

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD



**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**ROLE AUTOFAGIE V BUNĚČNÉ SMRTI A  
FOTODYNAMICKÉ TERAPII NÁDORŮ**

**KATEŘINA HASONOVÁ**

**Vedoucí bakalářské práce: RNDr. MILOSLAV MACHÁČEK, Ph.D.**

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2018**

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé práce panu RNDr. Miloslavu Macháčkovi, PhD. za odborné vedení, ochotu, trpělivost a mnoho cenných rad, které mi při vypracování této práce velmi pomohly. Poděkování patří také mé rodině a přátelům za jejich podporu jak při psaní této práce, tak v průběhu celého studia.

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

V Hradci Králové

Kateřina Hasoňová

## Obsah

<b>1.</b>	<b>ÚVOD .....</b>	<b>5</b>
<b>2.</b>	<b>SEZNAM ZKRATEK.....</b>	<b>6</b>
<b>3.</b>	<b>TYPY BUNĚČNÉ SMRTI .....</b>	<b>7</b>
1.1	Apoptóza .....	8
1.2	Nekróza a nekroptóza .....	11
1.3	Autofagie .....	13
<b>4.</b>	<b>AUTOFAGIE .....</b>	<b>14</b>
1.4	Autofagie – charakteristika .....	14
1.5	Autofagie – mechanismus .....	15
<b>5.</b>	<b>FOTODYNAMICKÁ TERAPIE (PDT).....</b>	<b>21</b>
1.6	Fotodynamická terapie – charakteristika .....	21
1.7	Faktory, které hrají důležitou roli v PDT .....	22
1.8	Fotodynamická terapie – mechanismus .....	24
<b>6.</b>	<b>AUTOFAGIE V PDT.....</b>	<b>27</b>
1.9	Příklady autofagie v PDT .....	30
<b>7.</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>33</b>
<b>8.</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>34</b>

# 1. ÚVOD

Má práce na téma *Role autofagie v buněčné smrti a fotodynamické terapii nádorů* se bude zabývat okrajově typy buněčné smrti. Více se zaměřím na autofagii a především bude moje práce pojednávat o autofagii v kontextu fotodynamické terapie.

Autofagie je jedním z typů buněčné smrti; je to buněčný mechanismus degradace větších objemů vnitrobuněčného materiálu, a to včetně celých organel.

Fotodynamická terapie se skládá ze tří základních komponent, kterými jsou fotosenzitizér, světlo a kyslík. Společně jsou tyto komponenty schopné vyvolat fotochemickou reakci, při které vzniká velmi reaktivní produkt – singletový kyslík. Tento produkt může velmi rychle způsobit toxicitu, která vede k buněčné smrti.

Fotodynamická terapie může vyvolat autofagii, která vede buď k recyklaci vnitrobuněčného materiálu, nebo k buněčné smrti.

Tato terapie je stále předmětem výzkumu. Klinické studie ale ukazují, že jde o velmi účinnou léčebnou metodu, především při léčbě nádorových onemocnění.

## 2. SEZNAM ZKRATEK

$^1\text{O}_2$	- kyslík v singletovém stavu
$^3\text{O}_2$	- kyslík v tripletovém stavu
ALA	- kyselina 5-aminolevulová
AlPcS	- hlinitý ftalocyanin sulfonát
AMPK	- AMP aktivovaná proteinová kinasa
ATG	- geny specifické pro autofagii ( <i>autophagy-related genes</i> )
C-PC	- C-fykocyanin
DNA	- deoxyribonukleová kyselina
GABARAP	- protein asociovaný s receptorem $\gamma$ -aminomáselné kyseliny
HpD	- derivát hematoporfyrinu
IP3	- inositol trifosfát
LC3	- protein s lehký řetězcem
PAS	- pre-autofagosomální struktura
Pc4	- křemičitý ftalocyanin
PDT	- fotodynamická terapie ( <i>photodynamic therapy</i> )
PE	- fosfatidylethanolamin
PI3	- fosfatidylinositol-3-fosfát
PpIX	- protoporfyrin IX
PS	- fotosenzitizér ( <i>photosensitizer</i> )
RIP1	- <i>receptor-interacting protein kinase</i>
ROS	- reaktivní formy kyslíku ( <i>reactive oxygen species</i> )
Se-PC	- fykocyanin obsahující selen
TOR	- <i>target of rapamycin</i>
Vps34	- <i>vesicular protein sorting 34</i>

### 3. TYPY BUNĚČNÉ SMRTI

Buněčná smrt je klíčový proces v průběhu vývoje, v udržování homeostázy a při imunitní regulaci v mnohobuněčném organismu (Duprez et al. 2009). Regulovaná, programovaná buněčná smrt je klíčová pro všechny organismy (Tait et al. 2014). Řada patologických stavů vychází z poruch regulace buněčné smrti (Duprez et al. 2009). Takovými příklady mohou být nádorová, autoimunitní nebo neurodegenerativní onemocnění (Tait et al. 2014). Buněčná smrt je často indukovaná při infekci patogenem, jako součást obranného mechanismu.

Různé typy buněčné smrti jsou často definovány jejich morfologickými znaky a dalšími kritérii, a jsou klasifikovány jako apoptóza, nekróza, autofagie a buněčná smrt asociovaná s mitotickou katastrofou. Buněčná smrt je také definována na základě enzymologických kritérií (včetně zapojení různých tříd proteas a nukleas), na funkčních aspektech (programovaná x náhodná; fyziologická x patologická) nebo na imunologické charakteristice (Duprez et al. 2009).

Obecně lze příčiny, kvůli kterým buňka umírá, rozdělit na pasivní – vyskytující se jako důsledek neopravitelného poškození – nebo aktivní – při kterých buňka sama přispívá ke svému zániku (Tait et al. 2014).

Různé typy buněčné smrti jsou často definovány podle již výše zmíněných morfologických kritérií bez jasného odkazu na přesný biochemický mechanismus, který při buněčné smrti probíhá.

Buněčná smrt je vratným procesem až do doby, kdy se buňka dostane do ireverzibilní fáze, neboli překročí tzv. „point of no return“, tedy bod, ze kterého se nelze vrátit zpátky. Bylo navrženo, aby tento krok, kdy dojde k překročení do ireverzibilní fáze, byl reprezentován masivní aktivitou kaspas, kompletní propustností vnější mitochondriální membrány nebo expozicí fosfatidylserinu. Existují ale spousty případů, ve kterých jsou kaspasy aktivovány v procesech, které nesouvisí s buněčnou smrtí, nebo jsou aktivovány při buněčné diferenciaci. Stejně tak expozice fosfatidylserinu může být reverzibilní, například v neutrofilních granulocytech.

Protože neznáme přesný biochemický proces, kterým se buňka dostane do ireverzibilní fáze, je buňka považována za mrtvou, pokud splňuje následující molekulární a morfologická kritéria:

- celistvost plazmatické membrány buňky je porušena; to prokážeme obarvením vitálními barvivy *in vitro*.
- buňka, včetně jádra, podlehla kompletní fragmentaci na tzv. apoptotická tělíška (Kroemer et al. 2009).

První popisy mechanismu programované buněčné smrti jsou datovány asi do poloviny 60. let 20. století. Od té doby bylo mnoho pokusů klasifikovat buněčnou smrt na základě morfologických charakteristik. Proto v roce 1973 Schweichel a Merker navrhli klasifikaci různých způsobů buněčné smrti. Klasifikace zahrnovala 1. typ buněčné smrti spojený s heterofágií, 2. typ buněčné smrti je spojený s autofágií a 3. typ buněčné smrti, který není asociován ani s jedním typem trávení. Tento typ odpovídá apoptóze a nekróze (Galluzzi et al. 2012). Nejlépe prostudovanou formou programované buněčné smrti je apoptóza. Později bylo zjištěno, že existují i různé jiné, ne-apoptotické formy buněčné smrti, jako například nekroptóza nebo pyroptóza (Tait et al. 2014).

## 1.1 APOPTÓZA

V roce 1972 byl poprvé použitý termín apoptóza. Tento termín popisoval formu buněčné smrti spojenou se specifickými morfologickými funkcemi. Od té doby byla apoptóza intenzivně studována a dnes jsou základní signalizační procesy dobře charakterizovány (Duprez et al. 2009).

Apoptóza je jednou z forem programované buněčné smrti a u živočichů se vyskytuje v průběhu ontogenetického vývoje. Jde o komplexní a více cestami zprostředkovaný způsob, jakým buňka umírá. Tento způsob je geneticky zakódovaný v každé buňce těla. Je aktivní formou buněčné smrti, na které se odumírající buňka podílí aktivací specifických genů. Bylo zjištěno, že apoptotické buňky nezpůsobují zánět (na rozdíl od nekrózy) a jsou pohlcovány sousedními buňkami (Mlejnek and Mlejnek 2004).

Apoptózu může vyvolat aktivace receptorů smrti, které se nachází na povrchu buňky (vnější cesta). Druhým způsobem, jak může být apoptóza spuštěna, je uvolnění cytochromu c z mitochondrií (vnitřní cesta). Obě cesty vedou k aktivaci kaspas, které jsou známé jako efektorové kaspasy. Tyto aktivované formy kaspas štěpí buněčné substráty, a to vede k biochemickým a morfologickým změnám, které lze pozorovat v umírajících buňkách (Mroz et al., 2011).

