

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

BIOLOGICKÉ ÚČINKY FOTODYNAMICKÉ  
TERAPIE NÁDORŮ

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Miloslav Macháček Ph.D.

Hradec Králové 2017

Michael Pasák

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěl poděkovat svému vedoucímu práce Mgr. Miloslavu Macháčkovi Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky při zpracování této práce.

### **Prohlášení**

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne .....

.....

podpis

# 1 OBSAH

1	OBSAH.....	4
2	ÚVOD.....	6
3	TEORETICKÁ ČÁST.....	7
3.1	Fotodynamická terapie.....	7
3.1.1	Historie.....	7
3.1.2	Mechanismus PDT.....	9
3.1.3	Fotosensitizéry.....	10
3.1.4	Zdroje světla pro PDT.....	11
3.2	Reaktivní formy kyslíku.....	12
3.2.1	Vznik ROS.....	12
3.2.2	Působení ROS.....	13
3.2.3	Zástupci ROS.....	14
3.3	Typy buněčné smrti.....	15
3.3.1	Programovaná buněčná smrt.....	16
3.3.2	Apoptóza.....	16
3.3.2.1	Vnější cesta apoptózy.....	17
3.3.2.2	Vnitřní cesta apoptózy.....	17
3.3.2.3	Apoptóza způsobená PDT.....	19
3.3.3	Nekróza.....	22
3.3.3.1	Nekróza a ROS.....	22
3.3.3.2	Nekróza při PDT.....	25
3.3.4	Autofagie.....	25
3.3.4.1	Autofagie při PDT.....	26

3.4	Mechanismus destrukce tumoru v PDT .....	27
3.4.1	Přímý efekt PDT .....	27
3.4.2	Vaskulární efekt.....	28
3.4.3	Efekt PDT na imunitní systém.....	28
4	ZÁVĚR.....	31
5	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	32

## 2 ÚVOD

Práce Biologické účinky fotodynamické terapie zahrnuje celkový pohled na fotodynamickou terapii (PDT), od jejího vývoje, přes nejdůležitější části pro ni potřebné, až po samotné děje probíhající během PDT na úrovni buňky.

Nejdůležitější části pro správný průběh PDT jsou fotosensitizer (PS), záření vhodné vlnové délky a kyslík. Právě kyslík a reaktivní sloučeniny kyslíku vznikající po aplikaci záření jsou zodpovědné za poškození nádorových buněk.

PDT se jeví jako velmi vhodná pro léčbu nemaligních i maligních onemocnění. Dle klinických studií je PDT velmi účinná při léčbě časnějších stádií rakoviny, nepoškozuje okolní tkáň a má také dobrý kosmetický efekt.

Díky možnosti různých kombinací použití PS, vhodného záření a rovněž díky své rozmanitosti mechanismu účinku přímo na nádorovou buňku, cévní zásobení nádoru nebo efektu na imunitní systém je stále předmětem výzkumu. Nový vývoj PS a jejich kombinace v PDT vedou ke změnám ve fungování buněk, z nichž mnohé ještě nebyly zcela objasněny.

## 3 TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 Fotodynamická terapie

Fototerapie zahrnuje ozáření lidského těla světlem a jedná se např. o léčbu novorozenecké žloutenky modrým nebo zeleným světlem. Fotochemoterapie kombinuje fotoaktivní léčivo tzv. fotosensitizer (PS) se světelným zářením (Silva et al. 2006).

Fotodynamická terapie (PDT) může být definována jako distribuce netoxické substance známé jako PS pacientovi a jeho následující ozáření světlem v oblasti VIS nebo UV-A (Castano et al. 2004).

PDT se skládá především ze 3 hlavních komponent: PS, světlo a molekulární kyslík ( $^3\text{O}_2$ ). Žádná z těchto 3 komponent není toxická, ale dohromady zprostředkovávají fotochemickou reakci, která vyúsťuje v tvorbu především vysoce reaktivního singletového kyslíku ( $^1\text{O}_2$ ). Ten může rychle způsobit značné poškození buňky vedoucí k její apoptóze nebo nekróze.

Protinádorový efekt PDT spočívá ve 3 základních mechanismech: přímý cytotoxický účinek na nádorovou buňku, rozrušení cévního zásobení nádoru a započetí zánětlivé reakce, která může vést až k rozvoji systémové imunity.

Pro účinnou PDT je potřeba správného množství PS, důležitý je rovněž čas mezi distribucí PS do těla a celkovou dávkou ozáření (Agostinis et al. 2011).

#### 3.1.1 Historie

Termín fotodynamická reakce byl poprvé objasněn r.1900 studentem medicíny Oscarem Raabem a profesory Jodlbauerem, Jesionickem a von Tappeinerem. Interakci PS, kterým bylo v tomto případě fluorescenční barvivo akridin, spolu se zářením objevil náhodou. Raab spolu se svým profesorem přispěli k zavedení PDT do klinické praxe s pozitivními výsledky na kožní tumory (Allison & Sibata 2010).

Jeden z dalších kroků ve vývoji fototerapie uskutečnil v roce 1901 dánský lékař Niels Finsen. Ten úspěšně použil fototerapii k léčbě pravých neštovic červeným světlem

a k léčbě kožní tuberkulózy UV zářením. Za svůj přínos byl v roce 1903 oceněn Nobelovou cenou (Ackroyd et al. 2001).

Von Tappeiner roku 1903 zjistil, že podání eozinu následované ozářením vede ve tkáni k reakcím závislým na kyslíku, což vedlo k pokrokům v léčbě kožních nemocí jako jsou lupus vulgaris, syfilis a karcinomy kůže. Tento úkaz nazval fotodynamickou reakcí (Kim et al. 2015).

V 60.letech 20.století Samuel Schwartz izoloval tumor lokalizující směs, která byla pojmenována HpD - hematoporfyrinové deriváty. Později na něho navázal Richard Lipson, který začal experimentovat s HpD a zjistil, že HpD lze použít jako PS k destrukci tumorové tkáně.

V 70.letech 20.století Weishaupt et al. identifikovali singletový kyslík jako hlavní cytotoxický produkt fotochemické reakce (Macdonald & Dougherty 2001).

V roce 1978, Dr. Tom Dougherty zaznamenal úspěch při léčbě 25 pacientů s různě pokročilými stádii karcinomů kůže. K léčbě byl použit PS HpD. Po 24-168 hodinách od podání následovalo ozáření červeným světlem z xenonové lampy. Došlo k regresi 98 malignit. Třináct malignit projevilo částečnou regresi a pouze 2 malignity byli zcela rezistentní. Jednalo se o spinocelulární a bazocelulární karcinom a metastázové léze z primárních tumorů prsu, tlustého střeva a endometria. Vedlejší efekty jako edémy, popáleniny a erytém byly redukovány díky zvětšení intervalu mezi podáními PS a ozářením. Studie prokázala PDT jako úspěšnou v léčbě různých maligních tumorů (Ackroyd et al. 2001).

Tento úspěch zapříčinil pozitivní pohled na PDT. PDT tak mohla být rozšířena na léčbu různých typů tumorů jako tumor mozku, jícnu, plic nebo krku (Oniszczuk et al. 2016).

Thomas Dougherty zkoumal HpD, které je známo pro svou absorpci v červeném spektru viditelného světla, která má větší penetrační hloubku do kůže a selektivně se zadržovalo v tumorové tkáni. Po několika letech strávených usilovnými izolacemi a identifikacemi různých frakcí HpD byla vytvořena purifikovaná verze pojmenovaná Photofrin 1 (Macdonald & Dougherty 2001).



Porfimer Sodný (Photofrin<sup>®</sup>) byl do klinické praxe poprvé zaveden roku 1993 v Kanadě, kde byl schválen pro léčbu rakoviny močového měchýře (Wang et al. 2013). V následujících letech byl v USA Photofrin<sup>®</sup> povolen pro léčbu časných i pozdních stádií nádorů plic a jícnu a časem povolen k léčbě nejrůznějších malignit i v dalších zemích. Od legálního zavedení Photofrinu do klinické praxe je metoda v intenzivním vývoji včetně vývoje nových PS (Macdonald & Dougherty 2001). Roku 1999 vládní agentura Food and Drug Administration povolila PDT k léčbě prekancerózních lézí obličeje (Oniszczyk et al. 2016).

### 3.1.2 Mechanismus PDT

PDT je založena na buněčné smrti díky kombinaci PS, viditelného světla a O<sub>2</sub>. Léčba spočívá v aplikaci PS, který se selektivně akumuluje v tkáni postižené nádorem následované aplikací světla o vhodné vlnové délce (obvykle světla červeného spektra, které proniká hlouběji do tkáně). Energie ze světlem ozářeného PS je přenesena zejména na molekulární kyslík (<sup>3</sup>O<sub>2</sub>), což dává vzniknout singletovému kyslíku (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) a ostatním vysoce reaktivním sloučeninám kyslíku (ROS) (Juarranz et al. 2008).

Po absorpci fotonů je PS aktivován do prvního excitovaného singletového stavu. Tento stav trvá v řádu nanosekund a může ztratit nabytou energii emitací záření (fluorescencí) nebo se energie přemění v teplo. Excitovaný singletový stav PS může rovněž podstoupit mezisystémový přechod na tripletový stav, který má dobu trvání delší než singletový stav (v řádu mikrosekund). PS v excitovaném tripletovém stavu může podstoupit dva typy fotoreakcí.

