID gali sukelti MIMP padidėjimą. Tikslus mechanizmas, kaip tBID padidina MIMP, nėra aiškus, tačiau yra pastebėta, jog tBID gali jungtis prie savito mitochondrijų vidinės membranos lipido kardiolipino (Gonzalvez et al., 2005), o jam įsiterpus į išorinę mitochondrijų membraną, gali palengvėti tBID sąveika su BAX ir BAK. Padidėjus MIMP, iš mitochondrijų tarpmembraninės ertmės į citozolį išteka citochromas c ir pradeda apoptosomos sąranką. Tai svarbu žūties receptorių aktyvacijos sukeltai apoptozei II tipo ląstelėse. II tipo ląstelės skiriasi nuo I tipo ląstelių tuo, jog žūties receptorių aktyvacijos sukeltai apoptozei būtinos mitochondrijos – apoptozė vyksta tik tuo atveju, kai iš mitochondrijų tarpmembraninės ertmės išteka baltymai, slopinantys XIAP (Tait and Green, 2010).

Dažniausiai, apoptozės indukcijai stuburinių ląstelėse yra reikalingas MIMP padidėjimas. Tai yra lemiamas įvykis (*point of no return*), kuriam įvykus greitai aktyvuojamos kaspazės, hidrolizuojančios šimtus ląstelės

baltymų, ir įvyksta apoptozė. Jei kaspazių aktyvumas yra nuslopintas, įvyksta nuo kaspazių nepriklausoma žūtis, kurią, manoma, sukelia: 1) iš mitochondrijų tarpmembraninės erdmės ištekėję baltymai AIF ir endonukleazė G, ir/arba 2) dėl sutrikusios mitochondrijų veiklos sumažėjęs ATP kiekis ląstelėse (Tait and Green, 2010).

### 1.2.2 Autofagija

Autofagija yra laikoma vienu pagrindinių ląstelių žūties tipų, o sutrikusi autofagija lemia kai kurias ligas, pvz., vėžį (Gozuacik and Kimchi, 2004). Autofagija inicijuojama ląstelės veikiant įvairiais stresą sukeliančiais poveikiais, tiek išoriniais (pvz., maisto medžiagų trūkumas, hipoksija), tiek viduląsteliniais (pvz., organelių ir citoplazmos komponentų pažeidimas).

Nors autofagija ir yra laikoma atskiru žūties tipu, yra pabrėžiama, jog pavadinime slypintis kvietimas manyti, jog ląstelės žūtis įvyksta dėl autofagijos, yra klaidinantis, ir autofagiją siūloma laikyti ląstelės žūties palydove, o ne priežastimi (Kroemer and Levine, 2008). Autofagija yra ne tik programuotos žūties tipas, ji gali būti ir atsarginė žūties programa tuomet, kai apoptozė yra nuslopinta, arba pažeistose ląstelėse aktyvuojamas apsauginis atsakas į stresą, kurio dėka ląstelė gali išvengti žūties (Maiuri et al., 2007).

Kol kas yra parodytas tik vienas atvejis *in vivo*, kai išveiklinus/nuslopinus autofagijos genus (*ATG*) ląstelių žūtis susilpnėja – tai būdinga *Drosophila melanogaster* seilės liaukų vystymuisi (Berry and Baehrecke, 2007). Daugeliu atvejų, išveiklinus/nuslopinus autofagijos genus, ląstelių žūtis ne susilpnėja, bet, atvirkščiai, įvyksta greičiau (Galluzzi et al., 2008b), dėl ko autofagija ir laikoma išgyventi padedančiu reiškiniu. Nėra abejonų, jog autofagija skatina ląstelių išgyvenamumą tiek eksperimentinėmis, tiek fiziologinėmis sąlygomis.

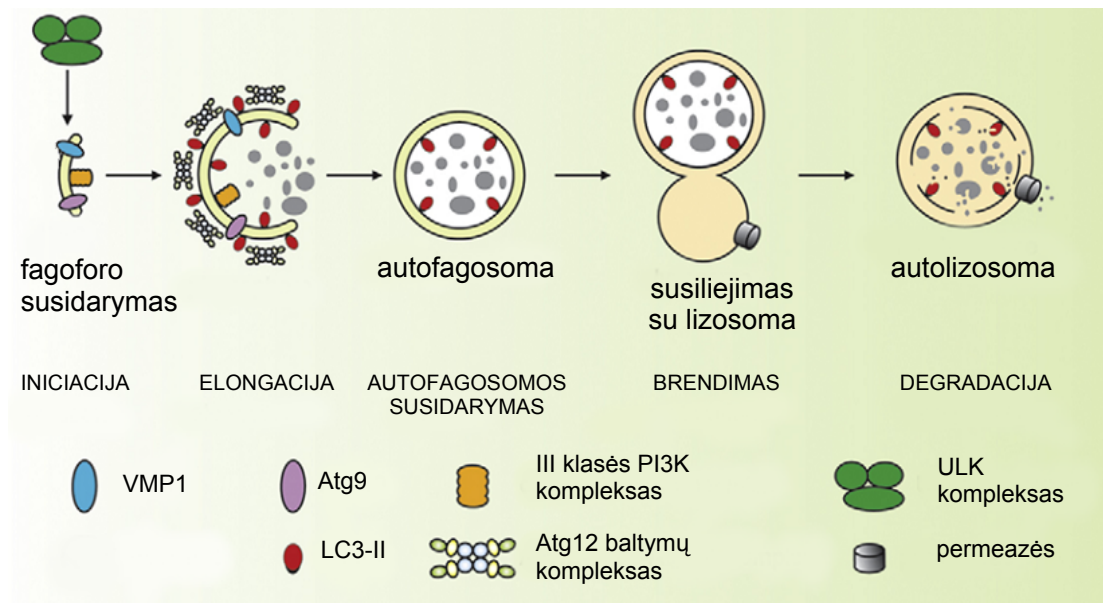
Autofaginės ląstelių žūties metu nevyksta chromatino kondensacija, tačiau citoplazmoje intensyviai susidaro autofaginės pūslelės. Autofagija - tai degradacijos procesas, kai dvigubą membraną turinčios autofagosomos atskiria organeles ar citozolio dalį, kurią, autofagosomoms susiliejus su lizosomomis,

suskaido lizosomų hidrolazės (He and Klionsky, 2009). Elektroniniu mikroskopu autofagosomą nuo kitų pūslelių (endosomų, lizosomų, apoptozinių kūnelių) galima atskirti pagal tai, jog šios pūslelės membrana yra dviguba. Susilieję autofagosomai ir lizosomai, išorinė autofagosomos membrana susilieja su lizosomos membrana, o autofagosomos vidinė membrana ir turinys yra degraduojamas. Autofagijos procesas pirmiausiai buvo ištirtas mielėse *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, ir buvo nustatyti 32 genai (*ATG*), kurių produktai vykdo autofagiją (He and Klionsky, 2009). *ATG* baltymai valdo didžiąją proceso dalį: jie svarbūs autofagijos iniciacijai, degraduotinos medžiagos atpažinimui, autofagijos pūslelės susidarymui ir sąliejai su lizosoma.

Žinduolių autofagija prasideda susidarant fagoforui - membraniniam dariniui, atskiriančiam degraduotiną medžiagą. Fagoforo susidarymui svarbūs bent penki molekuliniai komponentai: 1) Atg1/ULK kompleksas; 2) Beklinas 1 ir III klasės fosfatidilinozitolio 3-kinazės (PI3K) kompleksas; 3) du transmembraniniai baltymai Atg9 ir VMP1; 4) dvi į ubikvitiną panašių baltymų (Atg12 ir Atg8/LC3) konjugacijos sistemos; 5) baltymai, padedantys autofagosomoms ir lizosomoms susilieti (Kroemer et al., 2010).

Žinduolių autofagijos vyksmų sekoje galima išskirti keletą etapų: fagoforo susidarymas (iniciacija), fagoforo ilgėjimas (elongacija), autofagosomos susidarymas, autofagosomos sąlieja su endosoma/lizosoma (brendimas), autofagosomos turinio ir vidinės membranos skaidymas (1.2 pav.) (Yang and Klionsky, 2010).

Normaliomis sąlygomis autofagijos lygis yra nežymus. Kinazė mTOR yra vienas svarbiausių baltymų, pradedančių intensyvią autofagiją. Badaujant arba veikiant rapamicinu, yra nuslopinama mTOR ir ji disocijuoja nuo ULK komplekso. Tokiu būdu yra aktyvuojami ULK1 (arba ULK2) ir prasideda autofagijos vyksmai (He and Klionsky, 2009).



**1.2 pav.** Žinduolių ląstelėms būdingos autofagijos schema ir ją vykdančios molekulės (pagal (Yang and Klionsky, 2010)).

Autofaginės pūslelės elongacijai svarbios dvi į ubikvitiną panašios konjugacijos sistemos. Dalyvaujant vienai šių sistemų, veikiant peptidazei ATG4 ir fermentams ATG7 bei ATG3, fosfatidiletanolaminas yra prijungiamas prie LC3 baltymo glicino. Prijungus fosfatidiletanolaminą, tirpus baltymas LC3 (vadinamasis LC3 I) virsta autofaginės pūslelės baltymu LC3 II (Yang and Klionsky, 2010). LC3 II yra stabiliai surištas su autofagosomos membrana, ir autofagija yra dažnai nustatoma pagal padidėjusį šios baltymo formos kiekį ląstelėse (Klionsky et al., 2008).

Kitas autofagijos žymuo yra baltymas p62. Šis baltymas turi su LC3 sąveikaujantį regioną ir veikia kaip pritaikymo baltymas, nukreipdamas ubikvitinilintus baltymus į autofagosomas (Kirkin et al., 2009). Autofagijos metu p62 yra suskaidomas.

Fagoforas gali susidaryti iš įvairių ląstelės dalių: ET (Axe et al., 2008; Hayashi-Nishino et al., 2009; Yla-Anttila et al., 2009), išorinės mitochondrijų membranos (Hailey et al., 2010) ir plazminės membranos (Ravikumar et al., 2010). Nesavitosios (bendrosios) autofagijos metu, pvz., vykstančios ląstelei badaujant, lipidai yra sutelkiami iš daugelio vietų. Nėra žinoma, ar dėl savitų

poveikių (ET streso, mitochondrijų pažeidimų arba nuo plazminės membranos atsklidusių signalų) autofagosomos susidaro iš savitų membraninių organelių.

Įdomu, jog kai kurie genai ir jų produktai (pvz., p53, BCL2) yra svarbūs ir apoptozei, ir autofagijai.

### 1.2.3 Nekrozė

Morfologiniai nekrozės požymiai yra padidėjęs ląstelės tūris, išbrinkusios organelės, yranti plazminė membrana ir pro ją išsiliejantis ląstelės turinys. Nekrozė tradiciškai buvo laikoma atsitiktine, nevaldoma ląstelės žūties forma, vykstančia tik patologijos atveju. Pastaraisiais metais nustatyti signalo perdavimo keliai bei kataboliniai mechanizmai, valdantys nekrozinę ląstelių žūtį. Pavyzdžiui, buvo parodyta, jog žūties domeną turintys receptoriai (TNFR1, Fas/CD95 ir TRAILR) bei Toll tipo receptoriai (TLR3, TLR4) sukelia nekrozę, ypač kai yra kaspazių slopiklių. Buvo nustatyta, jog ląstelių žūtis, kurią sukelia receptorių TNFR1, Fas/CD95, TRAIL-R ir TLR3 aktyvacija, priklauso nuo kinazės RIP1 (*receptor-interacting protein 1*). Siekiant atskirti valdomą nekrozę nuo atsitiktinės nekrozės, RIP1 kinazės valdoma nekrozė buvo pavadinta „nekroptoze“ (Degterev et al., 2005). Nekroptoze kartais vadinama „tvarkingu sprogimu“ (Vandenabeele et al., 2010). Atlikus viso genomo siRNA patikrą (*genome wide siRNA screen*), nustatyta, jog nekroptozei svarbi ne tik RIP1, bet ir RIP3 kinazė (He et al., 2009). Yra parodyta, jog programuotos nekrozės iniciacijai *in vitro* ir *in vivo* svarbus RIP1 ir RIP3 katalizinis aktyvumas (Galluzzi et al., 2009).

Yra nustatyti kai kurie procesai, tarpiniai junginiai ir organelės, svarbūs nekrozinei ląstelių žūčiai, tačiau vis dar neaišku, kaip jie tarpusavyje susiję. Tai yra mitochondrijų pokyčiai (elektronų pernaša atskiriama nuo ATP sintezės, intensyviau susidaro ROS, padidėja mitochondrijų membranos pralaidumas), lizosomų pokyčiai (vykstant Fenton'o reakcijai susidaro ROS, padidėja lizosomų membranos pralaidumas), branduolio pokyčiai (hiperaktyvinama PARP1), lipidų degradacija (fosfolipazių, lipoksigenazių ir sfingomielinazių aktyvacijos pasekmė), padidėjusi  $Ca^{2+}$  koncentracija citozolyje, dėl ko padidėja

kai kurių peptidazių: kalpainų bei katepsinų, aktyvumas ir  $\text{Ca}^{2+}$  koncentracija mitochondrijose. Yra pastebėta, jog nekrozės metu PARP1 yra skaidomas kitaip nei apoptozės metu. Vykstant apoptozei, PARP1 skeliamas į 89 kDa ir 24 kDa fragmentus, o nekrozės metu susidaro 62 kDa ir 50 kDa fragmentai (Soldani and Scovassi, 2002). Kai kuriems nekrozės atvejams yra svarbios kinazės RIP1 ir RIP3. Tačiau kol kas nėra nustatyta bendrų biocheminių pokyčių, kuriuos būtų galima naudoti nekrozės identifikacijai, todėl teigiama, kad ląstelės žūva nekrozės būdu tuomet, kai nėra apoptozei ar autofagijai būdingų požymių, o proceso pradžioje padidėja plazminės membranos pralaidumas (apoptozės metu tai vyksta vėlyvosiose stadijose).

#### **1.2.4 Ragėjimas**

Ragėjimas - tai savitas programinės ląstelių žūties tipas, kuris būdingas epidermio ląstelėms ir kurio morfologiniai bei biocheminiai požymiai skiriasi nuo apoptozės. Įvykus ragėjimui, susidaro korneocitai, t. y. žuvę keratinocitai, turintys savitus baltymus (pvz., savitą keratiną, lorikriną, SPR ir involukriną) bei lipidus (pvz., riebalų rūgštis ir ceramidus), kurie lemia odos raginio sluoksnio savybes: struktūrinį stabilumą, mechaninį atsparumą, elastingumą. Ragėjimas kartais vadinamas keratinizacija arba raginio dangalo susidarymu ir yra laikomas galutinės diferenciacijos programa, panašia į kitų bebranduolių ląstelių: akies lęšio epitelio, eritrocitų susidarymą. Tačiau eritrocitus ir lęšio epitelio ląsteles galima paveikti taip, kad šios ląstelės žūtų, o korneocitai jau yra žuvusios ląstelės, todėl ragėjimas yra laikomas žūties programa (Kroemer et al., 2009).



**1.2 lentelė.** Pagrindinių ląstelės žūties tipų morfologiniai ir biocheminiai požymiai, pagal (Kroemer et al., 2009)

<b>Žūties tipas</b>	<b>Morfologiniai požymiai</b>	<b>Biocheminiai požymiai</b>
<b>Apoptozė</b>	Ląstelės apvalėja; Pseudopodijos įtraukiamos; Ląstelės ir branduolio tūris mažėja (vyksta branduolio piknozė); Branduolys fragmentuojamas (karioreksis); Nežymiai pakinta citoplazmos organelės; Plazminė membrana pūslėja; <i>In vivo</i> fagocitai praryja apoptozines ląsteles.	Aktyvuojami apoptozę sukeltantys BCL2 šeimos baltymai (pvz., BAX, BAK, BID); Aktyvuojamos kaspazės; Sumažėja mitochondrijų membranos įtampa ( $\Delta\psi_m$ ); Padidėja mitochondrijų išorinės membranos pralaidumas; DNR suskaidoma iki oligonukleosominių fragmentų; Suyra plazminė membrana; Plazminės membranos išoriniame sluoksnyje atsiranda fosfatidilserino; Padaugėja ROS ; Aptinkama viengrandininė DNR.
<b>Nekrozė</b>	Citoplazma brinksta (onkozė); Plazminė membrana suyra; Citoplazminės organelės brinksta; Nežymiai/vidutiniškai kondensuojamas chromatinas.	Aktyvuojami kalpainai; Aktyvuojami katepsinai; Sumažėja ATP kiekis; Iš ląstelių išteka HMGB1; Padidėja lizosomų membranos pralaidumas; Suyra plazminė membrana; Fosforilinamas RIP1; Ubikvitinilimas RIP1; Padaugėja ROS ; Savitas PARP1 skaldymo pobūdis.
<b>Autofagija</b>	Chromatinas nekondensuojamas; Citoplazmoje žymiai padaugėja autofaginių pūslelių; <i>In vivo</i> fagocitai nepraryja autofaginių ląstelių arba tai vyksta nežymiai.	Beklinas 1 disocijuoja nuo BCL2/XL; Procesas priklauso nuo <i>ATG</i> genų produktų; LC3 I virsta LC3 II; Degraduojamas p62 <sup>Lck</sup> .
<b>Ragėjimas</b>	Sunaikinamos citoplazminės organelės; Modifikuojama plazminė membrana; F ir L grūdeliuose kaupiami lipidai; Lipidai išmetami iš ląstelės; Aktyvavus peptidazes, atskiriami korneocitai (pleiskanos).	Padidėja transglutaminazių raiška; Padidėja transglutaminazių substratų raiška; Padaugėja biomolekulių sąsiuvų.

### 1.2.5 Žūvančios ląstelės ir imuninė sistema

Žuvusias ląsteles iš audinio pašalina gretimos ląstelės arba fagocitai, dažniausiai makrofagai (Zitvogel et al., 2010). Žūvanti ląstelė išleidžia savitas medžiagas (signalas „surask mane“) tam, kad pritrauktų judrius fagocitus, o ląstelės paviršius pakinta taip (signalas „praryk mane“), kad fagocitai atpažintų ir prarytų žuvusias ląsteles.

Nekrozės (nevaldoma ląstelių žūtis) metu plazminė membrana tampa pralaidi, ir ląstelių turinys išteka į tarpląstelinę ertmę (Taylor et al., 2008). Tai gali ne tik sukelti greta esančių ląstelių pažaidas, bet ir imuninį atsaką (Gallucci et al., 1999). Nekrozinės ląstelės beveik visada sukelia uždegimą, kurio metu yra aktyvuojami neutrofilai, makrofagai ir kitos imuninės sistemos ląstelės. Iš nekrozinių ląstelių ištekančios molekulės, vadinamosios DAMP (*danger-associated molecular patterns*), arba aliarminai, stimuliuoja makrofagų, dendritinių ir NK (*natural killer*) ląstelių receptorius (Oppenheim and Yang, 2005). Aktyvuotos dendritinės ląstelės, savo ruožtu, gali aktyvuoti T ląsteles ir inicijuoti imuninius atsakus. Yra nustatytos kelios nekrozinių ląstelių molekulės, kurios gali aktyvuoti dendritines ląsteles. Tai branduolio baltymas/citokinas HMGB1, šlapimo rūgštis, kai kurie šiluminio streso baltymai, viengrandininė RNR ir genomine DNR (Oppenheim and Yang, 2005; Scaffidi et al., 2002; Shi et al., 2003). Iš nekrozinių ląstelių taip pat gali iškėti IL-1 $\alpha$  ir stimuliuoti uždegimą (Zitvogel et al., 2010). Kai kuriais ypatingais atvejais ir nekrozės būdu žūvančių ląstelių išoriniame plazminės membranos sluoksnyje buvo aptikta fosfatidilserino (Kryska et al., 2004), kas būdinga apoptozinėms ląstelėms. Tokias ląsteles atpažįsta ir „praryja“ fagocitai (Brouckaert et al., 2004; Hirt and Leist, 2003).

Apoptozės būdu žūvančios ląstelės yra pašalinamos iš audinio, dar nespėjus suirti plazminei membranai. Apoptozinės ląstelės paleidžia į aplinką signalą „surask mane“. Tai nukleotidai ATP ir UTP (Elliott et al., 2009) bei lipidai: tirpus lizofosfatidilcholinai (Lauber et al., 2003), sfingozino 1-fosfatas (Gude et al., 2008). Šie lipidai ne tik pritraukia makrofagus, bet ir slopina

prouždegiminių citokinų (HMGB1, TNF- $\alpha$ , IL-12) bei skatina imuninę sistemą slopinančių veiksnių (IL-10, PGE<sub>2</sub>) sekreciją iš makrofagų (Zitvogel et al., 2010). Apoptozės būdu žūvančias ląsteles fagocitai atpažįsta iš plazminės membranos pokyčių – jau apoptozės pradžioje išoriniame plazminės membranos sluoksnyje aptinkama fosfatidilserino (Martin et al., 1995) (signalas „praryk mane“). Dažniausiai vykstant apoptozei, imuninė sistema nėra aktyvuojama, tačiau kai kurių poveikių sukeltos apoptozės metu gali būti sekretuojami ar į ląstelės paviršių išnešami saviti baltymai, tuomet dendritinės ląstelės praryja apoptozinę „medžiagą“, vyksta antigeno prezentacija ir kyla savitas imuninis atsakas (Zitvogel et al., 2008).

Stresą patyrusioje ląstelėje, dar prieš jai žūvant, dažnai intensyvėja autofagija. Autofagija yra svarbi ATP koncentracijos ląstelėje palaikymui, lizofosfatidilcholino (signalo „surask mane“) sekrecijai ir fosfatidilserino (signalo „praryk mane“), perkėlimui iš plazminės membranos citozolinio sluoksnio į išorinį (Zitvogel et al., 2010). Nuo autofagijos taip pat priklauso žūvančios ląstelės paviršiaus proteomas, be to autofagija stimuliuoja HMGB1 sekreciją (Thorburn et al., 2009).

Be kelių išimčių, apoptozinė programa dažniausiai leidžia išvengti imuninės sistemos aktyvacijos. Tuo tarpu audinyje pasirodžius nekrozinėms ląstelėms, jos „suprantamos“ kaip pavojus, ir tai yra signalas imuninio atsako aktyvacijai. Taigi, imuninė sistema skirtingai reaguoja į apoptozines ir nekrozinės ląsteles.

### **1.3 Mitochondrijos ir ląstelių žūtis**

1996-1997 m. buvo nustatyta, jog mitochondrijos yra labai svarbios ląstelių žūčiai. Mitochondrijos yra viena pagrindinių vietų, kur ląstelėje susidaro ROS. Daugiau ROS susidaro ir apoptozės, ir nekrozės metu. Išorinėje mitochondrijos membranoje esančiai monoaminoooksidazei oksiduojuant monoaminus, susidaro H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tačiau šio fermento substratų, monoaminų, koncentracija ląstelėse nėra didelė, todėl šios reakcijos metu negali susidaryti dideli ROS kiekiai, būdingi apoptozinei ar nekrozinėi ląstelių žūčiai.

Daugiausia ROS, ypač superoksido anijonų ( $O_2^{\cdot-}$ ), susidaro elektronų pernašos grandinėje, veikiant I ir III kompleksams (Skulachev, 2006).

Mitochondrijos išorinė membrana praleidžia mažas molekules, kadangi joje yra neatrankių kanalų, kuriuos sudaro mitochondrijos porinų šeima, vadinamieji VDAC baltymai. Tačiau mitochondrijos išorinė membrana nepraleidžia baltymų, ir ši barjerinė funkcija yra būtina ląstelėms išgyventi. MIMP padidėjimas yra vienas kertinių procesų, vykstančių apoptozės ir nekrozės metu.

### **1.3.1 Mitochondrijų išorinės membranos pralaidumo padidėjimas**

Padidėjus MIMP, iš mitochondrijų tarpmembraninės ertmės į citozolį išteka citochromas c ir kiti baltymai, aktyvuojantys kaspazes ir sukeltantys apoptozę. Nors MIMP gali padidėti vėlai, nuo apoptozės iniciacijos praėjus kelioms valandoms, pats MIMP didėjimas yra greitas procesas – pradėjus didėti MIMP, per 5 min. iš daugumos ląstelės mitochondrijų išteka citochromas c (Goldstein et al., 2000). Pastaruoju metu, tiriant pavienes ląsteles, nustatyta, jog MIMP padidėjimas, inicijuotas viename ląstelės taške, „bangomis“ išplinta visose ląstelės mitochondrijose. Nors šio proceso mechanizmas nėra aiškus, naudojant slopiklius, nustatyta, jog MIMP didėjimui svarbus baltymų fosforilinimas ir endoplazminio tinklo  $Ca^{2+}$  ATPazių veikla (Bhola et al., 2009; Lartigue et al., 2008; Rehm et al., 2009). MIMP padidėjimą gali sukelti: 1) BCL2 šeimos baltymai, 2) mitochondrijų nesavitosios poros (MNP), 3) lipidinės poros.

#### **BCL2 šeimos baltymai**

BAX (*BCL2-associated X protein*) arba BAK (*BCL2 antagonist or killer*) padidina MIMP. Mat, įvairūs poveikiai, sukeltantys apoptozę vidiniu keliu, nepadidina MIMP ląstelėse, neturinčiose abiejų šių baltymų, ir jų apoptozė nevyksta (Wei et al., 2001). BAX baltymą gali aktyvuoti sąveika su vien tikrai BH3 domeną turinčiais baltymais tBID ir BIM. Normaliomis sąlygomis BAX būna ląstelės citozolyje, o BAK yra integralusis mitochondrijų išorinės membranos baltymas. BAX ir BAK aktyvacijos metu ryškiai pakinta

šių baltymų konformacija, BAX patenka į mitochondrijos išorinę membraną, kur BAX ir BAK sudaro oligomerus.

Neseniai pasiūlytas biocheminiais duomenimis paremtas BAK aktyvacijos modelis (Dewson et al., 2008). Aktyvacijos metu molekulės paviršiuje atsiduria BH3 domenas ir atsiveria hidrofobinis plyšys, vienos molekulės BH3 domenas įsiterpia į kitos molekulės hidrofobinį plyšį, ir taip susidaro simetriški BAK homodimerai. Aktyvacijos metu taip pat atidengiamas ir dimerų sąveikos paviršius, tuomet gali susidaryti dar didesnio laipsnio molekulių oligomerai. Panašus mechanizmas, manoma, lemia ir BAX oligomerizaciją. Yra duomenų, jog BAX baltymo mitochondrijose padaugėjus tik keliais procentais, MIMP padidėja (Dussmann et al., 2010). Galutinai nėra nustatyta, kiek BAX ir BAK molekulių turi oligomerizuotis, kad padidėtų MIMP. Taip pat nežinomas ir tikslus mechanizmas kaip šie oligomerai didina MIMP. Greičiausiai, susidaro baltyminiai kanalai arba destabilizuojamos membranos ir susidaro lipidinės poros (Tait and Green, 2010).

### **Mitochondrijų nesavitosios poros**

Vienas iš veiksnių, nuo kurių priklauso MIMP yra mitochondrijų nesavitųjų porų (MNP) pralaidumas. Žinoma, jog šios poros atsiveria, kai sumažėja adenino nukleotidų koncentracija arba kyla oksidacinis stresas (Halestrap, 2009). MNP savybės yra gana gerai ištirtos, tačiau, jų molekulinė sudėtis nėra aiški. Ilgą laiką buvo manoma, kad MNP - tai baltymų kompleksas, perveriantis išorinę ir vidinę mitochondrijos membranas, kurio pagrindiniai komponentai yra šie: 1) išorinėje membranoje esantis nuo įtampos priklausomas anijonų kanalas (VDAC), 2) vidinėje mitochondrijos membranoje esantis adenino nukleotidų nešiklis (ANT) ir mitochondrijos užpilde esantis baltymas ciklofilinas D (CypD, mitochondrijų peptidil prolil-*cis, trans*-izomerazė) (Tsujimoto and Shimizu, 2007).

Pastaraisiais metais, „sukonstravus“ peles, kuriose buvo išveiklinti ANT, CypD arba VDAC, buvo gauti netikėti rezultatai. Genetiškai inaktyvavus dvi ANT izoformas (ANT1 ir ANT2) buvo nustatyta, jog šie baltymai nėra

būtinai MNP komponentai, tačiau yra svarbūs poros aktyvumo valdymui (Kokoszka et al., 2004).

Ląstelės ir mitochondrijos, išskirtos iš pelių, kuriose buvo išveiklintos visos trys VDAC izoformos (VDAC1, VDAC2, VDAC3), buvo vienodai, kaip laukinio tipo ląstelės ir mitochondrijos, jautrios  $\text{Ca}^{2+}$  ir oksidacinio streso sukeltam MIMP padidėjimui ir ląstelių žūčiai (Baines et al., 2007). Taigi VDAC nėra būtinas MNP sukeltai ląstelių žūčiai.

„Klasikiniai“ apoptozės induktoriai: staurosporinas, etopozidas,  $\text{TNF}\alpha$  ir kt., sukėlė pelių, kurios neturėjo CypD, ląstelių apoptozę taip pat veiksmingai, kaip ir laukinio tipo ląstelių apoptozę (Baines et al., 2005; Nakagawa et al., 2005; Schinzel et al., 2005). Kita vertus, buvo nustatyta, jog CypD reikalingas  $\text{Ca}^{2+}$  ir oksidacinio streso ( $\text{H}_2\text{O}_2$  indukuoto) sukeltai nekrozei. Padidinus  $\text{Ca}^{2+}$  koncentraciją laukinio tipo mitochondrijose, MNP pralaidumas padidėjo, tuo tarpu mitochondrijas neturėjusias CypD inkubavus didelės  $\text{Ca}^{2+}$  koncentracijos tirpale, MNP pralaidumas nepakito. Taigi, CypD ir MNP svarbūs  $\text{Ca}^{2+}$  ir oksidacinio streso sukeltai ląstelių žūčiai, tačiau CypD nėra būtinas „klasikinių“ apoptozės induktorių: staurosporino, etopozido,  $\text{TNF}\alpha$  ir kt., sukeltai apoptozei.

Šie tyrimai rodo, kad nei ANT, nei VDAC nėra MNP komponentai, tik CypD kai kuriais atvejais yra būtinas MNP komponentas. Tačiau neaišku, kaip tirpus mitochondrijų užpildo fermentas CypD gali sukelti vidinės mitochondrijų membranos pralaidumą. Galėtų būti koks nors membraninis MNP komponentas, surišantis CypD. Egzistuoja ir tokia hipotezė, jog MNP gali sudaryti bet kuris oksidacijos ar kitokio streso pažeistas vidinės membranos baltymas, dėl tų pažeidimų įgavęs naują, netinkamą konformaciją ir agregavęsis (He and Lemasters, 2002). Tokia pora būtų nevaldoma - jos neaktyvuotų  $\text{Ca}^{2+}$  ir neslopintų ciklosporinas A (MNP slopiklis, kuris veikia rišdamasis prie CypD).

Vis dar neaišku, kaip MNP padidina mitochondrijos išorinės membranos pralaidumą, kad iš tarpmembraninės ertmės galėtų išeiti apoptozę sukeltantys baltymai. Yra pasiūlytos kelios hipotezės. Pagal pirmąją hipotezę,

atsivėrus MNP, vidinė mitochondrijų membrana praleidžia jonus ir mažos molekulinės masės molekules. Kadangi baltymų ir kitų junginių koncentracija mitochondrijų užpilde yra didesnė nei tarpmembraninėje ertmėje, vanduo plūsta į mitochondrijų užpildą, mitochondrijų vidus išbrinksta. Vidinės mitochondrijų membranos plotas žymiai didesnis, nei išorinės, todėl išbrinkus mitochondrijų vidinei ertmei, yra suplėšoma išorinė mitochondrijų membrana ir į citozolį iš tarpmembraninės ertmės patenka apoptozę sukeliantys baltymai (Crompton, 1999). Pagal antrąją hipotezę, MNP sudarantiems baltymams sąveikaujant su aktyvuotais apoptozę skatinančiais BCL2 šeimos baltymais, susidaro savitos poros (Adachi et al., 2004; Marzo et al., 1998).

### **Lipidinės poros**

MIMP galėtų padidėti ir susidarius lipidinėms poroms: spėjama, kad aktyvuoti BAX tipo baltymai sulenkia išorinę mitochondrijų membraną, susidaro bent dalinai iš lipidų sudarytos poros, pro kurias iš mitochondrijų gali išeiti tarpmembraniniai baltymai (Basanez et al., 2002). Tačiau šio modelio patvirtinimui dar reikalingi papildomi tyrimai.

Kol kas nėra visiškai aišku, ar yra vienas bendras MIMP didinantis mechanizmas, kuriam svarbūs BCL2 baltymai, MNP komponentai ir lipidų molekulės, ar skirtingi apoptozę sukeliantys veiksniai indukuoja savitą mechanizmą, o gal tai priklauso nuo ląstelių tipo ir kitų sąlygų. Nors padidėjęs MNP pralaidumas buvo pirmoji pasiūlyta priežastis, dėl kurios didėja MIMP (Zamzami et al., 1996), šiuo metu tai nėra laikoma pagrindiniu apoptozės keliu. Yra priimta, jog MNP yra svarbesnės nekrozei, o ne apoptozei. MNP svarbios tik tais apoptozės atvejais, kuriems būdingas oksidacinis stresas ir  $Ca^{2+}$  koncentracijos padidėjimas mitochondrijose (pvz., širdies ir smegenų išemija-reperfuzija, kai kurios neurodegeneracinės ligos bei toksiniai poveikiai), o apoptozės metu MIMP dažniausiai padidėja dėl BAX ir BAK baltymų veiklos.

### 1.3.2 Padidėjusio MIMP poveikis mitochondrijoms

Mitochondrijos – tai dinamiškos organelės, kurios pastoviai fragmentuojasi ir viena su kita susilieja. Masiškai mitochondrijos skyla panašiu metu, kai padidėja MIMP, veikiant į dinaminą panašiam baltymui DRP1 (Frank et al., 2001). Apoptozės metu vykstanti mitochondrijų fragmentacija taip pat gali priklausyti ir nuo mitochondrijų membranų lipidų sudėties pokyčių (Garofalo et al., 2005). MIMP padidėja ir ląstelėse, neturinčiose DRP1, tačiau šis baltymas yra būtinas įprastiniam citochromo c ištekėjimo ir kaspazių aktyvacijos greičiui apoptozės metu (Ishihara et al., 2009). Mitochondrijų skilimo reikšmė apoptozei dar nėra aiški. Įdomu, jog badavimo sukeltos autofagijos metu vyksta priešingas procesas – mitochondrijos pailgėja, ir šį procesą sukelia DRP1 fosforilinimas (Blackstone and Chang, 2011).

Padidėjus MIMP, sumažėja  $\Delta\psi_m$  bei ATP sintezės greitis ir greičiau susidaro ROS. Šie procesai gali vykti nuo kaspazių priklausomu ir nepriklausomu būdu. Yra parodyta, jog aktyvuotos kaspazės skelia mitochondrijų kvėpavimo grandinės I komplekso 75 kDa subvienetą NDUFS1 ir dėl to sutrikus elektronų pernašai, mažėja  $\Delta\psi_m$  ir ATP, susidaro daugiau ROS ir mitochondrijos skyla (Ricci et al., 2004). Nefunkcionuojančios mitochondrijos gali būti pašalinamos savitos mitochondrijų autofagijos – mitofagijos būdu. Mitofagija gali prasidėti sumažėjus mitochondrijų membranos įtampai, atsivėrus MNP bei padidėjus MIMP (Colell et al., 2007; Rodriguez-Enriquez et al., 2009; Twig et al., 2008). Nors mitofagija, pirmiausia, yra homeostazei svarbus vyksmas, kurio metu pašalinamos pažeistos mitochondrijos, tačiau gali būti, jog tuomet, kai dėl mitofagijos ląstelėje kritiškai sumažėja mitochondrijų, ląstelė žūva (Xue et al., 2001a).

Net ir padidėjus MIMP, ląstelės gali išvengti žūties. Buvo parodyta, jog glicerolio aldehido 3-fosfato dehidrogenazė (GAPDH) apsaugo ląsteles nuo žūties jau padidėjus MIMP, jei kaspazės yra nuslopintos (Colell et al., 2007). Šiuo atveju, GAPDH veikia ne tik kaip glikolizės fermentas, bet ir valdo



autofagiją – dėl jo veiklos padidėja autofagijos baltymo ATG12 raiška ir tuomet pažeistos mitochondrijos yra greičiau pašalinamos autofagijos metu.

#### 1.4 Lizosomos ir ląstelių žūtis

Apoptozės molekulinį tyrimų pradžioje buvo manoma, jog branduolys ir mitochondrijos yra pagrindinės šiame procese veikiančios organelės, tačiau pastaraisiais metais nustatyta, jog lizosomos ir endoplazminis tinklas yra taip pat svarbūs apoptozei. Pastarąjį dešimtmetį buvo nustatyta, jog lizosomos svarbios ne tik makromolekulių skaidymui, bet ir ląstelės žūčiai. Lizosomos - tai labai dinamiškos organelės, į kurias pūslelių pernašos būdu patenka medžiagos iš trans-Goldžio tinklo (biosintezė), iš ląstelės išorės (endocitozė) ir iš pačios ląstelės (autofagija). Ilgą laiką lizosomų reikšmė ląstelių žūčiai nebuvo tiriama, kadangi elektroniniu mikroskopu negalima pastebėti žūties metu vykstančių lizosomų pokyčių. Pastaruosius galima įvertinti imunofluorescenciniais metodais, pagal į citozolį patekusius lizosomų baltymus. Be to, žūties tyrimams naudojami kai kurių kaspazių slopikliai, kurių didelės koncentracijos slopina ir lizosomų peptidazes (Boya and Kroemer, 2008).

