

## APOPTÓZA – PROGRAMOVANÁ BUNKOVÁ SMRŤ A RASTLINNÉ METABOLITY

MÁRIA FICKOVÁ<sup>a</sup> a MILAN NAGY<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ústav experimentálnej endokrinológie SAV, Vlárská 3, 833 06 Bratislava, <sup>b</sup>Katedra farmakognózie a botaniky, Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava  
ueenfick@savba.sk, nagy@fpharm.uniba.sk

Došlo 24.11.04, prepracované 17.7.06, prijaté 31.8.06.

Kľúčové slová: apoptóza, receptory smrti, kaspázy, rastlinné metabolity

### Obsah

1. Úvod
2. Mechanizmus apoptózy
3. Rastlinné metabolity a apoptóza
4. Záver

### 1. Úvod

*Definícia:* Apoptóza, nazývaná tiež „programovaná bunková smrť“, je fyziologické odumretie bunky, ktoré odstraňuje nepotrebné alebo poškodené bunky. Tento ná-

zov sa objavil v šesťdesiatych rokoch minulého storočia a je starším synonymom pre apoptózu.

*Fyziologická bunková smrť* má dôležitý význam pri regulácii normálnych procesov vývoja a pri regulácii imunitného systému, je normálnou zložkou vývoja a zdravia viacbunkových organizmov. V dospelom organizme je počet buniek v orgánoch a tkanivách v určitom rozsahu konštantný, udržuje sa odumieraním a delením, diferenciáciou buniek. V ľudskom organizme umrie denne približne  $1 \cdot 10^9$  buniek. Homeostáza organizmu je preto výsledkom rovnováhy medzi rýchlosťou mitózy (bunková proliferácia) a bunkovou smrťou. Signál pre uskutočnenie apoptózy vychádza buďto zo samotnej bunky, z okolitých buniek, alebo imunitného systému. Apoptóza je súčasťou programovaného zániku buniek aj v priebehu embryogenézy, pri formovaní orgánov počas morfogénzy, involúcie závislej na hormónoch u dospelých jedincov (napr. deštrukcia sliznice endometria počas menštruačného cyklu, atrezia ovariálnych folikulov v menopauze). Konštantná obnova krvných a kožných buniek je tiež kompenzáciou za apoptózou odumreté bunky.

*Nefyziologická apoptóza* charakterizuje poškodenú apoptickú schopnosť buniek (supresia, overexpresia alebo mutácia génov podmieňujúcich apoptózu), alebo keď je blokovaná iniciácia apoptózy. Ochorenia z dôvodu nesprávnej regulácie apoptózy možno rozdeliť do dvoch skupín: 1) ochorenia spôsobené zvýšeným prežívaním buniek (inhibícia apoptózy) ako sú rakovina, restenóza, autoimúnne ochorenia a vírusové infekcie (AIDS, lupus erythematosus); 2) ochorenia na podklade zvýšenej bunkovej smrti (veľmi aktívna apoptóza), ktoré sú spojené s ireverzibilnou stratou buniek (mozgová príhoda, infarkt myo-

Tabuľka I  
Apoptóza vs. nekróza

Apoptóza	Nekróza
<i>Morfologické znaky</i>	
pľuzgierovitá vonkajšia membrána	strata membránovej integrity
agregácia chromatinu	
scvrknutie cytoplazmy a kondenzácia jadra	nabobtnanie cytoplazmy a mitochondrií
fragmentácia buniek	úplná lýza buniek
<i>Biochemické znaky</i>	
aktívny proces, potreba ATP	pasívny proces, bez potreby ATP
fragmentácia DNA	sporadické natrávenie DNA
uvoľnenie rôznych faktorov z mitochondrií do cytoplazmy	
aktivácia kaspázovej kaskády	
<i>Fyziologický význam</i>	
jednotlivé bunky	skupina buniek
indukcia fyziologickými stimulmi	nefyziologické podnety
fagocytóza okolitými bunkami alebo makrofágmi	fagocytóza makrofágmi
bez zápalovej odpovede	zápal

kardu, muskulárne atrofie, neurodegeneratívne ochorenia ako Alzheimerova a Parkinsonova choroba).

### Charakteristické znaky apoptózy

Klasická apoptóza sa zvyčajne uskutočňuje v jednotlivých bunkách, bez postihnutia susedných buniek. Apoptickú bunku charakterizuje zaguľatený tvar, strata asymetrie fosfolipidov v membráne, zmenšený objem (úbytok vody a elektrolytov), scvrknutie bunky, nabobtnanie endoplazmatického retikula a membrány, porušenie bunkovej matrix a zmeny v cytoskelete. Jedným z hlavných znakov apoptózy je zmenšenie objemu jadra, kondenzácia chromatinu, vyplavenie chromozómovej DNA a proteínov jadra do cytoplazmy. Bunka je fragmentovaná na kompaktné, membránou uzatvorené vezikuly, označované ako apoptotické telieska, ktoré sú eliminované fagocytózou makrofágmi alebo susediacimi bunkami bez paralelného poškodenia susedných buniek a okolitých tkanív. Tento geneticky podmienený proces je závislý od koncentrácie adenozin-5'-trifosfátu (ATP). Vyššie charakteristiky odlišujú apoptózu od inej formy bunkovej smrti – nekrózy (tab. I).

