

## FOTOSENSIBILIZUOTOS LĄSTELĖS PAŽAIDOS

*Išsamiai aptariami du ląstelių žūties būdai – apoptozė ir nekrozė – bei fotosensibilizacijos poveikis įvairiems ląstelės komponentams*

Organizmas, kuriame augantis navikas (arba kitas dėl ląstelių išvešėjimo ar kitų priežasčių atsiradęs darinys) yra prikaupęs fotosensibilizatorių, į regimąją šviesą gali reaguoti trimis lygiais: 1) žūsta fotosensibilizuotos naviko ląstelės, 2) suyra naviko kraujagyslės ir pasireiškia naviko išemija (ischemija<sup>1</sup>), 3) kyla imuninis atsakas. Manoma, kad navikas sunyksta veikiant visiems šiems procesams. Kiekvieno jų indėlis labiausiai priklauso nuo fotosensibilizatoriaus struktūros, jo dozės, jo telkimosi vietos organizme, švitinimo dozės ir spinduliuotės galios, naviko ar kito ardytino darinio savybių.

Fotosensibilizuoto organizmo atsakas į šviesą tiriamas gyvuose organizmuose naudojant eksperimentinius gyvūnus (lot. *in vivo* – gyvame) ir dirbtinėmis sąlygomis auginamose ląstelių kultūrose (lot. *in vitro* – lot. stikle, plačiąja prasme – dirbtiniame). Paprastai vaisto ar gydymo būdo poveikis gyvam organizmui pradedamas tirti nuo bandymų su ląstelių kultūromis *in vitro*. Dažniausiai poveikis sutrikdo esmines ląstelės funkcijas ir taip sukelia žalą organizmui. Todėl iš ląstelių kultūros atsako į poveikį galima spręsti apie to poveikio įtaką organo ar viso organizmo būklei. Ląstelių kultūros yra labai svarbus fotosensibilizacijos vyksmų tyrimų objektas, ir jose tirama tiesioginė fotosensibilizuotų ląstelių žūtis.

Šiame skyriuje apžvelgsime žinias, sukauptas tyrimais *in vitro* ir *in vivo*.

---

<sup>1</sup>Ischemija ( gr. *ισχαιμία*, *isch* – suvaržymas, *hem* – kraujas) kraujo apytakos sutrikimas, paprastai kylantis kraujagyslėse; dėl jo pažeidžiamas atitinkamas audinys.

**Ląstelių žūtis.** Ląstelių žūtis molekuliniai vyksmai yra viena iš labiausiai tiriamų ląstelės biologijos sričių. Pažinus priežastis, trikdančias ląstelių gyvybingumą, galima tikėtis, kad sėkmingiau bus kuriami vaistai, žudantys nenormaliai gyvybingas ląsteles arba apsaugantys nuo nepageidaujamos ląstelių žūtis.

Pirmiausias ląstelių žūtis tyrimų uždavinys – atpažinti, kuri ląstelė yra gyva, o kuri jau žuvusi. 2005 m. buvo susitarta, kad žuvusiomis bus laikomos ląstelės, turinčios bent vieną šių požymių: 1) ląstelė prarado plazmalemos integralumą (kitai – „prakiuro“ ląstelę gaubianti plazminė membrana); 2) ląstelė ir jos branduolys visai subyrėjo į atskirus kūnelius; 3) ląstelės liekaną (-as) prarijo kita ląstelė *in vivo*. Pastaruosius du požymius galima aptikti mikroskopu, o plazmalemos integralumą galima įvertinti biocheminiais metodais arba dažant vadinamaisiais vitaliniais dažais. Šie požymiai svarbūs ir nustatant žudantį poveikį ląstelių kultūrai *in vitro* (vadinamąjį citotoksiškumą). Tačiau labai dažnai vertinamas ne žuvusių ląstelių kiekis, o visos kultūros gyvybingumas. Tada tiriama, kaip dėl poveikio pakito ląstelių kultūros klonogeniškumas, t. y. ląstelių geba dalytis (sudaryti klonus – vienos ląstelės palikuonis), medžiagų apykaita, DNR sintezė ar kitos ląstelių funkcijos.

Naviko vystymąsi ir jo atsparumą priešvėžiniam gydymui lemia neseniai suprasta vėžinių ląstelių ypatybė – atsparumas ląstelių žūčiai ir ypač apoptozei (gr. *apoptosis* – sezoninis lapų ar žiedų kritimas, graikiškai tariama *apOtosis*), vienam iš programuotos ląstelių žūtis pavidalų. Intensyvūs apoptozės tyrimai ir išsamios žinios apie apoptozės molekulinis vyksmus lėmė, kad šiuo metu ieškoma tokių vėžio gydymo būdų, kurie sukeltų vėžinių ląstelių apoptozę. Atrodo, užmirštama, kad dauguma navikų ląstelių yra jautrios kitų pavidalų žūčiai, kaip nekrozei, autofagijai, senėjimui ar vadinamajai mitozės katastrofai. Juolab kad priešvėžiniais vaistais ar švitinimu nuslopinus apoptozę, padaugėja ląstelių, žūvančių kitais, ne apoptozės būdais. Deja, žinių apie visus kitus ląstelių žūtis būdus yra sukaupta kur kas mažiau negu apie apoptozę.

Fotosensibilizuotos ląstelės gali žūti tiek apoptozės, tiek ir kitais būdais. Žūtis kelią lemia ląstelės savybės ir tai, kuriame ląstelės skyriuje sulaikomas fotosensibilizatorius (Oleinick ir Evans, 1998). Galima teigti, kad tie fotosensibilizatoriai, kurie kaupiami endoplazminiame tinkle ir (ar) Goldžio komplekse arba mitochondrijose, sukelia apoptozę, o tie, kurie sulaikomi plazminėje membranoje ar lizosomose, slopina

apoptozės programą, ir ima vyrėti nekrozė. Pasirodė pirmieji pranešimai, kad fotosensibilizuotose ląstelėse pastebėta autofagijos požymių (Kessel ir kt., 2006).

Kaip rutuliojasi ląstelės žūtis vyksmai, kuo skiriasi įvairūs žūtis tipai? Šiuos klausimus pirmiausia aptarsime bendruoju požiūriu, o vėliau išnagrinėsime, kaip žūsta švitinamos fotosensibilizuotos ląstelės.

**Programuota ir atsitiktinė ląstelių žūtis.** Programuota ląstelių žūtis – tai ląstelių mirtis, kai pačios ląstelės komponentai „nužudo“ ląstelę, paleidę jos genuose užkoduotą žūtis programą. Programuota ląstelių žūtis pirmiausia buvo aptikta tiriant natūralią besivystančio gemalo ląstelių žūtį, išstingančią ląsteles, kurios būtinos gemalui tik laikinai, o po tam tikro laiko tampa tik nereikalinga našta. Ši ląstelių mirties tipą galima laikyti genetiškai užkoduota savižudybe. Pastabūs embriologai išskyrė trijų tipų programuotą ląstelių žūtį. Vykstant I tipo programuotai žūčiai, sutankėja (kondensuojasi) branduolio medžiaga ir visa ląstelė susitraukia. Vykstant II tipo programuotai ląstelės žūčiai, susidaro autofaginės vakuolės, ir ląstelę „suvirškina“ lizosomos. Vykstant III tipo programuotai ląstelės žūčiai, ląstelė išbrinksta ir plazmalema „prakiūra“, t. y. ima nevaldomai praleisti medžiagas, kurios nepraeina pro normalios ląstelės plazminę membraną. Šie žūtis tipai dabar yra vadinami apoptoze, autofagija ir nekroze (atitinka I, II ir III tipo programuotą žūtį) (Buytaert ir kt., 2007). Ląstelių sandaros pokyčiai, būdingi programuotai žūstančioms ląstelėms, pastebėti ir tiriant ląstelių atsaką į žalingus aplinkos poveikius, pavyzdžiui, toksiškus cheminius junginius, jonizuojančią spinduliuotę. Todėl kai kuriuos patologinės ląstelių žūtis pavidalus imta vadinti programuota ląstelių žūtimi.

