

mgr Beata Joanna  
Mossakowska✉,

dr Anna Fabisiewicz,

prof. dr hab. Janusz Siedlecki

Zakład Onkologii Molekularnej i Translacyjnej, Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy, Warszawa, ul. Roentgena 5, 02-781 Warszawa

[https://doi.org/10.18388/pb.2021\\_394](https://doi.org/10.18388/pb.2021_394)

✉ autor korespondujący: [beata.mossakowska@pib-nio.pl](mailto:beata.mossakowska@pib-nio.pl)

**Słowa kluczowe:** terapia fotodynamiczna, fotouczulacz, protoporfiryna IX, reaktywne formy tlenu, śmierć komórki

**Wykaz najważniejszych stosowanych skrótów:** PDT – terapia fotodynamiczna (ang. *photodynamic therapy*); PS – fotouczulacza (ang. *photosensitizer*); PpIX – protoporfiryna IX (ang. *protoporphyrin IX*); ROS – reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*)

## STRESZCZENIE

Terapia fotodynamiczna (ang. *photodynamic therapy*, PDT) jest jedną z najmniej toksycznych metod walki z rakiem. Podany pacjentowi fotouczulacz (ang. *photosensitizer*, PS) akumuluje się w tkance guza, gdzie pod wpływem światła o odpowiedniej długości fali i intensywności dochodzi do jego aktywacji. Aktywowany PS w obecności tlenu prowadzi do powstania reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS), które powodują liczne uszkodzenia. Powstałe nieodwracalne uszkodzenia prowadzą do śmierci komórek poprzez mechanizm apoptozy, nekrozy lub autofagii. Ponadto w wyniku PDT dochodzi do zapoczątkowania ostrej lokalnej reakcji zapalnej, która bierze udział w usuwaniu martwych komórek, przywróceniu normalnej homeostazy tkanek, a czasami i w rozwinięciu odporności ogólnoustrojowej. Część komórek nowotworowych może jednak przeżyć terapię i zmienić swój fenotyp, prowadząc do pojawienia się oporności. W ochronę przed cytotoksycznym efektem PDT mogą być zaangażowane mechanizmy prowadzące do obniżenia poziomu fotouczulacza w komórkach, zwiększone zdolności antyoksydacyjne, nadekspresja białek opiekuńczych czy aktywacja ścieżek sygnałowych sprzyjających przeżyciu.

## WSTĘP

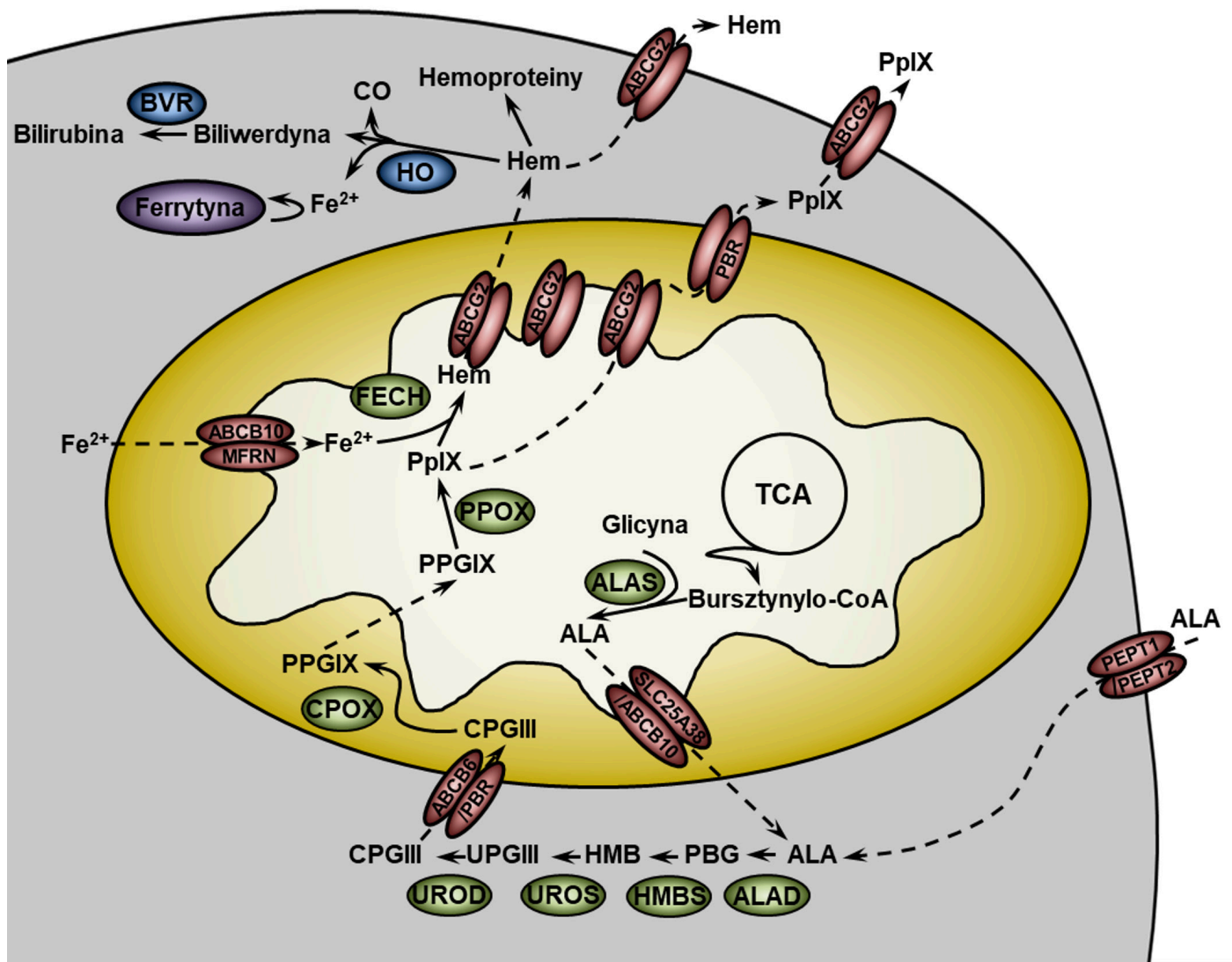
Terapia fotodynamiczna (ang. *photodynamic therapy*, PDT) jest jedną z najmniej toksycznych metod walki z rakiem, klinicznie zatwierdzoną od wczesnych lat 90 XX wieku [1,2]. Wymaga ona podania pacjentowi fotouczulacza (ang. *photosensitizer*, PS), który preferencyjnie akumuluje się w chorej tkance. Fotouczulacz pod wpływem światła o odpowiedniej długości fali i właściwym poziomie natężenia zostaje aktywowany, prowadząc do powstania reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS) niszczących guz i jego unaczynienie [3,4].

Toksyczność środków chemicznych pod wpływem światła była znana i wykorzystywana od początków XX wieku, jednak dopiero w latach siedemdziesiątych praca Dougherty'ego ze związkami porfirynewymi doprowadziła do powstania terapii fotodynamicznej, jaką dziś znamy [3,5].

Obecnie PDT stosuje się w leczeniu zmian nowotworowych ulokowanych na powierzchni ciała (skóra), jak i wewnątrz organizmu (m.in. rak pęcherza, płuc, mózgu, przelyku, trzustki, chorób ginekologicznych), ale także do leczenia niektórych nienowotworowych oraz przednowotworowych zmian dermatologicznych (np. trądzik pospolity, łuszczyca, brodawczak wirusowy, rogowacenie słoneczne), czy nawet fotoodmładzania [1,6,7]. W przypadku przednowotworowych zmian ginekologicznych, takich jak śródnaślukowa neoplazja sromu (ang. *vulvar intraepithelial neoplasia*, VIN), PDT stanowi cenną alternatywę dla leczenia chirurgicznego. Pozwala ona na leczenie wieloogniskowej choroby przy minimalnym niszczeniu tkanek, zachowaniu anatomii sromu i doskonałych efektach kosmetycznych [8,9]. W latach 2013-2015 w Centrum Onkologii - Instytucie im. Marii Skłodowskiej-Curie pozytywny wynik leczenia przy pomocy kwasu aminolewulinowego uzyskano u 91% pacjentek ginekologicznych (dane niepublikowane). Metodę fotodynamiczną można również stosować do wykrywania nowotworów w diagnostyce fotodynamicznej (ang. *photodynamic diagnosis*, PDD) [1,7].

## KWAS 5-AMINOLEWULINOWY JAKO LEK STOSOWANY W PDT

Kwas 5-aminolewulinowy (ang. *5-aminolevulinic acid*, 5-ALA) jest substratem szlaku biosyntezy hemu. W komórkach powstaje on w macierzy mitochondrialnej z połączenia bursztynylo-CoA i glicyny w obecności syntazy kwasu 5-aminolewulinowego (ang. *5-aminolevulinic acid synthase*, ALAS) (Ryc. 1). Enzym ten występuje w dwóch izoformach: izoforma ALAS1 jest enzymem metabolizmu podstawowego, a izoforma ALAS2 jest obecna tylko w prekursorach erytroidalnych [10,11].



