

PREGLEDNI RAD / REVIEW

Opstati ili umrijeti – regulacija stanične smrti

Should I stay or should I die – cell death regulation

Marina Miletić¹, Teuta Murati¹, Anita Slavica², Ivana Kmetić^{1*}¹Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Laboratorij za toksikologiju, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Hrvatska²Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

*Corresponding author: ikmetic@pbf.hr

Sažetak

Stanično umiranje je temeljni biološki proces, koji je u fiziološkom smislu embrionalnoga razvoja i obnove tkiva, te kao patološki odgovor na ozljedu stanica i infekciju patogenima, uključen u mehanizme koji kontroliraju razvoj, homeostazu i imunološku regulaciju višestaničnih organizama. Stanice mogu umrijeti slučajnom (biološki nekontrolirani procesi) ili reguliranom (genetski kontrolirani molekularni procesi) staničnom smrću. Stanična smrt odvija se različitim mehanizmima koji dovode do pojave različitih morfoloških promjena u stanicama zahvaćenim tim procesima. Nedavna otkrića u tom području i detekcija sve većeg broja novih oblika regulirane stanične smrti, rezultirala su novom sustavnom klasifikacijom i nomenklaturom različitih tipova stanične smrti. U ovom preglednom radu dan je uvid u sustav klasifikacije, mehanizme i obilježja glavnih tipova stanične smrti: nekroze, apoptoze i autofagije.

Ključne riječi: stanična smrt, mehanizmi stanične smrti, apoptoza, nekroza, autofagija

Abstract

Cell death is fundamental biological activity involved in mechanisms controlling the development, homeostasis and immune regulation of multicellular organisms in the physiological context of embryonic development and tissue regeneration, as a pathological response to cell injury and pathogen infection. Cells can die by accidental (biologically uncontrolled processes) or regulated (genetically controlled molecular processes) cell death. Cell death occurs by different mechanisms leading to the development of specific morphologies. Recent discoveries in this field and the increasing number of new forms of regulated cell death have resulted in a novel classification system and nomenclature of different cell death modalities. This review provides an insight into the system of classification, mechanisms and characteristics of main cell death modalities: necrosis, apoptosis and autophagy.

Keywords: cell death, cell death mechanisms, apoptosis, necrosis, autophagy

Uvod

Noviji znanstveni radovi sve detaljnije opisuju genetičke i epigenetičke mehanizme regulacije aktivnosti gena čiji proteinski produkti sudjeluju u ciljanom uklanjanju suvišnih, nepovratno oštećenih i / ili potencijalno štetnih stanica (Galluzzi i sur., 2018). Tijekom razvoja veliki broj stanica umire u različitim tkivima kralježnjaka i beskralježnjaka. U nekim slučajevima, cijele regije ili cijeli organi se na taj način uklanjaju, dok se u drugim slučajevima, pojedine umiruće stanice pojavljuju u tkivima u razvoju te u razvijenom tkivu gdje se zamjenjuju novim stanicama (Clarke i Clarke, 1996).

Višestanični organizmi koriste fiziološke mehanizme stanične smrti za razvoj i morfogenezu, za kontrolu broja stanica i kao obrambenu strategiju za uklanjanje zaraženih, mutiranih ili oštećenih stanica (Vaux i Korsmeyer, 1999). Stanično umiranje je izrazito složen proces prisutan u regulaciji diobe i diferencijacije stanica te ima ključnu ulogu u embrionalnom razvoju i održavanju homeostaze organizma (Danial i Hockenbery, 2018; Yan i sur., 2020). Gubitak kontrole u regulaciji stanične smrti pridonosi pojavi karcinoma, neurodegenerativnih poremećaja, autoimunih i zaraznih bolesti i dr. (Tait i sur., 2014; Tang i sur., 2019).

Stanična smrt nastala tijekom uzgoja staničnih kultura predstavlja ograničavajući faktor u biotehnološkoj proizvodnji - smanjuje prinos visokovrijednih proizvoda, a može negativno utjecati i na kvalitetu proizvoda (Krampe i Al-Rubeai, 2010; Henry i sur., 2020). Kako bi se riješio taj problem, većinom su korištene različite strategije poput modifikacije staničnog medija, optimizacije bioreaktora i dr. Međutim, bolje rješenje za pouzdanu kvalitetu takvih proizvoda i veći prinos biomase (odnosno spriječavanje stanične smrti) koji bi zadovoljio biotehnološku i farmaceutsku industriju je dizajn anti-apoptotskih staničnih linija (Henry i sur., 2020). Aktivacija stanične smrti odgovorna je za akutnu toksičnost mnogih lijekova i toksičnih tvari, ali ostaje za istražiti njena potencijalna uloga u subakutnoj, subkroničnoj i kroničnoj toksičnosti uzrokovanoj dugotrajnijom izloženošću lijekovima ili zagađivačima okoliša (Orrenius i sur., 2011).

Prvi opis stanične smrti (1842. godine) bilježi samo činjenicu da stanice nestanu tijekom normalnoga razvoja, a 1858. godine njemački patolog Rudolph Virchow je opisao dva oblika smrti - nekrobiozu („programiranu“ staničnu smrt, kako ju je on nazvao) i nekrozu (Häcker, 2000; Movassagh i Foo,



