

UDK 612.014.3 ; 615.32:582.573.36

ISSN 035-2899, 38(2013) br.1 p.30-34

**INDUKCIJA APOPTOZE JEDAN OD MEHANIZAMA CITOTOKSIČNOSTI
ANTIPROLIFERATIVNOG EFEKTA HIPERICINA****APOPTOSIS INDUCTION AS ONE OF THE MECHANISMS OF CYTOTOXICITY
AND ANTIPROLIFERATIVE ACTION OF HYPERICIN***Tatjana Sokolović (1), Milica Lazović (2), Dušan Đurić (3), Vlada Cekić (4)*(1) PLIVA TEVA, BEOGRAD, (2) INSTITUT ZE REHABILITACIJU BEOGRAD, (4) INTEGRISANE
STUDIJE FARMACIJE, MEDICINSKI FAKULTET U KRAGUJEVCU, (4) HEMOFARM AD, BEOGRAD

Sažetak: Život, rast i razvoj višćelijskog organizma zavisi od njegove sposobnosti da, sa jedne strane, stvara nove ćelije procesom ćelijske proliferacije i uništava stare procesom programirane ćelijske smrti. Rast tkiva, bilo da je ono normalno ili maligno, određen je kvantitativnim odnosom između nivoa ćelijske proliferacije i nivoa ćelijske smrti. Apoptoza je programirana ćelijska smrt koja se odlikuje specifičnim funkcionalnim promenama koje su u korelaciji sa morfološkim promenama u jedru i citoplazmi. Krajnji rezultat tih promena je stvaranje apoptotičnih telašaca, pri čemu je integritet ćelijske membrane očuvan. Očuvanost mitohondrija je još jedno obeležje apoptoze. Mitohondrije ne bubre i ne gube svoju funkciju, tačnije funkcionalno su aktivne u apoptotičnim telašcima. Jednom inicirana programirana smrt ćelije (PCD) uslovljava pokretanje kaskade biohemijskih reakcija, čiji je krajnji rezultat degradacija i fragmentacija genomske DNK. Glavni nosioci u biohemijskim reakcijama su proteaze (kaspaze) i nukleaze. Mnoge studije ukazuju na antiproliferativne efekte aktivnih principa nekih biljaka iz grupe flavonoida, flavona, hiperozida i drugih. Hipericin, fotosenzitivno, liposolubilno diantronsko jedinjenje *Hypericum perforatum* (kantarion) je jedan od aktivnih principa biljaka, čija su antiproliferativna i fotocitotoksična dejstva predmet mnogih *in vitro* i *in vivo* istraživanja. Kompleksan proces antiproliferativnog dejstva hipericina rezultat je indukcije apoptoze, nastale aktivacijom više biohemijskih mehanizama koji uključuju inhibiciju protein kinaze C, smanjenje ekspresije Bcl-2 gena i/ili promenu oksidativnog statusa.

Ključne reči: ćelijska proliferacija, hipericin, apoptoza

Summary: Life, growth and development of a multicellular organism depends on its ability to create new cells through the process of cell proliferation and destroy the old ones through the process of programmed cell death. The growth of tissue, whether it is normal or malignant, is determined by the quantitative relation between the rate of cell proliferation and the rate of cell death. Apoptosis is programmed cell death that is characterized by specific functional changes that are correlated with morphological changes in the nucleus and cytoplasm. The ultimate result of these changes is to create apoptotic bodies with preserved cell membrane integrity. The integrity of mitochondria is another hallmark of apoptosis. Mitochondria do not swell, and do not lose their function, namely they are functionally active in apoptotic small bodies. Once initiated programmed cell death (PCD) causes a cascade of biochemical reactions which eventually results in degradation and fragmentation of genomic DNA. The main carriers in biochemical reactions are proteases (caspases) and nuclease. Numerous studies point to the antiproliferative effects of active ingredients of some plants from the group of flavonoides, flavones, hyperoside and others. Hypericin - photosensitive, liposoluble perihinone derivate of *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) is one of the active ingredients of plants the antiproliferative and fotocytotoxicity effects of which have been subject of numerous *in vitro* and *in vivo* studies. The complexity of antiproliferative effects induced by hypericin is the result of apoptosis induction and includes many biochemical mechanisms such as protein kinase C inhibition, suppression of Bcl-2 expression and/or change of oxidative status.

