



mánková
UNIVERZITA KARLOVA
V PRAZE



3. *LÉKAŘSKÁ FAKULTA*

Ústav biochemie, buněčné a molekulární biologie
Oddělení buněčné a molekulární biologie

Marie Mánková

Význam a možnosti ovlivnění apoptózy v terapii hematologických malignit

*The Significance and Possibilities of Affecting
Apoptosis in the Therapy of Haematological
Malignancies*

Diplomová práce

Praha, červen 2007

Autor práce: Marie Mánková

Studijní program: Všeobecné lékařství s preventivním zaměřením

Vedoucí práce: **Doc. RNDr. Jan Kovář, DrSc.**

Pracoviště vedoucího práce: **Ústav biochemie, buněčné a molekulární biologie 3.LF/ Oddělení buněčné a molekulární biologie**

Datum a rok obhajoby: 26.6. 2007

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předkládanou práci zpracovala samostatně a použila jen uvedené prameny a literaturu. Současně dávám svolení k tomu, aby tato diplomová práce byla používána ke studijním účelům.

V Praze dne 12. června 2007

Marie Mánková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala Doc. RNDr. Janu Kovářovi, DrSc. za nevšední ochotu a odborné vedení při psaní této diplomové práce.

Obsah

OBSAH.....	5
ÚVOD.....	6
1 APOPTÓZA A JEJÍ VÝZNAM V ONKOLOGII.....	7
1.1 Co je apoptóza	7
1.2 Morfologické charakteristiky apoptózy.....	7
1.3 Význam apoptózy pro organismus jako celek.....	8
1.4 Úloha apoptózy při nádorové transformaci	8
2 MECHANISMY INDUKCE APOPTÓZY A JEJÍ PRŮBĚH.....	9
2.1 Apoptotické signály	9
2.2 Dráha receptorů smrti	10
2.3 Mitochondriální dráha	11
2.3.1 Proteiny rodiny Bcl-2	11
2.3.2 Proapoptotičtí členové.....	12
2.3.3 Aktivace exekčních mechanismů	13
2.4 Aktivace kaspáz a exekuce apoptózy	13
2.4.1 Co jsou kaspázy.....	13
2.4.2 Exekuce apoptózy efektorovými kaspázami	14
2.5 Propojení apoptotických drah.....	14
2.6 Regulace apoptotických proteinů	15
3 ÚLOHA APOPTÓZY V TERAPII HEMATOLOGICKÝCH MALIGNIT.....	17
3.1 Mechanismus účinku tradičních postupů	17
3.2 Nové směry v terapii nádorových onemocnění	17
3.2.1 Genová terapie	18
3.2.2 Terapie založené na ovlivnění apoptózy.....	19
3.2.2.1 Látky ovlivňující dráhu receptorů smrti.....	20
3.2.2.2 Látky ovlivňující mitochondriální dráhu.....	22
3.2.2.3 Proteiny rodiny Bcl-2.....	23
3.2.2.4 Látky ovlivňující aktivaci kaspázy.....	25
3.2.2.5 Modulátory molekul regulujících indukcí apoptózy.....	26
4 ZÁVĚR: MOŽNOSTI A PROBLÉMY V KLINICKÉ PRAXI.....	28
SOUHRN.....	29
SUMMARY.....	30
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	31

Úvod

Téma své diplomové práce „Význam a možnosti ovlivnění apoptózy v terapii hematologických malignit“ jsem si vybrala, protože je to téma zajímavé nejen z vědeckého hlediska, ale přináší též reálnou naději na lepší a šetrnější léčbu pro mnoho pacientů s obtížně léčitelnými typy nádorových onemocnění.

V prvních dvou kapitolách jsme se snažila o definici a detailnější popis průběhu apoptózy a její regulace s využitím zahraničních studií (viz seznam literatury). Třetí kapitola je věnována mechanismu účinku tradičních postupů (chemoterapie a radioterapie) a zejména přehledu nových směrů v terapii nádorových onemocnění.

Vzhledem k širokému spektru výsledků bádání a množství nových látek s nadějnými perspektivami uplatnění v klinické medicíně se práce zabývá pouze úzkým výběrem (zejména nejvíce citovaných) potencionálních léčiv.

1 Apoptóza a její význam v onkologii

1.1 Co je apoptóza

Apoptóza je typ programované buněčné smrti se specifickými morfologickými rysy. Je to aktivní děj, zprostředkovaný kaspázami a vedoucí k odstranění určitých buněk, aniž by vyvolal zánětlivou reakci okolní tkáně. Tento komplexní fyziologický proces je závislý na integrované funkci celé řady genových produktů a je indukován množstvím stimulů, například působením chemoterapeutik, zářením nebo deprivací růstových faktorů (Chan-Yu, 2004; Cookson-Fink, 2005). Výzkumy ukazují, že mechanismy programované buněčné smrti se vyskytují též u autofagie, pyroptózy i onkózy (Cookson-Fink, 2005), proto je užívání těchto pojmů jako synonym nepřesné.

Termín apoptóza je odvozen z řečtiny a znamená „opadávání,“ například opadávání listů ze stromů. Je tak výstižnou metaforou kontrolovaného fyziologického procesu, kdy dochází k odstraňování jednotlivých komponent organismu bez destrukce nebo poškození organismu jako celku (Cookson-Fink, 2005).

1.2 Morfologické charakteristiky apoptózy

V buňkách realizujících apoptózu se vyskytují charakteristické morfologické a biochemické změny, rozdílné od změn při jiných typech buněčné smrti. Prvotní a typické jsou především změny v jádře, při nichž se chromatin kondenzuje a shlukuje se na periferii jádra. Dochází k postupnému štěpení DNA specifickými endonukleázami nejprve na fragmenty dlouhé 30-50 kbp až posléze na fragmenty tvořené pouze 180-200 bp nebo násobky této délky. Bylo zjištěno, že ke štěpení DNA dochází mezi nukleosomy, které zahrnují právě 180 bp DNA. Na elektroforéze tyto fragmenty vytváří typický obraz, tzv. DNA žebříček. Dále se mění též struktura jádra. Proteolytické enzymy štěpí proteiny zajišťující integritu jádra a jaderného obalu. Jádro se rozpadá do mnoha částí, ale ostatní buněčné orgány zůstávají v této době beze změn. Pro průběh apoptózy je nezbytná energie dodávaná v podobě ATP. Teprve v dalším průběhu apoptózy dochází i ke změnám mitochondrií a narušení cytoskeletu. Mění se struktura membrán a jsou přerušena mezibuněčná spojení. Buňka se smršťuje a rozpadá se na mnoho částí, které se nazývají apoptotická tělíska (Kapras-Kohoutová, 1999; Hoffbrand-Wickremasinghe, 1999). U těchto tělísek dochází též k expozici fosfatidylserinu, který je rozpoznáván fagocyty (Hoffbrand-Wickremasinghe, 1999).

1.3 Význam apoptózy pro organismus jako celek

Proces apoptózy se vyskytuje u všech mnohobuněčných organismů. To svědčí z hlediska evoluce pro jeho velmi časný vznik, a to pravděpodobně v době vzniku strukturně složitějších organismů. Pro mnohobuněčné organismy je to tedy proces prvořadého významu. Tím, že umožňuje selektivní odstranění buněk z tkání, je apoptóza nezbytná pro udržení homeostázy i správného vývoje a funkce organismu. Apoptóza nastává během embryogeneze, při obnově tkání, atrofii stárnoucích orgánů a je též odpovědí na neopravitelné poškození DNA a obranným mechanismem před proliferací nežádoucích buněk (Ghobrial et al., 2005; Tamm et al., 2001). Ročně je programovanou buněčnou smrtí eliminováno množství buněk odpovídající téměř veškeré tělesné hmotnosti (Tamm et al., 2001). Významnou úlohu hraje apoptóza i v imunitním systému (Los et al., 2003).

Poruchy apoptózy jsou spojené se vznikem celé řady onemocnění. Jsou to poruchy ve smyslu snížené četnosti apoptózy u nádorových onemocnění, ale i patologicky zvýšené četnosti u neurodegenerativních onemocnění (Alzheimerova choroba, Huntingtonova choroba), kardiovaskulárních onemocnění (ischemická choroba srdeční, městnavé srdeční selhání), cévní mozkové příhody a mnoha dalších (Alam, 2003).

1.4 Úloha apoptózy při nádorové transformaci

Vlastní příčinou maligní transformace buňky jsou mutace, a to především v protoonkogenech, antionkogenech a genech reparačních, přičemž pro maligní transformaci je třeba 4-6 kritických, na sobě nezávislých změn v genomu jedné buňky (Kapras et al., 1998; Rejhar-Vojtěšek, 2002). Poruchy apoptózy umožňují přežití buněk s defektním genomem, kumulaci mutací, přežití buněk nezávisle na růstových faktorech, propůjčují rezistenci k T-lymfocyty zprostředkované cytotoxicitě a vedou tak ke vzniku nesmrtelných maligních klonů. Defekty v apoptotických drahách se navíc významně spolupodílejí na vzniku rezistence k chemoterapii a radioterapii (Tamm et al., 2001)

2 Mechanismy indukce apoptózy a její průběh

Pro spuštění apoptózy existuje několik drah, ale dvěma z nich byla v posledních letech věnována velká pozornost a byly popsány do velkých detailů. Tyto dvě dráhy jsou dráha receptorů smrti a mitochondriální dráha (Pellecchia-Reed, 2004). Dráha receptorů smrti (ang. extrinsic pathway) začíná vazbou ligandu na receptory smrti ukotvené v plazmatické membráně, dráha mitochondriální (ang. intrinsic pathway), zahrnuje uvolnění cytochromu-c z mitochondrie. Obě dráhy se sbíhají do konečné společné dráhy zahrnující aktivaci exekučních kaspáz, které štěpí regulační a strukturální molekuly a celý tento proces vede k buněčné smrti (Ghobrial et al., 2005). Buňka se rozpadá do mnoha fragmentů ohraničených cytoplazmatickou membránou nazývaných apoptotická tělíska (Hoffbrand-Wickremasinghe, 1999).

