

ALEKSANDRA KAWCZYK-KRUPKA¹, ZENON CZUBA², WOJCIECH LATOS¹, ANNA MERTAS², WOJCIECH KRÓL², MARIA SIMON-SIEROŃ³, ALEKSANDER SIEROŃ^{1,3}

¹ Ośrodek Diagnostyki i Terapii Laserowej, Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Angiologii i Medycyny Fizykalnej, Śląski Uniwersytet Medyczny

² Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny

³ Katedra Fizjoterapii, Wyższa Szkoła Ekonomii i Administracji w Bytomiu

Aspekty immunologiczne terapii fotodynamicznej

Immunological features of photodynamic therapy

Streszczenie:

Terapia fotodynamiczna (photodynamic therapy - PDT) jest metodą leczenia wybranych (przede wszystkim wczesnych) nowotworów i stanów przednowotworowych. Istotą tej metody jest selektywne niszczenie zmienionych chorobowo tkanek poprzez zadziałanie na nie światła laserowego o ściśle określonej długości fali. Zjawisko to umożliwia substancja – fotouczulacz, wychwytywana przez chorobowo zmienioną tkankę. Standardowo stosowanymi fotouczulaczami są porfiryny, które są komponentą hemoglobiny. Działanie fotodynamiczne wywołuje trzy typy reakcji w naświetlanej tkance: bezpośredni efekt cytotoksyczny, pośredni efekt cytotoksyczny przez okluzję naczyń krwionośnych oraz wtórne działanie immunostymulujące i prozapalne. Spośród wymienionych sposobów działania, efekt immunostymulujący wydaje się być unikalny, zważywszy, że zarówno chemio- jak i radioterapia powodują upośledzenie funkcji układu immunologicznego. Wiele prac doświadczalnych wykazało, iż w trakcie terapii fotodynamicznej dochodzi do mobilizacji komórek immunokompetentnych: nacieku limfocytów, neutrofilów, makrofagów, co wskazuje na aktywację procesu zapalnego. Mediatorami tego procesu są substancje wazoaktywne, składniki C3 dopełniacza, białka ostrej fazy, proteinazy, peroksydazy, reaktywne formy tlenu, cytokiny, czynniki wzrostu oraz inne substancje biorące udział w odpowiedzi immunologicznej. Podkreśla się, iż immunomodulatoryjny efekt terapii fotodynamicznej związany jest także z wpływem na angiogenezę i aktywność metastatyczną komórek nowotworowych.

Abstract:

Photodynamic therapy (PDT) is a well-known method for the selective, non-invasive and effective treatment of precancerous and cancerous lesions due to the activation of photobiochemical processes that cause cytotoxicity. PDT is based on mutual reactions between laser irradiation and photosensitizers that accumulate in tissues and result in selective damage of pathological tissues. The anticancer effect of PDT is due to three main mechanisms. First, PDT is cytotoxic, with both necrotic and apoptotic effects. Second, PDT leads to the occlusion of blood and lymphatic vessels of the tumor. Third, PDT is associated with the modulation of immune and inflammatory responses. In addition to these mechanisms of cell death, there is a variety of events that occur during PDT that lead to and magnify the inactivation of tumor cells. Many studies have reported the infiltration of lymphocytes, neutrophils and macrophages into PDT-treated tissue, indicating activation of the immune response. The inflammatory process is mediated by factors such as vasoactive substances, components of the complement and clotting cascades, acute phase proteins, proteinases, peroxidases, reactive oxygen species, leukocyte chemoattractants, cytokines, growth factors and other immunoregulators. It is possible that immunomodulatory mechanisms of PDT could also influence angiogenesis and the invasiveness of tumor cells.

Słowa kluczowe: terapia fotodynamiczna, immunoterapia, immunoregulatory

Key words: photodynamic therapy, immunotherapy, immunoregulators

Terapia fotodynamiczna (photodynamic therapy - PDT) jest metodą leczenia wybranych (przede wszystkim wczesnych) nowotworów i stanów przednowotworowych. Istotą tej metody jest selektywne niszczenie zmienionych chorobowo tkanek poprzez zadziałanie na nie światła laserowego o ściśle określonej długości fali. Zjawisko to umożliwia substancja – fotouczulacz, wychwytywana przez chorobowo zmienioną tkankę. Standardowo stosowanymi fotouczulaczami są porfiryny, które są komponentą hemoglobiny. Porfiryny znalazły zastosowanie w leczeniu dzięki swojej szczególnej zdolności do absorpcji energii

zawartej w fotonach i przenoszenia jej na otaczające cząsteczki tlenu z powstaniem toksycznych fotopochodnych takich jak tlen singletowy oraz wolne rodniki. Aktywne postacie tlenu mają zdolność niszczenia białek, lipidów, kwasów nukleinowych, które są materiałem budulcowym organelli komórkowych oraz naczyń stanowiących integralną część guza.