**Rycina 1.** Szlak metabolizmu hemu. W macierzy mitochondrialnej w wyniku połączenia przez ALAS glicyny z bursztynilo-CoA powstaje 5-ALA, który następnie po przejściu do cytoplazmy w wyniku licznych przemian jest przekształcany w CPGIII. Transport 5-ALA odbywa się prawdopodobnie przy udziale nośnika substancji rozpuszczonych SLC25A38 (ang. *solute carrier family 25 member 38*) i transportera ABCB10 (ang. *ABC subfamily B member 10*). Natomiast egzogenne podany 5-ALA jest dostarczany do cytoplazmy komórek przez 1 lub 2 transporter peptydu (ang. *peptide transporter 1/2*, PEPT1/PEPT2). CPGIII jest transportowany do mitochondriów, gdzie w przestrzeni międzylonowej zostaje przekształcany przez CPOX do PPGIX, a następnie w matrix mitochondrialnej w PpIX przez PPOX. W kolejnym etapie FECH prowadzi do powstania hemu poprzez włączenie do PpIX żelaza. PpIX oraz hem mogą być wyrzucane z komórki z udziałem transportera ABCG2. Hem w komórce jest wykorzystany do tworzenia hemoprotein, lub poddawany procesowi degradacji przy udziale HO, prowadząc do uwolnienia biliwerdyny, CO i Fe<sup>2+</sup>. Jony żelaza mogą być wiązane i przechowywane przez ferrytynę. Biliwerdyna jest przekształcana przez BVR do bilirubiny [10,11,13,14].

Po przejściu do cytoplazmy dwie cząsteczki 5-ALA są łączone przez dehydratazę kwasu 5-aminolewulinowego (ang. *5-aminolevulinic acid synthase dehydratase*, ALAD), co prowadzi do powstania porfobilinogenu (ang. *porphobilinogen*, PBG). Z połączenia czterech cząsteczek PBG przez deaminazę porfobilinogenu (ang. *porphobilinogen deaminase*, PBGD) powstaje niestabilny hydroksymetylobilan (ang. *hydroxymethylbilane*, HMB), który może ulec spontanicznej cyklizacji do uroporfirynogenu I (ten związek nie jest prekursorem hemu) albo zostać przekształcony przez syntazę uroporfirynogenu III (ang. *uroporphyrinogen III syntha-*

*se*, UROS) do uroporfirynogenu III (ang. *uroporphyrinogen III*, UPGIII). Następnie dekarboksylaza uroporfirynogenu (ang. *uroporphyrinogen decarboxylase*, UROD) katalizuje przekształcenie UPGIII do koproporfirynogenu III (ang. *coproporphyrinogen III*, CPGIII), który jest transportowany do przestrzeni międzylonowej mitochondriów prawdopodobnie przez obwodowe receptory benzodiazepinowe (ang. *peripheral-type benzodiazepine receptors*, PBR) lub transporter zawierający kasetę wiążącą ATP (ang. *ATP-binding cassette*, ABC) - ABCB6 (ang. *ABC subfamily B member 6*), gdzie ulega przemianie przez oksydazę koproporfirynogenu (ang. *co-*

*protoporphyrinogen oxidase*, CPOX) do protoporfirynogenu IX (ang. *protoporphyrinogen IX*, PPGIX). PPGIX jest następnie przekształcany w protoporfirynę IX (ang. *protoporphyrin IX*, PpIX) za pomocą oksydazy protoporfirynogenu (ang. *protoporphyrinogen oxidase*, PPOX), po czym ferrochelataza (ang. *ferrochelatase*, FECH) wstawia jony żelaza  $Fe^{2+}$  do PpIX prowadząc do powstania hemu [10,11].

Mitoferyna (ang. *mitoferrin*, MFRN) oraz białko ABCB10 są zaangażowane w dostarczanie żelaza koniecznego do syntezy hemu do mitochondriów. Nieprzekształcona PpIX może być usunięta z komórki przez ABCG2 (ang. *ABC subfamily G member 2*) i PBR (Ryc. 1) [10,12,13].

Enzymem odpowiedzialnym za degradację hemu, prowadzącym do powstania biliwerdyny, tlenku węgla (CO) i żelaza, jest oksygenaza hemowa (ang. *heme oxygenase*, HO) (Ryc. 1), która występuje w dwóch izoformach: indukowalnej HO-1 i wyrażanej konstytutywnie HO-2. Do przeprowadzenia reakcji wymaga ona reduktazy cytochromu p450, zredukowanej formy fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego – NADPH (ang. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, NADP<sup>+</sup>) oraz tlenu. Biliwerdyna jest następnie przekształcana do bilirubiny przez zależną od NADPH reduktazę biliwerdyny (ang. *biliverdin reductase*, BVR) (Ryc. 1). Zarówno biliwerdyna jak i bilirubina pełnią funkcje antyoksydantów w komórce poprzez wychwytywanie i neutralizację ROS [11,14].

Terapia fotodynamiczna wykorzystuje 5-ALA jako prekursor silnego fotouczulacza, jakim jest PpIX oraz fakt, że ferrochelataza (FECH) jest enzymem ograniczającym szybkość reakcji. Podany zewnętrznie 5-ALA prowadzi do omińnięcia regulacji hamowania ALAS1 przez hem w mechanizmie ujemnego sprzężenia zwrotnego, który zwykle prowadzi do wytwarzania PpIX w takich ilościach, które mogą zostać skutecznie przekształcone w hem za pomocą FECH. W ten sposób nadmiernie wytwarzana PpIX nie jest wystarczająco szybko przekształcana w hem przez ferrochelatazę, co prowadzi do jej nagromadzenia się w komórkach. Zgromadzona w komórkach PpIX może zostać wzbudzona przez światło czerwone. Prowadzi to do uszkodzeń oksydacyjnych i indukuje cytotoksyczność w naświetlanej tkance. Dodatkowo zmiany w aktywności enzymów metabolizmu hemu w guzie nowotworowym w porównaniu z normalnymi komórkami prowadzą do wyższej akumulacji PpIX w komórkach transformowanych [11].

## MECHANIZM DZIAŁANIA PDT

PS lub jego prekursor, jest podawany pacjentowi systemowo lub miejscowo i selektywnie akumuluje się w tkance zmienionej chorobowo [6,7]. Selektowna akumulacja fotouczulacza w tkance nowotworowej może być wynikiem zwiększenia tempa proliferacji komórek nowotworowych, zwiększoną liczbą receptorów lipoprotein o niskiej gęstości (ang. *low-density lipoprotein*, LDL) na komórkach nowotworowych (wiele PS wiąże się z LDL), z obecnością makrofagów infiltrujących guz (wyłapują hydrofobowe PS) i z obniżonym pH (ułatwia wychwytywanie komórkowe), ale także nieprawidłową strukturą zrębu guza charakteryzującą się dużą przestrzenią śródmiąższową, nieszczelnymi naczyń-

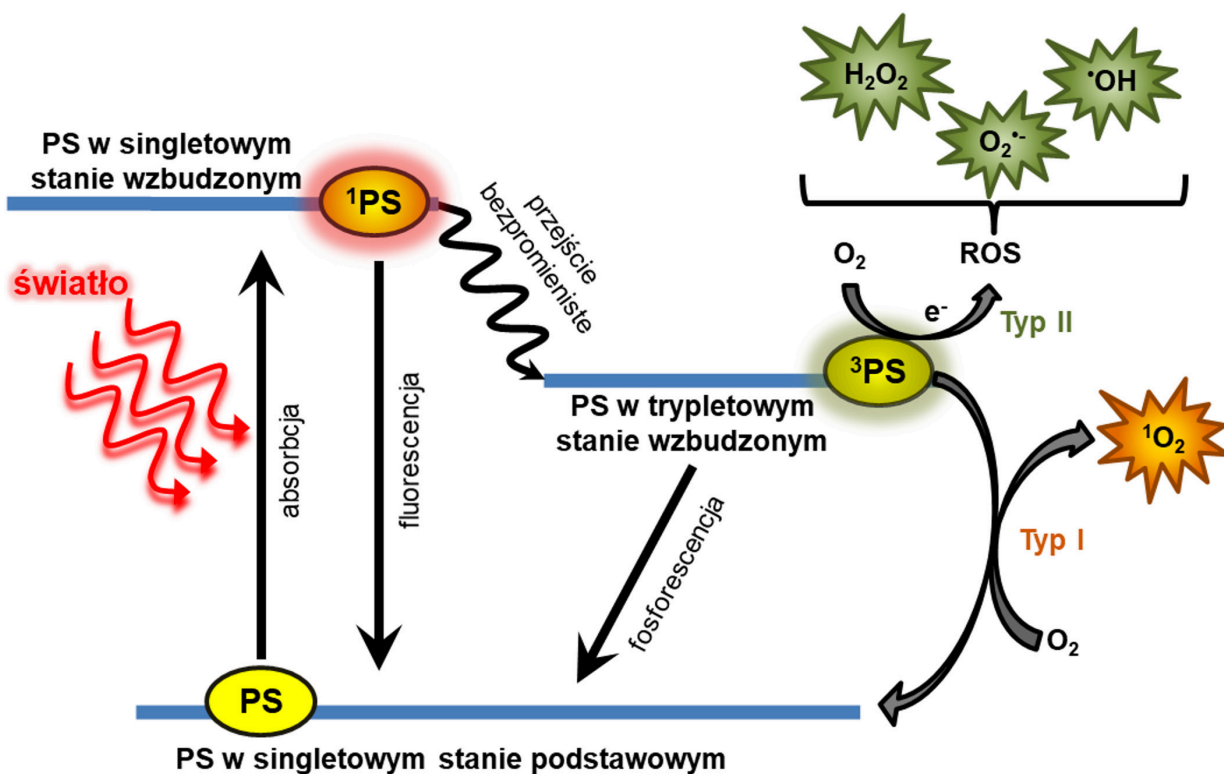
mi krwionośnymi, upośledzonym drenażem limfatycznym, dużą ilością nowo zsyntetyzowanego kolagenu (wiążącego porfiryny) i dużą ilością lipidów (wysokie powinowactwo do barwników lipofilowych) [15,16]. Ponadto w przypadku PpIX preferencyjna akumulacja w tkance nowotworowej w porównaniu do normalnych zdrowych komórek jest wynikiem różnic w szlaku biosyntezy hemu pomiędzy komórkami nowotworowymi i prawidłowymi. Obniżona aktywność/poziom ekspresji ferrochelatazy oraz ograniczona dostępność żelaza, a także obniżona ilość mitoferyny w komórkach nowotworowych przyczynia się do zwiększonej akumulacji PpIX. Dodatkowo w komórkach nowotworowych zaobserwowano podwyższoną aktywność enzymów prowadzących do produkcji PpIX, jak np. ALAD, UROD, czy PBGD [11,12].