2007). Veliki broj ranih morfoloških studija opisuje vidljive promjene koje vode ka staničnoj smrti *in vitro* i *in vivo*, a morfološke promjene i nestanak stanica neko su vrijeme bili jedini pokazatelji stanične smrti. Na temelju morfoloških karakteristika Kerr i suradnici su 1972. godine razvili koncept stanične smrti kao mogući mehanizam odstranjivanja nepotrebnih stanica tijekom embrionalnog razvoja, zamjene starih stanica novima u patološkim stanjima kao i u proliferirajućim tkivima (Häcker, 2000). Rana klasifikacija tipova stanične smrti ovisila je o morfološkim i strukturnim detaljima pojedinih tkiva i stanica. Shweichel i Merker su 1973. godine morfološki okarakterizirali pojedine tipove stanične smrti te dali smjernice za klasifikaciju stanične smrti u tipove I (apoptoza), II (autofagija) i III (nekroza). Sva tri tipa stanične smrti mogu biti izvršena kroz različite, a ponekad i preklapajuće signalne puteve uključene kao odgovor na specifične podražaje (Green i Llambi, 2015; Tang i sur., 2019). Odbor za nomenklaturu stanične smrti (NCCD - engl. The Nomenclature Committee on Cell Death) je 2005. godine formulirao preporuke i smjernice za klasifikaciju stanične smrti. Ažurirane preporuke objavljene su 2009., 2012., 2015. te 2018. godine u časopisu *Cell Death & Differentiation* (Kroemer i sur., 2005, 2009; Galluzzi i sur., 2012, 2015, 2018). NCCD predlaže jedinstvene kriterije za definiranje različitih morfologija i biokemijskih mehanizama stanične smrti. Prvenstveno je važno razlikovati umiranje kao proces i smrt kao krajnju točku toga procesa (Kroemer i sur., 2005, 2009). NCCD predlaže novu klasifikaciju signalnih puteva temeljenih na biokemijskim i fiziološkim razmatranjima i ukazuje da se tipovi stanične smrti mogu svrstati u dvije, međusobno isključive kategorije, slučajnu (ACD - engl. accidental cell death) i reguliranu (RCD - engl. regulated cell death) staničnu smrt. ACD su uzrokovane teškim oštećenjima, uključujući fizičke, kemijske i mehaničke podražaje te nisu osjetljive na farmakološke ili genetske promjene bilo koje vrste. RCD uključuju genetski kontrolirane molekularne procese, stoga se tijekom RCD-a može mijenjati pomoću farmakoloških i / ili genetskih zahvata usmjerenih na ključne komponente takvih procesa (Galluzzi i sur., 2012, 2018). Prema NCCD smjernicama razlikuju se nekroza i nekroptoza, autofagija, anoikis, entoza, piroptoza, mitotska katastrofa, NEToza, partanatoza i dr. Međutim, NCCD preporučuje ograničavanje formuliranja novih naziva, osim u slučajevima kada su specifični molekularni mehanizmi ili morfološke karakteristike identificirani (Kroemer i sur., 2005, 2009, Galluzzi i sur., 2012). U ovom radu dan je sustavan uvid u klasifikaciju, mehanizme i obilježja glavnih tipova stanične smrti – nekroze, apoptoze i autofagije.

Slučajna (neregulirana) stanična smrt - nekroza

Tradicionalno, nekroza se opisuje kao pasivni i nekontrolirani proces, potaknut vanjskim čimbenicima kao što su ishemijsko-reperfuzijska ozljeda, toksini, virusne i bakterijske infekcije. Nekroza se javlja kao odgovor na različita oštećenja ili u patološkim stanjima, ali ne i tijekom normalnog razvoja (Nikoletopoulou i sur., 2013). Karakterizirana je bubrenjem organela i stanica, gubitkom integriteta stanične membrane

te njezinim brzim raspadom, što rezultira lizom stanica i nekontroliranim oslobađanjem unutarstaničnog sadržaja u nekrotičnom tkivu u izvanstanični prostor te oštećenjem susjednih stanica, što posljedično dovodi do aktivacije imunološkoga sustava (Jha i Kitsis, 2011; Negroni i sur., 2015) (slika 1). Spontano se pojavljuje u neoplazmama kada proliferacija stanica nadmašuje angiogenezu, a do pojave nekroze dovodi i izlaganje stanica mehaničkoj sili, toplini, hladnoći i sl. (Hotchkiss i sur., 2009).

Brojni stanični procesi i organeli uključeni su u nekrotičnu smrt stanice, ali još uvijek nije jasno kako su međusobno povezani (Chaabane i sur., 2013). Uobičajeni posrednici procesa nekroze su kalcijevi ioni (Ca^{2+}), koji uzrokuju preopterećenje mitohondrija kalcijem, različite bioenergetske učinke te aktivaciju proteaza i fosfolipaza. Nekrozu mogu potaknuti reaktivne kisikove vrste (ROS – engl. reactive oxygen species), koje dovode do disfunkcije mitohondrija, deregulacije homeostaze iona i gubitka integriteta membrane (Hotchkiss i sur., 2009; Negroni i sur., 2015). Niska razina ATP-a odražava ozbiljnu disfunkciju mitohondrija i podudara se s poremećajem metabolizma što dovodi do pojave nekroze. Poli-ADP-riboza polimeraza (PARP – engl. poly (ADP-ribose) polymerase) je enzim uključen u popravak DNA, koji tijekom popravka višestrukih lomova lanaca DNA može iscrpiti stanične spremnike ATP-a. Inhibicija PARP-a ublažava nekrozu u ishemijsko-reperfuzijskim ozljedama i u drugim vrstama oštećenja (Hotchkiss i sur., 2009; Jha i Kitsis, 2011).

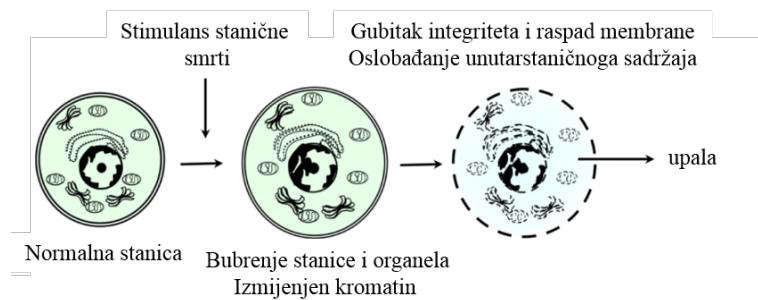
Programirana (regulirana) stanična smrt

Izraz „programirana stanična smrt“ nastao je u 19. stoljeću, kada su R. Lockshin i J. Saunders ustvrdili da stanice imaju niz visoko reguliranih mehanizama koji rezultiraju staničnom smrću (Movassagh i Foo, 2007; Yan i sur., 2020). U posljednjem desetljeću opisani su brojni novi oblici stanične smrti i pojavio se velik broj *in vitro* i *in vivo* studija koje su okarakterizirale nove oblike s pripadajućim regulatornim signalnim putevima (Feoktistova i Leverkus, 2015). U Tablici 1 prikazana su obilježja pojedinih oblika regulirane stanične smrti.

S obzirom na morfološke značajke i molekularne mehanizme, regulirana stanična smrt može biti dodatno kategorizirana na apoptotsku i neapoptotsku staničnu smrt (Yan i sur., 2020).

Apoptoza

Apoptoza je prvi identificirani genetski programirani proces stanične smrti. Detaljno je proučen i njegov doprinos patogenezi bolesti dobro je dokumentiran (Eisenberg-Lerner i sur., 2009). Evolucijski je očuvan i strogo reguliran oblik stanične smrti, bitan u fiziologiji jer oblikuje složena tkiva tijekom embriogeneze te uklanja stanice koje su dosegle određen broj dioba ili čiji je genom nepopravljivo oštećen. Apoptoza rezultira brzim i učinkovitim uklanjanjem mrtvih stanica putem eferocitoze (termin koji se koristi za razlikovanje fagocitoze apoptotskih stanica od drugih fagocitoznih procesa) (Birge i sur., 2016).