Programuotos ląstelių žūtis sąvoka yra gana prieštaringa, ir laikui bėgant jos turinys kinta. Pradėjus tirti molekulinis apoptozės vyksmus ir atskleidus jų sekas bei juos valdančius genus ir baltymus, programuotą ląstelių žūtį imta tapatinti su apoptoze. Atradus autofagijai svarbius genus, šis ląstelių žūtis tipas pradėtas laikyti savita programuotos žūtis forma. Nekrozė buvo laikoma atsitiktine pasyvia ląstelės žūtimi, kurią sukelia patologiniai veiksniai. Tačiau pastaruoju metu skelbiama vis daugiau duomenų, kad ląstelė valdo ir nekrozę. Taip nyksta ribos tarp programuotos ir atsitiktinės ląstelių žūtis sąvokų. Todėl patariama mokslinėje literatūroje vengti tokių terminų kaip programuota ar atsitiktinė ląstelės žūtis, geriau kuo tiksliau apibūdinti stebimą žūtis tipą.

pavyzdžiui, apoptozė su kaspazių aktyvinimu. Nuo apoptozės ir pradėsime ląstelės žūties kelių apžvalgą.

## **Apoptozė**

### ***Apoptozės morfologiniai požymiai***

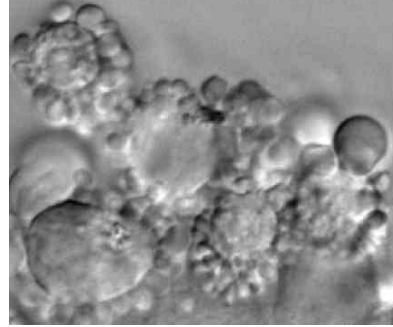
Apoptozė – tai vadinamoji I tipo programuota žūtis, kuriai prasidėjus ląstelėje aktyvuojami saviti fermentai ir imamos skaidyti ląstelę sudarančios medžiagos. Skaidymo produktai pasiskirsto tarp membrana apgaubtų kūnelių, vadinamų apoptoziniais kūneliais, ir taip citoplazmos medžiagos nepatenka už plazminės membranos ribų į tarpląstelinę medžiagą.

Apoptozei nustatyti sukurta nemažai metodų, kuriems reikia sudėtingos įrangos. Tačiau dažnai ją lengva atpažinti nesudėtingu optiniu mikroskopu iš ryškių ląstelės sandaros pokyčių (7.1 pav.). Prasidėjus ląstelės apoptozei, stebimi šie pakitimai:

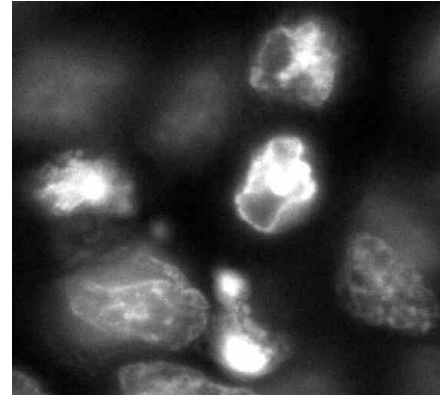
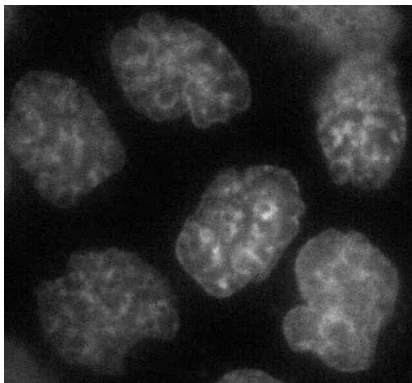
- išnyksta mikrogaureliai ir ryšiai tarp ląstelių,
- ląstelė apvalėja,
- įtraukiamos pseudopodijos,
- sumažėja ląstelės tūris (piknozė),
- pakinta citoplazmos judrumas,
- sutankėja (kondensuojasi) chromatinas ir telkiasi branduolio pakraštyje,
- branduolys fragmentuojasi (karioreksis),
- citoplazmos organelių struktūra beveik nepakinta,
- plazminė membrana pūslėja, bet išlieka nepralaidi iki paskutinių apoptozės stadijų.

Baigiantis apoptozei, ląstelė fragmentuojasi į membrana apgaubtus apoptozinius kūnelius, į kuriuos „supakuojamos“ branduolio, mitochondrijų ir kitų organelių liekanos. Apoptozinius kūnelius fagocituoja aplinkinės ląstelės ar makrofagai.

Dažniausiai apoptozė nustatoma, nudažius gyvas ląsteles fluorescuojančiais dažais, kurie rišasi su DNR. Pro fluorescencinį mikroskopą matomos ryškios kondensuoto ir fragmentuoto chromatino sankaupos (7.2 pav.).



**7.1 pav.** Ląstelės prieš fotosensibilizaciją (kairėje) ir apoptozuojančios ląstelės (dešinėje), fotosensibilizuotos safraninu ir švitintos 509 nm spinduliuotę skleidžiančiais šviestukais. Praleistos šviesos mikroskopija



**7.2 pav.** Ląstelių branduoliai prieš fotosensibilizaciją (kairėje) ir apoptozuojančių ląstelių branduoliai (dešinėje); ląstelės fotosensibilizuotos safraninu ir švitintos 509 nm spinduliuotę skleidžiančiais šviestukais. Fluorescencinė mikroskopija

Kitas nesunkus būdas apoptozei aptikti yra DNR elektroforezė, vadinamasis *Northern blotting* 'as. Vykstant apoptozei, fermentai skaido chromosomų DNR molekules, nutraukdami ryšius tarp nukleotidų, esančių tarp nukleosomų. Todėl, skirstant DNR fragmentus pagal judrumą elektros lauke, gaunamas rinkinys DNR fragmentų, kurių dydis būna nukleosomos dydžio kartotinis. Elektroforegramoje matyti vadinamosios DNR kopėčios.

**Apoptozės molekuliniai vyksmai.** Apoptozė vyksta dviem etapais. Pradinės (latentinės) fazės metu ląstelių sandara atrodo nepakitusi, tačiau ląstelėje vyksta paruošiamoji pertvarka. Latentinės fazės metu vykstantys reguliaciniai procesai būna labai įvairūs, jie priklauso nuo ląstelės tipo ir apoptozę sukeliančio stimulo pobūdžio. Tuo

tarpu vykdomoji (egzekucinė) fazė visais atvejais būna labai panaši. Egzekucinės fazės metu ląstelėje vyksta biocheminiai ir struktūriniai pokyčiai, dėl kurių maždaug per valandą ląstelė subyra į membrana apgaubtus apoptozinius kūnelius. Svarbiausios ląstelės skaidytojos yra kaspazės - baltymus skaidančių fermentų (peptidazių) grupė. Beje, kai kada apoptozė vyksta ir be kaspazių.