Key words: cell proliferation, hypericin, apoptosis

UVOD

Ćelijska smrt predstavlja proces koji je suprotan od mitoze, ali ono što im je zajedničko, jeste kompleksnost koja podrazumeva i složenost procesa njihove regulacije. Da li će ćelija ući u proces mitoze ili proliferacije ili u proces programirane

ćelijske smrti, zavisi prvenstveno od prirode signala, tačnije da li će delovati faktori mitoze ili faktori smrti.

Apoptoza je programirana ćelijska smrt koja se odlikuje pored obaveznih funkcionalnih promena i specifičnim morfološkim promenama koje su u

Adresa autora: Tatjana Sokolović, Trgovačka 30/41, Beograd, Srbija;

E-mai: tatjanasokolovic@teva.rs

Rad primljen: 30. 3. 2012. Rad prihvaćen: 1. 4. 2013. Elektronska verzija objavljena: 15. 7. 2013.

www.tmg.org.rs

korelaciji sa prethodnim. Specifične morfološke promene dešavaju se u jedru i citoplazmi kroz proces kondenzacije hromatina kao i povećanje gustine jedra i citoplazme i konačne fragmentacije ćelija u apoptotična telašca, pri čemu je intergitet plazma membrane očuvan, što je jedna od razlika u odnosu na smrt ćelije procesom nekroze. Ono što apoptozu razlikuje od nekroze, jeste očuvanost mitohondrija, koje ne bubre i ne gube svoju funkciju, tačnije funkcionalno su aktivne u apoptotičnim telašcima. Jednom inicirana, programirana smrt ćelije (PCD) uslovljava pokretanje kaskade biohemijskih reakcija čiji je krajnji rezultat degradacija i fragmentacija genomske DNK. Glavni nosioci u biohemijskim reakcijama su proteaze (kaspaze) i nukleaze.

U patologiji savremenog čoveka posebno mesto zauzimaju neoplastična oboljenja kod kojih zbog nemogućnosti kauzalne terapije značajnu primenu ima hemioterapija. Mnoge studije ukazuju na anti-proliferativne efekte aktivnih principa nekih biljaka iz grupe flavonoida, flavona, hiperozida i drugih. Jedan od aktivnih principa biljaka, čija su modulatorna dejstva na ćelijsku proliferaciju predmet značajnog broja u in vitro i in vivo studija je hipericin.

Hipericin

Hypericum perforatum L. (kantaron, bogorodična trava, gospino zelje, St. John's Wort) pripada porodici Hypericaceae. *Hypericum* se odnosi na lekovitost biljke, dok *perforatum* ukazuje na čitav niz svetlih, prozirnih tačaka koje se uočavaju na listovima i predstavljaju žlezde sa etarskim uljem. Za mnoge sistemske efekte kantariona odgovoran je hipericin.

Ekstrakt kantariona se danas koristi kao anti-depresiv, ali i kod psihovegetativnih poremećaja, anksioznosti i uznemirenosti. Dokazano je da hipericin ovo dejstvo ostvaruje inhibicijom enzima monoaminoooksidaze: monoaminoooksidaze A (MAO A) i monoaminoooksidaze B (MAOB), a ispitivanja in vitro na mitohondrijama izolovanim iz mozga pacova pokazala su da je ovo dejstvo posebno izraženo prema MAOB [1]. Kao posledica nagomilavanja biogenih amina u velikom mozgu nastaje povećanje psihomotorne aktivnosti i smanjenje depresivnih misaonih sadržaja, a posle većih doza hipomanija, što je u eksperimentalnim studijama sa hipericinom na životinjama i potvrđeno [2].