Lizosomos - tai eukariotinėse ląstelėse esančios membrana apgaubtos pūslelės, kuriose sukauptos rūgštinės hidrolazės (de Duve, 1983). Lizosomose aptinkama daugiau nei 50 įvairių hidrolazių: fosfatazių, nukleazių, glikozidazių, peptidazių, sulfatazių ir lipazių (Kirkegaard and Jaattela, 2009). Geriausiai iširta lizosomų hidrolazių grupė – tai peptidazių šeima vadinama katepsiniais. Pagal aktyvaus centro amino rūgštį katepsinai yra skirstomi į cisteino (katepsinai B, C, F, H, K, L, O, S, V, W ir X), serino (katepsinai A ir G) bei asparto katepsinus (katepsinai D ir E) (Turk and Stoka, 2007). Lizosomų membraną nuo rūgštinių hidrolazių poveikio iš vidaus apsaugo lizosomų membranoje esantys stipriai glikozilinti baltymai Lamp-1 ir Lamp-2 (Boya and Kroemer, 2008). Pažeidus lizosomų membraną, padidėja vadinamasis lizosomų membranos pralaidumas (LMP) ir į citozolį išteka tirpus lizosomų turinys (tarp jų ir fermentai).

Ilgą laiką buvo manoma, jog į citozolį patekę lizosomų fermentai turėtų inicijuoti nekrozinę ląstelių žūtį. Tačiau 1998 m. buvo nustatyta, jog dėl oksidacinio streso katepsinui D ištekėjus iš lizosomų į citozolį, kyla apoptozė (Roberg and Ollinger, 1998). Be to, lizosomų destabilizacija bei padidėjęs LMP yra būdingas ir kitiems ląstelių žūties tipams: nekroptozei ir autofaginei ląstelių žūčiai. Lizosomų pažaidų mastas lemia žūties kelią: padidėjus LMP dalinai ir atrankiai kyla apoptozė, o LMP padidėjus visuotinai - nekrozė.

Šiuo metu yra manoma, jog apoptozė dažnai būna susijusi su katepsinų patekimu į citozolį. Skirtingų poveikių sukeltai apoptozei svarbūs katepsinai D, B ir L (Johansson et al., 2010). Šie katepsinai yra aktyvūs ne tik rūgščioje, bet ir neutralioje terpėje (Boya and Kroemer, 2008). LMP padidėja ne tik tais atvejais, kai ląstelių žūtis sukeliama tiesiogiai pažeidžiant lizosomų membranas (pvz., dėl oksidacinio streso), bet ir tuomet, kai ląstelių žūtį inicijuoja įvairūs „klasikiniai“ apoptozės induktoriai. Tai augimo veiksnių nebuvimas, mikrovamzdelius stabilizuojantys junginiai, etopozidas, sintetinis retinoidas CD437, staurosporinas, osmozinis stresas interleukinas-1, p53 aktyvacija, kai kurie priešvėžiniai vaistai, kai kurių receptorių aktyvacija: TNF šeimos receptorių, sigma 2 receptoriaus, B ląstelių receptoriaus (Kirkegaard and Jaattela, 2009). Vienuose eksperimentiniuose modeliuose LMP padidėjimas svarbus apoptozės iniciacijai, kituose – LMP padidėjimas vyksta jau išibėgėjus žūties vyksmams, kaip žūties signalo stiprinimas (amplifikacija). Nors padidėjus LMP, iš lizosomų išteka ne tik katepsinai, bet ir kitos hidrolazės bei  $H^+$  ir  $Ca^{2+}$ , dabar manoma, jog apoptozei svarbiausia tai, kad citozolyje padaugėja katepsinų. Katepsinams ištekėjus iš lizosomų į citozolį, gali kilti tiek nuo kaspazių priklausoma, tiek ir nepriklausoma ląstelių žūtis, dalyvaujant ar nedalyvaujant mitochondrijoms. Katepsinų taikiniai gali būti kaspazės 2 ir 8, fosfolipazė A2, sfingozino kinazė 1, ir BCL2 šeimos baltymai: BID, BCL2, BCLXL ir MCL1.

Yra nustatyta, jog didelės lizosomos yra jautresnės LMP padidėjimui, nei mažos (Ono et al., 2003). Tikslus mechanizmas, kaip padidėja LMP, nėra žinomas. Tai gali vykti lizosomos membranoje susidarius nesavitoms poroms,

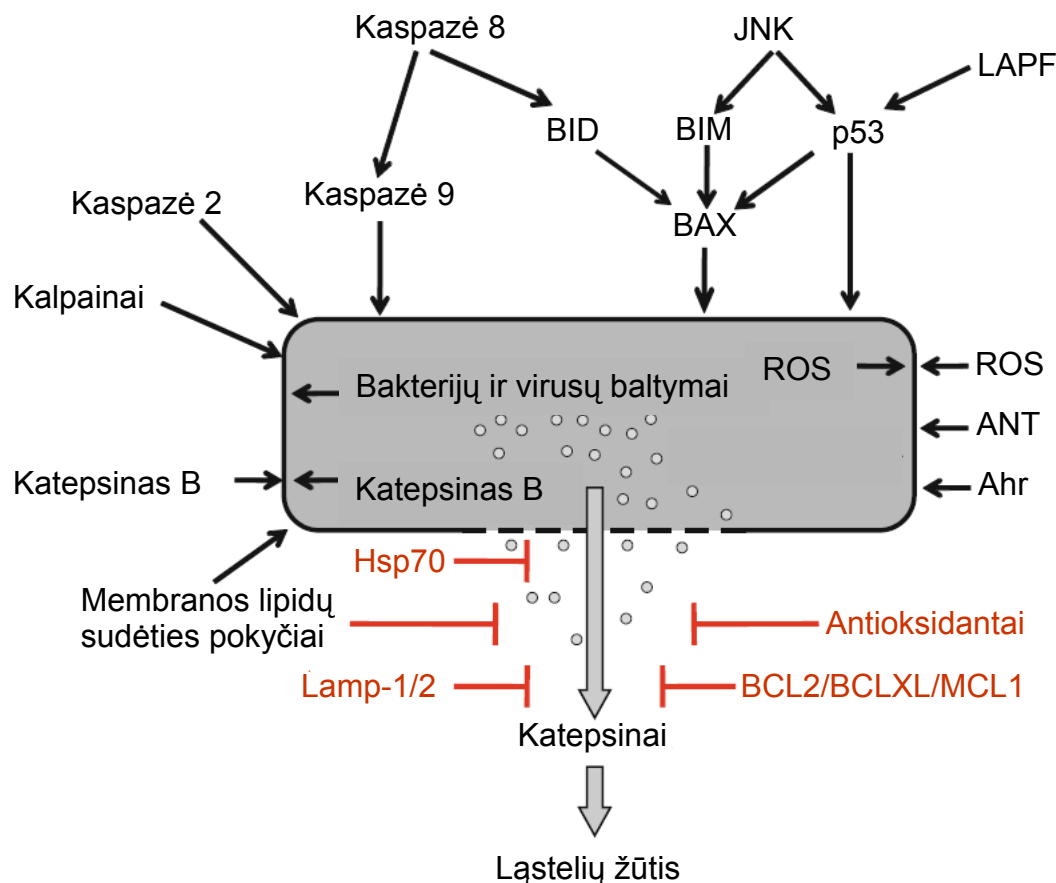
ar tiesiog pažeidus lizosomų membraną. LMP padidėjimo mechanizmas gali būti skirtingas, priklausomai nuo jį sukėlusio poveikio bei ląstelių tipo (Johansson et al., 2010).

#### **1.4.1 Lizosomų membranos pralaidumą didinantys veiksniai**

LMP gali padidėti veikiant apoptozę inicijuojantiems BCL2 šeimos baltymams, p53, peptidazėms (kaspazėms, katepsinams, kalpainams), kinazėms, ROS, arilangliavandenilių receptoriui (Ahr), virusiniams ir bakteriniams baltymams,  $\beta$  amiloido peptidams, apolipoproteinui E, ANT aktyvatoriui atraktilozidui, citotoksiniuose T limfocituose esančiam granuliziniui ar įvykus lizosomų membranos lipidų sudėties pokyčiams (1.3 pav.) (Johansson et al., 2010). Kai kurie veiksniai bus apžvelgti detaliau.

##### **BCL2 šeimos baltymai**

Yra pastebėta, jog žmogaus fibroblastus paveikus staurosporinu, BAX kolokalizuoja ne tik su mitochondrijomis, bet ir su lizosomomis (Kagedal et al., 2005). Be to, inkubuojant rekombinantinį BAX su išskirtomis lizosomomis pastebėta, jog jis įsiterpia į lizosomų membranas ir katepsinai išteka iš lizosomų. Šiuo metu yra vis daugiau publikacijų, įrodančių, jog įvairūs apoptozę sukeltantys ir slopinantys BCL2 šeimos baltymai valdo lizosomų membranos vientisumą. Yra parodyta, jog BAX yra aktyvuojamas ir patenka į lizosomas, veikiant hepatocitus riebalų rūgštimis (Feldstein et al., 2004), o cholangiokarcinomos ląsteles - TRAIL'u bei kiaušidžių vėžio ląsteles - etopozidu (Castino et al., 2009; Werneburg et al., 2007). Visais trim atvejais, sumažinus BAX raišką siRNR, padidėjo LMP. Paveikus cholangiokarcinomos ląsteles TRAIL, lizosomose buvo aptiktas ne tik BAX, bet ir kitas BCL2 šeimos baltymas BIM, o sumažinus BIM raišką siRNR, sumažėjo ir LMP (Werneburg et al., 2007). Taigi, gali būti, jog šiuo atveju BIM aktyvuoja BAX, kuris ir padidina LMP. Be to, yra nustatyta, jog stimuliuojant hepatocitus TNF $\alpha$ , BAX'ą aktyvuojantis baltymas BID padidina LMP (Guicciardi et al., 2005).



**1.3 pav.** Veiksniai, keičiantys lizosomų membranos pralaidumą. Didinantys - juodos rodyklės; mažinantys - raudonos (pagal (Johansson et al., 2010)).

Yra parodyta, jog esant BAX baltymo, BH3 domeną atitinkantys peptidai padidina išskirtų lizosomų membranos pralaidumą (Werneburg et al., 2007). Įdomu, jog BAK baltymas taip pat buvo aptiktas lizosomose (Feldstein et al., 2004), tačiau kol kas nėra duomenų, jog BAK didina LMP.

Taigi, apoptozę sukeliantys BCL2 šeimos baltymai gali padidinti ne tik MIMP, bet ir LMP. Tuomet iš lizosomų ištekėję katepsinai dar labiau sustiprina žūties signalą. Kadangi katepsinų ištekėjimas iš lizosomų buvo stebėtas net ir tose ląstelėse, kuriose išveiklinti abu BAX ir BAK baltymai (Boya et al., 2003), taigi šie baltymai nėra vieninteliai veiksniai, didinantys LMP.

### **Lizosomų membranos lipidų sudėties pokyčiai**

Lizosomų membranos komponentų pažeidimas ar membranos struktūros bei takumo pokyčiai gali destabilizuoti lizosomas. Apoptozės metu padidėjus citozolyje  $\text{Ca}^{2+}$  koncentracijai, padidėja fermentų, reguliuojančių membranos lipidų sudėtį – fosfolipazės A2, fosfolipazės C ir sfingomielinazės - aktyvumas. Tyrimams panaudojus išskirtas žiurkės lizosomas, buvo parodyta, jog šie fermentai, arachidono rūgštis, lizofosfatidilcholinas bei fosfatido rūgštis gali padidinti lizosomų jautrumą osmosiniam stresui (Johansson et al., 2010).

Įvairiuose eksperimentiniuose modeliuose buvo nustatyta, jog lizosomas destabilizuoja fosfolipazę A2: pvz., paveikus ląsteles nedidelės koncentracijos  $\text{H}_2\text{O}_2$ , lizosomų pralaidumo padidėjimas priklausė nuo fosfolipazės A2 (Zhao et al., 2001).

Sfingolipidas sfingozinas taip pat gali sukelti su apoptozę susijusį LMP padidėjimą. Aktyvavus sfingomielinazes, iš sfingomielino susidaro ceramidas, kuris veikiant ceramidazei paverčiamas sfingozinu. Sfingozinas kaupiasi lizosomose, kur veikia kaip detergentas (ypač protonizuota forma), sukelia LMP padidėjimą bei ląstelės žūtį (Kagedal et al., 2001).

Kai kuriais atvejais sfingozino sukeltas LMP padidėjimas priklauso nuo katepsino B (Werneburg et al., 2002), taigi, gali būti, jog sfingozinas yra būtinas, kad katepsinas B galėtų padidinti LMP. TNF reguliuoja sfingozino kiekį ne tik skatindamas jo pirmtako, ceramido, susidarymą, bet ir veikdamas per katepsiną B. Šis ištekėjęs iš lizosomų suskaido sfingozino kinazę 1, kuri apoptozę sukeliantį sfingoziną verčia apoptozę slopinančiu sfingozino 1-fosfatu (Taha et al., 2005). Dėl tokio katepsino B aktyvumo lizosomose kaupiasi sfingozinas. Taip bent dalinai galima paaiškinti katepsino B svarbą TNF sukeltam LMP padidėjimui hepatocituose.

Pastaraisiais metais atlikus proteominę analizę buvo nustatyti baltymai, kurių kiekis lizosomose pakinta, kai apoptozės būdu žūvančiose ląstelėse padidėja LMP (Parent et al., 2009). Įdomu, jog du iš šių baltymų: prosapozinas ir baltymų kinazė Cδ, gali aktyvuoti lizosomų rūgštinę sfingomielinazę.

### **p53 baltymas**

p53 baltymas yra geriausiai žinomas kaip transkripcijos veiksnys, kuris skatina apoptozę, inicijuodamas proapoptozinių baltymų (BAX, BID, PUMA, NOXA ir kt.) transkripciją. Tačiau pastaruoju metu yra nustatyta, jog p53 sukelia apoptozę ir nuo transkripcijos nepriklausomu būdu (veikdamas ne kaip transkripcijos veiksnys). LMP padidėjimas yra būdingas p53 inicijuotai apoptozei, kurios metu pats p53 lokalizuojasi lizosomose ir sukelia LMP padidėjimą. Manoma, kad LAPF baltymas (*lysosome-associated apoptosis-inducing protein containing the pleckstrin homology and FYVE domains*) veikia kaip pritaikymo baltymas, sudarantis kompleksą su p53, kurio Ser15 yra fosforilintas (p-p53<sup>Ser15</sup>). LAPF perneša p-p53<sup>Ser15</sup> į lizosomas, padidėja LMP ir prasideda apoptozė (Li et al., 2007). Įdomu, jog kai kuriais atvejais, p53 tiesiogiai sąveikaudamas su BCL2 šeimos baltymais, apoptozės metu lokalizuojasi mitochondrijų membranose ir gali padidinti MIMP (Johansson et al., 2010). Yra parodyta, jog veikiant UVB, nuo p53 priklausomai padidėja LMP. Tai yra susiję su padidėjusia Puma ir Noxa baltymų raiška. Tuo tarpu, p53 lizosomų membranose nėra aptinkama (Waster and Ollinger, 2009).

### **Kaspazės**

Kaspazės gali skatinti apoptozę sukeliančių veiksnių ištekėjimą iš lizosomų. Yra parodyta, jog iš ląstelių išskirtas lizosomas veikiant kaspaze 8, iš lizosomų išteka katepsinai, ir šis poveikis dar labiau sustiprėja pridėjus citozolio frakcijos (Guicciardi et al., 2000). Yra tyrimų, pagal kuriuos nei kaspazės 8, nei aktyvuoto BID nepakanka padidinti LMP, tuomet LMP padidina BAX (Kagedal et al., 2005).

TNF gali padidinti LMP ir nuo kaspazių priklausomai ir nepriklausomai. Kai TNF padidina LMP nuo kaspazių priklausomu keliu, veikia kaspazė 8 ir 9. Įdomu, jog kaspazės 8 tiesiogiai aktyvuota kaspazė 9 (nesusidarant apoptosomai) padidina LMP (Gyrd-Hansen et al., 2006).

Be to, LMP padidėja ir ET streso sukeltos apoptozės metu, ir tam reikia aktyvios kaspazės 2 (Huang et al., 2009). Veikiant šia kaspaze iš ląstelių išskirtas lizosomas, iš jų išteka katepsinai (Guicciardi et al., 2000).

### **Katepsinai**

Manoma, kad lizosomų peptidazės katepsinai, ypač katepsinas B, gali ištekėti iš lizosomų dėl savo pačių veiklos. Pelės hepatocituose TNF $\alpha$  ir sfingozino sukelta lizosomų destabilizacija priklauso nuo katepsino B, kadangi ląstelėse, neturinčiose katepsino B, LMP nepadidėja (Werneburg et al., 2002). Be to, paveikus ląsteles katepsino B slopikliais, sumažėja TRAIL ir riebalų rūgščių padidintas LMP (Feldstein et al., 2004; Guicciardi et al., 2007). Tačiau neaišku, ar katepsinas šį procesą sukelia būdamas lizosomų viduje ar išorėje. Gali būti, kad maži iš lizosomų ištekėjusio katepsino B kiekiai, būdami išorėje, dar labiau padidina LMP – vyksta signalo stiprinimas.

### **Kalpainai**

Žūvant neuronams, lizosomų membranos destabilizaciją sukelia kalpainai (Ca<sup>2+</sup> aktyvuojamos nelizosominės cisteino peptidazės) (Yap et al., 2006). Išemijos bei hipochlorito rūgštis sukeltos ląstelių žūtis metu padidėja Ca<sup>2+</sup> koncentracija citozolyje, aktyvinami kalpainai ir padidėja LMP. Aktyvuotas  $\mu$ -kalpains lokalizuojasi lizosomos membranoje dar prieš katepsinams ištekant iš lizosomų. Be to,  $\mu$ -kalpains gali padidinti išskirtų lizosomų membranos pralaidumą (Guicciardi et al., 2000), o kalpainų slopikliai sutrikdo LMP didėjimą (Yap et al., 2006). Įdomu, jog kalpainų aktyvumas koreliuoja su fosforilinto p53 baltymo atsiradimu lizosomų membranose, taigi, kai kuriais atvejais, kalpainai gali didinti LMP priklausomai nuo p53 (Fogarty et al., 2010).

### **Kinazės**

Kinazės valdo daugelį ląstelės vyksmų. Lizosomų membranos vientisumas taip pat priklauso nuo kinazių perduodamų signalų. Kraujagyslių endotelio ląstelių fosfatidilinozitolio 3-kinazę nuslopinus cheminiu slopikliu ir šias ląsteles paveikus citokinais, galima sukelti nuo LMP padidėjimo priklausomą apoptozę (Madge et al., 2003). Be to, yra parodyta, jog aktyvavus c-Jun N-galinę kinazę (JNK, *c-Jun N-terminal kinase*) po poveikio TNF $\alpha$ , TRAIL arba UVB spinduliuote, lizosomos suyra (Bivik and Ollinger, 2008; Dietrich et al., 2004; Werneburg et al., 2007). Kai apoptozė sukeliamą veikiant

ląsteles TRAIL arba UVB spinduliuote, didėjant LMP lizosomose lokalizuojasi vien tik BH3 domeną turintis baltymas BIM. UVB poveikis skatina JNK fosforilinti BIM. Neuronus paveikus  $\beta$ -amiloido peptidu, p53 baltymo Ser15 buvo fosforilintas priklausomai nuo JNK1 (Fogarty et al., 2003). Greičiausiai, ne tik minėtais atvejais, LMP yra valdomas kinazių perduodamais signalais, tiesiog dar trūksta tyrimų.

## **ROS**

Oksiduodamos membranų lipidus ROS gali pažeisti lizosomų membranos vientisumą. UVA spinduliuotė,  $H_2O_2$ , N-(4-hidroksifenil)retinamidas didina LMP priklausomai nuo ROS.

Lizosomose suskaidžius geležies turinčius baltymus, kaupiami geležies jonai. Lizosomose esantys  $Fe^{2+}$  jonai Fenton'o tipo reakcijų metu gali reaguoti su  $H_2O_2$ , tuomet susidaro labai aktyvūs hidroksiradikalai, kurie gali sukelti lizosomų membranų peroksidaciją ir destabilizuoti lizosomų membranas (Yu et al., 2003). Buvo parodyta, jog geležies junginių ar geležies turinčių baltymų fagocitozė padidina lizosomų pažeidžiamumą (Persson et al., 2005), o surišus lizosomose esančius geležies jonus, sumažėja LMP ir ląstelių žūtis (Persson et al., 2003). Apie FDP sukeltą LMP didėjimą žiūr. 1.5.1 sk.

## **Arilangliavandenilių receptoriai**

Šis receptoriai yra ligando aktyvuojamas transkripcijos veiksnys, kurio valdomi genai koduoja baltymus svarbius daugeliui ląstelės vyksmų, tarp jų ir apoptozei. Be to, yra manoma, jog Ahr gali turėti ir nuo ligando nepriklausomų funkcijų.  $TNF\alpha$  sukelta pelės hepatomos ląstelių 1c1c7 žūtis nepriklausė nuo kaspazės 8, o LMP padidėjimas priklausė nuo Ahr (Caruso et al., 2006). Šis baltymas svarbus ne tik  $TNF\alpha$ , bet ir FDP sukeltam LMP padidėjimui pelės hepatomos 1c1c7 ląstelėse, veiktose fotosensibilizatoriumi NPe6 (Caruso et al., 2004).

### **1.4.2 Lizosomų membranų stabilumą didinantys veiksniai**

Dažnai stresą patyrusių ar vėžinių ląstelių lizosomose aptinkamas Hsp70. Šis baltymas apsaugo ląsteles nuo LMP padidėjimo, kurį sukelia



TNF $\alpha$ , etopozidas, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ar UVB spinduliuotė (Nylandsted et al., 2004). Hsp baltymai - tai šaperonai, kurie streso sąlygomis padeda ląstelei išlaikyti veiklius baltymus. Navikuose dažnai nustatoma padidėjusi Hsp70 raiška, o sumažinus šio baltymo raišką krūties, kasos ar storosios žarnos vėžio ląstelėse, padidėja LMP ir nuo katapsinų priklausoma ląstelių žūtis, nesant jokių žūtį sukeliančių veiksnių. Taigi, Hsp70 gali stabilizuoti lizosomas. Yra parodyta, jog padidėjus Hsp70 raiškai, sumažėja laisvų geležies jonų kiekis lizosomose - taip Hsp70 gali paveikti LMP didinančius oksidacinius procesus (Doulias et al., 2007).

Apoptozę slopinantys BCL2 šeimos baltymai gali nuslopinti ir LMP padidėjimą. Yra nustatyta, jog 1) ląstelės su padidėjusia BCL2 raiška yra atsparesnės oksidacinio poveikio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sukeltiems LMP padidėjimui ir apoptozei (Zhao et al., 2000); 2) TRAIL ir riebalų rūgščių indukuoti baltymai, atitinkamai MCL1 ir BCLXL, slopina LMP padidėjimą (Feldstein et al., 2006; Werneburg et al., 2007). Abiem šiais atvejais indukuotos apoptozės metu BAX buvo aktyvuotas ir perneštas į lizosomas. Nors nėra tiesioginių įrodymų, galima daryti prielaidą, jog apoptozę slopinantys BCL2 šeimos baltymai apsaugojo ląsteles nuo LMP padidėjimo, neutralizuodami apoptozę sukeliančius BCL2 šeimos baltymus.

Kadangi ROS, oksiduodamos membranų lipidus, gali suardyti lizosomų membranos integralumą, antioksidacinis poveikis slopina šį procesą. Evoliucijos eigoje ląstelėje išsivystė mechanizmai, neutralizuojantys ROS ir taip apsaugantys ląsteles nuo žalingo poveikio. Ląstelės antioksidacinė apsauga - tai mažos molekulinės masės antioksidantai (vitaminas C, E), kofermentas Q10, glutationas bei antioksidaciniai fermentai: gliutatio peroksidazė, katalazė ir superoksido dismutazė. Geležies jonus surišantys baltymai: feritinas, metalotioneinas, kaip ir jau minėtasis Hsp70 taip pat gali sušvelninti oksidantų sukeltą LMP padidėjimą ir sumažinti ląstelių žūtį (Johansson et al., 2010).

Lizosomų membranos stabilumą gali padidinti ir cholesterolis. Sfingomielinas keičia membranos takumą, sudarydamas karkasą cholesteroliui

įsiterpti į membraną. Iš išorės pridėtas sfingomielinas, taip pat ir jo darinys 3-O-metilsfingomielinas kaupiasi lizosomų membranose ir apsaugo jas nuo suirimo veikiant TNF $\alpha$  ir fotodinaminiu poveikiu, naudojant lizosomose sukauptą fotosensibilizatorių (Caruso et al., 2005).

### **1.4.3 Lizosomų sukelta vidinio kelio aktyvacija**

LMP padidėjimo sukeltas citotoksinis poveikis dažnai bent jau dalinai priklauso nuo mitochondrijų žūties kelio aktyvacijos. Kai kurie „klasikiniai“ apoptozės induktoriai: p53, etopozidas ir staurosporinas, sukelia LMP padidėjimą, po kurio vyksta nuo katepsinų priklausomas MIMP padidėjimas (Kirkegaard and Jaattela, 2009). Tačiau kaip šiuo atveju padidinamas LMP dar nėra žinoma. Yra parodyta, jog pakanka į citozolį injekuoti vieną lizosomų hidrolazę – katepsiną D, kurios kiekis atitiktų pusę ląstelėje esančio katepsino D aktyvumo, kad žmogaus fibroblastuose padidėtų MIMP ir prasidėtų apoptozė (Roberg et al., 2002). Tačiau katepsino D ištekėjimas į citozolį sukelia ląstelių žūtį ne visose modelinėse sistemose, kuriose padidėja LMP. Yra pastebėta, jog LMP padidėjimas dažnai sukelia ląstelių žūtį dalyvaujant cisteino katepsinams B ir L bei ROS (Kirkegaard and Jaattela, 2009). Manoma, jog ląstelių žūčiai gali būti svarbios ir kitos lizosomų hidrolazės ar padidėjusio LMP sukeltas citozolio parūgštėjimas, tačiau tam įvertinti reikėtų daugiau tyrimų.

Vienas iš būdų, kaip dėl katepsinų gali padidėti MIMP - tai apoptozę sukeliančio BCL2 šeimos baltymo BID virsmai. Citozolyje BID'ą gali skaidyti ir aktyvuoti cisteino katepsinai B, H, L, S ir K (Cirman et al., 2004). Yra parodyta, jog aktyvavus TNF receptorių, asparto katepsinas D skaldo ir aktyvuoja BID'ą (Heinrich et al., 2004). Šis procesas vyksta tokia seka: 1) TNF sukelia rūgštinės lizosomų sfingomielinazės aktyvaciją, 2) susidaro ceramidas, 3) pastarasis ne tik didina LMP, bet ir aktyvuoja katepsiną D, 4) katepsinui D patekus į citozolį, jis skelia BID'ą. Yra parodyta, jog katepsinai BID skelia kitoje vietoje nei kaspazės - už šešių amino rūgščių liekanų nuo kaspazės 8 skėlimo vietas (Stoka et al., 2001).

Apoptozės vidinis kelias gali būti aktyvuotas ir be BID'o. Staurosporinu veiktuose žmogaus T limfocituose katepsinas D aktyvuoja BAX'ą nuo BID'o nepriklausomu būdu (Bidere et al., 2003). Fibroblastus veikiant chinolonų kilmės antibiotiku ciprofloksacinu ir UV spinduliuote, dėl padidėjusio LMP, padidėja ir MIMP, vykstant BAX ir BAK aktyvacijai, tačiau BID šiame procese nedalyvauja (Boya et al., 2003). Šioje modelinėje sistemoje BAX aktyvaciją sukelia ROS, o ne katepsinas D. Įdomu, kad ląstelėse, neturinčiose abiejų baltymų - BAX ir BAK, ciprofloksacino sukeltas MIMP padidėjimas nėra visai nuslopinamas. Taigi, egzistuoja dar vienas mechanizmas, siejantis LMP padidėjimą ir MIMP padidėjimą. Tai galėtų būti tiesioginis ROS ir/arba lipidų kilmės tarpininkų (pvz., arachidono rūgštis), kurie gali susidaryti nuo katepsino B priklausomu būdu, poveikis (Kirkegaard and Jaattela, 2009).

#### **1.4.4 Lizosomų sukelti nuo mitochondrijų nepriklausomi ląstelių žūtis keliai**

LMP padidėjimas gali sukelti ląstelių žūtį ir neveikdamas mitochondrijų. Mikrovamzdelius stabilizuojantys vaistai: paklitakselis, epotilonas B ir diskodermolidas, inicijuoja nuo kaspazių nepriklausomą plaučių vėžio ląstelių žūtį (Broker et al., 2004). Šias ląsteles veikiant mikrovamzdelius stabilizuojančiais vaistais, katepsinas B ištekėjo iš lizosomų. Nuslopinus katepsino B aktyvumą, ląstelės nežuvo – nebuvo daugiabranduolių ląstelių, šių vaistų sukeltai ląstelių žūčiai būdingo požymio.

TNF veiktuose pelės embriono fibroblastuose LMP padidėjo jau po to, kai padidėjo MIMP (Gyrd-Hansen et al., 2006). Paveikus TNF pelės fibrosarkomos ląsteles WEHI-S, katepsinas B lėmė apoptozei būdingus morfologijos pokyčius (Foghsgaard et al., 2001). Hsp70 baltymo išveiklinimas įvairiose žmogaus vėžio ląstelėse (Nylandsted et al., 2004) bei T ląstelių aktyvacija (Michallet et al., 2004) padidino LMP ir sukėlė nuo katepsinų priklausomą į apoptozę panašią ląstelių žūtį, nors vidinis apoptozės kelias ir nebuvo aktyvuotas. Katepsinas B sukėlė branduolio apoptozę išskirtuose branduoliuose (Vancompernelle et al., 1998). Ląstelių žūtis procese

katapsinai gali veikti ir kaip iniciacijos, ir kaip vykdymo peptidazės, priklausomai nuo poveikio ir nuo bendro konteksto.

Ypač daug vilčių teikia katapsinų gebėjimas inicijuoti vėžinių ląstelių žūtį. Šios ląstelės dažnai būna atsparios „klasikiniam“ apoptozės induktoriams, kadangi vidinis žūties kelias dažnai būna užblokuotas (pvz., padidėjus BCL2 raiškai). Neseniai pasirodė naujas priešvėžinis vaistas siramezinas (*siramesine*), veiksmingai sukeltis įvairių vėžinių ląstelių žūtį. Šis vaistas kaupiasi lizosomose ir tiesiogiai jas destabilizuoja. Dėl to katapsinai išteka į citozolį ir kyla nuo katapsinų priklausoma ląstelių žūtis (Ostenfeld et al., 2005). Be to, yra pastebėta, jog imortalizacija ir transformacija gali padidinti ląstelių jautrumą žūčiai, kuri kyla padidėjus LMP (Kirkegaard and Jaattela, 2009). Yra pastebėta, jog Ras, Src onkogenai sukelia lizosomų pasiskirstymo, tankio, ultrastruktūros pokyčius, sumažėja ir lizosomų membraninių baltymų Lamp-1 ir Lamp-2 kiekiai (Fehrenbacher et al., 2008). Tokios ląstelės tampa jautresnės įvairiems priešvėžiniams vaistams (pvz., cisplatinai, etopozidui, doksorubicinui ir siramezinui), kurie sukelia nuo lizosomų priklausomą žūtį.

### 1.5 Ląstelių atsakas į fotodinaminį poveikį

Ląstelių atsakas į FDP priklauso nuo ląstelių tipo, nuo fotosensibilizatoriaus prigimties, jo lokalizacijos ląstelėje, FDP dozės, inkubacijos su fotosensibilizatoriumi trukmės (keičiasi kai kurių fotosensibilizatorių kaupimo vieta ląstelėje).

Yra parodyta, jog žūties kelią gali nulemti net ir tai, kokios ROS susidaro FDP metu. Buvo pastebėta, jog švitinant fotosensibilizatorių bengalo rožinį, kuris kaupiamas ląstelių membranose, regimąja šviesa, susidaro tiksliai  $^1\text{O}_2$ , tuo tarpu pašvitinus UVA spinduliuote, greta  $^1\text{O}_2$  susidaro bengalo rožinio radikalai. Nors šio fotosensibilizatoriaus radikalai sukėlė intensyvesnę lipidų oksidaciją nei  $^1\text{O}_2$ , tačiau tik  $^1\text{O}_2$  iniciavo apoptozę (branduolio kondensaciją ir DNR fragmentaciją) (Kochevar et al., 2000).

Santykinai nedidelis atstumas, kurį gali difunduoti FDP metu susidaręs  $^1\text{O}_2$  t.y.  $\sim 100$  nm (žiūr. 1.1.1 sk.), leidžia manyti, jog biomolekulių pažaidas fotosensibilizatorius sukelia greta kaupimo vietos ląstelėje. Manoma, jog fotosensibilizatoriaus lokalizacija ląstelėje sutampa su pirminių fotopažaidų vieta (Buytaert et al., 2007). Šiuo požiūriu įdomu, kad po švitinimo gali pakisti kai kurių fotosensibilizatorių lokalizacija ląstelėje (Kessel et al., 2005), (Kessel, 2002). Taigi kai kuriais atvejais fotosensibilizatorius gali sukelti fotopažaidas ne tik pirminėje kaupimo vietoje.

FDP stimuliuoja įvairius signalo perdavimo kelius (apžvelgta (Almeida et al., 2004)). FDP keičia lipidų apykaitos fermentų aktyvumą: padidėjus fosfolipazės C, fosfolipazės A<sub>2</sub>, ciklooksigenazės 2 aktyvumams, padidėja lipidų kilmės antrinių signalinių molekulių susidarymas, atitinkamai: inozitolio 1,4,5-trisfosfato (IP3), arachidono rūgšties, prostaglandino E<sub>2</sub>; padidėjus rūgštinės sfingomielinazės aktyvumui ar sumažėjus sfingomielino sintazės ir gliukozilceramido sintazės aktyvumams po FDP gali padidėti ir ceramido koncentracija. FDP taip pat stimuliuoja cAMP, NO ir Ca<sup>2+</sup> signalinius kelius. FDP keičia ir MAPK (*mitogen activated protein kinases*): ERK (*extracellular signal regulated kinases*), JNK/SAPK (*c-Jun N-terminal kinases/stress activated protein kinases*) ir p38 MAPK aktyvumą. FDP taip pat gali paveikti ir transkripcijos veiksnių aktyvumą, pvz., aktyvuoja AP-1 (*activator protein-1*), NF-κB (*nuclear factor kappa B*) transkripcijos veiksnius, sumažina E2F (*transcription factor E2F*) šeimos transkripcijos veiksnių raišką. Kurie signaliniai keliai ir transkripcijos veiksniai bus aktyvuoti po FDP priklauso ir nuo ląstelių linijos, ir nuo fotosensibilizatoriaus.

Pastaraisiais metais intensyviai tiriama pačių ROS geba tiesiogiai perduoti signalą. Manoma, kad H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> labiausiai iš visų ROS pasižymi antrinei signalinei molekulei būdingomis savybėmis: jis sudaromas ir degraduojamas veikiant fermentams, be to, savitai oksiduoja tiolius (Forman et al., 2010). Svarbiausias FDP tarpininkas,  $^1\text{O}_2$ , natūraliomis sąlygomis ląstelėje nesusidaro, todėl joje, greičiausiai, nėra šiai molekulei savitų jutiklių. Ląstelėje turėtų egzistuoti jutikliai, reaguojantys į ląstelės oksidacinės-redukcinės pusiausvyros

pokyčius,  $H_2O_2$  koncentracijos didėjimą ar bendrą ROS kiekį ([photobiology.info](http://photobiology.info)).

### **1.5.1 FDP sukelta apoptozė**

Naudojant įvairias ląsteles ir fotosensibilizatorius, parodyta, jog FDP sukeltas fotooksidacinis stresas sukelia apoptozę (apžvelgta (Oleinick et al., 2002)). Priklausomai nuo FDP sąlygų (fotosensibilizatoriaus, inkubacijos su fotosensibilizatoriumi trukmės ir kt.), apoptozė gali būti inicijuojama aktyvuojant išorinį arba vidinį kelią.

#### **Išorinis kelias**

Nustatyta, jog žmogaus epidermoidinės karcinomos ląsteles A-431 paveikus ftalocianino Pc4 sukeltu FDP, padidėja ląstelės paviršiaus žūties receptoriaus Fas ir jo ligando FasL raiška (Ahmad et al., 2000). Be to, FDP, sukeltas fotosensibilizatoriais hipokrelinu A ir hipokrelinu B, inicijavo žmogaus nosiaryklės karcinomos ląstelių apoptozę išoriniu keliu, aktyvuodamas Fas receptoriaus kelią (Ali et al., 2002). Žmogaus promielocitines leukemijos ląsteles HL-60 veikiant fotosensibilizatoriumi bengalo rožiniu buvo aktyvuota apoptozė, priklausoma nuo kaspazės 8, o pastarąją nuslopinus, iš mitochondrijų neištekėjo citochromas c ir nebuvo aktyvuota kaspazė 3 (Zhuang et al., 1999).

