

ZASTOSOWANIE HIPERYCYNY W TERAPII FOTODYNAMICZNEJ – PRZEGLĄD BADAŃ PRZEDKLINICZNYCH

APPLICATION OF HYPERICIN IN PHOTODYNAMIC THERAPY – REVIEW OF PRECLINICAL STUDIES

Anna Dyrła¹, Marta Kaleta-Richter², Kamila Cylupa¹, Piotr Porwoł¹,
Aleksandra Kawczyk-Krupka¹, Aleksander Sieroń¹

¹ Śląski Uniwersytet Medyczny, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym
w Zabrze, Katedra i Oddział Kliniczny Chorób Wewnętrznych, Angiologii
i Medycyny Fizykalnej, 41-902 Bytom, ul. Batorego 15

² Szpital Specjalistyczny w Zabrze, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym
w Zabrze, Oddział Kliniczny Chorób Wewnętrznych, Diabetologii i Alergologii,
41-800 Zabrze, ul. Curie-Skłodowskiej 10

* e-mail: a.m.dyrala@gmail.com

STRESZCZENIE

Terapia fotodynamiczna znajduje zastosowanie w wielu obszarach onkologii. Połączenie fotouczulacza, światła i tlenu prowadzi do powstania reaktywnych form tlenu, które niszczą patologiczne komórki. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie stanu badań przedklinicznych z wykorzystaniem naturalnego fotouczulacza – hiperycyny uzyskiwanej z dziurawca zwyczajnego. Pozytywne rezultaty uzyskano w przypadku nowotworów skóry, jamy nosowo-gardłowej, pęcherza moczowego, nerki, popromiennych włókniakomięsakach oraz w hematologii i pediatrii. Terapia fotodynamiczna może stać się bezpieczną metodą leczenia nowotworów oraz uzupełnieniem standardowego leczenia płynu.

Słowa kluczowe: terapia fotodynamiczna, hiperycyna, dziurawiec zwyczajny, onkologia, badania przedkliniczne

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) is used in various oncological fields. The combination of photosensitizer, light, and oxygen leads to the production of reactive oxygen species (ROS), which destroy pathological cells. Presented review informs on preclinical studies with the use of the natural photosensitizer – hypericin, derived from *Hypericum perforatum*. Positive results were achieved in case of tumors of skin, nasopharyngeal, bladder, kidney neoplasms, radiation-induced fibrosarcoma, in haematology and paediatrics. Photodynamic therapy can become a safe treatment method for neoplasms, as well as an additional method in conventional protocols.

Keywords: photodynamic therapy, hypericin, *Hypericum perforatum*, oncology, preclinical research

1. Wstęp

Terapia fotodynamiczna polega na wyzwoleniu reakcji fotobiochemicznej w warunkach tlenowych między fotouczulaczem oraz światłem o określonej długości fali. Fotouczulacz (fotosensybilizator) jest wprowadzany do organizmu jako substancja *per se* obojętna, która kumuluje się w sposób mniej lub bardziej selektywny w nieprawidłowej tkance. Istotą jest wprowadzenie patologicznych komórek na ścieżkę zaprogramowanej śmierci (apoptozy) lub nekrozy na drodze uszkodzenia fotoooksydacyjnego. Terapia fotodynamiczna jest obecnie wykorzystywana jako forma leczenia chorób nowotworowych i nienowotworowych [1].

Istnieją dwie zasadnicze ścieżki uszkodzenia fotoooksydacyjnego:

- 1) reaktywne formy tlenu (anion ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru, rodniki hydroksylowe) utworzone na drodze przekazania elektronów,
- 2) tlen singletowy $^1\text{O}_2$ powstały na drodze przekazania energii.

Obie ścieżki zachodzą równolegle w czasie terapii fotodynamicznej, a ich proporcja zależy głównie od rodzaju zastosowanego fotouczulacza oraz zawartości tlenu [2].

Apoptoza jest wyzwalana na drodze dwóch mechanizmów:

- 1) receptorowego (zewnątrzpochodnego) – indukowanego przez ligand działający na receptor błony komórkowej [3, 4],
- 2) mitochondrialnego (wewnątrzpochodnego) – indukowanego przez bodźce silnie stresujące (takie jak promieniowanie UV, wysokie stężenie utleniaczy) uszkodzające DNA [5, 6, 7].