V prvním typu reakce může PS v excitovaném tripletovém stavu přenášet atom vodíku či elektron na biomolekuly (lipidy, proteiny) a přímo tak interagovat s buněčnou stěnou nebo tvořit radikály, které interagují s kyslíkem a generují ROS produkty jako peroxid vodíku, superoxidový anion radikál nebo hydroxylový radikál. ROS produkty, zejména hydroxylový radikál, poté způsobí poškození buňky.

U druhého typu reakce se energie PS v excitovaném tripletovém stavu přenáší přímo na <sup>3</sup>O<sub>2</sub>, který je sám o sobě v tripletovém stavu, čímž se převede na excitovaný vysoce reaktivní <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Tento singletový kyslík ihned reaguje s mnoha biologickými strukturami a je primárně zodpovědný za buněčnou smrt (Castano et al. 2004; Juarranz et al. 2008).

Buněčná smrt způsobená oběma typy reakcí závisí ovšem na mnoha faktorech jako jsou typ PS, jeho subcelulární lokalizace, koncentrace substrátů a přítomnost  $^3\text{O}_2$  (Juarranz et al. 2008).

Životnost  $^1\text{O}_2$  je velmi krátká (přibližně 10-320 ns), což limituje difúzi v buňce na 10-55 nm. Fotodynamické poškození buňky tedy závisí na blízké lokalizaci PS (Agostinis et al. 2011).

### 3.1.3 Fotosensitizéry

PS je chemická sloučenina, která může být excitována světlem o specifické vlnové délce. V klinické praxi nalézáme látky odvozené od celé řady struktur – většina z nich vychází z porfyrinu a jeho chemických analog. Komplex porfyrinů je i první oficiálně povolený PS Photofrin<sup>®</sup>. Porfyriny jsou součástí první i druhé generace PS. První generace PS je známa pro svou nízkou penetrační hloubku a dlouhodobý zůstatek v organismu. Druhá generace PS, která obsahuje deriváty porfyrinů, chlorofylu a barviva má naproti tomu lepší lokalizaci v nádoru a lépe se odstraňuje ze zdravých tkání a plazmy (Wang et al. 2013).

V polovině 20.stol. byly nejpoužívanějšími PS deriváty hematoporfyrinu, což je porfyrin vytvořený kyselou hydrolýzou hemu. Avšak endogenní porfyriny mohou způsobit vážnou fototoxicitu s dlouhotrvající fotosensitivitou.

Roku 1990 bylo pro aplikaci v PDT použito proléčivo jako prekurzor PS, což znamenalo konec mnohých omezení, která měla dřívější PDT. Šlo o kyselinu 5-aminolevulovou (ALA). Po lokální aplikaci ALA je důležitý čas mezi metabolizací na protoporfyrin IX (PpIX) a akumulací podané látky před její aktivací viditelným světlem. Výhoda lokální PDT je možnost léčit rozsáhlé léze tkáně současně, méně invazivně, s větší snášenlivostí a s excelentními kosmetickými výsledky. PDT se čím dál více využívá v dermatologii. PDT v kombinaci s ALA je v současné době hojně využívána pro léčbu různorodých kožních tumorů a infekčních nebo zánětlivých kožních nemocí (Kim et al. 2015).

PS je obvykle užíván intravenózně (*i.v.*), přičemž následuje tzv. „drug-light interval“ (DLI), což je časový interval nutný k akumulaci PS uvnitř tumoru.

Světlo může být k nádorové tkáni distribuováno ve formě přesného paprsku zaměřeného na danou tkáň (lze provádět endoskopicky) nebo vložением optických vláken do nádorové tkáně u techniky nazývané intersticiální distribuce záření. Mnoho různých typů fotoaktivních molekul bylo zkoumáno a syntetizováno jako možné PS pro PDT. Tyto PS jsou většinou založeny na tetrapyrolovém jádře. Řadíme sem např. porfyriny, chloriny, bakteriochloriny a ftalocyaniny. Důležitá je zde silná absorpce při vlnových délkách nad 650 nm, které se kryjí s tzv. optickým oknem tkáně, které umožňuje vyšší penetraci světla. Efektivní PS by měl mít hlavní absorpční pás v oblasti 650-800 nm. Chemická struktura PS může být uzpůsobena pro lepší selektivitu a pronikání do nádorových tkání, tím že se PS naváže (kovalentně nebo nekovalentně) na monoklonální protilátky, specifické peptidy či jiné cílicí struktury. Hojně užívanou alternativou je ALA jako biochemický prekurzor pro endogenní PS PpIX (Silva et al. 2015).

### **3.1.4 Zdroje světla pro PDT**

Výběr správného zdroje záření pro PDT závisí na lokalizaci tumoru, distribuované dávce záření a výběru PS. Účinnost PDT se tedy také odvíjí od distribuce záření. V PDT se používá již široké spektrum koherentních a nekoherentních zdrojů světla (Brancaleon & Moseley 2002).

První zdroje používané v PDT byly konvenční lampy, kde výstup byl zřetelně vymezený použitím filtrů. Nedostatek těchto zdrojů byl v obtížně vypočitatelné dávce světla a ve značné tepelné složce záření. Tyto nekoherentní zdroje (produkující široké spektrum vlnových délek) jsou však lákavé vzhledem k jejich jednoduchému použití a relativně nízké ceně. Nicméně nejvíce používané a praktické zdroje záření jsou lasery, jelikož produkují monochromatické záření o známé vlnové délce, dávka záření je jednoduše vypočitatelná a záření může být distribuováno optickými vlákny pro přesně zacílenou léčbu. Laser může být rovněž měněn v závislosti na použitém PS a dle potřebné hloubky penetrace do nekrotizující tkáně. Mezi nejčastěji používané lasery se řadí argonový laser, laser s optickým materiálem KTP (obsahuje krystal draselno-titaničitého fosfátu), laser s parami kovů a diodové lasery. Argonový laser je široce používaný, protože přidáním určitého filtru do systému je možno měnit vlnovou délku, která odpovídá maximální absorpci PS, což umožňuje současné použití rozdílných PS a jednoho laseru (Ackroyd et al. 2001).

Detailní znalost penetrační hloubky je nezbytná pro obdržení žádaného terapeutického efektu a pro vyhnutí se nežádoucím vedlejším efektům PDT. Penetrační hloubka je vysoce závislá na vlnové délce a barvě kůže. Pro bledou, světlou a velmi světlou kůži se jeví jako nejvhodnější použití zelených a modrých laserů, avšak tyto nejsou vhodné pro tmavší kůži, jelikož tmavší kůže vede k vysokým absorpcím záření. Červené lasery jsou v PDT naopak aplikovatelné na všechny typy kůže. Při vlnové délce 635 nm měly všechny typy kůže nejmenší ztrátovost účinku laseru (Mustafa & Jaafar 2013).

Absolutní penetrace pro světlo závisí na optických vlastnostech tkáně a na úhlu dodávaného záření. Optická penetrační hloubka (OPD) je definována jako hloubka, při které je intenzita šířícího se záření zeslabena na přibližně 37% své původní hodnoty (při přechodu ze vzduchu do tkáňového prostoru). Například u mozkové tkáně je OPD při 635 nm 800  $\mu$ m, zatímco u močového měchýře je 4 mm. Dle tkáňových modelů záření vlnové délky 600-700 nm proniká o 50-200 % více než záření vlnové délky 400-500 nm. PDT je obvykle vykonáváno při vlnových délkách větších než 620 nm, kdy může být léčeno široké spektrum tkáňových malignit (Brancaleon & Moseley 2002).

## **3.2 Reaktivní formy kyslíku**

Mezi ROS řadíme radikálové (obsahují nepárový elektron) i neradikálové sloučeniny s vysokou reaktivitou, které však mohou některé radikálové sloučeniny produkovat (Ledvina a kol. 2005).

### **3.2.1 Vznik ROS**

Bylo prokázáno, že 90 % ROS je v eukaryotických buňkách produkováno mitochondriemi. Mnoho ROS vzniká v buňce při úniku elektronů z mitochondriálního elektron-transportního řetězce, tedy hlavně z koenzymu Q a jejich interakcí s  $^3\text{O}_2$ . Unikající elektrony reagují s kyslíkem za vzniku superoxidového anion radikálu ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), který je později spontánně nebo enzymaticky přeměněn na peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a následně na hydroxylový radikál ( $\text{OH}^{\cdot}$ ). ROS rovněž vznikají v ER, kde je jejich produkce spjata s hydroxylačním systémem cytochromu P450. Z tohoto systému rovněž

unikají elektrony a váží se na  $^3\text{O}_2$  opět za vytvoření  $\text{O}_2^{\cdot-}$  a produktů jeho transformace (Lushchak 2014).

Oxidační stres je definován jako nadbytek reaktivních sloučenin kyslíku a dusíku (RONS) oproti antioxidantům tvořících obranou síť buňky. Lipoperoxidace indukovaná RONS je obecně zodpovědná za patologické stavy jakými jsou např. kardiovaskulární onemocnění, neurodegenerativní onemocnění, diabetes mellitus nebo za oxidaci LDL-lipoproteinů vedoucí ke vzniku aterosklerotických plátů (Pinchuk & Lichtenberg 2014).

Oxidační poškození lipidů (lipoperoxidace) je vyvolána nejčastěji  $\text{OH}^{\cdot}$ . Terčem je fosfolipidová dvojvrstva biologických membrán, kde jsou cílem hlavně nenasycené mastné kyseliny jako jsou kyselina linolová a linolenová. Membrány postižené lipoperoxidací vykazují změnu permeability. Míru lipoperoxidace lze určit stanovením vznikajícího produktu malondialdehydu. Vzniklé peroxidy se likvidují v těle glutathionperoxidasou (GPx). Viditelným projevem lipoperoxidace je vytváření pigmentů ve stařeckých skvrnách – tzv. lipofuscinu (Ledvina a kol. 2005).