Kai kuriais FDP atvejais (pvz., žmogaus keratinocitus veikiant hidrofiliniu chlorino dariniu ATX-S10(Na)) nustatyta, jog Fas multimerizacija ir aktyvacija gali vykti nuo ligando nepriklausomu būdu (Takahashi et al., 2003). Nors yra tyrimų, kur nustatyta, jog kaspazės 8 aktyvacija po FDP vyksta anksčiau, nei iš mitochondrijų išteka citochromas c (Ahmad et al., 2000; Ali et al., 2002), tačiau yra ir tokių duomenų, kad kaspazė 8 aktyvuojama jau aktyvavus vidinį apoptozės kelią, kaip signalo amplifikacija, pvz., po fotodinaminio poveikio sukulto HeLa ląsteles veikiant BPD-MA, HCT-116 ląsteles - PPME (Granville et al., 1998; Matroule et al., 2001).

Taigi, kai kuriais FDP atvejais kaspazės aktyvuoja žūties receptorių signalas, o apoptozės išorinio kelio aktyvaciją gali sukelti autokrininiai ar

parakrininiai signalai, kuriuos indukuoja padidėjusi žūties receptorių ir jų ligandų raiška.

### **Vidinis kelias**

Manoma, jog mitochondrijose sukauptų fotosensibilizatorių sukeltas FDP veiksmingai ir greitai inicijuoja apoptozę todėl, kad šis poveikis tiesiogiai pažeidžia mitochondrijas, tada į citoplazmą ištekėjęs citochromas c gali sąveikauti su APAF1 ir aktyvuoti kaspazes – apoptozė inicijuojama vidiniu keliu. Ilgą laiką buvo manoma, jog patys veiksmingiausi fotosensibilizatoriai kaupiami mitochondrijose, o FDP sukeltas oksidacinis stresas tiesiogiai paveikia mitochondrijas, padidina mitochondrijų išorinės membranos pralaidumą, dėl ko išteka citochromas c ir inicijuojama apoptozė (apžvelgta (Oleinick et al., 2002), (Buytaert et al., 2007)).

### **Fotosensibilizatoriaus lokalizacijos reikšmė apoptozės indukcijai**

Yra parodyta, jog dėl FDP savitai **plazminėje membranoje** susidaręs  $^1\text{O}_2$  gali inicijuoti apoptozę - branduolio morfologijos pokyčius ir fosfatidilserino translokaciją (Lin et al., 2000): apšvitinus jaučio aortos endotelio ląsteles, inkubuotas su membranose sukauptu fotosensibilizatoriumi bengalo rožiniu nykstančios bangos regimajai šviesa (*evanescent wave visible radiation*), kuri, išsiskverbdama ~100 nm apšvitina tik ląstelės paviršių (plazminę membraną ir paviršinių citoplazmos sluoksni), buvo sukelta apoptozė.

**Mitochondrijose** sukaupti fotosensibilizatoriai apoptozę sukelia vidiniu keliu (apžvelgta (Almeida et al., 2004; Oleinick et al., 2002)). Po fotodinaminio poveikio citochromui c ištekėjus į citozolį, susidaro apoptosomos ir aktyvuojamos kaspazės, sukeliančios apoptozei būdingus pokyčius. Mitochondrijas pažeidžiančio FDP sukeltos apoptozės metu mažėja  $\Delta\psi_m$  ir ATP koncentracija.

Vidiniu keliu apoptozė gali būti inicijuojama ne tik tiesiogiai veikiant mitochondrijas, bet ir sukėlus **endoplazminio tinklo** (ET) oksidacinį stresą, dėl kurio padidėja  $\text{Ca}^{2+}$  koncentracija citozolyje ir ląstelėje kaupiasi neteisingos konformacijos baltymai (Buytaert et al., 2007).  $\text{Ca}^{2+}$  koncentracija citozolyje po FDP gali padidėti dėl kelių priežasčių: jis gali atitekėti iš ląstelės išorės

arba, FDP sukeltam oksidaciniam poveikiui pažeidus  $\text{Ca}^{2+}$  ATPazę, ištekėti iš ląstelės vidinių saugyklų (mitochondrijų, ET) (apžvelgta (Almeida et al., 2004)). Pavyzdžiui, po FDP, kuri sukelia ET sukauptas hipericinas, HeLa ląstelėse sumažėja  $\text{Ca}^{2+}$  ATPazės - SERCA 2 baltymo, iš ET išteka  $\text{Ca}^{2+}$  ir ląstelėse kyla nuo BAX/BAK priklausoma apoptozė (Buytaert et al., 2006).

FDP indukuoja ET stresą ne tik keisdamas  $\text{Ca}^{2+}$  koncentraciją ET, bet ir sukeldamas baltymų konformacijos pokyčius. Veikiant šaperonams, baltymų konformacija gali vėl tapti „teisinga“. Tačiau jei poveikis toks stiprus, kad ląstelė nepajėgia atkurti baltymų struktūros, ET kaupiasi neteisingos konformacijos baltymai. ET stresas aktyvuoja IRE1 $\alpha$  (*inositol-requiring protein-1*), ATF6 (*activating transcription factor-6*) ir PERK (*protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase*) signalinius kelius, ir ląstelėse kyla vadinamasis „atsakas į netvarkius baltymus“ (*unfolded protein response, UPR*). Šis atsakas indukuoja ET šaperonų raišką, sulėtina baltymų sintezę, aktyvuoja baltymų degradaciją ir taip padidina ET gebą „ištaisyti“ baltymų konformacijos pokyčius. Ląstelės gali išgyventi, jei sukeltas atsakas į netvarkius baltymus pašalina sutrikimus, tačiau kai pažeidimai yra dideli ir ET stresas trunka ilgiau, atsakas į netvarkius baltymus gali inicijuoti apoptozę (Tabas and Ron, 2011). Tikslus mechanizmas, kaip šis atsakas sukelia apoptozę, nėra žinomas, tačiau yra parodyta, kad kai kuriais atvejais aktyvuojama kaspazė 12 (Nakagawa et al., 2000), kartais šiame procese veikia ir kalpainai (Nakagawa and Yuan, 2000; Tan et al., 2006). Kadangi žmogaus kaspazė 12 yra mutavusi, yra tyrimų, rodančių, jog žmogaus ląstelėse atsakas į netvarkius baltymus aktyvuoja kaspazę 4 (Kim et al., 2006). Nustatyta, kad ET streso sukeltą apoptozę gali vykdyti ir baltymas Bim (Puthalakath et al., 2007).

Kai FDP sukelia ET kaupiamas hipericinas, indukuojami genai, svarbūs atsakui į netvarkius baltymus. Šių genų raišką valdo p38MAPK signalas (Buytaert et al., 2008). Yra parodyta, kad endoplazminį tinklą pažeidžiantis hipericino sukeliamas FDP, šlapimo pūslės vėžio ląstelėse T24 indukuoja genus, svarbius atsakui į netvarkius baltymus (Buytaert et al., 2008). Atsakas į netvarkius baltymus taip pat buvo sukeltas žmogaus gimdos kaklelio vėžio



ląsteles HeLa veikiant fotofrino FDP (Szokalska et al., 2009). Po ET pažeidžiančių FDP buvo nustatyta ir kaspazės 12 aktyvacija: benzochlorino dariniu Zn-BC-AM paveikus nosiaryklės (*nasopharyngeal*) karcinomos ląsteles (Mak et al., 2004), bengalo rožiniu - HeLa ląsteles (Panzarini et al., 2011).

Nors ilgą laiką buvo manoma, jog veiksmingiausiai apoptozę sukelia mitochondrijose ir ET kaupiami fotosensibilizatoriai, neseniai paskelbti įdomūs rezultatai, kad **lizosomose** lokalizuotas silicio ftalocianino darinys Pc181, buvo veiksmingesnis už mitochondrijose ir ET sukauptą tos pačios cheminės prigimties fotosensibilizatorių Pc4 (Quiogue et al., 2009). Ląstelės po Pc 181 sukkelto FDP, žuvo daugiausia apoptozės keliu. Taip pat buvo parodyta, jog apoptozei, kurią sukėlė lizosomose lokalizuoto Pc 181 FDP, buvo svarbus Bid (Chiu et al., 2010). Bid reikšmė apoptozei, kurią sukelia lizosomose lokalizuoti fotosensibilizatoriai, nustatyta naudojant ir kitą fotosensibilizatorių - lizosomose kaupiamą chlorino darinį NPe6. Po šio poveikio buvo aktyvuotas Bid baltymas, taip pat ir vidinis apoptozės kelias: citochromas c ištekėjo į citozolį, buvo aktyvuotos kaspazės 9 ir 3 (Reiners et al., 2002). Yra parodyta, jog lizosomose sukaupti fotosensibilizatoriai gali padidinti LMP.

### **Mitochondrijų išorinės membranos pralaidumo padidėjimas**

MIMP gali padidėti atsidiarius MNP arba po BAX ar BAK baltymų aktyvacijos atsivėrus baltyminiams kanalams ar susidarius lipidinėms poroms (žiūr. 1.3.1 sk.).

Daugelis FDP sukeltų vyksmų yra palankūs MNP atsiverti: padidėjus  $Ca^{2+}$  koncentracijai citozolyje, jis yra sukaupiamas mitochondrijų užpilde, ląstelėse padaugėja oksidantų, veikiant fosfolipazei  $A_2$  susidaro laisvosios riebalų rūgštys (Rasola and Bernardi, 2007). Be to, yra laikoma, kad oksidavus numanomo MNP komponento – ANT - tiolio grupės atveriamos MNP (Pestana et al., 2009). Žinoma, jog kai kurie fotosensibilizatoriai yra giminingi MNP baltymams, jų sudarantiems ar valdantiems jos aktyvumą: pvz., PpIX gali jungtis prie periferinio benzodiazepino receptoriaus (Verma et al., 1998).

Įdomūs rezultatai gauti taikant FDP išskirtoms žiurkės mitochondrijoms. Hematoporfirinas slopino MNP atsidarimą, manoma, pažeisdamas histidino liekanas (Salet et al., 1997). Tuo tarpu mitochondrijas fotodinamiškai paveikus psoraleno dariniu, MNP atsidarė ir šį poveikį sukėlė tiolių oksidacija (Moreno et al., 2001). Šie tyrimai rodo, jog labai svarbu, kurioje poros vietoje FDP sukelia pažaidas.

Greičiausiai, MNP veikla FDP sukeltose ląstelių žūtyje priklauso ir nuo fotosensibilizatoriaus, ir nuo ląstelių. Pavyzdžiui, MNP atsidaro, A-431 ląsteles fotodinamiškai paveikus mitochondrijose ir ET sukauptu Pc4 (Lam et al., 2001). Tačiau yra ir tokių tyrimų, kur FDP sukėlė apoptozę neatsivėrus MNP: žmogaus storosios žarnos vėžio ląsteles fotodinamiškai paveikus feoforbido dariniu, sukauptu ET, Goldžio tinkle ir lizosomose, MNP slopiklis ciklosporinas A nenuslopino apoptozės (Matroule et al., 2001).

MIMP gali padidėti ir BAX baltymui translokuojantis iš citozolio į mitochondrijas. Daugeliu atvejų po FDP citochromas c ištekėdavo iš mitochondrijų, BAX baltymui translokuojantis į mitochondrijas (apžvelgta (Buytaert et al., 2007)).

Kokiu būdu vyksta MIMP padidėjimas tiksliai nėra žinoma ne tik FDP atveju, bet ir kitais poveikiais sukėlus apoptozę, be to, tai gali priklausyti nuo fotosensibilizatoriaus prigimties ir lokalizacijos vietos ląstelėse.

### **Lizosomų membranos pralaidumo padidėjimas**

Po FDP, sukulto naudojant lizosomose sukauptus fotosensibilizatorius, katapsinai išteka į citozolį. Pelės hepatomos ląsteles 1c1c7 fotodinamiškai paveikus lizosomose kaupiamu fotosensibilizatoriumi NPe6, padidėja LMP, į citozolį išteka katapsinas B (Kessel et al., 2000) ir katapsinas D (Caruso et al., 2005). Be to, susidaro tBID, iš mitochondrijų išteka citochromas c ir aktyvinamos kaspazės 9 bei 3. Panaudojus katapsinų B, D ir L slopiklius, nesumažėja tBID kiekis ar kaspazių aktyvacija (Reiners et al., 2002). Tačiau iš išorės pridėtas sfingomielino darinys 3-O-metil-sfingomielinas apsaugo lizomas nuo oksidacinių pažaidų, padidindamas lizosomų stabilumą (Caruso et al., 2005).

Žmogaus krūties vėžio ląsteles MCF-7c3 fotodinamiškai paveikus lizosomose ir mitochondrijose lokalizuotu fotosensibilizatoriumi ATX-s10, buvo sukelta apoptozė, kurią stabdė katepsinų B ir D slopikliai (Ichinose et al., 2006). Padidinus BCL2 raišką, ląstelės tapo atsparesnės fotodinaminiam poveikiui.

Žmogaus plaučių adenokarcinomos ląsteles paveikus lizosomose sukauptu fotosensibilizatoriumi NPe6, suyra lizosomos ir į citozolį išteka katepsinai (Liu et al., 2011). Vėliau tokia seka inicijuojami vidinio apoptozės kelio etapai: aktyvinamas BAX baltymas, iš mitochondrijų išteka citochromas c, aktyvinamos kaspazės 9 ir 3. Šio fotosensibilizatoriaus sukeltai apoptozei labai svarbus BAX baltymas: nuslopinus jo raišką siRNR, apoptozė nevyksta.

Taigi, lizosomose lokalizuotų fotosensibilizatorių sukeltas FDP padidina LMP – iš lizosomų išteka katepsinai, o tokių fotosensibilizatorių sukelta ląstelių žūtis priklauso nuo mitochondrijų, šiuo atveju veikia BCL2 šeimos baltymai.

Kaip FDP padidina LMP dar nėra nustatyta. Žinoma, kad kai kuriais FDP atvejais LMP padidėjimui svarbus Ahr (Caruso et al., 2004) ir lizosomų membranos sudėtis (Caruso et al., 2005). Tačiau, greičiausiai, FDP sukeltam LMP padidėjimui svarbiausios yra ROS sukeltos lizosomų membranų pažeidos. Gali būti, kad LMP pralaidumo pokyčius po FDP, kaip ir po kitų LMP didėjimą sukeliančių poveikių (žiūr. 1.4.1 sk.), gali lemti ir apoptozę inicijuojantys BCL2 šeimos baltymai, p53, įvairios peptidazės ir kinazės.

### **Nuo kaspazių nepriklausoma apoptozė**

FDP gali sukelti ne tik nuo kaspazių priklausomą, bet ir nuo kaspazių aktyvumo nepriklausomą apoptozę. Yra nustatyta, jog po verteporfino sukulto FDP iš lygiųjų raumenų ląstelių mitochondrijų išteka ne tik citochromas c, bet ir AIF (Granville et al., 2001). Žmogaus leukemijos ląsteles paveikus ALA darinio heksaminolevulinato sukeltu FDP, kaspazės nėra aktyvuojamos, o AIF patenka į branduolį (Furre et al., 2005). Tas pats FDP Jurkat ląstelėse aktyvuoja tiek tradicinį nuo kaspazių aktyvacijos priklausomą apoptozės kelią, tiek ir alternatyvų nuo kaspazių nepriklausomą, bet nuo AIF priklausomą

apoptozę (Furre et al., 2006). Yra parodyta, jog nuo kaspazių nepriklausomą, bet nuo AIF priklausomą apoptozę gali sukelti ir lizosomose sukauptas ftalocianino darinys (Vittar et al., 2010).

### **1.5.2 FDP sukelta nekrozė**

FDP gali inicijuoti ir apoptozę, ir nekrozę. Dažnai šie abu mechanizmai inicijuojami kartu, nors vyrauja apoptozė. Apoptozės ir nekrozės dalis dažniausiai, priklauso nuo FDP dozės – stiprėjant poveikiui pradeda dominuoti nekrozė (Andrzejak et al., 2011). Nekrozę dažnai inicijuoja plazminę membraną pažeidžiantis FDP. Nekrozė buvo sukelta ląsteles paveikus FDP, naudojant plazminėje membranoje kaupiamą cinko ftalocianiną (Fabris et al., 2001) ar ALA indukuotus endogeninius porfirinus (Krieg et al., 2003; Kuzelova et al., 2004). Po plazminę membraną pažeidžiančio FDP, sutriko plazminės membranos integralumas, buvo išekvotas ATP ir kilo nekrozė (Fabris et al., 2001).

Palankios sąlygos vykti nekrozei po FDP susidaro ir tuomet, kai FDP sukeltos ROS pažeidžia kai kuriuos apoptozei svarbius baltymus. Yra parodyta, jog plazminėje membranoje sukaupti katijoniniai porfirinai po švitinimo pasklinda po citozolį ir inaktyvuoja prokaspazę 9 ir prokaspazę 3 (Kessel, 2002).

Yra nustatyta, jog HeLa ląstelių nekrozę gali sukelti savitai mitochondrijose kaupiamas katijoninis fluorescencinis žymuo Mitotracker Red (Chernyak et al., 2006). Šio FDP metu susidarė  $O_2^- \cdot$  ir  $^1O_2$ .

### **1.5.3 FDP sukelta autofagija**

Yra parodyta, kad autofagiją sukelia FDP, kai naudojami fotosensibilizatoriai, kaupiami mitochondrijose (Kessel and Reiners, 2007), ET (Buytaert et al., 2006; Kessel and Arroyo, 2007; Kessel and Reiners, 2007), ET ir mitochondrijose (Xue et al., 2007). Parodyta, kad autofagosomų padaugėja ir po FDP, sukulto naudojant lizosomose susikaupusį fotosensibilizatorių NPe6 (Reiners et al., 2010).

FDP inicijuota autofagija palanki tų ląstelių, kuriose gali vykti apoptozė, išgyvenimui, o ląstelėse, kuriose apoptozė negali vykti, autofagija lemia žūtį.

Autofagija gali būti ir ląstelių išgyvenimui palankus mechanizmas, kai yra pašalinamos FDP pažeistų baltymų sankaupos ar organelės. Pavyzdžiui, pelės leukemijos ląstelėse autofagija, kurios metu galėjo būti pašalintos FDP pažeistos organelės, vyko prieš apoptozę (Kessel and Arroyo, 2007). Šiuo atveju, nutildžius Atg7, esant mažoms poveikio dozėms, išaugo FDP citotoksiškumas – autofagija veikė kaip apsauginis mechanizmas.

Fotodinaminio poveikio sukelta autofagija gali būti žūties keliu tada, kai apoptozė yra nuslopinta (Buytaert et al., 2006; Kessel et al., 2006).

Nors nėra nustatyta, kaip FDP sukelia autofagiją, kai kurios detalės yra žinomos. Autofagijos baltymas Beklinas 1 rišasi prie BCL2 (Pattingre et al., 2005). Kadangi daugelio fotosensibilizatorių sukeltas FDP pažeidžia BCL2 (Kessel and Castelli, 2001; Kim et al., 1999; Xue et al., 2001b), laisvas Beklinas 1 gali inicijuoti autofagiją.

Yra parodyta, kad FDP, sukeltas mitochondrijose ir ET sukauptu fotosensibilizatoriumi Pc4, žmogaus karcinomos ląstelėse pažeidžia vieną iš autofagiją valdančių baltymų - IP3 receptorių (Reiners et al., 2010). Taip pat yra nustatyta, jog endosomose ir lizosomose kaupiamu amfifiliniu fotosensibilizatoriumi AlPcS<sub>2a</sub> sukėlus FDP žmogaus adenokarcinomos ląstelėse sumažėja fosforilintos ir nefosforilintos mTOR kinazės (Weyergang et al., 2009). Žinoma, kad nuslopinus mTOR kinazę, inicijuojama autofagija (žiūr. 1.2.2 sk.).

FDP pažeidžia ne visus autofagijoje dalyvaujančius baltymus (kitai autofagija po FDP nevyktų): veikiant pelės leukemijos ląsteles mitochondrijose sukauptu benzoporfirino dariniu, nebuvo pažeistas Beklinas 1, Atg5 ir Atg7 baltymai (Reiners et al., 2010).

#### 1.5.4 Ląstelės ciklas po FDP

FDP ląstelių gyvybingumą mažina ne tik sukeldamas ląstelių žūtį, bet ir sutrikdydamas ląstelės ciklą, kaip ir daugelis priešvėžinių vaistų (Hamed and Roth, 2011). Ląstelės ciklo areštas po FDP buvo nustatytas:  $G_0/G_1$  fazėje – po poveikio cinko ftalocianino tetrasulfonatu (Haywood-Small et al., 2006), fotoditazinu (Wen et al., 2011);  $G_2/M$  fazėje - paveikus hipericinu (Lee et al., 2006; Mikes et al., 2007) ir cinko ftalocianinu (Rello-Varona et al., 2008); S fazėje - fotofrinu (Compagnin et al., 2010). Ciklo fazė, kurioje FDP sulaiko ląsteles priklauso ir nuo ląstelių linijos: yra parodyta, jog fotosensibilizatorius hipericinas sukelia žmogaus storosios žarnos vėžio adenokarcinomos HT-29 ląstelių areštą  $G_2/M$  fazėje, tuo tarpu žmogaus mieloidinės leukemijos ląstelės U937 buvo sulaikytos S fazėje (Sackova et al., 2006). HeLa ląsteles veikiant membranose pasiskirsčiusiu hipericinu, ląstelių žūtį (apoptozę ir nekrozę) veiksmingai indukavo didelės dozės FDP, tuo tarpu mažos dozės sukėlė ląstelės ciklo areštą (Piette et al., 2003).

Pirmą kartą ląstelės ciklui svarbaus baltymo p21 (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*) raiškos padidėjimas po FDP buvo nustatytas po Pc4 sukkelto FDP A-431 ląstelėms (Ahmad et al., 1998). Po minėto poveikio taip pat sumažėjo  $G_1$  fazei svarbių kinazių CDK2 ir CDK6 bei jų aktyvumą valdančių ciklinų E ir D1 raiška. Šis poveikis sukėlė negrįžtamą ląstelių areštą  $G_0/G_1$  fazėje ir ląstelės žuvo apoptozės keliu. Taip pat nustatyta, jog po minėtojo FDP sumažėjo pRb baltymo fosforilinimas bei E2F šeimos transkripcijos veiksnių raiška (Ahmad et al., 1999), o šie baltymai valdo perėjimą iš  $G_1$  į S stadiją.

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1 Medžiagos

Darbe naudoti reagentai, ląstelių auginimo terpės ir jų priedai pirkti iš Sigma, jei nepažymėta kitaip.

#### 2.1.1 Fotosensibilizatoriai

**AlPcS<sub>4</sub>** (aliuminio (III) ftalocianino tetrasulfonato) (Porphyrin Products) pradinis tirpalas (5 mg/ml) ruošiamas PBS.

**Rh123** (rodamino 123, 2-(6-amino-3-imino-3H-ksanten-9-il)benzoinės rūgšties metilo esterio) pradinis tirpalas (1 mg/ml) ruošiamas 96% etanolyje.

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

**Safr** (safranino O, 3,7-diamino-2,8-dimetilo-5-fenilfenazino chlorido) pradinis tirpalas (1 mg/ml) ruošiamas 96% etanolyje.

Tirpalai laikomi -20°C temperatūroje.

#### 2.1.2 Medžiagos ląstelių kultivavimui

**Antibiotikai:** penicilinas G, streptomocinas (Biochrom);

**DMEM** – Dulbecco modifikuota Eagle terpė (Biochrom);

**DPBS** - druskų tirpalas, paruošiamas sumaišius: 400 ml PBS, 0,5 ml 10% CaCl<sub>2</sub>, 0,2 ml 25% MgSO<sub>4</sub> ir 99,3 ml H<sub>2</sub>O;

**FCS** - fetalinis veršelio serumas (Gibco, Biochrom);

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

**PBS** - druskų tirpalas: 1 g NaCl, 25 mg KCl, 25 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 144 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, ištirpinta 100 ml H<sub>2</sub>O, pH 7,3;

**Indai ląstelių kultivavimui:** 25 cm<sup>2</sup> ir 75 cm<sup>2</sup> flakonai; 9 cm<sup>2</sup> lėkštelės; 6, 24 ar 96 šulinėlių plokštelės (TPP arba BD Biosciences).

## 2.2 Ląstelių kultūros

**A-431** – žmogaus epidermoidinės karcinomos ląstelės (ATCC: CRL-1555). Monosluoksnį sudarančios ląstelės. Ląstelės kultivuojamos DMEM su 5% FCS, pridėjus 100 U/ml penicilino, 100 µg/ml streptomicino, 2 mM glutamino (pridedama kas dvi savaites) ir 10 mM HEPES, 37°C temperatūroje ir 5% CO<sub>2</sub> bei 95% drėgmės atmosferoje. Ląstelės persėjamos triskart per savaitę. Tam tikslui jos atkeliamos 0,05% tripsino/0,02% EDTA tirpalu ir praskiedžiamos iki 10<sup>5</sup> ląst./ml.

**MH-22A** - epiteliškos pelės hepatomos ląstelės (Rusijos mokslų akademijos Citologijos institutas, Sankt Peterburgas, Rusija). Monosluoksnį sudarančios ląstelės. Ląstelės kultivuojamos DMEM su 10% FCS, pridėjus 100 U/ml penicilino, 100 µg/ml streptomicino, 2 mM glutamino (pridedamas kas dvi savaites), 37°C temperatūroje ir 5% CO<sub>2</sub> bei 95% drėgmės atmosferoje. Ląstelės persėjamos triskart per savaitę. Tam tikslui jos atkeliamos 0,05% tripsino/0,02% EDTA tirpalu ir praskiedžiamos santykiu 1:3.

## 2.3 Inkubacija su fotosensibilizatoriumi bei švitinimas

Ląstelės eksperimentams užsėjamos į flakonus ar lėkšteles, kurių auginimo paviršius, atitinkamai, 25 cm<sup>2</sup> ir 9 cm<sup>2</sup>. Eksperimentams, kur su fotosensibilizatoriumi inkubuota 1 val., MH-22A ląstelių buvo sėjama 4×10<sup>5</sup> ląst./ml ir praėjus ~24 val. užpilamas fotosensibilizatorius, o A-431 ląstelių – 1×10<sup>5</sup> ląst./ml, fotosensibilizatorių užpilant po ~48 val.. Ilgą laiką inkubuojant su fotosensibilizatoriumi 18 val., fotosensibilizatorius užpilamas praėjus ~30 val. po sėjimo, MH-22A ląstelių sėjimo tankis 3×10<sup>5</sup> ląst./ml, o A-431 ląstelių – 1,2×10<sup>5</sup> ląst./ml.

Paruoštos eksperimentui ląstelės (beveik išsivysčiusios monosluoksnis) 2 kartus praplaunamos PBS tirpalu, po to užpilama atitinkamos koncentracijos fotosensibilizatoriaus tirpalu DMEM terpėje be FCS ir laikomos CO<sub>2</sub> inkubatoriuje (2.1 lent.). Po inkubacijos su fotosensibilizatoriumi, ląstelės 2



kartus praplaunamos PBS, užpilamos DMEM terpe su FCS ir švitinamos. Pašvitinus, ląstelės laikomos CO<sub>2</sub> inkubatoriuje.

## 2.1 lentelė. Fotosensibilizacijos sąlygos

Fotosensibilizatorius	Fotosensibilizatoriaus koncentracija	Inkubacijos su fotosensibilizatoriumi trukmė	Švitinimo trukmė	Šviesos šaltinio bangos ilgis
<i>MH-22A ląstelių fotosensibilizacijos sąlygos</i>				
<i>mTHPC</i>	0,15 µg/ml	18 val.	15 - 75 sek.	$\lambda = 660 \pm 5 \text{ nm}^*$
<i>Rh123</i>	5 µg/ml	1 val.	15 - 75 min.	$\lambda = 509 \pm 5 \text{ nm}^{**}$
<i>A-431 ląstelių fotosensibilizacijos sąlygos</i>				
<i>mTHPC</i>	0,1 µg/ml	18 val.	0,5 - 3 min.	$\lambda = 660 \pm 5 \text{ nm}^*$
<i>Safr</i>	0,7 µg/ml	1 val.	0,5 - 15 min.	$\lambda = 509 \pm 5 \text{ nm}^{**}$
<i>ALPcS<sub>4</sub></i>	20 µg/ml	18 val.	4 - 12 min.	$\lambda = 660 \pm 5 \text{ nm}^*$

\* Diodinis šviesos šaltinis UNIMELA-1 (Vilniaus universiteto Lazerinių tyrimų centras), kurio spinduliuotės  $\lambda = 660 \pm 5 \text{ nm}$  ( $16 \text{ W/m}^2$ ).

\*\* Diodinis šviesos šaltinis UNIMELA-2 (Vilniaus universiteto Lazerinių tyrimų centras), kurio spinduliuotės  $\lambda = 509 \pm 5 \text{ nm}$  ( $29 \text{ W/m}^2$ ).

Šviesos šaltinių galingumas matuotas energijos matuokliu Nova (Ophir).

## 2.4 Fotosensibilizatoriaus lokalizacijos ląstelėse vaizdinimas

Fotosensibilizatoriaus ir mitochondrijoms savito žymens Rh123 kolokalizacija MH-22A ląstelėse registruota tokiomis sąlygomis: po inkubacijos su mTHPC ląstelės 15 min. inkubuotos su 2 µg/ml mitochondrijų žymens Rh123.

Fluorescencija registruota mikroskopu Olympus AX70, naudojant 60× aliejaus imersijos objektyvą UPlanFl, kurio NA 1,25. mTHPC būdinga fluorescencija stebėta naudojant filtrų kubą, praleidžiantį spinduliuotę, kurios  $\lambda_{\text{ex}} = 400\text{-}410 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} > 590 \text{ nm}$ , o Rh123 būdinga fluorescencija – WIBA filtrų kubą, praleidžiantį spinduliuotę, kurios  $\lambda_{\text{ex}} = 460\text{-}490 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 515 - 550 \text{ nm}$ . Vaizdai registruoti CCD kamera Orca (Hamamatsu).

Fotosensibilizatoriaus ir organelėms savito žymens kolokalizacija A-431 ląstelėse stebėta, į terpę pridėjus: 1) 25 nM mitochondrijų žymens MitoTracker Deep Red 633 (Molecular Probes), kuris ląstelėms užpiltas kartu su Safr ir inkubuota 1 val.; 2) 20 nM mitochondrijų žymens MitoTracker

Green (Molecular Probes) pridėta likus 45 min. iki inkubacijos su mTHPC pabaigos; 3) 75 nm lizosomų žymens LysoTracker Yellow-HCK-123 (Molecular Probes), inkubuota 1 val.

Fluorescencija registruota lazeriniu skenuojamuoju mikroskopu Leica SP5, naudojant 63× vandens imersijos objektyvą HCX PL APO CS, kurio NA 1,2. Fotosensibilizatoriaus ir organelių žymenų fluorescencija stebėta: Safranino,  $\lambda_{ex} = 514$  nm,  $\lambda_{em} = 560 - 630$  nm; MitoTracker Deep Red 633,  $\lambda_{ex} = 633$  nm,  $\lambda_{em} = 650 - 750$  nm; mTHPC,  $\lambda_{ex} = 633$  nm,  $\lambda_{em} = 640 - 670$  nm; MitoTracker Green,  $\lambda_{ex} = 488$  nm,  $\lambda_{em} = 500 - 540$  nm; AlPcS<sub>4</sub>,  $\lambda_{ex} = 633$  nm,  $\lambda_{em} = 640 - 690$  nm; LysoTracker Yellow-HCK-123,  $\lambda_{ex} = 488$  nm,  $\lambda_{em} = 494 - 605$  nm.

## **2.5 Ląstelių gyvybingumo testai**

Ląstelių gyvybingumas vertintas praėjus 24 val. po FDP.

### **2.5.1 Dažymas kristaliniu violetiniu (KV)**

Metodas pagrįstas kristalinio violetinio dažo prisijungimu prie baltymo. Atšokusios negyvybingos ląstelės atsargiai nuplaunamos, likusios ląstelės praplaunamos 0,9% NaCl tirpalu ir 10 min. fiksuojamos 96% etanoliu. Užfiksuotos ląstelės dažomos 0,05% kristalinio violetinio tirpalu 20% etanolyje. Po 30 min. dažas nuplaunamas, ląstelių monosluoksnis 5 kartus praplaunamas vandeniu ir dažas ištirpinamas 0,1% acto rūgšties tirpale 50% etanolyje. 585 nm sugertis matuojama spektrofotometru Perkin Elmer  $\lambda$ 20. Ląstelių gyvybingumas po poveikio išreiškiamas procentais nuo kontrolinių ląstelių gyvybingumo. Pagal (Ito, 1984).

### **2.5.2 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. Nuo ląstelių nusiurbus terpę, ląstelės praplaunamos DPBS

buferiu ir užpilama 0,2 mg/ml MTT tirpalo DPBS buferyje, inkubuojama 1 val. 37°C temperatūroje. Nusiurbus MTT tirpalą, dėl gyvybingų ląstelių oksidoreduktazių veiklos susidaręs violetinės spalvos dažas ekstrahuojamas 100 % izopropanoliu. 570 nm sugertis matuojama spektrofotometru Perkin Elmer λ20. Pagal (Denizot and Lang, 1986).

## **2.6 Ląstelių žūties kelio nustatymas dažant AO ir EtBr mišiniu**

Metodas paremtas skirtingu fluorescencinių dažų, kuriuos riša DNR, akridino oranžinio (AO) bei etidžio bromido (EtBr), patekimu į gyvas ir negyvas ląsteles. Stebint fluorescenciniu mikroskopu, pagal ląstelės spalvą galima atskirti gyvas ląsteles (žalios spalvos - plazminė membrana laidi tik AO) ir negyvas ląsteles (oranžinės spalvos - plazminė membrana laidi ir AO ir EtBr).

Gyvos ląstelės – tolygiai žalios su nekondensuotu chromatinu. Gyvos apoptozinės – žalios su kondensuotu chromatinu, negyvos apoptozinės – oranžinės su ryškiu kondensuotu arba fragmentuotu chromatinu. Nekrozinės ląstelės – oranžinės su nekondensuotu chromatinu.

Ląstelės dažomos akridino oranžinio (1 µg/ml) ir etidžio bromido (1 µg/ml) tirpalų mišiniu PBS druskų tirpale (Merville and Massie, 1994). Ląstelės stebimos mikroskopu Olympus AX70, naudojant 60× aliejaus imersijos objektyvą UPlanFl, kurio NA 1,25 ir filtrų kubą MF ( $\lambda_{ex} = 480-500$  nm, 550-580 nm;  $\lambda_{em} = 515-535$  nm, 590-625 nm). Skaičiuojama nežinant kontrolinės ar paveiktos ir kaip paveiktos ląstelės yra stebimos. Skaičiuojama mažiausiai penkių pro objektyvą matomų laukų ląstelės. Apoptozinių ir nekrozinių ląstelių dalis išreiškiama procentais nuo bendro ląstelių kiekio.

## **2.7 Ląstelių paviršiaus ir branduolių morfologijos vaizdinimas**

Ląstelių paviršiaus morfologijos pokyčiai stebėti Nomarski (DIC) mikroskopijos metodu, naudojant mikroskopą Olympus AX70 ir 60× aliejaus imersijos objektyvą UPlanFl, kurio NA 1,25 arba lazerinį skenuojamąjį

mikroskopą Leica SP5, naudojant 63× aliejaus imersijos objektyvą HCX PL APO lambda blue, NA 1,4.

Branduolių morfologiniai pokyčiai vizualizuoti dažant chromatiną: 30 min. inkubuota su 5 µg/ml of Hoechst 33342 (Molecular Probes) 37°C. Ląstelių branduoliai stebėti mikroskopu Olympus AX70, naudojant 60× aliejaus imersijos objektyvą UPlanFl, kurio NA 1,25, filtrų kubą WU ( $\lambda_{\text{ex}} = 330\text{-}385$  nm;  $\lambda_{\text{em}} \geq 420$  nm), vaizdus registruojant CCD kamera Orca (Hamamatsu), arba lazerinį skenuojamąjį mikroskopą Leica SP5, naudojant 63× HCX PL APO lambda blue aliejaus imersijos objektyvą, NA 1,4,  $\lambda_{\text{ex}} = 405$  nm;  $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}570$  nm.

## 2.8 Citrato sintazės aktyvumo nustatymas

Citrato sintazė yra savitas mitochondrijų užpildo fermentas. Ląstelės atkeliamos nuo substrato 0,05% tripsino/0,02% EDTA tirpalu ir ląstelių suspensija centrifuguojama (10 min., 1000×g, 4°C) kartu su inkubavimo terpe ir joje esančiom jau atkilusiom ląstelėm. Nusėdusios ląstelės kartą praplaunamos PBS'u, skaičiuojamos ir pripilama tiek lizės buferio (50 mM Tris-HCl (pH 7,5) su 0,3% Tritono X-100 (Calbiochem)), kad būtų  $10^7$  ląst./ml.

Pirmiausia nustatomas acetil-KoA hidrolazės aktyvumas, pilant 10 µl arba 30 µl MH-22A arba A-431 ląstelių lizato, atitinkamai, į kiuvetę, kurioje yra: 100 µl DTNB (5,5'-ditiobis(2-nitrobenzenkarboksirūgštis) (0,4 mg/ml tirpalas 1 M Tris-HCl, pH 8,1), 30 µl acetil-KoA (10 mg/ml, pH 5) ir 810 arba 790 µl vandens (atitinkamai MH-22A ir A-431 ląstelių lizatams). 412 nm sugertis matuojama 2 min. spektrofotometru Perkin Elmer λ20. Pridėjus 50 µl 1,32 mg/ml oksalacto rūgšties (OAA), sugertis registruojama dar 2-3 minutes. Sugerties pokytis antrąją minutę (nustatant acetil-KoA hidrolazės aktyvumą) atimamas iš tiesinio sugerties pokyčio, pridėjus OAA. Pagal (Srere, 1969). Neperinis Stjudento t testas atliktas naudojant programą Sigma Stat 3.5.