Hiperycyna to ciemnoczerwony barwnik roślinny otrzymywany z dziurawca zwyczajnego (*Hypericum perforatum*). Jest od dawna wykorzystywana w medycynie ludowej. Obserwowane empirycznie korzystne działania przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe i wspomagające gojenie ran zostały potwierdzone naukowo. Z powodu działania hamującego monoaminooksydazę (MAO), inhibicji wchłaniania zwrotnego serotoniny, dopaminy i noradrenaliny oraz innych mechanizmów biochemicznych w ośrodkowym układzie nerwowym jest wykorzystywana jako łagodny środek przeciwdepresyjny [8, 9]. Hiperycyna posiada właściwości przeciwzapalne jako inhibitor kinaz JNK (c-Jun N-terminal kinases) – kinazy aktywowane stresem), co zostało udowodnione na szczurzych otrzewnowych makrofagach [10]. W badaniach przedklinicznych jest testowana na zwierzęcych modelach choroby Parkinsona [11]. W niskich stężeniach hiperycyna jako fotosensybilizator indukuje apoptozę za pośrednictwem tlenu singletowego, natomiast w wysokich stężeniach wykazuje tendencję do wywoływania nekrozy przy udziale innych reaktywnych form tlenu [12].

2. Terapia fotodynamiczna z zastosowaniem hiperniacyny – badania przedkliniczne

Celem niniejszej pracy jest przegląd najnowszych badań przedklinicznych z wykorzystaniem hiperycyny jako fotouczulacza w terapii fotodynamicznej nowotworów z uwzględnieniem parametrów terapii oraz mechanizmów molekularnych. Obiecujące efekty do tej pory uzyskano w nowotworach skóry, jamy nosowo-gardłowej, pęcherza moczowego, nerki, trzustki, popromiennych włókniakomięsakach oraz w hematologii i pediatrii [13-15, 19-20, 22-23, 30-32, 35-39].

Zastosowanie hiperycyny w leczeniu białaczek zostało zbadane na linii komórkowej K562 uzyskanej z wysięku opłucnowego pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową (CML) z obecnym chromosomem Philadelphia w fazie przelomu blastycznego. Wykazano, że *in vitro* optymalne parametry to: stężenie hiperycyny 0,4 µg/ml, 4-minutowe naświetlanie światłem o długości fali 595,18 nm z gęstością mocy 0,3 mW/cm², poprzedzone 5-godzinny okres. Poza doświadczalnym wyznaczeniem parametrów terapii, w badaniu Xu i wsp. oznaczono białka (kaspazy 3 i 9, JNK) dowodzące mechanizmu mitochondrialnego apoptozy [13]. Badanie dotyczące zastosowania hiperycyny w terapii fotodynamicznej chłoniaków zostało przeprowadzone na myszach z komórkami P388 implantowanymi podskórnymi. Dowiedziono, iż efektywność terapii jest znacząco wyższa po 2-godzinny czasie inkubacji z hiperycyną podaną dootrzewnowo (2,5 i 20 mg/kg, 120 J/cm², 595 nm) niż po 24-godzinny przerwie między podaniem fotouczulacza a naświetlaniem [14]. Nakajima i wsp. przeprowadzili terapię fotodynamiczną *in vitro* z hiperycyną na komórkach ludzkiej białaczki monocytarnej U937, uzyskując żywotność zmierzającą do 0% po 5 godzinach po naświetlaniu [15]. Możliwość wykorzystania hiperycyny badano również w szpiczaku mnogim (*multiple myeloma*) [16].