Slika 1. Morfološke karakteristike procesa nekroze (prema Escobar i sur., 2015)

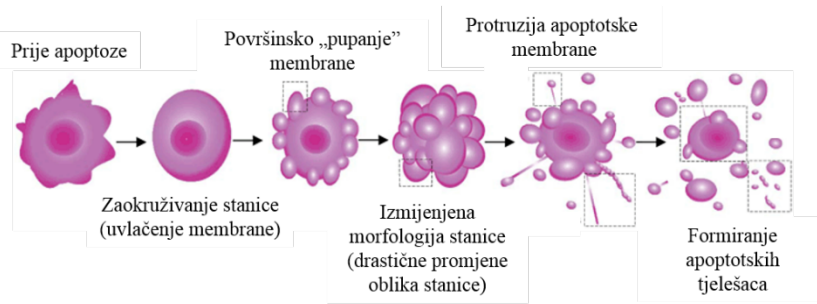
Figure 1. Morphological characteristics of necrosis (Escobar et al., 2015)

Tablica 1. Obilježja pojedinih oblika regulirane stanične smrti (Legrand i sur., 2016; Tang i sur., 2019; Yan i sur., 2020; Hu i sur., 2021)

Table 1. Characteristics of new modalities of regulated cell death (Legrand et al., 2016; Tang i sur., 2019; Yan et al., 2020; Hu et al., 2021)

oblik stanične smrti	morfološka obilježja	biokemijska svojstva *
lizosomalna stanična smrt	puknuće lizosoma i stanične membrane	permeabilizacija lizosomalne membrane; otpuštanje lizosomalnih hidrolitičkih enzima; oksidacijsko oštećenje lizosoma izazvano Fe ²⁺
piroptoza	puknuće stanične membrane; umjerena kondenzacija kromatina	aktivacija kaspaza 1 i 3; aktivacija i cijepanje GSDMD-a; stvaranje pora; otpuštanje IL1β
NEToza	puknuće stanične i jezgrine membrane; opuštanje kromatinskog vlakna	stvaranje NET-ova; otpuštanje i translokacija granuliranih enzima; citruljinacija histona
nekroptoza	bubrenje stanica; puknuće stanične membrane; umjerena kondenzacija kromatina	aktivacija RIPK (1 i 3) i MLKL; tvorba citosolnih nekrosoma
entoza	<i>cell-in-cell</i> struktura	aktivacija adhezijskih proteina i aktomiozina
partanatos	kondenzacija kromatina; DNA fragmentacija; nedostatak apoptotskih tjelešaca; gubitak integriteta membrane	pretjerana aktivacija PARP1; iscrpljivanje NAD ⁺ i ATP-a; otpuštanje AIFM1 iz mitohondrija; neovisan o kaspazama
feroptoza	manji mitohondriji; smanjena naboranost membrane mitohondrija; povećana oštećenja mitohondrijske membrane	akumulacija Fe; peroksidacija lipida; glutaminoliza; neovisna o kaspazama
okseiptoza	morfologija nalik apoptozi	ROS ovisan; NFE2L2 neovisan; neovisna o kaspazama; nedostatak nuklearne translokacije AIFM1
alkalipitoza	morfologija nalik nekrozi	intracelularna alkalizacija; aktivacija NF-κB; neovisna o kaspazama
metuoza	nakupljanje vakuola ispunjenih tekućinom; puknuće membrane	aktivirani Ras stimulira mikropinocitozu aktivacijom GTPaze 1 (Rac1)
paraptoza	značajna citoplazmatska vakuolizacija kao posljedica povećanja endoplazmatskog retikuluma ili mitohondrija	aktivacija IGF1R, MAPK, JNK
mitoptoza	nestanak mitohondrija; razgradnja mitohondrijskog retikuluma na male sferične organele	Bax/Bak-ovisno oslobađanje TIMM8a/DDP potiče mitohondrijsku fisiju i mitoptozu

*GSDMD – gasdermin D; IL1β – interleukin 1 beta; NET (engl. *neutrophil extracellular traps*); RIPK (engl. *receptor-interacting serine/threonine kinase 1/3*); MLKL (engl. *mixed lineage kinase domain like pseudokinase*); PARP (engl. *poly (ADP-ribose) polymerase*); AIFM1 (engl. *apoptosis inducing factor mitochondria associated 1*); NFE2L2 (engl. *nuclear factor, erythroid 2-like 2*); NF-κB (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*); Ras (engl. *reticular activating system*); Rac1 (engl. *Rac family small GTPase 1*); IGF1R (engl. *insulin-like growth factor 1 receptor*); MAPK (engl. *mitogen-activated protein kinase*); JNK (engl. *c-Jun N-terminal kinase*); TIMM8a/DDP (engl. *translocase of inner mitochondrial membrane 8a/ deafness-dystonia peptide*)



Slika 2. Obilježja i značajke procesa apoptoze (prema Tixeira i sur., 2017)

Figure 2. Characteristic and features of apoptotic cell death (Tixeira et al., 2017)

Apoptoza je mehanizam svojstven većini stanica. Aktivira se kada je stanica lišena bitnih faktora za preživljavanje. Također, može biti izazvana namjerno, bilo izazivanjem težih staničnih oštećenja ili kao odgovor na izvanstanične signale koji se prenose specifičnim signalnim putevima (Ashkenazi i Salvesen, 2014). Apoptozu morfološki i biokemijski karakteriziraju (slika 2) kondenzacija kromatina koja dovodi do piknoze stanice, fragmentacija DNA u oligonukleosomalne fragmente (putem aktiviranih endonukleaza), protruzija stanične membrane (zvjezdolik izgled) te stvaranje apoptotskih tjelešaca (Žlender, 2003; Tixeira i sur., 2017; Tang i sur., 2019).

Razumijevanje mehanizama uključenih u proces apoptoze u stanicama sisavaca započelo je istraživanjem programirane stanične smrti tijekom razvoja nematode *Caenorhabditis elegans*. U ovom organizmu 1090 somatskih stanica nastaje prilikom stvaranja odrasloga crva. Od ukupnoga broja stanica njih 131 podliježe apoptozi. Te stanice umiru u određenim trenucima tijekom razvojnoga procesa, što ukazuje na izvanrednu preciznost i kontrolu stanične smrti procesom apoptoze. Apoptoza je od tada prepoznata i prihvaćena kao poseban i važan način programirane stanične smrti, a uključuje genetski određeno uklanjanje stanica (Elmore, 2007).

Apoptoza se javlja normalno tijekom razvoja i starenja te kao homeostatski mehanizam za održavanje stanične populacije u tkivima. Također se pojavljuje kao obrambeni mehanizam pri imunološkim reakcijama ili prilikom uklanjanja oštećenih stanica. Iako postoji široki raspon čimbenika i stanja (fizioloških i patoloških) koji mogu potaknuti apoptozu, sve stanice neće nužno umrijeti kao odgovor na isti podražaj. Zračenje ili lijekovi koji se koriste za kemoterapiju u nekim stanicama dovode do oštećenja DNA, što može dovesti do apoptotske smrti. Hormoni, kao što su kortikosteroidi, mogu dovesti do apoptotske smrti u nekim stanicama (npr. timociti), dok u drugim stanicama apoptoza nije stimulirana (Elmore, 2007).

