

Review

APOPTOZA – PROGRAMIRANA SMRT STANICE

Vilim ŽLENDER

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb

Primljeno u srpnju 2003.

Tijekom evolucije višestanični organizmi uspjeli su razviti različite mehanizme zaštite od djelovanja štetnih utjecaja iz okoline. Apoptoza ili "programirana smrt stanice" jedan je od tih mehanizama kojim stanica aktivno uz utrošak energije i sintezu određenih proteina pokreće vlastitu smrt kao sastavni dio fizioloških procesa ili kao odgovor na određena patološka stanja. Poremećaji u apoptozi vezani su uz mnogobrojne bolesti jer nefunkcionalne, mutirane ili na bilo koji način oštećene stanice koje izmaknu kontrolnim mehanizmima i koje ne obavljaju svoju fiziološku funkciju, mogu dovesti do pojave teških bolesti. Stoga je pravilan tijek apoptotskih procesa ključan za pravilan embrionalni razvoj i za pravilno održavanje stanične homeostaze tkiva. Centralno je mjesto apoptoze proenzimska skupina cisteinskih proteaza u citoplazmi stanica. Kaskadna aktivacija tih proteaza ključna je u genezi morfoloških i biokemijskih apoptotskih promjena. Do danas je već poznat velik broj vanjskih i unutarnjih faktora koji dovode do pojave apoptoze. Poznavanje tih faktora i puno razumijevanje mehanizama apoptotskih procesa otvara potpuno nove mogućnosti u liječenju nekih teških, zasad neizlječivih bolesti.

KLJUČNE RIJEČI: *Bcl-2* porodica, homeostaza, kaspaze, nekroza, p53, receptori smrti

Apoptoza je poseban oblik stanične smrti nuždan za razvoj organizma i održavanje stanične homeostaze, tj. ravnoteže između gubitka i stvaranja stanica normalnog tkiva tijekom života (1, 2). Njezina uloga u embrionalnom razvoju poznata je i dokumentirana još pedesetih godina, a 1972. Kerr i suradnici (3) jasno su je na osnovi morfoloških karakteristika odvojili od nekroze te potvrdili njezinu pojavnost u odraslom organizmu, a koja se nastavlja sve do smrti. Budući da se radi o aktivnom procesu koji zahtijeva trošenje energije i aktivaciju gena potrebnih za sintezu proteina, apoptozu još nazivamo "programirana smrt stanice".

Stanice pokreću apoptozu u sklopu različitih fizioloških procesa ili zbog patoloških oštećenja stanica (uzrokovanih različitim vanjskim i unutrašnjim čimbenicima), zbog čega postaju opasne i/ili nekorisne za organizam. Na različitim pokusnim modelima dokazano je da je apoptoza temeljni proces u održavanju mase i funkcionalne sposobnosti pojedinih organa (4).

Mnogobrojni aktivatori programirane smrti stanice, preko različitih posrednika, dovode do pokretanja kaskade proteolitičkih enzima kaspaza (citoplazmatske cisteinil-aspartatno-specifične endoproteaze) koje uništavaju esencijalne strukturne komponente uključujući genski materijal stanice, i dovode do pojave specifičnih promjena kao što su skvrčenje stanice, kondenzacija kromatina, cijepanje DNA (Deoxyribonucleic Acid), "pupanje" dijelova stanične membrane i formiranje apoptotskih tjelešaca, koja fagocitiraju susjedne stanice i makrofazi.

Poremećaji apoptoze vezani su uz patogenezu bolesti kao što su tumori, neke autoimune bolesti (reumatoidni artritis, sistemski lupus eritematosus), degenerativni procesi (Alzheimerova bolest), AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome), ishemična oštećenja (infarkti), razvojne anomalije itd. Rezultati istraživanja pokretača apoptotskih mehanizama, genske aktivacije i regulacije apoptotskih promjena otvorili su nove mogućnosti u liječenju tih bolesti.