Kaspazės – tai peptidazės, kurių aktyviajame centre yra amino rūgštis cisteinas ir kurios skelia asparto rūgšties karboksilinės grupės sudaromą peptidinį ryšį (angl. *caspase – cysteinic aspartate specific peptidase*). Kaspazių pirmtakai – prokaspazės – yra nuolatos sintezuojami visose ląstelėse kaip neaktyvūs baltymai. Aktyviais fermentais jie tampa dėl autokatalizės arba skeliant kitoms kaspazėms. Dėl to nutrūksta asparto rūgšties sudaromi peptidiniai ryšiai, jungiantys du baltymo domenų, ir atskyla slopinantis fragmentas. Atsiskybę domenai suriša kitą tokią porą, ir sudaromas keturių peptidinių grandinių darinys – aktyvi kaspazė. Iš 14 žinomų kaspazių (7.1 lent.) 11 aptikta žmogaus ląstelėse. Kai kurios kaspazės svarbios uždegimo vyksmams, tačiau dauguma yra apoptozės fermentai. Jie skirstomi į dvi grupes – iniciacijos kaspazės ir vykdomosios (efektorinės) kaspazės. Iniciacijos prokaspazės turi ilgus N galinius domenų ir tais domenais sąveikaudamos su kitais baltymais geba susirinkti į didesnius telkinius. Ten jos aktyvinamos autokatalizės būdu, skeldamos viena kitos peptidinius ryšius.

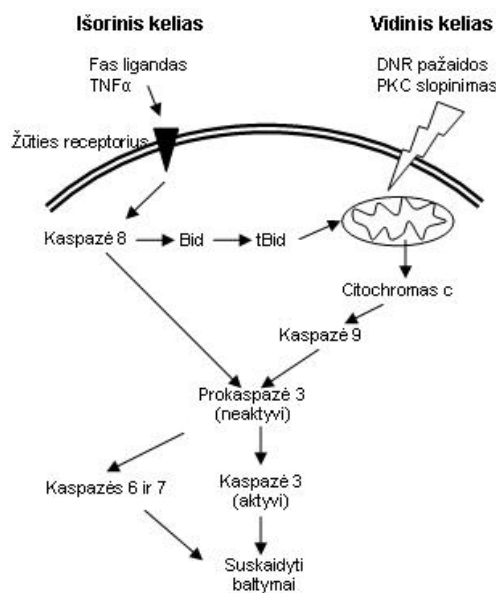
### 9.1 lentelė. Kaspazių funkcijos

<i>Kaspazė</i>	<i>Funkcija</i>
1	Interleukinų pošeimės baltymų brandinimas
2	Streso sukeltos apoptozės tarpininkė
3	Galutinė vykdomoji kaspazė
4	Uždegimas / apoptozė
5	Uždegimas / apoptozė
6	Galutinė vykdomoji kaspazė
7	Galutinė vykdomoji kaspazė
8	Žūties receptoriaus kelio apoptozės tarpininkė
9	Mitochondrinio kelio apoptozės tarpininkė
10	Žūties receptoriaus kelio apoptozės tarpininkė
11	Sepsinio šoko tarpininkė (pelės)
12	Endoplazminiam tinklui savitos apoptozės tarpininkė (pelės)
13	Uždegimas / apoptozė
14	Epidermio diferenciacijos metu ekspresuojama kaspazė

Apoptozė gali prasidėti dviem keliais – išoriniu (receptoriniu) ir vidiniu (mitochondrinu). Natūraliai ląstelių žūčiai kur kas svarbesnis išorinis kelias, o dirbtiniai žalingi poveikiai, tarp jų ir fotosensibilizuotų ląstelių švitinimas, dažniausiai sukelia vidinio apoptozės kelio vyksmus.

Išorinį apoptozės kelią paleidžia tirpūs, į tarpląstelinį užpildą sekretuojami saviti baltymai, vadinamieji žūties ligandai, pavyzdžiui, FasL, TNF- $\alpha$ . Jie prisijungia prie vadinamųjų žūties receptorių – į ląstelės plazminę membraną įsiterpusių baltymų, pavyzdžiui, Fas, TNF-RI. Surišę trimerinį ligandą, žūties receptoriai sukimba vienas su kitu ir sudaro žūtį sukeliantį signalinį kompleksą DISC (angl. *Death-Inducing Signaling Complex*). Taip atsiranda baltyminė platforma, kuri pritraukia kitus baltymus, tarp jų ir iniciacijos prokaspazių -8 ir -10 molekules. Kai jų vienoje vietoje susitelkia daug, jos aktyvina viena kita. Aktyvios iniciacijos kaspazės skaido ir taip aktyvina vykdomąsias kaspazes -3 ir -7 (7.3 pav.).

Šiuo metu vyrauja nuomonė, kad vidinis apoptozės kelias (jis ypač svarbus fotosensibilizuotoms ląstelėms) negrįžtamai paleidžiamas tuomet, kai pradiniai nelaimės signalai pasiekia mitochondrijas ir iš jų į citozolį patekusios savitosios molekulės netiesiogiai aktyvina kaspazes ir DNR skaidančius fermentus. Vidiniam apoptozės keliui svarbiausios kaspazės yra iniciacijos kaspazė-9 ir vykdomoji kaspazė-3 (7.3 pav.).



7.3 pav. Apoptozės keliai

Mitochondrijos yra ląstelės jėgainės, gaminančios medžiagų apykaitos virsmams naudojamą didžiaenergią junginį ATP. Tačiau dabar mitochondrijos laikomos ir savižudybės ginklų sandėliu. Jas pasiekę įvairūs ląstelės viduje ar išorėje kilę vidinio apoptozės kelio signalai padidina mitochondrijų membranų pralaidumą. Tada iš tarpmembraninės erdmės į citozolį patenka tokie kaspazių aktyvatoriai, kaip citochromas c, Omi/HtrA2 (angl. *Omi stress-regulated endoprotease / High temperature requirement protein A 2*), Smac/DIABLO (angl. *Second mitochondria-derived activator of caspase / Direct IAP Binding protein with a Low pI*) bei Apoptozę Indukuojantis Faktorius (AIF) ir endonukleazė G (EndoG). Pastarieji du keliauja į branduolį, ten sukelia chromatiną kondensaciją ir skaido DNR, taip žudydami ląstelę nepriklausomai nuo kaspazių. Citozolyje citochromas c pagauna Apoptozės peptidazę aktyvinantį faktorių 1 (Apaf-1), ir jie abu, padedant ATP arba dATP, sudaro didelį baltyminių 7-kartinės simetrijos kompleksą, vadinamą apoptosomą. Ji pritraukia iniciacijos prokaspazės-9 molekules, kur jos aktyvinamos autokatalizės būdu. Aktyvi kaspazė-9 savo ruožtu aktyvina vykdomąsias kaspazes -3 ir -7. Kaip veikia kiti du iš mitochondrijos ištrūkę kaspazių aktyvintojai? Jie suriša kaspazių slopiklius IAP (angl. *Inhibitors of Apoptosis Proteins*) ir taip palaiko kaspazių aktyvumą.

Vidinio apoptozės kelio vykdomosios fazės pradžia – padidėjęs mitochondrijų išorinės membranos pralaidumas. Kodėl ir kaip jis padidėja, nėra aišku iki šiol. Yra sugalvota ne viena priežastis, tačiau vyrauja dvi hipotezės. Pagal vieną, pirmiausia padidėja mitochondrijos vidinės membranos pralaidumas, ir dėl to vėliau „prakiūra“ išorinė membrana. Pagal kitą, mitochondrijos išorinės membranos pralaidumas didėja dėl to, kad apoptozės metu šioje membranoje sukuriama specialūs kanalai. Klausimas kaip ir kodėl padidėja mitochondrijų membranų pralaidumas, nėra savitikslis. Jeigu būtų aiškus atsakymas, būtų žinoma, į ką nusitaikyti vaistų kūrėjams.