Po zaaplikowaniu PS i jego akumulacji w chorej tkance, rejon poddawany leczeniu jest naświetlany światłem o odpowiedniej długości fali i intensywności, co prowadzi do aktywacji fotouczulacza i zniszczenia komórek nowotworowych przez powstałe w tkance guza ROS. Może także uszkadzać naczynia krwionośne guza, obniżając tym samym ilość dostarczanego tlenu i niezbędnych składników odżywczych. To z kolei doprowadza do powstania stanu zapalnego i odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko komórkom nowotworowym [3].

Aktywacja PS odbywa się poprzez absorpcję fotonu światła, powodując jego przejście w singletowy stan wzbudzony charakteryzujący się niską stabilnością, z którego może powrócić do stanu podstawowego poprzez utratę energii w zjawisku fluorescencji (Ryc. 2). Zjawisko to może być wykorzystane w celach diagnostycznych do wykrywania zmian nowotworowych [3,5]. Alternatywnie, aktywowany PS może utracić część energii poprzez przejście bezpromienne do wzbudzonego stanu trypletowego (Ryc. 2), który charakteryzuje się dłuższym czasem życia niż wzbudzony stan singletowy [7]. Dalsza utrata energii fotouczulacza może odbyć się poprzez fosforescencję lub w wyniku zderzeń z innymi cząsteczkami w dwóch typach reakcji prowadzących do utworzenia reaktywnych form tlenu (Ryc. 2) [3].

W reakcji typu I dochodzi do przeniesienia elektronu lub protonu z wytworzeniem rodników i jonorodników [3,7]. Zazwyczaj PS reaguje z substratem dostarczającym elektrony (NADPH, guanina w kwasach nukleinowych oraz tryptofan i tyrozyna w białkach) prowadząc do powstania anionorodnika fotouczulacza (PS<sup>•-</sup>) i kationorodnika biomolekuły (biomolekuła<sup>•+</sup>). W środowisku tlenowym anionorodnikowy PS<sup>•-</sup> przekazuje swój dodatkowy elektron na tlen cząsteczkowy, tworząc anionorodnik ponadtlenkowy (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) i przywracając PS w stanie podstawowym (Ryc. 2) [3,17].

Anionorodnik ponadtlenkowy może utleniać małe cząsteczki, takie jak siarczyny, tetrahydroflawiny, leukoflawiny, katecholaminy, endiolowe tautomery cukrów i inne dobre reduktory, ale nie reaguje bezpośrednio z kwasami nukleinowymi, lipidami lub węglowodanami. Ponadto rodnik ponadtlenkowy może tworzyć kolejne reaktywne formy poprzez reakcje z innymi biologicznie istotnymi rodnikami, uwalniając potencjalnie toksyczne produkty uszkadzające komórki, w tym wodoronadtlenki organiczne, chinony,



Rycina 2. Mechanizm aktywacji fotoczułacza. Pod wpływem absorpcji fotonu ze światła PS przechodzi z singletowego stanu podstawowego w singletowy stan wzbudzony, a następnie w wyniku relaksacji do stanu trypletowego. PS w stanie trypletowym może oddziaływać z tlenem w reakcji typu I tworząc ROS lub w reakcji typu II prowadząc do powstania tlenu singletowego.

czy nadtlenoazotyny ( $\text{ONOO}^\cdot$ ). Nadtlenoazotyn jest silnym utleniaczem, powstającym w reakcji  $\text{O}_2^{\cdot-}$  z  $\text{NO}^\cdot$ . Reaguje z  $\text{CO}_2$  i wodorowęglanami tworząc nitrozonadtlenowęglan ( $\text{ONOOOCO}_2^-$ ), prekursor anionorodnika węglanowego ( $\text{CO}_3^{\cdot-}$ ). Ten ostatni jest utleniaczem zdolnym do modyfikowania tyrozyny i tryptofanu [17].

Dodatkowo anionorodnik ponadtlenkowy jest zdolny do utleniania klastrów żelazowo-siarkowych [4Fe-4S] znajdujących się w białkach – głównie w dehydratazach i enzymach cyklu Krebsa. Utlenienie klastrów [4Fe-4S] powoduje ich dezaktywację, prowadząc do nieprawidłowego działania cyklu Krebsa, a zatem i wytwarzania energii, ale także do uszkodzeń szlaków metabolicznych zależnych od enzymów zawierających klastry [4Fe-4S]. Ponadto żelazo uwalniane z klastrów [4Fe-4S] wiąże anionowe cząsteczki takie jak białka, kwasy nukleinowe, lipidy oraz inne składniki błony komórkowej i jest utrzymywane w zredukowanej formie  $\text{Fe}^{2+}$  przez reduktory komórkowe. Po napotkaniu nadtlenku wodoru ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) powoduje jego rozkład w reakcji Fentona, tworząc w danym miejscu silny, utleniający rodnik hydroksylowy ( $\text{HO}^\cdot$ ).  $\text{HO}^\cdot$  może być także generowany w reakcji redukcji  $\text{H}_2\text{O}_2$  przez anionorodnik fotoczułacza ( $\text{PS}^{\cdot-}$ ). Ze względu na bardzo wysoką reaktywność  $\text{HO}^\cdot$  uszkadza obiekty, które napotka w miejscu swojego powstania [17].

W przypadku przyjęcia wodoru przez PS powstają obojętne rodniki fotoczułacza ( $\text{PS}^\cdot$ ) i biomolekuł (biomolekuła $^\cdot$ ). W obecności tlenu wodór zostaje przeniesiony z rodnika fotoczułacza na tlen cząsteczkowy prowadząc do

powstania rodnika wodoronadtlenkowego ( $\text{HO}_2^\cdot$ ) i przywrócenia PS w formie podstawowej [7].

W mechanizmie typu II PS w stanie trypletowym przenosi energię na tlen cząsteczkowy w stanie trypletowym ( $^3\text{O}_2$ ), tworząc wysoce reaktywny tlen singletowy ( $^1\text{O}_2$ ) (Ryc. 2), który jest uważany za podstawowy składnik niszczący guz i jego unaczynienie powstający w reakcji PDT [3,5]. Tlen singletowy oddziałuje głównie z nienasyconymi związkami zawierającymi wiązania podwójne [7]. Może też reagować z obojętnymi nukleofilami (jak siarczki i aminy) oraz anionami. W reakcjach z tlenem singletowym dochodzi do powstania nadtlenków, których rozpad generuje rodniki, mogące inicjować różnorodne reakcje chemiczne, wytwarzające biologicznie aktywne produkty [17].

Jednymi z ważniejszych celów PDT są białka. Fotoutlenianie aminokwasów może powodować zmiany strukturalne, mające konsekwencje w aktywności, właściwościach mechanicznych, stanie agregacji i powinowactwie do ligandów. Fotoutlenianie enzymów może prowadzić do utraty ich aktywności. Utlenianie białka lub peptydów może również prowadzić do utleniania kolejnych białek podczas propagacji łańcuchowej reakcji rodnikowej lub w wyniku dalszych reakcji między utlenionymi cząsteczkami [18].

Chociaż wiele białek ma powinowactwo do PS, to głównie wiąże się on z błonami. Błony lipidowe mają wyższe stężenie tlenu niż otaczający je roztwór, sprzyjając wygaszaniu wzbudzonego stanu trypletowego. Powstały tlen singletowy jak i rodniki mogą prowadzić do wytworzenia wodo-

ronadtlenków lipidów. W konsekwencji utlenienia lipidów może dojść do przepuszczalności i/lub lizy błon, co może również prowadzić do śmierci komórki [18].

Większość fotouczulaczy generuje zarówno tlen singletowy jak i rodniki, jednak ze względu na tlenowy charakter organizmu ludzkiego i fakt, że wydajność fotoreakcji II typu jest zależna od stężenia tlenu w środowisku reakcji oraz że przeniesienie energii na cząsteczkę tlenu występuje z większą szybkością niż transfer elektronu (np. do produkcji anionorodnika ponadtlenkowego), uważa się, że głównym produktem PDT powodującym uszkodzenia jest tlen singletowy [1,7,17]. Ponadto w przeciwieństwie do enzymów chroniących przed anionorodnikiem ponadtlenkowym, organizmy żywe nie wykształciły enzymatycznych antyoksydantów usuwających tlen singletowy, najprawdopodobniej ze względu na jego krótki czas życia [17]. Jednak zarówno tlen singletowy jak i anionorodnik ponadtlenkowy przyczyniają się do cytotoksyczności, ponieważ prowadzą do powstania uszkodzeń lipidów, białek i kwasów nukleinowych [3].