Terapia fotodynamiczna znalazła zastosowanie w eliminowaniu komórek nowotworowych ze szpiku kostnego przed przeszczepem autologicznym [17, 18]. Dowiedziono, że terapia fotodynamiczna z hiperycyną hamuje *in vitro* proliferację oraz indukuje apoptozę komórek mysiej linii szpiczaka mnogiego SP2/0. Wykazano zmiany morfologiczne komórek guza odpowiadające nekrozie i apoptozie przy stężeniach hiperycyny 0,025–0,05 μM , okresie inkubacji ciemnej 16 godzin, naświetlaniu promieniowaniem o długości fali 570–620 nm. Pokazano fragmentację DNA, spadek potencjału błon mitochondrialnych, wzrost stosunku ekspresji białek Bax-Bcl-2 oraz wzrost stężenia kaspaz 9 i 3. Efekt terapeutyczny jest zależny od stężenia fotouczulacza oraz intensywności światła. Niższe stężenia hiperycyny indukowały apoptozę (zmniejszenie komórki, kondensację chromatyny, formowanie ciałek apoptotycznych, fragmentację DNA), podczas gdy wyższe – nekrozę. Podobnie na rodzaj śmierci komórkowej wpływa natężenie światła [19].

Terapia fotodynamiczna z użyciem hiperycyny została wykorzystana *in vitro* w leczeniu guza insulinowego (insulinoma, neuroendokryny nowotwór z komórek beta) na linii RINm5F. W warunkach laboratoryjnych liczba komórek po terapii zmniejszyła się istotnie po 10-minutowym okresie naświetlania z wcześniejszą inkubacją w 50 nM roztworze hiperycyny. Badana grupa komórek wykazała zmniejszoną ekspresję markera proliferacji (Ki-67) oraz zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G0/G1. Brano pod uwagę również stężenia kinaz aktywowanych mitogenami. Dowiedziono zjawiska „regulacji w dół” fosfo-JNK i -ERK i zjawiska „regulacji w górę” kaspaz 3 i 9. W badaniu Yi i wsp. oznaczono również stosunek ekspresji onkoprotein Bax i Bcl-2, którego wzrost koreluje z apoptozą komórek [20]. Istotność badania podkreśla fakt, że <10% pacjentów z insulinoma to przypadki choroby rozsianej z przerzutami odległymi (wątroba, kości), gdzie mediana przeżycia wynosi < 2 lat [21].

Terapia fotodynamiczna z wykorzystaniem hiperycyny była również brana pod uwagę jako metoda leczenia raka trzustki. Linie komórkowe MiaPaCa-2 i PANC-1 inkubowano *in vitro* z hiperycyną w stężeniu 10 $\mu\text{g}/500\ 000$ komórek nowotworowych przez 2 godziny, a następnie naświetlono zielonym światłem laserowym (KTP232) o mocy 0,6 W przez 1 minutę za pomocą cylindrycznego dyfuzora. W drugiej fazie badania Liu i wsp. implantowali komórki linii MiaPaCa-2 podskórną oraz dokonali ortotopowego ich przeszczepu do trzustki myszy. Po 5 tygodniach podano do obu guzów 100 μg hiperycyny, następnie naświetlono myszy w dwóch projekcjach. Guzy mierzono przed i po 4 tygodniach od naświetlania. Zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* uzyskano istotne statystycznie zmniejszenie rozmiarów guza, co daje nadzieję na wykorzystanie terapii fotodynamicznej w leczeniu nieresekcyjnych raków trzustki u ludzi [22].

