

BLOKÁTORY ALFA 1 RECEPTORŮ A APOPTÓZA

MUDr. Libor Šafařík, CSc.¹, John Jaroslav Kyncl, MDPhD.²,
doc. MUDr. Jaroslav Novák, CSc.¹, prof. MUDr. Jan Dvořáček, CSc.¹

¹Urologická klinika 1. LF UK a VFN Praha, Česká republika

²Abbott Laboratories, Dept. 41K, Bldg. R13, 1401 Sheridan Rd., N. Chicago, IL 60064-4000, USA

Apoptóza je aktivní forma buněčné smrti, která společně s mitózou reguluje počet buněk v jednotlivých orgánech organismu. Je to proces fylogeneticky velmi starý, neboť ze současných výzkumů vyplývá, že zřejmě stejná signální i výkonná cesta apoptózy je u bezobratlých organismů (červů) i u obratlovců včetně člověka. V současnosti je zkoumán proces apoptózy především z hlediska jeho možného uplatnění v onkologii, avšak některé poznatky, jak to při výzkumné i klinické práci bývá, jsou získány neočekávaně i v jiných oblastech klinické medicíny. V dnešní době je již jasné, že apoptóza je pod vlivem faktorů, které ji podporují a faktorů, které ji zabraňují. Apoptóza je komplexní proces, na němž se podílejí proteiny příbuzné bcl-2, mitochondrie a caspasy.

Úvod

Ještě před 10–15 lety byl základní výzkum zaměřen jen na výzkum buněčného cyklu. Přesto již od roku 1965 byl Johnem Kerrem popsán proces svrášťování buněk, které podléhaly nekróze. (1) Kerr a Wyllie odlišili tento proces zániku buněk od prosté nekrózy a pojmenovali jej apoptózou v roce 1972. (2) Hlavním rozlišovacím znakem od prosté nekrózy bylo, že apoptóza je proces, který má každá buňka organismu v sobě již naprogramován. Záleží jen na spouštěcím mechanismu a regulujících faktorech kdy bude spuštěna a jak rychle bude probíhat. Naproti tomu nekróza je proces, kterému buňky podléhají v důsledku hrubého zevního traumatu (např. tepelný inzult, zástava perfuze aj.). Od roku 1980 je apoptóza intenzivně studována na modelech obratlovců i bezobratlých. V souvislosti s výzkumem apoptózy bylo zjištěno, že existují významné shody v sekvenci genů podílejících se na apoptóze u nematod (*C. elegans*), např. gen *ced-9* a u savců (protoonkogeny), např. *bcl-2*. (3)

V lidském organismu vzniká každou sekundu 100 000 buněk a přibližně stejné množství též zaniká. Tím je udržována homeostáza. Apoptóza má několik charakteristických rysů na mikroskopické úrovni a těmi je možno ji odlišit od nekrózy. Buňky podléhající apoptóze jsou nejprve uvolněny ze spojení s bazální membránou. Poté dochází k svrášťování a pyknotizaci jader. Nakonec dojde k frag-

mentaci buněčné membrány a fragmentaci jader. Jaderný materiál je štěpen DNAázami a může být detekován a kvantifikován některými testy založenými na průtokové cytometrii (např. Annexin V, FSC/SSC nebo Apo-BR-DU). (4) Interpretace takto získaných výsledků však vyžaduje značnou zkušenost. Navíc buněčné změny produkované apoptózou mají jen krátké trvání (přibližně 1–2 hodiny). Během vlastní apoptózy nevznikají zánětlivé změny. K infiltraci makrofágů a lymfocytů dochází v časové souvislosti později a ty pak svoji činností znemožní určit, zda se v případě zániku buňky jednalo o programovou smrt či nekrózu (obrázek 1.).

Přes výraznou snahu odlišovat proces apoptózy od nekrózy však toto není vždy možné. Z tohoto důvodu někteří autoři používají termín nekroptóza.

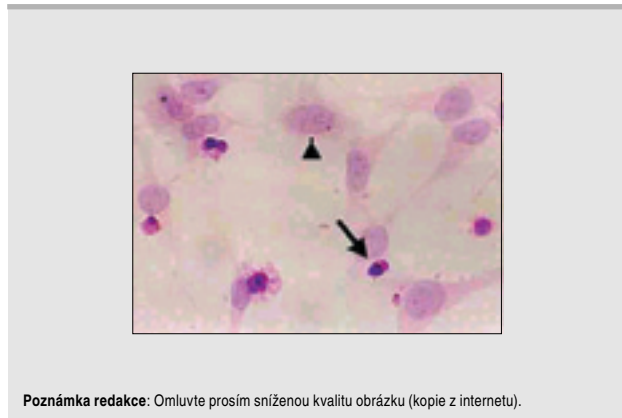
Apoptotická kaskáda

Za hlavní stimuly apoptózy jsou považovány dva faktory: specifické receptory apoptotické smrti buněk a stimuly, které poškozují buňky v nepřítomnosti receptorové aktivity.