Aby dokładniej poznać mechanizmy działania terapii fotodynamicznej wydaje się celowe uzupełnienie badań klinicznych o ocenę skuteczności PDT na poziomie subkomórkowym. Działanie fotodynamiczne wywołuje trzy

typy reakcji w naświetlanej tkance: bezpośredni efekt cytotoxyczny, pośredni efekt cytotoxyczny przez okluzję naczyń krwionośnych oraz wtórne działanie immunostymulujące i prozapalne. Spośród wymienionych sposobów działania, efekt immunostymulujący wydaje się być unikalny, zważywszy, że zarówno chemio- jak i radioterapia powodują upośledzenie funkcji układu immunologicznego. Wiele prac doświadczalnych wykazało, iż w trakcie terapii fotodynamicznej dochodzi do mobilizacji komórek immunokompetentnych: nacieku limfocytów, neutrofilów, makrofagów, co wskazuje na aktywację procesu zapalnego. Mobilizacja komórek immunokompetentnych może nie mieć dużego znaczenia w pierwotnym niszczeniu komórek guza, lecz ogromna rola przypada jej w długoterminowej kontroli wzrostu guza. Mediatorami tego procesu są substancje wazoaktywne, składniki C3 dopełniacza, białka ostrej fazy, proteiny, peroksydazy, reaktywne formy tlenu, cytokiny, czynniki wzrostu oraz inne substancje biorące udział w odpowiedzi immunologicznej. Podkreśla się, iż immunomodulacyjny efekt terapii fotodynamicznej związany jest także z wpływem na angiogenezę i aktywność metastatyczną komórek nowotworowych. Podkreśla się zwłaszcza rolę wolnych rodników tlenowych, interleukin oraz czynnika martwicy nowotworów. Z kolei przewlekły stan zapalny jest czynnikiem powodującym transformację nowotworową zmienionych zapalnie tkanek [1]. Wykazano, iż najbardziej podatne na przewlekły stan zapalny są płuca, pęcherz moczowy, trzustka i przewód pokarmowy. Za proces zapalny odpowiedzialny jest szereg mediatorów, w tym cytokiny i czynniki transkrypcyjne. Jądrowy czynnik transkrypcyjny kappa B (NF- κ B) oraz szlaki sygnalizacyjne, stanowią zasadnicze elementy procesu zapalnego oraz rozrostowego. Aktywacja kinazy I κ B (IKK)-NF- κ B, odpowiedzialnej za oporność komórek nowotworowych na czynniki cytotoxyczne i proapoptyczne, prowadzi do stymulacji produkcji czynników wzrostu, aktywujących rozrost guza nowotworowego oraz angiogenezę. Główną funkcją interleukiny 1 jest udział w inicjacji procesu zapalnego związany z indukcją gorączki oraz ekspresją molekuł adhezyjnych [2]. Voronov i współpracownicy wykazali, iż uczestniczące w procesie zapalnym cytokiny, zwłaszcza interleukina-1beta (IL-1 β) oraz interleukina-1alpha (IL-1 α) są odpowiedzialne *in vivo* za angiogenezę oraz inwazyjność różnych guzów nowotworowych, a antagoniści receptora interleukiny-1 (IL1RN), mogą przez powyższy mechanizm mieć zastosowanie w terapii nowotworów [3].

Decydującą rolę w procesach związanych z bezpośrednim efektem cytotoxycznym, lecz także z niszczeniem naczyń guza oraz działaniem immunostymulującym odgrywają procesy związane z mobilizacją większości komórek immunokompetentnych, w tym makrofagów, poprzez działanie receptorowe [4]. Jedną z molekuł uwalnianych przez

makrofagi jest czynnik martwicy nowotworów (TNF α), będący cytokiną odpowiedzialną za masywny efekt cytotoxyczny guzów wywołujący martwicę krwotoczną i ich regresję [5]. TNF α indukuje nekrozę i apoptozę poprzez różne szlaki biochemiczne prowadzące do fragmentacji wewnątrzjądrowego DNA [6]. Tlenek azotu (NO) jest wolnym rodnikiem odgrywającym istotną rolę jako modulator funkcji układu immunologicznego, endokrynologicznego oraz neurologicznego, a na poziomie komórkowym – aktywującym apoptozę. NO, generowany przez makrofagi i neutrofile, odpowiedzialny jest za homeostazę, skurcz mięśniówki gładkiej, agregację płytek krwi, oraz adhezję leukocytów do śródbłonna [7].

Tlenek azotu reaguje z anionem ponadtlenkowym, tworząc nadtlenoazotyn. Reaktywne formy tlenu (RFT) anion ponadtlenkowy (O $_2^{\bullet-}$), rodnik hydroksylowy (HO \bullet), rodnik peroksydowy (RO $_2^{\bullet}$), oraz rodnik alkoksylowy (RO \bullet) [8].

PDT aktywuje procesy związane z uwalnianiem wolnych rodników (ROSs) przez makrofagi, odpowiedzialnych za destrukcję tkanek [8].

Dla określenia mechanizmów działania cytotoxycznego, były przeprowadzone eksperymenty na liniach komórek nowotworowych L929 i MDPC-23 z zastosowaniem fotouczulacza Photogem® i z naświetlaniem światłem niebieskim LED (light-emitting diode). Badanie to wykazało, iż efekt cytotoxyczny związany był z wysokim poziomem reaktywnych form tlenu [9]. Kolejne badania wykazały, iż istnieje związek pomiędzy wysokim poziomem ROS i działaniem przeciwbakteryjnym PDT [10]. Dlatego też coraz częściej PDT stosowana jest w chorobach infekcyjnych [11] oraz stanach zapalnych przyzębia [12].

W innym badaniu na modelu zwierzęcym (myszy BALB/c), wykazano, iż zastosowanie PDT w przypadku guza EM6 spowodowało znaczny wzrost poziomu mRNA IL-6 oraz IL-10, bez wpływu na czynnik martwicy nowotworów- α [13].

Zespół de Vree wykazał, iż podczas terapii fotodynamicznej stosowanej w mięsakach szczurów dochodzi do uwalniania interleukiny 1 (IL-1 β), oraz wzrostu odsetka neutrofilów w krwi [14]. Efekt immunomodulacyjny PDT wykazany również został w badaniach klinicznych, w których prowadzono terapię fotodynamiczną nowotworów skóry oraz leukoplakii jamy ustnej [15].

Także kojarzenie terapii fotodynamicznej z immunoterapią wydaje się wielką nadzieją na zwiększenie selektywności oraz skuteczności terapii fotodynamicznej.