Hiperycyna jako fotouczulacz budzi również nadzieje na zastosowanie w dermatologii onkologicznej. Komórki czerniaka złośliwego (*melanoma malignum*) poddano terapii fotodynamicznej z hiperycyną w postaci trzech linii komórkowych: A375 i 501mel (bez barwnika) oraz UCT Mel-1 (z barwnikiem). Przygotowano roztwór hiperycyny o stężeniu 50 μM , który następnie rozcieńczano. Naświetlania prowadzono za pomocą światła UVA 320–410 nm przez 6 minut i 10 sekund. W obu typach linii komórkowych zaobserwowano efekt działania terapii fotodynamicznej przy stężeniu hiperycyny 3 μM (4 godziny inkubacji ciemnej) poprzez spadek liczby komórek o co najmniej 50% w stosunku do kontroli. W badaniu Kleemann i wsp. [23] zwrócono również uwagę na rozkład fotouczulacza w komórkach docelowych, co ma kluczowe znaczenie w związku z faktem krótkiego okresu półtrwania oraz krótkiego promienia dyfuzji reaktywnych form tlenu, które są podstawą cytotoksyczności metody [24, 25]. Czerwony barwnik zlokalizowany był w siateczce śródplazmatycznej, mitochondriach, lizosomach i melanosomach, jednak nie w jądrze komórkowym. Terapia fotodynamiczna z hiperycyną powodowała istotne zwiększenie pigmentacji w komórkach wszystkich linii czerniaka, co stanowi istotną obserwację z uwagi na fakt, iż komórki tego nowotworu wykazują sekwestrację chemioterapeutyków, wytwarzanie środowiska hipoksyjnego przez wysokie zużycie tlenu, co prowadzi do omijania śmierci komórkowej [26, 27]. Dowiedziono, że depigmentacja komórek czerniaka złośliwego przed poddaniem ich terapii fotodynamicznej zwiększa jej skuteczność. W tym celu zastosowano kwas kojowy (Kojic acid) – specyficzny inhibitor tyrozyazy, który zahamował syntezę melaniny po 3 dniach ekspozycji komórek linii Mel-1. Procedura przyniosła wzrost stężenia reaktywnych form tlenu oraz wzrost odsetka śmierci komórek [28]. Eksperymenty *in vitro* wskazują również na mechanizm autofagii w komórkach *melanoma malignum*, który ma znaczenie

cytoprotekcyjne, istotne dla skutków terapii fotodynamicznej, jednak możliwe do przewyciężenia na drodze zwiększenia stresu oksydacyjnego [29].

Skuteczność terapii fotodynamicznej *in vitro* badano także na nowotworach jamy nosowo-gardłowej. W badaniu Chan i wsp. za model posłużyła linia komórek HK-1. W badaniu mechanizmów apoptozy opisano translokację białka Bax i formowanie kanałów Bax oraz wzrost stężenia ufosforylowanych form kinaz z rodziny szlaku MAPK: p38 i JNK 1 oraz 2 aktywowanych tlenem singletowym, jak również wzrost stężenia kaspaz 3 i 9. W badaniu udowodniono, iż inhibitory p38 wpływają torująco na apoptozę wywołaną terapią fotodynamiczną [30]. Skuteczność terapii fotodynamicznej z hiperycyną została potwierdzona również na linii nie zróżnicowanych komórek raka jamy nosowo-gardłowej CNE-2 [31].

Jednym z najważniejszych problemów onkologicznych jest angiogeneza nowotworowa. Badania przeprowadzono na dwóch wspomnianych wcześniej liniach komórkowych HK-1 i CNE-2, zarówno *in vitro* oraz po implantacji komórek myszom. Zaobserwowano, że w 72 godziny po terapii fotodynamicznej z wykorzystaniem hiperycyny wzrasta stężenie śródbłonkowego czynnika wzrostu naczyń (VEGF), po uprzednim spadku, w ciągu pierwszej doby, w porównaniu z próbą kontrolną. Odnotowano także skuteczność obniżania stężenia VEGF przy pomocy selektywnego inhibitora cyklooksygenazy-2 (COX-2) – celekoksylu (*Celebrex*) [32]. Zużycie tlenu, które towarzyszy terapii fotodynamicznej oraz bezpośrednie uszkodzenie mikrokrążenia w okolicy guza prowadzi do stanu hipoksji [33]. Hipoksja natomiast, poprzez czynnik indukowany hipoksją (HIF-1alfa), stymuluje angiogenezę [34].

Hiperycyna jest także fotouczulaczem, nad którym prowadzono badania w terapii *in vitro* nowotworów pęcherza moczowego. Na modelu komórek T24 (rak niskozróżnicowany) i komórek RT4 (rak wysokozróżnicowany) potwierdzono cytotoksyczność 60 µg/ml roztworu fotouczulacza otrzymanego z dziurawca zwyczajnego przy wzbudzeniu światłem o długości fali 630 nm o gęstości energii 4–8 J/cm². Stwierdzono żywotność komórek po terapii rzędu 20–14%. Porównano wynik dla terapii fotosensybilizatorem Photofrin®, wykazując, iż w linii komórek niskozróżnicowanych skuteczność była porównywalna z hiperycyną (23% żywotności przy uznanych optymalnych parametrach terapii), natomiast w linii komórek wysokozróżnicowanych zdecydowanie lepsze rezultaty uzyskano po terapii hiperycyną [35].