Obvykle je za oxidační stres pokládána nerovnováha mezi volnými radikály, která vede ke zvýšení ROS a následnému ovlivnění mnoha procesů v buňce. Jako markery oxidačního stresu slouží oxidačně modifikované lipidy, proteiny, nukleové kyseliny a změny v aktivitě antioxidantů a enzymů. Hlavní problém je poškození aktivity enzymů, které závisí na intenzitě oxidačního stresu. Intenzita oxidačního stresu je tak patrná zejména při poškozené aktivitě enzymů (Lushchak 2014).

Dalším zdrojem ROS jsou v našem těle fagocytující buňky. Během fagocytózy se spotřebuje vysoký počet molekul kyslíku, což se označuje jako respirační vzplanutí (Ledvina a kol. 2005).

### **3.2.2 Působení ROS**

ROS mohou být tvořeny exogenními i endogenními stimuly. Endogenní produkce ROS (hlavně  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) je způsobena převážně elektrony unikajícími z elektron-transportního řetězce mitochondrií. Dvě hlavní místa pro produkci  $\text{O}_2^{\cdot-}$  jsou komplexy I a III dýchacího řetězce. Rovněž mohou být produkovány NADPH-oxidasami lokalizovanými v membráně či enzymatickou aktivací cytochrom-P450-reduktasy.

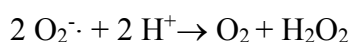
$O_2^{\cdot-}$  je rychle přeměňován na  $O_2$  a  $H_2O_2$  superoxid-dismutasou (SOD).  $H_2O_2$  může být redukován železnatými nebo měďnatými ionty za vytvoření  $OH^{\cdot}$  skrze Fentonovu reakci.  $OH^{\cdot}$  je vysoce reaktivní a škodlivý pro biologické makromolekuly.  $OH^{\cdot}$  i  $H_2O_2$  jsou detoxikovány antioxidačními enzymy jako jsou kataláza a GPx (Redza-Dutordoir & Averill-Bates 2016).

ROS mohou způsobovat redoxní změny proteinů (enzymů), v závislosti na přítomnosti thiolových skupin (SH-), konformaci či intenzitě působícího oxidačního stresu. Redoxní změny enzymů vedou k jejich inaktivaci. Například  $H_2O_2$  oxiduje cystein v Ras molekule a způsobí tak inhibici ligand-receptorové interakce v enzymu (Manda et al. 2009).

### **3.2.3 Zástupci ROS**

#### ***Superoxidový anion radikál ( $O_2^{\cdot-}$ )***

Jedná se o produkt mitochondriálního respiračního řetězce a reakcí katalyzovaných NADPH-oxidasou.  $O_2^{\cdot-}$  podléhá dismutaci na  $H_2O_2$  katalyzovanou antioxidačním enzymem SOD. Jelikož SOD detoxifikuje první ROS vzniklé z respiračního vzplanutí, zabraňuje tak rozšíření oxidačního stresu.



$O_2^{\cdot-}$  reaguje nejčastěji sám se sebou (spontánní dismutace) nebo s oxidem dusnatým za tvorby toxického peroxynitritu.  $O_2^{\cdot-}$  inaktivuje enzymy s Fe-S klastry, čímž uvolňuje  $Fe^{2+}$  účastníci se Fentonovy reakce vedoucí k hydroxylovým radikálům. Rovněž iniciuje lipoperoxidaci nenasycených mastných kyselin. Díky své malé reaktivitě může difundovat z místa své tvorby a způsobovat oxidační stres v celé buňce (Manda et al. 2009).

#### ***Peroxid vodíku ( $H_2O_2$ )***

$H_2O_2$  je tvořen dismutací  $O_2^{\cdot-}$  v reakci katalyzované SOD.  $H_2O_2$  je rychle přeměněn katalásou na vodu a kyslík.  $H_2O_2$  však dává vzniknout více toxickým ROS jako jsou  $OH^{\cdot}$  (Fentonova a Haber-Weissova reakce) a kyselina chlorná (myeloperoksidasou katalyzovaná reakce). Rovněž interaguje s lipidy, proteiny

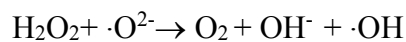
a nukleovými kyselinami. Díky snížené reaktivitě a rozpustnosti v lipidech může pronikat do a ven z buněk, skrz tkáně a interagovat tak mimo místo svého vzniku (Manda et al. 2009).

### ***Hydroxylový radikál ( $\cdot\text{OH}$ )***

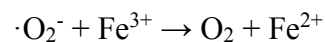
Je tvořen Fentonovou reakcí:



A rovněž i Haber-Weissovou reakcí:



Spojenou s redukcí železitých iontů:



$\cdot\text{OH}$  nemůže být eliminován enzymatickou reakcí, a je tedy neutralizován reakcí s oxidovatelnou sloučeninou ve svém okolí.  $\cdot\text{OH}$  může reagovat s  $\text{H}_2\text{O}_2$  v přítomnosti  $\text{Fe}^{3+}$  za vzniku  $\cdot\text{O}_2^-$ . Je extrémně reaktivní a reaguje s mnoha buněčnými elementy – nukleové kyseliny, lipidy či proteiny (Manda et al. 2009).

### ***Singletový kyslík ( $^1\text{O}_2$ )***

Singletový kyslík je společný název pro 2 metastabilní stavy molekulárního kyslíku s vyšší energií než molekulární kyslík v základním tripletovém stavu. Singletový stav kyslíku má vyšší energii než tripletový stav. Reaguje s buněčnými proteiny a lipidy, může existovat delší dobu v buňce a přecházet skrz buněčnou membránu do extracelulárního prostoru (Manda et al. 2009).

## **3.3 Typy buněčné smrti**

Na molekulární úrovni destrukce buňky PDT je nevratné poškození plazmatické membrány a vnitřních membrán mitochondrie, lysozomů, Golgiho aparátu (GA) a Endoplazmatického retikula (ER) (Buytaert et al. 2007). Rozsah a způsob buněčné smrti může být ovlivněn koncentrací kyslíku, subcelulární lokalizací

a fyzikálně-chemickými vlastnostmi PS. Dále intenzitou použitého světla a jeho vlnové délky (Castano et al. 2005b).

Mezi letální mechanismy způsobené fotosenzitizačním procesem patří 3 hlavní typy buněčné smrti: apoptóza, nekróza a buněčná smrt spojená s autofagií. Obecně lze říci, že PS lokalizované v mitochondriích nebo ER indukují apoptózu, zatímco PS účinkující v plazmatické membráně nebo lysosomech mohou zablokovat apoptotickou cestu a předurčit tím buňku k nekróze. Naproti tomu autofagie vyvolaná PDT může být pokus opravit a zachránit fotosenzitivní reakcí poškozené klíčové organely (Buytaert et al. 2007).

### **3.3.1 Programovaná buněčná smrt**

Programovaná buněčná smrt (PCD) je definovaná jako vrozená forma buněčné "sebevraždy" nastávající v předem určeném čase a místě po dobu embryonálního vývoje. Morfologicky bývala buněčná smrt rozdělována na tři typy: Typ I charakterizovaný fenotypickými změnami zahrnujícími kondenzaci jádra a celkovou buněčnou regresi (odpovídá apoptóze). Typ II je popisován jako pohlcení vlastních organel lysosomy s přítomností autofagických vakuol (odpovídá autofagii). Typ III je charakterizován výrazným zvětšením objemu buňky a rychlou ztrátou integrity plazmatické membrány (odpovídá nekróze). Zmíněné 3 typy buněčné smrti hrají klíčovou úlohu v normálním rozvoji buňky, tkáňové homeostáze a v eliminaci abnormálních či poškozených buněk (Buytaert et al. 2007).

### **3.3.2 Apoptóza**

Apoptóza je programovaná smrt buňky, která se vyskytuje u mnohobuněčných organismů. Je podmínkou pro správnou mitotickou aktivitu buněk a pro odstranění buněk, které představují hrozbu pro organismus. Charakterizuje jí fragmentace jádra spolu s fragmentací DNA, kondenzací chromatinu a svaštěním buňky (Wang et al. 2013).

Fyziologicky je apoptóza iniciována snížením růstových faktorů nebo interakcí cytokinů a jiných ligandů s receptory na povrchu buňky. Po iniciaci signální kaskády z povrchu buňky a nebo z místa jejího poškození se tato rozdělí na několik menších kaskád, které vedou k finální fázi apoptózy, během které se aktivují hydrolytické



enzymy jako proteasy či nukleasy a způsobí morfologické změny buňky (Oleinick et al. 2002).

Mechanismus apoptózy zahrnuje energeticky dependentní kaskádu dějů na molekulární úrovni. U apoptózy můžeme rozeznat 2 hlavní cesty – vnější (přes receptory smrti) a vnitřní, mitochondriální (Elmore 2007). Obě se sbíhají v aktivaci efektorových kaspas jako jsou kaspasy 3 a 7, vedoucí ke kondenzaci chromatinu, fragmentaci chromozomální DNA a degradaci cytoskeletálních proteinů (Rastogi et al. 2009). Kaspasy se v buňce vyskytují v neaktivní formě jako tzv. prokaspasy a jejich postupná aktivace jinou kaspasou vede k amplifikaci apoptotického signálu a vyústuje v rychlou nezánětlivou smrt buňky (Rastogi et al. 2009). Kaspasy 2,8,9,10 řadíme mezi iniciační a kaspasy 3,6,7 mezi efektorové (Elmore 2007).