Apoptoza – programirana ćelijska smrt

Život i rast ćelija je interakcija kompleksnih procesa koji uključuju ćelisku duplikaciju, ćelisku smrt, tj. procese koji su precizno regulisani. Ćelije

ulaze u ćelijski ciklus i sledstvenu sintezu DNK kao reakciju na eksterne faktore, uključujući faktore rasta i faktore adhezije. Tranzicija ćelije kroz faze ćelijskog ciklusa je regulisana aktivnošću ciklin-zavisnih kinaza (cdk) i njihovih inhibitora (cki). Radovima Kerra i saradnika 1971. i 1972. se po prvi put obelodanjuje postojanje sasvim različitog oblika smrti ćelije, nazvanog „programirana smrt“ ili „samoubistvo ćelije“, koji bi odgovarao fiziološkoj smrti i koji je dobio naziv apoptoza, za razliku od nekroze, koja predstavlja patološku smrt [3].

Apoptoza je proces koji se pokreće uticajima znatno manjeg intenziteta nego kod nekroze, ali dovoljnim da posredstvom indukcije „signala smrti“ sama ćelija pokrene seriju kaskadnih reakcija koje vode njenom uništenju [4]. Pri tome u procesu učestvuje svaka ćelija ponaosob, i to aktivnim procesom, zbog čega je uveden naziv „samoubistvo ćelije“. Izraz apoptoza i programirana ćelijska smrt se često upotrebljavaju kao sinonimi, premda apoptoza podrazumeva i programiranu smrt ćelije, ali i određene morfološke promene, dok svaka programirana smrt ne mora imati obeležje apoptoze [5].

Funkcionalne promene u apoptozi

Svaka ćelija koja je započela apoptozu prolazi kroz tri funkcionalno različite faze: fazu inicijacije, fazu aktivacije (efektorna faza) i fazu degradacije. Pojedini istraživači apoptozi pridodaju i fazu fagocitoze kao poslednju, sve do definitivne degradacije makromolekula i struktura ovako umrle ćelije [6]. Faza inicijacije započinje delovanjem apoptotičkih signala okoline - fizičkih faktora (toplota, radijacija), hemijskih faktora (toksini, neki lekovi) i bioloških faktora (virusi, bakterijski toksini, onkogeni, slobodni radikali, supresori tumora). Informacija se potom prenosi u ćeliju, tako što se serijom enzimskih reakcija, aktivira unutrašnji genetski kodirani program smrti. U inhibitore apoptoze spadaju fiziološki i farmakološki agensi i vitalni geni. Najznačajniji među njima su: faktori rasta, ekstracelularni matriks, CD-40, androgeni i estrogeni, Zn²⁺, promotori tumora i inhibitori cistein-proteaze [7]. S obzirom na to da je farmakološki uticaj moguć u oba smera, tj. u indukciji i inhibiciji apoptoze, trasirane su nove smernice u sintezi lekova [8].

Morfološke promene u apoptozi

Osnovne morfološke promene u toku apoptoze dešavaju se u jedru i citoplazmi. One se odvijaju u tri faze. U prvoj fazi dolazi do kondenzacije hromatina u polumesečasta telašca na periferiji jedra,

dezintegracije jedra i redukcije njegove veličine. Elektronmikrosopski su potvrđene sledeće promene: sakupljanje ukupnog ćeliskog volumena, porast gustine ćelije, zbijanje ćelijskih organela i širenje EPR-a, dok su mitohondrije ostale uglavnom morfološki nepromenjene.

U drugoj fazi dolazi do bubrenja i deobe i jedra i citoplazme i stvaranja mnogih apoptotičkih telašca. Ona mogu biti preuzeta na površini epitela ili fagocitovana od strane susednih ćelija ili makrofaga. U trećoj fazi dolazi do progresivne degeneracije preostalog jedra i citoplazmatskih struktura [5].

Genska kontrola apoptoze

U kontroli apoptoze učestvuju veći broj gena. Najbolje proučeni model je kontrola ovog procesa kod crva (nematodes) *Caenorabditis elegans*, zbog čega su ovi geni nazvani ced-geni [9].