Pirmosios hipotezės esmė – reiškiny, vadinamas pralaidumo perėjimu (angl. *permeability transition*), kai staiga vidinė membrana tampa tokia pralaidi kaip išorinė membrana. Tada į mitochondrijos užpildą ima plūsti mažos molekulinės masės medžiagos ir jonai. Dėl susidariusio osmosinio slėgio išbrinksta vidinės membranos gaubiamas mitochondrijos skyrius, kuris suplėšo išorinę membraną ir išleidžia į citozolį apoptozę sukeliančias molekules. Manoma, kad pralaidumo perėjimą valdo vidinėje



membranoje esanti pralaidumo perėjimo pora, kuri susidaro ir (arba) atsidaro, kai į mitochondriją patenka daug  $\text{Ca}^{2+}$  arba susidaro daug aktyvių deguonies formų, vadinamųjų ROS. Tai ypač svarbu fotosensibilizuotose ląstelėse, kur švitinimo metu susidaro daug ROS.

Antroji hipotezė teigia, kad mitochondrijų išorinėje membranoje proapoptoziniai Bcl-2 (angl. *B cells leukemia*) šeimos baltymai (7.4 pav.) sudaro baltyminius kanalus, pro kuriuos ir išeina apoptozę sukeliančios molekulės.

Kas yra toji Bcl-2 šeima? Tai maždaug 20 baltymų, kurių molekulėse yra nuo vieno iki keturių savitų domenų, vadinamų Bcl-2 homologijos domenais, BH. Šioje šeimoje yra du pošeimiai – proapoptoziniai ir antiapoptoziniai baltymai.

#### 7.4 pav. Bcl-2 šeimos baltymų sandara

Proapoptoziniai Bcl-2 šeimos baltymai skirstomi į dvi grupes – tik BH3 domeną turinčius (Bid, Bim, Bad, Puma) ir BH123 multidomeninius baltymus (Bax, Bak), kurie turi bent BH1, BH2 ir BH3 domenų. Jų veikla skiriasi. Sveikose ląstelėse BH123 multidomeninis baltymas Bax yra monomerinis ir plaukioja citoplazmoje arba būna silpnai prikibęs prie endoplazminio tinklo ar mitochondrijų. Gavęs apoptozės signalą, Bax keičia konformaciją, keliauja į mitochondriją, įsiterpia į jos išorinę membraną, ten oligomerizuojasi ir taip sudaro kanalą. Atrodo, kad tokių baltymų sąveiką su membrana veikia ir membranų lipidų pokyčiai. Fotosensibilizuotoms ląstelėms tai ypač svarbu, nes švitinimo metu susidariusios ROS gali oksiduoti lipidus ir taip keisti membranų savybes. Apie tik BH3 domeną turinčius baltymus – kitoje pastraipoje.

Antiapoptoziniuose Bcl-2 šeimos baltymuose, tokiuose kaip Bcl-2 ir Bcl-X<sub>L</sub>, yra visi keturi BH domenai. Šie baltymai aptinkami prie mitochondrijų, endoplazminio tinklo

membranų ir branduolio apvalkalo iš citoplazmos pusės. Manoma, kad antiapoptoziniai baltymai suriša proapoptozinius Bcl-2 šeimos baltymus, tokius kaip Bax ir Bak, ir taip slopina apoptozę. Čia reikia prisiminti likusią proapoptozinių Bcl-2 baltymų grupę – tik BH3 domeną turinčius baltymus. Jie, išskyrus Bid, suriša antiapoptozinius Bcl-2 šeimos baltymus, neleidžia jiems sąveikauti su Bax ir Bak ir taip padeda apoptozei.

Per Bid baltymą išorinis apoptozės kelias pasiekia mitochondrijas, nors šiam keliui, kitaip negu vidiniam apoptozės keliui, mitochondrijų apoptoziniai baltymai nėra būtini – vykdomąsias kaspazes čia aktyvina kaspazė-8. Ką daro Bid? Kaspazė-8 nuskelia dalį Bid molekulės, o susidaręs vadinamasis tBid keliauja į mitochondriją ir ten padeda citochromui c patekti į citozolį.

Molekuliniai apoptozės vyksmai yra intensyviai tiriama ir apoptozės kelius galima pavaizduoti gana išsamiai. Čia aprašytos tik reikšmingiausios molekulės ir svarbiausi apoptozės vyksmai, kuriais remsimės, nagrinėdami fotosensibilizuotų ląstelių apoptozę.

**Fotosensibilizuotų ląstelių apoptozė.** Švitinimo sukelta fotosensibilizuotų ląstelių apoptozė yra nustatyta daugelyje ląstelių *in vitro*, naudojant įvairius fotosensibilizatorius. Ypač greitai ir intensyviai apoptozė vyksta ląstelėse, fotosensibilizuotose junginiuose, kurie kaupiasi mitochondrijų membranose. Tačiau ir kitose ląstelės vietose esantys fotosensibilizatoriai gali sukelti mitochondrijų lemiamą apoptozę, tik ji išryškėja vėliau – reikia laiko, kol mitochondrijas pasiekia signalai, kylantys kitose ląstelės vietose, dėl kitų organelių pažeidimų. Kaip ir bendruoju atveju, apoptozės būdu žūvant fotosensibilizuotoms ląstelėms padidėja mitochondrijų membranų pralaidumas ir į citozolį patenka citochromas c, vėliau ima didėti kaspazių aktyvumas ir galima stebėti morfologinius ląstelių pokyčius (Oleinick ir kt., 2002).

Taigi, fotosensibilizuotose ląstelėse apoptozė vyksta. Ir vyksta vadinamuoju vidiniu, mitochondrinu keliu, kai ląstelės žūtį lemia ne žūties receptoriaus ligandas, o iš mitochondrijų išstrūkusios apoptozinės molekulės. Dėl ko švitinant fotosensibilizuotas ląsteles padidėja mitochondrijų membranų pralaidumas? Kaip ir bendruoju atveju, atsakymas neaiškus. Galima rasti duomenų, tvirtinančių tiek hipotezę, kuri remiasi pradiniu mitochondrijos vidinės membranos pralaidumo padidėjimu, tiek hipotezę, kuri remiasi pradiniu mitochondrijos išorinės membranos padidėjimu.

***Mitochondrijos membranų pralaidumo padidėjimas.*** Yra gerai žinoma, kad pralaidumo perėjimo pora (PPP) atsiveria, kai ląstelėje (o dėl to ir mitochondrijose) padidėja oksidantų, laisvų riebalų rūgščių ir  $\text{Ca}^{2+}$  koncentracija. Šių junginių koncentracija padidėja ir švitinant ląsteles įvairiais fotosensibilizatoriais. Tad lyg ir būtų prielaidų padidėti vidinės membranos pralaidumui. Ir iš tikrųjų buvo nustatyta, kad po švitinimo fotosensibilizuotų ląstelių mitochondrijose dažnai padidėja vidinės membranos pralaidumas, kad baltymai, sudarantys PPP, yra ypač jautrūs fotooksidacijai, kad nuslopinus PPP veiklą, fotosensibilizuotų ląstelių gyvybingumas padidėja, o jų citozolyje aptinkama mažiau citochromo c. Tačiau, kaip dažnai būna, vidinės membranos pralaidumo pokyčiai priklauso nuo fotosensibilizuotų ląstelių tipo ir nuo to, kurioje ląstelės vietoje telkiasi fotosensibilizatorius (Moreno ir kt., 2001).