Fotoimmunoterapia wewnątrzustrojowa, wykorzystując wiele różnorodnych mechanizmów działania (m.in. indukcję regulatorowych komórek T, zjawisko apoptozy, reakcje przeszczep-przeciw biorcy), daje nowe potencjalne

możliwości zastosowania w wielu dziedzinach medycyny, m.in.:

- w hematologii: (leczenie przewlekłej i ostrej reakcji przeszczep-przeciwko-gospodarzowi po allogenicznym przeszczepie szpiku kostnego, kontrola odrzucania w transplantacjach narządów miękkich: serca, płuc, nerek),
 - w dermatologii (leczenie stwardnienia układowego),
- oraz w terapii innych jednostek chorobowych, w których dominują reakcje związane z komórkami T:
- w gastroenterologii (terapia choroby Crohn'a),
 - w reumatologii (leczenie reumatoidalnego zapalenia stawów),
 - w dermatologii (terapia nefrogennej dermopatii włóknistej oraz innych, opornych na leczenie atopowych zapaleń skóry).

Fotoimmunoterapia komórkowa, z zastosowaniem np. płynnego psoralenu, jest metodą terapeutyczną o bardzo dużej skuteczności leczniczej oraz niskim stopniu objawów ubocznych [16].

Przedmiotem wielu badań i doświadczeń jest ocena mechanizmu działania oraz udział procesów enzymatycznych i immunologicznych, uruchamianych podczas akcji fotodynamicznej.

Celem badania A. Rück [17] była ocena roli i mechanizmu działania subkomórkowego fotouczulacza - Photofrinu i kwasu ursodeoksycholowego (względnie innych nietoksycznych kwasów żółciowych) w zwiększaniu skuteczności terapii fotodynamicznej. Badanie wykazało, że PDT z Photofrinem działa głównie poprzez indukcję apoptozy. W ocenie efektów wykorzystano kilka różnych testów m.in.: test uwalniania cytochromu c, test aktywacji kaspazy oraz fragmentacji DNA. Ponadto zastosowano spektralne obrazowanie długości fluorescencji (SLIM) w celu analizy budowy komórkowej Photofrinu i statusu enzymów łańcucha oddechowego. Badano 2 różne linie komórkowe ludzkiego wątrobiaka zarodkowego. W komórkach linii HepG2 śmierć komórkowa była efektem zaburzeń mitochondrialnych, co wykazała analiza uwalniania cytochromu c i fragmentacji DNA, podczas gdy w linii Huh7, wykazującej zmutowany gen p53, cech tych nie obserwowano. Na podstawie analizy czasu fluorescencji enzymów cyklu oddechowego, który okazał się być dłuższy w obecności kwasu ursodeoksycholowego w linii HepG2, zasugerowano, że jednym z powodów zwiększonej skuteczności PDT po dodaniu tego kwasu jest destabilizacja błon mitochondrialnych. Badanie wykazało, że terapia skojarzona: PDT z Photofrinem i kwasem ursodeoksycholowym w znacznym stopniu zwiększała skuteczność terapeutyczną PDT.

Przedmiotem innego eksperymentu była ocena działania cytotoksycznego PDT na ludzkie komórki białaczkowe. Oceniano aktywność fototoksyczną hypercyny – jednego z najsilniejszych naturalnych barwników oraz terapii

fotodynamicznej z użyciem światła o długości fali 370 – 680 nm i mocy energii 8 mW/cm² wobec ludzkich komórek B białaczkowych. Żywotność komórek oceniano za pomocą 1% błękitu trypanowego, zaś apoptozę i martwicę z wykorzystaniem transferaz terminalnych deoksyrybonukleotydów (TdT) i mikroskopii fluorescencyjnej. Wewnątrzkomórkowe stężenie fotouczulacza mierzono metodą fluorometryczną. Wyniki badań wykazały, że terapia skojarzona PDT z hypercyną powoduje znaczną śmiertelność białaczkowych komórek nowotworowych [18].

Terapia fotodynamiczna stymuluje uwalnianie cytokin. W badaniu klinicznym II fazy badano efekt antynowotworowy i bezpieczeństwo NPe6-PDT u pacjentów z rakiem płuc. Ten rodzaj terapii fotodynamicznej indukuje ekspresję takich cytokin, jak: IL-2, IL-6, IL-12, TNF-alpha. W badaniu oceniano rolę IL-2 w efekcie przeciwnowotworowym NPe6-PDT z użyciem komórek mysiego raka płuc transfekowanych IL-2, LLC/IL-2, *in vitro* i *in vivo*. Komórki LLC/IL-2 były odporne na działanie NPe6-PDT w porównaniu z macierzystymi komórkami LLC. NPe6-PDT indukowała w komórkach LLC/IL-2 tzw. bloker wzrostu i uszkodzenia DNA 45 alpha (Gadd 45 alpha), który jest gwałtownie indukowany przez stres genotoksyczny. Eksperymenty *in vitro* sugerowały, że Gadd 45 alpha chroni komórki LLC/IL-2 przed apoptozą indukowaną przez PDT. W 6 godzin po zakończeniu terapii fotodynamicznej dochodziło do ekspresji czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF), działanie to *in vivo* utrzymywało się na wysokim poziomie aż do 48h. Wysoka ekspresja IL-2 wywoływała wznówę nowotworu poprzez dodatnie sprzężenie Gadd 45 alpha i VEGF w terapii NPe6-PDT. To sugeruje że dodatkowe zastosowanie inhibitora IL-2 może zwiększyć efektywność terapeutyczną NPe6-PDT [19].