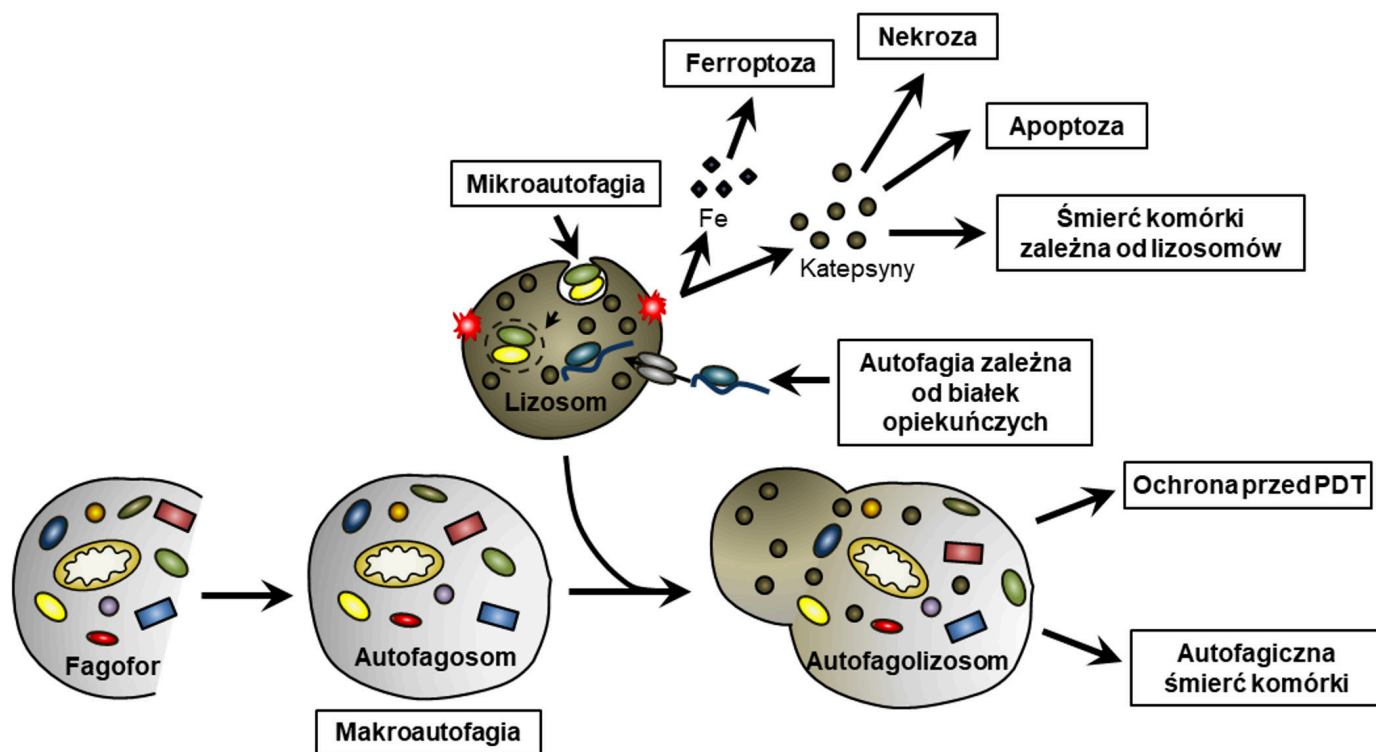
### MECHANIZMY PROWADZĄCE DO ŚMIERCI KOMÓRKI W ODPOWIEDZI NA PDT

Krótki czas istnienia powstających w wyniku PDT wolnych rodników oraz tlenu singletowego sprawia, że lokalizacja PS jest kluczowym czynnikiem decydującym o tym, które struktury komórkowe zostaną uszkodzone w wyniku terapii [1,17]. Nieodwracalne uszkodzenia najczęściej prowadzą do śmierci komórek nowotworowych poprzez mechanizm apoptozy, nekrozy lub autofagii. Kluczową

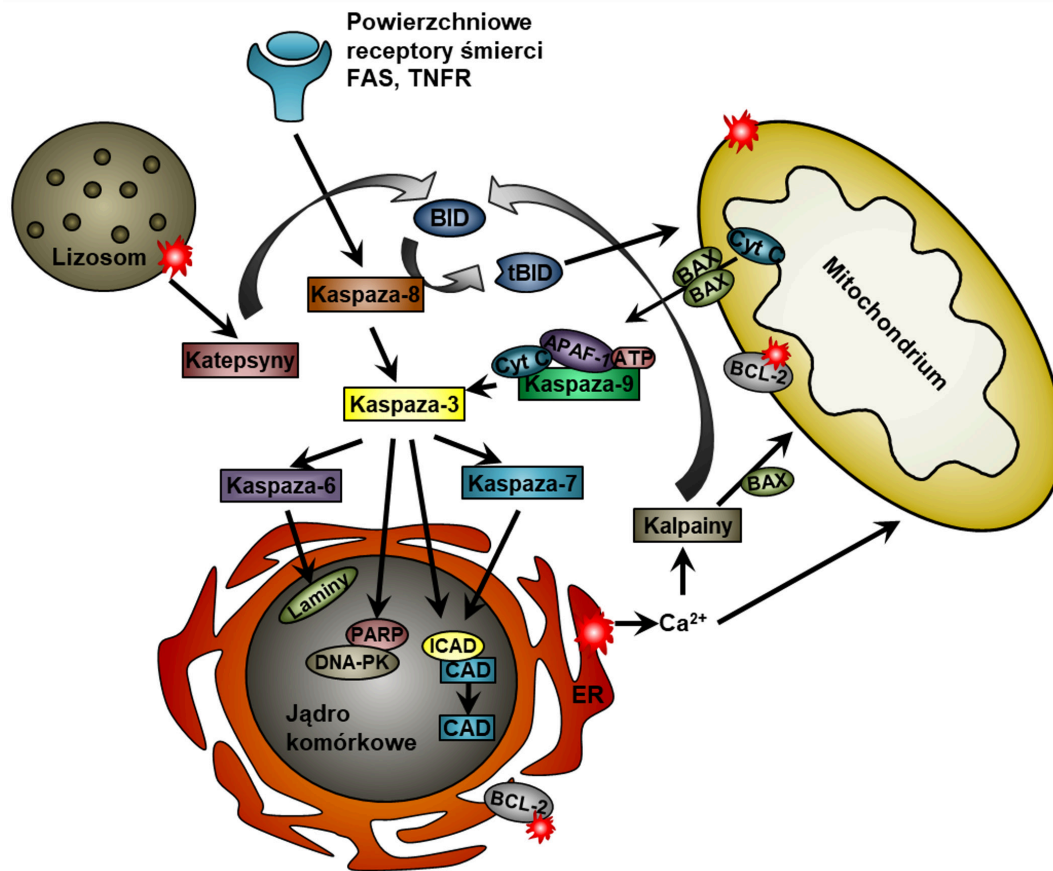
rolę w tym procesie przypisuje się dawce PDT (stężeniu fotouczulacza w tkance i natężeniu dostarczanego światła) oraz budowy fotouczulacza, która wpływa na miejsce jego gromadzenia w komórce [3,4,6,18]. Najskuteczniejsze fotouczulacze najczęściej akumulują się w mitochondriach bądź lizosomach, powodując ich uszkodzenia. Częstym miejscem uszkodzeń jest także siateczka śródplazmatyczna (ang. *endoplasmic reticulum*, ER) i błona komórkowa. Jednak PDT może także prowadzić do uszkodzeń w DNA [17]. Niektóre PS mogą akumulować się w kilku różnych organelach komórkowych. W takich przypadkach możemy się spodziewać jednoczesnego uruchomienia różnych szlaków śmierci komórkowej [4]. Chociaż apoptoza jest głównym mechanizmem śmierci komórek po PDT, autofagia oraz nekroza mogą służyć jako alternatywne mechanizmy śmierci komórki, zwłaszcza gdy proces apoptozy jest uszkodzony [4,6,19].

### AUTOFAGIA

Autofagia jest zazwyczaj ochronnym, antyapoptotycznym mechanizmem, który wraz z układem ubikwitynowo-proteasomalnym zapewnia ochronę przed toksycznymi efektami PDT poprzez usuwanie uszkodzonych przez ROS organelli, nieodwracalnie utlenionych białek podatnych na sieciowanie i tworzenie agregatów białkowych [4,19,20]. Jednak, gdy uszkodzenia komórki przewyższają jej zdolności naprawcze, autofagia może prowadzić do śmierci komórki. Ponadto akumulacja PS w organelach komórkowych podlegających autofagii może prowadzić do śmierci komórki poprzez uwolnienie ich zawartości do cytoplazmy. Akumulacja PS w lizosomach prowadzi pod wpływem



**Rycina 3.** Autofagia. Wewnątrzkomórkowy proces, w którym cytoplazmatyczne składniki komórkowe są degradowane przez enzymy lizosomalne. W przypadku niskiej dawki PDT może to stanowić mechanizm chroniący komórkę przed śmiercią poprzez usuwanie uszkodzonych komponentów komórkowych. W przypadku wyższej dawki PDT lub uszkodzeń lizosomów może również prowadzić do jej śmierci.