Pravděpodobnost iniciace apoptózy se liší v jednotlivých fázích buněčného cyklu a je ovlivněna i genetickou výbavou buňky. Jakmile však buňka překročí „point of no return,“ proces apoptózy je nevratný a zánik buňky je zahájen během několika minut a trvá včetně fagocytózy fragmentů nejvýše několik hodin. Aplikace extraktu cytosolu z buněk v této fázi apoptózy do buněk experimentálních spouští apoptózu v těchto buňkách během několika minut (Kapas-Kohoutová, 1999).

2.1 Apoptotické signály

Exekuci apoptózy předchází obecně dva stupně, a to interakce indukujícího signálu a buňky a biochemická transdukcce signálu smrti. Dráhy řídící apoptózu jsou velmi komplexní, tvořené sítí inhibitorů a induktorů působících proti sobě ve velmi citlivém poměru, aby bylo dosaženo homeostázy (Rejhar-Vojtěšek, 2002).

Apoptóza může být spuštěna ontogenetickým programem buňky, mezibuněčnými signály a faktory prostředí, které buňku poškozují. Mezi induktory apoptózy tedy patří například defekty cytokinů nebo jejich snížená hladina, glukokortikoidy, ionizující záření, oxidativní stres, hypoxie, tepelný šok a viry. Apoptózu jsou schopné navodit i některé léky jako například antimetabolity, inhibitory tubulinu nebo alkylující látky. Apoptotické signály jsou schopné spouštět jak apoptózu, tak na kaspázách nezávislou buněčnou smrt. Například z mitochondrie se kromě proteinů spouštějících na kaspázách závislou dráhu zahrnující cytochrom-c uvolňují též na kaspázách nezávislé efekторы smrti, jako je AIF (apoptosis-

inducing factor) a endonukleáza G, která se přemísťuje do jádra, kde způsobuje fragmentaci DNA (Chan-Yu, 2004).

Mezi inhibitory apoptózy patří někteří členové rodiny Bcl-2, rodina přímých inhibitorů kaspáz cFLIP a proteiny z rodiny inhibitorů apoptózy IAPs (inhibitors of apoptosis proteins), kam patří XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP, survivin, apollon a livin (Tamm et al., 2001).

2.2 Dráha receptorů smrti

Tato dráha je nazývána též vnější nebo cytoplazmatická. Je spouštěna navázáním ligandů na tzv. receptory smrti (death receptors - DR), jako je například Fas receptor, též nazývaný Apo-1 nebo CD95 receptor. Fas patří do TNF receptorové superrodiny. Dalšími členy této rodiny jsou TNF R1, DR3 (Apo 2), DR4 (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 - TRAIL R1), DR5 (TRAIL R2) a DR6. Míra exprese receptorů smrti se mezi různými druhy buněk liší. Například DR4 a DR5 jsou exprimované u různých maligních buněk, ale ne na většině normálních somatických buněk. Určité typy buněk exprimují neúplné nebo mutované receptory, takzvané návnadové receptory (angl. decoy receptors), které soutěží o ligand, ale neaktivují mašinerii buněčné smrti (Zimmermann et al., 2001).

Fas receptor a TNF R1 obsahují ve své intracelulární části vysoce homologní domény, tzv. domény smrti, které ostatní receptory této rodiny nemají. Intracelulární část receptorů TNF rodiny nemá tyrosinkinázovou aktivitu typickou pro receptory růstových faktorů. Na přenosu signálu z receptoru do buňky se podílí kaskáda kaspáz. Signál ovlivňují proteiny Abl, Ras, Bcl-2 a další. S těmito receptory smrti se váží další molekuly, které modulují jejich funkci. Jsou to například polypeptidy asociované s cytoplazmatickou doménou receptorů. Mezi tyto polypeptidy patří SODD (silencer of death domain), který se váže na intracelulární doménu TNF R1 a zabraňuje jeho spontánní oligomerizaci za nepřítomnosti ligandu (Earnshaw-Kaufmann, 2000).

Když apoptotický signál spustí tuto dráhu a na receptor smrti se naváže příslušný ligand, dojde k vytvoření takzvaného smrt indukujícího signalizačního komplexu (ang. death-inducing signaling complex). Například navázání ligandu Fas receptoru (FasL) nebo zkříženě reagující protilátky vede k receptorové trimerizaci následované navázáním adaptorové

molekuly FADD (Fas-associated death domain protein) k cytoplazmatické doméně receptoru. FADD váže prokaspázu-8 a -10, což vede k aktivaci kaspázy-8, která dále aktivuje efektorové kaspázy -3 a -7. Aktivní kaspáza-3 pak štěpí prokaspázu-6. V některých buňkách je tedy aktivace kaspázy-8 dostatečná k exekuci apoptózy, zatímco u jiných typů buněk kaspáza-8 zasahuje do mitochondriální dráhy, tím že štěpí Bid (proapoptotický člen Bcl-2 rodiny), což vede k následnému uvolnění cytochromu-c. Ačkoli ligandy a adaptorové molekuly pro ostatní receptory smrti jsou odlišné, nakonec jsou aktivované podobné dráhy (Earnshaw-Kaufmann, 2000; Ghobrial et al., 2005; Hoffbrand-Wickremasinghe, 1999; Tamm et al., 2001).

Dráha receptorů smrti je regulována na několika různých úrovních. Za prvé tím, že exprese receptorů smrti se liší mezi různými buňkami. Za druhé pomocí návnadových receptorů (decoy receptors) jako je DcR3, TRAIL R-3/DcR1 a TRAIL R-4/DcR2. Za třetí je to regulace signalizace prostřednictvím prokaspázy 8. Například přímý inhibitor kaspáz cFLIP se může vázat s kaspázou-8 a blokovat její štěpící aktivitu a tím i apoptózu zprostředkovanou dráhou receptorů smrti (Earnshaw-Kaufmann, 2000; Gores-Kaufmann, 2000; Tamm et al., 2001).

2.3 Mitochondriální dráha

Tato dráha se též označuje jako vnitřní dráha. Signály k jejímu spuštění jsou například DNA poškození, poškození mikrotubulů nebo deprivace růstových faktorů. Když je spuštěna, vede k uvolnění proapoptotických proteinů z mitochondrie a aktivaci kaspázové kaskády. Mezi klíčové regulátory této cesty patří proteiny rodiny Bcl-2. (Ghobrial et al., 2005; Reed-Pellecchia, 2004).

2.3.1 Proteiny rodiny Bcl-2

Název této rodiny pochází od produktu Bcl-2 genu (B cell lymphoma), který byl původně identifikován v chromozomálním zlomu translokace chromozomů 18 a 14 u folikulárního non Hodginského lymfomu. (Ghobrial et al., 2005, 9). Bcl-2 rodina zahrnuje jak proapoptotické členy (Bax, Bak, Bad, Bcl-X_S, Bik, Bid, Bim, Hrk), tak antiapoptotické (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, Bfl-1, Mcl-1). Všechny tyto proteiny jsou charakterizovány přítomností konzervovaných sekvencí zvaných Bcl-2 homologní (BH) domény. Antiapoptotičtí členové mají čtyři domény, proapoptotičtí buď tři nebo pouze jednu. Antiapoptotičtí a proapoptotičtí

členové vzájemně antagonizují své působení, tím že tvoří heterodimery. Výsledný efekt je více závislý na rovnováze mezi nimi, než na jejich samotném množství (Chan-Yu, 2004; Hoffbrand-Wickremasinge, 1999)

2.3.2 Proapoptotičtí členové

Tato skupina se dále dělí na proteiny mající pouze BH3 doménu a na proteiny multidoménové. Obě skupiny mají rozdílné funkce. Proteiny mající pouze BH3 doménu (Bad, Puma, Noxa, Bim, Bmf, Bid) účinkují jako senzory pro různé apoptotické dráhy, zatímco multidoménové proapoptotické proteiny (Bax a Bak) jsou exekutoři smrti (Chan-Yu, 2004).

Proteiny mající pouze BH3 doménu jsou pokládány za spojovatele signálů smrti a exekuční části apoptotických drah. Aktivace proteinů probíhá různými způsoby, které zahrnují jak mechanismy na úrovni transkripce, tak posttranslační mechanismy, jako je defosforylace, štěpení a fosforylace (Košťanová-Poliaková et al., 2005). Například odebrání růstových faktorů, vede k defosforylaci Bad. Defosforylovaný Bad se přesunuje do mitochondrie, kde antagonizuje antiapoptotický protein Bcl-X_L. Bim a Bmf, fungují jako senzory intracelulárního poškození a to díky svému umístění na cytoskeletální struktury (Chan-Yu, 2004).