Na podstawie wstępnych badań doświadczalnych wydaje się, że terapia fotodynamiczna, poprzez modyfikację odpowiedzi immunologicznej, może być jedną z metod terapeutycznych w chorobie Crohn'a. W badaniu na modelu zwierzęcym oceniano skuteczność terapeutyczną PDT z użyciem niskich dawek energii w leczeniu zapalenia okrężnicy u myszy SCID. Wstępnie ustalano endoskopowy wskaźnik zapalenia okrężnicy – EIC, a następnie myszy SCID z umiarkowanym lub znaczącym zapaleniem okrężnicy losowo przydzielano do jednej z grup: leczonej za pomocą PDT lub do grupy kontrolnej. Myszom BALB/c z grupy PDT podawano doustnie kwas 5-δ-aminolewulinowy w dawce 15mg/kg, a następnie 3 godziny później poddawano je naświetlaniom - za pomocą cylindrycznego dyfuzora - światłem o długości fali 635nm, w dawce 5 lub 10 J/cm². 74h po sesji PDT oceniano stan ogólny, wagę ciała, EIC, długość okrężnicy oraz badanie histopatologiczne, a także wskaźniki ekspresji cytokin. W zapaleniu okrężnicy znacznego stopnia już w 3 dni po PDT obserwowano gojenie się zmian. Endoskopowy wskaźnik

zapalenia okrężnicy korelował ze wskaźnikiem ekspresji cytokin w przypadku IFN- γ , TNF- α i IL-10. Indeksy ekspresji tych cytokin były niższe w grupie PDT niż w grupie kontrolnej. We wnioskach badania podkreślono brak znaczących efektów ubocznych, powtarzalność terapii fotodynamicznej oraz jej znaczenie w regulacji odpowiedzi immunologicznej i poprawie stanu ogólnego w mysim modelu z zapaleniem jelit [20].

W badaniach doświadczalnych Korbelik wykazał, że terapia fotodynamiczna wyzwała w docelowych tkankach nowotworowych sprzężenie dodatnie w genach kodujących białka szoku cieplnego oraz akumulację białkowych produktów tych genów, co odgrywa dużą rolę w eliminacji zniszczonych komórek nowotworowych oraz immunologicznym rozpoznaniu antygenów nowotworowych. W pracy wykorzystano model mysiej białaczki limfoblastycznej celem zbadania ekspresji genu białka szoku cieplnego HSP70 w zmianie nowotworowej leczonej wcześniej PDT. Stwierdzono, że Gen HSP70 po terapii fotodynamicznej był regulowany dodatnim sprzężeniem nie tylko w obrębie zmiany nowotworowej, ale również w wątrobie i śledzionie gospodarza, co pozwala zakwalifikować HSP70 jako czynnik reakcyjny fazy ostrej. Głównymi regulatorami tego genu są hormony steroidowe, działające przez swoiste receptory. Pod wpływem PDT wyzwalane ogólnoustrojowo HSP70 akumuluje się w zmianach nowotworowych, gdzie łączy się z niszczonymi komórkami poprzez mostki fosfatydyloseryny znajdujące się na ich powierzchni [21].

W innym badaniu oceniano znaczenie immunoterapeutyczne połączenia CpG-oligodeoksynukleotydu (ODN) i lizatów komórek nowotworowych HPV (TC-1) oraz indukcji za pomocą terapii fotodynamicznej. Stwierdzono, że w lizatach komórek nowotworowych przy zastosowaniu terapii łączonej (CpG-oligodeoksynukleotyd + PDT) dochodziło do znacznie większego zahamowania wzrostu nowotworu, zarówno na poziomie terapeutycznym, jak i profilaktycznym, w porównaniu z lizatami komórek, w których stosowano samo PDT lub sam CpG-oligodeoksynukleotyd.

Dodatkowo do lizatów komórek z PDT włączano białko szoku cieplnego HSP70, które jest ważnym regulatorem odpowiedzi zapalnej i immunologicznej. Obserwowano odpowiedź komórek T – pomocniczych oraz znaczny wzrost specyficznych przeciwciał dla lizatów komórek – PDT (IgG1, IgG2a, IgG2b i IgG3). Produkcja IFN- γ i odpowiedzi CTL była niezwykle silnie indukowana w grupie lizatów komórek – PDT + ODN. Główną rolę w odpowiedzi immunologicznej odgrywały komórki T CD8+. Wyniki badania potwierdzają, że dodanie CpG-oligodeoksynukleotydu do lizatów komórek-PDT, poprzez indukcję odpowiedzi immunologicznej typu CTL, daje możliwość immunoterapeutycznej strategii leczenia nowotworów [22].

Celem innego badania była ocena skuteczności PDT i immunoterapii z wykorzystaniem terapii kombinowanej: ALA-PDT z imiquimodem w leczeniu 27 pacjentów z chorobą Bowena narządów płciowych. Przed rozpoczęciem leczenia pobierano wycinki ze zmian chorobowych i badano pod kątem obecności DNA HPV-16 i HPV-18. Pacjentów losowo podzielono na dwie grupy. W pierwszej liczącej 15 osób (12 mężczyzn i 3 kobiety w przedziale wiekowym 22-56 lat) stosowano terapię skojarzoną: miejscowo podawano 3 x w tygodniu 5% krem imiquimod oraz 1 x w tygodniu stosowano terapię fotodynamiczną w dawce 100 J/cm² o mocy energii 100 mW/cm². Procedurę powtarzano od 1 do 4 razy. Drugą grupę – kontrolną – stanowiło 12 osób (6 mężczyzn i 6 kobiet, w wieku 29-58 lat) leczonych poprzez waporyzację za pomocą lasera CO₂. Okres obserwacyjny po zakończeniu terapii zawierał się w przedziale od 3 do 12 miesięcy. W grupie terapii łączonej w 60% przypadków (u 9 na 15 pacjentów) uzyskano całkowite wyleczenie, w 1 przypadku odnotowano wznowę procesu chorobowego (11,1%). W grupie tej nie obserwowano żadnych ogólnych efektów ubocznych, miejscowo natomiast występowało łagodne przekrwienie, obrzęk i nadżerka. Z dolegliwości pacjenci zgłaszali uczucie pieczenia i klucia. W grupie drugiej u 10 pacjentów (co stanowiło 83,3%) wykazano całkowitą regresję zmian, wznowę zaś u 6 pacjentów (60,0%). Z miejscowych efektów ubocznych odnotowano: przekrwienie (w stopniu łagodnym lub umiarkowanym), nadżerkę, owrzodzenie. Obserwowano również przedłużone gojenie zmian z bliznowaceniem. Różnica w ilości wznów między grupami była statystycznie znamienne (P < 0,05) [23].