Kaspaze – efektori apoptoze

Središnji apoptotski enzimski aparat sastoji se od proteolitičkih enzima kaspaza - citoplazmatskih cisteinil-aspartatno-specifičnih endoproteaza. Obitelj kaspaza opisana je nakon što je utvrđeno da gen *CED-3* u *Caenorhabditis elegans* kodira protein Ice (engl. *interleukin-1 β -converting enzyme*), koji je homologan interleukin-1 β -konvertirajućem enzimu sisavaca, a danas se naziva kaspaza-1. Pokazalo se da ova obitelj proteaza ima središnju ulogu u započinjanju i provođenju apoptoze (Köhler i sur., 2002; Žlender, 2003; Ashkenazi i Salvesen, 2014). Prisutne su unutar stanice kao neaktivni oblici ili zimogeni, a odgovorne su za cijepanje ključnih staničnih proteina (npr. citoskeletnih proteina i enzima koji sudjeluju u popravku DNA), koji dovode do tipičnih biokemijskih i morfoloških promjena stanica u apoptozi. Također, mogu aktivirati i druge enzime poput nukleaza i proteaza (Siddiqui i sur., 2015).

Apoptotske kaspaze dijele se u dvije kategorije: (1) pokretačke ili inicijatorske kaspaze (npr. kaspaze-8, -9), čija je aktivacija potrebna za aktiviranje drugoga seta kaspaza, (2) izvršiteljske ili efektorske

kaspaze (npr. kaspaza-3, -7) (Ashkenazi i Salvesen, 2014). Kaspaze se najprije proizvode u neaktivnim prekursorskim oblicima, a aktiviraju se proteazama ili autokatalizom (Dasgupta i sur., 2017). Apoptotski signali smrti, vanjski ili unutarnji čimbenici, potiču aktivaciju jedne ili više inicijatorskih kaspaza preko specifičnih oligomerizacijskih platformi. Inicijatori zatim pokreću kaskadnu proteolitičku stimulaciju efektorskih kaspaznih zimogena. Aktivirani enzimi potiču apoptotsku smrt stanice cijepanjem stotina ili čak tisuća strukturo i funkcionalno kritičnih proteina unutar stanice (Ashkenazi i Salvesen, 2014).

Putevi apoptoze

Razlikujemo dva glavna puta apoptoze - vanjski (ekstrinzični) put ili put receptora smrti te unutrašnji (intrinzični) ili mitohondrijski put. Međutim, uz ova dva puta izvještava se i o zasebnom putu koji uključuje T limfocitima i perforin-granzim posredovanu smrt stanica (Siddiqui i sur., 2015). Ekstrinzični, intrinzični i perforin/granzim putevi započinju specifičnim staničnim signalima koji uzrokuju smrt, a uključuju aktiviranje inicijatorskih kaspaza (-8, -9, -10), koje u konačnici aktiviraju izvršiteljsku kaspazu-3. Navedeni putevi rezultiraju fragmentacijom DNA, razgradnjom citoskeletnih proteina, stvaranjem apoptotičnih tjelešaca i njihovim unosom u fagocitne stanice. Međutim, signalni put koji uključuje granzim A djeluje mehanizmom neovisnim o kaspazama, putem jednolančanog oštećenja DNA (Siddiqui i sur., 2015).

Ekstrinzični put ili put posredovan receptorima smrti, prima i obrađuje izvanstanične signale koji induciraju smrt i koji djeluju preko tih receptora na površini stanica (Derakhshan i sur., 2016; Dasgupta i sur., 2017). Promoviraju ga molekule koje pripadaju skupini čimbenika nekroze tumora (TNF - engl. *tumor necrosis factor*), u obliku su homotrimerata te se mogu vezati za TNFR (engl. *tumor necrosis factor receptor*) na staničnoj membrani. Ova interakcija uzrokuje trimerizaciju adaptornih proteina kao što su TRADD (engl. *TNF receptor 1-associated via death domain*) i FADD (engl. *Fas-associated via death domain*) i njihovo naknadno regrutiranje na staničnu površinu iz citoplazme. FADD sadrži domene koje služe kao most između receptora i prokaspaze-8, stvarajući tako DISC (engl. *death-inducing signaling complex*), koji signalizira pokretanje stanične smrti. Slijedi aktivacija kaspaze-3 i -8, što dovodi do apoptoze (Derakhshan i sur., 2016; Fan i sur., 2016).

Nasuprot tome, intrinzične signale čine čimbenici koji nastaju unutar stanice kao rezultat staničnoga stresa (npr. iscrpljivanje faktora rasta, virusna infekcija, ionizirajuće zračenje, slobodni radikali) (Siddiqui i sur., 2015; Dasgupta i sur., 2017). Aktivacija intrinzičnoga ili mitohondrijskoga puta inducirana je citogenetskim oštećenjima uzrokovanim zračenjem ili kemoterapijom. Takav stres uzrokuje permeabilizaciju mitohondrija i oslobađanje apoptogenih proteina, uključujući citokrom c (Cyt c) i SMAC (engl. *second mitochondria-derived activator of caspases*) iz mitohondrija u citosol. Citosolni Cyt c stupa u interakciju s APAF1 (engl. *apoptotic protease activating factor 1*), stvarajući multimerni kompleks apoptosom, koji aktivira kaspazu-3 i -9 (Derakhshan i sur., 2016).

Bcl-2 proteini

Bcl-2 (engl. *B cell lymphoma 2*) porodica proteina imaju ključnu ulogu u odlučivanju hoće li stanica živjeti ili umrijeti. Vrlo brzo nakon identifikacije Bcl-2 proteina otkriveno je i njegovo anti-apoptotsko djelovanje te je izoliran veliki broj proteina koji imaju sličnost u sekvenci s Bcl-2, čime se obitelj ovih proteina značajno proširila, a uključuje pro- i anti-apoptotske molekule (Siddiqui i sur., 2015).