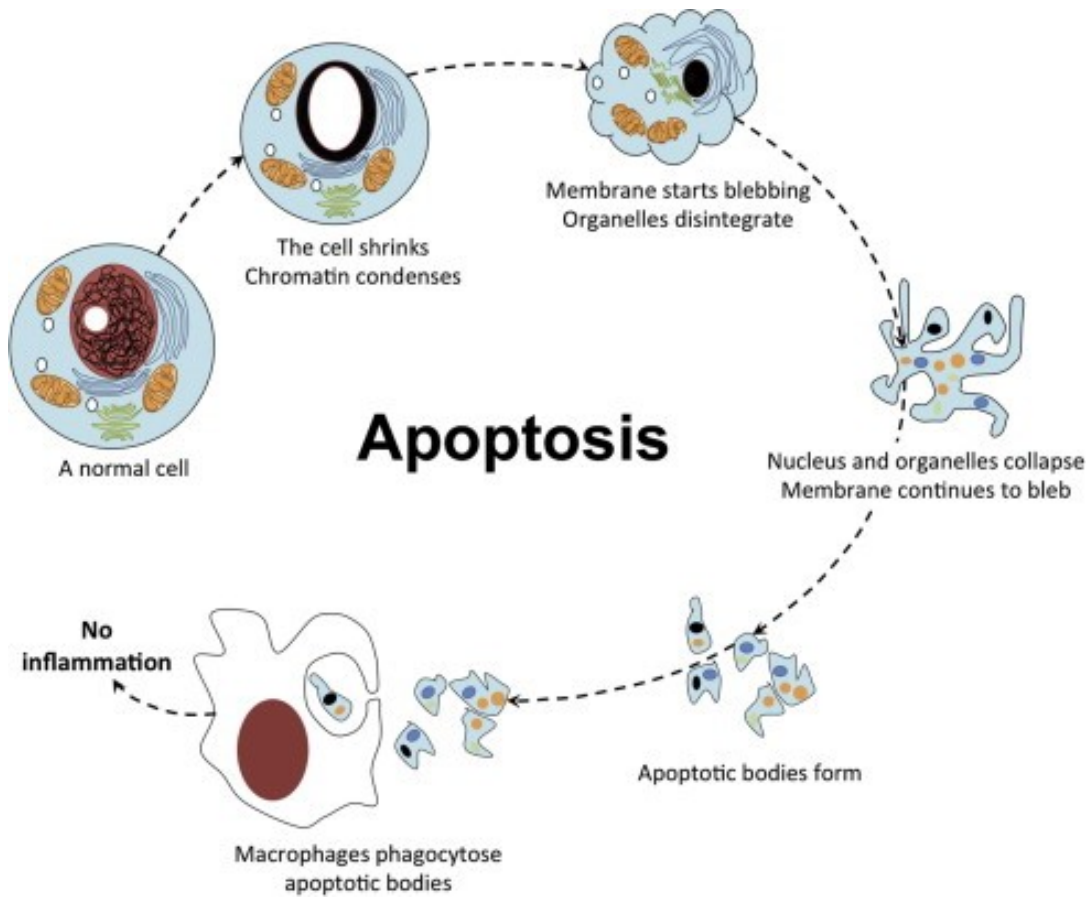


Mezi tyto změny patří kondenzace a fragmentace chromatinu v jádře, tvorba výběžků cytoplazmatické membrány a celkové zmenšení a zakulacení buňky. V pozdních fázích apoptózy dochází k rozpadu celé buňky do tzv. apoptotických tělísek (Ondroušková and Vojtěšek 2014).

Tato tělíška obsahují funkční orgány, fragmenty jádra a udržují si intaktní membránu. Na vnitřní straně membrány všech buněk je fosfatidylserin, který je během apoptózy vystavován na vnější stranu membrány a je silně imunogenní. Apoptóze může být zabráněno díky působení antiapoptotickým členům proteinů rodiny Bcl-2. Tyto proteiny pomáhají udržovat integritu membrán, a tím zabraňují uvolnění cytochromu c, a tedy aktivaci kaspas (Mroz et al. 2011). U lidí rozeznáváme dvanáct kaspas, které patří mezi apoptotické, ale byly popsány i zánětlivé podskupiny kaspas (Duprez et al. 2009).

- a) Vnitřní cesta apoptózy: Je aktivována různými podněty, například poškozením DNA, cytotoxickým poškozením. Vnitřní cesta působí prostřednictvím mitochondrií, které jsou kontrolovány rodinou proteinů Bcl-2. Mitochondrie reaguje na podněty otevřením pórů ve své membráně a uvolněním cytochromu c do cytosolu. Tady potom dochází k tvorbě apoptosomu. Tím se spustí kaskáda aktivace kaspas, což vede k typickým morfologickým a biochemickým změnám, které pozorujeme u apoptotických buněk.
- b) Vnější cesta apoptózy: Je spuštěná navázáním ligandů smrti na receptory smrti, které se nacházejí na plazmatické membráně. Receptory smrti fungují jako transmembránové přenašeče signálu. Navázání ligandů dochází k aktivaci iniciačních kaspas, poté dojde k aktivaci hlavních efektorových kaspas 3 a 7. Aktivní formy iniciačních kaspas 8 a 10 mohou také štěpit Bid (cytosolický proapoptotický člen rodiny Bcl-2) na tBid. Ten interaguje s dalšími členy této rodiny, což vede ve finále k tvorbě pórů na vnější mitochondriální membráně a

uvolnění cytochromu c do cytoplazmy. Tím dochází ke spojení vnitřní a vnější cesty (Buytaert et al. 2007; Duprez et al. 2009).

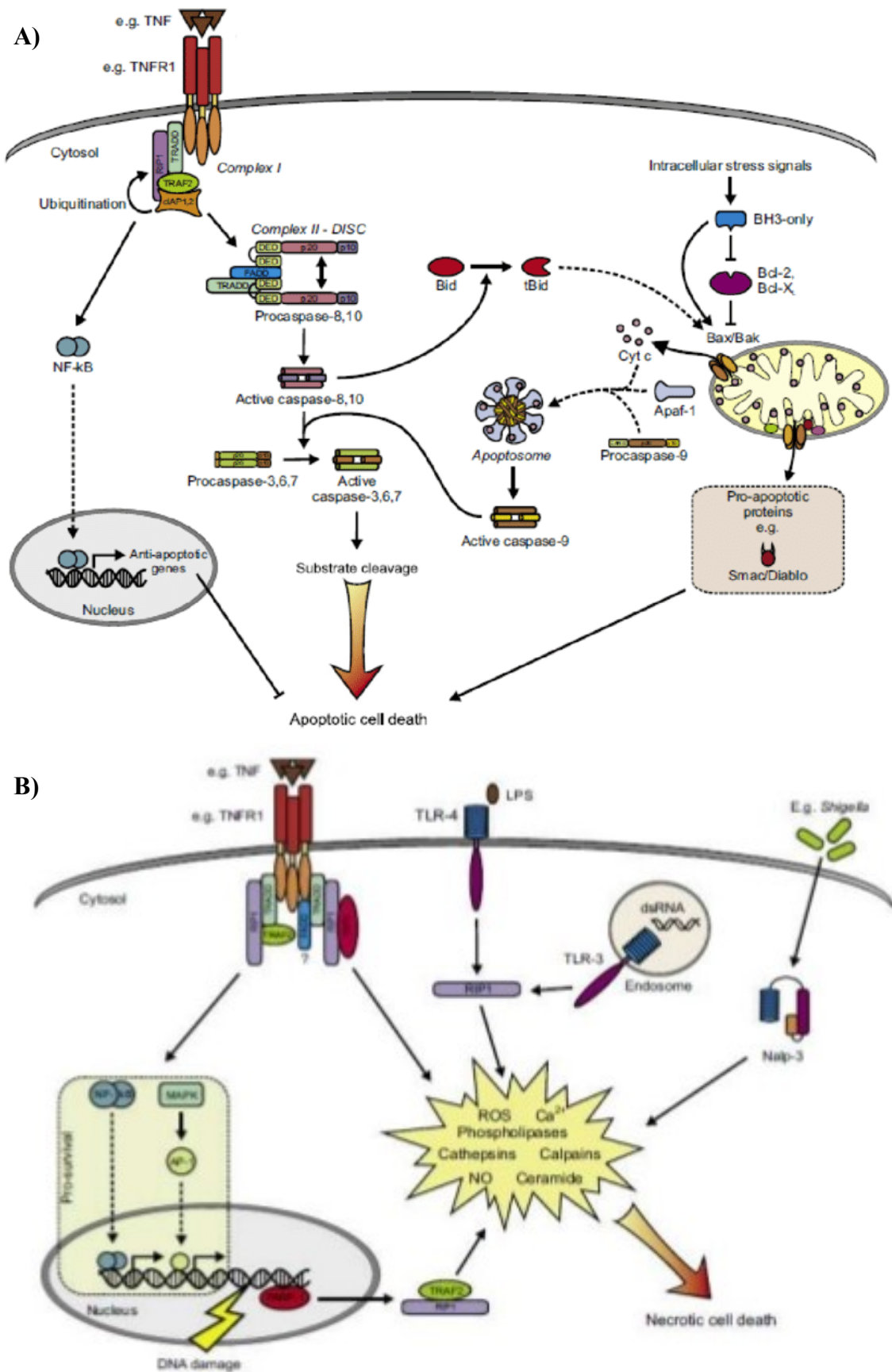


Obrázek 1 - Mechanismus apoptózy. Převzato z: (Abou-Ghali and Stiban 2015)

## 1.2 NEKRÓZA A NEKROPTÓZA

Nekróza byla dlouho považována za náhodnou a nekontrolovatelnou formu buněčné smrti, která není podmíněná buněčnou signalizací. To může platit pro buněčnou smrt, která je vyvolána vážným poškozením, jako je například hypertermie nebo cytolýza. V posledních letech se nahromadily důkazy, které podporují existenci buněčné smrti nesoucí znaky nekrózy, která může fungovat i v přísně regulovaném kontextu, nezávisle na kaspasách a odlišné od apoptózy – tzv. regulovaná nekróza (např. podtyp regulované nekrózy závislý na aktivitě RIP1 se nazývá nekroptóza). Tu může vyvolat celá řada stimulů – např. alkylační poškození DNA, vazba ligandů na receptory smrti apod. (Galluzzi et al., 2012; Galluzzi and Kroemer, 2008).

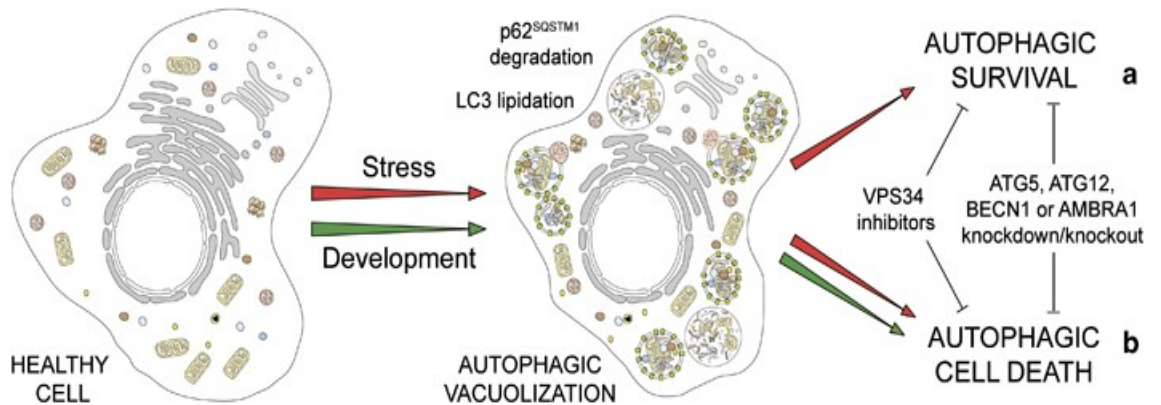
Nekrotická buněčná smrt je obecně charakterizována cytoplazmatickým a organelovým bobtnáním, které je následované prasknutím buněčné membrány a lýzou buňky. To vede k uvolnění obsahu buňky do okolního extracelulárního prostoru a indukci zánětu. Za určitých okolností je nekróza výsledkem přísně regulované souhry signalizačních událostí, které jsou vyvolány různými stimuly. Ve většině případů ligandy receptorů smrti aktivují spíše apoptózu než nekrozu. Pokud je však cesta aktivace kaspas omezená, může dojít k nekrotické buněčné smrti, která působí jako záložní způsob buněčné smrti (Duprez et al. 2009).