Šiuo požiūriu ypač įdomu panagrinėti, kaip žūva ląstelės, kurių fotosensibilizacijai buvo naudota 5-aminolevulino rūgštis (ALA) (Ji ir kt., 2006). Mitochondrijų užpilde iš jos gaminamas fotosensibilizatorius protoporfirinas IX (PpIX). Jį suriša mitochondrijos išorinėje membranoje esantis baltymas, vadinamas periferiniu benzodiazepino receptoriumi (centrinis yra smegenyse). Manoma, kad šis baltymas įeina į PPP. Fotosensibilizacijai panaudojus PpIX, ląstelės žūva, vyrauja apoptozė. PpIX fotosensibilizacijos veiksmingumą galima sumažinti sintetiniu periferinio benzodiazepino receptoriaus ligandu – šis ligandas prikimba prie receptoriaus, tarsi užima PpIX vietą, ir pastarojo gaminamos ROS jau nepažeidžia benzodiazepino receptoriaus. Tai yra PPP komponentas lieka sveikas, pora neatsiveria, apoptozė nepaleidžiama. Tai rodytų tiesioginį ryšį tarp PPP ir PpIX fotosensibilizuotų ląstelių apoptozės.

Naudojant kitus fotosensibilizatorius, tokių akivaizdžių duomenų negauta. Bandymai su fotosensibilizatoriais, kurie telkiasi kitose ląstelių membranose ir kiek silpniau mitochondrijų membranose, tokiais kaip hipericinas ar foskanas (*Foscan*<sup>®</sup>, mTHPC), siūlo išvadą, kad bendruoju atveju mitochondrijų vidinės membranos pralaidumo padidėjimo nepakanka fotosensibilizuotų ląstelių žūčiai sukelti.

***Bcl-2 šeimos baltymai.*** Fotosensibilizuotų ląstelių žūčiai labai svarbūs Bcl-2 šeimos baltymai, kurie gali lemti mitochondrijų išorinės membranos pralaidumo

padidėjimą. Įvairiose ląstelėse, prikaupusiose įvairių fotosensibilizatorių, nustatyta, kad po švitinimo Bax, proapoptozinis Bcl-2 šeimos baltymas, iš citozolio perkeliamas į mitochondrijas ir svarbiausia, kad šio vyksmo kinetika sutampa su citochromo c pasirodymo citozolyje kinetika (yra ir išimčių).

Kas galėtų lemti apoptozei palankią Bax veiklą? Gali būti, kad švitinimo metu dėl biomolekulių fotooksidacijos sukeliama signalai, kurie aktyvuoja Bax ir (arba) panašiai veikiančią Bak. Signalų reikšmę galima patvirtinti pastebėjimais, kad švitinamose fotosensibilizuotose ląstelėse kaupiasi kai kurie lipidai, kaip antai ceramidas, kuris yra laikomas apoptozę sukeliančiu signalu (Almeida ir kt., 2004).

Yra ir kita hipotezė, kad Bax valdoma apoptozė kyla dėl antiapoptozinių Bcl-2 šeimos baltymų fotooksidacijos. Šie baltymai yra išsidėstę prie ląstelės membranų. Švitinant ląsteles, membranose susitelkę fotosensibilizatoriai gamina ROS, kurie oksiduoja greta jų esančias molekules – membranų lipidus ir baltymus bei arti membranų esančius baltymus, tarp jų ir Bcl-2. Pažeistas Bcl-2 nebegali trukdyti Bax baltymui įsiterpti į mitochondrijų išorinę membraną ir taip pradėti negrįžtamą apoptozės vyksmų kaskadą. Švitinimo sukelti Bcl-2 pokyčiai fotosensibilizuotose ląstelėse buvo nuodugniai tiriami. Nustatyta, kad šio baltymo pokyčiai priklauso nuo fotosensibilizatoriaus susitelkimo vietos ląstelėje ir galimos sąveikos su Bcl-2. Jeigu fotosensibilizatoriaus molekulė bus arti Bcl-2 molekulės, pastarąją oksiduos fotosensibilizatoriaus pagamintos ROS. Kitu atveju signalo perdavimo kelyje esanti vykdomoji molekulė (efektorius) gali modifikuoti baltymo molekulę, pavyzdžiui, fosforilinti Ser-70, kaip buvo pastebėta hipericinu fotosensibilizuotose ląstelėse.

Liko neaparta ypatingo Bcl-2 šeimos baltymo Bid būklė fotosensibilizuotose ir po to švitintose ląstelėse. Svarbiausias jo aktyviklis yra kaspazė-8, kuri veikia išoriniame, receptoriniame apoptozės kelyje. Tačiau jį aktyvinti gali ir lizosomų fermentai katepsinai, patekę į citozolį, suirus lizosomos membranai. Tad, veikiant kai kuriems fotosensibilizatoriams, telkiamiems lizosomose, katepsinai ištrūksta į citozolį, skaido Bid'ą ir prasideda mitochondrinio apoptozės kelio vyksmai (Agostinis ir kt., 2004).

***Nuo kaspazių nepriklausoma apoptozė.*** Padidėjus mitochondrijų membranų pralaidumui, į citozolį patenka ne tik kaspazių aktyvikliai, bet ir dar du svarbūs baltymai:

AIF ir EndoG. Šie baltymai keliauja į branduolį ir, nepriklausomai nuo kaspazių, ardo chromatiną ir DNR. Švitintose fotosensibilizuotose ląstelėse AIF pastebėtas ir citozolyje, ir branduolyje. Dažnai tai vyksta lygia greta su citochromu c atsiradimu citozolyje, tačiau įdomu, kad kai kuriomis sąlygomis AIF ištrūksta iš mitochondrijų, o citochromas c lieka. Toks reiškinys pastebėtas ląstelėse, fotosensibilizuotose porfirinu PpIX. Kaip aptarėme pirmiau, PpIX suriša išorinėje mitochondrijos membranoje esantis baltymas, vadinamas periferiniu benzodiazepino receptoriumi. Kadangi jis yra pralaidumo perėjimo poros sudėtinė dalis, siūloma, kad šiuo atveju, būtent atsivėrus tai porai, į citozolį patenka AIF. Citochromas c turėtų būti kitose mitochondrijos vietose, gana glaudžiai susijęs su vidine membrana ir jam atpalaiduoti reikėtų papildomų signalų – Bax ar Bak aktyvinimo, lipidų oksidacijos ar kt.

## **Nekrozė**

Nekrozė yra apibrėžiama kaip ląstelės žūtis be apoptozės ar autofagijos požymių. Dažnai nekrozė laikoma atsitiktine, pasyvia ląstelės žūtimi, kuri išstinka ląstelę tuomet, kai žalingas poveikis būna labai stiprus ir viršija ląstelės galias išgyventi arba žūti tvarkingai. Tada plazminė membrana prakiūra ir citoplazma išsilieja už ląstelės ribų. Gyvame organizme to neturi būti, todėl kyla uždegimas, kurį skatina citoplazmoje buvusios uždegiminės molekulės (Edinger ir Thompson, 2004).

Pastaruoju metu kaupiasi vis daugiau duomenų, kad nekrozinę ląstelės žūtį sukelia vidinė programa, paleidžianti signalinius vyksmus, kaip atsaką į kai kuriuos stimulus.