Apoptóza a nekróza sa dlho považovali za dva rôzne mechanizmy bunkovej smrti s rôznymi morfológickými, biochemickými a funkčnými znakmi. V súčasnosti sa predpokladá, že rozhodujúcim faktorom, ktorý determinuje konkrétnu formu bunkovej smrti je intracelulárna koncentrácia ATP (cit.<sup>1</sup>) a intenzita stimulu/poškodenia. V prípade menšieho poškodenia buniek uskutoční sa bunková smrť apoptickým mechanizmom, v prípade intenzívneho poškodenia a čiastočného vyčerpania bunkových zásob ATP sa uskutoční iba časť apoptického programu, ktorý je ukončený nekrozou. Takýto proces uskutočnenia bunkovej smrti bol nazvaný „aponekróza“. Názov vyjadruje bunkovú smrť charakterizovanú dynamickými, molekulovými a morfológickými znakmi pre apoptózu aj nekrozou<sup>2</sup>.

## 2. Mechanizmus apoptózy

Proces apoptózy tvoria dve rozdielne fázy: 1) iniciačná fáza (indukcia), v ktorej bunky dostanú signál o uskutočnení bunkovej smrti a 2) exekučná fáza, charakterizovaná biochemickými a morfológickými znakmi.

### Indukcia apoptózy

Zahájenie apoptózy iniciujú signály bunkovej smrti. Tieto môžu mať intracelulárny alebo extracelulárny pôvod. Vnútroými induktormi apoptózy sú toxické látky, bunkový stres, nedostatok živín, poškodenie DNA (radiácia), vedľajšie produkty bunkového metabolizmu. Vonkajšími signálnymi podnetmi apoptózy sú exogénny oxidačný stres (mierna ischémia), exitačné toxíny (glutamát, prísun iónov), trofické faktory (znížená obsadenosť receptorov), cytokíny TNF- $\alpha$  (tumor nekrotický faktor - $\alpha$ ) a FASL

(ligand pre Fas receptor), kortikosteroidy (lymfatický systém), vírusové infekcie, niektoré chemické a farmakologické látky. Citlivosť buniek na ktorýkoľvek podnet sa mení v závislosti od mnohých faktorov ako napr.: závažnosť stimulov, stav bunkového cyklu, expresia pro- a anti-apoptických proteínov, pričom nie všetky bunky odpovedajú apoptózou na rovnaký stimul.