Već je desetljećima poznato da Bcl-2 proteini kontroliraju intrinzični apoptotski put regulacijom MOMP (engl. *mitochondrial outer membrane permeabilization*) procesa putem protein-protein interakcija (Dai i sur., 2016). Kontroliraju staničnu smrt primarno izravnim veznim interakcijama koje reguliraju MOMP, što dovodi do nepovratnog oslobađanja intermembranskih proteina te otpuštanja Cyt c iz mitohondrija, a kasnije do aktivacije kaspaza i apoptoze (Namura., 2017; Kale i sur., 2018). Članovi obitelji Bcl-2 dijele jednu ili više od ukupno četiri visoko očuvane homologne domene Bcl-2 (BH1 – BH4), a ovisno o stupnju homologije i funkciji svakoga proteina podijeljeni su u 3 skupine: (1) sub-obitelj koja uključuje Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, Bfl-1/a1 (djeluju anti-apoptotski i dijele homologiju unutar sve četiri regije; BH1 – BH4), (2) sub-obitelj koju predstavljaju Bax, Bak i Bok (sadrže tri homologne domene BH1 – BH3, iako je u nekih proteina uočena homologija i unutar BH4 domene; iskazuju pro-apoptotsku aktivnost) te (3) sub-obitelj koja uključuje Bik, Bid, Bad, Bim, Bmf, Hrk, Noxa i Puma (djeluju pro-apoptotski i dijele homologiju unutar BH3 domene, tzv. BH3 proteini) (Siddiqui i sur., 2015). U Tablici 2 prikazane su lokalizacija i funkcije nekih Bcl-2 proteina.

Autofagija

Riječ autofagija grčkoga je porijekla (grč. *autóphagos*; *auto* = sam + *phagein* = jesti). Pojam je prvi upotrijebio belgijski biokemičar Christian de Duve 1963. godine. Autofagija je važna za održavanje stanične homeostaze, jer može ukloniti oštećene, suvišne ili neželjene komponente (proteine / organele). Na taj način autofagija može djelovati kao mehanizam protiv starenja, podpirati remodeliranje stanica tijekom razvoja ili doprinijeti staničnoj obrani od patogena (Todde i sur., 2009). Autofagija je generički naziv za sve puteve pomoću kojih se neželjen citoplazmatski materijal (uključujući pojedine npr. oštećene makromolekule (proteini, glikogen, lipidi, nukleotidi) i organele (mitohondriji, peroksisomi, ER)) izdvaja i u konačnici razgrađuje (Mizushima i Levine, 2010; Mizushima i Komatsu, 2013).

Istraživanja molekularnih mehanizama autofagije započelo je identifikacijom ATG gena (engl. *AuTophagy-related genes*) (Xie i Klionsky, 2007). Višestupanjski je katabolički proces koji djeluje kao stanični odgovor na nedostatak nutrijenata i kisika. Stoga se slobodne aminokiseline, slobodne masne kiseline i ATP recikliraju natrag u citoplazmu zbog sinteze biomolekula. Kod sisavaca postoji pet ključnih kontrolnih točaka autofagije (slika 3) – inicijacija, nukleacija, elongacija,

lizosomalna fuzija te razgradnja sadržaja autofagosoma (Cooper, 2018). Trenutno poznati procesi autofagije podijeljeni su na tri oblika (slika 4), koji se razlikuju s obzirom na fiziološke funkcije i način prijenosa citoplazmatskog supstrata do lizosoma: (1) makroautofagija (prijenos citosolnog sadržaja u lizosom autofagosomima), (2) mikroautofagija (unutarnja invaginacija lizosomalne membrane) i (3) autofagija posredovana šaperonom (CMA - engl. *chaperone mediated autophagy*) (izravna translokacija preko lizosomalne membrane) (Levine i Kroemer, 2007; Todde i sur., 2009; Mizushima i Levine, 2010). Sva tri oblika kao završni katabolički odjeljak imaju lizosom, međutim njihovi se mehanizmi za isporuku i reguliranje supstrata značajno razlikuju (Kirchner i sur., 2019). Makro- i mikroautofagija javljaju se u sisavcima, biljkama i (mikro)gljivama, te dovode do degradacije dijelova citoplazme. CMA je opisan samo kod sisavaca i uključen je u razgradnju pojedinačnih, topljivih proteina (Levine i Kroemer, 2007; Todde i sur., 2009; Mizushima i Levine, 2010).

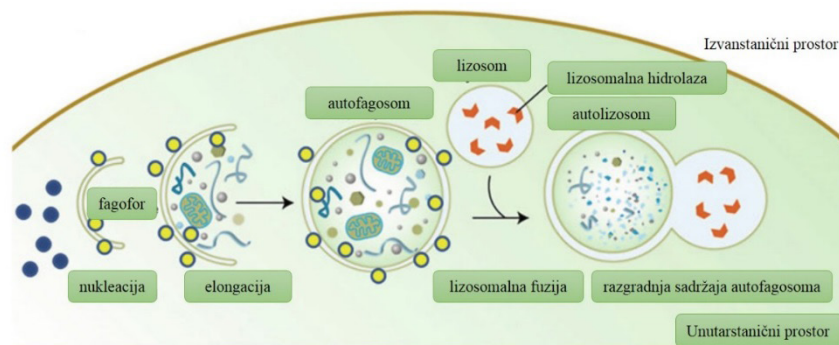
Makroautofagija

Makroautofagija je proces koji uključuje stvaranje (nukleacija) i produženje fagofore (izolacijske, dvostruke membrane) te potom stvaranje autofagosoma i autolizosoma, a izvršava se nizom visoko očuvanih ATG gena. Fagofora zatvara i izolira citoplazmatske komponente kako bi se stvorio autofagosom. Slijedi fuzija autofagosoma s lizosomom i nastaje autolizosom te razgrađuje sadržaj koji se u njemu nalazi (Levine i Kroemer, 2007; Mizushima i Komatsu, 2013; Su i sur., 2015). Rezultat ovakvog oblika razgradnje su slobodne aminokiseline i masne kiseline koje se mogu reciklirati ili sistemski prenositi na udaljena mjesta u organizmu. Pretpostavka je da se generirane aminokiseline koriste za *de novo* sintezu proteina, koji su ključni za prilagodbu u stresnim uvjetima (Levine i Kroemer, 2007). Makroautofagiju putem složenih puteva prijenosa signala pokreće nedostatak nutrijenata, ROS, hipoksija, lijekovi i stres ER-a. Promjene u makroautofagijalnom putu mogu dovesti do različitih patoloških stanja, poput neurodegeneracije, starenja i karcinoma (Su i sur., 2015). Proces stvaranja autofagosoma i autolizosoma osiguravaju značajan katabolički potencijal, koji (u specifičnim okolnostima) može doprinijeti reguliranoj staničnoj smrti ili staničnoj atrofiji (Galluzzi i sur., 2017).

Mikroautofagija

Mikroautofagija je oblik autofagije tijekom koje se citoplazmatske komponente namijenjene razgradnji direktnom invaginacijom membrane unose u vakuolu (u kvascima i u biljkama). U stanicama *Drosophila melanogaster* i u stanicama sisavaca sličan mehanizam uključuje kasne endosome. Taj se proces, koji se također događa i u stanicama kvasaca, naziva „endosomska mikroautofagija“ (Galluzzi i sur., 2017).