## 2.9 N-acetil- $\beta$ -gliukozaminidazės aktyvumo nustatymas

N-acetil- $\beta$ -gliukozaminidazė yra savitas lizosomų fermentas. Šis fermentas hidrolizuoja galinį N-acetil-D-gliukozaminą nuo N-acetil- $\beta$ -D-gliukozaminidų, o jo aktyvumas nustatomas pagal N-acetil- $\beta$ -gliukozaminidazės katalizuojamą p-nitrofenolio nuskėlimą nuo p-nitrofenilo-N-acetilo- $\beta$ -gliukozaminido (NAG). Įvykus reakcijai, matuojama p-nitrofenoliui būdinga 410 nm sugertis.

Fermento aktyvumas buvo matuojamas iš karto po švitinimo. Nuo ląstelių nusiurbiamo terpė, ląstelės praplaunamos PBS buferiu. Ląsteles užpilamos 200  $\mu$ l lizavimo buferiu (0,1% Tritono X-100 tirpalas 100 mM Na acetato tirpale, pH 4,6) ir sugramdomos guminiu grandikliu. Kiuvetėje sumaišoma 100  $\mu$ l ląstelių lizato ir 400  $\mu$ l substrato tirpalo (2 mM NAG tirpalas 100 mM Na acetate, pH 4,6). Kontrolei vietoj ląstelių lizato pripilama 100  $\mu$ l ląstelių lizavimo buferio. Inkubuojama 2 val. 37°C temperatūroje. Reakcija sustabdoma į kiuvetes pripilant 500  $\mu$ l šalto 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Spektrofotometru Perkin Elmer  $\lambda$ 20 matuojama 410 nm sugertis. Pagal (Beaufay et al., 1974). Neporinis Stjudento t testas atliktas naudojant programą Sigma Stat 3.5.

## 2.10 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-AFC) C-galo. Atskėlus AFC nuo substrato, padidėja jo 510 nm fluorescencijos intensyvumas. Fermento aktyvumas matuotas pagal gamintojo rekomenduotą protokolą.

Ląstelės atkeliamos nuo substrato 0,05% tripsino/0,02% EDTA tirpalu ir ląstelių suspensija centrifuguojama (10 min., 1000 $\times$ g, 4°C) kartu su inkubavimo terpe ir joje esančiom jau atkilusiom ląstelėm. Nusėdusios ląstelės

kartą praplaunamos PBS'u, skaičiuojamos ir 5 min. inkubuojamos su lizės buferiu (50 mM HEPES, pH 7,4, 0,1% CHAPS (Roth), 1 mM DTT (Roth), 0,1 mM EDTA) leduose, esant  $10^7$  ląst./ml.

Citozolio ekstraktas gaunamas po 10 min. centrifugavimo  $10000\times g$ ,  $4^\circ C$ . Į 96 šulinėlių matavimo plokštelės (Labsystems) šulinėlį pilama 80  $\mu l$  matavimo buferio (50 mM HEPES, pH 7,4, 100 mM NaCl, 0,1% CHAPS, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% glicerolis), 10  $\mu l$  citozolinio ekstrakto ir 10  $\mu l$  kaspazei savito substrato (0,2 mM). AFC būdinga fluorescencija matuojama 60 min., kas 3 min., fluoroskanu Ascent FL (Labsystems),  $\lambda_{ex}=390$  nm,  $\lambda_{em}=510$  nm.

Pagal gautus duomenis brėžiama kreivė, ordinačių ašyje atidedant santykinius fluorescencijos vienetus (SFV), abscisių – laiką (min.). Iš tiesės lygties apskaičiuojamas kreivės nuokrypis. Fermento aktyvumas apskaičiuojamas pagal šią lygtį: kaspazės aktyvumas (pmol/min) = kreivės nuokrypis (SFV/min)  $\times$  perskaičiavimo koeficientas ( $\mu M/SFV$ ) (iš kalibracinės kreivės)  $\times$  reakcijos tūris ( $\mu l$ ), kur perskaičiavimo koeficientas yra lygus „1/kreivės nuokrypio“, gauto iš AFC kalibracinės kreivės, gautos ordinačių ašyje atidėjus SFV, o abscisių ašyje - AFC standarto koncentraciją ( $\mu M$ ). Kaspazės aktyvumas (pmol/min) išreiškiamas pmol/min/ $10^5$  ląstelių.

## **2.11 Genų raiškos RNR lygiu nustatymas**

### **2.11.1 RNR išskyrimas**

RNR buvo skiriama iš  $1\times 10^6$  ląstelių.

Ląstelės atkeliamos nuo substrato 0,05% tripsino/0,02% EDTA tirpalu ir ląstelių suspensija centrifuguojama (10 min.,  $1000\times g$ ,  $4^\circ C$ ) kartu su inkubavimo terpe ir joje esančiom jau atkilusiom ląstelėm. Nusėdusios ląstelės kartą praplaunamos PBS'u, skaičiuojamos ir dar kartą centrifuguojamos (10 min.,  $1000\times g$ ,  $4^\circ C$ ). Jei RNR skiriama ne tą pačią dieną, ląstelių nuosėdos laikomos  $-70^\circ C$ .

RNR skyrimui buvo naudotas rinkinys „RNA Isolation Kit Purescript®“ (Gentra Systems), RNR išskirta pagal gamintojo rekomendacijas.

Išskirtos RNR vientisumas vertintas 1% agaroziniame gelyje. Agarozinis gelis ruošiamas: 1% agarozė išlydoma 1× TAE buferyje, atvėsinama ir pridedama 0,5 µg/ml EtBr. 50× TAE buferio sudėtis: 24,2 g Tris, 5,7 ml ledinės acto rūgšties, 10 ml 0,5 M EDTA, H<sub>2</sub>O iki 100 ml. Agarozinis gelis gaunamas išlydytą agarozę supylus į gelio formą. Gelis dedamas į elektroforezės aparatą, pripildytą 1× TAE buferio su 0,5 µg/ml EtBr. Į takelį užnešus po 5 µl išskirtos RNR, elektroforezė leista esant 5 V/cm lauko stiprumui.

RNR kiekis ir grynumas nustatytas spektrofotometriškai, matuojant sugertį ties 260 ir 280 nm ( $A^{260}$ ,  $A^{280}$ ). RNR koncentracija apskaičiuota pagal formulę:  $C(\mu\text{g/ml}) = A^{260} \times 40$ . Išskirta RNR laikoma -70°C.

### 2.11.2 kDNR sintezė

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

### 2.11.3 Kiekybinė PGR

Kiekybinės PGR metu susidaręs produktas buvo nustatomas naudojant SYBR Green dažą. Tiriamų genų (HIF1A, IL1A, P21, VEGFA) raiška vertinta pagal „atskaitos“ geno ACTB raišką. Suminės RNR kiekio, atvirkštinės transkripcijos ir PGR reakcijų efektyvumo skirtumai skirtinguose mėginiuose buvo normalizuoti pagal „atskaitos“ geno ACTB raišką. Pradmenys pasirinkti naudojant programą Primer3 ant egzono-egzono ribos - taip išvengiama genominės DNR amplifikacijos.

Bendras reakcijos tūris - 20 µl, kiekvienai reakcijai naudoti 1,6 µl 3 kartus skiestos kDNR (susintetintos pagal 1.13.1 sk. metodiką), po 1 µl 10 µM

tiesioginio ir atvirkštinio pradmenų (Metabion arba Fermentas), 10 µl SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) ir 6,4 µl vandens. Reakcija vykdoma 96 šulinėlių PGR plokštelėse (Applied Biosystems). Reakcijoms naudotų pradmenų sekos pateiktos 2.2 lentelėje. Kiekybinė PGR atlikta naudojant ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems) arba Mastercycler ep realplex (Eppendorf) aparatus.

Genų raiškos pokytis vertintas santykinų standartinių kreivių metodu. Iš standartinių kreivių yra surandami santykiniai tiriamų ir „atskaitos“ genų transkriptų kiekiai. Tuomet tiriamajame mėginyje transkripto kiekis, išreikštas kartais, palyginus su kontrole, apskaičiuojamas pagal formulę:

$$\frac{(\text{Santykinis kiekis}_{(\text{tiriamas genas})} / \text{Santykinis kiekis}_{(\beta\text{-aktino genas})})_{\text{po FDP}}}{(\text{Santykinis kiekis}_{(\text{tiriamas genas})} / \text{Santykinis kiekis}_{(\beta\text{-aktino genas})})_{\text{Kontrolė}}}$$

Rezultatai pateikiami kaip genų raiškos pokyčiai išreikšti kartais, pagal „atskaitos“ geno ACTB raišką, palyginus su kontrole (FDP neveiktomis ląstelėmis).

## 2.2 lentelė. Pradmenys, naudoti kiekybinei PGR

Genas	mRNR sekų nuorodos	Tiesioginis pradmuo	Atvirkštinis pradmuo
ACTB	NM_001101.3	ACAGAGCCTCGCCTTTG C-	CATCATCCATGGTGAGCTG
HIF1A	NM_001530.3, NM_181054.2	TCTGGATGCTGGTGATTT G	CACCATCATCTGTGAGAAC CA
IL1A	NM_000575.3	CTGCTGAAGGAGATGCC TGA	CAGACCTACGCCTGGTTTT C
P21	NM_000389.4, NM_078467.2, NM_001220777.1, NM_001220778.1	ACCAGCATGACAGATTTT TACC	GGATTAGGGCTTCCTCTTG G
VEGFA	NM_001025366.2, NM_001025367.2, NM_001025368.2, NM_001025369.2, NM_001025370.2, NM_001033756.2, NM_001171623.1, NM_001171624.1, NM_001171625.1, NM_001171626.1, NM_001171627.1, NM_001171628.1, NM_001171629.1, NM_001204384.1 NM_001204385.1, NM_003376.5	CCCACTGAGGAGTCCAA CAT	TTCTTGGTCTGCATTCAAC ATT

### 2.12 Western blot analizė

Atlikta pagal (Ausubel et al., 2000).



### 2.12.1 Mėginių paruošimas

Ląstelės atkeliamos nuo substrato 0,05% tripsino/0,02% EDTA tirpalu ir ląstelių suspensija centrifuguojama (10 min., 1000×g, 4°C) kartu su inkubavimo terpe ir joje esančiom jau atkilusiom ląstelėm. Nusėdusios ląstelės kartą praplaunamos PBS'u, skaičiuojamos ir dar kartą centrifuguojama (10 min., 1000×g, 4°C).

Citochromo c nustatymui  $7 \times 10^6$  MH-22A ir  $4 \times 10^6$  A-431 ląstelių suspenduojamos 60  $\mu$ l lizės buferio: PBS, kuriame yra 10  $\mu$ g/ml saponino, 1 mM PMSF, 1  $\mu$ M leupeptino ir 0,01  $\mu$ M aprotinino. Laikoma 30 min. leduose. Lizatai centrifuguojami 5 min. 1300×g, 4°C. Mitochondrijos nusodinamos, supernatantus centrifuguojant 15 min. 17000×g, 4°C.

P21 ir LC3 nustatymui, ląstelės lizuojamos RIPA buferyje (50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Tritono X-100, 1% natrio deoksicholato, 1 mM PMSF, 1  $\mu$ M leupeptino ir 0,01  $\mu$ M aprotinino).  $2 \times 10^5$  ląstelių ( $10^7$  ląst./ml) 30 min. inkubuojamos RIPA buferyje leduose ir 5 min. centrifuguojamos 14000×g, 4°C. Baltymų koncentracija superantante buvo nustatyta BCA metodu (pagal 1.14.5 sk. metodiką), į elektroforezės takelį užnešama po 70  $\mu$ g baltymo.

### 2.12.2 NDS elektroforezė denatūravimo sąlygomis

Supernatantas sumaišomas su 6× mėginio užnešimo buferiu (30% glicerolis, 10% NDS, 0,012% bromfenolio mėlis, 0,6 M DTT ir 0,35 M Tris-HCl, pH 6,8), inkubuojama 4 min. 90°C vandens vonioje ir atvėsinama ledu vonelėje.

Elektroforezė leista NDS-poliakrilamidiniame gelyje denatūravimo sąlygomis. Baltymai sukonzentruojami 4% NDS-poliakrilamidiniame gelyje, citochromo c mėginiai išfrakcionuoti 15% NDS-poliakrilamidiniame gelyje, o P21 ir LC3 – 12% NDS-poliakrilamidiniame gelyje, esant 120 V įtampai.

Poliakrilamidinis gelis gaunamas užsluoksniuojant 4% koncentruojamąjį gelį ant polimerinio 12% arba 15% skiriamojo gelio.

12% skiriamasis gelis paruošiamas sumaišius 6 ml 30% akrilamido/0,8% bisakrilamido tirpalo, 3,75 ml 4× Tris-HCl/NDS, pH 8,8 (1,5 M Tris-HCl su 0,4% NDS), 5,25 ml H<sub>2</sub>O, 50 µl 10% amonio persulfato ir 10 µl TEMED.

15% skiriamasis gelis gaunamas sumaišius 7,5 ml 30% akrilamido/0,8% bisakrilamido tirpalo, 3,75 ml 4× Tris-HCl/NDS, pH 8,8 (1,5 M Tris-HCl su 0,4% NDS), 3,75 ml H<sub>2</sub>O, 50 µl 10% amonio persulfato ir 10 µl TEMED.

4% koncentruojamasis gelis paruošiamas sumaišius 0,65 ml 30% akrilamido/0,8% bisakrilamido tirpalo, 1,25 ml 4× TrisHCl/NDS, pH 6,8 (0,5 M Tris-HCl su 0,4% NDS), 3,05 ml H<sub>2</sub>O, 25 µl 10% amonio persulfato ir 5 µl TEMED.

Baltymų elektroforezė leidžiama pripildžius aparatą 1× elektroforezės buferiu. 5× NDS elektroforezės buferio sudėtis: 15,1 g Tris, 72 g glicino, 5 g NDS, H<sub>2</sub>O iki 1 litro.

### **2.12.3 Baltymų pernešimas ant nitroceliuliozinės membranos**

Baltymai ant 0,45 µm nitroceliuliozinės (BioRad) membranos pernešti naudojant pusiau sauso pernešimo aparatą (C.B.S. Scientific). Pernešimo buferio sudėtis: 1,3 mM NDS, 48 mM Tris, 39 mM glicino, 15% izopropanolio. Ant pernešimo buferiu sudrėkintos anodinės aparato dalies dedami keturi pernešimo buferyje pamirkyti Whatman 3 MM popieriaus lapeliai, 1 mm ilgesni ir platesni už gelį. Ant jų uždedama tokio pat dydžio pernešimo buferyje sudrėkinta nitroceliuliozinė membrana, o ant jos - gelis. Ant gelio dedami dar keturi pernešimo buferyje pamirkyti Whatman 3 MM popieriaus lapeliai. Stikline lazdele išstumiami tarp sluoksnių esantys oro burbuliukai ir uždedamas pernešimo buferiu sudrėkintas katodinis dangtis. Pernešimas vykdomas 1 val. 15 min., esant 1 mA/cm<sup>2</sup> srovei.

#### 2.12.4 Baltymų detekcija

Membrana 1 val. inkubuojama TBS buferyje (50 mM Tris, pH 8, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20 (Roth)) su 5% BSA (Roth). Po to membrana per naktį inkubuojama 4°C temperatūroje pirminių antikūnų tirpale (skiedžiami santykiu 1:1000 TBS buferyje su 5% BSA). Buvo naudoti pirminiai antikūnai, atpažįstantys citochromą c (SA-226, Biomol), P21 (sc-756, Santa Cruz Biotechnology), LC3 (PM036, MBL) arba β-aktiną (sc-8432, Santa Cruz Biotechnology). Membrana plaunama 15 min. ir 2 kartus po 5 min. TBS buferiu ir 2 val. inkubuojama 4°C temperatūroje antrinių antikūnų tirpale (skiedžiami santykiu 1:10000 TBS buferyje su 5% BSA). β-aktinas ir citochromas c nustatomi naudojant su krienų peroksidaze konjuguotą antrinį antikūną prieš pelės IgG (sc-2031, Santa Cruz Biotechnology), o P21 ir LC3 - naudojant su krienų peroksidaze konjuguotą antrinį antikūną prieš triušio IgG (sc-2030, Santa Cruz Biotechnology). Membrana plaunama 15 min. ir 2 kartus po 5 min. TBS buferiu. Baltymai išryškinami naudojant ECL chemiliuminescencinius reagentus (Amersham Biosciences). Membrana 1 min. drėkinta ECL reagentų mišiniu. Fotojuosta Medical X-ray Film General Purpose Blue (Kodak) ant membranos eksponuojama 0,5 - 30 min.

P21 baltymo kiekis vertintas atlikus densitometrinę analizę, santykinis baltymo kiekis apskaičiuotas pagal formulę:

$$\frac{((\text{p21 juostelės tankis})/(\beta\text{-aktino juostelės tankis}))_{\text{po poveikio}}}{((\text{p21 juostelės tankis})/(\beta\text{-aktino juostelės tankis}))_{\text{kontrolė}}}$$

#### 2.12.5 Baltymo koncentracijos nustatymas BCA metodu

Metodas paremtas kompleksų sudarymo reakcija, kurios metu šarminėje terpėje bicinchonino rūgšties natrio druska (BCA-Na<sub>2</sub>) sudaro violetinės spalvos kompleksinius junginius su Cu<sup>+</sup> jonais, kurie susidaro, Biureto reakcijos metu baltymams sąveikaujant su Cu<sup>2+</sup>.

Baltymų kiekio matavimui į kiuvetę pilama: 5 µl supernatanto, gauto lizuojant ląsteles pagal 1.14.1 sk. metodiką, 45 µl RIPA buferio ir 950 µl BCA

reagento (gaunamas sumaišius 100 dalių bicinchonino rūgšties tirpalo (Sigma) ir 2 dalis 4%  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ). Mišinys inkubuojamas 30 min  $37^\circ\text{C}$ . Kiuvetes atvėsinus iki kambario temperatūros, spektrofotometru Perkin Elmer  $\lambda 20$  matuojama 562 nm sugertis. Baltymo kiekis nustatomas pagal kalibracinę kreivę, gautą naudojant BSA tirpalą, kurio koncentracija 100 – 900  $\mu\text{g/ml}$ . Pagal (Smith et al., 1985).

### **2.13 LC3 baltymo lokalizacijos ląstelėse vaizdinimas**

Mikroskopijos eksperimentams ląstelės auginamos ant dengiamųjų stiklelių  $9 \text{ cm}^2$  lėkštelėse. Praėjus 24 val. po švitinimo, nuo ląstelių nusiurbiami inkubavimo terpė ir ląstelės 2 kartus praplaunamos PBS'u. Ląstelės 10 min fiksuojamos 4% paraformaldehido tirpalu PBS'e,  $4^\circ\text{C}$  temperatūroje ir 3 kartus po 5 min. plaunamos su PBS'u. Ląstelės pralaidinamos 3 min. inkubuojant su 0,1% Tritono X-100 tirpalu PBS'e,  $4^\circ\text{C}$  temperatūroje ir kartą greitai praplaunamos tuo pačiu tirpalu.

Ant fiksuotų ir permeabilizuotų ląstelių užpilama blokavimo tirpalo: 0,5% BSA tirpalo PBS'e, laikoma 15 min. Toliau ląstelės 30 min. kambario temperatūroje inkubuojamos su pirminiu antikūnu prieš LC3 baltymą (PM036, MBL), praskiestu blokavimo tirpale santykiu 1:350. Ląstelės tris kartus po 5 min. plaunamos PBS'u ir 30 min kambario temperatūroje inkubuojamos su antriniu antikūnu prieš triušio IgG (NL005, R&D Systems), praskiestu blokavimo tirpale, santykiu 1:200. Ląstelės tris kartus po 5 min. plaunamos PBS'u.

Dengiamieji stikleliai su nudažytomis ląstelėmis padengiami DakoCytomation Fluorescent Mounting medium (Dako) ir uždedami ant objektinių stiklelių. Dengiamuosius stiklelius prie objekcinio stiklelio priklįjavus nagų laku, stikleliai laikomi  $4^\circ\text{C}$  temperatūroje, tamsoje.

LC3 imunofluorescencija stebėta lazeriniu skenuojamuoju mikroskopu Leica SP5, naudojant  $63\times$  HCX PL APO lambda blue aliejaus imersijos objektyvą, NA 1,4,  $\lambda_{\text{ex}} = 633 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 640\text{-}680 \text{ nm}$ .

## 2.14 Ląstelių analizė tėkmės citometru

### 2.14.1 Ląstelės ciklo analizė

Ląstelės ciklas tirtas dviparametrinės ląstelės ciklo analizės metodu, S fazėje esančias ląsteles pažymint BrdU ir nustatant bendrą ląstelės DNR kiekį dažant su PI. DNR sintezės metu, BrdU yra prijungiamas prie sintetinės DNR grandinės vietoje timino, taigi inkubuojant su BrdU yra pažymimos tuo metu S fazėje esančios ląstelės. Buvo atliekami dviejų tipų eksperimentai: 1) kai iš karto po švitinimo ląstelės yra inkubuojamos su BrdU, ir praėjus 6 val. stebimas ląstelių pasiskirstymas ciklo fazėse – taip galėjome įvertinti fotodinaminį poveikį S fazės ląstelėms; 2) ląstelės inkubuojamos su BrdU praėjus 24 val. po švitinimo, iš karto fiksuojamos ir analizuojamos – galėjome tiksliai nustatyti kiek ląstelių yra S fazėje praėjus 24 val. po FDP.

Į ląstelių auginimo terpę pridedama 10  $\mu$ M BrdU ir ląstelės inkubuojamos 30 min. CO<sub>2</sub> inkubatoriuje. Ląstelės atkeliamos nuo substrato 0,05% tripsino/0,02% EDTA tirpalu ir ląstelių suspensija centrifuguojama (10 min., 1000×g, 4°C) kartu su inkubavimo terpe ir joje esančiom jau atkilusiom ląstelėm. Nusėdusios ląstelės kartą praplaunamos PBS'u, skaičiuojamos. 1 mln. ląstelių suspensija dar kartą centrifuguojama (10 min. 1000×g, 4°C).

Ląstelių nuosėdos suspenduojamos 100  $\mu$ l PBS, sulašinamos į 5 ml ledinio (laikyto -20°C temp.) 70% etanolio tirpalą ir inkubuojamos 30 min. leduose. Ląstelės nucentrifuguojamos (10 min., 1000×g, 4°C). DNR denatūruojama įpylus 1 ml 2 N HCl su 0,5% Tritono X-100 ir mišinys inkubuojamas 30 min. Ląstelės nucentrifuguojamos (10 min., 1000×g, 4°C) ir praplaunamos 1 ml, 0,1 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, pH 8,5. Ląstelės dar kartą nucentrifuguojamos (10 min., 1000×g, 4°C) ir suspenduojamos 50  $\mu$ l PBS su 0,5% Tween 20 ir 1% BSA. Pridėjus 20  $\mu$ l FITC žymėto antikūno prieš BrdU (347583, Becton Dickinson), ląstelės 30 min. inkubuojamos kambario temperatūroje. Užpylus 1 ml PBS, ląstelės nucentrifuguojamos (10 min., 1000×g, 4°C) ir suspenduojamos PBS'e su 5  $\mu$ g/ml PI. Bendras ląstelių DNR

(vertinama pagal PI fluorescenciją) ir įjungto BrdU (vertinama pagal FITC žymėtų antikūnų fluorescenciją) kiekis buvo matuojamas tėkmės citometru FACSort (Becton Dickinson). Duomenys analizuoti naudojant programą WinMDI 2.8.

#### **2.14.2 Žūties kelio nustatymas**

Ląstelės atkeliamos nuo substrato 0,05% tripsino/0,02% EDTA tirpalu ir ląstelių suspensija centrifuguojama (10 min., 1000×g, 4°C) kartu su inkubavimo terpe ir joje esančiomis jau atkilusiomis ląstelėmis. Nusėdusios ląstelės kartą praplaunamos šaltu PBS'u, skaičiuojamos ir dar kartą nusodinamos. Ląstelių dažymui buvo naudotas rinkinys „FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I“ (BD Pharmingen). Ląstelės dažytos pagal gamintojo rekomendacijas. Tėkmės citometru FACS Calibur (Becton Dickinson) buvo matuojamas prie ląstelių prijungto Aneksino V ir į ląsteles patekusio PI kiekis. Duomenys analizuoti naudojant programą WinMDI 2.8.

### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

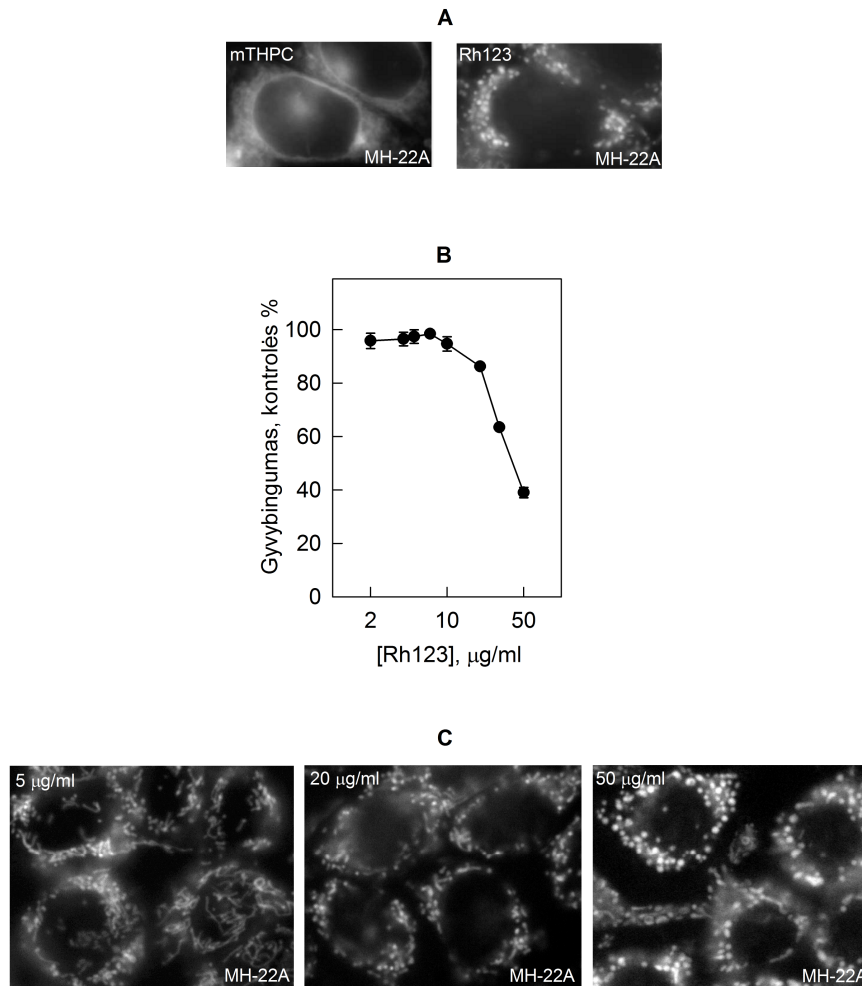
Šiame darbe tyrėme kaip ląstelių atsakas į FDP priklauso nuo fotosensibilizatoriaus lokalizacijos ląstelėje. Didžioji dalis klinikoje naudojamų fotosensibilizatorių (tarp jų ir šiame darbe naudotas mTHPC (1.1 lent.)) yra hidrofobiniai ir lokalizuojasi įvairiose ląstelės membranineose struktūrose: mitochondrijose, ET, Goldžio komplekse, lizosomose (žiūr. 1.1.4 sk.), o jų sukeltas fotodinaminis poveikis inicijuoja ir apoptozę ir nekrozę (Oleinick et al., 2002). Kadangi mitochondrijos ir lizosomos yra labai svarbios ląstelių žūčiai (žiūr. 1.3 ir 1.4 sk.), tyrėme ląstelių atsaką į fotodinaminį poveikį, sukeltą savitai mitochondrijose ir lizosomose sukauptais fotosensibilizatoriais. Šiame darbe lyginome ląstelių atsaką į FDP, sukeltą naudojant fotosensibilizatorius, kurie kaupiami: 1) įvairiose ląstelės membranineose struktūrose – mTHPC; 2) mitochondrijose - Rh123 ir Safr; 3) lizosomose - AlPcS<sub>4</sub>.

#### 3.1 Skirtingose ląstelės organelėse sukauptų fotosensibilizatorių sukelta ląstelių žūtis

##### 3.1.1 Šviesos ir savitai mitochondrijose sukaupto Rh123 bei įvairiose ląstelės organelėse lokalizuoto mTHPC poveikių MH-22A ląstelėms palyginimas

Kadangi mitochondrijos yra labai svarbios apoptozės iniciacijai (Green and Kroemer, 2004), siekėme iširti kokį žūties kelią sukelia **savitai** mitochondrijose sukauptas fotosensibilizatorius. Šiam tikslui pasirinkome gerai žinomą mitochondrijų žymenį Rh123 (žiūr. 1.1.5 sk.), kuris yra lipofilinis delokalizuotas katijonas ir kaupiamas mitochondrijų viduje dėl mitochondrijų vidinės membranos potencialo, kadangi vidinė membranos pusė neigiamesnė už išorinę. Be to, Rh123 yra savitas mitochondrijų žymuo – kitos organelės jo nekaupia. Rh123 patenka į mitochondrijas tiesiogiai, elektroforeziškai, ne endocitozės keliu (Johnson et al., 1980). Rh123 taip pat yra naudojamas įvertinti mitochondrijų įtampą - jo kaupimas ląstelėse yra proporcingas mitochondrijų vidinės membranos įtampos dydžiui (Palmeira et al., 1996).

Šioje darbo dalyje lyginome šviesos bei Rh123 ir įvairiose ląstelės organelėse kaupiamo mTHPC (žiūr. 1.1.5 sk.) poveikį MH-22A ląstelėms. Mūsų pasirinktomis inkubacijos sąlygomis mTHPC lokalizacija pelės hepatomos ląstelėse MH-22A dalinai sutapo su mitochondrijomis (3.1 pav., A).



**3.1 pav.** mTHPC lokalizacija ir rodamino 123 kaupimas bei tamsinis citotoksiškumas MH-22A ląstelėse.

A – mTHPC lokalizacija. Ląstelės 18 val. inkubuotos su 0,5 µg/ml mTHPC. Inkubacijos su FS pabaigoje į terpę pridėta mitochondrijų savito žymens 2 µg/ml Rh123. mTHPC ir Rh123 fluorescencija registruota mikroskopu Olympus AX70.

B – Gyvybingumas po inkubacijos su Rh123. Ląstelės 1 val. inkubuotos DMEM terpėje su atitinkamos koncentracijos Rh123. Gyvybingumas vertintas MTT metodu, praėjus 24 val. po inkubacijos su Rh123.

C – Rh123 fluorescencija ląstelėse. Ląstelės 1 val. inkubuotos terpėje su skirtingos koncentracijos Rh123, fluorescencija registruota mikroskopu Olympus AX70.

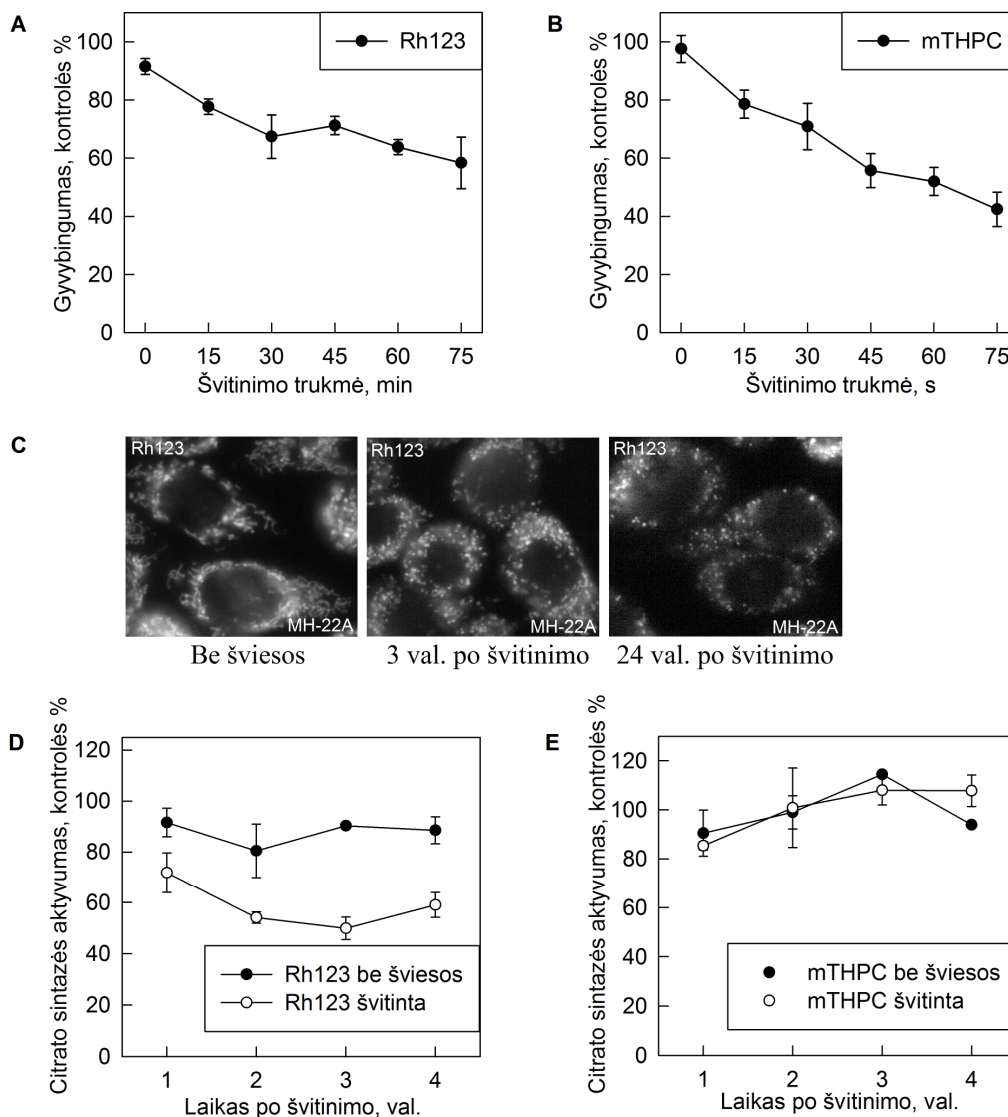
Brūkšniai - ± SN.



Rh123 koncentracijos, viršijančios 20  $\mu\text{g/ml}$ , buvo toksiškos ląstelėms – mažino ląstelių gyvybingumą (3.1 pav., B). Rh123 koncentracijai pasiekus 20  $\mu\text{g/ml}$ , pakito ir mitochondrijų morfologija, jos pradėjo brinkti – apvalėjo, o didėjant koncentracijai, darėsi vis apvalesnės (3.1 pav., C). Yra nustatyta, jog Rh123 koncentracija iki 10  $\mu\text{g/ml}$  nesutrikdo mitochondrijų kvėpavimo (elektronų transporto, ATP sintazės aktyvumo) (Atlante et al., 1992). Tuo tarpu didelė Rh123 koncentracija slopina išskirtų mitochondrijų ATP sintazę (Modica-Napolitano et al., 1984).

Atsižvelgdami į šiuos duomenis, tolimesniems tyrimams pasirinkome tokias inkubacijas su Rh123 sąlygas, kai Rh123 be šviesos nėra toksiškas MH-22A ląstelėms: ląsteles inkubavome 1 val. su 5  $\mu\text{g/ml}$  Rh123. MH-22A ląsteles terpėje su 0,15  $\mu\text{g/ml}$  mTHPC inkubavome 18 val. (Prasmickaite et al., 1997).

Ląstelių švitinimui parinkome šviesos šaltinius, kurių spinduliuojamos bangos ilgio maksimumas buvo artimas fotosensibilizatorių sugerties maksimumui: ląsteles su Rh123 švitinome diodiniu šviesos šaltiniu, kurio  $\lambda = 509 \pm 5$  nm, o ląsteles su mTHPC - diodiniu šviesos šaltiniu, kurio  $\lambda = 660 \pm 5$  nm. Ląstelių su Rh123 gyvybingumą pavyko sumažinti tik 40% (CD40): net švitinant 60 min. ( $104,4 \text{ kJ/m}^2$ ) ląstelių gyvybingumas praėjus 24 val. po švitinimo siekė 60% (3.2 pav., A). Tuo tarpu mTHPC fotodinaminis poveikis ląstelėms buvo daug stipresnis – tą pačią citotoksinę dozę (CD40) pasiekėme švitindami tik 45 sek. ( $0,72 \text{ kJ/m}^2$ ) (3.2 pav., B). Taigi, Rh123 nėra veiksmingas fototoksinio poveikio tarpininkas. Tai galima paaiškinti mažu, o kai kurių autorių duomenimis net ir nuliniu,  $^1\text{O}_2$  sudarymo kvantiniu našumu (1.1 lent.). Gali būti, jog Rh123 ir šviesos toksinis poveikis kyla dėl I tipo fotosensibilizuotos oksidacijos reakcijų. Literatūros duomenys apie deguonies svarbą Rh123 sukeltam fototoksiniam poveikiui yra prieštaringi: vienų autorių duomenimis Rh123 sukelia fotopažaidas nuo deguonies priklausomu keliu (Atlante et al., 1992; Richmond and O'Hara, 1993), kitų autorių duomenimis, deguonis šiame procese nedalyvauja (Morliere et al., 1990).