**Rycina 4.** Ścieżki apoptozy wywołane PDT. Wśród szlaków apoptozy związanych z PDT możemy wyróżnić te inicjowane przez receptory śmierci znajdujące się na błonie plazmatycznej, uszkodzeniami mitochondriów, lizosomów i ER. Aktywacja fotouczulacza zlokalizowanego w mitochondriach powoduje uwalnianie cytochromu c i innych czynników proapoptotycznych prowadząc do aktywacji kaskady kaspaz. Kaspazy efektorowe rozszczepiają wiele białek prowadząc do degradacji DNA oraz niszczenia białek jądrowych i cytoszkieletu. Aktywowane receptory śmierci na powierzchni komórki prowadzą do aktywacji kaspaz niezależnie od mitochondriów oraz cięcia BID, tworząc proapoptotyczny fragment tBID, który może wpływać na uwalnianie cytochromu c z mitochondriów. Aktywacja fotouczulaczy związanych z lizosomami powoduje uwalnianie katepsyn, które mogą ciąć BID oraz kaspazę-3 wpływając na apoptozę. Uszkodzenie ER przez PDT powoduje uwalnianie  $Ca^{2+}$ , co prowadzi do aktywacji kalpain i przepuszczalności mitochondriów, a w konsekwencji apoptozy [4,19,22,23].

światła do uwolnienia enzymów proteolitycznych, co skutkuje śmiercią komórki zależną od lizosomów (ang. *lysosomal cell death*, LCD) [4,18,21]. Uwolnienie zawartości lizosomów do cytozolu może prowadzić do aktywacji także innych rodzajów śmierci komórkowej [21] (Ryc. 3). W ten sposób PS akumulujący się w lizosomach osłabia ratunkowy proces autofagii [4,18]

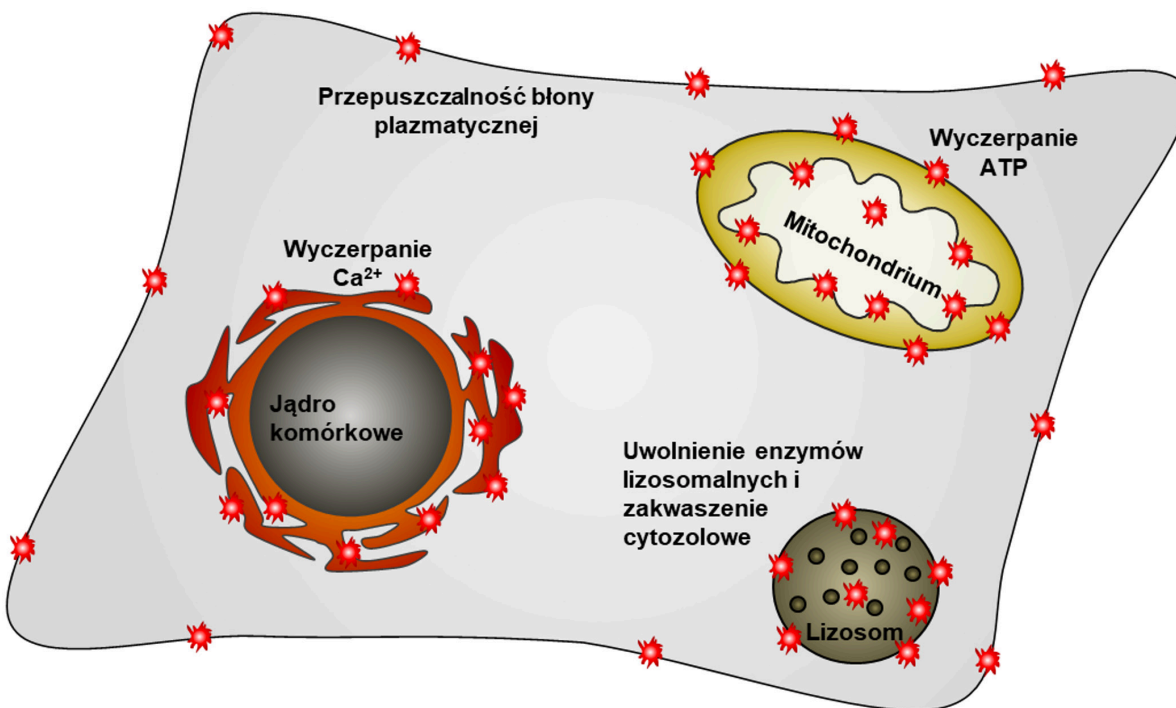
#### APOPTOZA

Apoptoza może zostać zapoczątkowana uszkodzeniami różnych organelli w wyniku PDT [3,22]. Do śmierci komórki może dojść zarówno w szlaku zewnętrznym, zależnym od receptorów śmierci jak i wewnętrznym, mitochondrialnym [19]. PDT z fotouczulaczami lokalizującymi się w mitochondriach prowadzi do uwolnienia z nich czynników proapoptotycznych, natomiast PDT z PS uszkodzającymi ER powoduje uwalnianie z niej komórkowego zapasu wapnia (Ryc. 4) [4]. Ponadto, gdy celami dla PS jest ER lub mitochondrium, podczas PDT dochodzi do uszkodzeń antyapoptotycznych białek z rodziny BCL2 [3,19]. Natomiast uszkodzenie w wyniku PDT lizosomów prowadzi do uwolnienia katepsyn. Białka te tnąc BID prowadzą do aktywacji apoptozy [4, 19, 23] (Ryc. 4).

Ekspozycja komórek nowotworowych na światło po użyciu różnych fotouczulaczy może prowadzić do zwiększonej ekspresji receptorów śmierci. Uważa się, że ten mechanizm, w którym pośredniczą receptory śmierci (Ryc. 4), występuje preferencyjnie, gdy stosowane są fotouczulacze gromadzące się w błonie komórkowej [16,23,24]. Z drugiej strony, gdy fotouczulacz lokalizuje się w błonie komórkowej, może dojść do opóźnienia lub zahamowania apoptozy i indukcji odpowiedzi ratunkowych, bądź nawet zapoczątkowania nekrozy [3,19].

#### NEKROZA

Nekroza jest głównym typem śmierci komórki indukowanej, gdy zastosowany fotouczulacz lokalizuje się głównie w błonie plazmatycznej. Prawdopodobną przyczyną jest utrata integralności błony plazmatycznej i szybkie wyczerpanie wewnątrzkomórkowego ATP [4,23,25]. Poważne uszkodzenia wywołane przez PDT z fotouczulaczami zlokalizowanymi w innych częściach komórek także mogą prowadzić do nekrozy. W takim przypadku nekroza następuje w wyniku masywnej indukcji ROS, która prowadzi do gwałtownej katastrofy bioenergetycznej, drastycznego



Rycina 5. Nekroza jako wynik wysokiej dawki PDT. Wysokie dawki PDT w organellach oraz fotouszkodzenie błony plazmatycznej powodują wyczerpanie ATP, co prowadzi do nieprogramowanej śmierci komórki - nekrozy [4,18].

spadku poziomu ATP i ogólnego hamowania metabolizmu podstawowego (Ryc. 5) [3,4,23].

Możliwe jest również, że wysokodawkowa PDT może fotochemicznie inaktywować niezbędne elementy szlaku apoptotycznego, przez co apoptoza nie może zostać poprawnie przeprowadzona. Niektóre fotouczulacze, gdy przenikną do cytozolu, prowadzą do fotoinaktywacji kaspaz. Może to powodować aktywację i propagację nekrotycznego szlaku śmierci komórek [3,4,23].

#### ŚMIERĆ KOMÓRKI PO ALA-PDT

Podanie 5-ALA może prowadzić do rozprzestrzenienia się protoporfiryny IX w cytozolu i błonach cytozolowych. PpIX jest też ligandem o wysokim powinowactwie do PBR, wysoce hydrofobowego białka mitochondrialnego – domnianego składnika porów zmiany przepuszczalności mitochondriów (ang. *mitochondrial permeability transition pore*, MPTP) [23]. Oznacza to, że śmierć komórki po ALA-PDT może być wynikiem uszkodzeń mitochondriów, jak i stresu ER. Prawdopodobnie, gdy PpIX akumuluje się głównie w mitochondriach, ALA-PDT prowadzi do apoptozy, natomiast jeśli fotouczulacz rozprzestrzeni się w innych składnikach komórkowych, bądź apoptoza nie może zostać zrealizowana, dochodzi do nekrozy [11]. ALA-PDT może także indukować autofagię i autofagiczną śmierć komórki. Ponadto w niektórych liniach komórkowych ALA-PDT może prawdopodobnie prowadzić do apoptozy indukowanej receptorami śmierci (silna indukcja genu FADD w płaskonabłonkowych komórkach nowotworowych A-431) [11,19].

Wydaje się, że PpIX może także oddziaływać z białkiem TP53 i regulować jego aktywność transkrypcyjną, prowadząc do zwiększenia poziomu proapoptotycznych członków rodziny BCL2 – PUMA i BAK [23]. Zaobserwowano także, że ALA-PDT może wpływać na ekspresję innych białek z rodziny BCL2 [4].