NEKROZA I APOPTOZA

Nekroza stanice nastaje kao posljedica znatnijeg oštećenja stanice izazvanog različitim fizikalno-kemijskim agensima (hipoksija, ekstremne temperature, djelovanje komplementa, liza uzrokovana mikroorganizmima). Jako oštećena stanica ne može kontrolirati ravnotežu tekućine i iona (natrijevi i kalcijevi ioni ulaze nekontrolirano u stanicu) te ona bubri, a stanične organele gube cjelovitost. Raspadom i istjecanjem staničnog sadržaja dolazi do nadraživanja okolnog tkiva zbog oslobađanja biomedijatora upale (5). Upala pomaže u ograničavanju infekcije i uklanjanju staničnog debrisa, ali sekretorna aktivnost leukocita može oštetiti zdravo susjedno tkivo (enzimi, radikali kisika). Zato nekroza obično zahvaća veći broj stanica odnosno veća tkivna područja.

Apoptoza kao dio fiziološkog razvoja organizma prisutna je u većini tkiva počevši od programiranog uništavanja stanica tijekom embriogeneze (implantacija jajne stanice, organogeneza, metamorfoza). Možda je najbolji primjer ovih procesa formiranje očne leće iz apoptotskih stanica čiji je sadržaj nadomješten čistim proteinom, kristalinom. Važna uloga apoptoze nastavlja se i nakon rođenja. Tako primjerice keratinociti pri migraciji iz dubljih dijelova kože do njezine površine podliježu apoptozi pretvarajući se u vanjski zaštitni sloj odumrlih stanica. Apoptoza prati i involutivne procese ovisne o hormonima (menstrualni ciklus, atrofija ovarija u vrijeme menopauze, atrofija prostate nakon kastracije), smrti stanica imunskog sustava (smrt neutrofila kod akutnih upalnih procesa, gubitak T i B-limfocita zbog nedostatnog podražaja citokinima) (6). Jednako tako i stanice koje su inficirane virusima, stanice s nepopravljivim genskim mutacijama, kao i stanice koje su oštećene zračenjem, antitumorskom terapijom citostaticima (7), antibioticima (8), oksidativnim stresom, djelovanjem nekih toksina itd., mogu pokrenuti proces samouništenja.

Apoptoza je aktivni proces koji zahtijeva sintezu proteina i aktivaciju endogenih enzima, uz očuvanje staničnih organela koji imaju aktivnu ulogu u regulaciji mehanizama apoptoze. Apoptotska stanica odnosno fragmentirana apoptotska tjelešca konačno "tiho" nestaju procesom fagocitoze ne izazivajući upalni proces.

Katkad isti uzrok u nekom tkivu dovodi do istodobne pojave i nekroze i apoptoze. Naime, u slučajevima kada integritet stanice nije ozbiljnije narušen i kada su oštećenja slabija stanica može ući u program samouništenja, odnosno kada su ta

oštećenja jaka i nepopravljiva, stanica umire nekrozom (2). Hoće li doći do apoptoze ili nekroze ovisi i o dugotrajnosti i jačini negativnog djelovanja. Tako su istraživanja vaskularnih bubrežnih oštećenja dokazala pojavu apoptoze nakon potpune kratkotrajne ishemije tijekom reperfuzije, dok su prolongirana ishemična stanja dovela do pojave nekroze stanica (9).

MORFOLOŠKE I BIOKEMIJSKE OSOBINE APOPTOZA

Pokretanje i brzina apoptotskog procesa razlikuju se ovisno o tipu stanice, kao i o razvojnim stupnjevima istih tipova stanica. Sam početak apoptoze karakterizira skvrčenje stanice i izdvajanje iz okoline. Kondenzacija kromatina i njegovo izdvajanje iz matriksa u petlje veličine 300 do 500 kbp (kilo-baza-parova) početna je faza kondenzacije koja traje nekoliko minuta (10), nakon koje se DNA cijepa na fragmente od 200 do 300 bp (11). Konačnom kondenzacijom DNA se cijepa djelovanjem endonukleaza, a nastali oligonukleosomski fragmenti su cjelobrojni višekratnici veličine 180 parova baza koji se elektroforezom vide kao fragmenti uniformnih razmaka tipa "ljestvica", proporcionalnih njihovoj veličini (12). Zbog polumjesečastog nakupljanja kromatina uz jezgrinu ovojnicu dolazi do piknoze i u toj fazi stanicu mogu fagocitirati susjedne stanice ili makrofazi. U suprotnome proces se nastavlja karioreksom i specifičnim "pupanjem" stanice kada se zbog jezgrine invaginacije i izbočenja dijela stanične membrane oblikuju mjehurići ili apoptotska tijela koja sadržavaju ulomke kromatina i stanične citoplazme.