Terapia fotodynamiczna charakteryzuje się dużą skutecznością w inaktywacji i niszczeniu patogenów wieloopornych. W badaniu Hamblina oceniano skuteczność przeciwbakteryjną połączeń fotouczulaczy i nietoksycznych substancji adiuwantowych w stosunku do patogennych mikroorganizmów, takich jak: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Proteus mirabilis*. Na modelach zwierzęcych z infekcjami przyrannymi oraz na modelach infekcji miazgi zębów ludzkich stosowano połączenia: wody utlenionej w niskich dawkach (1 μ M do 1 mM), naturalnych i syntetycznych inhibitorów wielolekowych pomp wypływu oraz fotouczulaczy przeciwdrobnoustrojowych o różnej budowie chemicznej. Zaobserwowano znaczące współdziałanie przeciwbakteryjne pomiędzy niskimi dawkami nadtlenku wodoru i inaktywacją fotodynamiczną za pomocą różnych fotouczulaczy (mi.in. barwników fenotiazynowych) – niszczenie bakterii było od 10 do 100 razy większe. Nietoksyczne wielolekowe inhibitory mogą więc synergistycznie zwiększać inaktywację fotodynamiczną zarówno bakterii Gram dodatnich, jak i Gram ujemnych za pośrednictwem fotouczulaczy [24].

Mechanizm fotoinaktywacji z zastosowaniem hyperycyny w stosunku do *Streptococcus aureus* (ATCC 25923) oraz

klinicznie wyizolowanych szczepów MRSA oceniano celem określenia działania przeciwbakteryjnego terapii fotodynamicznej. Zahamowanie wzrostu bakterii oceniano przez zliczanie kolonii płytkowej, a test z jodkiem propidyny służył do badania integralności błony po fotoinaktywacji. Przed i po terapii badano również efekt genotoksyczny hyperycyny poprzez ocenę przerw w nici DNA za pomocą testu comet. Obie grupy bakterii uczulano hyperycyną w dawce od 0.5 do 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ przez 1/2 godziny, a następnie naświetlano w dawce od 10 do 30 J/cm^2 . 100% skuteczność, czyli zabicie wszystkich bakterii *S. aureus* i MRSA, osiągnięto przy zastosowaniu hepercyny w dawce 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ i naświetlania 30 J/cm^2 . W teście z jodkiem propidyny, obserwowano przesunięcie w obrębie intensywności, narastające wraz ze zwiększaniem dawki PDT. W teście comet nie obserwowano uszkodzenia DNA u patogenów poddawanych działaniu hyperycyny, co sugeruje, że uszkodzenie błony komórkowej jest głównym mechanizmem jej antibakteryjnego działania [25].

W innych badaniach eksperymentalnych przedstawiono możliwości wykorzystania terapii fotodynamicznej w eradykacji infekcji *Helicobacter pylori*, szczególnie wobec efektów ubocznych oraz narastającej ostatnio oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki. Szczep bakterii *H. pylori* inkubowano przez 3h w różnych stężeniach Photogemu (10, 50, 100 i 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Następnie stosowano światło z lasera diodowego o długości fali 632 nm, w dawce 4 J/cm^2 . Grupa ze stężeniem 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ była dodatkowo posiana na podłożu agarowym. Po okresie inkubacji wynoszącym 120 godzin zliczano kolonie bakterii. Całkowitą skuteczność terapii (100% zabitych szczepów) odnotowano *in vitro* w połączeniu PDT z Photogemem w stężeniu 100 i 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. W grupach z użyciem photogemu w stężeniu 10 i 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, przy zastosowaniu samego fotouczulacza lub terapii samym światłem nie uzyskano zamierzonego efektu [26].

Efekt immunosupresyjny PDT oceniano w badaniach doświadczalnych w zapaleniu błony maziówkowej u myszy z defektami immunologicznymi po całkowitej wymianie stawu kolanowego w przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów. Myszom podawano dostawowo fotouczulacz-Laserphyrin'ę, a następnie naświetlano śródstawowo. Porównywano stężenie fotouczulacza w błonie maziówkowej oraz w sąsiednich tkankach zdrowych. W błonie maziówkowej uszkodzonej w przebiegu RZS fotouczulacz gromadził się w lizosomach *in vitro*. Fototoksyczność i efekt terapeutyczny zależały od stężenia fotouczulacza oraz dawki energii użytego światła, *in vitro* i *in vivo* [27].