Multidoménové proapoptotické proteiny (Bax, Bak, Bok) fungují jako exekutoři buněčné smrti. Bax je ve zdravých buňkách v neaktivní formě a je lokalizován hlavně v cytosolu nebo je volně připojen k mitochondriální membráně. Po signálech k apoptóze prodělá Bax konformační změny a translokuje se do vnější mitochondriální membrány, kde oligomerizuje. Oligomerizace Bax je pokládána za klíčový krok ke zvýšení propustnosti mitochondriální membrány, pravděpodobně prostřednictvím formace pórů. Bak je ve zdravých buňkách na rozdíl od Bax lokalizován ve vnější mitochondriální membráně, kde je asociován s napětově řízeným iontovým kanálem 2 (VADC2), který udržuje Bak v neaktivní monomerní formě. Zvýšená exprese proteinů mající pouze BH3 doménu má za následek disociaci Bak a VADC2 a v důsledku toho též zvýšení membránové propustnosti (Chan-Yu, 2004; Ghobrial et al., 2005; Hoffbrand-Wickremasinge, 1999).

2.3.3 Aktivace exekučních mechanismů

Klíčovou událostí v aktivaci kaspáz mitochondriální dráhou je zvýšení propustnosti mitochondriální membrány. V důsledku toho dojde k uvolnění proapoptotických proteinů do cytoplasmy. Mezi tyto proteiny patří cytochrom-c, Smac/Diablo HtrA2/Omi, AIF (apoptosis inducing factor) a endonukleáza G. Tyto proteiny indukují apoptózu různými způsoby (Yua-Zhangb, 2003).

Cytochrom-c váže Apaf 1 (apoptotic protease activating factor-1) a indukuje jeho konformační změny, které umožní Apaf-1 vázat prokaspázu-9. Toto navázání je zprostředkované prodoménou CARD (caspase recruitment domains) přítomnou u obou proteinů a celý tento komplex se nazývá apoptozóm. Takto aktivovaná kaspáza 9 dále aktivuje kaspázu-3 nebo kaspázu-7, tedy efektorové kaspázy (Chan-Yu, 2004).

Smac/Diablo a HtrA2/Omi potlačují schopnost proteinů z rodiny IAPs (inhibitors of apoptosis proteins) inhibovat kaspázy. AIF se po apoptotických signálech přesunuje do jádra, kde se váže na DNA a způsobuje na kaspázách nezávislou kondenzaci chromatinu a fragmentaci DNA. Tento poznatek má i potenciální terapeutické uplatnění, protože některé buňky rezistentní k chemoterapii se mohou stát citlivými k léčbě právě aktivací AIF (Ghobrial et al., 2005; Kim, 2005; Tamm et al., 2001).

2.4 Aktivace kaspáz a exekuce apoptózy

2.4.1 Co jsou kaspázy

Kaspázy (cysteine aspace) představují skupinu proteolytických enzymů obsahujících v aktivním místě cystein (Earnshaw-Kaufmann, 2000). Různí členové této proteázové rodiny se liší v primární struktuře a substrátové specifitě, ale sdílí několik společných rysů. Každá kaspáza štěpí na karboxylovém místě aspartátového zbytku. Kaspázy jsou syntetizovány jako zymogeny, které obsahují N-terminální prodoménu, velkou podjednotku a malou podjednotku. Proteolytické štěpení vede k separaci velkých a malých podjednotek od sebe a od prodomény. Každá aktivovaná kaspáza je tedy tetramer složený ze dvou identických velkých podjednotek a dvou identických malých podjednotek. Toto aktivující štěpení se odehrává na místě, které může být zároveň štěpeno i samotnými kaspázami. To vedlo k domněnce, že aktivace kaspáz zahrnuje jak proteolytickou kaskádu, tak autoaktivační proces. Tento předpoklad se později potvrdil. Kaspázy jsou klíčovými enzymy exekuce

apoptózy, jejich funkční inaktivace proto představuje výhodu pro nádorové buňky (Zhaoyu, 2005).

Kaspázy lze s funkčního hlediska rozdělit do dvou skupin. Na ty, které se účastní hlavně apoptózy (kaspáza 2, 3, 6, 7, 8, 9 a 10) a na ty, jejichž hlavní role se zdá být u zánětlivé odpovědi organismu (kaspáza 1, 4, 5, 11, 12, 13 a 14). Kaspázy 11-14 se však u lidí nevyskytují. Kaspázy účastnící se apoptózy se dále dělí do dvou podskupin. Jsou to tzv. iniciátorové kaspázy (kaspázy 2, 8, 9 a 10), které se aktivují navázáním na adaptorové molekuly a následně štěpí a aktivují efektorové kaspázy (kaspázy 3, 6 a 7), zodpovědné za konečnou exekuci apoptózy (Košťanová-Poliaková et al., 2005).

2.4.2 Exekuce apoptózy efektorovými kaspázami

Mitochondriální dráha i dráha receptorů smrti se sbíhá u efektorové kaspázy 3. Aktivované efektorové kaspázy selektivně štěpí omezenou skupinu cílových proteinů tzv. substrátů smrti (ang. death substrates). To má za následek vznik charakteristických morfologických a biochemických známek spojených s apoptózou, jako je kondenzace chromatinu, fragmentace DNA a vytváření váčků z plazmatické membrány. Mezi tyto cílové proteiny patří například kinázy, cytoskeletální proteiny, proteiny spojené s opravami DNA a inhibitory endonukleázové podjednotky (CIDE rodina). Kaspázy také postihují cytoskeletární struktury, regulaci buněčného cyklu, signalizační cesty a nakonec dochází i k destrukci „house keeping“ buněčných funkcí (Ghobrial et al., 2005). Kaspázy též způsobí expozici fosfatidylserinu, který je lokalizovaný u zdravých buněk na vnitřní straně plazmatické membrány, u apoptotických buněk je na straně vnější a může být rozpoznán fagocyty jako signál k pohlcení (Cookson-Fink, 2005). Rozštěpení relativně omezeného množství hlavních kaspázových substrátů se tedy podílí na apoptotické smrti, tím že dojde ke zničení strukturálních komponent, štěpení genetického materiálu a zabránění oprav DNA (Hoffbrand-Wickremasinghe, 1999).

2.5 Propojení apoptotických drah

Upřednostňování jedné z apoptotických drah závisí na typu buňky (Kim, 2005). Dále je třeba zdůraznit, že mitochondriální dráha a dráha receptorů smrti neprobíhají striktně odděleny jedna od druhé, ale existují mezi nimi četné vztahy. Například zvýšená exprese Bcl-

2 v mitochondriální dráze může vést k inhibici apoptózy spuštěné dráhou receptorů smrti a naopak TNF α může zvýšit expresi NF κ B a stimulovat antiapoptotické členy Bcl-2 rodiny (Ghobrial et al., 2005). Existují také dva typy buněčné odpovědi po navázání na Fas receptor. Buď je komplexem Fas/FADD aktivováno velké množství kaspázy 8 následované aktivací efektorových kaspáz, nebo je aktivováno pouze malé množství kaspázy 8, která pak aktivuje Bid. Aktivovaný Bid (tBid) se váže s Bax, usnadňuje uvolnění cytochromu-c z mitochondrie a tím aktivuje kaspázu-9 a efektorové kaspázy. Toto propojení je důležité, protože určuje zda faktory postihující mitochondriální dráhu (například zvýšená exprese Bcl-2) způsobí také rezistenci buněk k apoptóze indukované prostřednictvím receptorů smrti. Další propojení může probíhat též na úrovni efektorových kaspáz, například aktivní kaspáza 6 může štěpit a aktivovat prokaspázu-8 (Earnshaw-Kaufmann, 2000).

2.6 Regulace apoptotických proteinů

Mitochondriální dráha i dráha receptorů smrti je regulována různými proteiny. Některé z nich jsou důležité ve vztahu k nově vyvíjeným lékům, a proto jsou zmíněny podrobněji. Jde o NF κ B, ubikvitin/proteazómový systém, IAP proteiny, PI3K a „heat shock proteins“ (Hsps) (Ghobrial et al., 2005; Tamm et al., 2003).

NF κ B je jaderný transkripční faktor, který reguluje expresi velkého množství genů zahrnutých v regulaci apoptózy, virové replikace, nádorové transformace, zánětu a mnoha autoimunitních chorob. Je aktivován množstvím signálů, například cytokiny, radiací, nebo farmakologickými látkami. V neaktivní formě je přítomen v cytoplazmě navázaný na inhibitor z I κ B rodiny. Aktivující stimuly způsobí fosforylaci I κ B, která má za následek jeho degradaci a NF κ B se přesouvá do jádra. V jádře se váže s určitými geny a tak aktivuje jejich transkripci. NF κ B má jak proapoptotické tak antiapoptotické účinky, které jsou nejspíš určovány spíše povahou signálu smrti než typem tkáně. Za fyziologických podmínek aktivace NF κ B vede k rezistenci na apoptotické signály prostřednictvím aktivace mnoha proteinů (například XIAP). Avšak v odpovědi na určité stimuly vede aktivace NF κ B k indukci apoptózy. Toto se vysvětluje aktivací některých proapoptotických proteinů, jako je interferonem regulovaný faktor 1, c-myc, p53 nebo kaspáza 1. Při některých virových infekcích je indukce apoptózy virem též závislá na aktivaci NF κ B (Ghobrial et al., 2005).