**Obrázek 2** - rozdíly mezi apoptózou (A) a nekrotózou (B). Převzato z: (Duprez et al. 2009)

### 1.3 AUTOFAGIE

Autofagie je buněčný mechanismus degradace větších objemů vnitrobuněčného materiálu, a to včetně celých organel. Rozlišujeme tři typy autofagie.



**Obrázek 2** – Schematické znázornění autofagie v buněčném přežívání a smrti.  
Převzato z: (Galluzzi et al. 2012)

Eukaryotické buňky v reakci na stres a při vývoji často aktivují autofagii – proces, kdy se organely a část cytoplazmy uzavírají a rozpadají v autofagosomech. Ty jsou dodány do lyzosomů k degradaci. Při autofagii vyvolané stresovou reakcí je snaha o obnovení homeostázy a zachování života buňky.

Následující kapitola bude věnována autofagii podrobněji.

## 4. AUTOFAGIE

### 1.4 AUTOFAGIE – CHARAKTERISTIKA

Autofagie byla poprvé popsána Christianem de Duve. Ten v roce 1963 zavedl pojem „*autophagy*“, což značí schopnost buňky strávit a znovu využít své vlastní části. Rozlišujeme mikroautofagii, makroautofagii a autofagii zprostředkovanou chaperony. Při makroautofagii (dále jen autofagii) jsou agregáty a dlouho-žijící proteiny uzavírány do útvarů s dvojitou membránou, které se nazývají autofagosomy. Ty následně fúzí s lyzosomy a jejich obsah je v nich proteázami degradován. Produkty jsou potom buňkou recyklovány, nebo dále degradovány, a tím využity jako zdroj energie. Celý proces je regulovaný skupinou genů, které označujeme jako *ATG* (*autophagy-related genes*) (Ondroušková and Vojtěšek 2014).

Nejlépe prostudovaný byl proces autofagie u kvasinek, kde autofagie funguje jako adaptační mechanismus a udržuje životní funkce. V savčích buňkách může autofagie podporovat buněčné přežívání, a to odstraněním poškozených organel, toxických metabolitů nebo patogenů. Nicméně může autofagie hrát roli v buněčné smrti, a to díky její nadměrné aktivitě a degradaci základních buněčných složek (Buytaert et al. 2007).

Autofagie je proces, který buňka využívá k izolaci, odstranění a recyklaci odpadních látek. Při autofagii jsou makromolekuly nacházející se v cytosolu zachyceny v nově vznikajícím fagocytárním těle a jsou štěpeny ve speciálním lyzosomu, který potom výsledné metabolity uvolní zpět do cytosolu (Yorimitsu and Klionsky 2005).

Autofagie je procesem buněčného „samo-pojídání“ (Glick et al. 2010). Slouží k recyklaci velkých kusů cytoplazmy jako zdroje živin, které poté umožňují buňce udržování syntézy a energetické homeostázy, a to především během hladovění a jiných stresových stavů. Dlouho je považována za důležitou cestu degradace proteinů. Na rozdíl od ubiquitin-proteasomového systému, jehož cílem jsou jednoduché proteiny s krátkou životností, autofagie je procesem, který je schopný degradovat proteiny s dlouhou životností a celé organely, jako například mitochondrie, endoplazmatické retikulum, peroxisomy, jádro a ribosomy (Kaur and Debnath 2015). Je také schopná eliminovat intracelulární patogeny (Glick et al. 2010).

Autofagie je katabolický buněčný mechanismus, který buňce umožňuje udržování rovnováhy mezi syntézou, degradací a recyklací buněčných produktů. Existují různé

procesy autofagie, ale všechny zahrnují lyzozomální degradaci buněčných organel a proteinů (Mroz et al. 2011). Hladověním vyvolaná degradace proteinů je význačným rysem autofagie. Nedávný vývoj ale osvětlil, jak autofagie může mobilizovat různou buněčnou energii a živiny ukládá jako lipidy, sacharidy a železo. Toto probíhá jak za hladovění, tak při dostatku živin. Autofagie tedy řídí buněčný metabolismus ve zdravé i poškozené buňce.

V poslední době je snaha objasnit, jak nefunkční autofagie ovlivňuje metabolické poruchy a metabolické adaptace u patologických stavů, například u nádorových onemocnění (Kaur and Debnath 2015).

Na základě morfologických znaků se termín autofagie používá k označení případů buněčné smrti, u které se vyskytuje výrazná, masivní vakuolizace cytoplazmy (Galluzzi et al. 2012). Nedochozí ale ke kondenzaci jaderného chromatinu (Ondroušková and Vojtěšek 2014). Ve většině známých případů autofagie představuje cytoprotektivní odpověď, která je aktivována poškozenými buňkami ve snaze vyrovnat se se stresem. Pokud je autofagie inhibována, dochází k urychlení buněčné smrti (Galluzzi et al. 2012).

Role autofagie v nádorových buňkách je nejasná. Předpokládá se, že závisí na stádiu nádorového onemocnění. V raných fázích autofagie spíše potlačuje růst nádoru, protože odstraňuje poškozené organely a proteiny. V pozdějších stádiích naopak spíše pomáhá rakovinným buňkám vyrovnat se se stresovými podmínkami, jakými jsou nedostatek živin nebo oxidativní stres. Často je pozorována akumulace autofagických vakuol v cytoplazmě po aplikaci chemoterapie nebo radioterapie. Není ale zcela prokázáno, zda je autofagie v těchto případech příčinou smrti, nebo pouze doprovodným jevem (Ondroušková and Vojtěšek 2014).

## **1.5 AUTOFAGIE – MECHANIZMUS**

Jsou definovány tři typy autofagie: makroautofagie, mikroautofagie a autofagie zprostředkovaná chaperony. Všechny tyto typy podporují proteolytickou degradaci cytosolických součástí v lyzozomu.

V makroautofagii jsou součásti cytosolu přenášeny do lyzozomu v malém měchýřku s dvojitou membránou, to označujeme jako autofagosom. Ten se poté spojuje s lyzozomem a formuje se autolyzomem.

Při mikroautofagii jsou naopak součásti cytosolu přímo pohlceny samotným lyzozomem, a to díky vchlípení jeho membrány.

Během autofagie zprostředkované chaperony jsou cílové proteiny přenášeny přes lyzozomální membránu v komplexu s chaperonovými proteiny (Glick et al. 2010).

Klasická cesta autofagie probíhá ve sledu dobře definovaných kroků (Immunity 2012). První krok autofagie je charakterizovaný oddělením částí cytoplazmy a jejich uzavření do váčku s dvojitou membránou, který je nazývaný autofagosom. Ten se následně spojí s lyzozomem za vzniku autofagolyzosomu, což vede degradaci obsahu. Utváření autofagosomu zahrnuje tři hlavní kroky: iniciace, formování jádra a zvětšení izolační membrány (Kaur and Debnath 2015).

Autofagie začíná odloučením membrány, která se také označuje jako fagofor. Ten je pravděpodobně odvozen od lipidové dvojvrstvy nacházející se na endoplazmatickém retikulu, Golgiho aparátu nebo endosomech. Fagofor se rozšiřuje, aby byl schopný pohltit intracelulární součásti, například proteinové agregáty, organely a ribosomy. Tímto jsou buněčné součásti uzavírány do autofagosomu s dvojitou membránou (Glick et al. 2010). Dozrávání naplněných autofagosomů probíhá prostřednictvím fúze s lyzozomem. To vyvolá degradaci látek zachycených v autofagosomu. Aminokyseliny a další produkty této degradace jsou přenášeny zpátky do cytoplazmy, kde mohou být tyto produkty degradace znovu využity k vytvoření makromolekul nebo pro metabolismus.

Jak je tento komplexní proces zorganizovaný na molekulární úrovni? Existuje pět klíčových stupňů:

- a) utváření fagoforu nebo formování jádra
- b) konjugace Atg5 s Atg12, interakce s Atg16L
- c) LC3 zpracování a vložení do rozšiřující se fagoforové membrány
- d) zachycení náhodných nebo vybraných cílů pro degradaci
- e) fúze autofagosomu s lyzozomem, to je následováno proteolytickou degradací pohlcených molekul lyzozomálními proteázami

## A) TVORBA FAGOFORU

Utváření fagoforové membrány v kvasinkách je formováno na nebo v blízkosti cytosolové struktury, která je známá jako pre-autofagosomální struktura (PAS). Formace této struktury se účastní celá řada Atg proteinů, například Atg10, Atg12 – 14, Atg16 – 18, Atg29 a Atg31 (Suzuki et al. 2001). Neexistuje ale důkaz, že by se tato struktura



vyskytovala u savců. Zdá se, že v savčích buňkách fagoforová membrána vzniká primárně z endoplazmatického retikula. Dokonce je možné, že je membrána za omezených podmínek odvozena od membrány jaderné. Není ale možné vyloučit tvorbu membrán *de novo* z cytosolických lipidů. Aktivita Atg1 kinasy v komplexu s Atg13 a Atg17 je požadovaná pro formování fagoforu u kvasinek. Ulk-1 je savčí homolog Atg1a je klíčový pro formování fagoforu u savců. Tento krok, tedy formování fagoforu u savců a kvasinek, je regulovaný serin-threoninovou kinázou TOR, která fosforyluje Atg13, aby nedošlo k interakci s Atg1 u kvasinek a s Ulk-1 u savců (Glick et al. 2010).

TOR reguluje signální dráhy podporující růst buňky a tato kináza je zároveň schopná aktivovat katabolické i anabolické procesy v buňce (Díaz-Troya et al. 2008).