Korzystne efekty działania PDT wykazały badania eksperymentalne w zapaleniu stawów wywołanym przez szczep MRSA (metycylinooporne) *S. aureus*. W przedstawionym badaniu do stawów kolanowych myszy wstrzykiwano 560 lub 280 $\mu\text{mol}/\text{l}$ Na-Phde, a następnie po upływie 30 minut naświetlano przez 5 minut staw energią o mocy 125

mW uzyskiwaną z lasera półprzewodnikowego. Obrzęk stawu utrzymywał się do 3 tygodni po PDT, a w pierwszym tygodniu w badaniu histologicznym stwierdzano zmiany zapalne z proliferacją maziówki i naciekiem neutrofilów. W 8 tygodni po PDT nie obserwowano cech zapalenia maziówki, nie odnotowano również żadnego wpływu na łąkotki, chrząstkę, czy szpik kostny. Terapia wywoływała odwracalny stan zapalny stawu, bez zmian kostnow stawowych w otaczającej, zdrowej tkance stawu [28].

Przetwarzanie sygnału w PDT odgrywa istotną rolę w procesie leczenia zmian nowotworowych: zarówno przez bezpośrednią inicjację apoptozy komórki nowotworowej, jak i w indukowaniu wtórnego efektu naczyniowego oraz długoterminowej, przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej [29]. Cząsteczki tlenu reaktywnego generowane w trakcie terapii fotodynamicznej, poprzez różne drogi przetwarzania sygnału, mogą indukować apoptozę i/lub martwicę w komórkach docelowych. Na właściwości powstałej cząsteczki tlenu reaktywnego mają wpływ: cechy i dawka fotouczulacza, dawka światła, typ komórki oraz nasilenie zmian patologicznych.

Coraz częściej podkreśla się aspekt angiogenezy w leczeniu nowotworów. W eksperymencie oceniano skuteczność przeciwciała specyficznego dla VEGF (czynnik wzrostu) - bevacizumab'u (Avastin'u), w połączeniu z terapią fotodynamiczną z zastosowaniem hyperycyny w leczeniu zmian nowotworowych pęcherza moczowego na ksenografie *in vivo*. 6-8-tygodniowym myszom nagim typu Balb/c wszczepiano linię komórkową raka nabłonka pęcherza moczowego. Myszy dzielono następnie na 6 grup. Pierwszą stanowiła grupa kontrolna, drugą – grupa myszy poddana tylko działaniu Avastinu, kolejne dwie grupy to myszy, u których stosowano samą terapię fotodynamiczną w wysokich 150 J/cm^2 (grupa 3) lub niskich 50 J/cm^2 (grupa 4) dawkach użytej energii. Ostatnie dwie grupy stanowiły myszy, u których zastosowano połączenie PDT z Avastinem: w grupie 5 Avastin łączono z niskimi dawkami, a w grupie 6 z wysokimi dawkami użytej energii. Okres obserwacji po zakończeniu terapii wynosił 60 dni. Najlepsze rezultaty terapeutyczne osiągnięto w grupie stanowiącej połączenie Avastinu z terapią fotodynamiczną z małą dawką podanej energii. W guzach leczonych wysokimi dawkami PDT z hyperycyną poprzez wywoływanie hipoksji dochodziło do zamykania się naczyń krwionośnych, co doprowadzało do śmierci komórki nowotworowej, ale równocześnie obserwowano stymulację czynników wzrostu naczyń: VEGF, VEGF-D, bFGF i angiogeniny. W przypadku dodatnia do tej terapii inhibitora angiogenezy Avastinu obserwowano zahamowanie ekspresji tych czynników, co zwiększało skuteczność terapeutyczną zastosowanej metody [30].

W innym badaniu obserwowano pozytywne rezultaty terapii fotodynamicznej z powierzchniowym podawaniem ALA u pacjentów z sarkoidozą lub ograniczoną

sklerodermią, którzy nie odpowiadali na zastosowane dotychczas leczenie konwencjonalne, w tym leczenie PUVA. U chorych tych pod wpływem PDT dochodziło do bezpośrednich efektów cytotoksycznych oraz immunomodulujących. W przeciwieństwie do PUVA nie odnotowano karcynogennego działania PDT. Dużą skuteczność PDT odnotowano również w przypadku leczenia innych chorób skóry m.in. trądzika różowatego lub zwykłego, liszaja płaskiego czy choroby Darier'a. W trakcie terapii w naświetlanej skórze obserwowano powstanie zapalnego nacieku, który był bezpośrednim efektem terapii fotodynamicznej oraz indukowanym przez nią wyrzutem cytokin w keratynocytach nabłonkowych [31].

W badaniu Sanghoon i współpracowników na modelu zwierzęcym (myszy typu Balb/c ze zmianą nowotworową EMT-6) oceniano skuteczność przeciwnowotworową terapii fotodynamicznej łączonej z chemioterapią w niskich dawkach. Jako fotouczulacz stosowano pochodną chloryny (Radachlorin), a zmiany naświetlano światłem czerwonym o długości fali 662 nm, w dawce 100 lub 200 J/cm². Chemioterapeutykiem była karboplatyna (CADP) w dawce 1 lub 5 mg/kg m.c. Zastosowanie samej chemioterapii z małą dawką karboplatyny wiązało się z niską efektywnością terapeutyczną. Podanie CAPD w dawce 5mg/kg m.c. powodowało w 40% zniszczenie zmiany nowotworowej, zaś zastosowanie samej terapii fotodynamicznej w 50-80%. Najlepsze efekty uzyskano przy połączeniu PDT (niezależnie od dawki) z karboplatyną w niskiej dawce – uzyskiwano 100% wyleczeń [32].