Ubikvitin/proteazómový systém je tvořený komplexem proteáz. Je zodpovědný za degradaci většiny intracelulárních proteinů, a tím se nepřímo účastní regulace buněčného růstu a apoptózy. Mnoho regulátorů buněčného cyklu a transkripčních faktorů jako je p53, cycliny a NFκB je regulováno tímto systémem. Jeho substrátem je také mnoho členů Bcl-2 rodiny proteinů. Indukce apoptózy prostřednictvím inhibitorů proteazómu je důsledkem akumulace proteinů jako je p53 nebo proapoptotický Bad a Bax (Ghobrial et al., 2005).

PI3K je kináza, která hraje centrální roli v signalizačních drahách důležitých pro přežití buňky, proliferaci, motilitu a tkáňovou neovaskularizaci. Je zvýšeně exprimovaná u mnoha typů nádorových onemocnění (Ghobrial et al., 2005).

IAPs (inhibitors of apoptosis proteins) jsou vysoce konzervované polypeptidy, které potlačují apoptózu tím, že působí jako přímé inhibitory určitých kaspáz. Do této rodiny patří XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP, survivin, apollon a livin. Je prokázáno, že IAPs mohou vázat a inaktivovat kaspázy 3, 7, a 9. Survivin je zvýšeně exprimován u významné části lidských malignit a například u kolorektálního karcinomu, karcinomu žaludku, prsu a plic je exprese survivinu asociována s kratším přežíváním. Exprese survivinu kolísá během buněčného cyklu, nejvyšší je na rozraní G2/M fáze a naopak exprese je rapidně snížena po zástavě buněčného cyklu. Zvýšená exprese survivinu může proto umožnit překonání G2 kontrolního bodu a vstoupit do mitózy i buňkám transformovaným (Gerl-Vaux, 2005)

„Heat shock proteins“ (Hsps) fungují jako chaperony, napomáhají správnému skládání proteinů do vyšších struktur. Jsou mimo jiné zvýšeně syntetizovány buňkami, které byly vystaveny zvýšené teplotě. Hsp 70 a Hsp 27 mají cytoprotektivní aktivitu, kromě tepelného stresu chrání buňky též proti většině apoptotických signálů. Hsp 70 může zachránit buňky před apoptózou indukovanou cestou TNF ještě po aktivaci efektorových kaspáz. Tyto studie ukazují, že tzv. bod odkud není návratu („point of no return“) je dále než se dříve předpokládalo. Hsps jsou běžně zvýšeně exprimovány v lidských nádorových buňkách a jejich exprese u určitých druhů rakovin je spojena se špatnou prognózou a rezistencí k terapii (Tamm et al., 2001).

3 Úloha apoptózy v terapii hematologických malignit

3.1 Mechanismus účinku tradičních postupů

Všechny tradiční terapeutické postupy, chemoterapie i radioterapie, využívají při výsledné realizaci svého cytotoxického účinku poškození DNA a následnou indukci apoptózy. Zároveň však mají též přímý toxický účinek, to znamená, že blokují důležité metabolické dráhy. To je velmi významné, protože látka, která by pouze indukovala apoptózu, by selhala právě u buněk s defektními apoptotickými drahami a rychle selektovala rezistentní klony (Gerl-Vaux, 2005). Buňky s defekty v apoptotických drahách jsou přesto ve výhodě a jejich přežití je častou příčinou selhání terapie (Rejhar-Vojtěšek, 2002).

Studie, které si kladly otázku, jaká apoptotická dráha a v jaké míře se uplatňuje při indukci apoptózy chemoterapeutiky, přinesly rozdílné výsledky. Několik studií naznačovalo, že protinádorové léky působí prostřednictvím indukce exprese ligandů receptorů smrti, zvláště Fas ligandu (FasL). Jiné však ukázaly, že chemoterapeutické látky spouští apoptózu indukcí uvolnění cytochromu-c z mitochondrií (Earnshaw-Kaufmann, 2000). Další studie zpochybnily důležitost receptorů smrti v apoptóze indukované chemoterapií pozorováním, že buňky rezistentní k Fas i buňky s nepřítomnou aktivní kaspázou 8 se ukázaly stejně citlivé k chemoterapii jako Fas senzitivní buňky (Tamm et al., 2001). Prokázanou výjimkou je 5FU (5-fluorouracil), kde hraje signalizace prostřednictvím Fas klíčovou roli. Závěry studií tedy vedou k tomu, že predominantní roli v lékově navozené apoptóze hraje mitochondriální dráha, i když není vyloučeno, že za určitých podmínek se může uplatnit i signalizace prostřednictvím Fas receptorů (Earnshaw-Kaufmann, 2000).

3.2 Nové směry v terapii nádorových onemocnění

Největším problémem dosavadních terapeutických postupů je jejich nespecifita, v důsledku které postihují ve velké míře též zdravé buňky a tkáně. Mohou být proto používány jen v omezených dávkách, a i přesto mají významné nežádoucí účinky. To je důvodem velké snahy vyvinout takové látky, které by selektivně ničily jen nádorové buňky a měly minimální efekt na buňky zdravé (Thorburn et al., 2004).

Mezi hlavní směry vývoje nových terapeutických metod patří genová terapie a terapie založené na ovlivnění apoptózy. Přesvědčivé důkazy získané ze studia zvířecích modelů

potvrzují přínos strategií cílených na ovlivnění apoptózy a ukazují jejich nesmírný potenciál pro terapeutickou intervenci u množství chorob, nejen nádorových. Ačkoli velký počet takových látek se v současné době vyvíjí, jen několik jich postoupilo do stadia klinických zkoušek nebo je již schváleno (Fisher-Schulze-Osthoﬀ, 2005).

3.2.1 Genová terapie

Strategie genové terapie nádorů spočívá ve vnesení takové nové genetické informace do buňky, která vede k likvidaci nádorových buněk (Kapras et al., 1998). Strategie genové terapie by mohly být použity v případě nadprodukce proapoptotických proteinů rodiny bcl-2 nebo k obnovení původního typu p53 u nádorových buněk (Fisher-Schulze-Osthoﬀ, 2005).

Jelikož mutace p53 je daleko nejobvyklejší genetickou abnormalitou nádorových buněk, vyvíjí se velké množství adenovirových vektorů, které by byly schopné obnovit jeho funkci v transformovaných buňkách. Tyto snahy ovšem narážejí nejen na technologické překážky, ale též na nutnost cíleného doručení genů do transformovaných buněk, protože Ghobrial et al., 2005 prokázala při použití adenoviru nesoucího p53 indukci apoptózy i u netransformovaných thymocytů. Tento problém se pokouší překonat konstrukce geneticky upravených virů (Khuri et al., 2000).

ONYX015 je replikace schopný rekombinantní adenovirus schopný selektivně ničit pouze buňky s mutovaným p53. Tento rekombinantní adenovirus nemá E1B gen, který umožňuje divokým typům zablokovat funkci p53. Produkt E1B genu se váže na p53 a tím umožňuje virovou replikaci a nakonec i zabití buňky. Mutantní adenoviry nemající E1B gen jsou proto neschopné proliferovat v normálních buňkách, ale jsou toho schopné v buňkách postrádajících p53. ONYX015 by tedy neměl mít efekt na zdravé buňky (Ghobrial et al., 2005; Hu-Kavanagh, 2003), i když tato selektivita byla též zpochybněna (Rothmann T. et al., 1998). Potenciální terapeutické využití ONYX015 v kombinaci s cisplatinou a 5-fluorouracilem se testuje ve fázi klinických zkoušek (Khuri et al., 2000).

Jedním z nejpokročilejších produktů genové terapie je RPR/INGN201. Je to nekompletní virus neschopný replikace, který má obnovit expresi p53. Preklinické studie na lidských buněčných liniích a zvířatech s rakovinou hlavy a krku ukázaly, že p53 obsažený v RPR/INGN201 je v cílových buňkách efektivně transkribován. V současné době je

RPR/INGN201 ve třetí fázi klinických zkoušek pro rakovinu hlavy a krku (Fisher-Schulze-Osthoff, 2005).

Mezi hlavní omezení a problémy genové terapie patří malá efektivita vektorů a hepatotoxicita asociovaná s jejich systémovým podáním (Fisher-Schulze-Osthoff, 2005).

3.2.2 Terapie založené na ovlivnění apoptózy

Porozumění mechanismům apoptózy umožňuje vývoj nových terapeutických postupů, které mohou cíleně indukovat smrt nádorových buněk nebo zvýšit jejich citlivost k chemoterapii a radioterapii (Ghobrial et al., 2005). Nádorové buňky mající alterované proteiny účastníci se apoptózy jsou často rezistentní k chemoterapii, protože chemoterapeutika z velké části pracují právě na principu indukce apoptózy. Proto látky, které by dokázaly apoptotické dráhy obnovit, by mohly být efektivními léky pro mnoho typů nádorových onemocnění. Zároveň by tímto mohlo být dosaženo i cílenější ničení nádorových buněk, protože narozdíl od normálních buněk, nádorové buňky jsou okolními signály určeny k zániku a jejich přežití je vysoce závislé na defektech v apoptotických drahách (Fesik, 2005).