### Extracelulárna (receptorová) aktivácia apoptózy

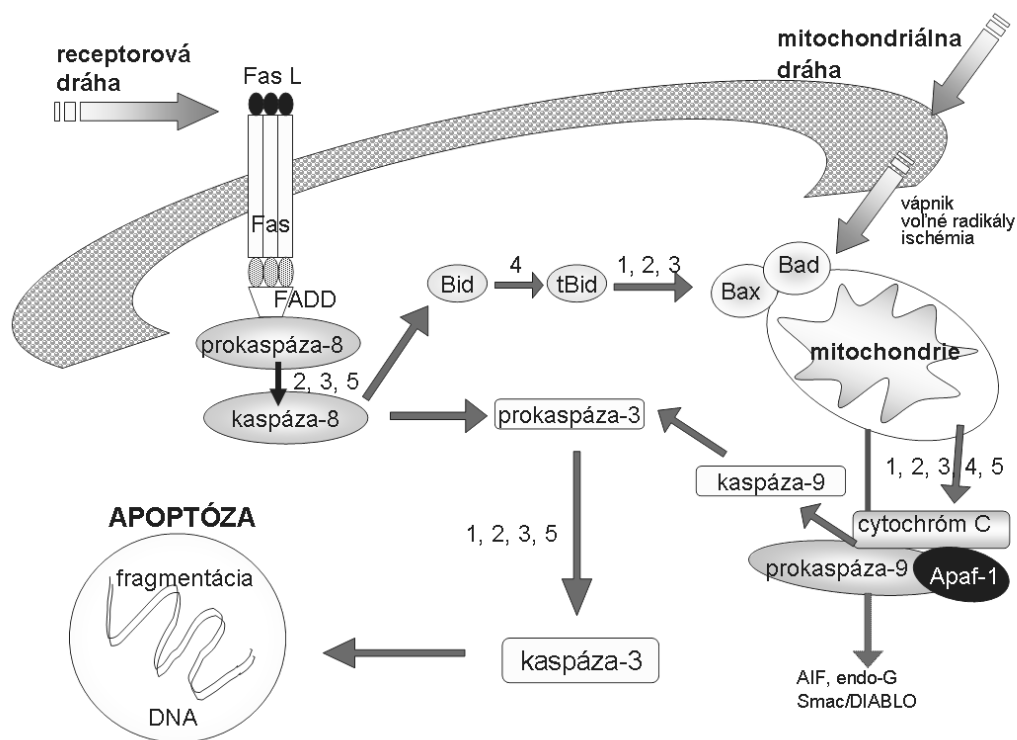
#### Receptory smrti

Extracelulárne apoptické signály sú prenášané do bunky cez transmembránové proteíny receptorov. Hlavným mimobunkovým aktivátorom apoptózy je cytokín produkovaný aktivovanými makrogámi, TNF (tumor nekrotický faktor). TNF je špecifickým ligandom pre receptory TNFR-1 a TNFR-2. Ďalším apoptickým ligandom je transmembránový proteín FasL, ktorý sa viaže na príslušný Fas-receptor (označovaný tiež ako Apo-1 alebo CD95), ktorý tiež patrí do superrodiny TNF receptorov. Do tejto skupiny sa zaraďujú aj receptory DR4 a DR5, ktoré sú väzobné proteíny pre TRAIL ligand (apoptózu indukujúci ligand súvisiaci s TNF). V súčasnosti je známych viac ako 30 rozdielnych členov veľkorodiny TNF receptorov<sup>3</sup>, ktoré sa delia na dva typy: typ I s obsahom intracelulárnej domény smrti (DD) v cytoplazme a typ II bez DD. Pre zahájenie apoptózy 1 bunky je potrebná väzba troch ligandov, ktoré indukujú trimerizáciu receptorovej molekuly. Zhluknutie receptorových DD iniciuje väzbu medzi DD iných signalizačných proteínov, tzv. adaptorných molekúl, ktoré s prokaspázou-8 vytvoria DISC komplex (death-inducing signalling complex). Vo vnútri tohto komplexu nastáva autoproteolytická aktivácia kaspázy-8. V bunkách typu I kaspáza-8 aktivuje ďalšie efektorové kaspázy, apoptická dráha sa uskutoční bez účasti mitochondrií. V bunkách typu II je k dispozícii malé množstvo kaspázy-8, preto sa aktivačná kaskáda uskutočňuje alternatívnou cestou cez mitochondrie<sup>4</sup>. Kaspáza-8 štípe Bid proteín za vzniku rozštiepeného tBid, ktorý po translokácii do mitochondrií a interakciou s Bak a Bax proteínmi (proapoptické proteíny Bcl-2 superrodiny) iniciuje uvoľnenie proapoptických molekúl cytochrómu C, AIF (apoptózu indukujúceho faktora), endonukleázy G, alebo Smac/DIABLO (cit.<sup>5</sup>, obr. 1).

### Intracelulárna (mitochondriálna) aktivácia apoptózy

#### Mitochondrie

Vnútroková cesta aktivácie apoptózy predstavuje odpoveď bunky na stimuly pochádzajúce zo samotnej bunky (aktivácia onkogénov, poškodenie DNA, uvoľnenie stresom indukovaných molekúl), ale aj na pôsobenie extracelulárnych apoptogénnych molekúl, napr. výšená koncentrácia vápnika, glutamátu, prítomnosť voľných radikálov, ale aj ischémia<sup>6</sup>. Kľúčovými regulátormi intracelulárneho mechanizmu apoptózy sú kanálové proteíny Bcl-2 veľko-



Obr. 1. Schéma receptorovej/mitochondriálnej dráhy apoptózy; aktivácia Fas receptora pôsobením FasL indukuje zapojenie adaptorevej molekuly FADD, ktorý priamo viaže prokaspázu-8. Aktivovaná iniciálna kaspáza-8 aktivuje exekučnú prokaspázu-3 na aktívnu kaspázu-3, ktorá priamo štiepi štrukturálne cytoskeletárne proteíny a inaktivuje enzýmy jadra. Aktivovaná kaspáza-8 štiepi Bid proteín na aktívny tBid, ktorý prostredníctvom proapoptických proteínov (Bax, Bad) uvoľňuje apoptogénny cytochróm C, ktorý s Apaf-1 a prokaspázou-9 vytvoria apoptozóm. V tejto štruktúre nastane autoaktivácia kaspázy-9, ktorá v ďalšom kroku aktivuje premenu prokaspázy-3 na účinnú kaspázu-3. Exekučná kaspáza-3 štiepi štrukturálne proteíny v cytoplazme a ovplyvňuje aktivity enzýmov jadra. Výsledkom procesu je fragmentácia DNA. Pro-apoptické pôsobenie niektorých rastlinných metabolitov na rôznych úrovniach apoptického mechanizmu je vyznačené číselne pre flavonoidy (1), terpenoidy (2), alkaloidy (3), fenolické látky (4) a sulfidické látky (5)

rodiny, ktoré kontrolujú a ovplyvňujú permeabilitu vonkajšej mitochondriálnej membrány. V súčasnosti je u ľudí známych 16 homológov Bcl-2 proteínov. Podľa účinku sa označujú ako antiapoptické proteíny (napr. Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1), ktoré sú prítomné na vonkajšej strane mitochondriálnej membrány a inhibujú uvoľnenie cytochrómu C. Proapoptické proteíny (napr., Bax, Bak, Bok, Bad, Bim, Bid a Noxa) prítomné v cytoplazme sú apoptickým stimulom premiestnené do mitochondrií, kde indukciou tvorby pórov v membráne iniciujú uvoľnenie cytochrómu C a pôsobia ako promotory apoptózy.

Uvoľnený cytochróm C väzbou s Apaf-1 proteínom (aktivačný faktor-1 apoptickej proteázy) indukuje konformačnú zmenu, ktorá umožní väzbu Apaf-1 na ATP/dATP s prokaspázou-9 za vzniku apoptozómu<sup>7</sup>. V tejto multiproteínovej štruktúre nastane autoproteolytická aktivácia kaspázy, ktorá v ďalšom kroku aktivuje efektorové kaspázy-3, -6 a -7. Výsledkom procesu je zahájenie kaspázovej kaskády.

Pôsobením apoptického stimulu dochádza k uvoľneniu niekoľkých proteínov z medzimembránového mito-

chondriálneho priestoru do cytoplazmy. Sú to predovšetkým cytochróm C, SMAC (second mitochondria-derived activator of caspases)/DIABLO (direct inhibitor of apoptosis (IAP)-binding protein), AIF (apoptosis-inducing factor), EndoG (endonukleáza G) a HTRA2/OMI (high-temperature-requirement protein A2). Z týchto proapoptických proteínov je pravdepodobne najvýznamnejší cytochróm C. Permeabilizácia vonkajšej mitochondriálnej membrány a uvoľnenie cytochrómu C prerušuje transport elektrónov, čo následne vyvoláva stratu mitochondriálneho transmembránového potenciálu, pokles hladiny ATP a odpriahnutie oxidatívnej fosforylácie<sup>8</sup>.