U mikroautofagiji, lizosomalna / vakuolarna membrana nasumično se



Slika 3. Kontrolne točke autofagije (prema Adiseshaiah i sur., 2017)

Figure 3. Autophagy checkpoints (Adiseshaiah et al., 2017)

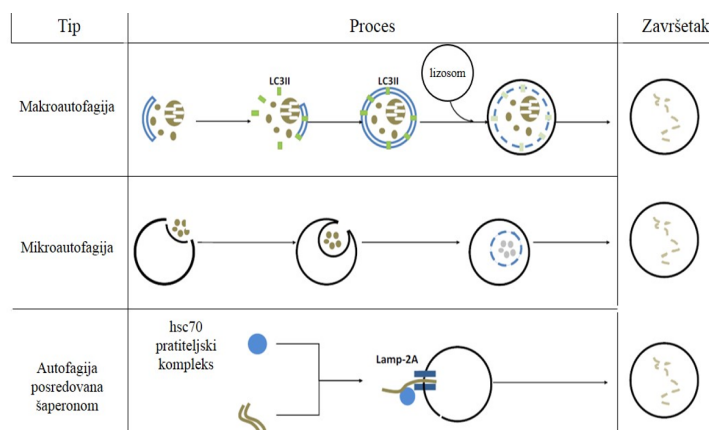


Tablica 2. Lokalizacija i apoptotske funkcije Bcl-2 obitelji proteina (prema Tzifi i sur., 2011; Siddiqui i sur., 2015; Popgeorgiev i sur., 2018)

Table 2. Localization and apoptotic functions of Bcl-2 family proteins (Tzifi et al., 2011; Siddiqui et al., 2015; Popgeorgiev et al., 2018)

Protein	Lokalizacija	Apoptotska funkcija
Bcl-2	MOM, ER, NOM, jezgra	anti-apoptotski; sekvstrira i inhibira pro-apoptotske proteine
Bcl-xL	MOM, citosol, ER	anti-apoptotski; sprječava oslobađanje mitohondrijskih proteina
Mcl-1	MOM, ER, jezgra	anti-apoptotski ili pro-apoptotski
Bcl-w	MOM, citosol	anti-apoptotski; mehanizam djelovanja nepoznat
Bfl-1/a1	MOM, citosol, NOM, jezgra	anti-apoptotski; inhibira oslobađanje pro-apoptotskog Cyt c iz mitohondrija i blokira aktivaciju kaspaza
Bax	MOM, citosol, ER, jezgra	pro-apoptotski; inducira oslobađanje apoptogenih čimbenika poput Cyt c
Bak	MOM, ER	pro-apoptotski; posreduje u interakcijama s Bcl-xL preko BH3
Bim	MOM, citosol, ER, jezgra	pro-apoptotski; u interakciji s drugim proteinima Bcl-2 i inducira apoptozu
Bid	MOM, citosol, jezgra	izravni aktivator Bax proteina
Bad	MOM, citosol	defosforiliran tvori heterodimer s Bcl-2 i Bcl-xL čime ih deaktivira i inducira apoptozu
Puma	MOM	pro-apoptotski; ulazi u interakciju s anti-apoptotskim članovima Bcl-2 i oslobađa Bax i Bak za MOMP
Noxa	MOM	pro-apoptotski; posreduje u interakcijama s Mcl-1 preko BH3
Bik	ER, NOM	pro-apoptotski; u interakciji s Bcl-2 i Bcl-2-L1
Hrk	MOM, citosol	pro-apoptotski; u interakciji s anti-apoptotskim proteinima inducira apoptozu

*MOM (engl. *mitochondrial outer membrane*); ER (engl. *endoplasmic reticulum*); NOM (engl. *nuclear outer membrane*); MOMP (engl. *mitochondrial outer membrane permeabilization*)



Slika 4. Oblici autofagije (prema Yang i sur., 2013)

Figure 4. Forms of autophagy (Yang et al., 2013)

Tablica 3. *Selektivni oblici autofagije (prema Korać, 2013; Anding i Baehrecke, 2017; Galluzzi i sur., 2017)*
Table 3. *Types of selective autophagy (Korać, 2013; Anding and Baehrecke, 2017; Galluzzi et al., 2017)*

vrsta selektivne autofagije	stanični sadržaj koji podliježe autofagiji
retikulofagija	endoplazmatski retikulum
peksosofagija	peroksisom
mitofagija	mitohondrij
lipofagija	lipidne kapi
zimofagija	zimogene granule u acinarnim stanicama gušterače
mijelinofagija	mijelin u Schwannovim stanicama
feritinofagija	feritin
nukleofagija	dijelovi jezgre
ksenofagija	patogeni (bakterije / virusi)
ribofagija	ribosom
agrefagija	proteinski agregati
proteafagija	inaktivni proteasom
lizofagija	lizosom
klorofagija	kloroplast

invaginira i stvara autofagijalnu cijev kako bi zatvorila dijelove citosola (Yang i sur., 2013). Mikroautofagiju čini pet uzastopnih stupnjeva – (1) mikroautofagijalna invaginacija, (2) nastanak vezikula, (3) rast vezikula, (4) rascjep vezikula, (5) raspadanje/dezintegracija i razgradnja vezikula (Li i sur., 2012). Mikroautofagija neprekidnim recikliranjem pomaže stanicama izdržati dugotrajno gladovanje. Također, zahvaća više-vezikularna tijela (MVB - engl. *multivesicular bodies*) koja nastaju endocitozom, te se proteini stanične membrane u endosomima mogu obnoviti mikroautofagijom. Mikroautofagija funkcionira i kao put za isporuku (isporuka glikogena u lizosomu), a može se dogoditi istovremeno s makroautofagijom u lizosomu / vakuoli zbog stabilizacije unutarstaničnoga okoliša (Li i sur., 2012).

Autofagija posredovana šaperonom (CMA)

CMA uključuje izravnu isporuku citosolnih proteina na razgradnju do lizosoma, a budući da supstrati do lizosomalnog lumena dopiru kroz protein-translokacijski kompleks na lizosomalnoj membrani, nisu potrebne vezikule niti membranske invaginacije za isporuku supstrata lizosomima (Galluzzi i sur., 2017).

Aktivnost CMA povećava se kao odgovor na stresore poput gladi, lipotoksičnosti, proteotoksičnosti, hipoksije, oksidacijskog stresa ili oštećenja DNA (Kirchner i sur., 2019). Razgrađuju se samo topljivi proteini koji sadrže sekvence biokemijski slične KFERQ motivu (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) vezane na HSPA8 (engl. *heat shock protein family a (Hsp70) member 8*) (Dice, 1990), ali se ne razgrađuju organeli, druge makromolekule poput lipida, nukleinskih kiselina te proteini koji su sastavni dio membrane (Galluzzi i sur., 2017). Disfunkcija CMA povezuje se sa stanjima poput neurodegenerativnih bolesti, karcinoma ili metaboličkih bolesti, uključujući dijabetičku nefropatiju i masnu jetru (Kirchner i sur., 2019). Zbog visoke selektivnosti, ovaj put ima bitnu ulogu u regulaciji različitih procesa, poput staničnog ciklusa, aktivacije

T-stanica, popravljavanja DNA, katabolizma glukoze i lipida, rasta stanica ili staničnog preživljavanja (Kirchner i sur., 2019).