W badaniu Wessels i wsp. hiperycyna została wykorzystana jako foto- i radiouczulacz (2-8 Gy) na liniach komórek raka jasnokomórkowego nerki A498 i ACHN. Wykazano zmniejszenie aktywności metabolicznej oraz apoptozy komórek, co dowodzi pozytywnych efektów terapii [36].

Chen i wsp. wprowadzili hiperycynę jako fotouczulacz oraz mitomycynę C jako inhibitor replikacji DNA do badań na mysim modelu popromiennego włóknakiomięsaka. W badaniu udowodniono efekt addycyjny mitomycyny C, podanej w dawce 2,5 mg/kg na 20 minut przed naświetlaniem światłem laserowym o długości fali 594 nm i gęstości energii 120 J/cm² po 24 godzinach od dożylnego wstrzyknięcia hiperycyny w dawce 1 mg/kg [37].

W piśmiennictwie opisano także zastosowanie hiperycyny w badaniach nad nowotworami wątroby oraz w terapii mięsaka prążkowanokomórkowego. Terapia fotodynamiczna okazała się skuteczna, co potwierdzono poprzez spadek żywotności komórek linii hepatoblastoma HUH6 99,8±2,4%, HepT1 99±2% oraz komórek raka wątrobowokomórkowego Hep2G 98,4±1,6% [38]. Seitz i wsp. dowiedli zahamowania proliferacji oraz promocji apoptozy na wyizolowanych komórkach *rhabdomyosarcoma*, jak również większą selektywność hiperycyny w stosunku do komórek nowotworowych w porównaniu z kontrolną hodowlą fibroblastów [39].

3. Dyskusja

Hiperycyna bierze udział w wielu komórkowych szlakach sygnalizacyjnych. Jednym z istotnych onkologicznie jest szlak MAPK, który wykazuje wzmożoną aktywność w komórkach nowotworowych i jest krytyczny dla procesu proliferacji i różnicowania. Poza kontrolą cyklu komórkowego, procesu angiogenezy, hiperycyna promuje mitochondrialny mechanizm apoptozy (onkoproteina Bax-uwolnienie cytochromu c-prokaspaza 9-kaspaza 9-prokaspaza 3-kaspaza 3- białka naprawiające DNA) [40, 41, 42, 43, 44, 45].

Fotouczulacze mogą być endo- i egzogenne, naturalne i syntetyczne, hydrofilowe czy hydrofobowe. Hiperycyna jest egzogennym, naturalnym i hydrofobowym fotosensybilizatorem. Jej przewaga nad

innymi związkami chemicznymi wynika z takich cech, jak widmo absorpcji w zakresie widzialnym, niski stopień fotowytwarzania oraz szeroki zakres wzbudzenia [46]. Problem rozpuszczalności hiperycyny jest rozwiązywany różnymi metodami, takimi jak dodanie soli potasu [47], połączenia z albuminami osocza [48] oraz zamykanie fotouczulacza w lipidowych nanocząsteczkach [46].

Choroby nowotworowe stanowią wyzwanie współczesnej medycyny w związku ze stale rosnącą zapadalnością, chorobowością i śmiertelnością w populacji światowej. Radykalne leczenie łączy się ze znacznymi efektami ubocznymi – okaleczające zabiegi chirurgiczne, toksyczność leków, powikłania popromienne. Terapia fotodynamiczna jest pozbawiona poważnych działań niepożądanych. Efekty badań przeprowadzonych na liniach komórkowych oraz zwierzętach są obiecujące, jednak stopień skuteczności musi zostać potwierdzony w szerokich badaniach klinicznych.