**3.2 pav.** Pokyčiai MH-22A ląstelėse po Rh123 fototoksinio ir mTHPC fotodinaminio poveikio.

A – Rh123-FDP sukelti gyvybingumo pokyčiai. Gyvybingumas vertintas MTT metodu, praėjus 24 val. po švitinimo.

B – mTHPC-FDP sukelti gyvybingumo pokyčiai. Gyvybingumas vertintas MTT metodu, praėjus 24 val. po švitinimo.

C - Rh123 būdinga fluorescencija ląstelėse po Rh123-FDP. Rh123 fluorescencija registruota ląstelių nešvitinus (Be šviesos), praėjus 3 val. ir 24 val. po švitinimo.

D – Citrato sintazės aktyvumas po Rh123-FDP, išreikštas % nuo neveiktų kontrolinių ląstelių.

E – Citrato sintazės aktyvumas po mTHPC-FDP, % nuo neveiktų kontrolinių ląstelių.

Rh123-FDP: ląstelės 1 val. inkubuotos su 5 µg/ml Rh123, švitintos 60 min. šviesa, kurios  $\lambda=509\pm 5$  nm, intensyvumas 29 W/m<sup>2</sup>.

mTHPC-FDP: ląstelės 18 val. inkubuotos su 0,15 µg/ml mTHPC, švitintos 45 sek. šviesa, kurios  $\lambda=660\pm 5$  nm, intensyvumas 16 W/m<sup>2</sup>.

Brūkšniai - ± SN.

Todėl poveikį, kai ląstelės veikiamos Rh123 ir šviesa, toliau vadinsiu ne fotodinaminiu (t. y. priklausančiu nuo deguonies), bet fototoksinu (FTP).

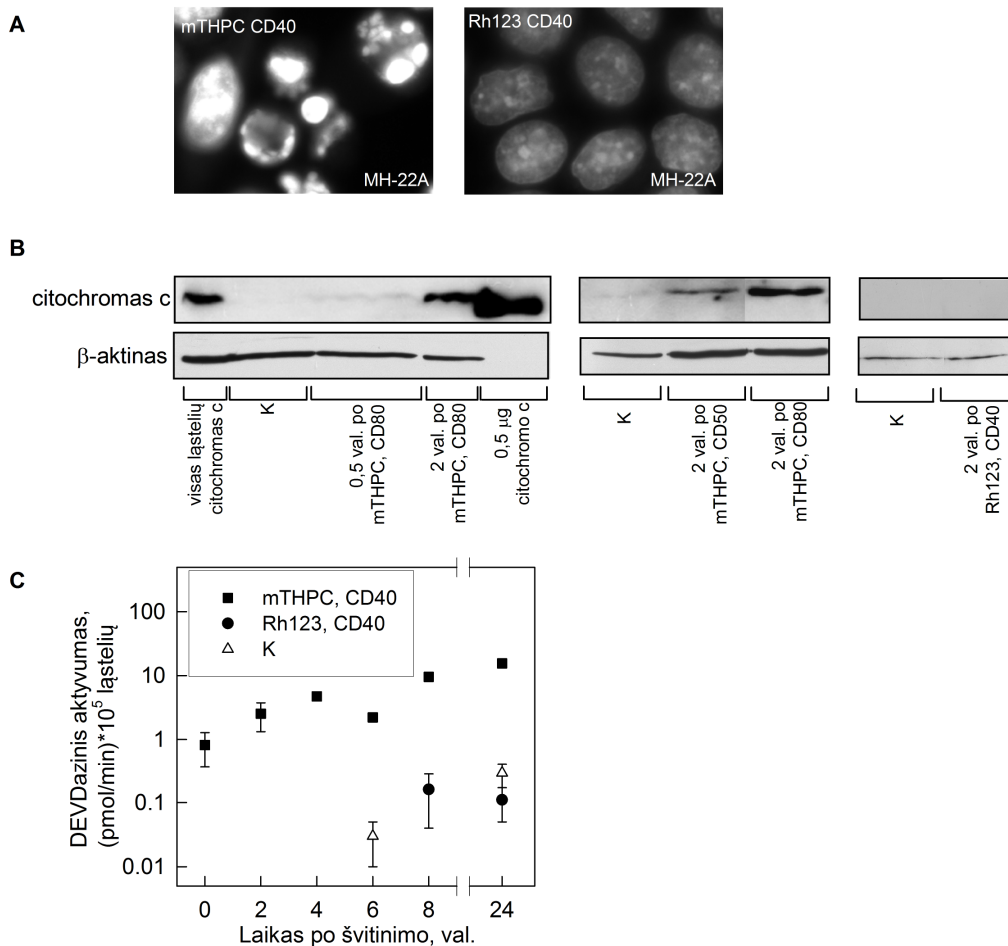
Tolesniems tyrimams naudojome minėtasias Rh123-FTP ir mTHPC-FDP sąlygas, mažinančias gyvybingumą 40% (citotoksinė dozė CD40).

Įdomu tai, jog ląstelėse po Rh123 fototoksinio poveikio stebėjome sutrumpėjusias mitochondrijas, ir tokia mitochondrijų, sukaupusių Rh123, morfologija išliko ir praėjus 24 val. po poveikio (3.2 pav., C). Mitochondrijų skilimas taip pat buvo stebėtas ir po fotofrino sukkelto FDP (Wu et al., 2011). Be to, yra nustatyta, jog mitochondrijų tinklo skilimą taip pat sukelia ROS, susidariusios mitochondrijas veikiant  $H_2O_2$ , kvėpavimo grandinės slopikliais ir skyrikliais (Pletjushkina et al., 2006). Kai kurių autorių nuomone, suirus mitochondrijų tinklui / sutrumpėjus mitochondrijoms, citochromas c pradeda tekėti į citozolį ir aktyvuojamos kaspazės (Youle and Karbowski, 2005), nors kitų autorių duomenimis, citochromo c ištekėjimas ir mitochondrijų skilimas nėra susiję (Sheridan et al., 2008).

Fotosensibilizatoriaus ir šviesos poveikio sukeltas mitochondrijų pažaidas tyrėme matuodami mitochondrijų užpildo fermento – citrato sintazės - aktyvumą. Mūsų poveikio sąlygomis Rh123-FTP reikšmingai ( $P < 0,001$ ) mažino citrato sintazės aktyvumą (3.2 pav., D). Tuo tarpu po mTHPC-FDP citrato sintazės aktyvumas nesiskyrė nuo nešvitintos kontrolės (3.2 pav., E). Galima spėti, jog mTHPC-FDP nemažino citrato sintazės aktyvumo todėl, kad šis fotosensibilizatorius yra sulaikomas mitochondrijų membranose, o ne užpilde. Tuo tarpu, užpilde sukaupto Rh123 FTP sukelia mitochondrijų užpildo fermento pažaidas.

Nustatėme ląstelių žūties tipą po Rh123-FTP ir mTHPC-FDP, mažinančių gyvybingumą 40% (CD40). mTHPC-FDP sukėlė apoptozei būdingus požymius: kondensavosi chromatinas (3.3 pav., A), citochromas c ištekėjo iš mitochondrijų į citozolį (3.3 pav., B) ir padidėjo vykdomosioms kaspazėms būdingas DEVDazinis aktyvumas (3.3 pav., C). Po Rh123-FTP neišryškėjo nė vienas šių apoptozei būdingų požymių, o dažydami AO ir EtBr dažų mišiniu matėme tik pavienes apoptozines ir nekrozines ląsteles, kaip ir

kontrolinėse ląstelėse. Reikia paminėti, jog praėjus 1,5 val. po mTHPC-FDP stebėjome tik ~ 2% nekrozinių ląstelių (stebėjome dažydami AO ir EtBr dažų mišiniu).



**3.3 pav.** Apoptozei būdingi požymiai MH-22A ląstelėse po mTHPC fotodinaminio poveikio.

A – Ląstelių branduolių morfologija. Praėjus 4 val. po Rh123-FDP ir 1,5 val. po mTHPC-FDP, ląstelės inkubuotos su Hoechst 33342. Fluorescencija registruota mikroskopu Olympus AX70.

B – Citochromo c kiekis citozolyje po mTHPC-FDP ir Rh123-FDP. Citozolio ekstraktai paruošti praėjus 0,5 ir 2 val. po mTHPC-FDP bei 2 val. po Rh123-FDP.

C – DEVDazinis aktyvumas po Rh123-FDP ir mTHPC-FDP.

Rh123-FDP: ląstelės 1 val. inkubuotos su 5 μg/ml Rh123, švitintos 60 min. (CD40) šviesa, kurios  $\lambda=509\pm 5$  nm, intensyvumas 29 W/m<sup>2</sup>.

mTHPC-FDP: ląstelės 18 val. inkubuotos su 0,15 μg/ml mTHPC, švitintos 45 sek. (CD40), 1 min. (CD50) arba 3 min. (CD80) šviesa, kurios  $\lambda=660\pm 5$  nm, intensyvumas 16 W/m<sup>2</sup>.

Brūkšniai - ± SN.

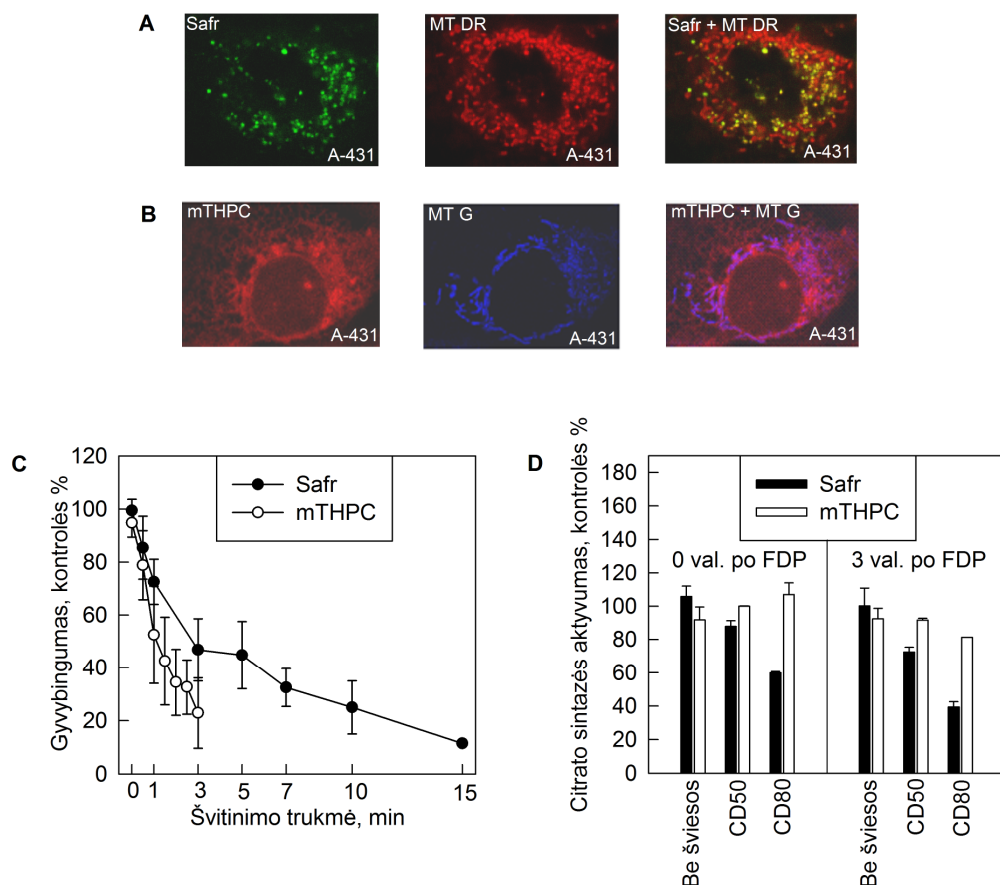
Taigi, nors po Rh123-FTP, kaip ir po mTHPC-FDP praėjus 24 val. po poveikio ląstelių gyvybingumas sumažėjo 40%, po Rh123-FTP nematėme žuvančių ląstelių (apoptozinių ar nekrozinių). Nors yra nustatyta, jog mitochondrijose kaupiami fotosensibilizatoriai veiksmingai sukelia apoptozę (Buytaert et al., 2007), mitochondrijų užpildą pažeidžiantis ir mitochondrijų skilimą sukeliantis Rh123-FTP nesukėlė MH-22A ląstelių žūties.

MH-22A ląstelėse Rh123-FTP pažeidžia mitochondrijų užpildą ir sukelia mitochondrijų skilimą, tačiau šis poveikis nedidina MIMP (citochromas c neišteka iš mitochondrijų) ir nesukelia apoptozės. Dėl šio poveikio gyvybingumas sumažėja, galima manyti dėl to, kad pažeidus mitochondrijas, ląstelės auga lėčiau. Tuo tarpu mTHPC-FDP šiose ląstelėse nepažeidžia mitochondrijų užpildo, tačiau inicijuoja apoptozę.

### **3.1.2 Šviesos ir savitai mitochondrijose sukaupto Safr bei įvairiose ląstelės struktūrose lokalizuoto mTHPC poveikių A-431 ląstelėms palyginimas**

Šioje darbo dalyje tyrėme šviesos ir įvairiose ląstelės organelėse (tarp jų ir mitochondrijose) lokalizuoto mTHPC bei savitai mitochondrijose kaupiamo Safr poveikį žmogaus epidermoidinės karcinomos ląstelėms A-431. Kadangi Rh123 nebuvo veiksmingas fotosensibilizatorius, pasirinkome kitą mitochondrijose kaupiamą delokalizuotą katijoną Safr, kuriam yra būdingas nemažas  $^1\text{O}_2$  sudarymo kvantinis našumas, siekiantis 0,24 (1.1 lent.). Tyrimams pasirinkome žmogaus epidermoidinės karcinomos A-431 ląsteles.

Pirmiausia, įvertinome šių fotosensibilizatorių kaupimąsi A-431 ląstelėse. Safr A-431 ląstelėse kolokalizavosi su mitochondrijų žymeniu MitoTracker Deep Red 633 (3.4 pav., A). Inkubuodami mTHPC kartu su savitu mitochondrijų žymeniu MitoTracker Green nustatėme, jog A-431 ląstelėse dalis mTHPC yra sulaikoma mitochondrijose (3.4 pav., B). mTHPC ir Safr lokalizaciją tyrėme naudodami skirtingus mitochondrijų žymenis, norėdami išvengti fotosensibilizatoriaus ir žymens spektrų persiklojimo.



**3.4 pav.** Safr ir mTHPC lokalizacija ir pokyčiai po jų sukeltų fotodinaminių poveikių A-431 ląstelėse.

A – Safr ir mitochondrijų žymens MitoTracker DeepRed 633 (MT DR) būdinga fluorescencija. Ląstelės 1 val. inkubuotos su 0,7  $\mu\text{g/ml}$  Safr ir 25 nM MT DR. Kolokalizacija – geltona spalva.

B– mTHPC ir mitochondrijų žymens MitoTracker Green (MT G) būdinga fluorescencija. Ląstelės 18 val. inkubuotos su 0,1  $\mu\text{g/ml}$  mTHPC. Likus 45 min. iki inkubacijos su mTHPC pabaigos, pridėta 20 nM MT G. Kolokalizacija – violetinė spalva.

C – Gyvybingumo pokyčiai po Safr-FDP ir mTHPC-FDP. Gyvybingumas vertintas KV metodu, praėjus 24 val. po švitinimo.

D – Safr-FDP ir mTHPC-FDP sukelti citrato sintazės aktyvumo pokyčiai praėjus 0 ir 3 val. po švitinimo. Citrato sintazės aktyvumas išreikštas procentais nuo ląstelių, inkubuotų su Safr ir mTHPC, bet nešvitintų.

Safr-FDP: ląstelės 1 val. inkubuotos su 0,7  $\mu\text{g/ml}$  Safr, nešvitintos (Be šviesos) ir švitintos 3 min. (CD50) arba 10 min. (CD80), jei nenurodyta kitaip, šviesa, kurios  $\lambda=509\pm 5$  nm, intensyvumas 29  $\text{W/m}^2$ .

mTHPC-FDP: ląstelės 18 val. inkubuotos su 0,1  $\mu\text{g/ml}$  mTHPC, nešvitintos (Be šviesos) ir švitintos 1 min. (CD50) arba 3 min. (CD80), jei nenurodyta kitaip, šviesa, kurios  $\lambda=660\pm 5$  nm, intensyvumas 16  $\text{W/m}^2$ .

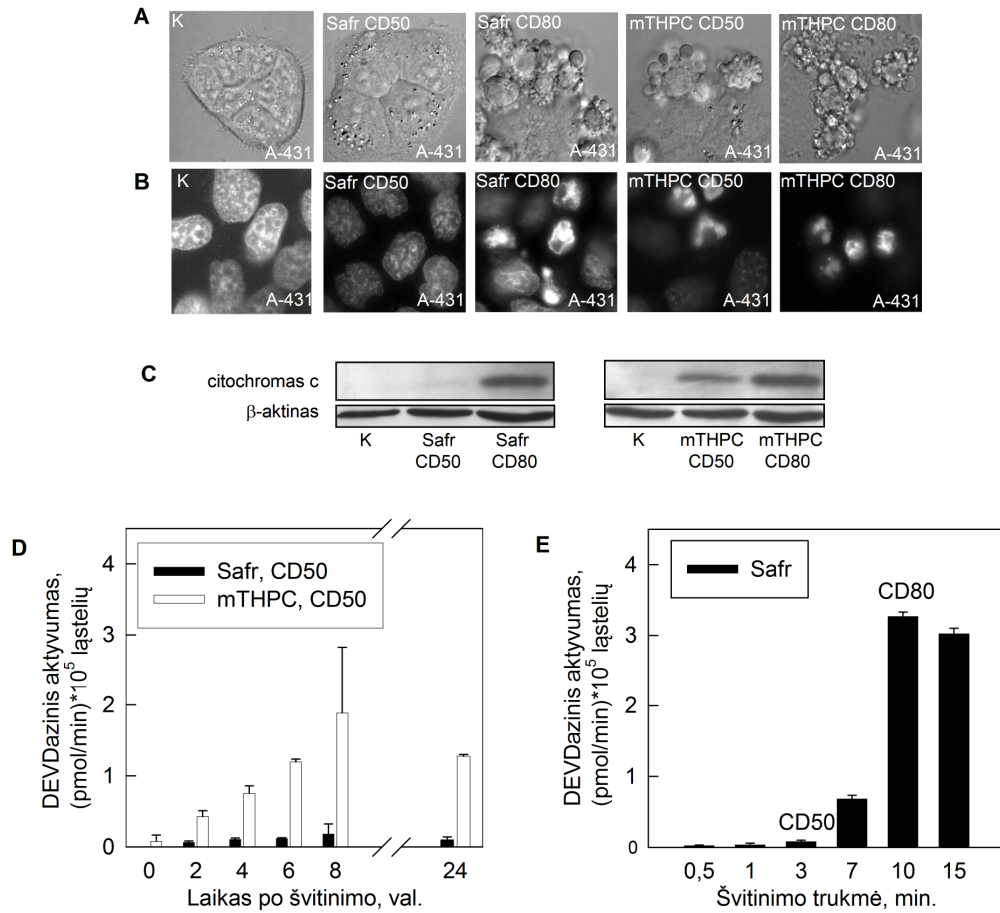
Brūkšniai -  $\pm$  SN.

Tačiau inkubuojant Safr kartu su MitoTracker Deep Red 633, pakito mitochondrijų morfologija – mitochondrijos sutrumpėjo. Tokio reiškinio nestebėjome inkubuodami ląsteles su vienu Safr.

Safr ir mTHPC fotodinaminiai poveikiai veiksmingai mažino A-431 ląstelių gyvybingumą (3.4 pav., C). Tolimesnius eksperimentus atlikome ląsteles veikdami vidutine fotodinaminio poveikio doze, mažinančia gyvybingumą 50% (CD50) ir didele doze, gyvybingumą mažinančia 80% (CD80). Lyginome mitochondrijose sukauptų lipofilinio katijono Safr ir neutralaus amfifilinio chlorino mTHPC poveikį mitochondrijų užpildo fermentui – citrato sintazei (3.4 pav., D). Iš karto po poveikio šio fermento aktyvumas reikšmingai sumažėjo 40% ( $P=0,049$ ) tiktai paveikus didelės dozės (CD80) Safr-FDP. Praėjus 3 val. po švitinimo net ir vidutinė (CD50) Safr-FDP dozė 20% reikšmingai sumažino ( $P=0,012$ ) citrato sintazės aktyvumą, o po stipraus poveikio aktyvumas reikšmingai sumažėjo net 60% ( $P=0.003$ ). Po stipraus (CD80) mTHPC-FDP citrato sintazės aktyvumas taip pat reikšmingai sumažėjo 20% ( $P<0,001$ ).

Po Safr-FDP ir mTHPC-FDP A-431 ląstelės žuvo skirtingai (3.5 pav.). Paveikus ląsteles vidutinio stiprumo doze (CD50), po Safr-FDP nebuvo žuvusių ląstelių, nevyko apoptozei būdingi ląstelių morfologijos (ląstelės susitraukimas, plazminės membranos pūslėjimasis) ir chromatino pokyčiai (kondensacija, fragmentacija) (3.5 pav., A ir B), iš mitochondrijų neištekėjo citochromas c (3.5 pav., C), nebuvo padidėjęs kaspazei 3 būdingas DEVDazinis aktyvumas (3.5 pav., D ir E). Po šio poveikio aptikome tik kelias nekrozines ląsteles (stebėta dažant AO ir EtBr mišiniu), o jų kiekis neviršijo nekrozinių ląstelių kiekio kontrolinėse ląstelėse. Tuo tarpu didelė Safr-FDP dozė (CD80) sukėlė apoptozę – vyko apoptozei būdingi ląstelių morfologijos ir chromatino pokyčiai, iš mitochondrijų ištekėjo citochromas c, buvo aktyvuota kaspazė 3. Šis poveikis taip pat nesukėlė intensyvios nekrozės - dažydami AO ir EtBr mišiniu stebėjome tik ~2% nekrozės, tai neviršijo jų kiekio kontrolinėse ląstelėse. Tuo tarpu ir vidutinis (CD50), ir stiprus mTHPC fotodinaminis

(CD80) poveikis sukėlė ląstelių žūtį – stebėjome apoptozei būdingus pokyčius (3.5 pav.).



**3.5 pav.** Apoptozei būdingi požymiai A-431 ląstelėse po Safr ir mTHPC sukeltų fotodinaminių poveikių.

A – Ląstelių nuotraukos praėjus 4 val. po Safr-FDP ir 1,5 val. po mTHPC-FDP, gautos naudojant Nomarski (DIC) mikroskopijos metodą.

B – Ląstelių branduolių nuotraukos. Ląstelės inkubuotos su Hoechst 33342, praėjus 4 val. po Safr-FDP ir mTHPC-FDP (CD50), bei 1,5 val. po mTHPC-FDP (CD80).

C – Citochromo c kiekis citozolyje. Citozolio ekstraktai paruošti praėjus 3 val. po FDP.

D – DEVDazinis aktyvumas po Safr-FDP ir mTHPC-FDP.

E – DEVDazinis aktyvumas po Safr-FDP, praėjus 3 val. po švitinimo.

Safr-FDP: ląstelės 1 val. inkubuotos su 0,7  $\mu\text{g/ml}$  Safr ir švitintos 3 min. (CD50) arba 10 min. (CD80) šviesa, kurios  $\lambda=509\pm 5$  nm, intensyvumas 29  $\text{W/m}^2$ .

mTHPC-FDP: ląstelės 18 val. inkubuotos su 0,1  $\mu\text{g/ml}$  mTHPC ir švitintos 1 min. (CD50) arba 3 min. (CD80) šviesa, kurios  $\lambda=660\pm 5$  nm, intensyvumas 16  $\text{W/m}^2$ .

Brūkšniai -  $\pm$  SN.



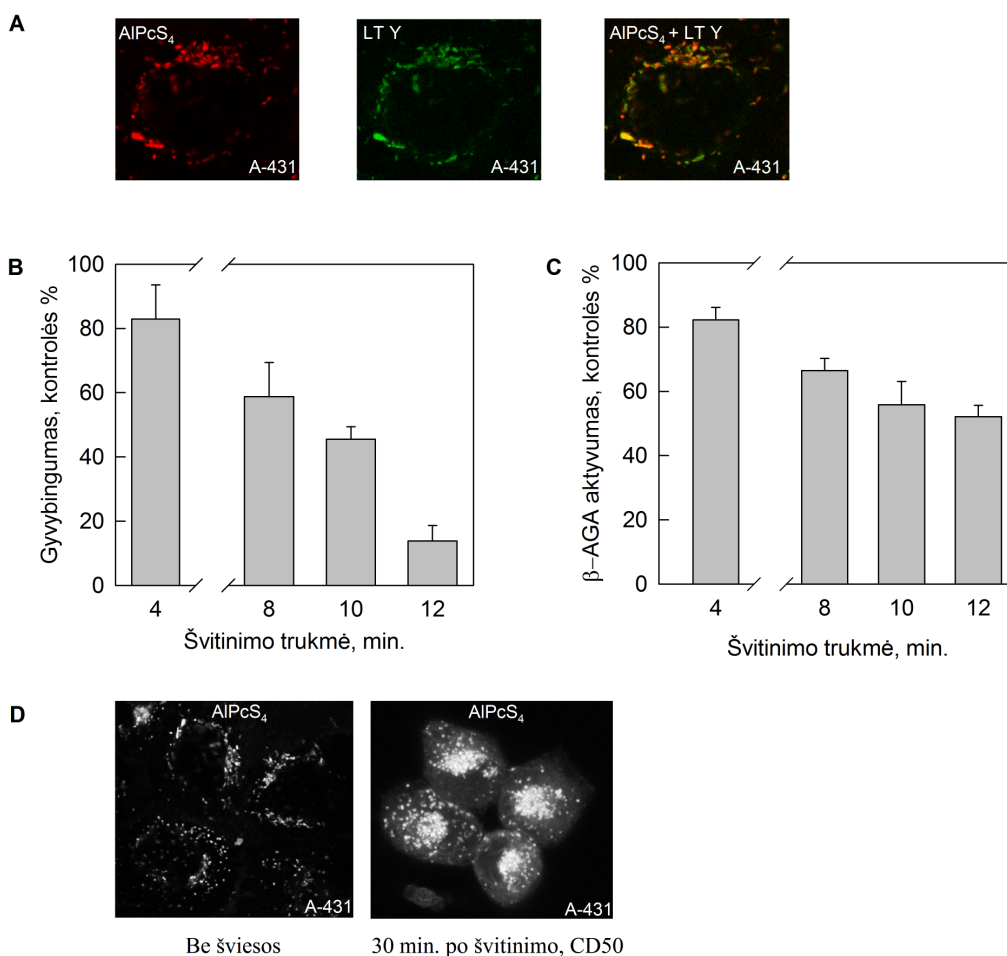
Ivairiose organelėse lokalizuoto mTHPC fotodinaminis poveikis sukėlė A-431 ląstelių apoptozę. Tuo tarpu savitai mitochondrijose sukaupto Safr fotodinaminis poveikis sukėlė apoptozę tik veikiant stipria citotoksine doze (CD80), o vidutinė dozė (CD50) neinicavo ląstelių žūtis.

### **3.1.3 Lizosomose sukaupto ALPcS<sub>4</sub> fotodinaminis poveikis A-431 ląstelėms**

Ilgą laiką buvo manoma, jog mitochondrijose ir ET sukaupti fotosensibilizatoriai sukelia apoptozę, tuo tarpu plazminėje membranoje ir lizosomose lokalizuoti fotosensibilizatoriai blokuoja apoptozės indukciją ir ląstelės žūva nekrozės keliu (apžvelgta (Oleinick et al., 2002), (Buytaert et al., 2007)). Todėl tyrėme kokį poveikį A-431 ląstelėms turi savitai lizosomose kaupiamo fotosensibilizatoriaus sukeltas FDP. Šioje darbo dalyje tyrėme į lizomas patenkančio ALPcS<sub>4</sub> poveikį žmogaus epidermoidinės karcinomos ląstelėms A-431. Veikiamas šviesa šis fotosensibilizatorius generuoja <sup>1</sup>O<sub>2</sub> dideliu kvantiniu našumu (1.1 lent.).

Reikia pabrėžti, kad ALPcS<sub>4</sub> lokalizacija A-431 ląstelėse sutapo su lizosomų žymens LysoTracker Yellow-HCK-123 lokalizacija (3.6 pav., A).

ALPcS<sub>4</sub> veiksmingai mažino A-431 ląstelių gyvybingumą (3.6 pav., B). Lizosomų savito fermento β-N-acetilgliukozaminidazės aktyvumas buvo matuotas iš karto po ALPcS<sub>4</sub>-FDP poveikio, todėl jis atspindi pirmines FDP sukeltas pažeidas. Nustatėme, kad vidutinio stiprumo ALPcS<sub>4</sub>-FDP dozė (CD40) iš karto po švitinimo β-N-acetilgliukozaminidazės aktyvumą reikšmingai (P<0.001) sumažino 30%, o paveikus didele doze (CD90), šio fermento aktyvumas reikšmingai sumažėjo (P<0.001) beveik per pusę (3.6 pav., C). Įdomu, jog pašvitinus ląsteles, inkubuotas su ALPcS<sub>4</sub>, pakito lizosomų su ALPcS<sub>4</sub> lokalizacija ląstelėse – jos susikaupė ląstelės centre, greta branduolio, pastebėta ir neryški fotosensibilizatoriui būdinga fluorescencija citozolyje (3.6 pav., D).



**3.6 pav.** AIPcS<sub>4</sub> lokalizacija A-431 ląstelėse ir pokyčiai jose po AIPcS<sub>4</sub> sukulto fotodinaminio poveikio.

A – AIPcS<sub>4</sub> ir lizosomų žymens LysoTracker Yellow-HCK-123 (LT Y) būdinga fluorescencija. Ląstelės 18 val. inkubuotos su 20 μg/ml AIPcS<sub>4</sub> ir 1 val. su 75 nm LT Y. Kolokalizacija – geltona spalva.

B – Ląstelių gyvybingumas. Vertintas MTT metodu po AIPcS<sub>4</sub>-FDP praėjus 24 val. po švitinimo.

C – N-acetil-β-gliukozaminidazės (β-AGA) aktyvumas paveikus AIPcS<sub>4</sub>-FDP, iš karto po švitinimo.

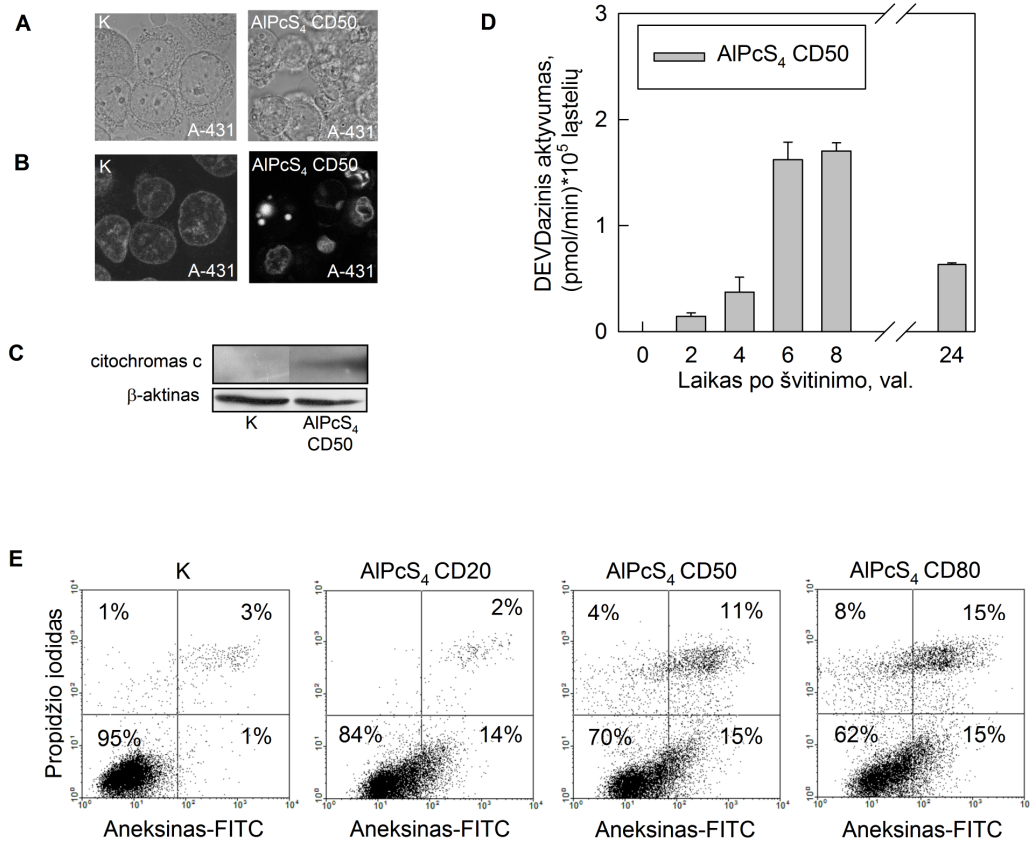
D – AIPcS<sub>4</sub> pasiskirstymas ląstelėse prieš ir po švitinimo.

AIPcS<sub>4</sub>-FDP: ląstelės 18 val. inkubuotos su 20 μg/ml AIPcS<sub>4</sub> ir atitinkamą laiką švitintos šviesa, kurios  $\lambda=660\pm 5$  nm, intensyvumas 16 W/m<sup>2</sup>.

Brūkšniai - ± SN.

Lizosomose sukauptas AIPcS<sub>4</sub> veiksmingai sukėlė A-431 ląstelių apoptozę - vyko apoptozei būdingi ląstelių morfologijos (ląstelės susitraukė) (3.7 pav., A), chromatinio pokyčiai (kondensavosi ir fragmentavosi) (3.7 pav.,

B), iš mitochondrijų ištekėjo citochromas c (3.7 pav., C) ir padidėjo kaspazei 3 būdingas DEVDazinis aktyvumas (3.7 pav., D).



**3.7 pav.** Apoptozei būdingi požymiai A-431 ląstelėse po AIPcS<sub>4</sub> sukulto fotodinaminio poveikio.

A – Ląstelių nuotraukos praėjus 3 val. po AIPcS<sub>4</sub>-FDP (CD50), gautos naudojant Nomarski (DIC) mikroskopijos metodą.

B – Ląstelių branduolių nuotraukos. Praėjus 3 val. po AIPcS<sub>4</sub>-FDP (CD50) ląstelės inkubuotos su Hoechst 33342.

C – Citochromo c kiekis citozolyje. Citozolio ekstraktai paruošti praėjus 3 val. po AIPcS<sub>4</sub>-FDP (CD50).

D – DEVDazinis aktyvumas po AIPcS<sub>4</sub>-FDP (CD50).

E – praėjus 2 val. po AIPcS<sub>4</sub>-FDP, ląstelės dažytos aneksino-FITC ir PI mišiniu bei analizuotos tėkmės citometru. Kairiajame viršutiniame kvadrante nekrozinės ląstelės, dešiniajame viršutiniame apoptozinės ląstelės su pažeista plazmine membrana, kairiajame apatiniame gyvos ląstelės, dešiniajame apatiniame apoptozinės ląstelės su nepažeista plazmine membrana. Kartota 3 kartus, pateikta reprezentacinė diagrama.

AIPcS<sub>4</sub>-FDP: ląstelės 18 val. inkubuotos su 20 μg/ml AIPcS<sub>4</sub> ir švitintos 4 min. (CD20), 9 min. (CD50) ir 12 min. (CD80) šviesa, kurios λ=660±5 nm, intensyvumas 16 W/m<sup>2</sup>.

Brūkšniai - ± SN.

Nudažę ląsteles Aneksino-FITC ir PI mišiniu ir išanalizavę ląsteles tėkmės citometru nustatėme, kad po silpnos, vidutinės ir stiprios AlPcS<sub>4</sub>-FDP dozių kilo apoptozė, nekrozinės ląsteles stebėjome po vidutinės ir stiprios dozių (3.7 pav., E).