#### Kaspázy a ich úloha v apoptóze

Apoptóza iniciovaná extracelulárnymi alebo intracelulárnymi podnetmi má spoločnú exekučnú fázu – aktiváciu centrálnych efektorov apoptózy, ktorými sú kaspázy. Sú to cystenyl-aspartát proteázy (cytosolic aspartate-specific cysteine proteases), ktoré štiepia intracelulárne

substráty, štrukturálne a regulačné proteíny na špecifickom mieste zvyšku kyseliny asparágovej. Kaskády špecifických kaspáz sa nakoniec spájajú do spoločnej dráhy, ktorej výsledkom sú morfológické a biochemické zmeny charakterizujúce apoptickú bunku.

Kaspázy sa nachádzajú v bunke v neaktívnej forme. Aktivácia týchto inaktívnych proenzýmov nastáva: a) väzbou na APAF-1 (viď vyššie), alebo b) proteolytickým štiepením inou aktívnou kaspázou (vrátane autoaktivácie). Známych je 14 členov kaspázovej rodiny, ktoré sú podľa štruktúry a funkcie rozdelené do dvoch kategórií: iniciačné kaspázy, (kaspáza-2, -8, -9 a -10) regulujú apoptózu a aktivujú efektorové kaspázy, nazývané tiež exekučné kaspázy (kaspáza-3, -6 a -7) (cit.<sup>9</sup>).

Inhibítormi kaspáz sú antiapoptické proteíny (IAP), ktoré pôsobia ako negatívne regulátory apoptózy. Známych je osem IAP, z ktorých je najviac preštudovaný survivin. Mechanizmus pôsobenia predstavuje vytvorenie komplexu survivínu so Smac/DIABLO proteínom, v dôsledku čoho nedochádza k priamej interakcii s efektorovou kaspázou-3 (cit.<sup>10</sup>).

Receptorová a mitochondriálna dráha apoptózy sa spájajú na úrovni aktivácie kaspázy-3. Jej účinkom nastáva aktivácia ďalších proteolytických enzýmov spôsobujúcich rozklad štruktúrnych zložiek cytoplazmy (aktín, gelsolin, aktomyozín) a jadra (lamin), štiepenie genetického materiálu (fragmentácia DNA) a zabránenie opravy DNA. Výsledkom procesu je nezvratná smrť bunky.

#### Apoptické zmeny na úrovni jadra

Aktívne kaspázy degradujú DNA v jadre apoptických buniek nasledovne:

- Inaktivácia enzýmov DNA opravy: Enzým poly (ADP-ribózo) polymeráza (PARP) sa zúčastňuje opravy poškodenej DNA; je substrátom pre kaspázu-3. Rozštiepený PARP nemôže pôsobiť pri oprave poškodenej DNA.
- Inaktivácia enzýmov bunkovej replikácie: Kaspázy inaktivujú DNA topoizomerázu II (jadrový enzým dôležitý pre replikáciu a opravu DNA), čo vedie k poškodeniu DNA.
- Štiepenie štruktúrnych jadrových proteínov: Lamíny, intranukleárne proteíny jadra, sprostredkujú interakcie medzi chromatinom a jadrovou membránou. Degradácia lamínov kaspázou-6 spôsobí kondenzáciu chromatinu a fragmentáciu jadra<sup>11</sup>.
- Fragmentácia DNA: Fragmentáciu DNA na nukleozomálne jednotky spôsobuje enzým CAD (caspase activated DNase)<sup>12</sup>. CAD existuje ako inaktívny komplex s ICAD (inhibitor CAD, známy pod označením DNA fragmentačný faktor 45). V priebehu apoptózy je ICAD rozštiepený kaspázami a uvoľní sa CAD. Keďže CAD je DNáza, nastáva rýchla fragmentácia nukleárnej DNA a zánik bunky.

### 3. Rastlinné metabolity a apoptóza

Napriek tomu, že v nádorových bunkách neprebíha kontrolovaná apoptóza, niektoré formy liečby onkologických ochorení indukujú klasickú apoptózu cestou aktivácie mitochondriálnej dráhy. Perspektíva nových foriem liečby rakoviny predstavuje smerovanie na novoobjavené, na kaspázach nezávislé mechanizmy bunkovej smrti. Predpokladá sa účasť apoptózy pri neurodegeneratívnych, kardiovaskulárnych ochoreniach, AIDS, anémii, atď. Tu všade môžu v terapii zohrať významnú úlohu najmä selektívne pôsobiace inhibítory jednotlivých zložiek apoptických procesov. Okrem testovania syntetických molekúl je značná pozornosť venovaná prírodným látkam, najmä rastlinným metabolitom so širokou paletou štruktúrnych typov. Nasledujúce príklady sú preto len obmedzeným výberom charakteristických zástupcov.