PI-3 kinázy se dělí do tří tříd podle jejich struktury a substrátové specifity. Při autofagii a tvorbě fagoforu je u savčích modelů dobře známý význam III třídy PI-3 kináz. Tyto kinázy obsahují katalytickou podjednotku Vps34 (vesicular protein sorting 34). PI-3 kinázy III třídy fungují jako živinami regulované lipidové kinázy, které mohou hrát roli v regulaci buněčného růstu. Vps34 se účastní mnoha membránových procesů, ale pokud se vyskytuje v komplexu s Beclin-1, má zásadní úlohu při autofagii.

Od ostatních PI-3 kináz se se Vps34 odlišuje tím, že využívá fosfatidylinositol jako substrát pro tvorbu fosfatidylinositoltrifosfátu (PI3P). Ten je klíčový pro elongaci fagoforu, přijímání Atg proteinů do fagoforu (Glick et al. 2010).

## B) KONJUGACE

Existují dva systémy konjugačních proteinů, mezi které patří ubikvitinové proteiny Atg12 a Atg8 (Yang and Klionski, 2009). Tyto dva systémy hrají při autofagii klíčovou roli (Glick et al. 2010). Oba konjugační systémy jsou evolučně konzervované od kvasinek až po člověka. Přestože Atg12 a Atg8 zdánlivě nemají stejnou sekvenci s ubikvitinem, každý z těchto proteinů obsahuje na C-konci ubikvitinový záhyb (Yang and Klionski, 2009).

Atg12 je kovalentně připojen k Atg5 prostřednictvím isopeptidové vazby mezi glycinem na C-terminálním konci proteinu Atg12 a mezi lysinem na proteinu Atg5. Konjugační reakce je katalyzována dalšími dvěma proteiny, a to Atg7 a Atg10. Atg7 je homologem k enzymu E1, který aktivuje ubikvitin. Atg10 funguje jako enzym E2, což je ubikvitin-konjugační enzym.

Atg7 hydrolyzuje ATP, což vede k aktivaci Atg12 tím, že vzniká thioesterová vazba mezi Atg12 a Atg7. Následně je aktivovaný Atg12 přímo přenesen na Atg10 za vzniku Atg12-Atg10 thioesteru. Nakonec je Atg12 přenesen na cílový protein Atg5 a vzniká konečný konjugát. Atg5 je dále nekovalentně navázaný na další protein – Atg16 a vzniká multimer, který je funkčně klíčový pro autofagii.

Druhý ubikvitinový protein Atg8 je konjugován s membránovým lipidem – fosfatidyletanolaminem (PE). Nejprve dochází ke štěpení C-konce proteinu Atg8 pomocí proteinu Atg4, čímž dojde k odhalení glycinu. Prostřednictvím glycinu je potom Atg8 navázan na Atg7. Aktivovaný protein Atg8 je přenesen na Atg3 (enzym podobný E2). Nakonec je Atg8 konjugován s PE prostřednictvím amidové vazby mezi C-terminálním glycinem a amino-skupinou PE.

Existuje také savčí protein Atg16, který tvoří komplex s konjugátem Atg12-Atg5.

Jsou známy nejméně čtyři savčí homology proteinu Atg8. Mezi nimi je nejvíce zastoupen LC3 v autofagosomálních membránách a je zaveden jako marker pro sledování autofagosomu a aktivity autofagie. Během formování autofagosomu jsou komplex Atg12-Atg5-Atg16 i konjugát Atg8-PE lokalizovány na PAS (Yang and Klionski, 2009).

### C) ZPRACOVÁNÍ LC3

Druhým systémem, který se podílí na tvorbě autofagosomů, je zpracování proteinu lehkého řetězce 3 (LC3). Tento protein je spojen s mikrotubuly a je kódovaný savčím homologem Atg8. LC3 je ve většině buněk jako cytosolický protein, který je po vyvolání autofagie štěpen proteinem Atg4. Tímto štěpením vzniká LC3B-I. Dojde k aktivaci tohoto proteinu a ten je poté přenesen na Atg3 a vzniká LC3B-II. Přijetí a integrace LC3B-II do rostoucího fagoforu závisí na komplexu Atg5-Atg12. LC3B-II se nachází na vnějším i vnitřním povrchu autofagosomu, kde hraje roli jak při hemifuzi membrán, tak při výběru částic, které mají být degradovány. Během autofagie je zvýšená syntéza i zpracování proteinu lehkého řetězce 3 (LC3). To se využívá pro zobrazení úrovně autofagie v buňkách.

Existuje příbuzná molekula GABARAP (protein asociovaný s receptorem  $\gamma$ -aminomáselné kyseliny), ta podléhá podobnému zpracování během autofagie a vznikající GABARAP-II je lokalizována společně s LC3 na autofagosomu (Glick et al. 2010).

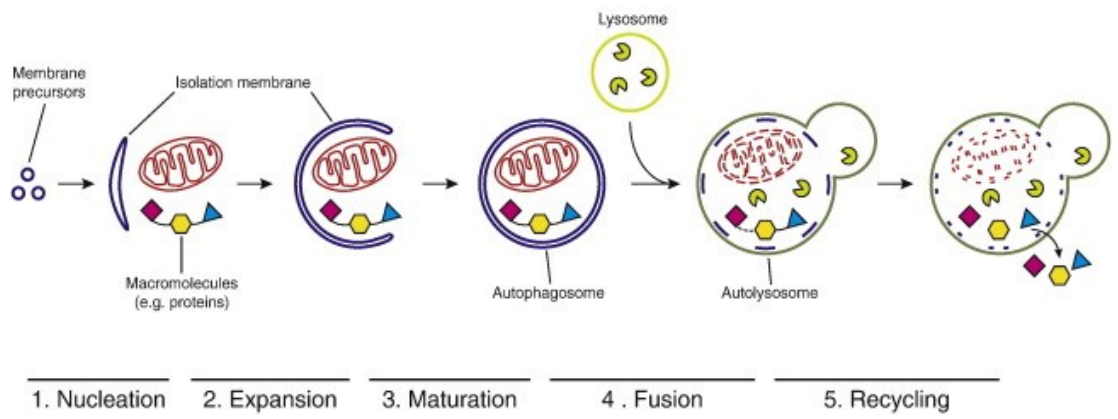
#### D) ZACHYCENÍ CÍLŮ PRO DEGRADACI

Obecně je autofagie považována za náhodný proces. Obrázky z elektronového mikroskopu často ukazují autofagosomy s různým obsahem, a to včetně mitochondrií, endoplazmatického retikula nebo membrán Golgiho aparátu.

Začíná ale přibývat důkazů, že rostoucí fagoforová membrána může selektivně interagovat s proteinovými agregáty a organelami. Existuje názor, že LC3B-II působí jako receptor ve fagoforu a interaguje s adaptačními molekulami na cílových strukturách (proteinové agregáty nebo mitochondrie). Touto interakcí LC3B-II podporuje selektivní absorpci cílových struktur a jejich degradaci. V tomto ohledu je nejlépe charakterizována molekula p62/SQSTM1. Jedná se o multifunkční molekulu, která podporuje obrat polyubikvitinovaných proteinů (Glick et al. 2010).

#### E) FÚZE AUTOFAGOSOMU S LYZOSOMEM

Nejdříve autofagosom dokončí spojení rozšiřujících se konců fagoforové membrány. Dalším krokem je fúze autofagosomu se specializovaným endozomálním kompartmentem, kterým je lyzosom. Formuje se takzvaný autolyzom. S lyzosomy splývá vnější membrána autofagosomu. Autolyzom vzniká za účasti proteinů LAMP-1 a LAMP-2. Ve vzniklém autolyzomu dochází k degradaci zadržovaných částic. Rozklad těchto částic je usnadněn, pokud dojde ke snížení pH prostředí, které aktivuje enzymy. Při zrání autolyzomu se uplatňují kathepsinové proteázy, které obsahuje lyzosom a proteiny LAMP-1 a LAMP-2 (Glick et al. 2010).



**Obrázek 3** - Mechanismus autofagie. Převzato z: (Zaffagnini and Martens 2016).

## 5. FOTODYNAMICKÁ TERAPIE (PDT)

### 1.6 FOTODYNAMICKÁ TERAPIE – CHARAKTERISTIKA

Fotodynamický efekt látek (kterého je dnes využíváno ve fotodynamické terapii, PDT) byl náhodně objeven přibližně před sto lety, a to studentem medicíny Oscarem Raabem. Tento nový jev byl ale oficiálně popsán Raabovými profesory – Jesionkem a von Tappeinerem (Allison and Moghissi 2013).

Na začátku 20. století von Tappeiner a Jesionek provedli první lékařskou aplikaci využívající interakce mezi fluorescenční látkou a světlem. Použili kombinaci eosinu a bílého světla k léčbě kožních nádorů. Von Tappeiner potom pokračoval ve výzkumu s Jodlbauerem, aby dokázali, že je nutná přítomnost kyslíku při fotosenzitivní reakci.

Tento fenomén a využití různých fotosenzitizérů v léčbě různých nádorových onemocnění pak bylo pravidelně zkoumáno a znovuobjevováno. Všechny studie poukázovaly na potencionální roli hematoporphyrinu jako diagnostického nástroje nádorových chorob. V roce 1955 Schwartz *et al.* poukázal na to, že hematoporphyrin použitý v předchozích studiích byl směsí různých porfyrinů. Proto bylo nutné podávat vysokou dávku, která způsobovala vysokou toxicitu. Schwartz *et al.* prokázal, že po přečištění této směsi byl samotný hematoporphyrin velmi slabě lokalizován v tumorové tkáni a naopak zbytky, které zůstaly po přečištění měly k této tkáni výbornou afinitu. Upravil proto hematoporphyrin a získal substanci známou jako derivát hematoporphyrinu.

Schwartz poté přesvědčil doktora Lipsona, aby se zaměřil na studie týkající se derivátů hematoporphyrinu. Lipson *et al.* dále demonstrovali vlastnosti lokalizace tumoru a v 60. letech 20. století se začali zabývat využitím derivátů hematoporphyrinu k detekci tumorů. Roku 1993 proběhlo v Kanadě první klinické schválení PDT pro léčbu nádorů močového měchýře (Ackroyd *et al.* 2001).