Coraz bardziej powszechne stosowanie PDT, spowodowane zaletami metody oraz zastosowaniem nowych skuteczniejszych fotouczulaczy i źródeł światła, sprawiło że rozszerzył się wachlarz wskazań pozaonkologicznych dla PDT, czego przykładem może być leczenie schorzeń zapalnych, i to o różnej etiologii. Ważnym jest jednak wyjaśnienie immunologicznego mechanizmu działania terapii fotodynamicznej, co może implikować wytłumaczenie addycyjnego działania przeciwnowotworowego PDT spowodowanego indukcją immunologicznych mechanizmów obrony przeciwnowotworowej. Aspekt ten ważny jest także z punktu widzenia możliwości wykorzystania PDT w leczeniu schorzeń zapalnych, oraz udowodnienie tego działania PDT nie tylko na modelu eksperymentalnym, lecz wdrożenie tej procedury do standardów postępowania klinicznych w wybranych jednostkach chorobowych, co podyktowane jest zaletami PDT takimi jak: skuteczność, mała inwazyjność, bezpieczeństwo, dobra tolerancja leczenia oraz świetne efekty kosmetyczne.

LITERATURA

- [1] Balkwill, F., Mantovani A.: Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001; 357, 539–45.
- [2] Gollnick S. O., Evans S. S., Baumann H. i wsp.: Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation. *Br J Cancer*. 2003; 88, 1772-9.
- [3] Voronov E., Shouval D. S., Krelin Y.: IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003; 100, 2645–50.
- [4] Demidova T. N., Hamblin M. R.: Macrophage-targeted photodynamic therapy. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 2004; 17, 117-26.
- [5] Coutier S. L., Bezdetnaya S., Marchal V. i wsp.: Foscan (mTHPC) photosensitized macrophage activation: enhancement of phagocytosis, nitric oxide release and TNF α mediated cytolytic activity. *Br. J. Cancer*. 1999; 81, 37-42.
- [6] Sarraf C. E.: Tumor necrosis factor and cell death in tumors (Review). *Int. J. Oncology*. 1994; 5, 1333-1339.
- [7] Reeves K. J., Reed M. WJ., Brown I. N. i wsp.: The role of nitric oxide in the treatment of tumours with aminolaevulinic acid-induced photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B*. 2010 Jul 17 [Epub ahead of print].
- [8] Halliwell B. C. E.: Cross Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ. Health Perspect*. 1994; 102, 5–12.
- [9] Dias Ribeiro A. P., Pavarina A. C., Trindade F. Z. i wsp.: Photodynamic therapy associating Photogem® and blue LED on L929 and MDPC-23. *Cell Biology International* 2010; 34, 343–351.
- [10] Park J. H., Moon Y. H., Bang I. S i wsp.: Antimicrobial effect of photodynamic therapy using a highly pure chlorin e6. *Lasers Med Sci*. 2010; 25, 705-10.
- [11] Dai T., Huang Y. Y., Hamblin M. R.: Photodynamic therapy for localized infections- state of the art. *Photodiagnosis Photodyn. Ther*. 2009; 6, 170-88.
- [12] Malik R., Manocha A., Suresh D. K.: Photodynamic therapy – A strategic review. *Indian J. Dent. Res*. 2010; 21, 285-91.
- [13] Gollnick S. O., Liu X., Owczarczak B., i wsp.: Altered expression of interleukin 6 and interleukin 10 as a result of photodynamic therapy in vivo. *Cancer Res*. 1997; 57, 3904-9.
- [14] De Vree W. J., Essers M. C., Koster J. F. i wsp.: Role of interleukin 1 and granulocyte colony-stimulating factor in photofrin-based photodynamic therapy of rat rhabdomyosarcoma tumors. *Cancer Res*. 1997; 57, 2555-8.
- [15] Kawczyk-Krupka A., Wiczkowski A., Adamek M. i wsp.: Photodynamic therapy and its immunomodulating activity in malignant skin tumors and oral leukoplakia. *Acta Bio-Opt. Inf. Med*. 2001; 7, 67-72.
- [16] Knobler R.: Extracorporeal Photoimmunotherapy 11th World Congress of the International Photodynamic Association. Congress Program and Abstracts. Session 1-2. Shanghai 2007.
- [17] Rück A., Haseroth E., Hauser C i wsp.: Role of Mitochondria in Cell Death of Hepatic Cancer Cells Induced by Photofrin® PDT and Ursodeoxycholic Acid 11th World Congress of the International Photodynamic Association. Congress Program and Abstracts. Session 03-4. Shanghai 2007.
- [18] Daniuleviciute E., Luksiene Z.: Hypericin-based Photosensitization of Human Leukemia (reh) Cells 11th World Congress of the International Photodynamic Association. Congress Program and Abstracts. Session 3-P10. Shanghai 2007.
- [19] Ohtani K., Usuda J., Ichinose S. i wsp.: Expression of Gadd45-alpha and VEGF Caused Resistance to the Antitumor Effect of Photodynamic Therapy (PDT) via Upregulation of IL-2 11th World Congress of the International Photodynamic Association. Congress Program and Abstracts. Session 13-4. Shanghai 2007.
- [20] Favre L., Velin D., Borle F. i wsp.: Photodynamic Therapy in Crohn's Disease: A Novel Therapeutic Approach 11th World Congress of the International Photodynamic Association. Congress Program and Abstracts. Session 15-6. Shanghai 2007.
- [21] Korbelik M.: Role of Heat Shock Protein 70 in Systemic Host Response Induced by Tumor PDT, Soroush Merchant 11th World Congress of the International Photodynamic Association. Congress Program and Abstracts. Session 16-3. Shanghai 2007.
- [22] Su-Mi B., Yong-Wan K., Sun-Young K. i wsp.: Photodynamic Therapy-Generated Tumor Cell Lysate in Combination with CpG-Oligodeoxynucleotide Enhances Protective and Therapeutic Immunotherapy Efficacy 11th World Congress of the International Photodynamic Association. Congress Program and Abstracts. Session 16-4. Shanghai 2007.
- [23] Xiu-Li W., Hong-Wei W., Ming-Xia G. i wsp.: Combination of Immunotherapy and Photodynamic Therapy in the Treatment of Bowenoid Papulosis 11th World Congress of the International Photodynamic Association. Congress Program and Abstracts. Session 16-5. Shanghai 2007.
- [24] Hamblin M.R., Tegos G.P.: New Approaches to Microbial Photoinactivation. 11th World Congress of the International Photodynamic Association. Congress Program and Abstracts. Session 16-1. Shanghai 2007.