#### EFEKT PDT NA NACZYNIA GUZA I UKŁAD IMMUNOLOGICZNY

Przeciwnowotworowy efekt PDT jest wynikiem nie tylko bezpośredniej cytotoksyczności wywołanej przez ROS w komórkach guza, ale także poważnych uszkodzeń jego unaczynienia, co prowadzi do obniżenia ilości tlenu i składników odżywczych jakie docierają do przeżywających komórek [4].

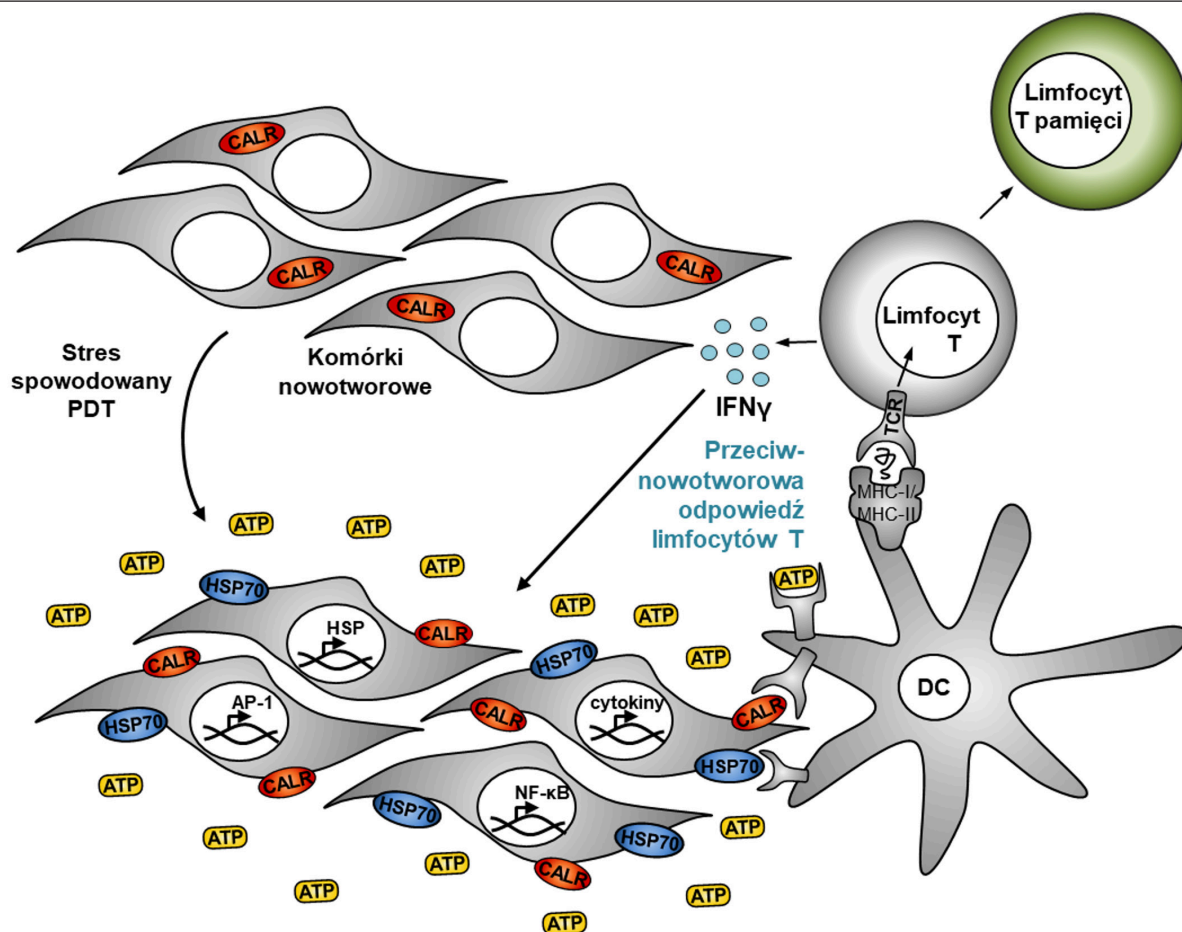
W konsekwencji stresu oksydacyjnego PDT często wywołuje ostrą reakcję zapalną. Jest to proces ochronny zaangażowany w utrzymanie homeostazy poprzez usuwanie uszkodzonych komórek oraz pobudzanie do gojenia się tkanki z przywróceniem jej prawidłowej funkcji. Ostrą odpowiedź zapalną wywołuje wrodzony układ odpornościowy poprzez rozpoznawanie wyrażanych na powierzchni komórki albo uwalnianych zewnątrzkomórkowo molekularnych wzorców związanych z uszkodzeniami (ang. *damage-associated molecular patterns*, DAMP) za pomocą receptorów rozpoznających wzorce (ang. *pattern recognition receptors* PRR). Wśród DAMP obserwowanych po PDT można wyróżnić białka szoku cieplnego (ang. *heat shock proteins*, HSP), np. HSP70, produkty rozpadu błon (fragmenty lipidów i metabolity kwasu arachidonowego), ATP czy białko ER – kalretikulinę (ang. *calreticulin*, CALR). Ponadto stres oksydacyj-

ny wywołany PDT może zwiększać ekspresję białek szoku cieplnego oraz czynników transkrypcyjnych związanych ze stanem zapalnym, takich jak czynnik jądrowy  $\kappa B$  (ang. *nuclear factor  $\kappa B$* , NF- $\kappa B$ ) i białko aktywatorowe AP-1 (ang. *activator protein 1*, AP-1), a także powodować uwalnianie cytokin zapalnych indukowanych przez te czynniki (czynnik martwicy nowotworu TNF- $\alpha$ , interleukiny IL-6 i IL-1 $\beta$ ) i stymulujących neutrofile. Dochodzi również do wzrostu ekspresji cząsteczek adhezji komórkowej, które ułatwiają migrację neutrofilii. Komórki te usuwają fotouszkodzone komórki nowotworowe i pośredniczą w tworzeniu odporności przeciwnowotworowej po PDT. Do miejsca stanu zapalnego docierają także rekrutowane przez DAMP komórki tuczne, monocyty/makrofagi oraz komórki dendrytyczne (ang. *dendritic cell*, DC) w celu usunięcia resztek komórkowych i przyspieszenia gojenia się tkanek [3,6].

Po ostrej odpowiedzi zapalnej wrodzonego układu odpornościowego, prowadzącej do fagocytozy apoptotycznych i nekrotycznych komórek nowotworowych, może rozwinąć się odporność przeciwnowotworowa. Aktywowane przez DAMP DC migrują do węzłów chłonnych drenujących guz, gdzie stymulują aktywację limfocytów T poprzez krzyżową prezentację antygenów, generując limfocyty T

specyficzne wobec guza. TCR cytotoksycznych limfocytów T CD8+ jest zdolny do wiązania się z głównym układem zgodności tkankowej (ang. *major histocompatibility complex*, MHC) klasy I komórek nowotworowych i wywoływania w nich lizy poprzez uwolnienie perforyn, granzymów i granulizyn. Ponadto komórki T wyrażające  $\gamma\delta$  TCR (limfocyty T  $\gamma\delta$ ), wykazujące aktywność cytotoksyczną przeciwko szerokiemu zakresowi nowotworów, wydzielają interferon  $\gamma$  (ang. *interferon- $\gamma$* , IFN- $\gamma$ ) i przyciągają aktywowane limfocyty oraz komórki prezentujące antygen poprzez uwalnianie szeregu chemokin. IFN- $\gamma$  zwiększa produkcję perforyn oraz ligandów indukujących apoptozę – FAS i TRAIL. Aktywuje komórki dendrytyczne i promuje wytwarzanie specyficznych dla nowotworu komórek T CD4+ i CD8+. Ponadto zwiększa ekspresję MHC na komórkach nowotworowych. Odporność przeciwnowotworowa indukowana PDT może być dodatkowo wzmacniana przez komórki naturalnych zabójców (ang. *natural killer*, NK). Pamięć immunologiczna komórek limfoidalnych nadaje długoterminową skuteczność PDT oraz przyczynia się do opóźnienia nawrotu guza [3,6,26].

Śmierć komórek, która prowadzi do aktywacji układu odpornościowego i wyzwolenia odporności na antygeny



**Rycina 6.** Immunogenna śmierć komórki (ICD). Śmierć komórki wywołana przez niektóre terapie przeciwnowotworowe, w tym PDT, na skutek stresu i ekspozycji/uwalniania DAMP (np. CALR, ATP, HSP70, kwas nukleinowy pochodzący z komórek nowotworowych), w której dochodzi do aktywacji układu odpornościowego i wyzwolenia odporności na antygeny martwych komórek. Podczas ICD CALR przemieszcza się z ER, na zewnętrzną stronę błony komórkowej, gdzie działa jako sygnał „zjedź mnie” dla fagocytujących makrofagów, neutrofilii i DC, co prowadzi do prezentacji antygenów guza i odpowiedzi z udziałem specyficznych dla guza cytotoksycznych limfocytów T. Zewnątrzkomórkowy ATP nie tylko działa jako sygnał „znajdź mnie” dla makrofagów i prekursorów DC, ale także pośredniczy w aktywacji inflamasyonu, prowadząc do wydzielania IL-1 $\beta$ . Ta cytokina, wraz z prezentacją antygenów, jest wymagana do polaryzacji komórek T CD8+ wytwarzających IFN $\gamma$  oraz do adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej skierowanej na komórki nowotworowe. Indukowana przez PDT HSP70 oddziałuje z TLR na DC, co prowadzi do dojrzewania i aktywacji DC, promując ich zdolność do krzyżowej prezentacji antygenów [3,6,26-29].



martwych komórek nosi nazwę immunogennej śmierci komórki (ang. *immunogenic cell death*, ICD) (Ryc. 6) [27-29].