Do sada je poznato ukupno 13 gena, koji kod ovog crva vrše modulaciju programirane smrti (slika). Ostali geni determišu proces fagocitoze i, konačno, degradacije DNK [10]. Potvrđeno je da je ced-3 gen sličan interleukin 1 β konvertujućem enzimu (ICE), koji može izazvati apoptozu u kulturi fibroblasta [11]. Kod sisara su poznate inetrakcije mnogih poznatih faktora sa analognom funkcijom-humani Bcl-2 blokira apoptozu *Caenorabditid elegans*, te predstavlja analog gena ced-9. Inhibiciju apoptoze vrše i drugi proteini iz iste grupe-Bcl-XL i Mcl-1, c-myc i p53 su, pak, antionkogeni koji mogu stimulisati apoptozu [12], ali i uvesti u reparaciju, što govori u prilog jedinstvu procesa proliferacije i destrukcije. Antiapoptično dejstvo imaju i ostali članovi porodice onkogena Bcl-2, Mcl-1, NR-13, Al, Bcl-w, Bax, Bak, s tim da poslednja dva takođe mogu delovati i proapoptotički [12].

Enzimi koji učestvuju u apoptozi

Jednom inicirana programirana smrt ćelije (PCD) uslovljava pokretanje kaskade biohemijskih reakcija, čiji je kranji rezultat ireverzibilna degradacija i fragmentacija genomske DNK. Glavni nosioci u biohemijskim reakcijama su proteaze i nukleaze koje katalizuju reakcije koje imaju kritičnu ulogu za ulazak ćelije u PCD [13].

Biohemijski put u toku ćelijske smrti ostvaruje se kroz dva procesa: spoljašnjeg „extrising“ i unutrašnjeg „intrising“, koji deluju preko receptora smrti ili procesa koji su locirani u mitohondrijama. Apoptoza može biti indukovana smanjenjem prisustva antiapoptotičnih stimulatora, gubitka normalne strukture mitohondrija i oslobađanjem citohroma c ili ligand vezujućih receptora smrti. Na ovaj način dolazi do aktivacije efektnih kaspaza u mitohondrijama [13].

Bez obzira na specifičnost stimulusa apoptoze, ona uvek ima za posledicu aktivaciju kaspaza, koje čine familiju cistein proteaza, a koje u normalnim uslovima u ćeliji postoje u obliku inaktivnih prekursora [13]. Njihovom aktivacijom u apoptozi dolazi do selektivnog cepanja velikog broja target proteina, pri čemu imaju važnu ulogu u inicijaciji efektorne faze u kojoj su glavni medijatori. Do sada je potvrđeno 14 kaspaza kod sisara koje su podeljene u tri grupe [14]. Prvu grupu čine kaspaze odgovorne za produkciju citokina, dok kaspaze druge i treće grupe imaju direktnu ulogu u apoptozi. U celoj familiji izdvajaju se kaspaza 8, 9 i 10 kao inicijalne, a kaspaze 3 i 6 kao efektorne kaspaze. Aktivacijom efektnih kaspaza dolazi do cepanja citozolarnih i jedarnih supstanci, u čemu aktivnu ulogu imaju i enzimi odgovorni za razgradnju DNK [14]

Upravo razgradnja nuklearne DNK u nukleozomalnim jedinicama je jedna od najznačajnijih biohemijskih karakteristika ćelijske smrti apoptozom. Otkriveno je i opisano nekoliko različitih molekula koji mogu da imaju endonukleaznu aktivnost. Nukleaza koje učestvuju u razgradnji DNK su DN-aza I konstitutivno ispoljavaju svoju aktivnost u tkivima koja su sa predispozicijom za apoptozu. DN-aze II, katjon nezavisne, sa optimalnom pH 5 definisane kao kisele DN-aze. Jedinstveno je prihvaćeno mišljenje da kaspaze i kaspaza zavisne nukleaze imaju ključnu ulogu u apoptozi. U svemu tome je interesentna hipoteza o univerzalnoj ulozi nekih proteina u apoptozi koji vrše dvojaku funkciju - inhibiraju proteolizu i štite normalnu strukturu i funkciju ćelije ili, sa druge strane, potpomažu cepanje proteina i hromatina u apoptozi, u uslovima kada se oslobode inhibitora [14].

Hipericin i ćelijska proliferacija

Antiproliferativna svojstva i citotoksičnost hipericina dokazana su na mnogim ćelijskim linijama [15,16].