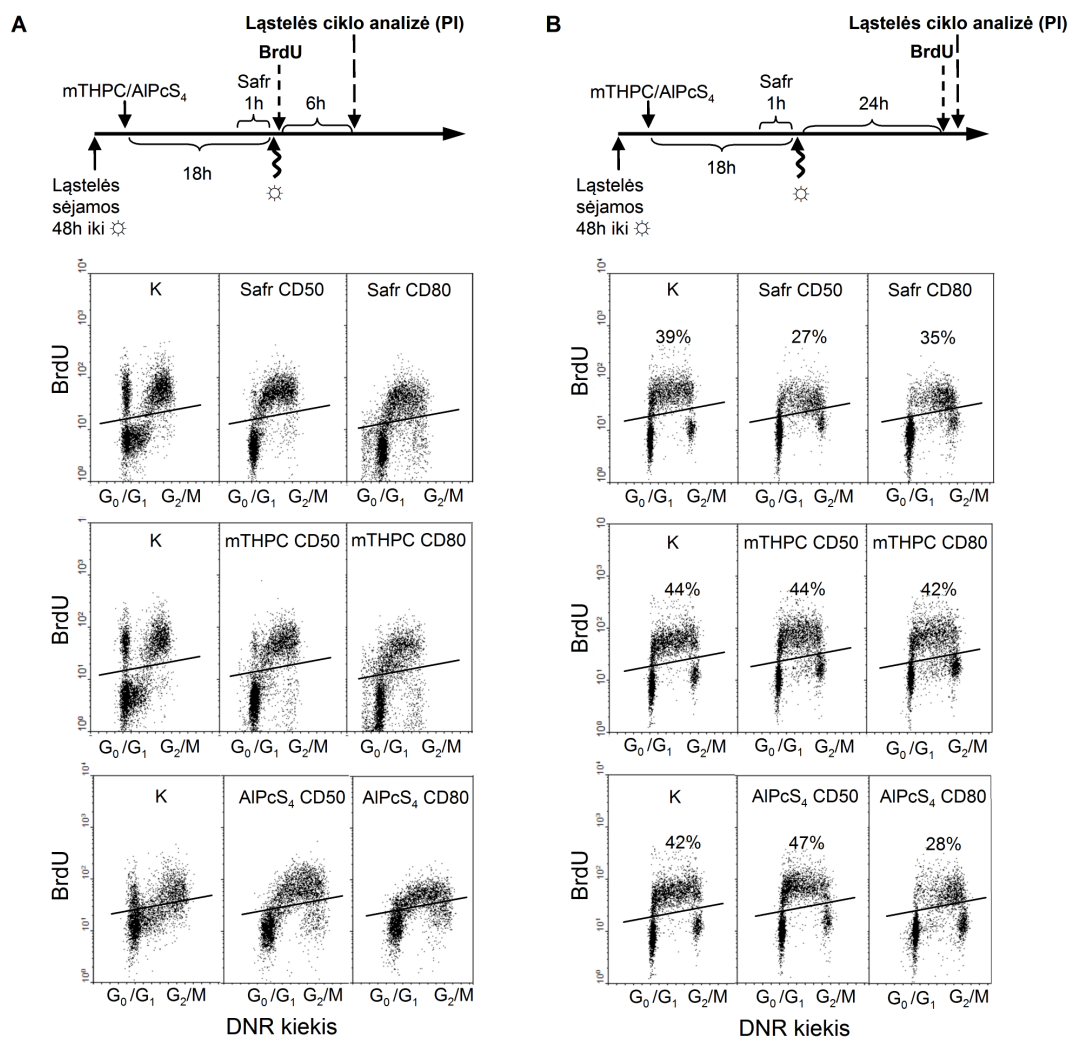
Nors ilgą laiką mitochondrijose ir ET sukaupti fotosensibilizatoriai buvo laikomi veiksmingiausiais apoptozę inicijuojančiais fotosensibilizatoriais, neseniai paskelbti įdomūs rezultatai, kad lizosomose lokalizuotas silicio ftalocianino darinys Pc181 pasirodė veiksmingesnis už mitochondrijose ir ET lokalizuotą tos pačios cheminės prigimties fotosensibilizatorių Pc4, o ląstelės veiktos Pc181-FDP daugiausia žuvo apoptozės keliu (Quiogue et al., 2009). Taigi ir FDP, sukeltas naudojant lizosomose sukauptus fotosensibilizatorius, gali veiksmingai inicijuoti apoptozę.

Mūsų gauti rezultatai rodo, kad lizosomose sukaupto AlPcS<sub>4</sub> fotodinaminis poveikis sukėlė A-431 ląstelių apoptozę ir nekrozę.

### **3.2 A-431 ląstelių ciklo pokyčiai po fotodinaminio poveikio**

Kadangi vidutinio stiprumo (CD50) Safr-FDP sumažino ląstelių gyvybingumą, tačiau nesukėlė ląstelių žūties, spėjome, kad šis FDP sutrikdė ląstelės ciklą. Ląstelės ciklą tyrėme S fazės ląsteles žymėdami BrdU, o DNR kiekį ląstelėje nustatėme dažydami propidžio jodidu. Atlikome dviejų tipų eksperimentus, kurie skyrėsi inkubacijos po švitinimo trukme iki žymėjimo BrdU.

Pirmo tipo eksperimentuose S fazės ląsteles žymėjome, BrdU pridėdami į terpę iš karto po švitinimo ir, praėjus 6 val. po švitinimo, tyrėme kaip jos pasiskirsto skirtingose ląstelės ciklo fazėse (3.8 pav., A). Nustatėme, jog visi mūsų tirti FDP (Safr-FDP, mTHPC-FDP ir AlPcS<sub>4</sub>-FDP) sutrikdė ląstelės ciklą – praėjus 6 val. po FDP, kontrolinėse ląstelėse dauguma BrdU žymėtų ląstelių buvo G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> ir G<sub>2</sub>/M fazėse, tuo tarpu po visų fotodinaminių poveikių didžioji dalis BrdU žymėtų ląstelių taip ir liko S fazėje.



### 3.8 pav. A-431 ląstelių ciklo pokyčiai po Safr, mTHPC ir AIPcS<sub>4</sub> sukeltų fotodinaminių poveikių.

A – Eksperimento schema ir ląstelės ciklo analizė, ląstelės inkubuojant su BrdU iš karto po švitinimo ir 6 val. iki ląstelės ciklo analizės. Po švitinimo, ląstelės 0,5 val. inkubuotos su BrdU, o praėjus 6 val. ląstelės surinktos ir žymėtos anti-BrdU antikūnais ir dažytos PI.

B – Eksperimento schema ir ląstelės ciklo analizė, ląstelės ciklo analizę atlikus 24 val. po švitinimo ir inkubuojant su BrdU prieš pat ląstelių surinkimą. Po švitinimo praėjus 24 val., ląstelės inkubuotos 0,5 val. su BrdU ir žymėtos anti-BrdU antikūnais ir dažytos PI.

Safr-FDP: ląstelės 1 val. inkubuotos su 0,7  $\mu\text{g/ml}$  Safr ir švitintos 3 min. (CD50) arba 10 min. (CD80) šviesa, kurios  $\lambda=509\pm 5$  nm, intensyvumas 29  $\text{W/m}^2$ .

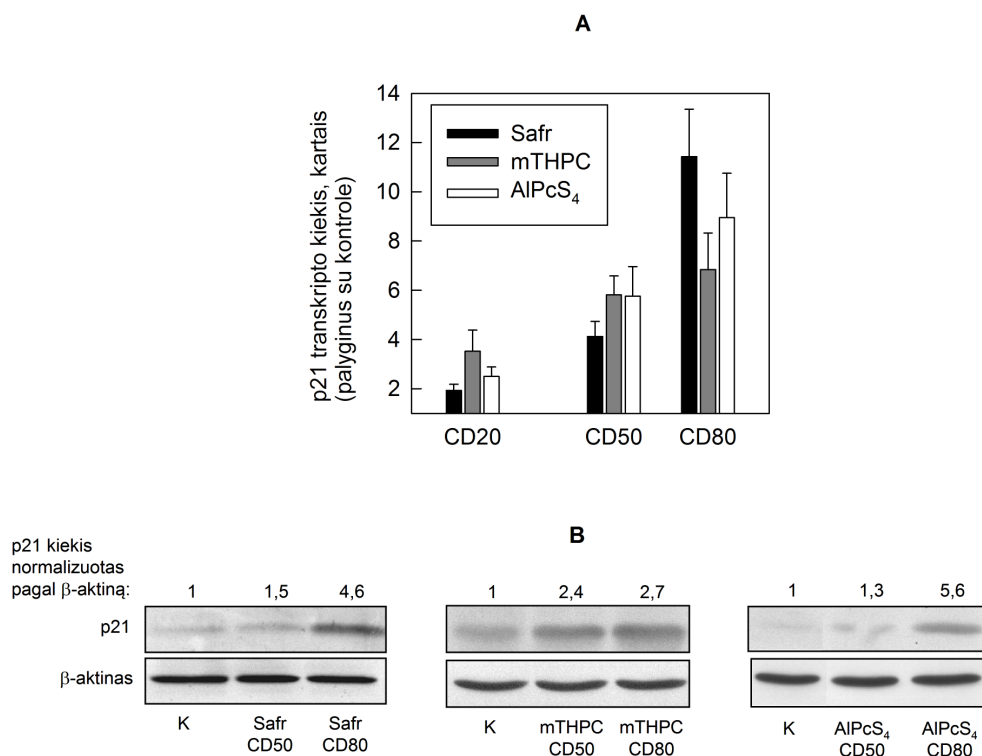
mTHPC-FDP: ląstelės 18 val. inkubuotos su 0,1  $\mu\text{g/ml}$  mTHPC ir švitintos 1 min. (CD50) arba 3 min. (CD80) šviesa, kurios  $\lambda=660\pm 5$  nm, intensyvumas 16  $\text{W/m}^2$ .

AIPcS<sub>4</sub>-FDP: ląstelės 18 val. inkubuotos su 20  $\mu\text{g/ml}$  AIPcS<sub>4</sub> ir švitintos 9 min. (CD50) arba 12 min. (CD80) šviesa, kurios  $\lambda=660\pm 5$  nm, intensyvumas 16  $\text{W/m}^2$ .

Procentais nurodyta ląstelių dalis, kuriose buvo įsiterpęs BrdU (žymėjimo metu S fazėje buvusios ląstelės), dalis. Eksperimentai kartoti mažiausiai 2 kartus. Pateikta reprezentacinė diagrama.

Antrojo tipo eksperimentuose S fazės ląsteles žymėjome, BrdU į terpę pridėdami praėjus 24 val. po švitinimo, ir iš karto atlikome ląstelės ciklo analizę – taip nustatėme kiek yra S fazės ląstelių praėjus 24 val. po FDP (3.8 pav., B). Pokyčius, lyginant su kontrole, aptikome tik po Safr-FDP ir AlPcS<sub>4</sub>-FDP. Po mTHPC-FDP praėjus 24 val. nė viena iš tirtų dozių nesumažino S fazėje esančių ląstelių dalies – po poveikio išlikusių ląstelių ciklas nesiskyrė nuo kontrolinių ląstelių. Įdomu, jog paveikus vidutine Safr-FDP doze (CD50), tuomet kai gyvybingumas sumažėja, o žuvusių ląstelių nestebėjome, sumažėja S fazėje esančių ląstelių santykinis kiekis: kontrolinėse ląstelėse jis siekia 39%, o po Safr-FDP CD50 – 27%. Vidutiniškai po Safr-FDP, lyginant su kontrole, S fazės ląstelių buvo  $10 \pm 2\%$  mažiau, tačiau  $11,5 \pm 2\%$  padaugėjo G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fazės ląstelių. Taigi, ląstelės po vidutinės Safr-FDP dozės buvo sulaikytos G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fazėje. Mažesnis S fazėje esančių ląstelių santykinis kiekis po vidutinio stiprumo Safr-FDP atspindi sutrikusį ląstelės ciklą, dėl kurio sumažėjo ląstelių gyvybingumas. Taigi, po vidutinės Safr-FDP dozės ląstelių kiekis sumažėja dėl to, kad sutrinka ląstelių ciklas – sulėtėja jų dalijimasis. Mažesnę S fazėje esančių ląstelių santykinį kiekį nustatėme ir po AlPcS<sub>4</sub>-FDP CD80. Tačiau šis poveikis taip pat sukelia intensyvią ląstelių žūtį. Tad, pastaruoju atveju mažesnė S fazės ląstelių dalis nėra vienintelė gyvybingumo sumažėjimo priežastis. Lyginant trijų tirtų fotosensibilizatorių poveikį, matyti, kad ląstelės atsakas į mTHPC-FDP realizuojamas greitai ir po 24 val. išgyvenusių ląstelių ciklas nesiskiria nuo neveiktų ląstelių ciklo. Tuo tarpu mitochondrijų arba lizosomų vidų pažeidžiantys FDP sukelia lėtesnį atsaką ir po 24 val. ląstelių ciklas tebėra sutrikęs.

Vienas iš ląstelės ciklą valdančių baltymų yra p21 – tai nuo ciklinų priklausomų kinazių slopiklis 1A. Po visų tirtų FDP: Safr-FDP, mTHPC-FDP ir AlPcS<sub>4</sub>-FDP, šio baltymo raiška padidėjo tiek RNR, tiek baltymo lygiu (3.9 pav.). Didėjant FDP dozei, didėjo ir p21 raiška RNR lygiu (3.9 pav., A). p21 baltymo raiška po FDP taip pat išliko padidėjusi (3.9 pav., B).



**3.9 pav.** P21 raiška A-431 ląstelėse po Safr, mTHPC ir AIPcS<sub>4</sub> sukeltų fotodinaminių poveikių.

A – p21 transkriptų kiekis po Safr-FDP, mTHPC-FDP ir AIPcS<sub>4</sub>-FDP, praėjus 4 val. po švitinimo. Nustatyta kiekybinės PGR metodu.

B – p21 baltymo kiekis ląstelių ekstraktuose praėjus 24 val. po Safr-FDP ir mTHPC-FDP, bei 4 val. po AIPcS<sub>4</sub>-FDP. Western blot'o analizė - p21 kiekis normalizuotas pagal β-aktiną, baltymų kiekiai nustatyti densitometriškai.

Safr-FDP: ląstelės 1 val. inkubuotos su 0,7 μg/ml Safr ir švitintos 1 min. (CD20), 3 min. (CD50) arba 10 min. (CD70) šviesa, kurios λ=509±5 nm, intensyvumas 29 W/m<sup>2</sup>.

mTHPC-FDP: ląstelės 18 val. inkubuotos su 0,1 μg/ml mTHPC ir švitintos 0,5 min. (CD20), 1 min. (CD50) arba 3 min. (CD80) šviesa, kurios λ=660±5 nm, intensyvumas 16 W/m<sup>2</sup>.

AIPcS<sub>4</sub>-FDP: ląstelės 18 val. inkubuotos su 20 μg/ml AIPcS<sub>4</sub> ir švitintos 4 min. (CD20), 9 min. (CD50) arba 12 min. (CD80) šviesa, kurios λ=660±5 nm, intensyvumas 16 W/m<sup>2</sup>.

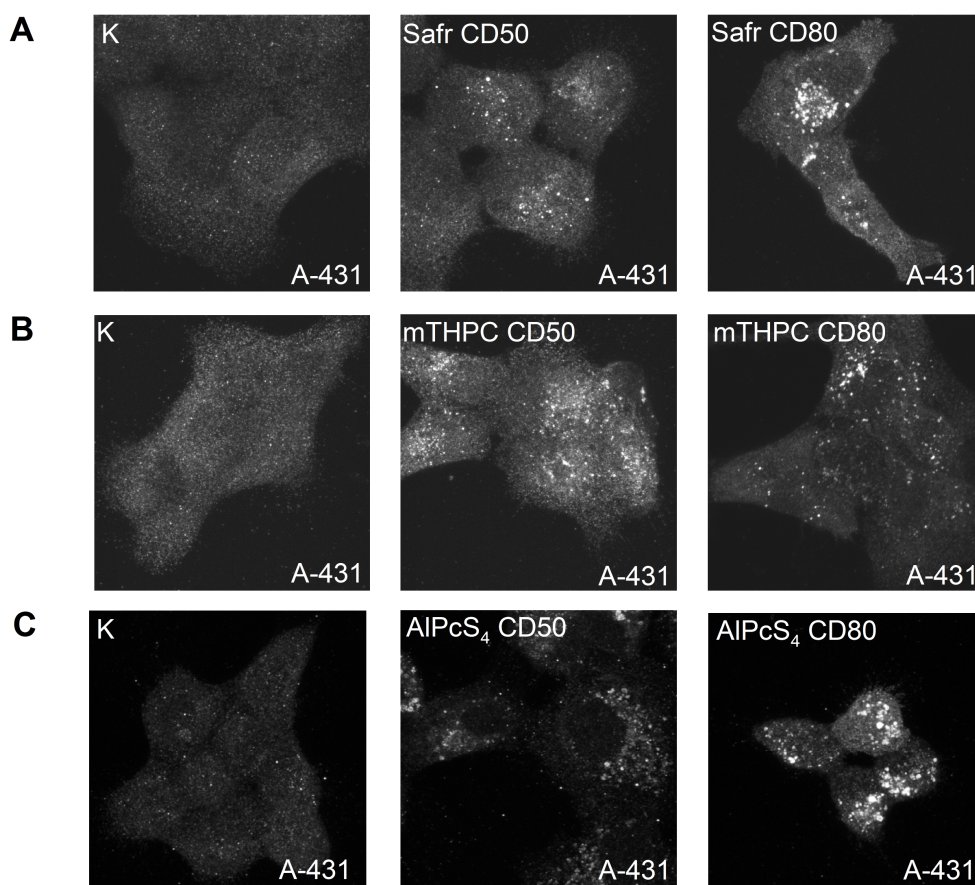
Brūkšniai - ± SN.

Taigi, remiantis šiame darbe gautais rezultatais, Safr-FDP, mTHPC-FDP ir AIPcS<sub>4</sub>-FDP sutrikdo A-431 ląstelių ciklą. Vidutinio stiprumo Safr-FDP nesukelia ląstelių žūties, o gyvybingumas sumažėja dėl ląstelių augimo

arešto – mažiau ląstelių įveikia G<sub>1</sub>-S fazių barjerą ir sumažėja S fazėje esančių ląstelių dalis.

### 3.3 Fotodinaminio poveikio sukelta autofagija A-431 ląstelėse

Kadangi autofagija gali būti tiek ląstelių išgyvenimą skatinantis mechanizmas, tiek ir ląstelių žūties kelias, tyrėme kokią reikšmę FDP indukuotai autofagijai turi fotosensibilizatoriaus lokalizacija ląstelėje.



**3.10 pav.** LC3 baltymo lokalizacija A-431 ląstelėse po Safr, mTHPC ir AlPcS<sub>4</sub> sukeltų fotodinaminių poveikių.

Imunofluorescencinė analizė atlikta praėjus 24 val. po FDP.

A - Safr-FDP: ląstelės 1 val. inkubuotos su 0,7 μg/ml Safr ir švitintos 3 min. (CD50) arba 10 min. (CD80) šviesa, kurios  $\lambda=509\pm 5$  nm, intensyvumas 29 W/m<sup>2</sup>.

B - mTHPC-FDP: ląstelės 18 val. inkubuotos su 0,1 μg/ml mTHPC ir švitintos 1 min. (CD50) arba 3 min. (CD80) šviesa, kurios  $\lambda=660\pm 5$  nm, intensyvumas 16 W/m<sup>2</sup>.

C - AlPcS<sub>4</sub>-FDP: ląstelės 18 val. inkubuotos su 20 μg/ml AlPcS<sub>4</sub> ir švitintos 9 min. (CD50) arba 12 min. (CD80) šviesa, kurios  $\lambda=660\pm 5$  nm, intensyvumas 16 W/m<sup>2</sup>.



Autofagijos indukciją po FDP nustatėme pagal autofagijos metu modifikuojamą LC3 baltymą (žiūr. 1.2.2 sk.). LC3 baltymo modifikacija yra būtina, kad susidarytų autofagosomos (Klionsky et al., 2008). Citozolinei baltymo formai, vadinamajai LC3 I, prisijungus prie fosfatidiletanolamino susidaro LC3 II baltymo forma. LC3 II baltymo kiekis koreliuoja su autofagosomų kiekiu ląstelėse (Kabeya et al., 2000).

Imunofluorescencinės mikroskopijos metodu nustatėme LC3 baltymo pasiskirstymą ląstelėse. Mūsų naudotas antikūnas prieš LC3 atpažino ir citozolinę LC3 I, ir su fosfatidiletanolaminu konjuguotą LC3 II baltymo formą. Kontrolinėse ląstelėse nestipri LC3 baltymo fluorescencija buvo tolygiai (difuziškai) pasiskirsčiusi visoje citoplazmoje (3.10 pav.). Po Safr, mTHPC ir ALPcS<sub>4</sub> sukeltų FDP, ląstelėse matyti ryškiai fluorescuojančių LC3 baltymo sankauptų, greičiausiai atsirandančių dėl to, kad baltymo LC3 II forma kaupiama autofagosomose.

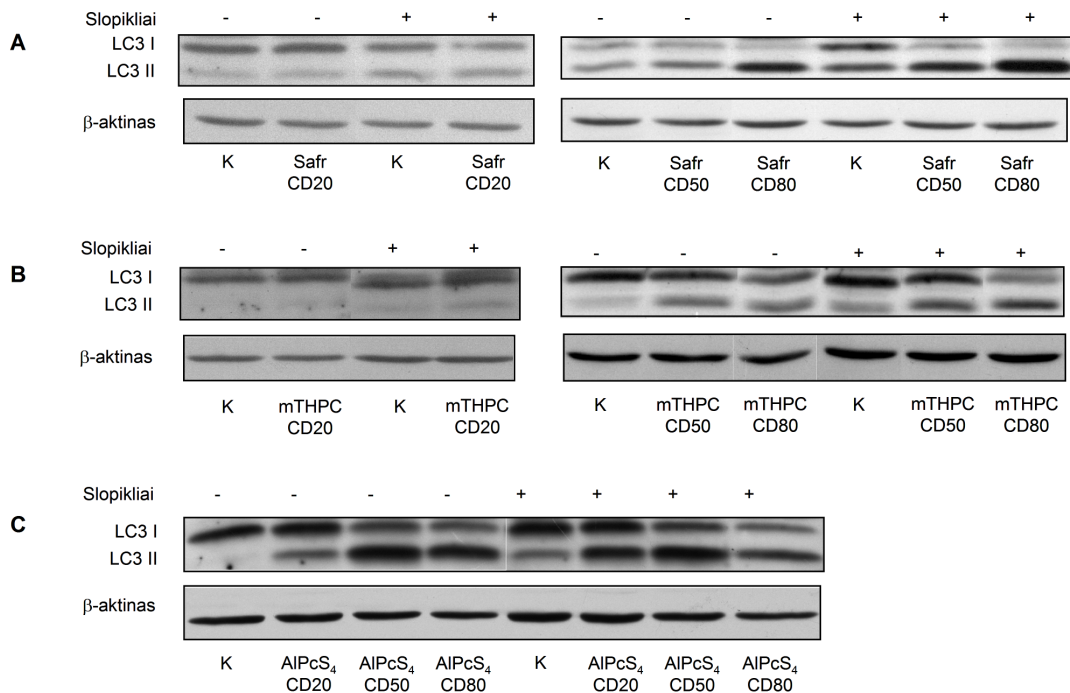
Autofagosomos gali kauptis ląstelėse suintensyvėjus autofagijai, arba priešingai – jai sulėtėjus, kai sutrinka autofagosomų sąlyjeja su lizosomomis ar autofagosomos skaidymas. Todėl, norint įvertinti patį autofagijos vyksmą, reikia atlikti papildomus tyrimus.

Kadangi ir pats LC3 II baltymas yra suskaidomas autofagijos metu, lizosomų peptidazių slopikliai (E64d ir pepstatinas A) yra naudojami nuslopinti LC3 II skaidymą (Mizushima and Yoshimori, 2007). Naudojant slopiklius ir lyginant LC3 II baltymo kiekį ląstelėse, inkubuotose su slopikliais ir be slopiklių galima įvertinti autofagijos intensyvumą arba srautą, kuris yra proporcingas LC3 II baltymo degradacijai. LC3 I ir LC3 II baltymo formų kiekį vertinome atlikę Western blot analizę.

Visi tirti fotodinaminiai poveikiai - Safr-FDP, mTHPC-FDP ir ALPcS<sub>4</sub>-FDP - padidino autofagosomų kiekį ląstelėse: lyginant su neveiktomis ląstelėmis, ląstelėse po FDP padaugėjo LC3 II baltymo (3.11 pav.). Skyrėsi tikrai autofagijos srautas, kurį nustatėme lygindami LC3 II baltymo kiekį po tam tikro poveikio be slopiklių su LC3 II baltymo juostele iš ląstelių su slopikliais. Ląstelėse su peptidazių slopikliais, po Safr ir mTHPC vidutinio

(CD50) ir stipraus (CD80) FDP, padaugėjo LC3 II baltymo (palyginus ląsteles su slopikliais ir be jų) (3.11 pav., A ir B). Tai rodo, jog dėl šių poveikių ne tik padaugėjo autofagosomų, bet vyko ir galutinės autofagijos stadijos – autofagosomos susiliejo su lizosomomis ir jose buvo skaidomos.

Lizosomas pažeidžiantis AlPcS<sub>4</sub>-FDP skatino autofagosomų susidarymą. Tačiau pats autofagijos procesas (šiuo atveju, baltymų skaidymas) vyko tik paveikus silpna doze (CD20): ląstelėse su peptidazių slopikliais LC3



**3.11 pav.** LC3-I ir LC3-II baltymų analizė A-431 ląstelėse po Safr, mTHPC ir AlPcS<sub>4</sub> sukeltų fotodinaminių poveikių.

Ląstelių ekstraktai surinkti praėjus 24 val. po FDP ir atlikta Western blot analizė. Lizosomų proteazių slopikliai E64d (10 µg/ml) ir pepstatinas A (10 µg/ml) buvo pridėti į ląstelių augimo terpę iš karto po švitinimo.

A - Safr-FDP: ląstelės 1 val. inkubuotos su 0,7 µg/ml Safr ir švitintos 1 min. (CD20), 3 min. (CD50) arba 10 min. (CD80) šviesa, kurios  $\lambda=509\pm5$  nm, intensyvumas 29 W/m<sup>2</sup>.

B - mTHPC-FDP: ląstelės 18 val. inkubuotos su 0,1 µg/ml mTHPC ir švitintos 20 sek. (CD20), 1 min. (CD50) arba 3 min. (CD80) šviesa, kurios  $\lambda=660\pm5$  nm, intensyvumas 16 W/m<sup>2</sup>.

C - AlPcS<sub>4</sub>-FDP: ląstelės 18 val. inkubuotos su 20 µg/ml AlPcS<sub>4</sub> ir švitintos 4 min. (CD20), 9 min. (CD50) arba 12 min. (CD80) šviesa, kurios  $\lambda=660\pm5$  nm, intensyvumas 16 W/m<sup>2</sup>.

Eksperimentai kartoti mažiausiai 2 kartus. Pateikta reprezentacinė nuotrauka.

II baltymo buvo daugiau nei ląstelėse be slopiklių (3.11 pav., C). Ląstelėse su slopikliais po vidutinio (CD50) ir stipraus (CD80) ALPcS<sub>4</sub>-FDP nepadaugėjo LC3 II baltymo, palyginus su ląstelėmis be slopiklių. Tai rodo, jog vidutinis ir stiprus ALPcS<sub>4</sub> fotodinaminis poveikis, pažeidžia autofagijos vyksmams: sąlyėjai su lizosomomis ar baltymų degradacijai, svarbias molekules.

Nors yra paskelbti duomenys, jog po lizosomose sukaupto fotosensibilizatoriaus NPe6 sukulto FDP pelės hepatomos ląstelėse 1c1c7 padaugėja autofagosomų (Reiners et al., 2010), tačiau nebuvo nustatyta ar po šio poveikio vyko pats autofagijos procesas. Be to, šiame darbe pirmą kartą parodėme, jog autofagiją inicijuoja savitai mitochondrijų viduje kaupiamo Safr ir klinikoje naudojamo įvairiose organelėse lokalizuoto mTHPC sukeltas FDP.

Įdomu, jog autofagija yra svarbi MHC II molekulėms eksponuojant citozolinių baltymų antigenus ląstelių paviršiuje (van der Bruggen and Van den Eynde, 2006). Taip ląstelės po FDP sukelia priešvėžinį imuninį atsaką ir gali būti naudojamos kaip vakcina prieš vėžį (Gollnick et al., 2002).

Vidutinis ir stiprus FDP, sukeltas A-431 ląstelėms savitai mitochondrijose sukauptu Safr ir įvairiose organelėse lokalizuotu mTHPC ne tik didina autofagosomų kiekį, bet ir sukelia patį autofagijos procesą. Savitai lizosomose sukaupto ALPcS<sub>4</sub> silpnas, vidutinis ir stiprus FDP didina autofagosomų kiekį, tačiau pats autofagijos procesas (baltymų degradacija) vyksta tiktai paveikus silpna poveikio doze - po vidutinio ir stipraus poveikio autofagija nevyksta.

### **3.4 Citokinų VEGF-A, IL-1 $\alpha$ ir transkripcijos veiksnio HIF-1**

#### **$\alpha$ subvieneto raiška A-431 ląstelėse po fotodinaminio poveikio**

Mūsų laboratorijoje, tiriant mTHPC-FDP sukeltus genų raiškos pokyčius kDNR makrogardelių ir kiekybinės PGR metodais, buvo nustatyta padidėjusi citokinų: kraujagyslių endotelio augimo veiksnio A (VEGF-A) ir interleukino 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) raiška (Dabkevičienė, 2010; Mickė, 2004). Kadangi šie

citokinai jau buvo plačiai aprašyti mūsų laboratorijoje atliktame darbe (Dabkevičienė, 2010), šio darbo literatūros dalyje dėmesio jiems neskyrėme. Šiuos citokinus čia tik trumpai pristatysime.

Pirmą kartą VEGF-A ir HIF-1 $\alpha$  baltymų raiškos padidėjimas po FDP buvo pastebėtas peles paveikus fotofrinu (Ferrario et al., 2000). Tuo tarpu, paveikus Lewis plaučių karcinomos naviką turinčias peles ALA-FDP buvo nustatyta, kad VEGF-A baltymo kiekis sumažėjo (Lisnjak et al., 2005). Mažesnis VEGF-A kiekis yra palankus vėžio gydymui, kadangi VEGF-A yra vienas iš angiogenezę (kraujagyslių augimą) ir vėžio plitimą skatinančių veiksnių (Lee et al., 2010; Murukesh et al., 2010).

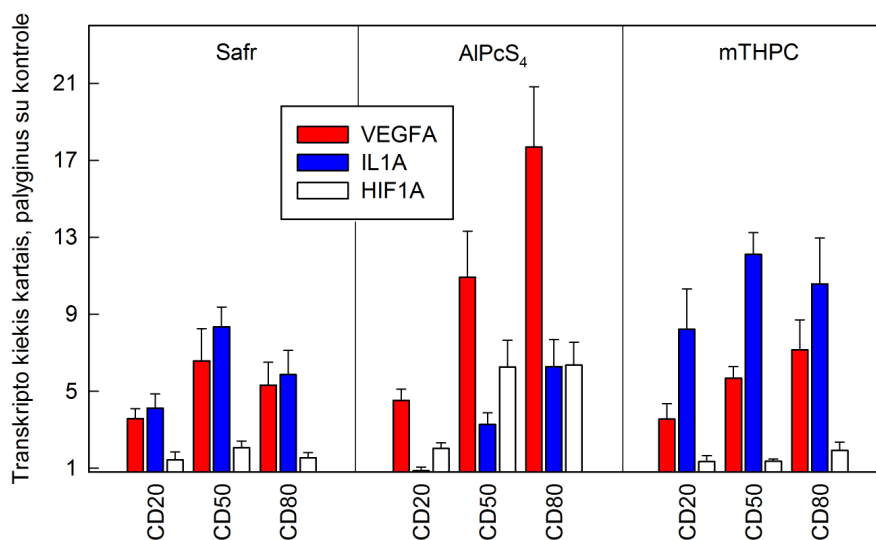
Transkripcijos veiksnys HIF-1 skatina daugelio genų raišką, tarp jų ir VEGFA (Podar and Anderson, 2010). Transkripcijos veiksnys HIF-1 yra heterodimeras, kurį sudaro konstitutyviai ekspresuojamas stabilus  $\beta$  subvienetas ir nestabilus, po sintezės greitai degraduojamas  $\alpha$  subvienetas (koduoja HIF1A genas). Žinoma, jog transkripcijos veiksnį HIF-1 aktyvuoja hipoksija, onkogeninis, uždegiminis, metabolinis ir oksidacinis stresai (Kroemer and Pouyssegur, 2008).

IL-1 $\alpha$  – tai pleotropinis citokinas, svarbus imuniniam atsakui ir uždegimo vyksmams (Dinarello, 2009). IL-1 $\alpha$  poveikis vėžiniams procesams nevienareikšmis: jis sukelia pelių navikų regresiją (Dvorkin et al., 2006), tačiau žmogaus skrandžio vėžinėse ląstelėse IL-1 $\alpha$  raiška atitinka jų gebą metastazuoti (Ma et al., 2008). Be to, iš nekrozinių ląstelių ištekėjęs IL-1 $\alpha$  gali stimuliuoti uždegimą (žiūr. 1.2.5 sk.). Įdomu, jog IL-1 $\alpha$  gali veikti ne tik kaip citokinas - IL-1 $\alpha$  pirmtakas yra transkripcijos aktyvatorius (Werman et al., 2004). Nustatyta, jog žmogaus hipofizės vėžinėms ląstelėms ir pirminiems navikams pridėjus IL-1 $\alpha$  baltymo, padidėja sekretuoto VEGF kiekis (Borg et al., 2005). Mūsų laboratorijoje taip pat buvo tiriamas IL-1 $\alpha$  poveikis VEGFA raiškai po FDP. Buvo nustatyta, jog IL-1 $\alpha$  skatina VEGFA raišką po mTHPC-FDP A-431 ląstelėse (Dabkevičienė, 2010). Neseniai buvo publikuoti duomenys, kur paminėtas IL1A raiškos padidėjimas po FDP - nustatytas IL1A raiškos

padidėjimas po FDP, sukkelto žmogaus glioblastomos ir prostatos karcinomos ląsteles veikiant ALA (Kammerer et al., 2011).

Šiame darbe tyrėme, kokią reikšmę citokinių VEGF-A ir IL-1 $\alpha$  bei HIF1  $\alpha$  subvieneto raiškai A-431 ląstelėse turi savitai mitochondrijose ir lizosomose sukauptų, atitinkamai, Safr ir AlPcS<sub>4</sub> fotodinaminiai poveikiai, palyginus su mūsų laboratorijoje ištirtu mTHPC-FDP.

Nustatėme, jog praėjus 3,5 val. po Safr-FDP ir po AlPcS<sub>4</sub>-FDP, VEGFA raiška A-431 ląstelėse padidėjo (3.12 pav.). Po vidutinio ir stipraus Safr-FDP, VEGFA transkripto kiekis padidėjo panašiai kaip ir po mTHPC-FDP - apie 5-7 kartus. Daugiausiai VEGFA raiška išaugo po AlPcS<sub>4</sub>-FDP – net iki 17 kartų.



**3.12 pav.** VEGFA, IL1A ir HIF1A transkriptų kiekis po Safr, mTHPC ir AlPcS<sub>4</sub> sukeltų fotodinaminių poveikių A-431 ląstelėse.

Ląstelių ekstraktai paruošti praėjus 3,5 val. švitinimo. Transkriptų kiekis nustatytas kiekybinės PGR metodu, normalizuota pagal  $\beta$ -aktiną.

Safr-FDP: ląstelės 1 val. inkubuotos su 0,7  $\mu$ g/ml Safr ir švitintos 1 min. (CD20), 3 min. (CD50) arba 10 min. (CD80) šviesa, kurios  $\lambda=509\pm 5$  nm, intensyvumas 29 W/m<sup>2</sup>.

mTHPC-FDP: ląstelės 18 val. inkubuotos su 0,1  $\mu$ g/ml mTHPC ir švitintos 20 sek. (CD20), 1 min. (CD50) arba 3 min. (CD80) šviesa, kurios  $\lambda=660\pm 5$  nm, intensyvumas 16 W/m<sup>2</sup>.

AlPcS<sub>4</sub>-FDP: ląstelės 18 val. inkubuotos su 20  $\mu$ g/ml AlPcS<sub>4</sub> ir švitintos 4 min. (CD20), 9 min. (CD50) arba 12 min. (CD80) šviesa, kurios  $\lambda=660\pm 5$  nm, intensyvumas 16 W/m<sup>2</sup>. Brūkšniai -  $\pm$  SN.

IL1A raiška po Safr-FDP padidėjo iki 8 kartų, po ALPcS<sub>4</sub>-FDP iki 6 kartų, o daugiausia IL1A raiška padidėjo po mTHPC-FDP – iki 12 kartų.

HIF1A raiškos pokyčiai po Safr-FDP ir mTHPC-FDP nebuvo dideli. Kadangi tikrai 1,5 karto geno raiškos padidėjimą laikėme reikšmingu, HIF1A padidėjimą neviršijantį 2 kartų stebėjome tikrai po vidutinio ir stipraus Safr-FDP, silpno ALPcS<sub>4</sub>-FDP ir stipraus mTHPC-FDP. Tuo tarpu po vidutinės ir stiprios ALPcS<sub>4</sub>-FDP dozės HIF1A raiška padidėjo 6 kartus. Įdomu, kad VEGFA raiškos padidėjimas po šio poveikio taip pat buvo didžiausias, palyginus su kitais fotosensibilizatoriais.

Taigi, savitai mitochondrijose bei lizosomose sukauptu, atitinkamai, Safr ir ALPcS<sub>4</sub>, taip pat kaip ir įvairiose ląstelės organelėse lokalizuoto mTHPC fotodinaminis poveikis sukelia citokinų VEGF-A ir IL-1 $\alpha$  bei transkripcijos veiksnio HIF-1  $\alpha$  subvieneto raiškos padidėjimą A-431 ląstelėse.