## ZMIANY TOWARZYSZĄCE NABYCIU OPORNOŚCI NA PDT

Oporność na terapie przeciwnowotworowe jest główną przyczyną ich niepowodzenia i prowadzi do progresji guza oraz złych rokowań klinicznych. W przypadku PDT skuteczność zależy głównie od wybiórczego wychwytu fotouczulacza przez komórki guza, poziomu tlenu i dawki napromieniania. W odpowiedzi na PDT aktywowane są różne geny i ścieżki sygnałowe, z których jedynie pewna część jest wyraźnie skierowana na uśmiercenie komórki. Niestety zbyt wiele genów i ścieżek sygnałowych ma ochronny efekt. W przypadku genów aktywowanych stresem oksydacyjnym większość przyczynia się do naprawy lub tolerancji uszkodzeń prowadząc do słabej odpowiedzi na leczenie i rozwoju oporności [19,30].

Dodatkowo na obniżenie poziomu PS w komórkach nowotworowych mogą mieć wpływ mechanizmy wspólne z ogólnymi mechanizmami oporności na leki (ang. *multidrug resistance*, MDR). Są one związane ze zmienioną szybkością wychwytu, rodzajem PS lub jego różną dystrybucją wewnątrzkomórkową. Zwiększona aktywność pomp lekowych powoduje zwiększone wyrzucanie PS z komórek, chroniąc je przed fototoksycznością. Może to przyczynić się do występowania oporności. W zależności od budowy fotouczulacza różne transportery mogą prowadzić do usuwania PS z komórki. Nadekspresja ABCG2 prowadzi do zwiększonego wyrzucania PpIX z komórek i chroni je przed toksycznym efektem PDT. To oznacza, że hamowanie ABCG2 może zwiększać skuteczność terapii [19].

Słabsza akumulacja fotouczulacza w komórkach poddawanych PDT może też być wynikiem zmian w tempie syntezy i/lub degradacji PS. Zmiany w enzymach szlaku hemu, mogą prowadzić do obniżenia ilości PpIX w komórkach, poprzez np. akumulację wcześniejszych półproduktów – hydrofilowych porfiryn, takich jak koproporfiryna i uroporfiryna. Oba te związki są słabymi fotouczulaczami ze względu na zachowanie przedziałów błonowych, co osłabia wychwyt komórkowy. Także inna lokalizacja subkomórkowa tych porfiryn może wpływać na wzrost oporności [19].

Akumulacja protoporfiryn może być również modulowana przez aktywność oksygenazy hemowej-1, której zwiększona ekspresja jest prawdopodobnie spowodowana zwiększoną potrzebą degradacji hemu po inkubacji komórek z 5-ALA [19,31]. Jednak aktywność HO-1 zmniejsza stres oksydacyjny nie tylko poprzez degradację hemu ale i poprzez aktywność jego produktów degradacji. Dodatkowo HO-1 może promować angiogenezę, wpływać na progresję guza oraz hamować przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną [31].

Komórki mogą też bronić się przed powstałymi w wyniku zastosowania PDT reaktywnymi formami tlenu poprzez zwiększone działanie mechanizmów antyoksydacyjnych. Wśród nich można wyróżnić system glutationu, dysmutazy

ponadtlenkowe (ang. *superoxide dismutase*, SOD), katalazę czy dehydrogenazę lipoamidową [19].

Naprawa uszkodzeń wywołanych fotouczulaczem, w tym białek, błon a nawet DNA, to kolejny mechanizm obronny przed PDT. Ekspresja białek szoku cieplnego oraz białek, których aktywność jest regulowana przez poziom glukozy (ang. *glucose regulated proteins*, GRP), może być związana z odpowiedzią ratunkową komórek na PDT. Te białka opiekuńcze uczestniczą w naprawie uszkodzonych peptydów poprzez swoją zdolność do ustalenia właściwej konformacji białek lub stabilizację częściowo rozwiniętych białek. Natomiast nieodwracalnie utlenione białka, które są podatne na sieciowanie i tworzenie agregatów białkowych mogą być usunięte w wyniku zwiększonej aktywności układu ubikwitynowo-proteasomalnego oraz w procesie autofagii. Makroautofagia może uczestniczyć także w oczyszczaniu komórki z organelli uszkodzonych przez PDT [19].

Ponadto PDT może prowadzić do aktywacji kilku szlaków sygnałowych sprzyjających przeżyciu, w tym zależnych od kinazy białkowej C (ang. *protein kinase C*, PKC), kinazy fosfatydyloinozytolu 3 (ang. *phosphoinositide-3 kinase* PI3K), kinazy białkowej B (ang. *protein kinase B*, PKB/Akt), kinazy białkowej aktywowanej mitogenem (ang. *mitogen activated protein kinases*, MAPK), kinazy regulowanej sygnałem zewnątrzkomórkowym (ang. *extracellular signal regulated kinase*, ERK), kinazy tyrozynowej Etk/Bmx, czy kinazy regulującej sygnał apoptozy ASK1 (ang. *apoptosis signal regulating kinase 1*). Także aktywacja takich czynników transkrypcyjnych jak AP-1, NF- $\kappa$ B, NRF2 (ang. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), czynnik indukowany hipoksją (ang. *hypoxia inducible factor 1*, HIF-1), czynnik szoku cieplnego 1 (ang. *heat shock factor 1*, HSF-1), czy też cyklozygenaza 2 (ang. *cyclooxygenase 2*, COX-2), sprzyja negatywnej odpowiedzi na PDT [4,16,19,30,32].

PDT może także prowadzić do zwiększenia ilości indukowanej syntazy tlenku azotu (ang. *inducible NO synthase*, iNOS), prowadząc do podwyższenia produkcji NO. Tlenek azotu w niskim stężeniu może wykazywać właściwości cytoprotekcyjne. Działając jako antyoksydant wygasza wolne rodniki i hamuje peroksydację lipidów. Może także aktywować ścieżki sprzyjające przeżyciu i progresji guza [19,33-35].

W nabywaniu oporności może mieć także znaczenie wzrost liczby mitochondriów, gdyż porfirynewe PS uszkadzają mitochondria, prowadząc do inaktywacji licznych enzymów mitochondrialnych, hamowania trifosfatazy adenozyny i rozprzęgania fosforylacji oksydacyjnej. Ponadto w komórkach opornych, może dojść do wzrostu zawartości ATP i aktywności dehydrogenazy bursztynianowej oraz zmniejszenia potencjału mitochondrialnego. [19]. Umiarkowane obniżenie  $\Delta\Psi$  może skutkować niższą produkcją ROS w mitochondriach bez znaczącego wpływu na produkcję ATP [36]. Z drugiej strony utrata mitochondrialnego DNA oraz zmniejszenie ilości mitochondrialnego RNA także może prowadzić do powstania oporności na PDT [19].

PDT wywołuje także zmiany w macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *extracellular matrix*, ECM) oraz wpływa na zmniejszanie lub zwiększanie adhezji do ECM i komórek

śródbłonna. Interakcje komórka-komórka i macierz-komórka prowadzą do reorganizacji cytoszkieletu i aktywacji wielu szlaków transdukcji sygnałów. Tego typu zmiany bezpośrednio wpływają na przeżycie, wzrost i różnicowanie komórek. Szlaki antyapoptotyczne uruchomione przez adhezję komórek nowotworowych mogą także wpływać na oporność na różne cytotoksyny. Zjawisko to zostało nazwane opornością na leki zależną od adhezji komórek (ang. *Cell Adhesion Mediated Drug Resistance*, CAM-DR) i opiera się na obserwacji, że komórki, które przylegają do składników ECM, są chronione przed apoptozą indukowaną przez środki terapeutyczne [19].

PDT wywołuje istotne zmiany w cytoszkielecie komórek, głównie poprzez wpływ na trzy kluczowe białka cytoszkieletu: aktynę, tubulinę i filamenty pośrednie. Wszelkie zaburzenia w mikrofilamentach, mikrotubulach i filamentach pośrednich oraz ich oddziaływaniach mogą wpływać na progresję guza. PDT może więc mieć wpływ na zdolność komórek, które przeżyły terapię do tworzenia przerzutów [19].

Również nadekspresja białek w komórkach, jako celów PDT była powiązana z opornością na PDT [19].