### **3.3.2.1 Vnější cesta apoptózy**

Začíná interakcí ligandu z nadrodiny tumor-nekrotizujících faktorů (FasL, TNF- $\alpha$ , TRAIL) s transmembránovými receptory smrti (TNFR1, FasR, DR3) v cytoplazmatické membráně. Sekvence dějů pro vnější cestu apoptózy je nejlépe charakterizována u FasR receptorů. Navázání ligandu (FasL) na FasR iniciuje navázání adaptorového proteinu FADD (z angl. fast associated death domain). FADD se poté asociuje s prokaspasou 8, ta se autokatalicky přemění na kaspasu 8, vytvoří se signální smrtící komplex (DISC, z angl. death-inducing signaling complex). Kaspasa 8 je schopna přímo aktivovat efektorovou kaspasu 3, která specificky aktivuje endonukleasu CAD (z angl. caspase activated deoxyribonuclease), která degraduje chromosomální DNA a způsobuje kondenzaci chromatinu. Kaspasa 3 rovněž způsobuje rozdělení buňky do apoptotických tělísek (Elmore 2007). Nepřímo pak kaspasa 8 štěpí proapoptotický protein Bid, čímž se propojí vnitřní a vnější cesta apoptózy (Rastogi et al. 2009). Tento protein interaguje s Bax a Bak, které způsobí vypuštění mitochondriálního cytochromu c a SMAC/DIABLO, aktivující kaspasu 9 a eventuálně kaspasu 3 (Mroz et al. 2011).

### **3.3.2.2 Vnitřní cesta apoptózy**

Může být iniciována negativními či pozitivními signály. Negativní signály zahrnují nedostatek růstových faktorů, hormonů a cytokinů, které fungují jako inhibitory apoptózy. Mezi pozitivní signály se pak řadí ozáření, hypoxie, toxiny, virové infekce a ROS. Všechny tyto stimuly způsobují změny ve vnitřní membráně

mitochondrií, otevření mitochondriálního póru s následnou ztrátou mitochondriálního transmembránového potenciálu a uvolněním pro-apoptotických proteinů z vnitřní membrány mitochondrie do cytosolu (Elmore 2007).

První třídu pro-apoptotických mitochondriálních proteinů tvoří cytochrom c, SMAC/DIABLO a serinová proteasa – tyto aktivují na kaspasách závislou mitochondriální cestu. Cytochrom c se váže na Apaf-1 (z angl. apoptotic protease activating factor), prokaspasu 9 a za přítomnosti ATP či dATP pak vytvoří apoptosom. Apoptosom přemění prokaspasu 9 na aktivní kaspasu 9, která aktivuje efektorové kaspasy 3 a 7 vedoucí k PCD. Mitochondriální proteiny SMAC/DIABLO spouští apoptózu inhibicí a narušením funkce inhibičních proteinů apoptózy (AIF) (Elmore 2007; Rastogi et al. 2009).

Druhá třída proteinů je tvořena AIF (z angl. apoptosis-inducing factor), endonukleasou G a cytokiny, které vedou k selhání mechanismů potlačujících PCD. AIF spolu s endonukleasou G fungují na kaspasách nezávislém mechanismu, přesouvají se do jádra a způsobují DNA fragmentaci (Elmore 2007).

Kontrolu a regulaci mitochondriálních apoptotických procesů řídí rodina Bcl-2 proteinů skrz regulaci propustnosti mitochondriální membrány vedoucí k uvolnění cytochromu c. Rodina Bcl-2 proteinů obsahuje anti-apoptotické proteiny (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1) a pro-apoptotické proteiny (Bax, Bad, Bid, PUMA, NOXA). Anti-apoptotické proteiny Bcl-2 a Bcl-X<sub>L</sub> jsou lokalizovány na vnější straně mitochondriální membrány, kde tvoří heterodimery s Bax, Bad a Bak, čímž blokují jejich pro-apoptotické vlastnosti spočívající ve schopnosti uvolnit cytochrom c z mitochondrií (Redza-Dutordoir & Averill-Bates 2016).

Během apoptózy, Bax a Bak tvoří oligomery na vnější straně mitochondriální membrány a způsobují tím její dezintegraci, uvolňují pro-apoptotické proteiny jako cytochrom c, který umožňuje aktivaci kaspasy 9 (Mroz et al. 2011).

Protein NOXA je schopen migrovat do mitochondrie a interagovat zde s anti-apoptotickými Bcl-2 proteiny a aktivovat kaspasu 9. PUMA a NOXA jsou spouštěné tumor-supresorovým proteinem p53 a mohou být zodpovědné za onkogenní aktivaci apoptózy. Poslední fází apoptózy je vystavení fosfatidylserinu na vnější straně

membrány buňky. Umožní se tím jejich rozpoznání fagocytujícími buňkami a zabrání se vyelití buněčného obsahu do okolí buňky, což by vedlo k zánětlivé reakci (Elmore 2007).

### 3.3.2.3 *Apoptóza způsobená PDT*

ROS produkované při PDT oxidují proteiny ADP/ATP-translokasy mitochondrie (importuje ADP dovnitř mitochondrie a exportuje ATP do cytosolu), translokasa se tímto přemění na nespecifický pór propustný pro nízkomolekulární molekuly, dojde tak ke ztrátě gradientu nízkomolekulárních látek ( $K^+$ ,  $Cl^-$ ) mezi matrix a cytolem a k influxu vody dovnitř mitochondrie a její bobtnání. Ruptura vnější membrány způsobí vyplavení pro-apoptických proteinů (např. cytochrom c a AIF) z mezimembránového prostoru do cytoplazmy a nastartuje se tak apoptotická kaskáda. Peroxidací lipidů ROS okolo translokasy nastane ztráta mitochondriálního membránového potenciálu a otevřou se napěťově řízené iontové kanály na vnější straně membrány a umožní uniknutí pro-apoptických proteinů do cytosolu.

Použití PpIX produkovaného z ALA u leukemických buněk HL-60 způsobuje splynutí ER a mitochondrií vedoucí k přímému toku  $Ca^{2+}$  do mitochondrie, poškození přímo ER, čímž zvýší množství cytosolického  $Ca^{2+}$  a následné otevření PTP póru mitochondrie nebo přímou aktivaci kaspasy 3.

Hydrofilní PS jsou lokalizovány primárně v cytoplasmě a v lyzosomech. V lyzosomech způsobují přímo uvolnění kathepsinů, které mohou v cytoplasmě aktivovat kaspasy nebo štěpit protein Bid a tím indukovat otevření mitochondriálního póru a vyplavení cytochromu c.

PS lokalizované v plazmatické membráně (BengalRose) mohou spouštět smrt buňky přímo. Spouští apoptózu produkcí  $^1O_2$  v membráně a fotoaktivací podléhají molekuly přímo v plazmatické membráně (a v malé části cytoplazmy). Rozpoznání oxidovaného fosfatidylserinu na vnější straně membrány fosfatidylserinovým receptorem pak vede k vyslání apoptotických signálů do cytoplazmy (Plaetzer et al. 2005).

PS lokalizované v plazmatické membráně (verteporfin, BengalRose, hypericin) mohou indukovat apoptózu aktivací kaspasy 8, která bývá stimulována přes receptory Fas nebo TNFR. V myších a lidských buňkách tumoru bylo během PDT při použití hypericinu pozorováno zvýšení exprese FasR a FasL. Tyto procesy byly následovány

aktivací kaspasy 8, uvolněním cytochromu c, aktivací kaspasy 3 a DNA fragmentací (Uzdensky 2008).

Během PDT napadá  $^1\text{O}_2$  mitochondriální proteiny, mění strukturu jejich aminokyselin a rozrušuje tím jejich specifické uspořádání, což vede k narušení jejich normální funkce. Lipofilní PS Pc4 lokalizující se hlavně v mitochondriích způsobuje fotodestrukci anti-apoptotického mitochondriálního proteinu Bcl-2. Fotodestrukce Bcl-2 vede v buňkách ke zvýšené expresi Bax a výsledkem je apoptóza (Kessel 2004). U Pc4 bylo rovněž pozorováno při jeho použití na lidské nádory kůže, rozrušení propustnosti mitochondriální membrány, depolarizace a uvolnění cytochromu c do cytosolu (Ribeiro et al. 2004).

PDT jako induktor oxidačního stresu rovněž aktivuje a reguluje protektivní buněčné proteiny (chaperony, SOD). Mezi senzory oxidačního poškození buňky PDT lze zařadit singletovým kyslíkem oxidované nenasycené lipidy jako jsou hydroperoxydy (LOOH) a jejich radikály ( $\text{LOO}\cdot$ ,  $\text{OLOO}\cdot$ ,  $\text{OLO}\cdot$ ). Hydroperoxydy, spíše než radikály, slouží jako markery fotooxidativního stresu. LOOH se přemísťují mezi buněčnými membránami, a tak rozvíjí oxidační stres uvnitř buňky. Mezi další marker oxidačního stresu PDT patří fosfolipasa A2 zahrnutá do PDT indukované apoptózy, která je více aktivní na peroxidovaných membránách. Oxidační poškození buňky je však regulováno detoxikačními enzymy jako SOD a GPx. K poškození tak dochází jen tehdy, je-li překročena jejich antioxidační kapacita.  $^1\text{O}_2$  může lehce inaktivovat enzymy obsahující thiolové skupiny (-SH) v aktivním místě.