Vandenbogaerde i saradnici (1997.) dokazali su da je citotoksičnost hipericina na HeLa ćelijama u nanomolarnoj koncentraciji u direktnoj korelaciji sa fotosenzibilizacijom. To je reprezentativni primer fotocitotoksičnosti, a mehanizam kojim hipericin ostvaruje ovo dejstvo je inhibicija protein kinaze C [17].

Novija istraživanja sve više potvrđuju značajno mesto hipericina u apoptozi, čime se otvara mogućnost njegove primene u terapiji nekih tumora [18, 19]. Fox i saradnici ispitivali su antiproliferativnu aktivnost fotoaktivnog hipericina na normalne, transformisane i maligne T-limfocite, kao i mogućnosti njegove primene u terapiji limfoproliferativnih bolesti kože [20]. Dokazano je da je

indukcija apoptoze jedan od mehanizama kojim hipericin inhibira proliferaciju T-ćelija. Potvrđen je dozno zavisni inhibicioni efekat na rast ćelija pituitarnog adenoma, što on ostvaruje inhibicijom protein kinaze C (PKC) [21]. Weller i saradnici (1997.) su potvrdili da hipericin indukuje apoptozu na sedam ćelijskih linija humanog malignog glioma, uz dozno vremensku zavisnost i fotostimulaciju [15]. Međutim, ova indukcija apoptoze isključuje kao uzrok inhibiciju sinteze RNK i proteina, a citotoksičnost hipericina ne dovodi u korelaciju sa inhibicijom protein kinaze C, niti indukuje faktor tumorske nekroze α (TNF α) i CD 95 liganda.

U prilog jasnom učešću enzima odgovornih za razgradnju nukleinskih kiselina u procesu degradacije i sledstvenog usmerenja ćelije u programiranu smrt, ukazuju rezultati istraživanja modulatorni efekti hipericina na aktivnost enzima odgovornih za metabolizam nukleinskih kiselina, DNA-ze i RNA-ze, u in vivo uslovima u dozno-zavisnom dizajnu u uslovima nestimulisanе i stimulisanе proliferacije na modelu 2/3 resekcije jetre [22]. Tačnije, u uslovima nestimulisanе proliferacije zabeležen je porast aktivnosti DNA-ze I i RNA-ze I koji je u dinamičkom odnosu sa količinom DNK i RNK [22]. Aktivnost kisele DNA-ze II prati aktivnost alkalne DNA-ze I pri dozi koja je terapijska za ispitivani preparat čiji je aktivni princip hipericin, dok je smanjena aktivnost ovog enzima u značajno višim dozama od terapijske (10 puta) rezultat pomeranja pH ćelije u pravcu alkalizacije uslovljene uticajem hipericina. U uslovima stimulisanе proliferacije višestruko aktivacija DNA-za I aktivnosti ima signifikantan upliv na količinu novosintetisanе DNK [22]. Značajno manja aktivnost DNA-ze II u uslovima stimulisanе proliferacije u odnosu na kontrolu potvrđuje efekta alkalizacije koja se javlja u uslovima proliferacije tkiva.

Sigurno je da hipericin povećava citotoksičnost velikog broja citostatika, ali to dejstvo je tkivno specifično, tj. ne može se objasniti jedinstvenim mehanizmom. U prilog tome govore i istraživanja Vinay i saradnika (2006.) koja su opravdala korišćenje hipericina kao adjuvatne terapije sa temozolamidom u terapiji glioblastoma [23]. Hipericin svoje dejstvo ostvaruje inhibicijom protein kinaze C. Tumorska regresija na životinjskom modelu na tretmanu temozolamid i hipericin rezultat je dramatične redukcije ekspresije Bcl-2 i u isto vreme značajne indukcije apoptoze. Sva navedena dejstva hipericina potvrđena su u uslovima bez fotostimulacije [23].