PDT se v posledních letech objevuje jako nový způsob léčby nádorových onemocnění. Tato terapie využívá kombinaci netoxických látek, tzv. fotosenzitizérů (PS) spolu s viditelným světlem a molekulárním kyslíkem ( $^3\text{O}_2$ ), které nepůsobí škodlivě, pokud jsou aplikovány odděleně. Zmíněná kombinace způsobuje produkci reaktivních druhů kyslíku a ničení nádorů (Mroz *et al.* 2011).

Jak už byl zmíněno, PDT se skládá ze tří základních komponent: PS, světla a  $^3\text{O}_2$ . Žádná ze zmíněných součástí této terapie není sama o sobě škodlivá nebo toxická.

Společně jsou ale tyto komponenty schopné vyvolat fotochemickou reakci, která vyústí k vytvoření vysoce reaktivního produktu, který je označován jako singletový kyslík ( $^1\text{O}_2$ ). Právě tento produkt může velmi rychle způsobit významnou toxicitu, která vede k buněčné smrti, a to zejména apoptózou nebo nekrotózou. Celkový efekt PDT má protinádorový efekt, který je odvozován z 3 mechanismů, které spolu vzájemně souvisí. Jsou jimi: přímý cytotoxický efekt působící na nádorové buňky, poškození nebo zničení cévního řečiště nádoru a indukce zánětlivé reakce (Agostinis et al. 2011).

PS mohou být po podání lokalizovány do různých organel – nejčastěji jsou to mitochondrie, Golgiho aparát, endoplasmatické retikulum, cytoplazmatická membrána nebo lyzosomy (Mroz et al. 2011).

PDT je terapeutický postup, který je v současné době již klinicky schválený a je minimálně invazivní. Vůči maligním buňkám může vyvíjet selektivní cytotoxickou aktivitu. Postup této léčebné terapie spočívá v podání PS, po něm následuje ozařování při takové vlnové délce, která odpovídá absorpčnímu pásu této látky.

Bylo klinicky prokázáno, že PDT může být léčebným procesem, především v počátečních stádiích nádorů. Tato terapie je minimálně toxická pro normální tkáň, má zanedbatelné systémové účinky a je u ní výrazně snížena morbidita (Agostinis et al. 2011). Při PDT se využívá toho, že se tvoří  $^1\text{O}_2$  a další reaktivní formy kyslíku (ROS). Tyto formy vznikají ozařováním PS nahromaděného v nádorové tkáni, a to viditelným světlem. Vznikající ROS způsobí v místě nádorové buňky aktivaci nebo spustí nekrotickou buněčnou smrt, pokud je tvorba ROS (Liang et al. 2015). na druhou stranu, v závislosti na lokalizaci PS v buňce mohou vzniklé ROS vést nejen k buněčné smrti, ale i k takové odpovědi buňky, která vede k její adaptaci (Buytaert et al. 2007).

PS může být podáno během PDT systémově, lokálně nebo topicky. Léčivo je možné aplikovat i na lézi, která nemusí být vždy nádorového charakteru. Po uplynutí inkubační doby je obvykle tato specifická léze ozářena červeným viditelným světlem. V přítomnosti  $^3\text{O}_2$  vede toto ozáření k vytvoření ROS a následně k buněčné smrti a destrukci tkáně (Robertson, Evans, and Abrahamse 2009).

## **1.7 FAKTORY, KTERÉ HRAJÍ DŮLEŽITOU ROLI V PDT**

### **A) FOTOSENZITIZÉR**

Bylo zkoumáno velké množství PS, a to jak v podmínkách *in vitro*, tak *in vivo*. Pouze malé množství z testovaných PS splňovalo ideální vlastnosti pro provedení fotodynamické terapie. Tzv. „ideální fotosenzitizer“ by měl splňovat následující požadavky: chemickou čistotu, selektivitu pro nádorové buňky, stabilitu fyzikální i chemickou, krátký časový interval mezi podáním PS a maximální akumulací v tumorové tkáni, aktivaci při takové vlnové délce (600 – 800nm), aby došlo k optimální penetraci do tkáně, a rychlá eliminace z těla (Robertson et al.2009).

Ve většině případů jsou PS planární sloučeniny – jsou to látky odvozené od struktur složených ze čtyř pyrrolových jednotek, které jsou symetricky uspořádané a vzájemně propojené. Mezi nejvíce využívané PS v PDT patří porfyrinoidy, především pak porfyriny, chloriny a bakteriochloriny. Existují ale i jiné třídy porfyrinoidů, které jsou také využívány v PDT – ftalocyaniny a texafyriny.

Průnik světla do tkáně se zvyšuje s rostoucí vlnovou délkou (dáno snižující se absorpencí endogenních chromoforů ve tkáni). Proto PS, které silně absorbují v červené oblasti, nabízejí zlepšení v kontrole nádorů. Mezi ně patří chloriny, bakteriochloriny a ftalocyaniny (Macdonald and Dougherty, 2001).

Prvním PS, který byl klinicky využit při léčbě nádorů, byla směs ve vodě rozpustných porfyrinů, které nazýváme derivát hematoporfyrinu (HpD). Porfimer sodný je čištěná forma tohoto derivátu a později se stal známým pod komerčním názvem Photofrin® (Agostinis et al. 2011).

Obecně dělíme PS do tří generací. Na porfyrinu je založena první generace PS. Do této skupiny patří např. HpD a Photofrin®. Velmi užívanými PS byly deriváty hematoporfyrinu, což je porfyrin vytvořený kyselou hydrolyzou hemu. Protože má první generace PS řadu nevýhod, začaly být studovány látky z tzv. druhé generace. Do této skupiny patří látky odvozené od celé řady struktur – porfyriny, deriváty chlorofylu, barviva a jiné. Jako prekurzor PS lze použít prolečivo – kyselinu 5-aminolevulovou. Třetí generace PS zahrnuje struktury z první i druhé generace, které jsou různě modifikovány pro selektivnější akumulaci v nádorové tkáni apod. Takovými modifikacemi jsou např. vazba s cholesterolu a protilátek, či nosičové formulace pro lepší transport v organismu – nanočástice a liposomy (Macdonald and Dougherty, 2001).

## B) ZDROJ SVĚTLA

V PDT je důležité, abychom byli schopní odhadnout, jak se bude světlo šířit v prostoru cílové tkáně. Když světlo pronikne do tkáně, je buď rozptýleno, nebo absorbováno. Oba tyto procesy závisí na typu tkáně, do které světlo proniklo, a na vlnové délce použitého světla (Robertson et al. 2009).

Modré světlo proniká do tkáně mnohem méně než světlo červené nebo infračervené. Rozmezí vlnových délek mezi 600 – 1200 nm je často označováno jako tzv. „optické okno“ tkáně. Na druhou stranu, pouze světlo vlnových délek do cca 800 nm má dostatečnou energii k vyvolání vzniku  $^1\text{O}_2$ . Výběr vhodného světelného zdroje závisí na absorpčním spektru PS, charakteru onemocnění, ale také ceně a velikosti zařízení (Agostinis et al. 2011).

Aktivační světlo používané v PDT je nejčastěji generováno laserem. V některých případech mohou být použity například obloukové lampy nebo zdroje fluorescenčního světla (tzv. nekoherentní zdroje světelného záření).

Nejvíce používané v PDT jsou lasery, protože vytváří vysoce koherentní monochromatické světlo. To je potom efektivně směřované do optických vláken, které v PDT fungují jako zařízení pro dodávání světla. Tímto způsobem může být světlo dodáno i na méně přístupná místa v těle (např. močový měchýř či prostata) (Macdonald and Dougherty, 2001).

## 1.8 FOTODYNAMICKÁ TERAPIE – MECHANIZMUS

Fotosenzitizér je schopný interagovat s  $^3\text{O}_2$  a produkovat ROS pouze, pokud je v excitovaném stavu. Mezi vznikající ROS patří  $^1\text{O}_2$ , hydroxylový radikál a superoxidové ionty. Mohou interagovat s nenasycenými mastnými kyselinami, nukleovými kyselinami nebo aminokyselinami v celé řadě biologických struktur. Tato interakce způsobí oxidační poškození, které může vést až k buněčné smrti.

ROS jsou považovány za zdroj cytotoxicity. Je tomu tak z důvodu jejich interakce prakticky se všemi makromolekulárními složkami buňky (především lipidy, DNA, proteiny). ROS jsou tedy redukovány buněčnými detoxikačními a antioxidačními enzymy a látkami. Tuto redukci označujeme jako první obrannou linii proti ROS, která však během PDT může být přemožena. To vede k oxidačnímu stresu a k progresivnímu



rozvoji selhání buněčných mechanismů. V savčích buňkách existuje proteolytický systém sloužící k odstranění organel a nevratně oxidovaných cytosolických proteinů, které byly poškozeny působením ROS.

V souladu s tímto jsou shromažďovány důkazy, které poukazují na to, že ROS mohou stimulovat autofagii s funkčními následky. Ty mohou být různé – od ochrany buňky až po aktivaci autofagické buněčné smrti (Reiners et al. 2010).

Velká část PS má v základním (singletovém) stavu dva elektrony, které mají opačné spiny. Tyto elektrony se nacházejí v orbitalu, který je pro ně energeticky výhodný. Cyklická tetrapyrrolová struktura tvoří takzvaný chromofor. Pokud chromofor absorbuje foton elektromagnetického záření ve formě světelné energie, dojde přesunu elektron do vyšší energetické hladiny. Chromofor se dostane do excitovaného stavu. Posléze může dojít k navrácení do základního stavu, nebo k inverzi spinu elektronu a vzniku excitovaného tripletového stavu. PS v excitovaném tripletovém stavu mohou reagovat dvěma způsoby, které dělíme na proces Typu I a proces Typu II.

Procesy Typu I mohou zahrnovat PS, které se nachází buď v singletovém, nebo tripletovém excitovaném stavu. Excitovaný singletový stav má velmi krátké trvání, a proto může PS reagovat se substrátem, pouze pokud je v jeho těsné blízkosti (Josefsen and Boyle 2008). Proces Typu I se může vyskytnout i při reakci PS s organickou molekulou v buněčném prostředí (Agostinis et al. 2011).

Procesy Typu II zahrnují přímou interakci excitovaného tripletového PS s molekulárním kyslíkem. Z excitovaného tripletového stavu PS přechází na základní energetický stav emisí fosforescenčního záření, nebo přenesením energie na jinou molekulu nezářivým přechodem (Macdonald and Dougherty, 2001).