Tyto enzymy (tyrosin fosfatasa (TP), mitochondriální ATP/ADP-translokasa) mohou souviset s poškozením signální cesty, která chrání buňky nebo indukuje jejich smrt. TP je inaktivována  $\text{H}_2\text{O}_2$  skrz tvorbu intermediátů jako jsou TP-S-OH nebo TP-S-S-glutathion. Zpětně je lze regenerovat thio-redoxinem redukujícím -S-S- můstky. Thio-redoxin je tedy dalším markerem tvorby ROS. Jako intracelulární marker zvýšeného množství ROS produkovaných v mitochondrii a sníženého množství kyslíku slouží i HIF-1 (transkripční faktor indukovaný hypoxií). HIF-1 kooperuje s transkripčním faktorem AP-1 (aktivující protein-1) a kontroluje metabolismus buňky, proliferaci a její přežití. Může být aktivován cytokiny, hypoxií, ionizačním a UV zářením.

HIF-1 hraje důležitou roli v odpovědi buňky na nedostatek kyslíku a anaerobní energetický metabolismus. PDT způsobuje rychlou spotřebu kyslíku, poškozuje cévy a způsobuje hypoxii nádorové tkáně. Při léčbě nádoru jícnu pomocí PDT byla pozorována zvýšená exprese HIF-1 související se sníženou účinností a sníženou expresí Bcl-2 proteinu a zvýšenou apoptózou. Citlivost nádoru k PDT lze tedy stanovit porovnáním exprese HIF a Bcl-2 proteinu.

Tumor supresorový protein p53 koordinuje opravu DNA, buněčný cyklus a apoptózu spojenou s poškozením DNA. Zprostředkovává odpověď buněk podstupujících oxidační stres. Jeho mutace vede k nádorovému bujení. V normálních buňkách je jeho hladina nižší díky kontinuální proteolýze. Zvyšuje se při poškození způsobených ROS, UV, ionizačním zářením apod. Mezi cíle p53 zahrnujeme geny kódující pro-apoptotické proteiny Apaf-1, Bax, PUMA a NOXA. Poškození DNA není pro PDT charakteristické, většina PS není v jádře lokalizována, avšak u některých fotosenzitizovaných buněk (např. při použití Photofrinu<sup>®</sup> akumulujícího se uvnitř buňky) byla pozorována zvýšená exprese p53 spojená s nekrózou, apoptózou a sníženým buněčným dělením.

Sfingolipid ceramid je syntetizován ceramid-synthasou nebo produkován ze sfingomyelinu kyselou či neutrální sfingomyelinázou v různých patologických situacích a při PDT. Rozrušuje buněčné membrány, ovlivňuje vnitrobuněčný transport vezikuly a tvorbu apoptotických tělísek. Slouží jako druhý posel apoptózy a zástavy buněčného cyklu. Ceramid je schopen tvořit stabilní kanály na vnější straně mitochondriální membrány, propustné pro proapoptotické proteiny do 60 kDa (cytochrom c má 12 kDa, SMAC/DIABLO 42 kDa).

Oxid dusnatý (NO) je druhý posel v patologických i fyziologických procesech jako jsou vazodilatace, neurotransmise či buněčná odpověď na stres. Je tvořen z L-Argininu NO-synthasou (NOS). NO aktivuje guanylin-cyklasu produkující cGMP, která reguluje mnoho biochemických a cytofyziologických procesů. Subletální dávky PS mTHPC a hypericinu zvyšují expresi NO. NO značně zvyšuje rezistenci buněk na PDT, která byla pozorována při použití ALA. Rezistence na indukovaný oxidační stres je pravděpodobně způsobena uvolněním volných iontů železa z hemu, čímž se zvýší hladina protektivních proteinů (hemoxygenasa, feritin). Feritin redukuje množství

volného železa pod úroveň, která umožní zvýšenou rezistenci buňky na oxidační stres. Přesná signální kaskáda je však neznámá (Uzdensky 2008).

### **3.3.3 Nekróza**

Nekróza je na rozdíl od apoptózy pasivní forma buněčné smrti. Je výsledkem poklesu ATP neslučitelným s přežitím buňky, toxického nebo fyzikálního poškození. Doprovází ji zvětšování cytoplazmy, destrukce organel a disrupce plazmatické membrány vedoucí k vypuzení buněčného obsahu do extracelulárního prostoru a zánětu. Nekrotické buňky nevykazují organizovanou kondenzaci chromatinu a fragmentaci DNA (Edinger & Thompson 2004; Mroz et al. 2011). Nacházíme ji v hlubších částech tumoru, kde je k dispozici omezené množství živin a kyslíku. Nekrózou také buňky umírají při nedostatku růstových faktorů (Zong & Thompson 2006). Podstatně přispívá k ovulaci, usmrcením chondrocytů kontroluje růst kostí do délky, zajišťuje obnovu buněk ve střevě. Její účinek se nejvíce projevuje při epilepsii či Alzheimerově chorobě (Festjens et al. 2006).

#### **3.3.3.1 Nekróza a ROS**

ROS jsou produkovány při normálních fyziologických buněčných procesech jako jsou regulace proliferace, aktivace genové exprese a buněčná odpověď na cytokiny. Mitochondrie jsou hlavním zdrojem ROS uvnitř buňky. Elektrony unikají z elektron-transportní řetězce nejčastěji mezi komplexem I a III. Reakce molekulárního kyslíku s vypadlými elektrony tvoří kyslíkový radikál, který je konvertován na  $H_2O_2$  nebo ostatní ROS ( $\cdot OH$ ,  $O_2^{\cdot -}$ ). Buňky však obsahují redoxní pufrční mechanismy a antioxidantní enzymy jako např. GPx, SOD, katalasy. Oxidační stres je výsledkem dysbalance mezi ROS produkcí a eliminací a vyúsťuje v poškození biomolekul. Toto poškození je poté spojeno s apoptózou, zánětem, septickým šokem, nádorovým bujením nebo nekrózou.

ROS tvořící se a účinkující v hydrofobním prostředí vnitřní mitochondriální membrány mají důležitou roli v TNF- $\alpha$  indukované nekróze. TNF- $\alpha$  indukuje zvýšenou glykolýzu a pravděpodobně s tím spojenou zvýšenou hladinu methylglyoxalu (MG). MG je cytotoxický vedlejší produkt glykolýzy. Za normálních fyziologických podmínek je MG vázán na buněčné proteiny jako adukt lysinu, argininu nebo cysteinu. Ireverzibilní vazbou MG na lysin či arginin se tvoří produkty pokročilé glykace

(AGEs). AGEs se účastní dalšího oxidačního stresu uvnitř buněk, a jsou tak spojovány s poškozením tkání po ischemii nebo během stárnutí. Důsledkem zvýšené tvorby AGEs může být zvýšená tvorba ROS. MG je tedy signální molekula v procesu nekrotické smrti buňky.

Mitochondriální dysfunkce a produkce ROS může modulovat extramitochondriální pool  $\text{Ca}^{2+}$ .  $\text{Ca}^{2+}$ , jejichž největší zásobárnu představuje ER, jsou pozitivní efektoři mitochondriální funkce a jejich primární rolí je stimulace oxidační fosforylace. Odchytky v cytosolické nebo mitochondriální homeostáze  $\text{Ca}^{2+}$  mají vážné následky. Zvýšení  $\text{Ca}^{2+}$  v mitochondrii stimuluje citrátový cyklus spolu s transportem elektronů v dýchacím řetězci a tím i tvorbu ROS.  $\text{Ca}^{2+}$  ovlivňuje NOS, následná produkce NO může rovněž ovlivnit mitochondriální respiraci a zvýšit produkci ROS.

Přímým důsledkem ischemického poškození tkáně je drastický pokles glukózy a kyslíku. Ischemické poškození vede k narušení oxidační fosforylace a nekontrolovatelné hydrolýze ATP ATPasou na vnitřní mitochondriální membráně. K udržení hladiny ATP během ischemie pak využívají buňky anaerobní glykolýzu, zbylou glukózu v okolních tkáních a glykogen (Festjens et al. 2006).

Tkáňová acidóza zvyšuje influx  $\text{Ca}^{2+}$  aktivací acido-senzitivních iontových kanálů. Udržování  $\text{Ca}^{2+}$  stimuluje mitochondriální dehydrogenasu s odpovídajícím zvýšením NADH. Zvýšené NADH přispívá paradoxně k větší produkci mitochondriálních ROS vedoucí ke ztrátě integrity vnitřní mitochondriální membrány včetně ztráty schopnosti generovat ATP. Tyto děje vyúsťují v nekrózu, která iniciuje zánětlivou odpověď (Zong & Thompson 2006).

Ischemie a následná reperfúze, zánět a ROS způsobená poškození jsou doprovázena snížením ATP. Pokles energie zpomaluje aktivní membránový transport iontů vedoucí ke zvýšení permeability buněčné membrány, změněnou distribucí iontů  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  a snížení mitochondriálního transmembránového potenciálu. Pokud změna propustnosti zahrnuje většinu mitochondrií a ATP z glykolýzy je nedostatek, dojde k lýze buňky.