#### Flavonoidy

Vo väčšine prípadov bol potvrdený cytotoxický účinok flavonoidov na rakovinové línie indukciou apoptózy. Zistila sa aktivácia kaspázy-3 a štiepenie PARP (cit.<sup>13–15</sup>), zriedkavejšie je pozorovaná aktivácia kaspázy-7 a -9 (cit.<sup>16</sup>) alebo Fas/Fas (cit.<sup>17</sup>), uvoľnenie mitochondriálneho cytochrómu C do cytozolu<sup>18</sup> alebo Bax (cit.<sup>17</sup>). Relatívnu nezávislosť bunkových signálnych procesov pri apoptóze názorne dokumentuje pokles hladiny Mcl-1 pri nezmenených koncentráciách Bax, Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, a Bak (cit.<sup>19</sup>).

#### Terpenoidy

Ginsenosidy tvoria podstatnú účinnú zložku fytofarmák s extraktom G-115 z koreňa žeň-šeňa (*Panax ginseng*). Štúdie potvrdili ich účinok na apoptózu<sup>20</sup>. Hlavný metabolit ginsenosidov R<sub>b1</sub>, R<sub>b2</sub>, a R<sub>c</sub> rozhodujúcou mierou ovplyvňuje viaceré etapy apoptózy buniek hepatoblastómu HepG2: aktiváciu kaspázy-3, -8 a -9, ako aj štiepenie cytozolových faktorov Brd a Bax. Zapojenie Fax/Faul systému nie je nutné.

Zodpovednosť za antihypoxický účinok extraktu EGb 761 z listov ginkga (*Ginkgo biloba*) sa prisudzuje frakcii obsahujúcej terpenové laktóny (ginkgolidy A, B, C, J a bilobalid). Ich rozdielne antiapoptické pôsobenie bolo sledované v modeloch fokálnej cerebrálnej ischémie<sup>21</sup>. V primárnych kultúrach neurónov hippocampu a astrocytov novorodených potkanov ginkgolid B (1 μM) a bilobalid (10 μM) chránia neuróny pred poškodením vyvolaným glutamátom (1 mM). Ginkgolid B (10 μM), ginkgolid J (100 μM) a bilobalid (1 nM) znižovali poškodenie spôsobené staurosporínom (200 nM) v kultúre neurónov kuračích embryí. Ginkgolid B (100 nM) a bilobalid (100 nM) v kultúre neurónov hippocampu potkana inhibujú apoptózu vyvolanú staurosporínom (300 nM). Ginkgolid A tieto ochranné účinky nevykazoval.

Karotenoidom ovocia a zeleniny sa prisudzujú antioxidačné a chemoprotektívne účinky. V modeli HL-60 promyelocytických leukemických buniek sa dokázalo, že induktorom apoptózy nie je lykopén, ale jeho produkt metabolickej oxidácie, ktorý zvyšuje aktivitu kaspázy-8 a -9, expresiu Bcl-2 a Bcl-x<sub>L</sub>, ale neovplyvňuje hladinu Bax (cit.<sup>22</sup>).

Aj ďalšie štúdie potvrdzujú, že mnohé terpenoidy (saponinové glykozidy sóje<sup>23</sup>, α- a β-kyseliny chmeľu<sup>24</sup>, niektoré silice alebo ich zložky<sup>25–27</sup>) modifikujú aktivitu kaspáz, uvoľňujú cytochróm C do cytozolu, štiepia PARP alebo znižujú hladinu Bcl-2.

#### Alkaloidy

Fytofarmaká obsahujúce extrakt Kawa-Kawa (z podzemku *Piper methysticum*) môžu pri nesprávnej výrobnej technológii obsahovať hepatotoxický alkaloid pipermethystín. Pôsobenie 100 mM pipermethystínu spôsobilo 90% zníženie viability buniek hepatómu HepG2 už po 24h. Alkaloidom indukovaná apoptóza bola spojená s aktiváciou kaspázy-3 (cit.<sup>28</sup>). Galantamín je účinnou látkou registrovaného lieku pri liečbe Alzheimerovej choroby. Vykazuje koncentračne závislý antiapoptický účinok s maximom pri 300 nM. Pri terapii môže priaznivo spolupôsobiť trojnásobné zvýšenie expresie Bcl-2 (cit.<sup>29</sup>). Tetrandín vykazuje okrem cytoprotektívneho účinku aj výraznú cytotoxicitu. Napr. apoptóza buniek hepatoblastómu HepG2 (IC<sub>50</sub> 20 μM) sa vysvetľuje potlačením Bcl-x<sub>L</sub>, štiepením Bid a Bax, uvoľnením cytochrómu C, ako aj aktiváciou kaspázy-9, -3 a -8 (cit.<sup>30</sup>). V bunkách neuroblastómu myši Neuro 2a bol pozorovaný duálny, koncentračne závislý účinok: pri koncentrácii 1 μM prevládala cytoprotektívny účinok, avšak pri koncentrácii 10 μM bol indukovaný Bax a teda aj apoptóza<sup>31</sup>. Príkladom nežiadúcej indukcie apoptózy je pôsobenie morfinu, ktorý znižuje počet makrofágov, čím sa oslabuje celá imunitná reakcia organizmu. V ľudských monocytoch morfin indukuje syntézu proapoptického Bax proteínu a fragmentáciu DNA (cit.<sup>32</sup>).