Woynarowska a Woynarowski (2002) uvádí ve své práci hlavní výhody likvidace nádorových buněk spuštěním apoptózy. Apoptóza je fyziologický proces, proto je spojena s menším výskytem nežádoucí reakce okolních tkání. Dysregulace normálních apoptotických drah přispívá k expanzi nádoru a jeho rezistenci. Pro úspěšnou léčbu nestačí jen zastavit růst nádorové populace, neboť pomalu rostoucí buňky, které se zotavují z neapoptotického poškození přinášejí riziko selekce agresivnějších nebo rezistentních klonů. Vyvolání apoptózy toto riziko zásadně snižuje, protože apoptotické buňky již nemohou být klonogenní. Dalším důvodem je to, že pomalu proliferující nádory je velmi těžké eradikovat tradičními chemoterapeutiky, které jsou cílené na rychle se dělící buňky.

Mezi hlavní problémy strategií zaměřených na indukci apoptózy patří problém specificity. Je celkem snadné odstartovat apoptózu, ale je již mnohem těžší indukovat ji pokud možno jen v nádorových buňkách. Klíčem k selektivitě může být například poznání, že signály k pokračování buněčného cyklu zároveň zcitlivují buňky k apoptóze, tím je zajištěna závislost tkáňové expanze na dostupnosti exogenních růstových faktorů. Buňka, která má

porušenou jednu z drah vyvolávajících apoptózu, by teoreticky měla mít ostatní dráhy k apoptóze dokonce víc citlivé (Green-Kroemer, 2005). Další problém vyplývá z toho, že apoptóza je komplexní fyziologický proces závislý na integrované funkci velkého množství genových produktů. Proto jakákoli léčebná strategie závislá pouze na indukci apoptózy povede k rychlému vzniku klonů rezistentních k buněčné smrti (Hoffbrand-Wickremasinghe, 1999). Dále je třeba zmínit, že efekt léků ovlivňujících apoptózu je signifikantně variabilní dokonce i u identicky klasifikovaných pacientů, protože tento efekt záleží též na polymorfismu genů pro metabolismus léčiv (Schuler-Szende, 2004).

Proteiny účastníci se apoptózy mohou být teoreticky ovlivňovány chemoterapeutiky na více úrovních, a to ovlivněním transkripce, mRNA nebo samotného proteinu (Pellecchia-Reed, 2004). Jednou z možností jak tato nová chemoterapeutika dělit je podle dráhy, kterou zasahují (dráhu receptorů smrti, mitochondriální dráhu, společnou dráhu čili exekuční kaspázy nebo proteiny regulující indukci apoptózy) (Ghobrial et al., 2005).

3.2.2.1 Látky ovlivňující dráhu receptorů smrti

Myšlenka možnosti ovlivnění specifických receptorů smrti a následné indukce apoptózy u nádorových buněk je velmi atraktivní, protože receptory smrti přímo spouští kaspázovou mašinerii a to bez potřeby funkčního p53 (Tamm et al., 2001) a také při rezistenci k chemoterapii způsobené nadprodukcí antiapoptotických proteinů Bcl-2 rodiny (Fisher-Schulze-Osthoff, 2005). Do této skupiny patří například monoklonální protilátky agonistické k DR4 a DR5, „all trans“ retinová kyselina (ATRA) a rekombinantní lidský TRAIL (Ghobrial et al., 2005).

Monoklonální protilátky (HGS-ETR1, HGS-ETR2, HGS-TR2) s agonistickou funkcí na DR4 (TRAIL R1) a DR5 (TRAIL R2) jsou schopny indukovat apoptózu a v současné době jsou ve fázi I a II klinických zkoušek (Ghobrial et al., 2005).

„All trans“ retinová kyselina (ATRA) je jedním z prvních příkladů použití cílené terapie u lidských malignit. Uplatňuje se u akutní promyelocytární leukémie, kde indukuje diferenciaci leukemických buněk. Také se soudí, že indukuje apoptózu cestou receptorů smrti. Léčbou ať už samotnou ATRA, nebo v kombinaci s další chemoterapií se dosahuje úplné remise u 85-95% pacientů. Jedním z hlavních vedlejších účinků je tzv. ATRA syndrom

charakterizovaný respiračními obtížemi, horečkou, plicními infiltráty a pleurálním výpotkem a vyskytující se až u 26% takto léčených pacientů (Ghobrial et al., 2005).

Při hledání možností, jak ovlivnit specifické receptory smrti, se nejprve zvažovalo podávání TNF a FASL nebo jejich analogů. Avšak klinická použitelnost těchto ligandů je znemožňována jejich toxickými vedlejšími účinky. Navázání TNF na receptor spouští totiž dvě paralelní dráhy, které se rozdělují u adaptorového proteinu TRADD (TNF receptor-associated death domain). Jedna dráha vede k aktivaci kaspáz a spuštění apoptózy. Druhá dráha spouští aktivaci transkripčních faktorů rodiny NF- κ B. NF- κ B ovlivňuje expresi mnoha cílových genů zahrnutých v imunitních dějích, ale také genů potlačujících apoptózu. Ve výsledku tedy tato dráha nuluje aktivaci kaspázovou a navíc způsobuje zánětlivé vedlejší účinky (Pellecchia-Reed, 2004). Systémová aplikace TNF způsobuje SIRS (severe inflammatory response syndrome), který se podobá septickému šoku a injekce agonistů Fas může být letální, kvůli masivnímu vyvolání apoptózy hepatocytů (Tamm et al., 2001). Nicméně některé studie poukazují na to, že i TNF by mohl být v léčbě nádorových onemocnění využit. Ukázalo se totiž, že dokáže ničit cévy zásobující nádor a to vyvoláním apoptózy, aniž by poškozoval normální cévy. Navíc zlepšuje cévní propustnost pro jiné cytotoxické léky (Fisher-Schulze-Osthoff, 2005).

Bezpečnější látkou se ukázal být TRAIL. Za prvé, mnoho tkání konstitutivně exprimuje TRAIL, takže exprese sama o sobě pravděpodobně pro normální buňky není toxická. Za druhé, ačkoli DR4 a DR5 mohou aktivovat NF- κ B, jsou-li zvýšeně exprimovány, TRAIL ho aktivuje pouze slabě. Za třetí, DR4 a DR5 jsou exprimovány v normální tkáni a u mnoha typů nádorových buněk, zatímco návnadové receptory DcR1 a DcR2, které nemají doménu smrti jsou exprimovány u normálních buněk, ale u nádorových buněk jen vzácně. Tato rozdílná exprese receptorů mezi normálními a nádorovými buňkami, může umožňovat TRAIL indukovat apoptózu nádorových buněk, ale ušetřit buňky zdravé (Tamm et al., 2001). Důležitým rysem léčby pomocí TRAIL je silný synergický efekt při kombinaci s cytostatiky nebo radioterapií. Specifické detaily mechanismu tohoto potencujícího účinku nejsou známy, avšak mohly by zahrnovat indukci transkripce receptorů smrti TRAIL R1 a TRAIL R2, dále redukci exprese antiapoptotických proteinů jako je Bcl-2, Bcl-XL a c-FLIP, nebo zvýšenou expresi proapoptotických proteinů jako je FADD, Smac a HtrA2. Malignity (mezi nimi též například akutní myeloidní leukemie), které neodpovídaly na standartní léčbu, získaly po suplementaci TRAIL znovu citlivost (Fisher-Schulze-Osthoff, 2005; Los et al., 2003). Obavy

týkající se bezpečnosti použití TRAIL vyvolalo zjištění, že TRAIL indukoval apoptózu v kultuře lidských hepatocytů (Jo et al., 2000). Toto pozorování se však později vysvětlilo tím, že byl použit derivát TRAIL s připojenou polyhistidinovou skupinou, která změnila jeho biochemické vlastnosti. Intravenózní aplikace TRAIL neobsahující tento polyhistidinový zbytek opicím a šimpanzům neprokázala žádný škodlivý efekt jak v laboratorních parametrech, tak v tkáňové histologii (Lawrence et al., 2001). Nyní je TRAIL zařazen do preklinických i klinických studií (Fisher-Schulze-Osthoff, 2005).

3.2.2.2 Látky ovlivňující mitochondriální dráhu

Mnoho chemoterapeutik způsobuje poškození DNA, což je silným signálem pro aktivaci p53. p53 poté zvyšuje transkripci proteinů majících pouze BH3 doménu (př. Noxa, Puma) a aktivuje se proces apoptózy. Z toho vyplývá, že poškození funkce p53 velmi významně sníží účinnost těchto chemoterapeutik (Chan-Yu, 2004). Proto látky, které by působily přímo na klíčové proteiny nebo přímo na mitochondrii, by mohly být užitečné k obnovení citlivosti těchto buněk na léčbu.

Změna permeability mitochondriální membrány je velmi důležitou změnou v buňkách realizujících apoptózu. Existují cytotoxické látky indukující tuto změnu propustnosti přímým účinkem na mitochondrie, které tak mohou spustit apoptózu i u buněk, u kterých je nějakým způsobem znemožněn přenos zevních apoptotických signálů (Debatin et al., 2002). Některé z těchto látek se již používají v klinické praxi a další se vyvíjejí (Fisher-Schulze-Osthoff, 2005).