Neselektivni i selektivni procesi autofagije

Neselektivne i selektivne procese autofagije, kao i njihove supstrate, teško je razlikovati. Galluzzi i suradnici (2017) predlažu definiranje specifičnih vrsta autofagije na temelju supstrata autofagije, kao i specifičnih molekularnih faktora (poput autofagijalnih receptora), koji se mogu koristiti za selektivno praćenje i / ili ciljanu regulaciju ovih staničnih procesa (Galluzzi i sur., 2017). Kod neselektivne autofagije topljivi unutarstanični supstrati zatvaraju se i razgrađuju unutar vezikula nastalih cjevastim invaginacijama (Li i sur., 2012). Međutim, selektivna autofagija može selektivno prepoznati i razgraditi stanične komponente kao što su organeli, ribosomi, nakupine proteina ili patogeni (Korać, 2013). U Tablici 3 prikazani su selektivni oblici autofagije.

Zaključci

Oblici stanične smrti razlikuju se uglavnom po podražajima i morfologiji. Izuzev neregulirane stanične smrti (nekroze), ostali oblici regulirani su različitim molekulama i signalnim putevima te pokazuju značajan stupanj međusobne povezanosti. Svaki oblik može se manifestirati čitavim spektrom morfoloških karakteristika, u rasponu od potpuno nekrotičnih do potpuno apoptotskih i imunomodulacijskim profilom u rasponu od protuupalnog i tolerogenog do prouupalnog i imunogenog. Poremećaji u mehanizmima provođenja i regulaciji stanične smrti povezuju se s razvojem niza bolesti (karcinoma, neurodegenerativnih oboljenja, autoimunih bolesti) te samim time mogu biti temelj za razvoj



novih lijekova i mogućnosti sprječavanja, ali i liječenja navedenih bolesti. Nova saznanja o mehanizmima kojima djeluju štetni spojevi važni su za procjenu rizika, kao i smjernica za pokušaj stvaranja/proizvodnje manje toksičnih analoga takvih spojeva. Velik dio istraživanja danas usmjeren je i na poboljšanje metoda za detekciju stanične smrti i za određivanje tipa stanične smrti, kako konvencionalnih tehnika kao što su *Western blot*, protočna citometrija i qPCR (engl. *quantitative Polymerase Chain Reaction*), tako i najsuvremenijih metoda poput transmisivne elektronske mikroskopije te jednofotonske emisijske kompjutorizirane tomografije (SPECT) (Hu i sur., 2021).

Usprkos velikom napretku u razumijevanju mehanizama i detekciji stanične smrti koji se izučavaju već 50-tak godina, preostaje proširiti primjenjivost stečenog znanja u području biotehnologije (poput proizvodnje visokovrijednih proizvoda primjenom anti-apoptotskih staničnih linija), biomedicine, toksikologije, farmacije, poljoprivrede i prehrambene industrije.

Zahvala

Ovaj rad je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom „Bolničke zaštitne tekstilije“ (UIP-2017-05-8780).

Literatura

- Adishesaiah P.P., Skoczen S.L., Rodriguez J.C., Potter T.M., Kota K., Stern S.T. (2017) Autophagy monitoring assay II: imaging autophagy induction in LLC-PK1 cells using GFP-LC3 protein fusion construct. U: McNeil S.E. (ed): *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery. Methods in Molecular Biology*, str. 211-219. Humana Press, Totowa, NJ, SAD.
- Anding A.L., Baehrecke E.H. (2017) Cleaning house: selective autophagy of organelles. *Developmental Cell*, 41 (1) 10-22.
- Ashkenazi A., Salvesen G. (2014) Regulated cell death: signaling and mechanisms. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30 337-356.
- Birge R.B., Boeltz S., Kumar S., Carlson J., Wanderley J., Calianese D., Barcinski M., Brekken R.A., Huang X., Hutchins J.T., Freimark B., Empig C., Mercer J., Schroit A.J., Schett G., Hermann M. (2016) Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer. *Cell Death & Differentiation*, 23 962-978.
- Chaabane W., User S.D., El-Gazzah M., Jaksik R., Sajjadi E., Rzeszowska-Wolny J., Łos M.J. (2013) Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 61 43-58.
- Clarke G.H.P., Clarke S. (1996) Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anatomy and Embryology*, 193 (2) 81-99.
- Cooper K.F. (2018) Till death do us part: the marriage of autophagy and apoptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018 1-13.
- Dai H., Wei Meng X., Kaufmann S.H. (2016) BCL2 family, mitochondrial apoptosis, and beyond. *Cancer Translational Medicine*, 2 (1) 7-20.
- Daniel N.N., Hockenbery D.M. (2018) Cell Death. U: Hoffman R., Benz E.J., Silberstein L.E., Heslop H.E., Weitz J.I., Anastasi J., Ali Abutalib S. (ed): *Hematology – Basic Principles and Practice*, 7. izdanje, str. 186-196. Elsevier, Philadelphia, SAD.
- Dasgupta A., Nomura M., Shuck R., Yustein J. (2017) Cancer's achilles' heel: apoptosis and necroptosis to the rescue. *International Journal of Molecular Sciences*, 18 (1) 1-23.
- Derakhshan A., Chen Z., Van Waes C. (2016) Therapeutic small molecules target inhibitor of apoptosis proteins in cancers with deregulation of extrinsic and intrinsic cell death pathways. *Clinical Cancer Research*, 23 (6) 1379-1387.
- Dice J.F. (1990) Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends in Biochemical Sciences*, 15 (8) 305-309.
- Eisenberg-Lerner A., Bialik S., Simon H.-U., Kimchi A. (2009) Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death & Differentiation*, 16 966-975.
- Elmore S. (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35 (4) 495-516.
- Escobar M.L., Echeverría O.M., Vázquez-Nin G.H. (2015) Necrosis as programmed cell death. U: Ntuli T. (ed): *Cell Death - Autophagy, Apoptosis and Necrosis*, str. 419-434. IntechOpen, London, UK.
- Fan X.Y., Chen X.Y., Liu Y.J., Zhong H.M., Jiang F.L., Liu Y. (2016) Oxidative stress-mediated intrinsic apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells induced by organic arsenicals. *Scientific Reports*, 6 2986.
- Feoktistova M., Leverkus M. (2015) Programmed necrosis and necroptosis signalling. *The FEBS Journal*, 282 (1) 19-31.
- Galluzzi L., Baehrecke E.H., Ballabio A., Boya P., Bravo-San Pedro J.M. i sur. (2017) Molecular definitions of autophagy and related processes. *The EMBO Journal*, 36 1811-1836.
- Galluzzi L., Bravo-San Pedro J.M., Vitale I., Aaronson S.A., Abrams J.M. i sur. (2015) Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death & Differentiation*, 22 58-73.
- Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S.A., Abrams J.M., Adam D. i sur. (2018) Molecular mechanisms of cell death - recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25 486-541.
- Galluzzi L., Vitale I., Abrams J.M., Alnemri E.S., Baehrecke E.H. i sur. (2012) Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death & Differentiation*, 19 107-120.
- Green D.R., Llambi F. (2015) Cell death signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7 1-25.
- Häcker G. (2000) The morphology of apoptosis. *Cell and Tissue Research*, 301 5-17.
- Henry M.N., MacDonald M. A., Orellana C. A., Gray P. P., Gillard M., Baker K., Nielsen L. K., Marcellin E., Mahler S., Martínez V. S. (2020) Attenuating apoptosis in Chinese hamster ovary cells for improved biopharmaceutical production. *Biotechnology and Bioengineering* 117, 1187–1203.
- Hotchkiss R.S., Strasser A., McDunn J.E., Swanson P.E. (2009) Mechanism of disease. Cell death. *The New England Journal of Medicine*, 361 (16) 1570-1583.
- Hu X., Li Z., Lin R., Shan J., Yu Q., Wang R., Liao L., Yan W., Wang Z., Shang L., Huang Y., Zhang Q., Xiong K. (2021) Guidelines for regulated cell death assays: a systematic summary, a categorical comparison, a prospective. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9 1-28.
- Jha S., Kitsis R.N. (2011) Myocardial basis for heart failure: role of cell death. U: Mann D.L. (ed): *Heart Failure: A Companion to Braunwald's Heart Disease*, 2. izdanje, str. 85-102, Saunders, Philadelphia, SAD.
- Kale J., Osterlund E.J., Andrews D.W. (2018) BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death & Differentiation*,