LITERATURA

- [1] T.A. Debele, S. Peng, H.C. Tsai: *Drug Carrier for Photodynamic Cancer Therapy*, International Journal of Molecular Science, vol. 16, 2015, s. 22094–22136.
- [2] K. Plaetzer, B. Krammer, J. Berlanda, F. Berr, T. Kiesslich: *Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects*, Lasers in Medical Science, vol. 24, 2009, s. 259–268.
- [3] P.J. Naudé, J.A. den Boer, P.G. Luiten, U.L. Eisel: *Tumor necrosis factor receptor cross-talk*, The FEBS Journal, vol. 278 (6), 2011, s. 888–898.
- [4] A. Piotrowska, I. Izykowska, M. Podhorska-Okołów, M. Zabel, P. Dziegiel: *The structure of NF-kappaB family proteins and their role in apoptosis*, Postępy Higieny Medycyny Doświadczanej, vol. 62, 2008, s. 64–74.
- [5] P. Agostinis, E. Buytaert, H. Breysens, N. Hendrickx: *Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis*, Photochemical and Photobiological Sciences, vol. 3(8), 2004 s. 721–729.
- [6] A.C. Moor: *Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy*, Journal of Photochemical and Photobiological B, vol. 57(1), 2000, s. 1–13.
- [7] K. Plaetzer, T. Kiesslich, C.M. Oberdanner, B. Krammer: *Apoptosis following photodynamic tumor therapy: induction, mechanisms and detection*, Current Pharmaceutical Design, vol. 11(9), 2005, s. 1151–1165.
- [8] M. Marrelli, G. Statti, F. Conforti, F. Menichini: *New Potential Pharmaceutical Applications of Hypericum Species*, Mini Reviews in Medicinal Chemistry Journal, vol. 16(9), 2016, s. 710–720.
- [9] V. Butterweck: *Mechanism of action of St John's wort in depression: what is known?*, CNS Drugs, vol. 17(8), 2003, s. 539–562.
- [10] S. Lee, H.S. Park, Y. Notsu, H.S. Ban, Y.P. Kim, K. Ishihara, N. Hirasawa, S.H. Jung, Y.S. Lee, S.S. Lim, E.H. Park, H.K. Shin, T. Seyama, J. Hong, K. Ohuchi: *Effects of hyperin, isoquercitrin and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitrate production in rat peritoneal macrophages*, Phytotherapy Research, vol. 22(11), 2008, s. 1552–1556.
- [11] Z. Kiasalari, T. Baluchnejadmojarad, M. Roghani: *Hypericum Perforatum Hydroalcoholic Extract Mitigates Motor Dysfunction and its Neuroprotective in Intrastratial 6-Hydroxydopamine Rat Model of Parkinson's Disease*, Cellular and Molecular Neurobiology, vol. 36(4), 2016 s. 521–530.
- [12] B. Ehrenberg, J.F. Anderson, C.S. Foote: *Kinetics and yield of singlet oxygen photosensitized by hypericin in organic and biological media*, Photochemistry and Photobiology, vol. 68(2), 1998, s. 135–140.
- [13] Y. Xu, D. Wang, Z. Zhuang, K. Jin, L. Zheng, Q. Yang, K. Guo: *Hypericin-mediated photodynamic therapy induces apoptosis in K562 human leukemia cells through JNK pathway modulation*, Molecular Medicine Reports. vol. 12(5), 2015, s. 6475–6482.
- [14] B. Chen, P.A. de Witte: *Photodynamic therapy efficacy and tissue distribution of hypericin in a mouse P388 lymphoma tumor model*, Cancer Letters, vol. 150(1), 2000, s. 111–117.
- [15] N. Nakajima, N. Kawashima: *A basic study on hypericin-PDT in vitro*, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, vol. 9(3), 2012, s. 196–203.
- [16] P.R. Greipp, J. San Miguel, B.G. Durie, J.J. Crowley, B. Barlogie, J. Bladé, M. Boccadoro, J.A. Child, H. Avet-Loiseau, R.A. Kyle, J.J. Lahuerta, H. Ludwig, G. Morgan, R. Powles, K. Shimizu, C. Shustik, P. Sonneveld, P. Tosi, I. Turesson, J. Westin: *International staging system for multiple myeloma*, Journal Clinical Oncology, vol. 23(15), 2005, s. 3412–3420.
- [17] F. Sieber: *Phototherapy, photochemotherapy and bone marrow transplantation*, Journal of Hematotherapy, vol. 2(1), 1993, s. 43–62.
- [18] N. Brasseur, I. Menard, A. Forget, R. Jastimi, R. Hamel, N. Molino, J.E. van Lier: *Eradication of Multiple Myeloma and Breast Cancer Cells by TH9402-mediated Photodynamic Therapy: Implication for Clinical Ex Vivo Purging of Autologous Stem Cell Transplants*, Photochemistry and Photobiology, vol. 72(6), 2000, s. 780–787.
- [19] J. Zhang, L. Shao, C. Wu, H. Lu, R. Xu: *Hypericin-mediated photodynamic therapy induces apoptosis of myeloma SP2/O cells dependent on caspase activity in vitro*, Cancer Cell International, vol. 15, 2014, s. 58–66.
- [20] J. Yi, X. Jang, L. Zheng, G. Jang, L. Sun, Y. Bao, Y. Wu, Y. Huang, C. Yu, S.N. Yang, Y. Li: *Photoactivation of hypericin*