**Nekrozės morfologiniai požymiai.** Nekrozinių ląstelių citoplazmoje padaugėja pūslelių, ląstelės išbrinksta, matoma pro plazminę membraną besiliejanči citoplazma. Lengviausia nekrozę aptikti dažant ląsteles fluorescenciniais dažais. Kai kurie iš jų, pavyzdžiui, akridino oranžas, lengvai ir greitai patenka į gyvas ląsteles, o kiti, pavyzdžiui, propidžio jodidas, į ląstelę patekti gali tik tada, kai jos plazminė membrana nebegali būti užtvara tarp ląstelės ir aplinkos. Tad nudažius ląsteles tokių dviejų dažų mišiniu, galima lengvai atskirti gyvas ir negyvas ląsteles bei nustatyti apoptozę. Neapoptozinės negyvos ląstelės

paprastai laikomos nekrozinėmis, tačiau visada reikia turėti omenyje ir autofagijos galimybę.

**Fotosensibilizuotų ląstelių nekrozė.** Švitinamos fotosensibilizuotos ląstelės labai dažnai žūsta nekrozės būdu. Paprastai nekrozinė žūtis išstinka ląsteles, kai jose pagaminama daug ROS, pavyzdžiui, kai gauna didelę dozę šviesos energijos, arba kai fotosensibilizacijos sąlygos būna palankios sutelkti fotosensibilizatorius plazminėje membranoje (trumpa inkubacija su hidrofobiniais junginiais), citozolyje arba tokiose organelėse, tokiose kaip lizosomos. Plazminėje membranoje esantys fotosensibilizatoriai gali sukelti lipidų ir baltymų pažaidas. Dėl to sutrinka membranos pralaidumas, pakinta jonų srautai, greitai mažėja ląstelės ATP atsargos, ir ląstelė nevaldomai žūva. Citozolyje fotosensibilizatoriai gali gaminti ROS, kurie pažeidžia apoptozei svarbius fermentus, tokius kaip prokaspazės. Tokie aktyvių fermentų pirmtakai nebegali būti aktyvuojami, ir taip nuslopinama apoptozė (Moor, 2000).

Įdomūs rezultatai buvo gauti tiriant, kaip žūva ląstelės, fotosensibilizuotos endogeniniu protoporfirinu IX, PpIX. Kaip jau buvo minėta, ląstelių, kurios yra laikomos terpėje su 5-aminolevulino rūgštimi, mitochondrijų užpilde sintezuojamas PpIX. Jeigu ląstelės švitinamos tuo metu, kai PpIX dar yra mitochondrijose, ląstelės žūva apoptozės būdu. Jei švitinamos tuomet, kai PpIX išnešamas iš mitochondrijų į kitus ląstelės skyrius, pradeda ryškėti nekrozė.

## **Autofagija**

Susidėvėjusios ląstelės dalys ar jas sudarančios polimerinės molekulės, tokios kaip baltymai, nukleorūgštys, lipidai, angliavandeniai, yra skaidomos pačioje ląstelėje, kad iš gautų medžiagų būtų galima pagaminti naujas ląstelės sudėtines dalis. Svarbiausios skaidymo organelės yra lizosomos – vakuolės, pilnos įvairių skaidymo fermentų. Baltymus dažnai skaido proteasomos. Greta šių skaidymo būdų, ląstelėje vyksta dar ir autofagija.

Autofagija [gr. savivalga, savęs (auto-) valgymas (-fagija)] yra savitas eukariotinės ląstelės organelių ir ilgai gyvuojančių baltymų skaidymas. Vykstant autofagijai (tiksliau, makroautofagijai, kurią čia vadinsime autofagija, neminėdami mikroautofagijos), ląstelės

vidinės membranos apgaubia pasmerktą organelę ir perduoda ją lizosomai. Autofagija vyksta ląstelėms badaujant, trūkstant deguonies, pakilus temperatūrai, persitvarkant audiniams ar ląstelėms (pavyzdžiui, vystantis gemalui). Autofagija pašalina pažeistas organeles ar patogenus ir tokiu būdu padeda ląstelei išgyventi sunkius laikus. Tačiau per daug intensyvi autofagija gali nužudyti ląstelę. Tada autofagija laikoma II tipo programuota ląstelės žūtimi. Autofagija svarbi daugeliui fiziologinių vyksmų. Ji reguliuoja ląstelės augimą, senėjimą, svarbi imunitetui.

**Autofagijos morfologiniai požymiai.** Naudojant optinį mikroskopą, ląsteles su intensyvia apoptoze atpažinti yra daug sunkiau nei apoptozines ar nekrozines ląsteles. Autofaginių ląstelių citoplazma labiau grūdėta, jose būna daugiau pūslelių. Tačiau pūslelių padaugėja ir vykstant nekrozei, todėl įrodyti, kad tokiose ląstelėse vyksta būtent autofagija, galima ląsteles nudažius taip, kad išryškėtų saviti baltymai, būdingi autofaginėms pūslelėms. O tai nėra paprasta.

**Autofagijos molekuliniai vyksmai.** Sparčiai vystantis genomų tyrimo metodams, neseniai aptikta genų, kurie lemia autofagiją ir kurie mažai pakito evoliucijos eigoje. Tai paskatino intensyviau tirti šį programuotos ląstelių žūties tipą, ieškoti autofagijai reikšmingų molekulių. Šiuo metu yra nustatyti ryškiausi baltymai, reikalingi autofagijai, apibrėžtos autofagijos stadijos (Edinger ir Thompson, 2004). Pirmąją, indukciją, lemia savitosios kinazės. Vėliau Atg šeimos baltymai atrenka ir supakuoja pasmerktuosius ląstelės komponentus. Veikiant fosfatidilinozitolio 3-kinazei PI3K ir kai kuriems Atg šeimos baltymams, susidaro vadinamoji pradinė autofagosomos struktūra PAS, turinti dvigubą membraną. Veikiant baltymams Atg6/Beclin1 ir Atg8/LC3, PAS didėja, kol susidaro uždara pūslelė autofagosoma. Veikiant SNARE baltymams, autofagosoma susilieja su lizosoma. Čia hidrolazės suskaido organeles ar baltyminius darinius į smulkesnius blokus, kurie išmetami į citozolį naujiems biosintezės vyksmams (7.5 pav.).

### 7.5 pav. Autofagijos vyksmų seka

Autofagijos sąsajos su apoptoze iki šiol nėra visai aiškios. Žinoma, kad autofagijos ir apoptozės ženklus galima aptikti tose pačiose ląstelėse tomis pačiomis sąlygomis. Dažniausiai pirmiau pastebima autofagija, o vėliau išryškėja apoptozė. Manoma, kad kaspazės, kurios yra taip reikalingos apoptozei, autofagijos metu nėra aktyvinamos. Priešingai, autofagija ypač ryški tada, kai kaspazės slopinamos.