Příkladem látky, která se již v klinické praxi používá je oxid arsenitý. Oxid arsenitý ve vyšších koncentracích indukuje u leukemických buněk apoptózu narušením mitochondriální membrány, v nižších koncentracích indukuje diferenciaci. Je schválen pro léčbu akutní promyelocytární leukémie. A je ve fázi klinických zkoušek pro další malignity, například mnohočetný myelom. Hlavní vedlejší účinky oxidu arsenitého jsou kongestivní srdeční selhání, prodloužení QT intervalu, arytmie typu torsade de points, hypokalémii a hypomagnezémii (Ghobrial et al., 2005).

Zástupcem látek ve fázi klinických zkoušek je například lonidamin. Lonidamin má mohutný antiproliferační účinek na nádorové buňky tím, že inhibuje spotřebu kyslíku, interferuje s energetickým metabolismem (Ghobrial et al., 2005) a indukuje tvorbu kanálů

v mitochondriální membráně (Fisher-Schulze-Osthoff, 2005). Lonidamin v experimentálních modelech dále prokázal schopnost překonat rezistenci nádorových buněk k cisplatině a podporovat její cytotoxicitu (Ravagnan et al., 1999).

3.2.2.3 Proteiny Bcl-2 rodiny

Zvýšená exprese antiapoptotických členů rodiny Bcl-2 je častá u mnoha typů nádorů a podílí se též na rezistenci k chemoterapii (Ricci-Zong, 2006). Strategie zaměřené na ovlivňování těchto proteinů se ubírají čtyřmi základními směry. Je to regulace genové transkripce, indukce mRNA degradace pomocí antisense oligonukleotidů, přímé atakování antiapoptotických členů Bcl-2 rodiny a ovlivňování jejich endogenních antagonistů (Pellecchia-Reed, 2004).

Mezi látky regulující genovou transkripci patří některé syntetické retinoidy, u kterých bylo prokázáno, že redukuje hladinu mRNA pro Bcl-2 nebo Bcl-X_L v leukemických buňkách. Toto pozorování by mohlo být i potenciálním vysvětlením jejich proapoptotického působení prokázaného již v klinické praxi (Pellecchia-Reed, 2004). Dále se vyvíjejí například látky, které inhibují histonovou deacetylázu (HDAC), a tím také redukuje expresi Bcl-2 a Bcl-X_L na úrovni transkripce u některých leukemických buněk. S inhibitory HDAC probíhají v současné době klinické studie (Mori et al., 2004)

Schopnost atakovat Bcl-2 mRNA mají takzvané antisense oligonukleotidy. Nejdále ve vývoji je antisense oligonukleotid G3139 (oblimersen sodium, Genasense) vytvořený tak, aby se specificky vázal na prvních šest kodonů lidské mRNA pro Bcl-2. Tato mRNA je poté degradována a výsledkem je pokles hladiny Bcl-2 proteinu. V současné době je tato látka ve III. fázi klinických zkoušek pro refrakterní chronickou lymfocytární leukemii, akutní myeloidní leukemii a myelom (Chan-Yu, 2004). Dosavadní výsledky naznačují slibnou aktivitu proti B-buněčným malignitám a akutní myeloidní leukemii dospělých, avšak neprokázal se žádný užitek u myelomu. Vedlejší účinky zahrnují únavu, trombocytopenii (Los et al., 2003).

Mezi látky vázající přímo antiapoptotické proteiny patří skupina malých molekul se specifickou strukturou. Díky své struktuře jsou tyto malé molekuly schopny se vázat do hydrofobního záhybu ve struktuře Bcl-2 a Bcl-x_L. Toto místo je nezbytné pro funkci antiapoptotických proteinů a navázané molekuly je tak inaktivují (Kasibhatla-Tseng, 2003).

Dále se intenzivně zkoumá možnost použití inhibitorů funkce Bcl-2/ Bcl_{XL} (Chan-Yu, 2004). Některé tyto látky jsou již ve fázi klinických zkoušek. Například přírodní produkt gossypol, který je schopen vázat a inhibovat Bcl-2. Je to látka obsažená v semenech bavlny a původně byla užívána jako prostředek bylinkářské medicíny v Číně. Avšak gossypol je velmi reaktivní látka, obsahující dva aldehydy, pravděpodobně vysvětlující jeho toxicitu a nepříznivé farmakologické vlastnosti. Proto je snaha vyvinout jeho semisyntetický analog. Nejdále je látka apogossypol, kde byly tyto dva aldehydy eliminovány. Několik dalších chemických inhibitorů Bcl-2 a Bcl-_{XL} a Mcl-1 prochází nyní preklinickým testováním (mimo jiné i určité látky obsažené v černém a zeleném čaji) (Pellecchia-Reed, 2004). Další látkami ve vývoji jsou antimycin A a chelerythrin (Chan-Yu, 2004). Chelerytin je přírodní alkaloid, který efektivně indukuje apoptózu u buněk se zvýšenou expresí Bcl-2 nebo Bcl-_{XL}, pravděpodobně inhibicí interakce mezi Bcl-_{XL} a Bak (Fisher-Schulze-Osthoff, 2005).

Další strategie jsou zaměřené na látky aktivující endogenní antagonisty Bcl-2. Například, TR3 (Nur77), sirotčí receptor z retinoidové/steroidové rodiny nukleárních receptorů, se v odpovědi na určité apoptotické signály přesouvá z jadra do cytosolu. V cytosolu se TR3 váže s regulační doménou Bcl-2 a indukuje u něj zásadní konformační změny způsobující expozici BH3 domény a měnící Bcl-2 z antiapoptotického na proapoptotický. Bcl-2 může zaujímat dva konformační stavy, antiapoptotický, u něhož je BH3 doména maskovaná a proapoptotický, kdy je exponovaná. Proapoptotická forma může aktivovat proapoptotické proteiny Bax a Bak nebo inaktivovat antiapoptotické proteiny, jako je Bcl-_{XL}. Vyvíjejí se proto látky indukující expresi TR3 a jeho translokaci do cytosolu. Akt/protein kináza B pravděpodobně ruší proapoptotické působení TR3. Akt se proto též stává cílem pro vývoj léků, vyvíjejí inhibitory Akt (Pellecchia-Reed, 2004). Další možný přístup zahrnuje použití proapoptotických proteinů majících pouze BH3 doménu nebo molekul, které tyto domény imitují a indukují tak apoptózu (Fesik, 2005).

Terapie založené na ovlivňování Bcl-2 mají však i významná omezení. Například použití antisense nukleotidů je omezeno pouze na nádory mimo CNS, protože oligonukleotidy neprochází hematoencefalickou bariérou. Navíc, klinické studie prokázaly negativní prognostickou hodnotu Bcl-2 jen částečně (Hamilton-Piccart, 2000). Například buňky zvýšeně exprimující Bcl-2 mají také sníženě fosforylovaný Rb-protein a snížení hladiny Bcl-2 antisense terapií podpořilo proliferaci buněk akutní myelodní leukemie (Konopleva et al., 2000). Dalším problémem je, že mutace potlačující antiapoptotickou aktivitu Bcl-2 také ruší

jeho účinky na průběh buněčného cyklu (O'Connor et al., 2000). Také je třeba objasnit, do jaké míry bude terapie specifická pro nádorové buňky a jestli ji bude možno použít jako samostatnou léčbu nebo jen v kombinaci s jinými cytostatiky (Hu-Kavanagh, 2003).

3.2.2.4 Látky ovlivňující aktivaci kaspáz

Tato skupina zahrnuje syntetické aktivátory kaspáz, apoptotin a inhibitory proteinů rodiny IAP (Ghobrial et al., 2005).

Kaspázy jsou zdaleka nejpopulárnějším cílem pro vývoj nových léků modulujících apoptózu. Kromě své dobře známé roli při buněčné smrti a zánětu, mohou být kaspázy zahrnuty i v dalších klíčových buněčných procesech, jako je diferenciaci a progresi buněčného cyklu, a ačkoli tato oblast činnosti kaspáz stále ještě není osvětlena, mohla by být zodpovědná za nečekané účinky pozorované při farmakologické manipulaci s kaspázami (Los et al., 2003). Syntetické aktivátory kaspáz vedou k agregaci buněčných proteinů s následnou aktivací kaspáz. Tyto aktivátory jsou připravovány tak, aby byly inducibilní. Toho je docíleno tím, že obsahují domény schopné dimerizovat po vystavení určité chemické látky. Geny pro syntetické aktivátory kaspáz jsou doručeny adenovirovým vektorem a následně v nádorových buňkách aktivovány pomocí dimerizační látky schopné pronikat buněčnou membránou (MacCorkle et al., 1998; Shariat et al., 2001). Mnoho takových látek je nyní v preklinickém vývoji (Fisher-Schulze-Osthoff, 2005). Testuje se též další možnost aktivace kaspázy-3. Kaspáza-3, klíčový exekutor apoptózy, je inhibována intramolekulárními elektrostatickými interakcemi. Toto zjištění dává naději na vývoj malých farmakologicky aktivních molekul, schopných snížit práh aktivace nebo dokonce kaspázy aktivovat (Los et al., 2003).

Apoptotin je protein odvozený z viru kuřecí anémie, schopný indukovat apoptózu u maligních buněk, ale ne u buněk zdravých (Kleinberger, 2000; Rohn -Noteborn, 2004). Tato selektivita může být způsobena tím, že u zdravých buněk je apoptotin lokalizován v cytoplazmě, zatímco u transformovaných migruje do jádra, kde je aktivován. Tato látka je ve stadiu preklinického testování (Fisher-Schulze-Osthoff, 2005).