- decreases the viability of RINn5F insulinoma cells through reduction in JNK/ERK phosphorylation and elevation of caspase-9/caspase-3 cleavage and Bax-to-Bcl-2 ratio*, Bioscience Reports, vol. 35(3), 2015.
- [21] W.W. De Herder, E. von Schaik, D. Kwekkeboom, R.A. Feelders: *New therapeutic options for metastatic malignant insulinomas*, Clinical Endocrinology (Oxf), vol. 75(3), 2011, s. 277–284.
- [22] C.D. Liu, D. Kwan, R.E. Saxton, D.W. McFadden: *Hypericin and photodynamic therapy decreases human pancreatic cancer in vitro and in vivo*, Journal of Surgical Research, vol. 93(1), 2000, s. 137–143.
- [23] B. Kleemann, B. Loos, T.J. Scriba, D. Lang, L.M. Davids: *St John's Wort (Hypericum perforatum L.) photomedicine: hypericin-photodynamic therapy induces metastatic melanoma cell death*, PLoS One, vol. 9(7), 2014, e103762.
- [24] B Halliwell, J Gutteridge (red.): *Free Radicals in biology and medicine*, Oxford University Press, 1999.
- [25] B Kalyanaram: *Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants, and disease mechanisms*, Redox Biology, vol. 1, 2013, s. 244–257.
- [26] A. Slominski, D.J. Tobin, S. Shibahara, J. Wortsman: *Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation*, Physiological Review, vol. 84, 2004, s. 1155–1228.
- [27] J.M. Wood, K. Jimbow, R.E. Boissy, A. Slominski, P.M. Plonka, J. Slawinski, J. Wortsman, J. Tosk: *What's the use of generating melanin?*, Experimental Dermatology, vol. 8, 1999, s. 153–164.
- [28] K.V. Sharma, L.M. Davids: *Depigmentation in melanomas increases the efficacy of hypericin-mediated photodynamic-induced cell death*, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, vol. 9(2), 2012, s. 156–163.
- [29] L.M. Davids, B. Kleemann, S. Cooper, S.H. Kidson: *Melanomas display increased cytoprotection to hypericin-mediated cytotoxicity through the induction of autophagy*, Cell Biology International, vol. 33(10), 2009, s. 1065–1072.
- [30] P.S. Chan, H.K. Koon, Z.G. Wu, R.N. Wong, M.L. Lung, C.K. Chang, N.K. Mak: *Role of p38 MAPKs in hypericin photodynamic therapy – induced apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells*, Photochemistry and Photobiology, vol. 85(5), 2009, s. 1207–1217.
- [31] X. Wang, Y. Guo, S. Yang, C. Wang, Y. Mao, J. Zhang, Y. Li: *Cellular and molecular mechanisms of photodynamic hypericin therapy for nasopharyngeal carcinoma cells*, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 334 (1), 2010, s. 847–853.
- [32] R. Bhuvaneswari, Y.Y. Gan, K.K. Yee, C.K. Soo, M. Olivio: *Effect of hypericin-mediated photodynamic therapy on the expression of vascular endothelial growth factor in human nasopharyngeal carcinoma*, International Journal of Molecular Medicine, vol. 20(4), 2007, s. 421–428.
- [33] T.J. Dougherty, C.J. Gomer, B.W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, Q. Peng: *Photodynamic Therapy*, Journal of the National Cancer Institute, vol. 90(12), 1998, s. 889–905.