Brojna istraživanja govore u prilog primene Hipericin posredovane fotodinamske terapije kao potencijalni tretman malignih ali i nemalignih bolesti

(virusnih, gljivičnih, inflamatornih). Tako su Wang i saradnici potvrdili da hipericin fotodinamska terapija (HY PDT) inhibira rast humanih nazocelularnih kancerskih ćelija CNE-2 i indukuje apoptozu istih. Mehanizam kojim HY PDT deluje na celularnom nivou jeste povećanje broja ćelija u S i G fazi ćelijskog ciklusa, što je u korelaciji sa uticajem na DNK sintezu i replikaciju [24]. Isti autori su potvrdili da HY PDT izaziva smrt CNE-2 ćelija putem kaspaza zavisne apoptoze, i to na nivou mitohondrija (intrinsig signal), ali i kao extrinsig signalni put koji podrazumeva TNF and FAS-ligand zavisni put [24].

Antiproliferativno, tj. citotoksično, dejstvo hipericina potvrđeno je i u uslovima kada on nije fotostimulisan. Ovakav efekat hipericina moguće je objasniti postojanjem slobodnog elektrona koji se ponaša dvojako, kao akceptor ili donator. Otuda i sam hipericin može da ima dvojni oksidativni efekat, da deluje kao prooksidans ili antioksidans. Takođe je potvrđeno da je oksidativni efekat hipericina funkcija njegove koncentracije, tj. aplikovane doze [25].

Metodom hemiluminiscence dokazano je da je hipericin antioksidans, tj. da inhibira stvaranje slobodnih radikala [26] i deluje inhibitory na aktivnost glutathion reduktaze [27]. Johnson i Pardini (1998.) su ukazali na oštećenje mitohondrija kao kritični momenat za ispoljavanje fototoksičnosti hipericina [27]. U prilog ovom stavu govori značajan porast aktivnosti enzima oksidativnog statusa CuZn SOD, Mn SOD i katalaze posle fotoaktivacije hipericina, a koji se oslobađaju iz oštećenih mitohondrija. Inhibicija glutathion reduktaze, tj. izmena glutathion pula koja pomaže citotoksičnost je još jedan mehanizam kojim se mogu objasniti antiproliferativna svojstva hipericina i značaj kiseonika u ispoljavanju njegovih fototoksičnih efekata [27].

ZAKLJUČAK

Hipericin je fotosenzitivno, liposolubilno diantonsko jedinjenje koje se nalazi u kantarijonu (*Hypericum perforatum*), dobro je proučen sa aspekta hemijskih karakteristika, ali su dosta proučavana i njegova farmakološka svojstva i klinička primena. Farmakološka dejstva hipericina uključuju antidepressivno, antivirusno i bakteriocidno dejstvo, odavno su poznata i primenjena u tradicionalnoj narodnoj medicini.

Brojna istraživanja na ćelijskim linijama in vitro potvrdila su i dala značajno mesto hipericina u fotodinamskoj terapiji različitih tumora (HY PDT). Još uvek mehanizam antitumorskog dejstva hipericina nije dovoljno razjašnjen, ali se sigurnošću

može tvrditi da je jedan od mehanizama tumorske regresije indukcija apoptoze. Modulatorni efekat hipericina na ćelijsku proliferaciju rezultat je kompleksnih biohemijskih reakcija i ostvaruje se kroz nekoliko mehanizama koji uključuju inhibiciju protein kinaze C, supresije Bcl-2 ekspresije i dvoji oksidativni status koji omogućava njegovo dejstvo kao antioksidans ili prooksidans.