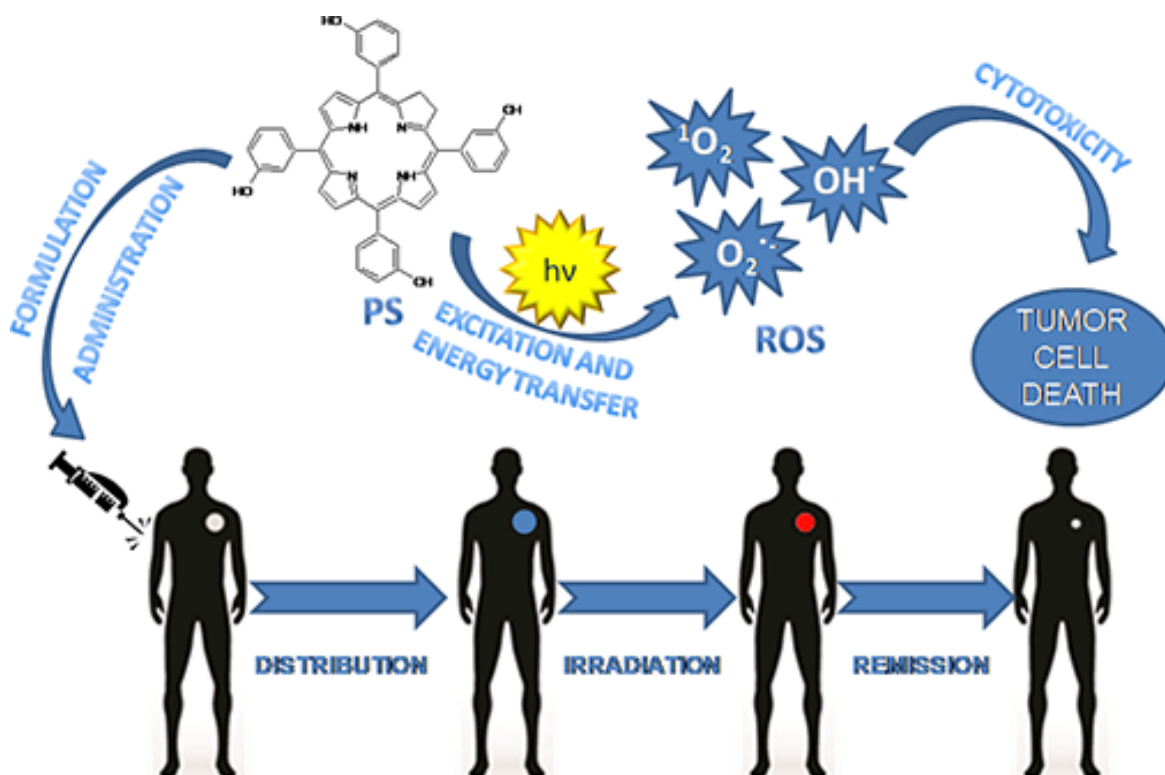
Procesy Typu I jsou dále rozděleny do dalších dvou mechanismů. První z nich zahrnuje přenesení elektronu (oxidace) z molekuly substrátu na molekulu PS – dojde k excitovanému stavu. Tím vzniká radikálový anion PS a radikálový kation substrátu. Druhý mechanismus zahrnuje přenos vodíkového atomu (redukce) do excitovaného stavu PS. Tak vznikají volné radikály, které jsou schopné rychle reagovat s molekulárním kyslíkem. Tak vzniká komplex tvořený reaktivními kyslíkovými intermediáty, včetně reaktivních peroxidů (Josefsen and Boyle 2008).

Při procesech Typu I dojde k získání vodíkového atomu nebo elektronu a tvoří se radikály. Následuje autooxidace redukovaného PS za vzniku kyslíkového radikálu. Redukce tohoto radikálu může poskytnout peroxid vodíku, který podléhá redukci a může vzniknout velmi reaktivní oxidační hydroxylový radikál.

Reakce Typu I závisí přímo na koncentraci cílového substrátu (Macdonald and Dougherty, 2001).

Naproti tomu procesy Typu II zahrnují přímou interakci excitovaného tripletového stavu PS s  $^3\text{O}_2$  v základním stavu.

Vysoce reaktivní kyslíkové radikály, které vznikají při procesech Typu II, působí v blízkosti místa jejich vzniku. Jejich životnost v biologickém systému je asi 40 ns. Je velmi pravděpodobné, že jak procesy Typu I, tak procesy Typu II, hrají klíčovou roli při poškození buněčné membrány a zároveň při poškození mechanismů, které probíhají v buňce. Toto poškození vzniká jako důsledek ozáření molekuly PS. Nezbytná je také přítomnost  $^3\text{O}_2$ , který se podílí na zmíněném poškození. Obecně je přijímáno, že proces Typu II částečně převládá v indukci buněčného poškození. Je to z důvodu interakce molekuly PS s  $^3\text{O}_2$ , který je ve tkáni aerobních organismů dostupný ve velkém množství. *In vivo* jsou však některé buňky před účinkem fotodynamické terapie chráněné.  $^1\text{O}_2$  je vychytáván jinými látkami – například histidinem. Tím se sníží účinek PDT (Josefsen and Boyle 2008).



**Obrázek 4** - Mechanismus PDT. PS je systematicky aplikován a po dostatečné době potřebné k akumulaci PS v nádorové lézi dojde k ozáření světlem. Začnou vznikat ROS (reaktivní kyslíkové radikály). PS absorbuje foton a tím je transformován z jeho stavu do excitovaného tripletového stavu skrze krátký excitovaný singletový stav. ROS působí poté cytotoxicky na nádorové buňky. Převzato z: (Kocki et al. 2017)

## 6. AUTOFAGIE V PDT

V roce 2006 bylo zjištěno, že PDT je schopná vyvolat autofagii – proces recyklace, který lze označit i jako „samo-pojídání“. Původně byla autofagie charakterizována jako reakce na nedostatek živin nebo jiné formy buněčného stresu. Nicméně pozdější studie ukázaly, že autofagie může vést také k buněčné smrti. Mezi úlohy autofagie patří odstranění poškozených organel a nesprávně složených nebo agregovaných proteinů. Trvale poškozené proteiny totiž mohou být zdrojem zvýšeného oxidačního stresu, a tím pádem mají nepříznivý účinek na buňky. Navíc organely, které podléhají oxidačnímu stresu, mohou vyvolat adaptaci buňky umožňující přežití, a tím podpořit vznik a růst nádoru.

Přímé letální účinky fotodynamické terapie na buněčnou populaci se zpočátku objevovaly při zahájení apoptózy, přičemž vysoké PDT dávky mají nekrotický účinek. Selektivní indukce buněčného „sebe-pojídání“ nebo „sebe-trávení“, které je známé jako autofagie, představuje nový léčebný cíl pro prevenci při růstu nádoru a při prevenci metastáz. Je nutné zmínit, že autofagie má protichůdné účinky v regulaci buněčné smrti. Při užití v onkologii, může autofagie vyvolat pozitivní i negativní účinky na růst a vývoj nádoru. (Distefano 2015)

PDT je schopná indukovat apoptózu, nekrózu nebo autofagii. To záleží na mnoha faktorech, jako jsou typ PS, typ buňky a celková fotodynamická dávka. Molekuly z rodiny porfyrinů, jako je například produkt proléčiva 5-ALA (kyselina aminolevulová), se ukládají v mitochondriích a vyvolávají zde vznik ROS. Hlavně ale způsobují mitochondriální apoptózu zahrnující kaskádovitou aktivaci kaspas, která vzniká po aktivaci světlem.

Autofagie následuje po PDT zprostředkované PS, které jsou zaměřeny na endoplazmatické retikulum a/nebo na mitochondrie. Sasnauskiene *et al.* provedl studii zaměřenou na PDT a odhalil, že pokud dojde k vnitřnímu poškození mitochondrie, které je způsobeno malou nebo střední fotodynamickou dávkou, neobjeví se apoptóza, ale je vyvolána autofagie. Avšak při vyšším fotodynamickém dávkování lze pozorovat rozsáhlou apoptózu, která se objeví společně s autofagií.

Nedávné pozorování, které provedl Francois *et al.* a další pozorovatelé ukázalo, že buňky, které byly podrobeny nejnižší PDT – dávce, vykazují významnou hodnotu

exprese LC3-II (znak autofagie), ale není pozorováno uvolňování cytochromu c ani štěpení kaspas (znaky apoptózy; Liang et al. 2016).

Nedávno provedl studii také Donohue *et al.* – v této studii bylo porovnáno více než 3500 sloučenin v automatizovaném mikroskopickém testu. Jejich zjištění bylo překvapující. Ukázalo se, že PS – derivát benzoporfyrinu, který se komerčně nazývá Verteporfin<sup>®</sup>, má bez ozáření vlastnost inhibovat autofagii. S využitím těchto informací se zkušelo ovlivnění buněk vysokou dávkou tohoto PS. To se projevilo sníženým účinkem autofagie (Distefano 2015).

Vzhledem k vysoké reaktivitě ROS, které vznikají při fotodynamické terapii, je autofagie iniciována k odstranění oxidativně poškozených organel jako jsou mitochondrie či endoplazmatické retikulum. Kombinace PDT s inhibitorem autofagie může vyvolat apoptotickou smrt, což vede k lepšímu léčebnému efektu. Autofagie tedy může částečně chránit buňky a pomoci jim tolerovat účinky PDT. Pokud ale bude úroveň autofagie vysoká, povede to k buněčné smrti (Liang et al. 2016).

Úloha autofagie při buněčné smrti indukované PDT není ještě zcela jasná. Existuje ale několik příkladů, ve kterých by autofagie potenciálně mohla hrát roli. Pro-autofagický protein Beclin-1 se váže na Bcl-2. Bcl-2 je cílem mnoha PS, které se běžně používají v klinických i experimentálních studiích. Po ztrátě funkce Bcl-2 tedy může dojít k zahájení autofagie (Reiners et al. 2010).

Podle prof. Kessela může už poměrně malá dávka světla způsobit smrt významného počtu nádorových buněk, které byly vystaveny fotodynamické terapii. Po PDT dochází k selektivní ztrátě proteinu Bcl-2, což přímo vede k apoptóze a následné smrti buňky. Nicméně protein Bax zůstává nedotčený působením PDT a zůstává pro-apoptickým proteinem (Distefano 2015).