#### **Fotosensibilizuotų ląstelių autofagija**

Kadangi švitinant fotosensibilizuotas ląsteles susidaro ROS, kurios lengvai oksiduoja baltymus ir lipidus, nenuostabu, kad tokiose ląstelėse neseniai aptikta autofagija. Tai būdas sunaikinti organeles su pažeistomis membranomis ir didelius baltymų agregatus. Jie susidaro dėl fotocheminių reakcijų tarp amino rūgščių radikalų. Taip atsiranda kovalentinės baltymų sąsiuvos, kurios suriša kelias baltymų molekules į vieną negamtinį darinį, ląstelei nereikalingą, todėl žalingą. Kadangi tai negamtinis darinys, proteasomos jo sunaikinti negali. Lieka autofagija. Autofagija iš esmės nėra mirtinas vyksmas. Autofagija yra būdas išlikti, ypač kai tenka badauti. Nėra aišku, ar autofaginė ląstelių žūtis ištinka viršijus kažkokią autofagijos ribą, ar nenustatytos signalinės molekulės tam tikromis sąlygomis perjungia išlikimo signalą į žūties signalą.



Tiriant, kaip žūva hipericinu fotosensibilizuotos ląstelės, kuriose nėra Bax geno, lemiančio apoptozę, buvo pastebėta, kad jos žūva taip pat kaip ląstelės su Bax genu, tik be apoptozės ženklų. Švitinimas sukėlė neapoptozinę žūtį, kuriai buvo nustatyti struktūriniai ir biocheminiai autofagijos požymiai. Porficenu fotosensibilizuotose laukinio tipo ląstelėse švitinimas sukėlė tuo pačiu metu ir apoptozę, ir autofagiją. Įdomu, kad apsaugojus nuo fotooksidacijos Bcl-2 baltymą, sumažėjo ne tik kaspazių aktyvinimas, bet ir nesusidarė baltymo LC3 lipidintas darinys, kuris yra autofagijos žymuo. Ryškėja iki šiol nežinota Bcl-2 funkcija – valdyti autofagijos vyksmus.

Ląstelės vieta, kur telkiasi fotosensibilizatoriaus molekulės, gali lemti ne tik autofagijos indukciją, bet ir jos baigmę. Pavyzdžiui, prieš prasidedant apoptozei vyksta mitochondrijų autofagija, kuri vadinama mitofagija. Kai kaspazės aktyvinamos, mitofagija nutrūksta. Iki šiol nėra aišku, ar mitofagija slopina ląstelių žūtį, neleisdama apoptozinėms molekulėms patekti į citoplazmą, ar skatina ląstelių žūtį, naikindama organeles, kurios yra svarbiausios ATP gamybai, taip mažindama energiją, būtiną ląstelės medžiagų apykaitai.

Gausūs fotosensibilizuotų ląstelių žūties tyrimai rodo, kad tokios ląstelės gali žūti įvairiais būdais. Dažniausiai ląstelėse galima pastebėti ne vieno žūties kelio požymių (Kessel ir Arroyo, 2007). Ir nors vyrauja apoptozė, jai sutrikus, prasideda nekrozės ar autofagijos vyksmai.

### **Tarpląstelinio užpildo pokyčiai**

Audinyje ląsteles supa neląstelinė medžiaga, vadinamasis tarpląstelinis užpildas (angl. *extracellular matrix*) (7.6 pav.). Tai ir užtvara, atskirianti ląstelių grupes, ir atraminis tinklas, kuris suteikia audiniams formą. Tarpląstelinį užpildą sudaro baltymai ir angliavandeniai, kuriuos gamina ir į užpildą išskiria pačios ląstelės. Žymiausi užpildo baltymai yra įvairūs kolagenai. Tarpląstelinis užpildas nėra pasyvus darinys. Juo sklinda signalai, valdantys organų vystymąsi, ląstelių dalijimąsi, judėjimą. Pavyzdžiui, naviko ląstelių metastazei labai svarbūs yra ląstelių sąlytis (adhezija) ir ląstelių ryšiai su tarpląstelinio užpildu. Šie ryšiai priklauso nuo sąlyčio molekulių, užpildo sudėtinių medžiagų ir nuo to, kokie aktyvūs yra jo fermentai, skaidantys baltymus ir angliavandenius.

### 7.6 pav. Tarpląstelinis užpildas

Tarpląstelinio užpildo pažaidos arba jo pokyčiai, kilę dėl jame esančių ląstelių pažaidų, gali lemti viso organizmo atsaką į fotosensibilizacijos ir švitinimo sukeltas lokalias vietas pažaidas. Dabar apžvelgsime, kas yra žinoma apie fotosensibilizacijos sukeltus tarpląstelinio užpildo pokyčius.

#### Ląstelių sąlyčio molekulės

Dažniausiai po švitinimo fotosensibilizuotų ląstelių sąlytis su tarpląstelinio užpildu ir jų geba prasiskverbti pro pamatinę laminą sumažėja. Bene svarbiausios molekulės, lemiančios ląstelių tarpusavio ryšius, priklauso dviem baltymų didšeimėms – integrinams ir kadherinams. Integrinai, be to, yra svarbūs ir perduodant signalą. Šiuo atveju jie formuoja santalkos plokšteles (angl. *focal adhesion plaques*), kai agreguoja daug integrinų molekulių. Pašvitinus ląsteles, fotosensibilizuotas benzoporfirino dariniu, integrinų santalkos plokštelės suyra ir integrinai difuziškai pasiskirsto po visą ląstelės paviršių. Mat po švitinimo integrinai nebesugeba rištis su tarpląstelinio užpildo baltymais (Runnels ir kt., 1999). Panašiai integrinai persiskirsto ir švitinant ląsteles, fotosensibilizuotas iš 5- aminolevulino rūgšties (ALA) susidariusiu protoporfirinu IX. Šiuo atveju kadherinų raiška nepakinta. Tuo tarpu fotosensibilizacijai panaudojus cinko ftalocianiną, labai greitai nutrūksta kadherinų sudaromi ląstelių ryšiai. Tik vėliau susilpnėja integrinų sąveika su ląstelių auginimo pagrindu.

Įdomus reiškinys buvo pastebėtas tiriant leukocitų fotosensibilizaciją fotofrinu (*Photofrin*<sup>®</sup>). Po švitinimo sustiprėjo tam tikros grupės leukocitų sąlytis su normalių

kraujagyslių sienelėmis, t.y. su kraujagyslių endotelio ląstelėmis, o su naviko kapiliarų sienelėmis liko nepakitęs (Dellian ir kt., 1995).

**Citokinai.** Jeigu švitinamos fotosensibilizuotos ląstelės nesunaikinamos, tai dėl trumpalaikio fotooksidacinio streso pakinta citokinų ir streso atsako genų raiška ir atitinkamų baltymų sintezė ląstelėje. Tokios ląstelės į tarpląstelinį užpildą išmeta įvairius citokinus, kurie būna svarbūs viso organizmo atsakui į fotosensibilizaciją.

Citokinai yra įvairialypė nedidelių baltymų grupė, kuriais yra perduodamas signalas kitoms ląstelėms ar tai pačiai ląstelei, kuri tuos citokinus sekretavo. Kitos ląstelės, kurios reaguoja į citokinus, gali būti tos ląstelės kaimynės arba labai tolimos, kitos organizmo dalies ląstelės, jei citokinai patenka į kraują ar limfą. Tuo citokinai yra panašūs į hormonus. Tik hormonus gamina specialūs organai ir jie visi patenka į kraują, o citokinus gali gaminti daugelis ląstelių ir jie patenka į tarpląstelinį užpildą. Citokinai yra labai svarbūs organizmo gynybai bei prisitaikymui ir yra organizmo imuninio atsako dalis. Tačiau jų veikla yra platesnė nei imuninis atsakas.

Citokinų nešamas signalas yra perduodamas ląstelei, citokinui prisirišant prie atitinkamo receptoriaus, esančio ląstelės paviršiuje. Po to pakinta kai kurių genų ir jų nuorašos veiksmų raiška. Atrodo, kad daugelis citokinų veikia gana panašiai ir jų veiklos rezultatai būna panašūs. Navikuose aptinkami citokinai lemia navikų augimą ir plitimą.