#### Fenolické látky

Výrazný proapoptický účinok kurkumínu (40 μM) bol potvrdený v bunkových líniiach pľúcnej rakoviny A549 a H1299. Pôsobenie po 12h sa prejavilo poklesom expresie Bcl-2 a Bcl-x<sub>L</sub>. Gény pre Bak a kaspázy ostali nezmenené až do koncentrácie 60 μM, pokles ich expresie nastal už pri koncentrácii 80–160 μM (cit.<sup>33</sup>). Naopak, bola pozorovaná inhibícia apoptózy vyvolaná pôsobením fotosenzitizéru (C.I.45440) na bunky epidermálneho karcinómu A431 v prítomnosti 100 μM kurkumínu, ktorý potlačil uvoľnenie cytochrómu C z mitochondrií a aktiváciu kaspázy-3 (cit.<sup>34</sup>). Epidemiologické údaje a *in vitro* štúdie s polyfenolmi čierneho a zeleného čaju potvrdzujú ich efektívnosť pri prevencii rakoviny. Najúčinnšie sú epigalokatechin-3-galát a teaflavíny. Pre rôzne typy nádorových bu-

niek sú inhibítormi Bcl-x<sub>L</sub> a Bcl-2 (cit.<sup>35–37</sup>). V mnohých líniiach buniek rakoviny prsníka bola potvrdená proapoptická aktivita resveratrolu<sup>38</sup>. Duálny účinok na nádorové bunky však vykazuje v prítomnosti známych cytotoxických látok: kombinované pôsobenie resveratrolu s paclitaxelom na non-Hodgkinov lymfóm sa prejavilo zvýšenou apoptózou prostredníctvom tvorby tBid, uvoľnenia cytochrómu C, aktivácie kaspázovej kaskády a štiepenia PARP (cit.<sup>39</sup>). Naopak, v leukemických bunkách pri koncentrácii resveratrolu 4 až 8 μM a pôsobení vinkristínu alebo daunorubicínu dochádza k inhibícii kaspáz, DNA fragmentácie a uvoľneniu cytochrómu C (cit.<sup>40</sup>).

#### Sulfidické látky

Inhibičný účinok na proliferáciu rôznych línii nádorových buniek a indukciiu apoptózy v nich vyvolávajú špecifické obsahové látky cesnaku. Alicín aktivuje kaspázy-3, -8 a -9 a štiepi PARP (cit.<sup>41</sup>). Aktívne sú aj jeho rozkladné produkty. Ajoén spôsobuje uvoľnenie cytochrómu C, znižuje hladinu Bcl-2 a aktivuje kaspázu-3 (cit.<sup>42,43</sup>). Expresiu Bcl-2 inhibuje tiež S-allylcysteín<sup>44</sup>, dialyldisulfid aktivuje kaspázu-3 a štiepi PARP (cit.<sup>45</sup>). Sulforafán, ktorý obsahuje najmä zelenina z čeľade Brassicaceae, je schopný indukovať apoptózu rôznych typov nádorových buniek aktiváciou kaspázy-3, -8 a -9, štiepením PARP, aktiváciou Bax a deaktiváciou Bcl-2 (cit.<sup>46–48</sup>).

Uvedené príklady dokumentujú rozsiahly potenciál rastlinných metabolitov ovplyvňovať rozhodujúce životné procesy bunky, a teda aj perspektívu ich využitia v terapii mnohých ochorení, pričom môžu byť aplikované samostatne alebo v kombináciách s inými terapeutikami<sup>49–51</sup>. Napr. v *in vitro* teste s leukemickou líniiou L1210 kvercetín a luteolín pozitívne modulovali účinnosť cisplatiny, kým apigenín, galangín a chryzín jej cytotoxický účinok tlmili. Pri použití doxorubicínu bola jeho účinnosť znížená pri všetkých piatich flavonoidoch<sup>52,53</sup>. V odlišných modeloch – línii MCF-7 a MDA-MB468 rakoviny prsníka – boli účinky doxorubicínu, cisplatiny alebo karboplatiny potencionálne silibínom<sup>54</sup>.

Druhou možnosťou ovplyvnenia bunkových procesov je prevencia vzniku nádorových ochorení – využitie účinných prírodných látok vo výžive (nutraceutiká). Epidemiologické štúdie a klinické testy s prípravkami obsahujúcimi štandardizované množstvo aktívneho rastlinného metabolitu sú v ostatnom desaťročí predmetom mnohých diskusií s prevažne pozitívnym záverečným hodnotením.

#### 4. Záver

V poslednej dobe odborná literatúra zaznamenáva veľa dôkazov o tom, že apoptóza nedokáže vysvetliť všetky formy programovanej bunkovej smrti. Výraz „paraptóza“ popisuje neapoptickú bunkovú smrť charakterizovanú prítomnosťou vakuol v cytoplazme, bez fragmentácie jadra, kondenzácie chromatinu a tvorby apoptických

teliesok. Tento druh bunkovej smrti môže byť indukovaný látkami, ktoré za iných podmienok indukujú aj apoptózu (napr. NO, overexpressia Bax, hypoxia). Bunky bez Apaf-1 alebo kaspáz, ktoré sú nevyhnutné pre proces apoptózy, podliehajú smrti spôsobom nezávislým na kaspázach<sup>55</sup>. Pri štiepení jadrových laminov a cytoskeletových elementov sa uvažuje aj o účasti iných proteáz ako sú kaspázy<sup>56</sup>. Schopnosť niektorých buniek preživať napriek aktivácii pro-apoptických kaspáz znamená pozoruhodnú plasticitu programovanej bunkovej smrti. Znamená to, že samotné kaspázy nie sú dostačujúce pre indukciu apoptózy. Odborná literatúra neustále podáva dôkazy o nových regulátoroch a/alebo inhibične pôsobiacich proteínoch apoptických signalizačných dráh. Poznanie presného mechanizmu a regulácie bunkovej smrti umožní modifikáciu molekulárnych krokov apoptických signalizačných pochodov. Napriek tomu, že v nádorových bunkách neprebíha kontrolovaná apoptóza, niektoré formy liečby rakoviny indukujú klasickú apoptózu cestou aktivácie mitochondriálnej dráhy. Perspektíva nových foriem liečby rakoviny predstavuje zameranie pozornosti na novo objavené, na kaspázach nezávislé mechanizmy bunkovej smrti.