Oxidační stres nastává také při zvýšení hladiny reaktivních forem dusíku (RNS) jako jsou např. NO nebo peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ). Zvýšený influx  $\text{Ca}^{2+}$  zvětšuje aktivitu NOS a produkci NO, který se v přítomnosti  $\text{O}_2^-$  mění na  $\text{ONOO}^-$ . NO inhibuje spolu se

zvýšenou koncentrací  $\text{Ca}^{2+}$  komplex I a IV v elektron-transportním řetězci, čímž zvyšuje produkci ROS a narušuje mitochondriální syntézu ATP a funkci buňky. NO nitrosylaci přímo zabraňuje aktivitě kaspasy 3, blokuje apoptózu a spouští nekrozu.

Větší produkce NO souvisí s excitotoxicitou, ději při kterém nervové buňky podléhají nekroze nebo apoptóze zapříčiněné uvolněním mnoha neurotransmiterů nebo N-methyl-D-aspartátu (NMDA). NMDA se váže na NMDA-receptor, zvyšuje tak influx  $\text{Ca}^{2+}$  vyúsťující ve smrt buňky.  $\text{Ca}^{2+}$  influx aktivuje proteasy i lipasy, ovlivňuje mitochondriální respiraci.  $\text{ONOO}^-$  je potenciální spouštěč mitochondriální permeability a poškozuje DNA. Excitotoxicita hraje zásadní roli v neurodegenerativních onemocněních jako Alzheimerova či Huntingtonova choroba.

Cytosolická fosfolipasa  $\text{A}_2$  (cPLA<sub>2</sub>) je intracelulární esterasa zodpovědná za hydrolyzu a uvolnění kyseliny arachidonové z fosfolipidů. Zvýšená hladina  $\text{Ca}^{2+}$  umožňuje přesun cPLA<sub>2</sub> do membrán jádra, ER a GA. Uvolněná kyselina arachidonová může být přeměněna cyklooxygenasou nebo lipooxygenasou, které jsou zodpovědné za produkci signálních molekul eikosanoidů při zánětu (Festjens et al. 2006).

Mimo zánětlivou reakci jsou lipooxygenasy (nehemové dioxygenasy) zodpovědné za konverzi nenasycených mastných kyselin na konjugované hydroperoxy. Jejich hlavním substrátem je kyselina arachidonová, aktivita pak záleží na přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$ , jejichž koncentrace roste se zvyšujícím se množstvím mastných kyselin, které způsobují změny cytosolického pH doprovázející aktivaci iontových kanálů s následným influxem  $\text{Ca}^{2+}$ . Aktivita lipooxygenasy je regulována hydroperoxy z buněk, které jsou důležité pro přeměnu nehemového železa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) na aktivní oxidovaný stav ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (Kühn & Borchert 2002). Inaktivaci lipooxygenasy se peroxidace lipidů vede neenzymovou cestou, která je způsobena hydroxylovými radikály tvořenými dysfunkčními mitochondrii. Tyto radikály napadají nenasycené mastné kyseliny a tvoří lipidové peroxidy. Lipidová peroxidace může vést k disrupci organely a plasmatické membrány, tím směřovat k nekroze (Festjens et al. 2006).

Kalpains jsou intracelulární cysteinové proteasy účinkující v signálních dráhách ovlivňovaných  $\text{Ca}^{2+}$  a modulující aktivitu i funkci proteinů savčích buněk. V cytosolu jsou ve formě neaktivních prekurzorů aktivující se zvýšením cytosolické hladiny  $\text{Ca}^{2+}$ . Přerušují  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -pumpu, což vede k nepřetržitému zvětšování intracelulární hladiny  $\text{Ca}^{2+}$ . Kalpains hrají důležitou roli v nekroze buněk i při svalové dystrofii.



Nekrotické poškození způsobené zvýšením hladiny  $\text{Ca}^{2+}$  vede k aktivaci kalpainů, které poškodí lyzomální membránu a uvolní katepsiny zodpovědné za na kaspasách nezávislou smrt buňky. Zvýšená aktivita u kalpainů byla pozorována Parkinsonovy či Alzheimerovy choroby. Lyzomální permeabilita může být také spojena s aktivací fosfolipázy  $\text{A}_2$  a následným zvýšením ROS, nemusí být způsobena jen kalpainy ale také oxidačním stresem.

Nekrotické buňky jsou fagocytovány nikoli vystavením fosfatidylserinu na membráně jako u apoptotických, ale pouze pokud dojde ke ztrátě celistvosti membrány makropinocytózou, kdy dochází ke vzniku výběžků plazmatické membrány, které na konci fúzí. Jejich fagocytóza je pak pomalá a málo efektivní. Vystavení fosfatidylserinu na vnější membráně není vždy specifické pro apoptózu, jelikož fosfatidylserin je rovněž přítomen na buněčné membráně při nekrotické smrti buňky. Pozdější odstraňování nekrotických buněk je spojeno s aktivací prozánětlivých a imunostimulačních odpovědí, takže apoptóza buňky je zcela potlačena (Festjens et al. 2006).

### **3.3.3.2 Nekróza při PDT**

Vysoká dávka PDT (vysoká koncentrace PS nebo vysoká dávka záření, popřípadě oboje) vede k nekróze, naopak nižší dávka vede k apoptóze. Při lokalizaci lipofilního PS v plazmatické membráně, vede jeho aktivace zejména k nekróze, ztrátou soudržnosti membrány a rychlým spotřebováním intracelulární ATP. Vysoké dávky PDT mohou fotochemicky inaktivovat esenciální enzymy a ostatní komponenty apoptotické kaskády jako jsou kaspasy (Mroz et al. 2011).

PDT indukuje nekrózu nádorů za současné aktivace makrofágů i neutrofilů. Makrofágy fagocytující PDT poškozené maligní buňky prezentují proteiny  $\text{CD4}^+$  pomocným T-lymfocytům, které dále aktivují  $\text{CD8}^+$  cytotoxické T-lymfocyty. Imunitní reakce proto nezahrnuje pouze léčenou oblast, ale také vzdálenou lymfatickou tkáň (Allison & Moghissi 2013).

### **3.3.4 Autofagie**

Regulovaný katabolický fyziologický proces eliminující poškozené buňky, nadbytečný cytoplazmatický obsah buňky či organely (mitochondrie, ER). Je důležitá

zejména při buněčném růstu, stárnutí a imunitní reakci. Dysregulace autofagie se vyskytuje u maligních i srdečních onemocnění, neurodegenerativních onemocněních (např. Alzheimerova, Parkinsonova a Huntingtonova choroba). Autofagii podporují stresové podmínky (hypoxie, hormonální dysbalance, oxidační stres. Jedná se o adaptační mechanismus na stres. Během autofagie je cytoplazmatický obsah buňky izolován uvnitř autofagosomu (vakuoly s dvojitou membránou). Vnější membrána autofagosomu splývá s membránou lyzosomu a tvoří autolyzosom, ve kterém je cytoplazmatický obsah degradován lyzozomálními enzymy (např. katepsiny). Při nedostatku živin je degradovaný cytoplazmatický obsah rozkládán na aminokyseliny a energii zajišťující přežití buňky. Funguje tedy jako na kaspasach nezávislá forma PCD. Autofagie postrádá účast fagocytů (Redza-Dutordoir & Averill-Bates 2016).

#### **3.3.4.1 *Autofagie při PDT***

Savčí buňky využívají autofagii jako obranný mechanismus proti ROS zprostředkovaným poškozením buňky. PDT může stimulovat autofagii jako cytoprotektivní odpověď v závislosti na rozsahu poškození buňky ROS či oxidačním stresem. PDT poškozuje proteiny důležité pro autofagii mimo proteiny tvořící autofagosom a organely přímo zahrnuté do procesu autofagie jako lyzosomy a endosomy (Mroz et al. 2011).

Použitím specifického PS (TPPS4–tetrasulfofenylporfín) dojde k jeho nahromadění v matrix lyzosomu a fotooxidaci (inaktivaci) hydrolytických enzymů. Následná ztráta membránové integrity lyzosomu vede k uvolnění obsahu endocytotických váčků do cytoplazmy s neaktivními lyzozomálními enzymy. Inaktivace lyzozomálních proteas před rupturou membrány by tak mohla sloužit jako mechanismus selektivní destrukce lyzosomů bez poškození ostatních organel (Reiners et al. 2010).

Použitím amfifilních PS zůstávají tyto navázány v membránách lyzosomů, endosomů a autofagosomů. Po ozáření dojde k narušení membrány a uvolnění obsahu do cytoplazmy. Uvolněné proteasy (katepsiny) z lyzosomů mohou štěpit proapoptotický protein Bid a spouštět apoptózu. Efekt PDT na autofagii nádorových buněk tedy záleží na typu použitého PS.

V buňkách podléhajících apoptóze se zmenšuje destruktivní efekt PDT recyklováním poškozených organel. Účinek PDT na nádorové buňky je tedy možno zvýšit potlačením pro-autofagických proteinů (Mroz et al. 2011).

Beclin1 je autofagický tumor supresorový protein obsahující BH3 doménu pomocí které se váže s anti-apoptotickými proteiny z nadrodiny Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>) a má důležitou roli v počínající autofagii. Beclin1 nemá vliv na anti-apoptotickou funkci mitochondriální Bcl-2. Naopak Bcl-2 (Bcl-X<sub>L</sub>) v ER nikoli v mitochondrii redukuje anti-autofagickou aktivitu Beclin1 (Kang et al. 2011). Tedy cílené zasažení Bcl-2 (Bcl-X<sub>L</sub>) v ER nikoli v mitochondrii může podpořit inhibici autofagie (Maiuri et al. 2010).