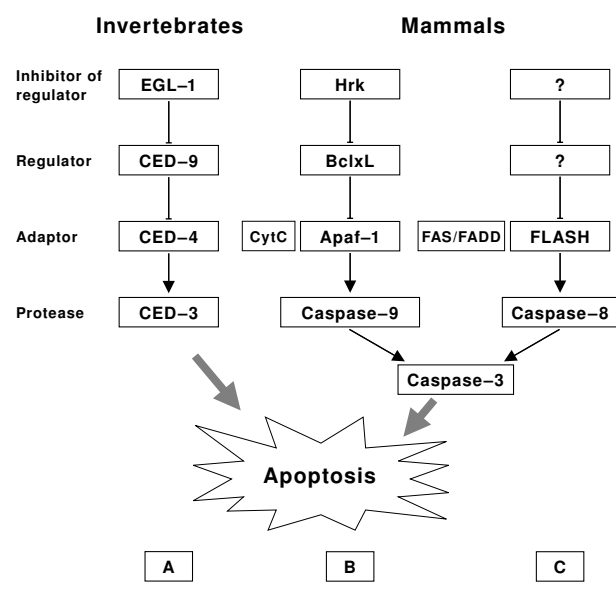
K těm prvním patří „letální cytokiny“. Ty jsou součástí skupiny tumor necrosis faktoru (TNF) a aktivují membránové receptory zodpovědné za iniciaci apoptotické kaskády. K extracelulárním faktorům působícím iniciaci apoptózy bez přispění membránových receptorů patří mitochondrie (poškozené) a proteinové produkty onkogenu *bcl-2*.

Nastartování procesu apoptózy i za přítomnosti např. *bcl-2* či při stimulaci receptorů cytokiny však brání jiné proteiny. Jsou to především růstové faktory (GF). Mezi růstové faktory bránící apoptóze patří IGF I a II (insulin growth factor). Fibroblastový růstový faktor bFGF však, jak se zdá, apoptóze zabránit nedokáže. Pokud však je apoptóza navozena onkogenem Fas, pak ani přítomnost IGF I či II apoptóze zabránit nedokáže. Z tohoto krátkého výčtu vzájemných interakcí je patrná komplikovanost jednotlivých pro a protirůstových vlivů. Přes značný pokrok v této oblasti výzkumu apoptóze však ještě nemáme dostatek informací o intracelulárním řízení apoptózy a většina studií je stále odkázána na četné experimentální studie a klinická pozorování. Určitou výhodou nám však poskytuje studium proteinů, které jsou označovány jako CED 3, CED 4, CED 9 a EGL 1. Tyto

Obrázek 1. Pyknotická jádra jsou malá, kondenzovaná a buňky mají svráštělou cytoplazmu. Barveno hematoxylinem a eosinem, 400 krát zvětšeno. (Ortiz et al.: Front Biosci 5, 2000, 735–749.



Obrázek 2. Intracelulární regulace apoptózy. A: bezobratlí, B: savci – mitochondriální cesta apoptózy, C: savci – apoptóza iniciovaná stimulací receptoru (Ortiz et al.: Front Biosci 5, 2000, 735–749).



proteiny jsou nezbytné, pokud proces apoptózy má být nastartován a úspěšně dokončen. Jejich přítomnost u bezobratlých i u savců nám umožňuje provádět četné experimentální studie (obrázek 2.). (5)

Intracelulární proces apoptózy může být aktivován třemi způsoby: aktivací receptoru, proapoptotickým enzymem, který je vytvářen při stresových situacích, Bcl 2 a poškozením mitochondrií.

Z hlediska možného využití v humánní medicíně byla dosud největší pozornost věnována výzkumu receptorové cesty k iniciaci apoptózy. Ta oproti ostatním dvěma (mitochondriím a případné inkorporaci genového materiálu v podobě bcl-2) má tu výhodu, že receptory jsou na různých buňkách vyjádřeny v různém množství a mají též odlišnou senzitivitu vůči jednotlivým chemickým substancím. Vhodnou kombinací receptorově specifické látky a její koncentrace by bylo možné dosáhnout navození selektivního zvýšení apoptózy jenom v těch tkáních, které jsou postiženy procesem, který je celému organismu škodlivý (terapeutický účinek).