Jedny z prvních onemocnění, které byly spojovány s autofagií, byly nádory. Bylo zjištěno, že esenciální protein pro autofagii – Beclin-1 – je také nádorovým supresorem. Právě produkcí Beclinu-1 autofagie zpočátku potlačuje růst nádoru. To se postupně mění s tím, jak se nádor stává více vyžralým. Autofagie začíná podporovat progresi tumoru tím, že poskytuje mechanismy pro buňky ve střední části nádoru, kde je málo živin. Tyto mechanismy poskytují buňkám energii a živiny nutné k přežití. Bylo také zjištěno, že autofagie blokuje cestu apoptózy, a tím chrání nádorové buňky před léčbou.

Na druhou stranu, jiné nádorové terapie mohou vyvolávat autofagickou smrt nádorových buněk. Tento oboustranný vliv autofagie může být využitý protinádorovou

terapií, a tím pádem poskytnout lepší možnosti léčby pro pacienty s rakovinou (Mroz et al. 2011).

Stále tedy ještě není úplně jasné, jak autofagie může ovlivnit výsledek PDT. Obecně je autofagie využívána savčími buňkami jako obrana proti poškození buňky, které je způsobeno ROS. Tato obrana je zprostředkována odstraněním poškozených organel nebo velkých agregátů proteinů, které nemohou být odstraněny ubikvitin-proteasomovým systémem, během autofagického procesu. PDT může stimulovat autofagii, která bude cytoprotektivní, nebo naopak vyvolá buněčnou smrt. To záleží na druhu ROS, a také na stupni oxidačního poškození (Buytaert et al. 2007; Mroz et al. 2011).

Autofagie může hrát roli v indukci apoptózy prostřednictvím PDT, ale tyto dva procesy mohou vznikat i nezávisle na sobě. Byla provedena studie na myších leukemických buňkách, která ukázala, že vlna autofagie se objevuje těsně před apoptózou. Také se zjistilo, že prevence autofagie umlčováním genu *Atg7* umožňuje zabít poškozených nebo nádorových buněk při nižších dávkách světla.

Jiná situace ale existuje u nádorových buněk, které nemají schopnost podstoupit apoptózu kvůli nedostatku Bax a Bak proteinů. V těchto buňkách je prostřednictvím PDT aktivována autofagie a následně nekróza a buněčná smrt nezávislá na aktivitě kaspas.

Zdá se, že autofagie pomáhá přežít nádorovým buňkám, které jsou schopné apoptózy. Naopak bylo prokázáno, že autofagie u buněk, kterým schopnost apoptózy chybí, podporuje buněčnou smrt.

Abychom mohli pochopit, jak je autofagie ovlivněná PDT, je důležité brát v úvahu proteiny postižené PDT, které jsou zapojené do tohoto mechanismu. Mnoho proteinů (některé z nich jsou přímo zapojené do procesu autofagie) je oxidativně poškozeno účinkem PDT. Některé PS lokalizované do mitochondrií a endoplazmatického retikula vyvolávají poškození Bcl-2, ke kterému se váže Beclin-1 (pro-autofagický protein). Dále, protein IP3 regulující autofagický proces, spojený s endoplazmatickým retikulem, je jedním z cílů poškození ftalocyaninovým PS (konkrétně Pc4). Jiný PS (AlPcS) způsobuje poškození savčího cíle rapamycinu (mTOR), což je regulátor růstu, který se účastní signalizační cesty při autofagii. Ostatní proteiny, jako například Beclin-1, Atg-5 nebo Atg-7, se zdají být nedotčené působením PDT. Přestože mnoho proteinů, které jsou zapojené do procesu autofagie, je poškozeno, předpokládá se, že proteiny podílející se na tvorbě autofagosomu zůstávají aktivní (Mroz et al. 2011).

## 1.9 PŘÍKLADY AUTOFAGIE V PDT

### **Apoptóza asociovaná s autofagií při použití nanončástic**

Při použití nanočástic oxidu titaničitého s dusíkem (N-TiO<sub>2</sub>) ve spojení s viditelným světlem vznikají jednak ROS a touto novou PDT založenou na nanočásticích je také indukována autofagie. Zatímco dobře rozptýlené nanočástice (N-TiO<sub>2</sub>) byly inertní, jejich fotoaktivace viditelným světlem vedla k indukci autofagie zprostředkované ROS v leukemických buňkách K562 a v normálních periferních lymfocytech. Tvorba ROS a indukce autofagie vzrůstá s vyšším počtem nanočástic a vyšší dávkou světla.

Při konstantní energii světla a vzrůstající koncentraci nanočástic (N-TiO<sub>2</sub>) vyvolají zvýšené hodnoty ROS megakaryocytární diferenciaci v leukemických buňkách K562. Tato diferenciaci je závislá na autofagii. Vysoké koncentrace nanočástic (N-TiO<sub>2</sub>) mohou vést k apoptotické buněčné smrti asociované s autofagií.

Použitím chemických inhibitorů autofagie bylo potvrzeno, že autofagie je nezbytná jak pro megakaryocytární diferenciaci, tak pro apoptózu vyvolanou fotoaktivovanými nanočásticemi.

Aktivace nanočástic představuje novou terapeutickou strategii léčby tumorových onemocnění (Moosavi et al. 2016).

### **Autofagie vyvolaná PDT za použití proléčiva kyseliny 5-aminolevulové**

Biguanid metformin je léčivo, které je používáno především pro léčbu diabetu 2. typu. Metformin zvyšuje účinnost chemoterapie tím, že podporuje signalizační dráhu autofagie zahrnující adenosinmonofosfát-aktivovanou proteinkinasu (AMPK).

PDT s kyselinou 5-aminolevulovou (5-ALA; prekurzor protoporfyrinu IX – PpIX) vede k apoptóze, když se PpIX akumuluje v mitochondriích. PDT s 5-ALA může vést také k autofagii, a to prostřednictvím aktivace AMPK.

Byla provedena studie, ve které byl vyhodnocený efekt metforminu v kombinaci s 5-ALA-PDT. Studie byla provedena *in vitro* na nádorové plicní buněčné linii KLN205. Buňky léčené 5-ALA-PDT vykazovaly kondenzaci jaderného chromatinu a přítomnost autofagosomů. Tyto výsledky naznačují, že v buňkách KLN205 probíhá jak autofagie, tak apoptóza při kombinované léčbě 5-ALA-PDT s metforminem (Osaki et al. 2017).

### **Kombinovaná PDT léčba (Photosan-II) s inhibitory autofagie**

PDT se často využívá jako terapeutická léčba tumorových onemocnění tlustého střeva a konečníku. Používá se především kvůli její schopnosti selektivně se zaměřit na nádory bez zničení anatomické integrity tlustého střeva.

Byla provedena studie, kde se zkoumal terapeutický význam vzájemného působení mezi autofagií a apoptózou při PDT zprostředkované Photosan-II (PS-II). Studie byla provedena jak *in vitro*, tak *in vivo* modelech s kolorektálním tumorem. Ukázalo se, že PS-PDT v závislosti na dávce vyvolává apoptózu i autofagii v buňkách SW620 a HCT116. Buňky, které podléhaly PS-PDT, vykazovaly jadernou kondenzaci a zvýšily se hladiny štěpené kaspasy-3 a Bax, což připomíná apoptózu. Objevily se také autofagické vakuoly, autofagosomální struktury s dvojitou membránou a proteiny Bcl-2, Atg-7 a LC3 související s autofagií.

Nálezy ukazují, že kombinovaná léčba pomocí PS-PDT a inhibitorů autofagie může být účinným prostředkem k léčbě pacientů s kolorektálním karcinomem (Xiong et al. 2017).

### **Inhibice autofagie fotoaktivovaným fytkocyaninem**

Z důvodu vážných vedlejších účinků syntetických léčiv je snaha se zaměřit na látky přírodního původu, které by byly využity jako PS. Využití těchto látek by mohlo vést k eliminaci nežádoucích účinků. Jednou z takových sloučenin je C-fykocyanin (C-PC). PC vykazuje mnoho biologických vlastností včetně protizánětlivých a antioxidačních účinků. Má také schopnost ničit volné radikály a nedávno byly zkoumány jeho protinádorové účinky.

Byla provedena studie, kde bylo využito fykocyaninu obsahujícího selen (Se-PC). Byl zkoumán PDT efekt Se-PC proti nádoru jater. Byl proveden experiment *in vitro* a *in vivo*.

Se-PC PDT by mohla indukovat buněčnou smrt prostřednictvím volných radikálů, které během PDT vznikají. Tím by došlo ke zvýšení aktivity antioxidačních enzymů se selenem *in vivo*. Mechanismus Se-PC PDT zahrnuje apoptózu doprovázenou inhibicí autofagie během časného vývoje nádorové léze (Liu et al. 2018).

### **Photofrin slabě indukuje autofagii *in vitro***

Autofagie indukovaná během PDT způsobuje přibližně stejný počet případů, kdy dojde ke smrti buňky a kdy naopak buňka přežije. Z toho vyplývá potřeba dalšího zkoumání autofagie indukované PDT, protože tento proces ještě nebyl zcela objasněn. Autofagická cesta v PDT je složitá a závisí na mnoha faktorech.

Dřívější studie zabývající se autofagií zahrnovaly především PS, které se hromadí v mitochondriích nebo endoplazmatickém retikulu. Nicméně se výzkum zabývá otázkou, zda je autofagie indukována i při použití PS Photofrin, který se hromadí hlavně v buněčných membránách. Navíc existují náznaky, že samotný Photofrin bez aktivace světlem, může fungovat jako inhibitor autofagie. Proto byla provedena studie, která byla zaměřena na vyšetření toho, zda Photofrin-PDT spouští autofagii a zda vede ke zvýšení citlivosti nebo naopak odolnosti nádorových buněk vůči PDT. V této studii byla využita buněčná linie lidského karcinomu děložního čípku – HeLa a také buněčná linie karcinomu prsu – buňky MCF-7.

HeLa a MCF-7 buňky byly podrobeny Photofrin-PDT. Western blot analýza ukázala, že tento typ PDT vede ke konverzi cytosolové LC3-I na její lipidovanou formu vázanou na membrány – LC3-II. Tato forma je specifickým markerem autofagie. Konverze LC3 je závislá na čase a podané dávce. Souběžná léčba inhibitorem autofagie – chlorochinem – vedla k výraznější akumulaci LC3-II než samotná PDT. Chlorochin je známý tím, že inhibuje lyzozomální degradaci autofagosomů.