Proteiny rodiny IAP hrají významnou roli v inhibici apoptózy a regulaci buněčného cyklu. IAPs jsou schopné snižovat aktivitu určitých kaspáz. Jejich patologicky zvýšená exprese byla dokumentována u řady nádorových onemocnění, včetně leukemií (Pellecchia-Reed, 2004). V současné době jsou v preklinickém výzkumu například antisense

oligonukleotidy cílené na survivin a XIAP (Fisher-Schulze-Osthoff, 2005) a byly též identifikovány dvě třídy antagonistů XIAP zahrnující deriváty fenylureáz a benzonsulfonamidové deriváty (Pellecchia-Reed, 2004). Aktivita IAPs je inhibovaná prostřednictvím Smac/Diablo (second mitochondria derived activator of caspase/direct inhibitor-of-apoptosis protein binding protein with low pI) a později objeveného proteinu Omi/HtrA2 (heat-inducible serine protease A2), který může též vázat a inhibovat XIAP (Hu-Kavanagh, 2003). Probíhá tedy hledání molekuly, která by měla obdobné účinky jako Smac. Doposud vyvinuté smac-like peptidy často nedokázaly indukovat apoptózu samy, avšak zcitlivovaly nádorové buňky na jiná chemoterapeutika (Fulda et al., 2002). Nikolovska-Coleska et al. (2004) objevila nízkomolekulární látku schopnou procházet buněčnou stěnou, aktivovat kaspázu-9 a indukovat apoptózu u nádorových buněk prostaty zvýšeně exprimujících XIAP. Navíc má pouze malý efekt na normální epitelové buňky. Je to látka přírodní povahy a byla nazvána embelin. Embelin by tak mohl být vedoucí látkou při vývoji Smac agonistů (Nikolovska-Coleska et al., 2004).

3.2.2.5 Modulátory molekul regulujících indukci apoptózy

Molekuly regulující indukci apoptózy zahrnují zejména inhibitory proteazómu, inhibitory mTOR, p53 inhibitory a „heat shock proteins“ (Hsps)

Ubiquitin/proteazómový systém se v modulaci indukce apoptózy uplatňuje tím, že ovlivňuje hladinu regulačních proteinů. Inhibitory proteazómu prokázaly protinádorovou aktivitu a učinily buňky citlivější k vyvolání apoptózy. Efekt těchto látek by mohl být alespoň částečně selektivní, protože vyvolává apoptózu jen v buňkách dělicích se nebo transformovaných. Například zvýšená exprese c-myc onkogenu způsobuje, že jsou tyto transformované buňky citlivější k apoptóze indukované proteazómovým systémem. Mezi inhibitory proteazómu patří například bortezomib (boronic acid inhibitor). Jeho důležitou vlastností je, že rezistence na něj je velmi vzácná, a to dokonce i u buněk s nefunkčním p53 a nadprodukcí Bcl-2 rezistentních na jiné látky. Mezi nežádoucí účinky patří horečka, únava, trombocytopenie, mírný průjem a periferní neuropatie. Bortezomib byl již schválen k léčbě refrakterního myelomu a je v klinickém testování pro další typy nádorů (Los et al., 2003) Farmakologická inhibice proteazómové aktivity potlačuje mimo jiné též degradaci I- κ B, který inhibuje transkripční faktor NF- κ B (Berenson et al., 2001). Abnormální zvýšení aktivity NF- κ B se vyskytuje u mnoha nádorů, včetně hematologických malignit. Pod kontrolou rodiny NF- κ B je též FLIP, inhibitor cIAP2, Bcl-XL, Bfl-1, způsobující rezistenci k apoptóze

spuštěné dráhou receptorů smrti u mnoha nádorových buněk, včetně RS buněk Hodgkinských nádorů, buněk Burkittova lymfomu a dalších. FLIP protein je vysoce podobný prokaspáze-8 a -10, ale nemá enzymatickou aktivitu. Tvoří s těmito prokaspázami komplexy, čímž brání jejich aktivaci a také soutěží o vazebná místa v komplexech receptorů smrti. Nadměrná exprese FLIP se vyskytuje běžně u mnoha B-buněčných malignit a některých AML a CLL. Vyvíjejí se proto látky, které by redukovaly expresi FLIP (Los et al., 2003).

mTOR (mammalian target of rapamycin) je součást PI3K/Akt dráhy. Inhibitory mTOR se tedy uplatní u nádorových buněk, které mají tuto dráhu konstitutivně aktivovanou. Přírodní látka rapamycin je mTOR inhibitor, který má antibiotické, imunosupresivní a protinádorové účinky. Je schválen jako imunosupresivum pro pacienty po renální transplantaci. Ve fázi klinického testování je například ester rapamycinu CCI-779, který prokázal cytostatickou aktivitu in vitro i in vivo (Ghobrial et al., 2005)

Metody genové terapie cílené na p53 byly již zmíněny výše. Existuje však i další možnost jak obnovit a stabilizovat funkci p53, a to inhibicí navázání Mdm2 na p53. Mdm2 je negativní regulátor proteinu p53, označuje ho totiž pro následnou degradaci proteazómem. Nejnovějším Mdm2 antagonistou je furanový derivát RITA [2,5-bis(5-hydroxymethyl-2-thienyl)furan] ((Fisher-Schulze-Osthoff, 2005).

„Heat shock proteins“ (HSPs) náleží do superrodiny molekulárních chaperonů, látek stabilizujících proteiny a polypeptidy a minimalizují výskyt proteinů se špatnou skladbou. Hlavním proteinem tepelného šoku je HSP70, který chrání buňku před různými stresovými faktory a dokáže zabránit indukci apoptózy. Zkoumá se proto možnost využití inhibitorů HSPs.

4 Závěr: Možnosti a problémy v klinické praxi

Dráhy regulující realizaci buněčné smrti byly během poslední dekády osvětleny do velkých detailů, což umožňuje vývoj mnoha nových léčebných strategií zaměřených na selektivní destrukci nádorových buněk (Green-Kroemer, 2005). Nové látky dávají naději nejen na účinnější, ale též na šetrnější léčbu. Budoucnost terapie nádorových onemocnění by měla být charakterizována individuální léčbou a pečlivou volbou cílů léčby (Los et al., 2003). Stále ale zbývá mnoho problémů pro další výzkum. Mezi hlavní patří problém specifity. Není obtížné odstartovat apoptózu, problémem zůstává, aby postihla jen nádorové buňky. Dále je třeba počítat s tím, že apoptóza je komplexní fyziologický proces závislý na integrované funkci velkého množství genových produktů, a proto jakákoli léčebná strategie závislá pouze na indukci apoptózy povede k rychlému vzniku klonů rezistentních k buněčné smrti (Hoffbrand-Wickremasinghe, 1999). Cílem je též optimalizovat spektrum aktivity nových látek, zlepšit jejich farmakologické vlastnosti a stanovit maximální terapeutickou dávku (Pellecchia-Reed). Největší výzvou je převést mnoho slibných výsledků z preklinických výzkumů do klinické praxe (Fisher-Schulze-Osthoff, 2005).

Souhrn

Apoptóza je typ programované buněčné smrti. Je to aktivní děj, zprostředkovaný kaspázami a vedoucí k odstranění určitých buněk, aniž by vyvolal zánětlivou reakci okolní tkáně. Je to proces nezbytný pro udržení homeostázy i správného vývoje a funkce organismu. Poruchy apoptózy jsou spojené se vznikem celé řady onemocnění, včetně nádorových.

Porozumění mechanismům apoptózy umožnilo vývoj nových terapeutických postupů, které mohou cíleně indukovat smrt nádorových buněk nebo zvýšit jejich citlivost k chemoterapii a radioterapii. Tyto nové strategie dávají naději na léčbu nejen účinnější, ale též šetrnější. Mezi hlavní směry vývoje nových terapeutických metod patří genová terapie a terapie založené na ovlivnění apoptózy. Metody genové terapie zahrnují v současné době především konstrukci virových vektorů, které by byly schopny obnovit expresi funkčního p53 do transformovaných buněk. Mezi hlavní omezení a problémy genové terapie patří malá efektivita vektorů a hepatotoxicita asociovaná s jejich systémovým podáním. Terapie založené na ovlivnění apoptózy zahrnují aktivaci receptorů smrti, aktivaci mitochondriální dráhy, aktivaci kaspáz a dále ovlivnění molekul regulujících indukcii apoptózy, k nimž patří například inhibitory proteazómu, inhibitory mTOR, p53 inhibitory a „heat shock proteins“ (Hsps). Mezi hlavní problémy strategií zaměřených na indukcii apoptózy patří problém specificity. Další problém vyplývá z toho, že apoptóza je komplexní fyziologický proces závislý na integrované funkci velkého množství genových produktů. Proto jakákoli léčebná strategie závislá pouze na indukcii apoptózy povede k rychlému vzniku klonů rezistentních k indukcii buněčné smrti. Dále je třeba zmínit, že účinek léků ovlivňujících apoptózu je signifikantně variabilní dokonce i u identicky klasifikovaných pacientů, protože záleží též na polymorfismu genů pro metabolismus léčiv. Největší výzvou je převést mnoho slibných výsledků z preklinických výzkumů do klinické praxe (Fisher-Schulze-Osthoﬀ, 2005).