### 3.5 Rezultatų apibendrinimas

Šiame darbe apžvelgėme kompleksinius tyrimus, kuriais siekėme nustatyti, kaip skiriasi oksidacinio streso, sukkelto skirtingose ląstelės organelėse, inicijuoti ląstelių žūties vyksmai (3.1 lent.). Oksidacinį stresą sukėlėme fotodinaminiu poveikiu (FDP). Pagrindinė ROS, susidaranti šio poveikio metu, yra <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, kuris ląstelėje difunduoja, skirtingų autorių duomenimis, 20 ar 100 nm spinduliu (Hatz et al., 2008; Moan and Berg, 1991). Todėl fotodinaminio poveikio metu turėtų būti oksiduojamos biomolekulės, esančios arti tos vietos, kur susidaro <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, t. y., kur lokalizuotas fotosensibilizatorius. Dauguma gydymui naudojamų fotosensibilizatorių (tarp jų ir šiame darbe naudotas mTHPC) sulaikomi daugelyje ląstelės organelių: ir mitochondrijose, ir ET, ir Goldžio komplekse, ir lizosomose. Yra nustatyta, kad tokių fotosensibilizatorių sukeltas FDP inicijuoja ir apoptozę, ir nekrozę.

Šiame darbe tyrėme, ar nuo fotosensibilizatoriaus lokalizacijos priklauso ląstelės žūties kelias, autofagija, poveikis ląstelės ciklui, kai kurių atsakui į citotoksinį poveikį svarbių genų raiška. Fotodinaminį poveikį pelės hepatomos

ląstelėse MH-22A ir žmogaus epidermoidinės karcinomos ląstelėse A-431 sukėlėme naudodami fotosensibilizatorius, kurie kaupiami įvairiose ląstelės organelėse (mTHPC), mitochondrijų (Rh123 ir Safr) arba lizosomų (AIPcS<sub>4</sub>) viduje. Apie mitochondrijų išorinės membranos pažaidas sprendėme pagal mitochondrijų tarpmembraninėje ertmėje esančio citochromo c ištekėjimą į citozolį, mitochondrijų užpildo pažaidas sekėme pagal mitochondrijų užpildui savito fermento citrato sintazės aktyvumo pokyčius, lizosomų užpildo pažaidas nustatėme pagal lizosomų savito fermento β-N-acetil-D-gliukozaminidazės aktyvumo mažėjimą.

Visais atvejais stiprus fotodinaminis poveikis (CD80) sukėlė apoptozę. Kai fotodinaminis poveikis buvo nestiprus (CD≤50), ląstelių su skirtingai pažeistomis organelėmis atsakas skyrėsi. Įvairiose ląstelės organelėse sukauptas mTHPC ir savitai lizosomose lokalizuotas AIPcS<sub>4</sub> sukėlė apoptozę. Tačiau mitochondrijų vidaus pažaidos, sukeltos veikiant Rh123 ar Safr ląstelėse, patyrusiose citotoksinį poveikį, dėl kurio jų gyvybingumas praėjus 24 val. po poveikio buvo iki 50% mažesnis negu neveiktų ląstelių, apoptozės nesukėlė. Tokių ląstelių nekrozė buvo tokio paties lygio, kaip kontrolinių ląstelių.

Atlikę ląstelės ciklo tyrimus nustatėme, kad po FDP ląstelės ciklas sutriko. Tačiau praėjus 24 val. po poveikio, veikiant įvairiose organelėse lokalizuotu mTHPC, ląstelės ciklas nesiskyrė nuo neveiktų ląstelių ciklo. Tuo tarpu stiprus poveikis naudojant lizosomose sukauptą AIPcS<sub>4</sub> (CD80) ir vidutinis poveikis (CD50), sukeltas mitochondrijų užpilde susikaupusio Safr mažino S fazės ląstelių kiekį praėjus 24 val. po poveikio.

Vienas iš galimai apsauginių procesų, kuris stiprėjo pažeistose ląstelėse, yra autofagija. Visos mūsų tirtos pažaidos didino autofagosomų kiekį. Ląstelėse, veiktose įvairiose organelėse susikaupusiu mTHPC, ir mitochondrijų užpildą pažeidžiančiu Safr, autofagija vyko iki galo – peptidazės skaidė LC3 baltymą. Autofagija buvo intensyvi ir ląstelėse su pažeistu mitochondrijų užpildu. Galima spėti, kad suskaidžiusios pažeistas mitochondrijas, ląstelės galėjo išvengti žūties.

Ląstelės su pažeistomis lizosomomis buvo ypatingai įdomios autofagijos tyrimams, nes lizosomos dalyvauja galutinėse autofagijos stadijose. Šiose

ląstelėse, po fotodinaminio poveikio padaugėjo autofagosomų, tačiau galutinės autofagijos stadijos vyko tik po silpno citotoksinio poveikio (CD20) – buvo skaidomas LC3 baltymas. Kitais atvejais - po vidutinio (CD50) ir stipraus (CD80) poveikio, galutinės autofagijos stadijos nevyko, greičiausiai šie poveikiai pažeidė molekules, nuo kurių priklauso autofagosomų sąlyje su lizosomomis, ar pačias lizosomų peptidazes.

Tirdami ląstelės ciklą, pastebėjome, kad pažeistose ląstelėse padaugėja p21 baltymo geno transkripto. Reiškia, kad mitochondrijų ar lizosomų užpildo pažaidos sukelia signalą, kuris pasiekia branduolį ir keičia genų raišką. Buvo įdomu nustatyti, ar tirtų ląstelės organelių pažaidos indukuoja kai kurių kitų genų, svarbių ląstelės atsakui, raišką. Visi poveikiai daugiau ar mažiau padidino trijų tirtų genų: VEGFA, HIF1A ir IL1A, raišką.

Lizosomose susikaupęs ALPcS<sub>4</sub> daugiausiai iš visų tirtų poveikių padidino kraujagyslių endotelio augimo veiksnio VEGFA raišką. Organizme šis citokinas gali padidinti pažeistų navikų aprūpinimą krauju, o tai būtų nenaudinga gydymui. Įdomu, kad po šio poveikio padidėjo ir VEGFA raišką skatinančio transkripcijos veiksnio HIF-1  $\alpha$  subvieneto raišką. Įvairiose ląstelės organelėse sukauptas mTHPC stipriausiai indukavo prouždegiminio citokino IL-1 $\alpha$  geno raišką. Šis pleotropinis citokinas, veikiantis ir kaip transkripcijos veiksnys, taip pat gali sukelti gydymui nenaudingą atsaką: mūsų laboratorijoje parodyta, kad slopinant šio citokino veiklą, lėtėja naviko augimas.

Taigi, FDP, nukreiptas į skirtingas ląstelės vietas (įvairios organelės (mTHPC), mitochondrijos (Safr) ar lizosomos(ALPcS<sub>4</sub>)), gali sukelti kai kuriuos ląstelių gyvybingumui svarbius vyksmus – kyla apoptozė, sutrinka ląstelės ciklas, inicijuojama autofagija, padidėja kai kurių genų raišką (P21, VEGFA, HIF1A ir IL1A). Be to, kai kurie vyksmai priklauso nuo poveikio dozės: 1) po vidutinio stiprumo (CD50) fotodinaminio poveikio, naudojant Safr, yra pažeidžiamas mitochondrijų vidus, bet ląstelės nežūva, o vyksta ląstelių ciklo areštas; 2) po vidutinio (CD50) ir stipraus (CD80) fotodinaminio poveikio, pažeidžiančio lizosomas, veikiant ALPcS<sub>4</sub> ląstelėse padaugėja autofagosomų, tačiau galutinės autofagijos stadijos nevyksta.



**3.1 lentelė. Rezultatų apibendrinimas**

Fotosensibilizatorius	Lokalizacija	CD	Apoptozė	Autofagosomų padaugėjimas	Autofagija	Ląstelės ciklo sutrikimas 6 val. po poveikio	Ląstelės ciklo areštas 24 val. po poveikio	P21	VEGFA	IL1A	HIF1A
<b>mTHPC</b>	Įvairios organelės	<b>20</b>	+	–	–	n	n	+	+	+	–
		<b>50</b>	+	+	+	+	–	+	+	+	–
		<b>80</b>	+	+	+	+	–	+	+	+	+
<b>Rh123</b>	Mitochondrijų vidus	<b>40</b>	–	n	n	n	n	n	n	n	n
<b>Safr</b>	Mitochondrijų vidus	<b>20</b>	–	–	–	n	n	+	+	+	–
		<b>50</b>	–	+	+	+	+	+	+	+	+
		<b>80</b>	+	+	+	+	–	+	+	+	+
<b>AlPcS<sub>4</sub></b>	Lizosomų vidus	<b>20</b>	+	+	+	n	n	+	+	+	+
		<b>50</b>	+	+	–	+	–	+	++	+	++
		<b>80</b>	+	+	–	+	+	+	++	+	++

n – nebuvo tirta

## IŠVADOS

1. Fotocitotoksinis poveikis, nukreiptas į skirtingas organeles, sukelia kompleksinį ląstelės atsaką, priklausantį nuo poveikio stiprumo ir pažeidų vietos.
2. Po mitochondrijų viduje kaupiamo rodamino123 ir šviesos vidutinio stiprumo (CD40) citotoksinio poveikio pelės hepatomos MH-22A ląstelėms sumažėja mitochondrijų užpildo fermento citrato sintazės aktyvumas, tačiau mitochondrijų išorinės membranos pralaidumas nepadidėja ir neinicijuojama apoptozė. To paties stiprumo mezo-tetra-(3-hidroksifenil)chlorino sukeltas fotodinaminis poveikis indukuoja apoptozę.
3. Mitochondrijų viduje kaupiamo safranino O ir šviesos vidutinio stiprumo (CD50) fotodinaminis poveikis žmogaus epidermoidinės karcinomos A-431 ląstelėms nesukelia ląstelių žūties, bet sutrinka ląstelių ciklas. Didesnė poveikio dozė (CD80) inicijuoja apoptozę. Tuo tarpu ir vidutinė (CD50), ir didelė (CD80) mezo-tetra-(3-hidroksifenil)chlorino sukulto fotodinaminio poveikio dozė sukelia ląstelių žūtį.
4. Lizosomų viduje kaupiamo aliuminio (III) ftalocianino tetrasulfonato fotodinaminis poveikis sukelia A-431 ląstelių žūtį; vyrauja apoptozė.
5. Po safranino O arba mezo-tetra-(3-hidroksifenil)chlorino sukulto vidutinio ir didelio stiprumo fotodinaminio poveikio A-431 ląstelėse suintensyvėja autofagija. Nors aliuminio (III) ftalocianino tetrasulfonato sukeltas mažos (CD20), vidutinės (CD50) ar didelės (CD80) dozės fotodinaminis poveikis padidina autofagosomų kiekį, tačiau galutinės autofagijos stadijos vyksta tiksliai po mažos dozės fotodinaminio poveikio.
6. Safranino O, aliuminio (III) ftalocianino tetrasulfonato arba mezo-tetra-(3-hidroksifenil)chlorino sukeltas fotodinaminis poveikis A-431 ląstelėse padidina citokinų VEGF-A, IL-1 $\alpha$  ir transkripcijos veiksnio HIF-1  $\alpha$  subvieneto genų raišką RNR lygiu.

## LITERATŪROS ŠALTINIAI

1. Adachi, M., Higuchi, H., Miura, S., Azuma, T., Inokuchi, S., Saito, H., Kato, S. and Ishii, H. 2004. Bax interacts with the voltage-dependent anion channel and mediates ethanol-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 287:G695-705.
2. Ahmad, N., Feyes, D.K., Agarwal, R. and Mukhtar, H. 1998. Photodynamic therapy results in induction of WAF1/CIP1/P21 leading to cell cycle arrest and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:6977-6982.
3. Ahmad, N., Gupta, S., Feyes, D.K. and Mukhtar, H. 2000. Involvement of Fas (APO-1/CD-95) during photodynamic-therapy-mediated apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *J Invest Dermatol.* 115:1041-1046.
4. Ahmad, N., Gupta, S. and Mukhtar, H. 1999. Involvement of retinoblastoma (Rb) and E2F transcription factors during photodynamic therapy of human epidermoid carcinoma cells A431. *Oncogene.* 18:1891-1896.
5. Akerman, K.E. and Wikstrom, M.K. 1976. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett.* 68:191-197.
6. Ali, S.M., Chee, S.K., Yuen, G.Y. and Olivo, M. 2002. Photodynamic therapy induced Fas-mediated apoptosis in human carcinoma cells. *Int J Mol Med.* 9:257-270.
7. Allan, L.A. and Clarke, P.R. 2009. Apoptosis and autophagy: Regulation of caspase-9 by phosphorylation. *Febs J.* 276:6063-6073.
8. Allen, C.M., Langlois, R., Sharman, W.M., La Madeleine, C. and Van Lier, J.E. 2002. Photodynamic properties of amphiphilic derivatives of aluminum tetrasulfophthalocyanine. *Photochem Photobiol.* 76:208-216.
9. Almeida, R.D., Manadas, B.J., Carvalho, A.P. and Duarte, C.B. 2004. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta.* 1704:59-86.
10. Andrzejak, M., Santiago, M. and Kessel, D. 2011. Effects of endosomal photodamage on membrane recycling and endocytosis. *Photochem Photobiol.* 87:699-706.
11. Atlante, A., Passarella, S., Moreno, G. and Salet, C. 1992. Effects of rhodamine 123 in the dark and after irradiation on mitochondrial energy metabolism. *Photochem Photobiol.* 56:471-478.
12. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. 2000. Analysis of Proteins. *Current Protocols in Molecular biology.* 2.
13. Axe, E.L., Walker, S.A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H.L., Habermann, A., Griffiths, G. and Ktistakis, N.T. 2008. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 182:685-701.
14. Baines, C.P., Kaiser, R.A., Purcell, N.H., Blair, N.S., Osinska, H., Hambleton, M.A., Brunskill, E.W., Sayen, M.R., Gottlieb, R.A., Dorn, G.W., et al. 2005. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature.* 434:658-662.
15. Baines, C.P., Kaiser, R.A., Sheiko, T., Craigen, W.J. and Molkenin, J.D. 2007. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol.* 9:550-555.

16. Basanez, G., Sharpe, J.C., Galanis, J., Brandt, T.B., Hardwick, J.M. and Zimmerberg, J. 2002. Bax-type apoptotic proteins porate pure lipid bilayers through a mechanism sensitive to intrinsic monolayer curvature. *J Biol Chem.* 277:49360-49365.
17. Beaufay, H., Amar-Costesec, A., Feytmans, E., Thines-Sempoux, D., Wibo, M., Robbi, M. and Berthet, J. 1974. Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. I. Biochemical methods. *J Cell Biol.* 61:188-200.
18. Ben-Dror, S., Bronshtein, I., Wiehe, A., Roder, B., Senge, M.O. and Ehrenberg, B. 2006. On the correlation between hydrophobicity, liposome binding and cellular uptake of porphyrin sensitizers. *Photochem Photobiol.* 82:695-701.19. Berg, K., Bommer, J.C. and Moan, J. 1989. Evaluation of sulfonated aluminum phthalocyanines for use in photochemotherapy. Cellular uptake studies. *Cancer Lett.* 44:7-15.
20. Berry, D.L. and Baehrecke, E.H. 2007. Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in *Drosophila*. *Cell.* 131:1137-1148.
21. Bhola, P.D., Mattheyses, A.L. and Simon, S.M. 2009. Spatial and temporal dynamics of mitochondrial membrane permeability waves during apoptosis. *Biophys J.* 97:2222-2231.
22. Bidere, N., Lorenzo, H.K., Carmona, S., Laforge, M., Harper, F., Dumont, C. and Senik, A. 2003. Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. *J Biol Chem.* 278:31401-31411.
23. Bivik, C. and Ollinger, K. 2008. JNK mediates UVB-induced apoptosis upstream lysosomal membrane permeabilization and Bcl-2 family proteins. *Apoptosis.* 13:1111-1120.
24. Blackstone, C. and Chang, C.R. 2011. Mitochondria unite to survive. *Nat Cell Biol.* 13:521-522.
25. Boya, P., Andreau, K., Poncet, D., Zamzami, N., Perfettini, J.L., Metivier, D., Ojcius, D.M., Jaattela, M. and Kroemer, G. 2003. Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion. *J Exp Med.* 197:1323-1334.
26. Boya, P. and Kroemer, G. 2008. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene.* 27:6434-6451.
27. Bonnett, R., White, R.D., Winfield, U.J. and Berenbaum, M.C. 1989. Hydroporphyrins of the meso-tetra(hydroxyphenyl)porphyrin series as tumour photosensitizers. *Biochem J.* 261:277-280.
28. Borg, S.A., Kerry, K.E., Royds, J.A., Battersby, R.D. and Jones, T.H. 2005. Correlation of VEGF production with IL1 alpha and IL6 secretion by human pituitary adenoma cells. *Eur J Endocrinol.* 152:293-300.
29. Bourre, L., Simonneaux, G., Ferrand, Y., Thibaut, S., Lajat, Y. and Patrice, T. 2003. Synthesis, and in vitro and in vivo evaluation of a diphenylchlorin sensitizer for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B.* 69:179-192.
30. Broker, L.E., Huisman, C., Span, S.W., Rodriguez, J.A., Kruyt, F.A. and Giaccone, G. 2004. Cathepsin B mediates caspase-independent cell death induced by microtubule stabilizing agents in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* 64:27-30.

31. Brouckaert, G., Kalai, M., Krysko, D.V., Saelens, X., Vercammen, D., Ndlovu, M., Haegeman, G., D'Herde, K. and Vandenabeele, P. 2004. Phagocytosis of necrotic cells by macrophages is phosphatidylserine dependent and does not induce inflammatory cytokine production. *Mol Biol Cell*. 15:1089-1100.
32. Brown, G.C. and Borutaite, V. 2008. Regulation of apoptosis by the redox state of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta*. 1777:877-881.
33. Buytaert, E., Callewaert, G., Hendrickx, N., Scorrano, L., Hartmann, D., Missiaen, L., Vandenheede, J.R., Heirman, I., Grooten, J. and Agostinis, P. 2006. Role of endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic BAX and BAK proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy. *Faseb J*. 20:756-758.
34. Buytaert, E., Dewaele, M. and Agostinis, P. 2007. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta*. 1776:86-107.
35. Buytaert, E., Matroule, J.Y., Durinck, S., Close, P., Kocanova, S., Vandenheede, J.R., de Witte, P.A., Piette, J. and Agostinis, P. 2008. Molecular effectors and modulators of hypericin-mediated cell death in bladder cancer cells. *Oncogene*. 27:1916-1929.
36. Bunting, J.R. 1992. A test of the singlet oxygen mechanism of cationic dye photosensitization of mitochondrial damage. *Photochem Photobiol*. 55:81-87.
37. Caruso, J.A., Mathieu, P.A., Joiakim, A., Leeson, B., Kessel, D., Sloane, B.F. and Reiners, J.J., Jr. 2004. Differential susceptibilities of murine hepatoma 1c1c7 and Tao cells to the lysosomal photosensitizer NPe6: influence of aryl hydrocarbon receptor on lysosomal fragility and protease contents. *Mol Pharmacol*. 65:1016-1028.
38. Caruso, J.A., Mathieu, P.A., Joiakim, A., Zhang, H. and Reiners, J.J., Jr. 2006. Aryl hydrocarbon receptor modulation of tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis and lysosomal disruption in a hepatoma model that is caspase-8-independent. *J Biol Chem*. 281:10954-10967.
39. Caruso, J.A., Mathieu, P.A. and Reiners, J.J., Jr. 2005. Sphingomyelins suppress the targeted disruption of lysosomes/endosomes by the photosensitizer NPe6 during photodynamic therapy. *Biochem J*. 392:325-334.
40. Castano, A.P., Mroz, P. and Hamblin, M.R. 2006. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer*. 6:535-545.
41. Castino, R., Peracchio, C., Salini, A., Nicotra, G., Trincheri, N.F., Demoz, M., Valente, G. and Isidoro, C. 2009. Chemotherapy drug response in ovarian cancer cells strictly depends on a cathepsin D-Bax activation loop. *J Cell Mol Med*. 13:1096-1109.
42. Chen, L.B., Summerhayes, I.C., Johnson, L.V., Walsh, M.L., Bernal, S.D. and Lampidis, T.J. 1982. Probing mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 46 Pt 1:141-155.
43. Chernyak, B.V., Izyumov, D.S., Lyamzaev, K.G., Pashkovskaya, A.A., Pletjushkina, O.Y., Antonenko, Y.N., Sakharov, D.V., Wirtz, K.W. and Skulachev, V.P. 2006. Production of reactive oxygen species in mitochondria of HeLa cells under oxidative stress. *Biochim Biophys Acta*. 1757:525-534.

44. Chiu, S.M., Xue, L.Y., Lam, M., Rodriguez, M.E., Zhang, P., Kenney, M.E., Nieminen, A.L. and Oleinick, N.L. 2010. A requirement for bid for induction of apoptosis by photodynamic therapy with a lysosome- but not a mitochondrion-targeted photosensitizer. *Photochem Photobiol.* 86:1161-1173.
45. Cirman, T., Oresic, K., Mazovec, G.D., Turk, V., Reed, J.C., Myers, R.M., Salvesen, G.S. and Turk, B. 2004. Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins. *J Biol Chem.* 279:3578-3587.
46. Colell, A., Ricci, J.E., Tait, S., Milasta, S., Maurer, U., Bouchier-Hayes, L., Fitzgerald, P., Guio-Carrion, A., Waterhouse, N.J., Li, C.W., et al. 2007. GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation. *Cell.* 129:983-997.
47. Compagnin, C., Mognato, M., Celotti, L., Canti, G., Palumbo, G. and Reddi, E. 2010. Cell proliferation and cell cycle alterations in oesophageal p53-mutated cancer cells treated with cisplatin in combination with photodynamic therapy. *Cell Prolif.* 43:262-274.
48. Crompton, M. 1999. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J.* 341 ( Pt 2):233-249.
49. Cunderlikova, B., Kaalhus, O., Cunderlik, R., Mateasik, A., Moan, J. and Kongshaug, M. 2004. pH-dependent modification of lipophilicity of porphyrin-type photosensitizers. *Photochem Photobiol.* 79:242-247.
50. Dabkevičienė, D. 2010. Citotoksinio poveikio skatinama citokinų VEGFA ir IL-1 $\alpha$  raiška *in vitro* ir *in vivo*. *Daktaro disertacija. Vilniaus universitetas, Vilnius.*
51. Davis, S., Weiss, M.J., Wong, J.R., Lampidis, T.J. and Chen, L.B. 1985. Mitochondrial and plasma membrane potentials cause unusual accumulation and retention of rhodamine 123 by human breast adenocarcinoma-derived MCF-7 cells. *J Biol Chem.* 260:13844-13850.
52. de Duve, C. 1983. Lysosomes revisited. *Eur J Biochem.* 137:391-397.
53. Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G.D., Mitchison, T.J., Moskowitz, M.A. and Yuan, J. 2005. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol.* 1:112-119.
54. Degterev, A. and Yuan, J. 2008. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:378-390.
55. Denizot, F. and 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.* 89:271-277.
56. Dewson, G., Kratina, T., Sim, H.W., Puthalakath, H., Adams, J.M., Colman, P.M. and Kluck, R.M. 2008. To trigger apoptosis, Bak exposes its BH3 domain and homodimerizes via BH3:groove interactions. *Mol Cell.* 30:369-380.

57. Dietrich, N., Thastrup, J., Holmberg, C., Gyrd-Hansen, M., Fehrenbacher, N., Lademann, U., Lerdrup, M., Herdegen, T., Jaattela, M. and Kallunki, T. 2004. JNK2 mediates TNF-induced cell death in mouse embryonic fibroblasts via regulation of both caspase and cathepsin protease pathways. *Cell Death Differ.* 11:301-313.
58. Dinarello, C.A. 2009. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol.* 27:519-550.
59. Doulias, P.T., Kotoglou, P., Tenopoulou, M., Keramisanou, D., Tzavaras, T., Brunk, U., Galaris, D. and Angelidis, C. 2007. Involvement of heat shock protein-70 in the mechanism of hydrogen peroxide-induced DNA damage: the role of lysosomes and iron. *Free Radic Biol Med.* 42:567-577.
60. Dubuc, C., Langlois, R., Benard, F., Cauchon, N., Klarskov, K., Tone, P. and van Lier, J.E. 2008. Targeting gastrin-releasing peptide receptors of prostate cancer cells for photodynamic therapy with a phthalocyanine-bombesin conjugate. *Bioorg Med Chem Lett.* 18:2424-2427.
61. Dussmann, H., Rehm, M., Concannon, C.G., Anguissola, S., Wurstle, M., Kacmar, S., Voller, P., Huber, H.J. and Prehn, J.H. 2010. Single-cell quantification of Bax activation and mathematical modelling suggest pore formation on minimal mitochondrial Bax accumulation. *Cell Death Differ.* 17:278-290.
62. Dvorkin, T., Song, X., Argov, S., White, R.M., Zoller, M., Segal, S., Dinarello, C.A., Voronov, E. and Apte, R.N. 2006. Immune phenomena involved in the in vivo regression of fibrosarcoma cells expressing cell-associated IL-1alpha. *J Leukoc Biol.* 80:96-106.
63. Elliott, M.R., Chekeni, F.B., Trampont, P.C., Lazarowski, E.R., Kadl, A., Walk, S.F., Park, D., Woodson, R.I., Ostankovich, M., Sharma, P., et al. 2009. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature.* 461:282-286.
64. Fabris, C., Valduga, G., Miotto, G., Borsetto, L., Jori, G., Garbisa, S. and Reddi, E. 2001. Photosensitization with zinc (II) phthalocyanine as a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Cancer Res.* 61:7495-7500.
65. Fehrenbacher, N., Bastholm, L., Kirkegaard-Sorensen, T., Rafn, B., Bottzauw, T., Nielsen, C., Weber, E., Shirasawa, S., Kallunki, T. and Jaattela, M. 2008. Sensitization to the lysosomal cell death pathway by oncogene-induced down-regulation of lysosome-associated membrane proteins 1 and 2. *Cancer Res.* 68:6623-6633.
66. Feldstein, A.E., Werneburg, N.W., Canbay, A., Guicciardi, M.E., Bronk, S.F., Rydzewski, R., Burgart, L.J. and Gores, G.J. 2004. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. *Hepatology.* 40:185-194.
67. Feldstein, A.E., Werneburg, N.W., Li, Z., Bronk, S.F. and Gores, G.J. 2006. Bax inhibition protects against free fatty acid-induced lysosomal permeabilization. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 290:G1339-1346.
68. Fernandez, J.M., Bilgin, M.D. and Grossweiner, L.I. 1997. Singlet oxygen generation by photodynamic agents *J Photochem Photobiol B* 37:131-140

69. Ferrario, A., von Tiehl, K.F., Rucker, N., Schwarz, M.A., Gill, P.S. and Gomer, C.J. 2000. Antiangiogenic treatment enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary carcinoma. *Cancer Res.* 60:4066-4069.
70. Fogarty, M.P., Downer, E.J. and Campbell, V. 2003. A role for c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1), but not JNK2, in the beta-amyloid-mediated stabilization of protein p53 and induction of the apoptotic cascade in cultured cortical neurons. *Biochem J.* 371:789-798.
71. Fogarty, M.P., McCormack, R.M., Noonan, J., Murphy, D., Gowran, A. and Campbell, V.A. 2010. A role for p53 in the beta-amyloid-mediated regulation of the lysosomal system. *Neurobiol Aging.* 31:1774-1786.
72. Foghsgaard, L., Wissing, D., Mauch, D., Lademann, U., Bastholm, L., Boes, M., Elling, F., Leist, M. and Jaattela, M. 2001. Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Cell Biol.* 153:999-1010.
73. Foote, C.S. 1968. Mechanisms of photosensitized oxidation. There are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. *Science.* 162:963-970.
74. Forman, H.J., Maiorino, M. and Ursini, F. 2010. Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry.* 49:835-842.
75. Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E.S., Leitner, W.W., Robert, E.G., Catez, F., Smith, C.L. and Youle, R.J. 2001. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell.* 1:515-525.
76. Furre, I.E., Moller, M.T., Shahzidi, S., Nesland, J.M. and Peng, Q. 2006. Involvement of both caspase-dependent and -independent pathways in apoptotic induction by hexaminolevulinate-mediated photodynamic therapy in human lymphoma cells. *Apoptosis.* 11:2031-2042.
77. Furre, I.E., Shahzidi, S., Luksiene, Z., Moller, M.T., Borgen, E., Morgan, J., Tkacz-Stachowska, K., Nesland, J.M. and Peng, Q. 2005. Targeting PBR by hexaminolevulinate-mediated photodynamic therapy induces apoptosis through translocation of apoptosis-inducing factor in human leukemia cells. *Cancer Res.* 65:11051-11060.
78. Gallucci, S., Lolkema, M. and Matzinger, P. 1999. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med.* 5:1249-1255.
79. Galluzzi, L., Joza, N., Tasdemir, E., Maiuri, M.C., Hengartner, M., Abrams, J.M., Tavernarakis, N., Penninger, J., Madeo, F. and Kroemer, G. 2008a. No death without life: vital functions of apoptotic effectors. *Cell Death Differ.* 15:1113-1123.
80. Galluzzi, L., Kepp, O. and Kroemer, G. 2009. RIP kinases initiate programmed necrosis. *J Mol Cell Biol.* 1:8-10.
81. Galluzzi, L., Vicencio, J.M., Kepp, O., Tasdemir, E., Maiuri, M.C. and Kroemer, G. 2008b. To die or not to die: that is the autophagic question. *Curr Mol Med.* 8:78-91.



82. Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., et al. 2011. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.*
83. Garofalo, T., Giammarioli, A.M., Misasi, R., Tinari, A., Manganelli, V., Gambardella, L., Pavan, A., Malorni, W. and Sorice, M. 2005. Lipid microdomains contribute to apoptosis-associated modifications of mitochondria in T cells. *Cell Death Differ.* 12:1378-1389.
84. Gyrd-Hansen, M., Farkas, T., Fehrenbacher, N., Bastholm, L., Hoyer-Hansen, M., Elling, F., Wallach, D., Flavell, R., Kroemer, G., Nylandsted, J., et al. 2006. Apoptosome-independent activation of the lysosomal cell death pathway by caspase-9. *Mol Cell Biol.* 26:7880-7891.
85. Goldstein, J.C., Waterhouse, N.J., Juin, P., Evan, G.I. and Green, D.R. 2000. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol.* 2:156-162.
86. Gollnick, S.O., Vaughan, L. and Henderson, B.W. 2002. Generation of effective antitumor vaccines using photodynamic therapy. *Cancer Res.* 62:1604-1608.
87. Gonzalez, F., Pariselli, F., Dupaigne, P., Budihardjo, I., Lutter, M., Antonsson, B., Diolez, P., Manon, S., Martinou, J.C., Gubern, M., et al. 2005. tBid interaction with cardiolipin primarily orchestrates mitochondrial dysfunctions and subsequently activates Bax and Bak. *Cell Death Differ.* 12:614-626.
88. Gozuacik, D. and Kimchi, A. 2004. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene.* 23:2891-2906.
89. Granville, D.J., Carthy, C.M., Jiang, H., Shore, G.C., McManus, B.M. and Hunt, D.W. 1998. Rapid cytochrome c release, activation of caspases 3, 6, 7 and 8 followed by Bap31 cleavage in HeLa cells treated with photodynamic therapy. *FEBS Lett.* 437:5-10.
90. Granville, D.J., Cassidy, B.A., Ruehlmann, D.O., Choy, J.C., Brenner, C., Kroemer, G., van Breemen, C., Margaron, P., Hunt, D.W. and McManus, B.M. 2001. Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor and cytochrome c during smooth muscle cell apoptosis. *Am J Pathol.* 159:305-311.
91. Green, D.R. and Kroemer, G. 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science.* 305:626-629.
92. Gude, D.R., Alvarez, S.E., Paugh, S.W., Mitra, P., Yu, J., Griffiths, R., Barbour, S.E., Milstien, S. and Spiegel, S. 2008. Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a "come-and-get-me" signal. *Faseb J.* 22:2629-2638.
93. Guicciardi, M.E., Bronk, S.F., Werneburg, N.W. and Gores, G.J. 2007. cFLIPL prevents TRAIL-induced apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting the lysosomal pathway of apoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 292:G1337-1346.
94. Guicciardi, M.E., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., Yin, X.M. and Gores, G.J. 2005. Bid is upstream of lysosome-mediated caspase 2 activation in tumor necrosis factor alpha-induced hepatocyte apoptosis. *Gastroenterology.* 129:269-284.

95. Guicciardi, M.E., Deussing, J., Miyoshi, H., Bronk, S.F., Svingen, P.A., Peters, C., Kaufmann, S.H. and Gores, G.J. 2000. Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J Clin Invest.* 106:1127-1137.
96. Hailey, D.W., Rambold, A.S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P.K. and Lippincott-Schwartz, J. 2010. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell.* 141:656-667.
97. Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T. and Yamamoto, A. 2009. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol.* 11:1433-1437.
98. Haywood-Small, S.L., Vernon, D.I., Griffiths, J., Schofield, J. and Brown, S.B. 2006. Phthalocyanine-mediated photodynamic therapy induces cell death and a G0/G1 cell cycle arrest in cervical cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 339:569-576.
99. Halestrap, A.P. 2009. What is the mitochondrial permeability transition pore? *J Mol Cell Cardiol.* 46:821-831.
100. Hamblin, M.R. and Hasan, T. 2004. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci.* 3:436-450.
101. Hamed, S.S. and Roth, C.M. 2011. Mathematical modeling to distinguish cell cycle arrest and cell killing in chemotherapeutic concentration response curves. *J Pharmacokinetic Pharmacodyn.*
102. Hatz, S., Poulsen, L. and Ogilby, P.R. 2008. Time-resolved singlet oxygen phosphorescence measurements from photosensitized experiments in single cells: effects of oxygen diffusion and oxygen concentration. *Photochem Photobiol.* 84:1284-1290.
103. He, C. and Klionsky, D.J. 2009. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet.* 43:67-93.
104. He, L. and Lemasters, J.J. 2002. Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function? *FEBS Lett.* 512:1-7.
105. He, S., Wang, L., Miao, L., Wang, T., Du, F., Zhao, L. and Wang, X. 2009. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell.* 137:1100-1111.
106. Heinrich, M., Neumeyer, J., Jakob, M., Hallas, C., Tchikov, V., Winoto-Morbach, S., Wickel, M., Schneider-Brachert, W., Trauzold, A., Hethke, A., et al. 2004. Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death Differ.* 11:550-563.
107. Henderson, B.W., Daroqui, C., Tracy, E., Vaughan, L.A., Loewen, G.M., Cooper, M.T. and Baumann, H. 2007. Cross-linking of signal transducer and activator of transcription 3--a molecular marker for the photodynamic reaction in cells and tumors. *Clin Cancer Res.* 13:3156-3163.

108. Higgins, G.C., Beart, P.M. and Nagley, P. 2009. Oxidative stress triggers neuronal caspase-independent death: endonuclease G involvement in programmed cell death-type III. *Cell Mol Life Sci.* 66:2773-2787.
109. Hirt, U.A. and Leist, M. 2003. Rapid, noninflammatory and PS-dependent phagocytic clearance of necrotic cells. *Cell Death Differ.* 10:1156-1164.
110. Huang, W.C., Lin, Y.S., Chen, C.L., Wang, C.Y., Chiu, W.H. and Lin, C.F. 2009. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  mediates endoplasmic reticulum stress-induced lysosomal apoptosis in leukemia. *J Pharmacol Exp Ther.* 329:524-531.
111. Ichinose, S., Usuda, J., Hirata, T., Inoue, T., Ohtani, K., Maehara, S., Kubota, M., Imai, K., Tsunoda, Y., Kuroiwa, Y., et al. 2006. Lysosomal cathepsin initiates apoptosis, which is regulated by photodamage to Bcl-2 at mitochondria in photodynamic therapy using a novel photosensitizer, ATX-s10 (Na). *Int J Oncol.* 29:349-355.
112. Ishihara, N., Nomura, M., Jofuku, A., Kato, H., Suzuki, S.O., Masuda, K., Otera, H., Nakanishi, Y., Nonaka, I., Goto, Y., et al. 2009. Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nat Cell Biol.* 11:958-966.
113. Ito, M. 1984. Microassay for studying anticellular effects of human interferons. *J Interferon Res.* 4:603-608.
114. Yang, Z. and Klionsky, D.J. 2010. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 22:124-131.
115. Yap, Y.W., Whiteman, M., Bay, B.H., Li, Y., Sheu, F.S., Qi, R.Z., Tan, C.H. and Cheung, N.S. 2006. Hypochlorous acid induces apoptosis of cultured cortical neurons through activation of calpains and rupture of lysosomes. *J Neurochem.* 98:1597-1609.
116. Yla-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E. and Eskelinen, E.L. 2009. 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy.* 5:1180-1185.
117. Youle, R.J. and Karbowski, M. 2005. Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:657-663.
118. Youle, R.J. and Strasser, A. 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:47-59.
119. Yu, Z., Persson, H.L., Eaton, J.W. and Brunk, U.T. 2003. Intralysosomal iron: a major determinant of oxidant-induced cell death. *Free Radic Biol Med.* 34:1243-1252.
120. Johansson, A.C., Appelqvist, H., Nilsson, C., Kagedal, K., Roberg, K. and Ollinger, K. 2010. Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane permeabilization. *Apoptosis.* 15:527-540.
121. Johnson, L.V., Walsh, M.L. and Chen, L.B. 1980. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77:990-994.
122. Juzeniene, A., Peng, Q. and Moan, J. 2007. Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis. *Photochem Photobiol Sci.* 6:1234-1245.

123. Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo J.* 19:5720-5728.
124. Kagedal, K., Johansson, A.C., Johansson, U., Heimlich, G., Roberg, K., Wang, N.S., Jurgensmeier, J.M. and Ollinger, K. 2005. Lysosomal membrane permeabilization during apoptosis--involvement of Bax? *Int J Exp Pathol.* 86:309-321.
125. Kagedal, K., Zhao, M., Svensson, I. and Brunk, U.T. 2001. Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases. *Biochem J.* 359:335-343.
126. Kammerer, R., Buchner, A., Palluch, P., Pongratz, T., Oboukhovskij, K., Beyer, W., Johansson, A., Stepp, H., Baumgartner, R. and Zimmermann, W. 2011. Induction of immune mediators in glioma and prostate cancer cells by non-lethal photodynamic therapy. *PLoS One.* 6:e21834.
127. Keir, W.F., Land, E.J., MacLennan, A.H., McGarvey, D.J. and Truscott, T.G. 1987. Pulsed radiation studies of photodynamic sensitizers: the nature of DHE. *Photochem Photobiol.* 46:587-589.
128. Kepczynski, M., Pandian, R.P., Smith, K.M. and Ehrenberg, B. 2002. Do liposome-binding constants of porphyrins correlate with their measured and predicted partitioning between octanol and water? *Photochem Photobiol.* 76:127-134.
129. Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26:239-257.
130. Kessel, D. 2002. Relocalization of cationic porphyrins during photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci.* 1:837-840.
131. Kessel, D. and Arroyo, A.S. 2007. Apoptotic and autophagic responses to Bcl-2 inhibition and photodamage. *Photochem Photobiol Sci.* 6:1290-1295.
132. Kessel, D. and Castelli, M. 2001. Evidence that bcl-2 is the target of three photosensitizers that induce a rapid apoptotic response. *Photochem Photobiol.* 74:318-322.
133. Kessel, D., Conley, M., Vicente, M.G. and Reiners, J.J. 2005. Studies on the subcellular localization of the porphycene CPO. *Photochem Photobiol.* 81:569-572.
134. Kessel, D., Luo, Y., Mathieu, P. and Reiners, J.J., Jr. 2000. Determinants of the apoptotic response to lysosomal photodamage. *Photochem Photobiol.* 71:196-200.
135. Kessel, D. and Reiners, J.J., Jr. 2007. Apoptosis and autophagy after mitochondrial or endoplasmic reticulum photodamage. *Photochem Photobiol.* 83:1024-1028.
136. Kessel, D., Vicente, M.G. and Reiners, J.J., Jr. 2006. Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy. *Lasers Surg Med.* 38:482-488.
137. Kim, H.R., Luo, Y., Li, G. and Kessel, D. 1999. Enhanced apoptotic response to photodynamic therapy after bcl-2 transfection. *Cancer Res.* 59:3429-3432.

138. Kim, S.J., Zhang, Z., Hitomi, E., Lee, Y.C. and Mukherjee, A.B. 2006. Endoplasmic reticulum stress-induced caspase-4 activation mediates apoptosis and neurodegeneration in INCL. *Hum Mol Genet.* 15:1826-1834.
139. Kirkegaard, T. and Jaattela, M. 2009. Lysosomal involvement in cell death and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1793:746-754.
140. Kirkin, V., McEwan, D.G., Novak, I. and Dikic, I. 2009. A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol Cell.* 34:259-269.
141. Kirveliène, V., Sadauskaitė, A., Kadziauskas, J., Sasnauskienė, S. and Juodka, B. 2003. Correlation of death modes of photosensitized cells with intracellular ATP concentration. *FEBS Lett.* 553:167-172.
142. Klionsky, D.J., Abeliovich, H., Agostinis, P., Agrawal, D.K., Aliev, G., Askew, D.S., Baba, M., Baehrecke, E.H., Bahr, B.A., Ballabio, A., et al. 2008. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy.* 4:151-175.
143. Kochevar, I.E. 2004. Singlet oxygen signaling: from intimate to global. *Sci STKE.* 2004:pe7.
144. Kochevar, I.E., Lynch, M.C., Zhuang, S. and Lambert, C.R. 2000. Singlet oxygen, but not oxidizing radicals, induces apoptosis in HL-60 cells. *Photochem Photobiol.* 72:548-553.
145. Kokoszka, J.E., Waymire, K.G., Levy, S.E., Sligh, J.E., Cai, J., Jones, D.P., MacGregor, G.R. and Wallace, D.C. 2004. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature.* 427:461-465.
146. Krieg, R.C., Messmann, H., Schlottmann, K., Endlicher, E., Seeger, S., Scholmerich, J. and Knuechel, R. 2003. Intracellular localization is a cofactor for the phototoxicity of protoporphyrin IX in the gastrointestinal tract: in vitro study. *Photochem Photobiol.* 78:393-399.
147. Krysko, O., De Ridder, L. and Cornelissen, M. 2004. Phosphatidylserine exposure during early primary necrosis (oncosis) in JB6 cells as evidenced by immunogold labeling technique. *Apoptosis.* 9:495-500.
148. Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., et al. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 16:3-11.
149. Kroemer, G. and Levine, B. 2008. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:1004-1010.
150. Kroemer, G., Marino, G. and Levine, B. 2010. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell.* 40:280-293.
151. Kroemer, G. and Pouyssegur, J. 2008. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell.* 13:472-482.

152. Kurtoglu, M. and Lampidis, T.J. 2009. From delocalized lipophilic cations to hypoxia: blocking tumor cell mitochondrial function leads to therapeutic gain with glycolytic inhibitors. *Mol Nutr Food Res.* 53:68-75.
153. Kuzelova, K., Grebenova, D., Pluskalova, M., Marinov, I. and Hrkal, Z. 2004. Early apoptotic features of K562 cell death induced by 5-aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B.* 73:67-78.
154. Lacerda, S.H., Abraham, B., Stringfellow, T.C. and Indig, G.L. 2005. Photophysical, photochemical, and tumor-selectivity properties of bromine derivatives of rhodamine-123. *Photochem Photobiol.* 81:1430-1438.
155. Lam, M., Oleinick, N.L. and Nieminen, A.L. 2001. Photodynamic therapy-induced apoptosis in epidermoid carcinoma cells. Reactive oxygen species and mitochondrial inner membrane permeabilization. *J Biol Chem.* 276:47379-47386.
156. Lampidis, T.J., Bernal, S.D., Summerhayes, I.C. and Chen, L.B. 1983. Selective toxicity of rhodamine 123 in carcinoma cells in vitro. *Cancer Res.* 43:716-720.
157. Lampidis, T.J., Hasin, Y., Weiss, M.J. and Chen, L.B. 1985. Selective killing of carcinoma cells "in vitro" by lipophilic-cationic compounds: a cellular basis. *Biomed Pharmacother.* 39:220-226.
158. Lartigue, L., Medina, C., Schembri, L., Chabert, P., Zanese, M., Tomasello, F., Dalibart, R., Thoraval, D., Crouzet, M., Ichas, F., et al. 2008. An intracellular wave of cytochrome c propagates and precedes Bax redistribution during apoptosis. *J Cell Sci.* 121:3515-3523.
159. Lauber, K., Bohn, E., Krober, S.M., Xiao, Y.J., Blumenthal, S.G., Lindemann, R.K., Marini, P., Wiedig, C., Zobywalski, A., Baksh, S., et al. 2003. Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell.* 113:717-730.
160. Lee, B.I., Chan, P.H. and Kim, G.W. 2005. Metalloporphyrin-based superoxide dismutase mimic attenuates the nuclear translocation of apoptosis-inducing factor and the subsequent DNA fragmentation after permanent focal cerebral ischemia in mice. *Stroke.* 36:2712-2717.
161. Lee, H.B., Ho, A.S. and Teo, S.H. 2006. p53 Status does not affect photodynamic cell killing induced by hypericin. *Cancer Chemother Pharmacol.* 58:91-98.
162. Lee, Y.J., Karl, D.L., Maduekwe, U.N., Rothrock, C., Ryeom, S., D'Amore, P.A. and Yoon, S.S. 2010. Differential effects of VEGFR-1 and VEGFR-2 inhibition on tumor metastases based on host organ environment. *Cancer Res.* 70:8357-8367.
163. Leung, W.N., Sun, X., Mak, N.K. and Yow, C.M. 2002. Photodynamic effects of mTHPC on human colon adenocarcinoma cells: photocytotoxicity, subcellular localization and apoptosis. *Photochem Photobiol.* 75:406-411.
164. Li, N., Zheng, Y., Chen, W., Wang, C., Liu, X., He, W., Xu, H. and Cao, X. 2007. Adaptor protein LAPF recruits phosphorylated p53 to lysosomes and triggers lysosomal destabilization in apoptosis. *Cancer Res.* 67:11176-11185.

165. Lin, C.P., Lynch, M.C. and Kochevar, I.E. 2000. Reactive oxidizing species produced near the plasma membrane induce apoptosis in bovine aorta endothelial cells. *Exp Cell Res.* 259:351-359.
166. Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W. and Feeney, P.J. 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 46:3-26.
167. Lisnjak, I.O., Kutsenok, V.V., Polyschuk, L.Z., Gorobets, O.B. and Gamaleia, N.F. 2005. Effect of photodynamic therapy on tumor angiogenesis and metastasis in mice bearing Lewis lung carcinoma. *Exp Oncol.* 27:333-335.
168. Liu, L., Zhang, Z. and Xing, D. 2011. Cell death via mitochondrial apoptotic pathway due to activation of Bax by lysosomal photodamage. *Free Radic Biol Med.*
169. Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. and Wang, X. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* 94:481-490.
170. Ma, J., Sawai, H., Matsuo, Y., Ochi, N., Yasuda, A., Takahashi, H., Wakasugi, T., Funahashi, H., Sato, M., Okada, Y., et al. 2008. Interleukin-1alpha enhances angiogenesis and is associated with liver metastatic potential in human gastric cancer cell lines. *J Surg Res.* 148:197-204.
171. Madge, L.A., Li, J.H., Choi, J. and Pober, J.S. 2003. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase sensitizes vascular endothelial cells to cytokine-initiated cathepsin-dependent apoptosis. *J Biol Chem.* 278:21295-21306.
172. Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A. and Kroemer, G. 2007. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:741-752.
173. Mak, N.K., Li, K.M., Leung, W.N., Wong, R.N., Huang, D.P., Lung, M.L., Lau, Y.K. and Chang, C.K. 2004. Involvement of both endoplasmic reticulum and mitochondria in photokilling of nasopharyngeal carcinoma cells by the photosensitizer Zn-BC-AM. *Biochem Pharmacol.* 68:2387-2396.
174. Marchal, S., Francois, A., Dumas, D., Guillemin, F. and Bezdetnaya, L. 2007. Relationship between subcellular localisation of Foscan and caspase activation in photosensitised MCF-7 cells. *Br J Cancer.* 96:944-951.
175. Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P., McGahon, A.J., Rader, J.A., van Schie, R.C., LaFace, D.M. and Green, D.R. 1995. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med.* 182:1545-1556.
176. Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jurgensmeier, J.M., Susin, S.A., Vieira, H.L., Prevost, M.C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J.C., et al. 1998. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science.* 281:2027-2031.
177. Matroule, J.Y., Carthy, C.M., Granville, D.J., Joloi, O., Hunt, D.W. and Piette, J. 2001. Mechanism of colon cancer cell apoptosis mediated by pyropheophorbide-a methylester photosensitization. *Oncogene.* 20:4070-4084.

178. Melnikova, V.O., Bezdetnaya, L.N., Potapenko, A.Y. and Guillemin, F. 1999. Photodynamic properties of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin in human tumor cells. *Radiat Res.* 152:428-435.
179. Mercille, S. and Massie, B. 1994. Induction of apoptosis in nutrient-deprived cultures of hybridoma and myeloma cells. *Biotechnol Bioeng.* 44:1140-1154.
180. Michallet, M.C., Saltel, F., Flacher, M., Revillard, J.P. and Genestier, L. 2004. Cathepsin-dependent apoptosis triggered by supraoptimal activation of T lymphocytes: a possible mechanism of high dose tolerance. *J Immunol.* 172:5405-5414.
181. Mickė, I. 2004. Fotosensibilizuoto citotoksiškumo moduliacijos citostatikais molekuliniai aspektai. *Daktaro disertacija. Vilniaus universitetas, Vilnius.*
182. Mikes, J., Kleban, J., Sackova, V., Horvath, V., Jamborova, E., Vaculova, A., Kozubik, A., Hofmanova, J. and Fedorocko, P. 2007. Necrosis predominates in the cell death of human colon adenocarcinoma HT-29 cells treated under variable conditions of photodynamic therapy with hypericin. *Photochem Photobiol Sci.* 6:758-766.
183. Mizushima, N. and Yoshimori, T. 2007. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy.* 3:542-545.
184. Moan, J. and Berg, K. 1991. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem Photobiol.* 53:549-553.
185. Moan, J., Berg, K., Anholt, H. and Madslie, 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.* 58:865-870.
186. Moan, J. and Sommer, S. 1985. Oxygen dependence of the photosensitizing effect of hematoporphyrin derivative in NHIK 3025 cells. *Cancer Res.* 45:1608-1610.
187. Modica-Napolitano, J.S., Weiss, M.J., Chen, L.B. and Aprille, J.R. 1984. Rhodamine 123 inhibits bioenergetic function in isolated rat liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* 118:717-723.
188. Moreno, G., Poussin, K., Ricchelli, F. and Salet, C. 2001. The effects of singlet oxygen produced by photodynamic action on the mitochondrial permeability transition differ in accordance with the localization of the sensitizer. *Arch Biochem Biophys.* 386:243-250.
189. Morliere, P., Santus, R., Bazin, M., Kohen, E., Carillet, V., Bon, F., Rainasse, J. and Dubertret, L. 1990. Is rhodamine 123 a photosensitizer? *Photochem Photobiol.* 52:703-710.
190. Murukesh, N., Dive, C. and Jayson, G.C. 2010. Biomarkers of angiogenesis and their role in the development of VEGF inhibitors. *Br J Cancer.* 102:8-18.
191. Nakagawa, T. and Yuan, J. 2000. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol.* 150:887-894.



192. Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara, H., Kubo, T. and Tsujimoto, Y. 2005. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature*. 434:652-658.
193. Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A. and Yuan, J. 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*. 403:98-103.
194. Niedre, M., Patterson, M.S. and Wilson, B.C. 2002. Direct near-infrared luminescence detection of singlet oxygen generated by photodynamic therapy in cells in vitro and tissues in vivo. *Photochem Photobiol*. 75:382-391.
195. Nylandsted, J., Gyrd-Hansen, M., Danielewicz, A., Fehrenbacher, N., Lademann, U., Hoyer-Hansen, M., Weber, E., Multhoff, G., Rohde, M. and Jaattela, M. 2004. Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *J Exp Med*. 200:425-435.
196. Norberg, E., Orrenius, S. and Zhivotovsky, B. 2010. Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochem Biophys Res Commun*. 396:95-100.
197. O'Connor, A.E., Gallagher, W.M. and Byrne, A.T. 2009. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 85:1053-1074.
198. Ogata, M., Inanami, O., Nakajima, M., Nakajima, T., Hiraoka, W. and Kuwabara, M. 2003. Ca(2+)-dependent and caspase-3-independent apoptosis caused by damage in Golgi apparatus due to 2,4,5,7-tetrabromorhodamine 123 bromide-induced photodynamic effects. *Photochem Photobiol*. 78:241-247.
199. Oleinick, N.L., Morris, R.L. and Belichenko, I. 2002. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem Photobiol Sci*. 1:1-21.
200. Ono, K., Kim, S.O. and Han, J. 2003. Susceptibility of lysosomes to rupture is a determinant for plasma membrane disruption in tumor necrosis factor alpha-induced cell death. *Mol Cell Biol*. 23:665-676.
201. Oppenheim, J.J. and Yang, D. 2005. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol*. 17:359-365.
202. Ostefeld, M.S., Fehrenbacher, N., Hoyer-Hansen, M., Thomsen, C., Farkas, T. and Jaattela, M. 2005. Effective tumor cell death by sigma-2 receptor ligand siramesine involves lysosomal leakage and oxidative stress. *Cancer Res*. 65:8975-8983.
203. Ott, M., Robertson, J.D., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B. and Orrenius, S. 2002. Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:1259-1263.
204. Pal, P., Zeng, H., Durocher, G., Girard, D., Li, T., Gupta, A.K., Giasson, R., Blanchard, L., Gaboury, L., Balassy, A., et al. 1996. Phototoxicity of some bromine-substituted rhodamine dyes: synthesis, photophysical properties and application as photosensitizers. *Photochem Photobiol*. 63:161-168.

205. Palmeira, C.M., Moreno, A.J., Madeira, V.M. and Wallace, K.B. 1996. Continuous monitoring of mitochondrial membrane potential in hepatocyte cell suspensions. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 35:35-43.
206. Panzarini, E., Inguscio, V. and Dini, L. 2011. Timing the multiple cell death pathways initiated by Rose Bengal acetate photodynamic therapy. *Cell Death Dis*. 2:e169.
207. Parent, N., Winstall, E., Beauchemin, M., Paquet, C., Poirier, G.G. and Bertrand, R. 2009. Proteomic analysis of enriched lysosomes at early phase of camptothecin-induced apoptosis in human U-937 cells. *J Proteomics*. 72:960-973.
208. Patingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D. and Levine, B. 2005. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*. 122:927-939.
209. Peng, Q., Moan, J., Farrants, G.W., Danielsen, H.E. and Rimington, C. 1991. Location of P-II and AIPCS4 in human tumor LOX in vitro and in vivo by means of computer-enhanced video fluorescence microscopy. *Cancer Lett*. 58:37-47.
210. Persson, H.L., Yu, Z., Tirosh, O., Eaton, J.W. and Brunk, U.T. 2003. Prevention of oxidant-induced cell death by lysosomotropic iron chelators. *Free Radic Biol Med*. 34:1295-1305.
211. Persson, H.L., Kurz, T., Eaton, J.W. and Brunk, U.T. 2005. Radiation-induced cell death: importance of lysosomal destabilization. *Biochem J*. 389:877-884.
212. Pestana, C.R., Silva, C.H., Pardo-Andreu, G.L., Rodrigues, F.P., Santos, A.C., Uyemura, S.A. and Curti, C. 2009. Ca(2+) binding to c-state of adenine nucleotide translocase (ANT)-surrounding cardiolipins enhances (ANT)-Cys(56) relative mobility: a computational-based mitochondrial permeability transition study. *Biochim Biophys Acta*. 1787:176-182.
213. Piette, J., Volanti, C., Vantieghem, A., Matroule, J.Y., Habraken, Y. and Agostinis, P. 2003. Cell death and growth arrest in response to photodynamic therapy with membrane-bound photosensitizers. *Biochem Pharmacol*. 66:1651-1659.
214. Plaetzer, K., Krammer, B., Berlanda, J., Berr, F. and Kiesslich, T. 2009. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med Sci*. 24:259-268.
215. Pletjushkina, O.Y., Lyamzaev, K.G., Popova, E.N., Nepryakhina, O.K., Ivanova, O.Y., Domnina, L.V., Chernyak, B.V. and Skulachev, V.P. 2006. Effect of oxidative stress on dynamics of mitochondrial reticulum. *Biochim Biophys Acta*. 1757:518-524.
216. Podar, K. and Anderson, K.C. 2010. A therapeutic role for targeting c-Myc/Hif-1-dependent signaling pathways. *Cell Cycle*. 9:1722-1728.
217. Polster, B.M., Basanez, G., Etxebarria, A., Hardwick, J.M. and Nicholls, D.G. 2005. Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria. *J Biol Chem*. 280:6447-6454.

218. Prasmickaite, L., Kirveliėne, V., Grigaliėne, G. and Juodka, B. 1997. Uptake and phototoxicity of temoporfin in BHK and MH22 cells. *Biologija*.87-91.
219. Puthalakath, H., O'Reilly, L.A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P.N., Huntington, N.D., Hughes, P.D., Michalak, E.M., McKimm-Breschkin, J., Motoyama, N., et al. 2007. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell*. 129:1337-1349.
220. Quiogue, G., Saggi, S., Hung, H.I., Kenney, M.E., Oleinick, N.L., Lemasters, J.J. and Nieminen, A.L. 2009. Signaling From Lysosomes Enhances Mitochondria-Mediated Photodynamic Therapy In Cancer Cells. *Proc Soc Photo Opt Instrum Eng*. 7380:1-8.
221. Ramu, A. and Ramu, N. 1993. Resistance to lipophilic cationic compounds in multidrug resistant leukemia cells. *Leuk Lymphoma*. 9:247-253.
222. Rasola, A. and Bernardi, P. 2007. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis*. 12:815-833.
223. Ravikumar, B., Moreau, K. and Rubinsztein, D.C. 2010. Plasma membrane helps autophagosomes grow. *Autophagy*. 6:1184-1186.
224. Redmond, R.W. and Gamlin, J.N. 1999. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochem Photobiol*. 70:391-475.
225. Redmond, R.W. and Kochevar, I.E. 2006. Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen. *Photochem Photobiol*. 82:1178-1186.
226. Rehm, M., Huber, H.J., Hellwig, C.T., Anguissola, S., Dussmann, H. and Prehn, J.H. 2009. Dynamics of outer mitochondrial membrane permeabilization during apoptosis. *Cell Death Differ*. 16:613-623.
227. Reiners, J.J., Jr., Agostinis, P., Berg, K., Oleinick, N.L. and Kessel, D. 2010. Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. *Autophagy*. 6:7-18.
228. Reiners, J.J., Jr., Caruso, J.A., Mathieu, P., Chelladurai, B., Yin, X.M. and Kessel, D. 2002. Release of cytochrome c and activation of pro-caspase-9 following lysosomal photodamage involves Bid cleavage. *Cell Death Differ*. 9:934-944.
229. Rello-Varona, S., Stockert, J.C., Canete, M., Acedo, P. and Villanueva, A. 2008. Mitotic catastrophe induced in HeLa cells by photodynamic treatment with Zn(II)-phthalocyanine. *Int J Oncol*. 32:1189-1196.
230. Ricci, J.E., Munoz-Pinedo, C., Fitzgerald, P., Bailly-Maitre, B., Perkins, G.A., Yadava, N., Scheffler, I.E., Ellisman, M.H. and Green, D.R. 2004. Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell*. 117:773-786.
231. Richmond, R.C. and O'Hara, J.A. 1993. Effective photodynamic action by rhodamine 123 leading to photosensitized killing of Chinese hamster ovary cells in tissue culture and a proposed mechanism. *Photochem Photobiol*. 57:291-297.
232. Roberg, K., Kagedal, K. and Ollinger, K. 2002. Microinjection of cathepsin d induces caspase-dependent apoptosis in fibroblasts. *Am J Pathol*. 161:89-96.

233. Roberg, K. and Ollinger, K. 1998. Oxidative stress causes relocation of the lysosomal enzyme cathepsin D with ensuing apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes. *Am J Pathol.* 152:1151-1156.
234. Rodriguez-Enriquez, S., Kai, Y., Maldonado, E., Currin, R.T. and Lemasters, J.J. 2009. Roles of mitophagy and the mitochondrial permeability transition in remodeling of cultured rat hepatocytes. *Autophagy.* 5:1099-1106.
235. Rodriguez, M.E., Kim, J., Delos Santos, G.B., Azizuddin, K., Berlin, J., Anderson, V.E., Kenney, M.E. and Oleinick, N.L. 2010. Binding to and photo-oxidation of cardiolipin by the phthalocyanine photosensitizer Pc 4. *J Biomed Opt.* 15:051604.
236. Sackova, V., Fedorocko, P., Szilardiova, B., Mikes, J. and Kleban, J. 2006. Hypericin-induced photocytotoxicity is connected with G2/M arrest in HT-29 and S-phase arrest in U937 cells. *Photochem Photobiol.* 82:1285-1291.
237. Salet, C., Moreno, G., Ricchelli, F. and Bernardi, P. 1997. Singlet oxygen produced by photodynamic action causes inactivation of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem.* 272:21938-21943.
238. Sasnauskiene, A., Kadziauskas, J., Labeikyte, D. and Kirvelienu, V. 2009a. Rhodamine 123-mediated photodamage to mitochondrial interior does not develop hallmarks of apoptosis in MH22 cells. *Biologija.* 55:51-56.
239. Sasnauskiene, A., Kadziauskas, J., Vezelyte, N., Jonusiene, V. and Kirvelienu, V. 2009b. Apoptosis, autophagy and cell cycle arrest following photodamage to mitochondrial interior. *Apoptosis.* 14:276-286.
240. Scaffidi, P., Misteli, T. and Bianchi, M.E. 2002. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature.* 418:191-195.
241. Schinzel, A.C., Takeuchi, O., Huang, Z., Fisher, J.K., Zhou, Z., Rubens, J., Hetz, C., Danial, N.N., Moskowitz, M.A. and Korsmeyer, S.J. 2005. Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:12005-12010.
242. Sheridan, C., Delivani, P., Cullen, S.P. and Martin, S.J. 2008. Bax- or Bak-induced mitochondrial fission can be uncoupled from cytochrome C release. *Mol Cell.* 31:570-585.
243. Shi, Y., Evans, J.E. and Rock, K.L. 2003. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature.* 425:516-521.
244. Skulachev, V.P. 2006. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis.* 11:473-485.
245. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150:76-85.
246. Soldani, C. and Scovassi, A.I. 2002. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis.* 7:321-328.

247. Srere, P.A. 1969. Citrate synthase: [EC 4.1.3.7 Citrate oxaloacetate-lyase (CoA-acetylating)]. *Methods Enzymol.* 13:3-11.
248. Stoka, V., Turk, B., Schendel, S.L., Kim, T.H., Cirman, T., Snipas, S.J., Ellerby, L.M., Bredesen, D., Freeze, H., Abrahamson, M., et al. 2001. Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J Biol Chem.* 276:3149-3157.
249. Szokalska, A., Makowski, M., Nowis, D., Wilczynski, G.M., Kujawa, M., Wojcik, C., Mlynarczuk-Bialy, I., Salwa, P., Bil, J., Janowska, S., et al. 2009. Proteasome inhibition potentiates antitumor effects of photodynamic therapy in mice through induction of endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response. *Cancer Res.* 69:4235-4243.
250. Tabas, I. and Ron, D. 2011. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol.* 13:184-190.
251. Taha, T.A., Kitatani, K., Bielawski, J., Cho, W., Hannun, Y.A. and Obeid, L.M. 2005. Tumor necrosis factor induces the loss of sphingosine kinase-1 by a cathepsin B-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 280:17196-17202.
252. Tait, S.W. and Green, D.R. 2010. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11:621-632.
253. Taylor, R.C., Cullen, S.P. and Martin, S.J. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:231-241.
254. Takahashi, H., Itoh, Y., Miyauchi, Y., Nakajima, S., Sakata, I., Ishida-Yamamoto, A. and Iizuka, H. 2003. Activation of two caspase cascades, caspase 8/3/6 and caspase 9/3/6, during photodynamic therapy using a novel photosensitizer, ATX-S10(Na), in normal human keratinocytes. *Arch Dermatol Res.* 295:242-248.
255. Tan, Y., Dourdin, N., Wu, C., De Veyra, T., Elce, J.S. and Greer, P.A. 2006. Ubiquitous calpains promote caspase-12 and JNK activation during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 281:16016-16024.
256. Teiten, M.H., Bezdetsnaya, L., Morliere, P., Santus, R. and Guillemin, F. 2003. Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are the preferential sites of Foscan localisation in cultured tumour cells. *Br J Cancer.* 88:146-152.
257. Thorburn, J., Horita, H., Redzic, J., Hansen, K., Frankel, A.E. and Thorburn, A. 2009. Autophagy regulates selective HMGB1 release in tumor cells that are destined to die. *Cell Death Differ.* 16:175-183.
258. Trapp, S. and Horobin, R.W. 2005. A predictive model for the selective accumulation of chemicals in tumor cells. *Eur Biophys J.* 34:959-966.
259. Triesscheijn, M., Ruevekamp, M., Aalders, M., Baas, P. and Stewart, F.A. 2004. Comparative sensitivity of microvascular endothelial cells, fibroblasts and tumor cells after in vitro photodynamic therapy with meso-tetra-hydroxyphenyl-chlorin. *Photochem Photobiol.* 80:236-241.
260. Trushina, O.I., Novikova, E.G., Sokolov, V.V., Filonenko, E.V., Chissov, V.I. and Vorozhtsov, G.N. 2008. Photodynamic therapy of virus-associated precancer and early stages cancer of cervix uteri. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 5:256-259.

261. Tsujimoto, Y. and Shimizu, S. 2007. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis*. 12:835-840.
262. Turk, B. and Stoka, V. 2007. Protease signalling in cell death: caspases versus cysteine cathepsins. *FEBS Lett*. 581:2761-2767.
263. Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., et al. 2008. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *Embo J*. 27:433-446.
264. van der Bruggen, P. and Van den Eynde, B.J. 2006. Processing and presentation of tumor antigens and vaccination strategies. *Curr Opin Immunol*. 18:98-104.
265. Vancompernelle, K., Van Herreweghe, F., Pynaert, G., Van de Craen, M., De Vos, K., Totty, N., Sterling, A., Fiers, W., Vandenabeele, P. and Grooten, J. 1998. Atractyloside-induced release of cathepsin B, a protease with caspase-processing activity. *FEBS Lett*. 438:150-158.
266. Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T. and Kroemer, G. 2010. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11:700-714.
267. Verma, A., Facchina, S.L., Hirsch, D.J., Song, S.Y., Dillahey, L.F., Williams, J.R. and Snyder, S.H. 1998. Photodynamic tumor therapy: mitochondrial benzodiazepine receptors as a therapeutic target. *Mol Med*. 4:40-45.
268. Vittar, N.B., Awruch, J., Azizuddin, K. and Rivarola, V. 2010. Caspase-independent apoptosis, in human MCF-7c3 breast cancer cells, following photodynamic therapy, with a novel water-soluble phthalocyanine. *Int J Biochem Cell Biol*. 42:1123-1131.
269. Waster, P.K. and Ollinger, K.M. 2009. Redox-dependent translocation of p53 to mitochondria or nucleus in human melanocytes after UVA- and UVB-induced apoptosis. *J Invest Dermatol*. 129:1769-1781.
270. Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B. and Korsmeyer, S.J. 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. 292:727-730.
271. Weissig, V., Cheng, S.M. and D'Souza, G.G. 2004. Mitochondrial pharmaceuticals. *Mitochondrion*. 3:229-244.
272. Weyergang, A., Berg, K., Kaalhus, O., Peng, Q. and Selbo, P.K. 2009. Photodynamic therapy targets the mTOR signaling network in vitro and in vivo. *Mol Pharm*. 6:255-264.
273. Wen, L.Y., Bae, S.M., Chun, H.J., Park, K.S. and Ahn, W.S. 2011. Therapeutic effects of systemic photodynamic therapy in a leukemia animal model using A20 cells. *Lasers Med Sci*.
274. Werman, A., Werman-Venkert, R., White, R., Lee, J.K., Werman, B., Krelin, Y., Voronov, E., Dinarello, C.A. and Apte, R.N. 2004. The precursor form of IL-1alpha is an intracrine proinflammatory activator of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:2434-2439.

275. Werneburg, N.W., Guicciardi, M.E., Bronk, S.F. and Gores, G.J. 2002. Tumor necrosis factor-alpha-associated lysosomal permeabilization is cathepsin B dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 283:G947-956.
276. Werneburg, N.W., Guicciardi, M.E., Bronk, S.F., Kaufmann, S.H. and Gores, G.J. 2007. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand activates a lysosomal pathway of apoptosis that is regulated by Bcl-2 proteins. *J Biol Chem.* 282:28960-28970.
277. Willis, S.N., Fletcher, J.I., Kaufmann, T., van Delft, M.F., Chen, L., Czabotar, P.E., Ierino, H., Lee, E.F., Fairlie, W.D., Bouillet, P., et al. 2007. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science.* 315:856-859.
278. Wu, S., Zhou, F., Zhang, Z. and Xing, D. 2011. Bax is essential for Drp1-mediated mitochondrial fission but not for mitochondrial outer membrane permeabilization caused by photodynamic therapy. *J Cell Physiol.* 226:530-541.
279. Xue, L., Fletcher, G.C. and Tolkovsky, A.M. 2001a. Mitochondria are selectively eliminated from eukaryotic cells after blockade of caspases during apoptosis. *Curr Biol.* 11:361-365.
280. Xue, L.Y., Chiu, S.M., Azizuddin, K., Joseph, S. and Oleinick, N.L. 2007. The death of human cancer cells following photodynamic therapy: apoptosis competence is necessary for Bcl-2 protection but not for induction of autophagy. *Photochem Photobiol.* 83:1016-1023.
281. Xue, L.Y., Chiu, S.M. and Oleinick, N.L. 2001b. Photochemical destruction of the Bcl-2 oncoprotein during photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4. *Oncogene.* 20:3420-3427.
282. Zamzami, N., Susin, S.A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez-Monterrey, I., Castedo, M. and Kroemer, G. 1996. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med.* 183:1533-1544.
283. Zhao, M., Brunk, U.T. and Eaton, J.W. 2001. Delayed oxidant-induced cell death involves activation of phospholipase A2. *FEBS Lett.* 509:399-404.
284. Zhao, M., Eaton, J.W. and Brunk, U.T. 2000. Protection against oxidant-mediated lysosomal rupture: a new anti-apoptotic activity of Bcl-2? *FEBS Lett.* 485:104-108.
285. Zhuang, S., Lynch, M.C. and Kochevar, I.E. 1999. Caspase-8 mediates caspase-3 activation and cytochrome c release during singlet oxygen-induced apoptosis of HL-60 cells. *Exp Cell Res.* 250:203-212.
286. Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F. and Kroemer, G. 2008. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol.* 8:59-73.
287. Zitvogel, L., Kepp, O. and Kroemer, G. 2010. Decoding cell death signals in inflammation and immunity. *Cell.* 140:798-804.
288. Zou, H., Li, Y., Liu, X. and Wang, X. 1999. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem.* 274:11549-11556.

## Publikacijų disertacijos tema sąrašas

1. **A. Sasnauskiene**, J. Kadziauskas, N. Vezelyte, V. Jonusiene, V. Kirveliėne. Apoptosis, autophagy and cell cycle arrest following photodamage to mitochondrial interior // *Apoptosis*. 2009, 14: 276-286.
2. **A. Sasnauskiene**, J. Kadziauskas, D. Labeikyte, V. Kirveliėne. Rhodamine 123-mediated photodamage to mitochondrial interior does not develop hallmarks of apoptosis in MH22 cells // *Biologija*. 2009, 55: 51-56.
3. **A. Sasnauskiene**, J. Kadziauskas, N. Vezelyte, V. Jonusiene, V. Kirveliėne. Damage targeted to the mitochondrial interior induces autophagy, cell cycle arrest and, only at high doses, apoptosis // *Autophagy*. 2009, 5: 743-744.

## Pristatymai konferencijose

1. N. Vėželytė, **A. Sasnauskienė**, V. Kirvelienė (2009). Cell death induced by photodynamic treatment targeted to lysosomes // 17<sup>th</sup> ECDO Euroconference, Paris, France, September 23-26, Abstract book, P-237.
2. **A. Sasnauskienė**, V. Kirvelienė (2008). Programmed cell death induced by mitochondria-targeted photodynamic treatment // 16<sup>th</sup> ECDO Euroconference on apoptosis, Bern, Switzerland, September 6-9, Programme and book of Abstracts, P-140.
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.
5. **A. Sadauskaite**, J. Kadziauskas, V. Kirveliėne (2006). On cellular effects of photosensitized damage by cationic dyes // 14<sup>th</sup> European Bioenergetics Conference, Moscow, Russian Federation, July 22-27, *Biochim. Biophys. Acta: Astract Book*, V. 14, p. 511.



## **PADĖKA**

Noriu kuo nuoširdžiausiai padėkoti visiems padėjusiems ruošti šį darbą, pasidalinusiems žiniomis, idėjomis ir tiesiog palaikusiems.

Pirmiausia dėkoju darbo vadovei prof. dr. Vidai Kirvelienei už galimybę dirbti ląstelės biologijos laboratorijoje ir puikų vadovavimą. Prof. dr. Jurgiui Kadziauskui už patarimus ruošiant disertaciją .

Mūsų laboratorijos sielai Vidai Piskarskienei už šilumą ir laimingas ląsteles. Neringai Vėželytei už pagalbą eksperimentuojant. Dr. Daivai Dabkevičienei už kasdienę pagalbą ir biostatistikos pamokas. Dr. Violetai Jonušienei už patarimus molekulinės biologijos klausimais ir ląstelių analizę tėkmės citometru. Dėkoju visam laboratorijos kolektyvui už puikią atmosferą.

Dėkoju visiems katedros darbuotojams už draugiškumą, dalijimąsi žiniomis, laboratorine įranga ir kitomis vertybėmis. Dr. Danutei Labeikytei už patarimus taikant baltymų analizės metodus. Dr. Lidai Bagdonienei už skirtą laiką mano darbui ir vertingas pastabas.

Dėkoju Vilniaus universiteto prof. dr. Dainiui Characiejui ir Onkologijos Instituto darbuotojai Rasai Purvinienei už konsultavimą ir pagalbą atliekant ląstelės ciklo analizės eksperimentus.

Nacionalinės Veterinarijos Laboratorijos skyriaus vedėjui dr. Vaclovui Jurgelevičiui už leidimą naudotis kiekybinės PGR aparatu.

Prof. Raymond Bonnett (University of London) už padovanotą mTHPC.

Už finansinę paramą dėkoju LVMSF.

Dėkoju Sofijai už visokeriopą pagalbą ir prieglobstį. Tėveliui, sesėms ir draugams už palaikymą. Ypatingai dėkoju Giedriui ir Mykoliukui.