Z několika studií, které byly provedeny v posledních čtyřech letech vyplynulo, že blokátory alfa 1 receptorů (A1R) by se mohly uplatnit jako stimulatory apoptózy. Byla a je nadále hledána souvislost mezi A1R a tzv. „death receptors“. Death receptors (DR) patří ke skupině TNF (tumor necrosis factor) receptorů. Tyto receptory mají svá vazebná jak na povrchu buňky tak v cytoplasmě. V cytoplasmě mají tzv. death domain (DD). Po vazbě některých cytokinů na povrch receptoru dochází k oligomerizaci několika proteinů a vazbě na DD. Vytváří se tzv. death-inducing signaling complex (DISC), jež vede k aktivaci enzymů (procaspas). Caspasy pak bezprostředně spouštějí proces apoptózy. Celý komplex aktivace je samozřejmě jistěn inhibitory proti nadměrné aktivaci apoptózy, avšak jednotlivé detaily tohoto procesu je ještě nutné objasnit.

Alfablokátory a apoptóza

Do nedávné doby se mělo zato, že blokátory alfa 1 adrenoceptorů mají příznivý efekt u benigní hyperplázie prostaty především v důsledku svého relaxačního působení na hladkou svalovinu obsaženou ve stromatu prostaty. V roce 1996 upozornil McConnell na skutečnost, že kontraktální buňky hladké svaloviny ve zvětšené prostatě mohou prodělat změnu fenotypu a změnit se na buňky sekreční pod vlivem sympatiků. (6) Při podání blokátoru alfa 1 receptoru však docházelo k výraznému poklesu počtu buněk hladké svaloviny a tyto buňky výrazným způsobem podléhaly apoptóze. Kyprianou et al. studovala indukcii apoptózy doxazosinem u benigní hyperplázie prostaty (BHP) a dospěla k názoru, že jak buňky stromatu tak buňky sekrečního epitelu prostaty vykazují vyšší podíl apoptózy, byl-li podán doxazosin. (7) Obdobnou studii provedla Chonová et al., když použila ve srovnávací studii terazosin, doxazosin a placebo. (8) Dospěla k závěru, že v případě alfablokády došlo k signifikantnímu poklesu exprese alfa-actinu v buňkách hladké svaloviny, což bylo v přímé korelaci se zlepšením mikčních obtíží pacientů a zvýšeným indexem apoptózy buněk stromatu i epitelu žlázek. Ve studii však nebylo prokázáno, že by terazosin nebo doxazosin významnějším způsobem ovlivňovali proliferativní aktivitu buněk BHP. Na kongresu Americké urologické asociace (AUA) v roce 1999 bylo na toto téma předneseno sdělení, které se týkalo vlivu doxazosinu na blokádu transforming growth faktoru (TGF-beta). (9) Ve studii bylo prokázáno, že při léčbě doxazosinem docházelo ke zvyšování apoptózy paralelně se zvyšující se koncentrací TGF beta.

Těmto klinickým pozorováním by mohla odpovídat již dříve učiněná pozorování, a sice že stimulací A1R dochází k aktivaci fosfolipázy C a ta pak dále aktivuje inositol trifosfát (IP3) a diacylglycerol (DAG). Inositol trifosfát mobilizuje kalcium z endoplazmatického retikula a navozuje tak syntézu proteinů. Terazosin díky silné afinitě k A1R tuto funkci však blokuje, přičemž jeho výsledný vliv je zřejmě dán stupni stimulace daného orgánu sympatikem. (10) Výraznou afinitu terazosinu k A1R k alfa 1 adrenergním receptorům potvrdili i další autoři, kteří studovali vzájemný vztah alfa 1 a alfa 2 receptorů. (11) Navíc, jak již bylo prokázáno dříve, piperazinové deriváty s quinazolinovou skupinou v molekule se váží ireverzibilně a velmi rychle (do 5 min) k A1R a snižují mobilizaci kalciových iontů z endoplazmatického retikula až 35krát. Tyto látky však nemají žádný vliv na mobilizaci kalcia v důsledku stimulace muscarinových receptorů, případně nemají žádný vliv na syntézu proteinů indukovaných beta adrenergní stimulací. (12)

Na posledním XV. kongresu Evropské urologické asociace (EAU) v Bruselu v roce 2000 ukázala Kyprianou, že další klinické zkušenosti nasvědčují tomu, že terazosin skutečně indikuje pro-apoptotickou kaskádu v buňkách prostaty, a to již v koncentracích, které jsou běžně používány jako terapeutické. Denní dávka testovaných pacientů byla v rozmezí 2–10 mg terazosinu. Z jejího sdělení však také vyplynulo, že navození apoptózy je pravděpodobně omezeno na alfablokátory s quinazolinovou molekulou (terazosin a

doxazosin). To by vysvětlovalo dobrý a dlouhodobý účinek těchto alfablokátorů při léčbě BHP. Ostatní alfablokátory jsou, dle Kyprianou, ve své účinnosti zřejmě omezeny na blokádu alfa 1 receptoru, a tím i na pouhou relaxaci hladké svaloviny stromatu prostaty (obrázek 3.). (13)