LITERATURA

- Okpanyi SN, Weischer ML. Experimental animal studies of the psychotropic activity of a hypericin extract. *Arzneimittelforschung* 1987; 37(1):10-13.
- Suzuki V, Katsumata Y, Oya M, Bladt S, Wagner H. Inhibition of monoamine oxidase by hypericin. *Planta Med* 1984; 50(3):272-274.
- McGovan J, Strain A, Buchler N. DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes in a defined medium: Effect of epidermal growth factor, insulin, glucagon and cyclic- AMP. *J Cell Physiol* 1981; 108(3):353-363.
- Baskić D, Acimović Lj, Djurdjević P, Djukić A, Arsenijević N. Apoptosis, the programmed cell death. *Medicus* 2002; 3(2):22-25.
- Djuričić B, Bumbasirević V. Programmed cell death. *Jugoslav Phisol Pharmacol Acta* 1994; 30:169-187.
- Hetts S. To die or not to die. *Jama* 1998; 279:300-7.
- Thomson BC. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of diseases. *Science* 1995; 267:1456-1462.
- Revvilard JP, Adorini L, Goldman M, Kabelitz D, Waldmann H. Apoptosis: Potential for diseases therapies. *Immunology Today* 1998; 19(7):291-293.
- Williams GT, Smith CA. Molecular regulation of apoptosis: Genetic controls of cell death. *Cell* 1992; 74:777-779.
- Driscoll M, Chalfie M. Developmental and abnormal cell death in *C. Elegans*. *Trends Neurosci* 1992; 15:15-19.
- Vaux DL. Ced-4 the third horseman of apoptosis. *Cell* 1997; 90(3):389-390.
- Rabizadeh S, LaCount DJ, Frensen PD, Bredsen DE. Expression of the baculovirus P53 gene inhibits mammalian neural cell death. *J Neurochem* 1993; 61:2318-2321.
- Mitchell A. Apoptosis: Death trial. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2002; 3:81.
- Kocić G, Pavlović D, Đorđević V, Bjelaković G, Stojanović I. Role of nitric oxide and peroxynitrite in apoptosis-reaction to endonuclease activity. *Jugoslovenska Medicinska Biohemija* 2003; 22(2):93-100.
- Weller M, Trepel M, Grimmel C, Schabet M, Bremen D, Krajewski S et al. Hypericin induced apoptosis of human malignant glioma cells is light-dependent, independent of cI-2 expression and does not require wild-type p53. *Neurol Res* 1997; 19(5):459-470.
- Ugwu F, Vandenberghe AL, Merlevede WJ, de Witte PA. A comparative study on photocytotoxicity of hypericin on A431 cells using three different assays. *Anticancer Res* 1998; 18(2A):1181-1184.
- Vandenberghe AL, Cuveele JF, Proot P, Himpens BE, Merlevede WJ, de Witte PA. Different cytotoxic effects induced after photosensitization by hypericin. *J Photochem Photobiol B* 1997; 38(2-3):136-142.
- Weiss RF. *Lenbuch der Phytotherapie*. Stuttgart; 1985.
- Chen B, Xu Y, Roskams T, Delaey E, Agostinis P, Vandenberghe JR et al. Efficacy of antitumoral photodynamic therapy with hypericin: relationship between biodistribution and photodynamic effect in the RIF-1 mouse tumor model. *Int J Cancer* 2001; 93(2):275-282.
- Fox F, Niu Z, Tobia A, Rook A. Photoactivated hypericin is an antiproliferative agent that induces a high rate of apoptotic death of normal, transformed and malignant T lymphocytes: implications for the treatment of cutaneous lymphoproliferative and inflammatory disorders. *J Invest Dermatol* 1998; 111(2):327-332.
- Hamilton HB, Hinton DR, Law RE, Gopalakrishna R, Su YZ, Chen ZH et al. Inhibition of cellular growth and induction of apoptosis in pituitary adenoma cell lines by the protein kinase C inhibitor hypericin: potential therapeutic application. *J Neurosurg* 1996; 85(2):329-334.
- Sokolović T. Modulatorni efekti Biosenzal-a na ćelijsku proliferaciju i imunu funkciju. *Medical Faculty University of Nis*; 2003.
- Gupta V, Yuzhuang S, Wang V, Kardosh A, Liebes L, Hofman F et al. Enhancement of Glioblastoma Cell Killing by Combination Treatment with Temozolamide and Tamoxifen or Hypericin. *Neurosurg Focus* 2006; 20(4):E20.
- Xiaoli Wang et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Photodynamic Hypericin Therapy for Nasopharyngeal Carcinoma Cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2010; 334:847-853.
- Blank M, Mandel M, Hazen S, Keisari Y, Lavie G. Anti-cancer activities of hypericin in the dark. *Photochem Photobiol* 2001; 74(2):120-125.
- Hunt EJ, Lester CE, Lester EA, Tackett RL. Effect of St John's Wort on free radical production. *Life Sci* 2001; 69(2):181-190.
- Johnson SA, Pardini RS. Antioxidant enzyme response to hypericin in EMT6 mouse mammary carcinoma cells. *Free Radic Biol med* 1998; 24(5):817-826.