Summary

Apoptosis is a type of programmed cell death. It is an active caspase-mediated process, which results in the removal of certain cells without inflammatory response of the surrounding tissue. It is a process indispensable for maintaining homeostasis, proper development and function of the organism. Defects of apoptosis are related to various diseases, including cancer.

Understanding apoptotic mechanisms made it possible to develop new therapeutical strategies, which can specifically induce death of cancer cells or sensitize them to chemotherapy or radiotherapy. These new strategies raise hope for the treatment not only more efficient, but also more gentle. The main directions in the development of new therapeutical methods include gene therapy and therapies based on affecting apoptosis. Recently methods of gene therapy include, above all, the construction of viral vectors, which would be able to restore expression of p53 to transformed cells. Most important restrictions of these therapies are low effectiveness of vectors and hepatotoxicity associated with its systemic administration. Therapies based on affecting apoptosis involve activation of death receptors, activation of the mitochondrial pathway, activation of caspases, and also influencing of regulating molecules of apoptosis induction, e.g. inhibitors of proteasome, inhibitors of mTOR, p53 inhibitors, and heat shock proteins. One of the main problems of strategies focused on apoptosis induction represent the problem of specificity. Another problem results from the fact that apoptosis is a complex physiological process depending on the integrated function of a large amount of gene products. That is why any therapeutical strategy depending only on the induction of apoptosis will result in a rapid development of clones resistant to death induction. Furthermore, the effect of drugs affecting apoptosis is significantly variable even in identically classified patients because the effect also depends on polymorphism of genes for drug metabolism. The greatest challenge is to transform many promising results from preclinical research to clinical practice (Fisher-Schulze-Osthoff, 2005).

Seznam použité literatury

KAPRAS, J., KOHOUTOVÁ, M., OTOVÁ, B. Genetika onkogeneze. In *Kapitoly z lékařské biologie a genetiky 1*. Praha: Karolinum, 1998, s. 57-73. ISBN 80-7184-322-1

KAPRAS, J., KOHOUTOVÁ, M. Dědičnost mechanismů reprodukce a ontogeneze. In *Kapitoly z lékařské biologie a genetiky 3*. Praha: Karolinum, 1999, s. 77-101. ISBN 80-246-0001-3

REJHAR, A., VOJTĚŠEK, B. *Obecná patologie nádorového růstu*. Praha: Grada Publishing, 2002. ISBN 80-247-0238-X

Alam, J. J. Apoptosis: target for novel drugs. *Trends in Biotechnology*, 2003, vol.21, no.11, p. 479-483.

Berenson J.R. et al. The role of nuclear factor-kappaB in the biology and treatment of multiple myeloma. *Seminars in Oncology*, 2001, vol. 28, no.6, p. 626–633.

Chan, S., Yu, V. C. Proteins of the Bcl-2 Family in Apoptosis Signalling: From Mechanistic Insights to Therapeutic Opportunities. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2004, vol. 31, no. 3, p. 119-128.

Cookson, B. T., Fink, S. L. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukariotic Cells. *Infection and Immunity*, 2005, vol. 73, no. 4, p. 1907-1916.

Debatin K.M. et al. Chemotherapy: targeting the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene*, 2002, vol. 21, p. 786–8803.

Duckett C. S., Wright, C. W. Reawakening the Cellular Death Program in Neoplasia through the Therapeutic Blockade of IAP Function. *The Journal of Clinical Investigation*, 2005, vol. 115, no. 10, p. 2673-2678

Earnshaw, W.C., Kaufmann, S. H. Induction of Apoptosis by Cancer Chemoterapy. *Experimental Cell Research*, 2000, vol. 256, no. 1, p. 42-49.

Fesik, S.W. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nature*, 2005, vol. 5, p. 876-885.

Fisher, U., Schulze-Osthoff, K. New Approaches and Therapeutics Targeting Apoptosis in Disease. *Pharmacological Reviews*, 2005, vol. 57, no. 2, p. 187–215.

Fulda S. et al. Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo. *Nature Medicine*, 2002, vol. 8, no. 8, p. 808–815.

Gerl, R., Vaux, D.L. Apoptosis in the development and treatment of cancer. *Carcinogenesis*, 2005, vol.26, no.2, p.263—270.

Ghobrial, I. M. et al. Targeting Apoptosis Pathway in Cancer Therapy. *A Cancer Journal for Clinicians*, 2005, vol. 55, no. 3, p. 178-194.

Gores, G. J., Kaufmann, S. H. Apoptosis in Cancer: Cause and Cure. *BioEssays*, 2000, vol. 22, no. 11, p.1007-1017.

Green, D. R., Kroemer, G. Pharmacological Manipulation of Cell Death: Clinical Applications in Sight? *The Journal of Clinical Investigation*, 2005, vol.115, no.10, p. 2610-2617.

Hamilton, A., Piccart, M. The contribution of molecular markers to the prediction of response in the treatment of breast cancer: a review of literature on HER-2, p53 and Bcl-2. *Annals of Oncology*, 2000, vol. 11, no. 6, p. 647-663.

Hu, W., Kavanagh J. J. Anticancer Therapy Targeting the Apoptotic Pathway. *The Lancet Oncology*, 2003, vol. 4, no. 12, p. 721–29.

Jo M. et al. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nature Medicine*, 2000, vol. 6, no. 5, p. 564–567.

Khuri F.R. et al. A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nature Medicine*, 2000, vol. 6, no. 8, p. 879–885.

Kim, R. Recent Advances in Understanding the Cell Death Pathways Activated by Anticancer Therapy. *Cancer*, 2005, vol. 103, no. 8, p. 1551-1560.

Kleinberger T. Induction of apoptosis by adenovirus E4orf4 protein. *Apoptosis*, 2000, vol. 5, no 3, p. 211–215.

Konopleva, M. et al. Liposomal Bcl-2 antisense oligonukleotides enhance proliferation, sensitize acute myeloid leukemia to cytosine-arabioside, and induce apoptosis independent of other antiapoptotic proteins. *Blood*, 2000, vol. 95, no. 12, p. 3929-3938.

Košťanová-Poliaková, D., Šabová, L. Anti-apoptotic proteins-targets for chemosensitization of tumor cells and cancer treatment. *Neoplasma*, 2005, vol. 52, no.6, p. 441-449.

Lawrence D. et al. Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nature Medicine*, 2001, vol. 7, no. 4, p. 383–385.

Los, M. et al. Anticancer Drugs of Tomorrow: Apoptotic Pathways as Targets for Drug Design. *Drug Discovery Today*, 2003, vol. 8, no. 2, p. 67-77.

MacCorkle R.A. et al. Synthetic activation of caspases: artificial death switches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, vol. 95, no. 7, p. 3655–3660.

Mori, N et al. Apoptosis induced by the histone deacetylase inhibitor FR901228 in human T-cell leukemia virus type 1-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. *Journal of Virology*, 2004, vol. 78, no. 9, p. 4582-4590.

Nikolovska-Coleska Z. et al. Discovery of embelin as a cell-permeable, small-molecularweight inhibitor of XIAP through structure-based computational screening of

atraditional herbal medicine three-dimensional structure database. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2004, vol. 47, no. 10, p. 2430–2440.

O' Connor et al. Apoptosis and cell division. *Current Opinion in Cell Biology*, 2000, vol. 12, no 2, p.257-263.

Pellecchia, M., Reed, J. C Apoptosis-based Therapies for Hematologic Malignancies. *Blood*, 2005, vol.106, no.2, p. 408-418.

Ravagnan L. et al. Lonidamine triggers apoptosis via a direct, Bcl-2-inhibited effect on the mitochondrial permeability transition pore. *Oncogene*, 1999, vol. 18, no. 16, p. 2537–2546.

Rohn J.L., Noteborn M.H. The viral death effector Apoptin reveals tumorspecific processes. *Apoptosis*, 2004, vol. 9, no. 3, p. 315–322.

Rothmann T. et al. Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells. *Journal of Virology*, 1998, vol. 72, no. 12, p. 9470–9478.

Schuler, D., Szende B. Apoptosis in Acute Leukemia. *Leukemia research*, 2004, vol. 28, no. 7, p. 661-666.

Shariat S.F. et al. Adenovirus-mediated transfer of inducible caspases: a novel “death switch” gene therapeutic approach to prostate cancer. *Cancer Research*, 2001, vol. 61, no. 6, p. 2562–2571.

Tamm, I. et al. Apoptosis: Implications of Basic Research for Clinical Oncology. *The Lancet Oncology*, 2001, vol.2, no.1, p.33-42.

Thorburn, A. et al. Induction of apoptosis by tumor cell-targeted toxins. *Apoptosis*, 2004, vol. 9, p.19–25.

Wickremasinghe, R., Hoffbrand, A. V. Biochemical and Genetic Control of Apoptosis: Relevance to Normal Hematopoiesis and Hematological Malignancies. *Blood*, 1999, vol. 93, no. 11, p. 3587-3600.

Woynarowska, B.A, Woynarowski, J.M. Preferential targeting of apoptosis in tumor versus normal cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, vol. 1587, p.309– 317.

Yua, J., Zhangb, L. Apoptosis in human cancer cells. *Current Opinion in Oncology*, 2004, vol. 16, p.19–24.

Zimmermann, K.C. et al. The machinery of programmed cell death. *Pharmacology & Therapeutics*, 2001, vol. 92, p.57– 70.