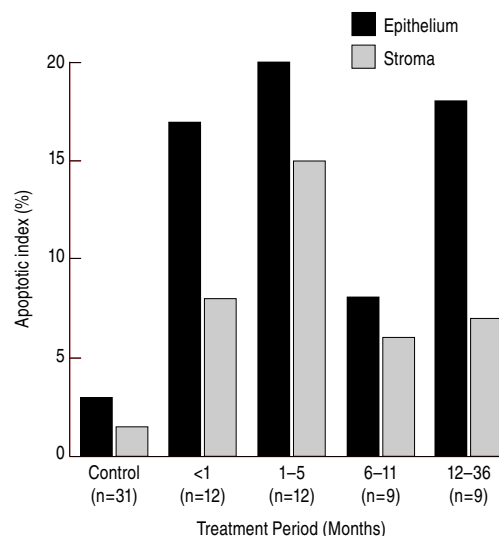
Závěr

Alfablokátory patří v současné době k lékům první volby pro potlačení symptomů benigní hyperplázie prostaty. Původní koncepce relaxace hladké svaloviny stromatu prostaty v závislosti na koncentraci alfablokátoru a jeho afinitě k patřičnému receptoru vedla k vývoji několika preparátů, které se liší na úrovni molekuly. V několika studiích provedených v posledních 4 letech se ukazuje, že klinicky příznivý efekt však nemusí být nutně působen jen relaxací hladké svaloviny v prostatě, ale že některé preparáty s quinazolinovou složkou mohou navozovat v buňce prostaty stav, kdy větší procento buněk vstupuje do terminálního stádia svého vývoje – buněčné smrti. Tyto studie by pak mohly vysvětlit rozdílné výsledky dosahované při léčbě alfablokátory především v dlouhodobém horizontu.

Literatura

1. Kerr J.F.: A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *J Pathol Bacteriol*, 90, 1965, 419–435.
2. Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26(4), 1972, 239–257.
3. Ortiz A., Lorz C., Catalan M.P., Justo P., Egido J.: Role and regulation of apoptotic cell death in the kidney. *Y2K update. Front Biosci* 5, 2000, 735–749.
4. Marinov I.: Detection, discrimination and Quantification of apoptosis by multiparameter flow cytometry. *Klin Biochem Metab*, 7, 1999, 12–17.
5. Guijarro C., Blanco-Colio L.M., Ortego M., Alonso C., Ortiz A., Plaza J.J., Diaz C., Hernandez G., Edigo J.: 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and isoprenylation inhibitors induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture. *Circ Res* 83, 1998, 490–500.
6. McConnell J.D.: Apoptosis and alphablockade. In Zlotta A.R., Schulman C. eds: Congress Report: Urological Research Today, 13th annual meeting, August 29–31, 1996, Brussels.
7. Kyprianou N., Litvak J.P., Borkowski A., Alexander R. Jacobs S.C.: Induction of prostate apoptosis by doxazosin in benign prostatic hyperplasia. *J Urol*, 159, 1998, 1810–1815.

Obrázek 3. Indukce apoptózy u pacientů užívajících terazosin méně než 1 měsíc, 1–5 měsíců, 6–11 měsíců a 1–3 roky (Chon et al., *J Urol*, 166, 1999, 2002–2005).



8. Chon J. K., Borkowski A., Partin A.W., Isaacs J.T., Jacobs S.C., Kyprianou N.: Alpha1 adrenoreceptor antagonists terazosin and doxazosin induce prostate apoptosis without affecting cell proliferation in patients with benign prostatic hyperplasia. *J Urol*, 161, 1999, 2002–2008.
9. Glassman D.T., Borkowski A., Jacobs S.C., Kyprianou N.: Effect of Doxazosin Mediated Alpha - 1 Blockade On TGF- beta and p27 Expression in benign prostatic hyperplasia. Abstracts of AUA, 1999.
10. Kyncl J.J.: Pharmacology of terazosin: an alpha 1 selective blocker. *J Clin Pharmacol*, 33, 1993, 878–883.
11. Hancock A.A., Buckner S.A., Ireland L.M., Knepper S.M., Kerwin J.F.Jr.: Action of terazosin and its enantiomers at subtypes of alpha 1 and alpha 2 adrenoreceptors in vitro. *J Recept Signal Transduct Res*, 15, 1995, 863–885.
12. Helman J., Kusiak J.W., Pitha J., Baum B.J.: Inhibition of alpha 1 adrenergic responsiveness in intact cells by a new, irreversible receptor antagonist. *Biochem Biophys Res Commun*, 142, 1987, 403–409.
13. Kyprianou N.: The role of alpha-blockers in Induction of apoptosis. In: Cell biology of the growing prostate. Satellite symposium Abbott Laboratories, XVth Congress of the EAU, Brussels, 2000.