### **3.4 Mechanismus destrukce tumoru v PDT**

Rozlišujeme 3 základní mechanismy při ničení nádorových buněk pomocí PDT. Přímé zabíjení buněk ROS generovaných PDT způsobující buněčnou smrt. Poškození cévního zásobení nádorových buněk vedoucí ke ztrátě zásobení tkáně kyslíkem a živinami. Aktivace imunitní odpovědi na nádorové buňky. Kombinace těchto mechanismů je důležitá pro optimální dlouho trvající léčbu nádorů, hlavně těch, které mohou metastázovat (Castano et al. 2005a).

#### **3.4.1 Přímý efekt PDT**

Přímé poškození nádorové buňky PDT může být pro léčení nádoru nedostatečné. S nehomogenní distribucí PS uvnitř tumoru a jeho vzdáleností od cévního zásobení tumoru klesá účinnost PDT. Dalším limitujícím faktorem je dostupnost kyslíku uvnitř tkání. V hypoxických tkáních není PDT dostatečně účinná hlavně při použití PS na bázi porfyrinů. Vysoký úbytek tkáňového kyslíku, zvyšující se množství <sup>1</sup>O<sub>2</sub> značí použití více PS a větší dávky záření. Vysoké spotřebě kyslíku při PDT lze předejít rozdělením záření na dávky umožňující tkáňovou reoxygenizaci. Jednotlivé časové periody pro působení záření jsou u každého typu buňky rozdílné a nejsou přesně definovány (Castano et al. 2005a).

Markerem spotřeby kyslíku je efekt "photobleaching". Jedná se o ztrátu absorpční nebo emisní intenzity světla PS, jeho modifikací nebo rozštěpením na menší fragmenty po ozáření. Modifikace je vratná (fotoadice a fotocyklizace doprovázená ztrátou chromoforu) nebo nevratná (nastávající při současném navázání přítomného

redukujícího činidla jako je vodík na specifická místa PS). Za přítomnosti kyslíku je proces oxidační, a často spojen s tvorbou ROS nebo  $^1\text{O}_2$  a doprovázený zvýšenou kožní fotosensitivitou (Bonnett & Martinez 2001).

### 3.4.2 Vaskulární efekt

Mikrovaskulární kolaps může vést k trvalé hypoxii. Efekt se mění dle použitého PS. Photofrin<sup>®</sup> vede ke stažení cév, adhezi leukocytů a tvorbě trombu. MACE (mono-L-aspartyl chlorine e6) způsobuje stázi krve a adhezi destiček. Všechny tyto efekty vedou k poškození cévního endotelu. PDT může vést ke zúžení cév způsobené inhibicí produkce nebo uvolňování NO endotelem. Pro správný efekt na cévy je důležitý DLI. Doba kdy *i.v.* podaný PS opustí cévní řečiště a naváže se na stěnu cévy zásobující tumor, doba se obvykle pohybuje v řádu hodin a mění dle použitého PS (Castano et al. 2005a). Rozrušením cévní stěny přestane krev zásobovat nádor kyslíkem a dojde k nekróze buněk cévní stěny i okolního nádoru, aktivaci a agregaci destiček, uvolnění toxických cytokinů. Použitím menší intenzity záření může nastat apoptóza cévních buněk bez účasti cytokinů a imunitní reakce (Allison & Moghissi 2013).

### 3.4.3 Efekt PDT na imunitní systém

Oproti běžné chemoterapii využívající ionizační záření v dostatečných dávkách na zničení nádoru má PDT menší imunostimulační i imunosupresivní efekt na imunitní systém a není vysoce toxická pro kostní dřeň, důležitý zdroj buněk imunitního systému (Castano et al. 2006).

Smrt nádorových buněk nastává zejména po aktivaci neutrofilů a makrofágů. Makrofágy fagocytují nádorové buňky poškozené PDT. Fototoxické poškození plazmatické membrány a membrány buněčných organel způsobené PDT vyúsťuje v rychlou aktivaci membránových fosfolipas vedoucí k urychlení degradace fosfolipidů a propuštění zánětlivých mediátorů. Charakteristické proteiny, cytokiny z poškozených buněk jsou zachyceny  $\text{CD4}^+$  pomocnými T-lymfocyty, které aktivují  $\text{CD8}^+$  cytotoxické T lymfocyty. Imunitní reakce nastává v nádorové tkáni, ale účastní se i vzdálená lymfatická tkáň. Cytotoxické T-lymfocyty mohou způsobit nekrózu i apoptózu (Allison & Moghissi 2013; Castano et al. 2005a).

PDT spouštěná apoptóza nevyvolává silnou a detekovatelnou imunologickou reakci. Imunogenní buněčná smrt (ICD) je forma imunogenní apoptózy či nekrózy, které se liší výraznějším protinádorovou imunitní odpovědí. Rozvinutí ICD v buňce záleží na typu použitého PS (nejlépe se ICD v buňce rozvíjí při použití hypericinu). Na množství použitého PS jsou citlivé T-lymfocyty imunosupresivního charakteru uvnitř tumoru, které jsou destruovány PDT a nahrazeny aktivovanými efektorovými T-lymfocyty. PDT je tak doprovázena zvýšenou produkcí imunitních buněk schopných přímého zabíjení patogenů, prezentování antigenů cizích buněk či aktivace pomocných CD4+ T-lymfocytů. Velikost infiltrace závisí na intenzitě léčby. Zvýšený influx neutrofilů a aktivovaných cytotoxických T-lymfocytů do nádorové tkáně byl dosažen méně intenzivním léčebným režimem PDT (Maeding et al. 2016).

PDT často indukuje silnou zánětlivou reakci projevující se edémem v daném místě. Je to důsledek PDT zapříčiněný oxidačním stresem. Akutní zánět je důležitý ochranný proces udržující narušenou homeostázu, zajišťující odstranění poškozených buněk a obnovení normální funkce tkáně (Castano et al. 2005a).

PDT způsobený oxidační stres poškozuje nádorovou tkáň, poškozené nebo umírající nádorové buňky pak uvolňují nebo na svém povrchu vystavují DAMPs (z angl. damage associated molecular patterns). Fungují jako imunostimulátory, které jsou rozpoznávány receptory imunitních buněk a zbytky nádorových buněk tak mohou být eliminovány (Yang et al. 2016; Wachowska et al. 2016). Exprese DAMPs z nádorových buněk (HSP70, HGMB1) hraje zásadní roli v aktivaci dendritických buněk (DC) a závisí na typu použitého PS (Yang et al. 2016).

Nezralé DC vyhledávají možný patogen v okolí postupnou makropinocytózou nebo fagocytózou, charakteristická je pro ně částečná absence produkce cytokinů (Maeding et al. 2016). Rozpoznáním DAMPs přecházejí nezralé DC do vyzrálého stádia, migrují do lymfatických uzlin, prezentují tumorové antigeny naivním T-lymfocytům a stimulují tak následnou tvorbu cytotoxických T-lymfocytů proti těmto antigenům (Yang et al. 2016). Dendritické buňky prezentují exogenní antigeny destruovaných nádorových buněk pomocí MHC II. třídy CD4+ T-lymfocytům, MHC I. třídy obvykle prezentují endogenní molekuly CD8+ T-lymfocytům (Castano et al. 2006).

Posílení PDT je proto možné inzercí nezralých DC do tumorové tkáně. Ty pohlcují tumorové antigeny, migrují do lymfatických uzlin a stimulují T-lymfocyty na efektorové, které zabíjejí nádorové buňky (Wachowska et al. 2016).

Regulační T-lymfocyty jsou subpopulací CD4<sup>+</sup> buněk. Mají regulační a supresivní aktivitu vůči ostatním imunitním buňkám včetně efektorových T-lymfocytů. Jsou důležité pro imunologickou toleranci a pro regulaci nadměrné imunitní reakce na vlastní antigen. Regulační T-lymfocyty (T<sub>reg</sub>) pocházejí z thymu (tT<sub>reg</sub>) při negativní selekci proti vlastnímu antigenu nebo z periferních lymfoidních orgánů (pT<sub>reg</sub>). Ze všech druhů T-lymfocytů jsou T<sub>reg</sub> lymfocyty nejvíce zastoupeny v nádorové tkáni a nízký poměr T<sub>efekt</sub>/T<sub>reg</sub> znamená špatnou prognózu. Potlačením T<sub>reg</sub> lze u některých typů nádorů zvýšit účinnost PDT (Maeding et al. 2016).

V zónách tkání blízkých ozáření, kde je efekt PDT silný, je možná úplná stáze krve bez invaze leukocytů. Ve vzdálenější zónách ozáření vlivem nehomogenní distribuce záření nejsou endotelové buňky poškozeny, ale jejich aktivace vede k expresi prozánětlivých a adhezivních molekul a leukocytů, proto u vzdálených nádorových ložisek může PDT vyvolat i zánětlivou reakci (Yang et al. 2016).

Monocyty se mohou diferencovat ve 2 rozdílné makrofágové fenotypy, M1 a M2 (Yang et al. 2016). Přičemž M1 makrofágy jsou indukovány intracelulárními patogeny, virem infikovanými a nádorovými buňkami, sekretují zánětlivé cytokiny a produkují NO, čímž efektivně patogeny zabíjí. M2 mají rovněž schopnost fagocytovat patogeny, ale jsou také zodpovědné za odstraňování apoptotických buněk, mohou proto přispívat k potlačení anti-tumorové imunitní odpovědi (Röszer 2015). V současné době jsou proto jedním z cílů protinádorové terapie při použití cílených PS nebo PS s nanočásticovým nosičem (Yang et al. 2016).