25 65-80.

- Kirchner P., Bourdenx M., Madrigal-Matute J., Tiano S., Diaz A., Bartholdy B.A., Will B., Cuervo A.M. (2019) Proteome-wide analysis of chaperone-mediated autophagy targeting motifs. *PLoS Biology* 17 (5) 1-27.
- Köhler C., Orrenius S., Zhivotovsky B. (2002) Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *Journal of Immunological Methods*, 265 (1-2) 97-110.
- Korać J. (2013) Uloga proteina optineurina u autofagiji proteinskih nakupina u neurodegenerativnim bolestima. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Hrvatska.
- Krampe B., Al-Rubeai M. (2010) Cell death in mammalian cell culture: molecular mechanisms and cell line engineering strategies. *Cytotechnology*, 62 175-188.
- Kroemer G., El-Deiry W.S., Golstein P., Vaux D., Vandenabeele P., Zhivotovsky B., Blagosklonny M.V., Malorni W., Knight R.A., Piacentini M., Nagata S., Melino G. (2005) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death & Differentiation*, 12 1463-1467.
- Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J., Alnemri E.S. i sur. (2009) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death & Differentiation*, 16 3-11.
- Legrand A.J., Konstantinou M., Goode E.F., Meier P. (2016) The diversification of cell death and immunity: memento mori. *Molecular Cell*, 76 232-242.
- Levine B., Kroemer G. (2007) Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132 (1) 27-42.
- Li W., Li J., Bao J. (2012) Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69 1125-1136.
- Mizushima N., Komatsu M. (2013) Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, 147 (4) 728-741.
- Mizushima N., Levine B. (2010) Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nature Cell Biology*, 12 (9) 823-830.
- Movassagh M., Foo R.S.-Y. (2007) Simplified apoptotic cascades. *Heart Failure Reviews*, 13 111-119.
- Namura S. (2017) Neuroprotectants: cell-death based. U: Caplan L.R., Biller J., Leary M.C., Lo E.H., Thomas A.J., Yenari M., Zhang J.H. (ed): *Primer on Cerebrovascular Diseases*, 2. izdanje, str. 189-192. Academic Press, Cambridge, Massachusetts, SAD.
- Negróni A., Cucchiara S., Stronati L. (2015) Apoptosis, necrosis, and necroptosis in the gut and intestinal homeostasis. *Mediators of Inflammation*, 2015 1-10.
- Nikoletopoulou V., Markaki M., Palikaras K., Tavernarakis N. (2013) Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833 (12) 3448-3459.
- Orrenius S., Nicotera P., Zhivotovsky B. (2011) Cell death mechanisms and their implications in toxicology. *Toxicological Sciences* 119, 3-19.
- Popgeorgiev N., Jabbour L., Gillet G. (2018) Subcellular localization and dynamics of the Bcl-2 family of proteins. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6 (13) 1-11.
- Siddiqui W.A., Ahad A., Ahsan H. (2015) The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. *Archives of Toxicology*, 89 289-317.
- Su Z., Yang Z., Xu Y., Chen Y., Yu Q. (2015) Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Molecular Cancer*, 14 (48) 1-14.
- Tait S.W.G., Ichim G., Green D.R. (2014) Die another way – non-apoptotic mechanisms of cell death. *Journal of Cell Science*, 127 (10) 2135-2144.
- Tang D., Kang R., Vanden Berghe T., Vandenabeele P., Kroemer G. (2019) The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Research*, 29 (5) 347-364.
- Tixeira R., Caruso S., Paone S., Baxter A.A., Atkin-Smith G.A., Hulett M.D., Poon I.K.H. (2017) Defining the morphologic features and products of cell disassembly during apoptosis. *Apoptosis*, 22 (3) 475-477.
- Todde V., Veenhuis M., van der Klei I.J. (2009) Autophagy: principles and significance in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1792 3-13.
- Tzifi F., Economopoulou C., Gourgiotis D., Ardavanis A., Papageorgiou S., Scorilas A. (2011) The role of BCL2 family of apoptosis regulator proteins in acute and chronic leukemias. *Advances in Hematology*, 2012 1-15.
- Vaux D.L., Korsmeyer S.J. (1999) Cell death in development. *Cell*, 96 245-254.
- Xie Z., Klionsky D.J. (2007) Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology*, 9 (10) 1102-1109.
- Yan G., Elbadawi M., Efferth T. (2020) Multiple cell death modalities and their key features (review). *World Academy of Sciences Journal*, 2 39-48.
- Yang J., Carra S., Zhu W.-G., Kampinga H.H. (2013) The regulation of the autophagic network and its implications for human disease. *International Journal of Biological Sciences*, 9 1121-1133.
- Žlender V. (2003) Apoptoza - programirana smrt stanice. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 54 267-274.