- [25] Tang H.M., Yow C.M.N., Wong C.K.: Mechanism of Photoinactivation of Hypericin on Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) in Hong Kong 11th World Congress of the International Photodynamic Association. Congress Program and Abstracts. Session 16-P1. Shanghai 2007.
- [26] Chung-Ku R., So-Young C., Jin-Chul A. i wsp.: Antibacterial Effect of PDT Using the Photogem on *Helicobacter Pylori* 2669511th World Congress of the International Photodynamic Association. Congress Program and Abstracts. Session 16-P4. Shanghai 2007.
- [27] Torikai E., Kageyama Y., Kohno E. i wsp.: Photodynamic Effects of Laserphyrin on Synovial Membrane from Rheumatoid Arthritis Patients and Collagen-Induced Arthritis Rats 11th World Congress of the International Photodynamic Association. Congress Program and Abstracts. Session 16-P8. Shanghai 2007.
- [28] Takanori Iriuchishima T., Saito A., Shin Aizawa S. i wsp.: The Effect of Photodynamic Therapy Using Na-Pheophorbide A on the Normal Joint Tissue of Mice 11th World Congress of the International Photodynamic Association. Congress Program and Abstracts. Session 16-P7. Shanghai 2007.
- [29] Huang L., Dai T., Hamblin M. R.: Antimicrobial photodynamic inactivation and photodynamic therapy for infections. *Methods Mol Biol.* 2010; 635, 155-73
- [30] Bhuvaneshwari R., Gan Y.Y., Ho M., Soo K.C., i wsp.: Combination of Bevacizumab (Avastin) and Hypericin-photodynamic Therapy for the Treatment of Human Bladder Cancer Xenografts. Therapy 11th World Congress of the International Photodynamic Association. Congress Program and Abstracts. Session 13-6. Shanghai 2007.
- [31] Szeimies R.M.: Photodynamic Therapy for Inflammatory Dermatoses 11th World Congress of the International Photodynamic Association. Congress Program and Abstracts. Session S14-1. P. 174. Shanghai 2007.
- [32] Sanghoon Jeon, Ki-Hong Kim, Jung-Sook Kim i wsp.: Combination Low-Dose Chemotherapy with Carboplatin and Photodynamic Therapy in Murine Tumors 11th World Congress of the International Photodynamic Association. Congress Program and Abstracts. Session 17-5. Shanghai 2007.

MAGDALÉNA LACKO-BARTOŠOVÁ
Slovak university of Agriculture in Nitra, Slovak Republic

Nutritional quality and antioxidant capacity of triticum spelta varieties

Wartości odżywcze i zdolności przeciwutleniające odmian pszenicy orkiszowej

Abstract:

*Eight winter spelt wheat varieties were cultivated under ecological system in the south Slovakia during 2005-2007 growing seasons. Nutritional parameters and macroelements composition were influenced by the variety and weather conditions. High content of proteins, fat, soluble fibre and ash was found in Altgold, Ostro, Rubiota. Spelt varieties were characterized with high content of potassium, magnesium, phosphorus and sulphur. Antioxidant capacity was 30% higher in winter spelt varieties as compared with *T. aestivum*. Spelt, as an ancient crop can find its place particularly in organic, health and specialty food markets.*

Streszczenie:

W latach 2005-2007 na południu Słowacji prowadzono uprawę ośmiu odmian ozimej pszenicy orkiszowej w systemie ekologicznym. Wartości odżywcze oraz skład makroelementów uzależnione były od rodzaju odmiany oraz warunków atmosferycznych. Wysoką zawartość białek, tłuszczu, rozpuszczalnego błonnika i popiołów wykazały odmiany Altgold, Ostro, Rubiota. Odmiany pszenicy orkiszowej wykazywały ponadto wysoką zawartość potasu, magnezu, fosforu i siarki. Zdolności przeciwutleniające pszenicy orkiszowej były o 30% wyższe w porównaniu z pszenicą zwyczajną. Pszenica orkiszowa, uprawiana już w starożytności, może znaleźć szczególne zastosowanie w przypadku rynku produktów ekologicznych i zdrowej żywności.

Key words: *Triticum spelta, nutritional quality, antioxidant capacity*

Słowa kluczowe: *Pszenica orkiszowa, wartości odżywcze, zdolności przeciwutleniające*

Spelt is hulled wheat with lax spikes that disarticulate when threshed. Spelt is a hexaploid with the genomic designation AABBDD. It was originally classified as a species separate from common wheat. More recently, spelt wheat has been classified as a morphological subgroup of common wheat [1]. Cereal grains have evolved over the centuries, primarily to enhance yield, quality, and disease resistance. With regard to quality, the emphasis was to improve protein and starch. Much less

attention was paid to secondary substances, such as phenolics, phytate, carotenoids, minerals (ash), which were targets for reduction because of adverse effects on quality. But recently, studies have accumulated to show a role of such secondary substances in promoting human health, reducing the risk of chronic diseases and protecting plants against pests and diseases. Research programmes are in progress to identify plant sources such as ancient grains that contain high levels of components that may