Jedna z metod pro studium role autofagie zahrnuje genetickou inhibici genů spojených s autofagií. Bylo prokázáno, že komplex Atg-5-Atg-12 je nezbytný pro tvorbu autofagosomů a lipidaci LC3. Byl proto proveden pokus, kdy bylo sníženo množství Atg-5 pomocí shRNA a bylo pozorováno, zda tato regulace ovlivní citlivost nádorových buněk k PDT. Důsledkem byla snížená exprese Atg-5, a snížená konverze LC3-I na LC3-II v obou buněčných liniích.

Bylo zjištěno, že snížení exprese Atg-5 vlivem shRNA pouze málo ovlivňuje citlivost nádorových buněk k PDT. Může to být způsobeno faktem, že exprese Atg-5 je snížena, ale není plně blokována.

Byla zaznamenána mírná indukce autofagie v buňkách HeLa a MCF-7. Je možné, že minimální exprese proteinů nutných k autofagii je dostatečná pro účinnou autofagii, takže účinnost PDT je minimálně ovlivněna (Domagala et al. 2018).



## 7. ZÁVĚR

Z této práce je zřejmé, že autofagie je neustále předmětem zkoumání. Výzkum se zabývá otázkou, za jakých podmínek je autofagie indukována a zda je pro buňku přínosem, či nikoliv.

PDT je považována za relativně novou, ale velmi úspěšnou a slibnou terapii, která se využívá při léčbě nádorových onemocnění. Jedná se o poměrně jednoduchou techniku, která má velkou účinnost a minimální následky pro pacienta.

Studie ukazují, že stále není úplně jasné, jak autofagie může ovlivnit výsledek PDT. Obecně je autofagie využívána savčími buňkami jako záchranný mechanismus – např. jako vypořádání se s následky oxidativního poškození buňky. Tato obrana je zprostředkovaná odstraněním poškozených organel nebo velkých agregátů proteinů. PDT může stimulovat autofagii, která bude cytoprotektivní, nebo naopak vyvolá buněčnou smrt. To záleží na typu PS, a především na stupni oxidačního poškození.

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abou-Ghali, Majdouline, and Johnny Stiban. 2015. "Regulation of Ceramide Channel Formation and Disassembly: Insights on the Initiation of Apoptosis." *Saudi Journal of Biological Sciences* 22 (6). King Saud University:760–72. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.03.005>.
- Ackroyd, Roger, Clive Kelty, Nicola Brown, and Malcolm Reed. 2001. "The History of Photodetection and Photodynamic Therapy." *Photochemistry and Photobiology* 74 (5):656. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2001\)074<0656:THOPAP>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2001)074<0656:THOPAP>2.0.CO;2).
- Agostinis, Patrizia, Kristian Berg, Keith a Cengel, Thomas H Foster, Albert W Girotti, Sandra O Gollnick, Stephen M Hahn, et al. 2011. "Photodynamic Therapy of Cancer : An Update." *American Cancer Society* 61:250–81. <https://doi.org/10.3322/caac.20114>. Available.
- Allison, Ron R., and Keyvan Moghissi. 2013. "Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms." *Clinical Endoscopy* 46 (1):24–29. <https://doi.org/10.5946/ce.2013.46.1.24>.
- Buytaert, Esther, Michael Dewaele, and Patrizia Agostinis. 2007. "Molecular Effectors of Multiple Cell Death Pathways Initiated by Photodynamic Therapy." *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 1776 (1):86–107. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2007.07.001>.
- Díaz-Troya, Sandra, María Esther Pérez-Pérez, Francisco J. Florencio, and José L. Crespo. 2008. "The Role of TOR in Autophagy Regulation from Yeast to Plants and Mammals." *Autophagy* 4 (7):851–65. <https://doi.org/10.4161/auto.6555>.
- Distefano, Mark D. 2015. "NIH Public Access" 10 (5):213–23. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-673-3>.
- Domagala, Antoni, Joanna Stachura, Magdalena Gabrysiak, Angelika Muchowicz, and Radoslaw Zagodzón. 2018. "Inhibition of Autophagy Sensitizes Cancer Cells to Photofrin-Based Photodynamic Therapy." *BMC Cancer*, 1–10.
- Duprez, Linde, Ellen Wirawan, Tom Vanden Berghe, and Peter Vandenabeele. 2009. "Major Cell Death Pathways at a Glance." *Microbes and Infection* 11 (13). Elsevier Masson SAS:1050–62. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.08.013>.
- Galluzzi, L, I Vitale, J M Abrams, E S Alnemri, E H Baehrecke, M V Blagosklonny, T M Dawson, et al. 2012. "Molecular Definitions of Cell Death Subroutines:

- Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012.” *Cell Death and Differentiation* 19 (1):107–20. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.96>.
- Glick, Danielle, Sandra Barth, and Kay F Macleod. 2010. “Autophagy: Cellular and Molecular Mechanisms.” *INVITED REVIEW Journal of Pathology J Pathol* 221 (February):3–12. <https://doi.org/10.1002/path.2697>.
- Josefsen, Leanne B., and Ross W. Boyle. 2008. “Photodynamic Therapy and the Development of Metal-Based Photosensitisers.” *Metal-Based Drugs* 2008. <https://doi.org/10.1155/2008/276109>.
- Kaur, Jasvinder, and Jayanta Debnath. 2015. “Autophagy at the Crossroads of Catabolism and Anabolism.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16 (8). Nature Publishing Group:461–72. <https://doi.org/10.1038/nrm4024>.
- Kocki, Tomasz, Beata Czarczynska-Goslinska, Katarzyna Kocka, Magdalena Stolarska, Daria Wachowska, Sebastian Lijewski, Tomasz Koczorowski, and Tomasz Goslinski. 2017. “World ’ s Largest Science , Technology & Medicine Open Access Book Publisher Nurses and Pharmacists in Interdisciplinary Team of Health Care Providers in Photodynamic Therapy Nurses and Pharmacists in Interdisciplinary Team of Health Care Providers in Pho.” *Photomedicine - Advances in Clinical Practice*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11723793>.
- Kroemer, G, L Galluzzi, P Vandenabeele, J Abrams, Es Alnemri, Eh Baehrecke, Mv Blagosklonny, et al. 2009. “Classification of Cell Death 2009.” *Cell Death and Differentiation* 16 (1):3–11. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.150.Classification>.
- Liang, Liming, Wenxiang Bi, and Yuanyuan Tian. 2016. “Autophagy in Photodynamic Therapy.” *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 15 (4):885–89. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v15i4.31>.
- Liang, Liming, Wenxiang Bi, Yuanyuan Tian, Mark D Distefano, Fakultý Uk, Univerzita Karlova, L Galluzzi, et al. 2015. “Význam Imunogenní Buněčné Smrti v Protinádorové Imunitě.” *Klinická Onkologie* 27 (1). Elsevier B.V.:107–20. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2007.07.001>.
- Liu, Zijian, Xiang Fu, Wei Huang, Chunxia Li, Xinyan Wang, and Bei Huang. 2018. “Journal of Photochemistry & Photobiology , B : Biology Photodynamic e Ff Ect and Mechanism Study of Selenium-Enriched Phycocyanin from Spirulina Platensis against Liver Tumours.” *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* 180 (July 2017). Elsevier:89–97. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.12.020>.
- MACDONALD, IAN J., and THOMAS J. DOUGHERTY. 2001. “Basic Principles of

- Photodynamic Therapy.” *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines (JPP)* 05 (02):105–29. <https://doi.org/10.1002/jpp.328>.
- Manuscript, Author. 2009. *Autophagy in Infection and Immunity*. Vol. 335. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-00302-8>.
- Mlejnek, Petr, and Rndr Petr Mlejnek. 2004. “Buněčná Smrt,” 468–71.
- Moosavi, Mohammad Amin, Maryam Shar, and Soroush Moasses Ghafary. 2016. “Photodynamic N-TiO<sub>2</sub> Nanoparticle Treatment Induces Controlled ROS-Mediated Autophagy and Terminal Differentiation of Leukemia Cells,” no. September:1–16. <https://doi.org/10.1038/srep34413>.
- Mroz, Pawel, Anastasia Yaroslavsky, Gitika B. Kharkwal, and Michael R. Hamblin. 2011. “Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer.” *Cancers* 3 (2):2516–39. <https://doi.org/10.3390/cancers3022516>.
- Ondroušková, Eva, and B. Vojtěšek. 2014. “Programovaná Buněčná Smrt v Nádorových Buňkách.” *Klinická Onkologie* 27 (SUPPL. 1):7–14.
- Osaki, Tomohiro, Inoru Yokoe, Kiwamu Takahashi, and Katsushi Inoue. 2017. “Metformin Enhances the Cytotoxicity of 5-Aminolevulinic Acid-Mediated Photodynamic Therapy in Vitro,” 1049–53. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6237>.
- Reiners, John J., Patrizia Agostinis, Kristian Berg, Nancy L. Oleinick, and David Kessel. 2010. “Assessing Autophagy in the Context of Photodynamic Therapy.” *Autophagy* 6 (1):7–18. <https://doi.org/10.4161/auto.6.1.10220>.
- Robertson, C. A., D. Hawkins Evans, and H. Abrahamse. 2009. “Photodynamic Therapy (PDT): A Short Review on Cellular Mechanisms and Cancer Research Applications for PDT.” *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 96 (1). Elsevier B.V.:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2009.04.001>.
- Suzuki, Kuninori, Takayoshi Kirisako, Yoshiaki Kamada, Noboru Mizushima, Takeshi Noda, and Yoshinori Ohsumi. 2001. “The Pre-Autophagosomal Structure Organized by Concerted Functions of APG Genes Is Essential for Autophagosome Formation.” *EMBO Journal* 20 (21):5971–81. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.21.5971>.
- Tait, Stephen W. G., Gabriel Ichim, and Douglas R. Green. 2014. “Die Another Way – Non-Apoptotic Mechanisms of Cell Death.” *Journal of Cell Science* 127 (10):2135–44. <https://doi.org/10.1242/jcs.093575>.
- Xiong, Li, Zhipeng Liu, Guoqing Ouyang, Liangwu Lin, and He Huang. 2017. “Autophagy Inhibition Enhances Photocytotoxicity of Photosan-II in Human Colorectal Cancer Cells” 8 (4):6419–32.

- Yorimitsu, T., and D. J. Klionsky. 2005. "Autophagy: Molecular Machinery for Self-Eating." *Cell Death and Differentiation* 12:1542–52. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401765>.
- Zaffagnini, Gabriele, and Sascha Martens. 2016. "Mechanisms of Selective Autophagy." *Journal of Molecular Biology* 428 (9). The Authors:1714–24. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.02.004>.