*Práca vznikla v rámci riešenia projektu VEGA 1/1185/04.*

#### Skratky

AIF	faktor indukujúci apoptózu
Apaf-1	aktivačný faktor 1 apoptózy
Bad	Bcl-2 asociovaný promótor smrti
Bak	homológny antagonista B-buniek
Bax	Bcl-2 asociovaný x proteín
Bcl-2	proteíny lymfómu B-buniek
Bcl-x <sub>L</sub>	dlhá forma apoptického regulátora Bcl-x
Bid	agonista BH3-interagujúcej domény smrti
CAD	kaspázou indukovateľná DNÁza
DD	doména smrti
DIABLO	priamy inhibítor apoptózy viažuci IAP
DISC	signalizačný komplex indukujúci smrť
DR4, DR5	receptory smrti viažuce TRAIL ligand
Endo G	endonukleáza G
FAS (CD95)	receptor pre apoptické signály, súčasť veľkorodiny TNF receptorov
FASL	ligand pre FAS receptor
HTRA2	proteín A2 s nárokom na vysokú teplotu
IAP	proteín inhibujúci apoptózu
ICAD	inaktívna kaspázou indukovateľná DNÁza
Mcl-1	antiapoptický proteín inhibujúci uvoľnenie cytochrómu C
PARP	poly(ADP-ribózo) polymeráza
Smac	druhý mitochondriálny aktivátor kaspáz
t-Bid	rozštiepený Bid
TNF- $\alpha$	tumor nekrotický faktor- $\alpha$
TNFR-1(2)	receptor 1(2) pre TNF
TRAIL	apoptózu indukujúci ligand súvisiaci s TNF- $\alpha$

#### LITERATÚRA

- Eguchi Y., Shimizu S., Tsujimoto Y.: *Cancer Res.* 57, 1835 (1997).
- Formigli L., Papucci L., Tani A., Schiavone N., Tampestini A., Orlandini G. E., Capaccioli S., Orlandini S. Z.: *J. Cell. Physiol.* 182, 41 (2000).
- Tafuku S., Matsuda T., Kawakami H., Tomita M., Yagita H., Mori N.: *Eur. J. Haematol.* 76, 64 (2006).
- Bagci E. Z., Vodovotz Y., Billiar T. R., Ermentrout G. B., Bahar I.: *Biophys J.* 90, 1546 (2006).
- Du J., Wang X., Miereles C., Bailey J. L., Debigare R., Zheng B., Price S. R., Mitch W. E.: *J. Clin. Invest.* 113, 115 (2004).
- Seiler N., Raul F.: *J. Cell Mol. Med.* 9, 623 (2005).
- Liu X., Kim C. N., Yang J., Jemmerson R., Wang X.: *Cell* 86, 147 (1996).
- Robertson J. D., Orrenius S.: *Toxicology* 181, 491 (2002).
- Linton S. D.: *Curr. Top. Med. Chem.* 5, 1697 (2005).
- Song Z., Yao X., Wu M.: *J. Biol. Chem.* 278, 23130 (2003).
- Ruchaud S., Korfali N., Villa P., Kottke T. J., Dingwall C., Kaufmann S. H., Earnshaw W. C.: *EMBO J.* 21, 1967 (2002).
- Samejima K., Tone S., Earnshaw W. C.: *J. Biol. Chem.* 276, 45427 (2001).
- Chan F. L., Choi H. L., Chen Z. Y., Chan P. S. F., Huang Y.: *Cancer Lett.* 160, 219 (2000).
- Li Y. C., Tyan Y. S., Kuo H. M., Chang W. C., Hsia T. C., Chung J. G.: *Food Chem. Toxicol.* 42, 37 (2004).
- Ueda S., Nakamura H., Masutani H., Sasada T., Takabayashi A., Yamaoka Y., Yodoi J.: *Mol. Immunol.* 38, 781 (2001).
- Seo H. J., Surh Y. J.: *Mutat. Res.* 496, 191 (2001).
- Hsu Y. L., Kuo P. L., Lin C. C.: *Biochem. Pharmacol.* 67, 823 (2004).
- Chena C., Wub C., Lin J.: *Biochem. Pharmacol.* 67, 53 (2004).
- Chen Y., Shen S., Lin H.: *Biochem. Pharmacol.* 66, 1139 (2003).
- Oh S. H., Yin H. Q., Lee B. H.: *Arch. Pharm. Res.* 27, 402 (2004).
- Ahlemeyer B., Krieglstein J.: *Pharmacopsych.* 36, Suppl.1, S8 (2003).
- Zhang Z., Kotake-Nara E., Ono H., Nagao A.: *Free Rad. Biol. Med.* 35, 1653 (2003).
- Yanamandra N., Berhow M. A., Konduri S., Dinh D. H., Olivero W. C., Nicolson G. L., Rao J. S.: *Clin. Exp. Metast.* 20, 375 (2003).
- Chen W., Lin J.: *J. Agric. Food Chem.* 52, 55 (2004).
- Calabrini A., Stringaro A., Toccaceli L., Meschini S., Marra M., Colone M., Salvatore G., Mondello F., Arancia G., Molinari A.: *J. Invest. Dermatol.* 122, 349 (2004).
- Burke Y. D., Ayoubi A. S., Werner S. R., McFarland B. C., Heilman D. K., Ruggeri B. A., Crowell P. L.:

- Anticancer Res. 22, 3127 (2002).
27. Na H. J., Koo H. N., Lee G. G., Yoo S. J., Park J. H., Lyu Y. S., Kim H. M.: *Clin. Chim. Acta* 314, 215 (2001).
  28. Nerurkar P. V., Dragull K., Tang C. S.: *Toxicol Sci.* 79, 106 (2004).
  29. Arias E., Alés E., Gabilan N. H., Cano-Abad M. F., Villarroya M., García A. G., López M. G.: *Neuropharmacol.* 46, 103 (2004).
  30. Oh S., Lee B.: *Biochem. Pharmacol.* 66, 725 (2003).
  31. Jin Q., Kang C., Soh Y., Sohn N. W., Lee J., Cho Y. H., Baik H. H., Kang I.: *Life Sci.* 71, 2053 (2002).
  32. Singhal P. C., Kapasi A. A., Franki N., Reddy K.: *Immunology* 100, 57 (2000).
  33. Pillai G. R., Srivastava A. S., Hassanein T. I., Chauhan D. P., Carrier E.: *Cancer Lett.* 208, 163 (2004).
  34. Chan W., Wu H.: *J. Cell. Biochem.* 92, 200 (2004).
  35. Lung H. L., Ip W. K., Chen Z. Y., Mak N. K., Leung K. N.: *Int. J. Mol. Med.* 13, 465 (2004).
  36. Leone M., Zhai D. Y., Sareth S., Kitada S., Reed J. C., Pellecchia M.: *Cancer Res.* 63, 8118 (2003).
  37. Masuda M., Suzui M., Lim J. T. E., Weinstein I. B.: *Clin. Cancer Res.* 9, 3486 (2003).
  38. Laux M. T., Aregullin M., Berry J. P., Flanders J. A., Rodriguez E.: *J. Altern. Compl. Med.* 10, 235 (2004).
  39. Jazirehi A. R., Bonavida B.: *Mol. Cancer Ther.* 3, 71 (2004).
  40. Ahmad K. A., Clement M., Hanif I. M., Pervaiz S.: *Cancer Res.* 64, 1452 (2004).
  41. Oommen S., Anto R. J., Srinivas G., Karunakaran D.: *Eur. J. Pharmacol.* 485, 97 (2004).
  42. Hassan H. T.: *Leuk. Res.* 28, 667 (2004).
  43. Ahmed N., Laverick L., Sammons J., Zhang H., Maslin D. J., Hassan H. T.: *Anticancer Res.* 21, 3519 (2001).
  44. Balasenthil S., Rao K. S., Nagini S.: *Cell. Biochem. Funct.* 20, 263 (2002).
  45. Kwon K. B., Yoo S. J., Ryu D. G., Yang J. Y., Rho H. W., Kim J. S., Park J. W., Kim H. R., Park B. H.: *Biochem. Pharmacol.* 63, 41 (2002).
  46. Gingras D., Gendron M., Boivin D., Moghrabi A., Theoret Y., Beliveau R.: *Cancer Lett.* 203, 35 (2004).
  47. Singh A. V., Xiao D., Lew K. L., Dhir R., Singh S. V.: *Carcinogenesis* 25, 83 (2004).
  48. Jackson S. J. T., Singletary K. W.: *Carcinogenesis* 25, 219 (2004).
  49. Los M., Burek C. J., Stroh C., Benedyk K., Hug H., Mackiewicz A.: *Drug Discov. Today* 8, 67 (2003).
  50. Kiechle F. L., Zhang X.: *Clin. Chim. Acta* 326, 27 (2002).
  51. Alam J. J.: *Trends Biotechnol.* 21, 479 (2003).
  52. Cipák L., Rauko P., Miadoková E., Cipáková I., Novotný L.: *Leuk. Res.* 27, 65 (2003).
  53. Cipák L., Novotný L., Cipáková I., Rauko P.: *Nutr. Res.* 23, 1045 (2003).
  54. Tyagi A. K., Agarwal C., Chan D. C. F., Agarwal R.: *Oncol. Rep.* 11, 493 (2004).
  55. Lockshin R. A., Zakeri Z.: *Curr. Opin. Cell. Biol.* 14, 727 (2002).
  56. Leist M., Jäätelä M.: *Cell Death Differ.* 8, 324 (2001).
- M. Ficková<sup>a</sup> and M. Nagy<sup>b</sup>** (<sup>a</sup>*Institute of Experimental Endocrinology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava*, <sup>b</sup>*Department of Pharmacognosy and Botany, Faculty of Pharmacy, Comenius University, Bratislava*): **Apoptosis – Programmed Cell Death and Plant Metabolites**
- Apoptosis is a fundamental process in the development and homeostasis of multicellular organisms. The process is a genetically controlled normal form of cell death characterized by specific morphological, biochemical and molecular events. Two mechanisms of apoptosis are described: intracellular or mitochondrial pathway and extracellular or death receptor pathway. Deregulation of apoptosis can result in diseases like cancer, autoimmune disease (AIDS), neurodegenerative disease (Alzheimer's disease). Modulation of apoptosis signaling pathways by naturally occurring compounds of plant origin is a novel promising approach in innovative therapeutics.