## 4 ZÁVĚR

PDT se jeví jako atraktivní léčebná metoda zejména díky relativně jednoduchému principu účinku založeném na aplikaci PS a následným ozářením, které způsobuje jen minimální poškození okolních tkání. V současné době jsou předmětem studia PS, které by mohly být přesně cíleny na nádorové buňky a ozářeny zářením pronikajícím hlouběji do tkání, čímž by se daly efektivně léčit i hluboko uložená ložiska. Efektivita PDT může být rovněž posílena kombinací s radioterapií nebo chemoterapií.

Detailnější poznání mechanismu PDT na buněčné úrovni a jak buňky odpovídají na PDT, umožňuje vhodně cílenou léčbou posílit efekty, které podporují smrt nádorových buněk, a naopak potlačit efekty, které tyto buňky před smrtí chrání.

## 5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Ackroyd, R., Kelty, C., Brown, N., & Reed, M. (2001). The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 74(5), 656–669. [http://doi.org/10.1562/0031-8655\(2001\)0740656THOPAP2.0.CO2](http://doi.org/10.1562/0031-8655(2001)0740656THOPAP2.0.CO2)

Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., Hahn, S. M., Hamblin, M. R., Juzeniene, A., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., Mroz, P., Nowis, D., Piette, J., Wilson, B. C., & Golab, J. (2011). Photodynamic therapy of cancer: An update. *A Cancer Journal for Clinicians*, 61(1), 250–281. <http://doi.org/10.3322/caac.20114>

Allison, R. R., & Moghissi, K. (2013). Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clinical Endoscopy*, 46(1), 24–29. <http://doi.org/10.5946/ce.2013.46.1.24>

Allison, R. R., & Sibata C. H. (2010). Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis and Photodynamic therapy* 7(2), 61–75. <http://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2010.02.001>

Bonnett, R., & Martinez, G. (2001). Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron* 57(47), 9513–9547. [http://doi.org/10.1016/s0040-4020\(01\)00952-8](http://doi.org/10.1016/s0040-4020(01)00952-8)

Brancaleon, L., & Moseley H. (2002). Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers in Medical Science* 17(3), 173–186. <http://doi.org/10.1007/s101030200027>

Buytaer, E., Dewaele M., & Agostinis P. (2007). Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1776(1), 86-107. <http://doi.org/10.1016/j>

Castano, A. P., Demidova T. N., & Hamblin, M. R. (2005a). Mechanisms in photodynamic therapy: Part three - Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2(2), 91-106. [http://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00060-8](http://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00060-8)

Castano, A. P., Demidova T. N., & Hamblin, M. R. (2005b). Mechanisms in photodynamic therapy: Part two - Cellular signaling, cell metabolism and modes of



cell death *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2(1), 1-23.

[http://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00030-X](http://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00030-X)

Castano, A. P., Demidova T. N., & Hamblin, M.R. (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: Part one - Photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 1(4), 279–293.

[http://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00007-4](http://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00007-4)

Castano, A. P., Mroz, P., & Hamblin, M.R. (2006). Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nature Reviews Cancer* 6(7), 535–545.

<http://doi.org/10.1038/nrc1894>.

Edinger, A. L., & Thompson C.B. (2004). Death by design: Apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology* 16(6), 663-669.

<http://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.09.011>

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <http://doi.org/10.1080/01926230701320337>

Festjens, N., Berghe T.V., & Vandenabeele P. (2006). Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1757(9-10), 1371-1387. <http://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.06.014>

Juarranz, Á., Jaén, P., Sanz-Rodríguez, Cuevas J., & González S. (2008) Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clinical and Translational Oncology*, 10(3), 148-154. <http://doi.org/10.1007/s12094-008-0172-2>

Kang, R., Zeh, H. J., Lotze, M. T., & Tang, D. (2011). The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 18(4), 571–580.

<http://doi.org/10.1038/cdd.2010.191>

Kessel, D. (2004). Correlation between subcellular localization and photodynamic efficacy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* 8(8), 1009–1014.

<http://doi.org/10.1142/S1088424604000374>

Kim, M., Jung, H.Y., & Park H. J. (2015). Topical PDT in the treatment of benign skin diseases: Principles and new applications. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* 16(10), 23259-23278. <http://doi.org/10.3390/ijms161023>

Kühn, H., & Borchert A. (2002). Regulation of enzymatic lipid peroxidation: The interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes, *Free Radical Biology and Medicine* 33(10), 154-172. [http://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00855-9](http://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00855-9)

Ledvina, M., Stoklasová A., a Cerman J. *Biochemie pro studující medicíny*. Praha: Karolinum, 2005.

Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification, *Chemico-Biological Interactions* 224(5), 164-175. <http://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>

Macdonald, I. J., & Dougherty, T. J. (2001). Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines (JPP)* 5(2), 105–129. <http://doi.org/10.1002/jpp.328>

Maeding, N., Verwanger, T., & Krammer, B. (2016). Boosting Tumor-Specific Immunity Using PDT. *Cancers*, 8(10), 91. <http://doi.org/10.3390/cancers8100091>

Maiuri, M. C., Criollo, A., & Kroemer, G. (2010). Crosstalk between apoptosis and autophagy within the Beclin 1 interactome. *The EMBO Journal*, 29(3), 515–516. <http://doi.org/10.1038/emboj.2009.377>

Manda, G., Nechifor M. T., & Neagu T. (2009). Reactive Oxygen Species, Cancer and Anti-Cancer Therapies. *Current Chemical Biology* 3(1), 342-366. <http://doi.org/10.2174/187231309787158271>

Mroz, P., Yaroslavsky, A., Kharkwal, G. B., & Hamblin, M. R. (2011). Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. *Cancers*, 3(2), 2516–2539. <http://doi.org/10.3390/cancers3022516>

Mustafa, F. H., Jaafar, M. S., Ismail, A. H., & Mutter, K. N. (2014). Comparison of Alexandrite and Diode Lasers for Hair Removal in Dark and Medium Skin: Which is Better? *Journal of Lasers in Medical Sciences*, 5(4), 188–193.

Oleinick, N. L., Morris R. L., & Belichenko I. (2002). The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 1(1), 1-21. <http://doi.org/10.1039/b108586g>

Oniszczyk A., Wojtunik-Kulesza K. A., Oniszczyk T., & Kasprzak K. (2016). The potential of photodynamic therapy (PDT)—Experimental investigations and clinical use. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 83(1), 912–929. <http://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.07.058>

Pinchuk, I., & Lichtenburg D. (2014). Analysis of the kinetics of lipid peroxidation in terms of characteristic time-points. *Chemistry and physics of lipid* 178(1), 63–76. <http://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.12.001>

Plaetzer, K., Kiesslich T., Oberdanner C. B., & Krammer B. (2005). Apoptosis following photodynamic tumor therapy: induction, mechanisms and detection. *Current pharmaceutical design* 11(9), 1151–1165. <http://doi.org/10.2174/1381612053507648>

Rastogi, R., Richa P., & Sinha R. P. (2009). Apoptosis: Molecular mechanisms and pathogenicity. *EXCLI Journal* 8(1), 155-181. <http://doi.org/10.17877/DE290R-8930>

Redza-Dutordoir M., & Averill-Bates D.A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et biophysica acta* 1863(12), 2977–2992. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.012>

Reiners, J. J., Agostinis, P., Berg, K., Oleinick, N. L., & Kessel, D. (2010). Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. *Autophagy*, 6(1), 7–18.

Ribeiro, J. N., Silva, A. R., & Jorge, R. A. (2004). Involvement of mitochondria in apoptosis of cancer cells induced by photodynamic therapy. *Journal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 40(6), 383–390. <http://doi.org/10.1590/S1676-24442004000600005>

Silva, J. N., Filipe, P., Morlière, P., Mazière, J. - C., Freitas, J. P., Cirne de castro, J. L., & Santus R. (2006). Photodynamic therapies: principles and present medical applications. *Bio-medical materials and engineering* 16(1), 147–154.

Silva, Z. S., Bussadori K. S., Fernandes K. P. S., Huang Y. -Y., & Hamblin R. M. (2015). Animal models for photodynamic therapy (PDT). *Bioscience Report* 35(9), 1–14. <http://doi.org/10.1042/BSR20150188>

Uzdensky, A. B. (2008). Signal transduction and photodynamic therapy. *Current Signal Transduction Therapy* 3(1), 55–74. <http://doi/10.2174/157436208783334277>

Wachowska, M., Muchowicz, A., & Demkow, U. (2015). Immunological aspects of antitumor photodynamic therapy outcome. *Central European Journal of Immunology*, 40(4), 481–485. <http://doi.org/10.5114/ceji.2015.56974>

Wang, W., Moriyama L. T., & Bagnato V. S. (2013). Photodynamic therapy induced vascular damage: an overview of experimental PDT. *Laser Physics Letters* 10(2), 23-31. <http://doi/10.1088/1612-2011/10/2/023001>

Yang, Y., Hu, Y., & Wang, H. (2016). Targeting Antitumor Immune Response for Enhancing the Efficacy of Photodynamic Therapy of Cancer: Recent Advances and Future Perspectives. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 1(1). <http://doi/10.1155/2016/5274084>

Zong, W. X., & Thompson C. B. (2006). Necrotic death as a cell fate. *Genes & Development* 20(1), 1-15. <http://doi/10.1101/gad.1376506>