Žymiausi citokinai yra interleukinai (IL), taip pavadinti dėl to, kad valdo leukocitų veiklą. Fotosensibilizuotose ląstelėse po švitinimo pakinta, dažniausiai padidėja, įvairių interleukinų raiška. Tai IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10. Šių interleukinų reikšmę organizmo atsakui atskleidė jų slopinimo rezultatai. Nuslopinus kai kuriuos citokinus, sumažėjo fotosensibilizuotos navikų terapijos veiksmingumas, t. y. sulėtėjo švitintų navikų nykimas. ALA-veiktose ląstelėse po švitinimo padaugėjo IL-6 molekulių, ir buvo atskleista, kad dėl jų veiklos ląstelės tapo atsparesnės apoptozei. Kai kuriuose navikuose IL-6 veikia ir kaip augimą skatinantis veiksnys. Kita vertus, po FNT ląstelėse sumažėja IL-6 ir kitų citokinų receptorių. Dėl to net ir padaugėjus citokinų, jie nesugeba valdyti ląstelių.

**Augimo veiksniai.** Augimo veiksniai yra ląstelių sekretuojami baltymai, kurie, susirišę su ląstelės paviršiuje esančiais receptoriais, skatina ląstelę augti, dalytis ir diferencijuoti.

Iš apibrėžimo aišku, kad augimo veiksniai yra savita citokinų ir hormonų grupė. Augimo veiksnių poveikį ląstelei lemia tos ląstelės receptorių ir pačios ląstelės būseną.

Daugelyje žmonių navikų yra aptinkama palyginti daug EGF receptorių (EGFR). Dėl to padidėja ląstelių judrumas, lipnumas (adhezija), dalijimasis ir kraujagyslių formavimasis. Yra pastebėta, kad fotosensibilizuotose ląstelėse po švitinimo sumažėja EGFR geba fosforilinti tiroziną, t. y. kinazinis aktyvumas. Ląstelėse, kurių fotosensibilizacijai naudotas ALA arba fotofrinas, po švitinimo liko tik apie 10% buvusio kinazinio aktyvumo. Reiškia, tokios ląstelės augs daug lėčiau negu negydyto organizmo ląstelės.

Kitas naviko augimui svarbus veiksnys yra VEGF. Fotosensibilizuotos naviko ląstelės po švitinimo gamina daugiau šio baltymo, kuris patekęs į tarpląstelinį užpildą pasiekia kraujagyslių endotelio ląsteles ir prisirišęs prie jų paviršiuje esančio receptoriaus VEGFR skatina kapiliarą tūsti naviko link. Naviką pasiekę nauji kapiliarai atneša daugiau kraujo, daugiau deguonies, daugiau maisto medžiagų, ir FNT metu išlikusioms gyvoms ląstelėms sudaromos puikios sąlygos atsigauti ir dalytis. Tad VEGF raiškos padidėjimas yra nepageidautinas šalutinis FNT poveikis.

Įdomių duomenų gauta tiriant ląstelių, fotosensibilizuotų ftalocianino dariniu, pokyčius po švitinimo. Pasirodė, kad ląstelėse sumažėjo dviejų su tarpląstelinio užpildu susijusių augimo veiksnių kiekis. Tai buvo transformuojantis augimo veiksnys TGF- $\beta$  ir bazinis fibroblastų augimo veiksnys bFGF. Įdomiausia, kad pašvitinus fotosensibilizatoriaus prikaupusį trimatį kolageno tinklą, kuris šiek tiek panašus į gyvūnų tarpląstelinį užpildą, ir po to patalpinus į jį „švarias“ ląsteles, TGF- $\beta$  ir bFGF kiekis tose ląstelėse taip pat sumažėja (Heckenkamp ir kt., 2004).

**Eikozanoidai.** Šios medžiagos dar vadinamos prostanooidais, prostaglandiniais, arachidono rūgšties metabolitais.

Ląstelės membranos yra sudarytos iš lipidų. Į vienos iš lipidų grupių – trigliceridų – sudėtį įeina riebalų rūgštys. Plazminėje membranoje, kuri atskiria ląstelės vidų nuo išorinės aplinkos, yra daug arachidono rūgšties. Veikiant savitam fermentui COX, iš jos gaminami labai aktyvūs uždegimo tarpininkai eikozanoidai. Patekę į tarpląstelinį užpildą, jie tampa signalais, į pažeistą vietą pritraukiančiais leukocitus. Po FNT padidėja COX

raiška ir padaugėja prostaglandinų. Šis FNT bruožas padeda navikui ataugti, nes pritraukia į pažeistą vietą naujų kapiliarų. Kita vertus, nustatyta, kad kraujagyslių endotelio ląstelės po FNT sekretuoja kitos eikozanoidų grupės medžiagas – tromboksanus. Tromboksanai skatina susidaryti trombus ir taip užkemša kapiliarus, nutraukdami kraujo tėkmę ir užkirsdami kelią maisto medžiagoms pasiekti naviko ląsteles. Tad po FNT susidarę eikozanoidai veikia priešingai ir galutinį rezultatą nuspėti yra nelengva.

**Užpildo metaloproteinazės.** Užpildo metaloproteinazės MMP (angl. *matrix metalloproteinases*) yra baltymus skaidantys fermentai endopeptidazės, esančios ląstelės išorėje ir gebančios skaidyti įvairias tarpląstelinio užpildo sudėtines medžiagas. Užpildo metaloproteinazės, ardydamos tarpląstelinį užpildą, praskina kelią naujiems kapilarams, padaro vietos augančio naviko ląstelėms ar padeda naviko ląstelėms nušliaužti tolyn nuo naviko, tuo padėdamos navikui plisti, sudaryti metastazes (Pazos ir Nader, 2007). Ląstelės sintezuoja šiuos fermentus ir po to išmeta į tarpląstelinį užpildą. Panaudojus fotosensibilizacijai ALA, po švitinimo ląstelėse padidėja MMP-1 ir MMP-3 raiška. Tai turėtų padidinti metastazių galimybę – žalingas pašalinis FNT poveikis. Tačiau yra nustatyta, kad po FNT susidariusios ROS tarpląsteliniam užpilde generuoja į baltymų sudėtį įeinančių amino rūgščių laisvuosius radikalus. Tie radikalai sąveikauja su kitomis tarpląstelinio užpildo molekulėmis, ir susidaro vadinamosios baltymų sąsiuvos. Tai buvo įtikinamai parodyta, tarpląstelinio užpildo fotosensibilizacijai panaudojus ftalocianino darinį. Susidarė metaloproteinazėms atsparios baltymų sąsiuvos, kurios trukdė ląstelėms judėti. Tad šis FNT poveikis neleidžia navikui plisti ir susidaryti metastazėms.

Visi šie pavyzdžiai rodo, kad FNT veikia ne tik naviko ląsteles, bet plinta kaip grandininė reakcija ląsteliniams ir užląsteliniais signalais ir pasiekia gana tolimas organizmo vietas. Tarpląstelinio užpildo komponentai patirs FNT poveikį net nebūdami pirminiais taikiniais. Dėl lemiamos šio užpildo įtakos kraujagyslių formavimuisi, naviko augimui ir sklaidai fotosensibilizacijos ir šviesos sukelti tarpląstelinio užpildo pokyčiai gali lemti išgyvenusių ląstelių likimą.