- [34] D.E. Richard, E. Berra, J. Pouyssegur: *Angiogenesis: how a tumor adapts to hypoxia*, Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 226(3), 1999, s. 718–722.
- [35] N.E. Stavropoulos, A. Kim, U.U. Nseyo, I. Tsimaris, T.D. Chung, T.A. Miller, D. Skalkos: *Hypericum perforatum L. extract – novel photosensitizer against human bladder cancer cells*, Journal of Photochemistry and Photobiology B, vol. 84(1), 2006, s. 64–69.
- [36] J.T. Wessels, A.C. Busse, M. Rave-Fränk, S. Zänker, R. Hermann, E. Grabbe, G.A. Müller: *Photosensitizing and radiosensitizing effects of hypericin on human renal carcinoma cells in vitro*, Photochemistry and Photobiology, vol. 84(1), 2008, s. 228–235.
- [37] B. Chen, B. Ahmed, W. Landuyt, Y. Ni, R. Gaspar, T. Roskams, P.A. de Witte: *Potential of photodynamic therapy with hypericin by mitomycin C in the radiation-induced fibrosarcoma-1 mouse tumor model*, Photochemistry and Photobiology vol. 78(3), 2003, s. 278–282.
- [38] G. Seitz, R. Krause, J. Fuchs, H. Heitmann, S. Armeanu, P. Ruck, S.W. Warmann: *In vitro photodynamic therapy in pediatric epithelial liver tumors promoted by hypericin*, Oncology Reports, vol. 20(5), 2008, s. 1277–1282.
- [39] G. Seitz, S.W. Warmann, S. Armeanu, H. Heitmann, P. Ruck, R.M. Hoffman, J. Fuchs, J.T. Wessels: *In vitro photodynamic therapy of childhood rhabdomyosarcoma*, International Journal of Oncology, vol. 30(3), 2007, s. 615–620.
- [40] A. Karioti, A.R. Bilia: *Hypericin as potential leads for new therapeutics*, International Journal of Molecular Science, vol. 11(2), 2010, s. 562–594.
- [41] P. Agostinis, A. Vantighem, W. Merlevede, P.A. de Witte: *Hypericin in cancer treatment: more light on the way*, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology vol. 34 (3), 2002, s. 221–241.
- [42] A. Gross, J.M. McDonnell, S.J. Korsmeyer: *BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis*, Genes & Development, vol. 13(15), 1999, s. 1899–1911.
- [43] S. Shalini, L. Dorstyn, S. Dawar, S. Kumar: *Old, new and emerging functions of caspases*, Cell Death & Differentiation, vol. 22(4), 2015, s. 526–539.
- [44] A.S. Dhillon, S. Hagan, O. Rath, W. Kolch: *MAP kinase signalling pathways in cancer*, Oncogene, vol. 26(22), 2007, s. 3279–3290.
- [45] T. Scholzen, J. Gerdes: *The Ki-67 protein: from the known to the unknown*, Journal of Cellular Physiology, vol. 182(3), 2000, s. 311–322.
- [46] A.M. Lima, C.D. Pizzol, F.B. Monteiro, T.B. Creczynski-Pasa, G.P. Andrade, A.O. Ribeiro, J.R. Perussi: *Hypericin encapsulated in solid lipid nanoparticles: phototoxicity and photodynamic efficiency*, Journal of Photochemistry and Photobiology B, vol. 125, 2013, s. 146–154.
- [47] H. Falk, W. Schmitzberger: *On the nature of "Soluble" hypericin in Hypericum species*, Monatsh Chemie. vol. 123, 1992, s. 731–739.
- [48] P. Miskovsky: *Hypericin – a new antiviral and antitumor photosensitizer: mechanism of action and interaction with*

biological macromolecules, Current Drug Targets, vol. 3(1), 2002, s. 55–84.

otrzymano / submitted: 21.12.2015
zaakceptowano / accepted: 30.12.2015