## PODSUMOWANIE

Terapia fotodynamiczna jest jedną z mniej toksycznych metod stosowanych do leczenia stanów przednowotworowych i nowotworów. Jej skuteczność jest wynikiem bezpośredniej cytotoxyczności wywołanej przez ROS w komórkach guza, uszkodzenia jego unaczynienia oraz stymulacji układu immunologicznego. Procesy prowadzące do śmierci komórek nowotworowych w wyniku PDT mogą być różne i zależeć od zastosowanego fotouczulacza, miejsca jego gromadzenia w komórce oraz podanej dawki PDT. Także mechanizmy prowadzące do rozwoju oporności mogą być różnorodne. Przykładowo w ochronę przed cytotoxycznym efektem PDT mogą być zaangażowane mechanizmy prowadzące do usuwania fotouczulacza z komórek nowotworowych. Alternatywnie na poziom fotouczulacza mogą wpływać zmiany w tempie jego syntezy lub degradacji. Zwiększona aktywność mechanizmów antyoksydacyjnych, nadekspresja białek opiekuńczych oraz aktywacja różnych szlaków sygnałowych sprzyjających przeżyciu także ma znaczenie dla rozwoju oporności. Z tego względu znalezienie wspólnych cech komórek opornych na PDT jest skomplikowane, a stworzenie skojarzonej terapii zwiększającej skuteczność PDT wymaga dalszych badań.

## PIŚMIENNICTWO

1. Nowak-Stępniewska A, Pergoł P, Padzik-Graczyk A (2013) Metoda fotodynamiczna diagnostyki i leczenia nowotworów – mechanizmy i zastosowanie. *Post Biochem* 59(1): 53-63
2. Zhang X, Liu T, Li Z, Zhang X (2014) Progress of photodynamic therapy applications in the treatment of musculoskeletal sarcoma (Review). *Oncol Lett* 8(4): 1403-1408. doi: 10.3892/ol.2014.2332
3. van Straten D, Mashayekhi V, de Bruijn H, Oliveira S, Robinson D (2017) Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions. *Cancers* 9(19): 1-54. doi: 10.3390/cancers9020019

4. Mroz P, Yaroslavsky A, Kharkwal GB, Hamblin MR (2011) Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. *Cancers* 3(2): 2516-2539. doi: 10.3390/cancers3022516
5. Allison RR, Moghissi K (2013) Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clin Endosc* 46: 24-29. doi: 10.5946/ce.2013.46.1.24
6. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, et al. (2011) Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA: A Cancer J Clin* 61(4): 250-281. doi: 10.3322/caac.20114
7. Kwaśny M (2018) Metoda fotodynamicznego leczenia w dermatologii. *Forum Dermatologicum* 4(4): 138-147. doi: 10.5603/FD.2018.0002
8. Hillemanns P, Untch M, Dannecker C, et al. (2000) Photodynamic therapy of vulvar intraepithelial neoplasia using 5-aminolevulinic acid. *Int J Cancer* 85:649-653. doi:10.1002/(sici)1097-0215(20000301)85:5<649::aid-ijc9>3.0.co;2-e.
9. Tosti G, Iacobone A, Preti E, et al. (2018) The Role of Photodynamic Therapy in the Treatment of Vulvar Intraepithelial Neoplasia. *Biomedicines* 6(13):1-11. doi:10.3390/biomedicines6010013
10. Sachar M, Anderson KE, Ma X (2016) Protoporphyrin IX: the Good, the Bad, and the Ugly. *J Pharmacol Exp Ther* 356(2): 267-275. doi: 10.1124/jpet.115.228130
11. Wachowska M, Muchowicz A, Firczuk M, et al. (2011) Aminolevulinic Acid (ALA) as a Prodrug in Photodynamic Therapy of Cancer. *Molecules* 16(5): 4140-4164. doi: 10.3390/molecules16054140
12. Hayashi M, Fukuhara H, Inoue K, et al. (2015) The Effect of Iron Ion on the Specificity of Photodynamic Therapy with 5-Aminolevulinic Acid. *Missirlis F, ed. PLoS ONE* 10(3): 1-11. doi: 10.1371/journal.pone.0122351
13. Kobuchi H, Moriya K, Ogino T, et al. (2012) Mitochondrial Localization of ABC Transporter ABCG2 and Its Function in 5-Aminolevulinic Acid-Mediated Protoporphyrin IX Accumulation. *Gallyas F, ed. PLoS ONE* 7(11): 1-14. doi: 10.1371/journal.pone.0050082
14. Chiang S-K, Chen S-E, Chang L-C (2018) A Dual Role of Heme Oxygenase-1 in Cancer Cells. *Int J Mol Sci* 20(39): 1-18. doi: 10.3390/ijms20010039
15. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, et al. (1998) Photodynamic Therapy. *J Natl Cancer Inst* 90(12): 891-905
16. Nowis D, Makowski M, Stokłosa T, Legat M, Issat T, Gołab J (2005) Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochim Pol* 52(2): 339-352. doi: 10.18388/abp.2005\_3447
17. Benov L (2015) Photodynamic Therapy: Current Status and Future Directions. *Med Princ Pract* 24(s1): 14-28. doi: 10.1159/000362416
18. Bacellar I, Tsubone T, Pavani C, Baptista M (2015) Photodynamic Efficiency: From Molecular Photochemistry to Cell Death. *Int J Mol Sci* 16(9): 20523-20559. doi: 10.3390/ijms160920523
19. Casas A, Di Venosa G, Hasan T, Batlle AI (2011) Mechanisms of Resistance to Photodynamic Therapy. *Curr Med Chem* 18(16): 2486-2515. doi: 10.2174/092986711795843272
20. Tower J (2015) Programmed cell death in aging. *Ageing Res Rev* 23: 90-100. doi: 10.1016/j.arr.2015.04.002
21. Wang F, Gómez-Sintes R, Boya P (2018) Lysosomal membrane permeabilization and cell death. *Traffic* 19(12):918-931. doi:10.1111/tra.12613
22. Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I (2002) The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem Photobiol Sci* 1(1): 1-21. doi: 10.1039/b108586g
23. Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P (2007) Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1776(1): 86-107. doi: 10.1016/j.bbcan.2007.07.001
24. Elmore S (2007) Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 35(4): 495-516. doi: 10.1080/01926230701320337
25. Debele T, Peng S, Tsai H-C (2015) Drug Carrier for Photodynamic Cancer Therapy. *Int J Mol Sci* 16(9): 22094-22136. doi: 10.3390/ijms160922094
26. O'Brien MA, Power DG, Clover AJP, Bird B, Soden DM, Forde PF (2014) Local tumour ablative therapies: Opportunities for maximising immune engagement and activation. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1846(2): 510-523. doi: 10.1016/j.bbcan.2014.09.005

27. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, et al. (2018) Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* 25(3): 486-541. doi: 10.1038/s41418-017-0012-4
28. Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandena-beele P (2012) Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 12(12): 860-875. doi: 10.1038/nrc3380
29. Tang D, Kang R, Berghe TV, Vandena-beele P, Kroemer G (2019) The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res* 29(5): 347-364. doi: 10.1038/s41422-019-0164-5
30. Lucena S, Salazar N, Gracia-Cazaña T, et al. (2015) Combined Treatments with Photodynamic Therapy for Non-Melanoma Skin Cancer. *Int J Mol Sci* 16(10): 25912-25933. doi: 10.3390/ijms161025912
31. Was H, Dulak J, Jozkowicz A (2015) Heme Oxygenase-1 in Tumor Biology and Therapy. *CDT* 11(12): 1551-1570. doi: 10.2174/1389450111009011551
32. Broekgaarden M, Kos M, Jurg F, van Beek A, van Gulik T, Heger M (2015) Inhibition of NF- $\kappa$ B in Tumor Cells Exacerbates Immune Cell Activation Following Photodynamic Therapy. *Int J Mol Sci* 16(8): 19960-19977. doi: 10.3390/ijms160819960
33. Girotti A (2016) Modulation of the Anti-Tumor Efficacy of Photodynamic Therapy by Nitric Oxide. *Cancer* 8(96): 1-16. doi: 10.3390/cancers8100096
34. Rapozzi V, Della Pietra E, Bonavida B (2015) Dual roles of nitric oxide in the regulation of tumor cell response and resistance to photodynamic therapy. *Redox Biol* 6: 311-317. doi: 10.1016/j.redox.2015.07.015
35. Sokolowska M, Włodek L (2001) Dobre i złe strony tlenku azotu. *Folia Cardiologica* 8(5): 467-477.
36. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ (2014) Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiol Rev* 94(3): 909-950. doi: 10.1152/physrev.00026.2013

# Photodynamic therapy – significance in oncology

Beata Joanna Mossakowska<sup>✉</sup>, Anna Fabisiewicz, Janusz Siedlecki

Department of Molecular and Translational Oncology, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw

<sup>✉</sup>Corresponding author: beata.mossakowska@pib-nio.pl

**Key words:** photodynamic therapy, photosensitizer, protoporphyrin IX, reactive oxygen species, cell death

## ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) is one of the least toxic methods causing the death of cancer cells. Photosensitizer (PS) applied to a patient accumulates in the tumor, where under the appropriate wavelength and insensitivity of light is activated. Activated PS in the presence of oxygen produces reactive oxygen species (ROS), which make significant damage leading to the destruction of cancer cells by apoptosis, necrosis or autophagic process. Moreover, PDT causes an acute local inflammatory response that is involved in removing dead cells, restoring normal tissue homeostasis, and sometimes leads to the development of systemic immunity. However, some cells may survive treatment and develop resistance. Mechanisms, which lead to decrease of the level of PS in cells may be involved in the cytoprotection of cancer cells from PDT. Furthermore, increased activity of antioxidant mechanisms, overexpression of molecular chaperones and activation of survival pathways can protect cells from PDT.