U početnoj fazi apoptoze oko stanične jezgre pojavljuju se perinuklearni srpoliki prostori CSS (crescent-shaped spaces) koji mogu sadržavati mijelin (13). Ti srpoliki prostori češće su zabilježeni u uvjetima *in vivo* jer zbog veze stanice s intersticijem citoplazma stanice ne prati promjene koje se zbivaju u jezgri. Patomorfološke specifičnosti apoptoze jetrenih stanica su acidofilna ili Councilmanova tjelešca (14).

Apoptotske se nukleaze razlikuju po strukturi, ovisnosti o kationima, optimalnom pH i posrednicima koji pokreću njihovu aktivaciju. Posrednici svoju optimalnu aktivnost postižu pri različitim uvjetima. Neki je postižu u prisutnosti kalcijevih i magnezijevih iona (DNaze I, DNaze γ , NUC-18), neutralnom pH (DNaze I, CAD) ili kiselom pH (DNaze II). Konačno, neke faktore aktiviraju kaspaze, dok su drugi potpuno

neovisni o kaspazama ili ih aktiviraju serin proteaze (15).

Osim endonukleaza, u nastajanju apoptotskih promjena važnu ulogu imaju enzimi kalpain i transglutaminaza koja križno povezuje proteine stvarajući apoptotska tijela. U vrijeme dramatičnih promjena jezgre struktura staničnih organela je očuvana (osobito mitohondrija), a na citoplazmatskoj membrani može se primijetiti smanjen broj mikrovila (10). Fagociti tijekom fagocitoze brzo uklanjaju apoptotske stanice (jedan do dva sata). Tijekom fagocitoze fosfatidilserin aktivno izlazi s unutrašnje na vanjsku stranu stanične membrane (16).

POKRETAČI APOPTOZE

Apoptoza može nastati zbog slabljenja ili izostanka (pozitivnih) signala potrebnih za preživljavanje stanica, ili zbog primanja (negativnih) signala.

Izostanak pozitivnih signala

Većini je stanica potrebno da ih stalno stimuliraju druge stanice ili pak stalna atezija s površinom na kojoj rastu. Osobito je važna uloga citokina, faktora rasta i nekih hormona (17). Tako je poznata povezanost trombocitnog faktora rasta s glijastanicama, interleukina 2 s T-limfocitima, interleukina 5 s eozinofilima, eritropoetina i interleukina 3 s hematopoetskim stanicama (18), spolnih hormona (estrogen, progesteron) s tkivom mliječne žlijezde, androgena s prostatom itd. (19).

Primanje negativnih signala

Stimulatore koji potiču stanicu na apoptozu nazivamo apogenima (10). Oštećenja DNA pokreću apoptozu iz same stanice, pa niz čimbenika s takvim učinkom uključujući ionizacijska zračenja (UV, X-zrake), kemoterapeutike, lijekove poput analoga nukleozida, neke mikotoksine (okratoksin A, fumonizine, gliotoksin, okadaičnu kiselinu itd.) i druge DNA-reaktivne toksine (20), ubrajamo u pokretače apoptoze. Različiti štetni čimbenici, lijekovi i toksini mogu izazvati stres stanice i potaknuti apoptotski odgovor posrednim djelovanjem na stanični samoubilački mehanizam (21). Reaktivni spojevi kisika koji nastaju kao produkti aerobnog metabolizma u ljudskim stanicama mogu aktivirati apoptozu djelujući na promjenu permeabiliteta

membrane mitohondrija i otpuštanje citokroma c (22).

Posebno mjesto zauzimaju molekule (ligandi) koje se vežu na komplementarnim površinskim receptorima stanica, a nazivamo ih pokretačima smrti. Od poznatijih možemo izdvojiti: Fas ligand (FasL ili CD95 Ligand), tumor necrosis factor α (TNF α), limfotoksin (TNF β) i TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL).

FasL ili CD95 ligand na površini citotoksičnih T-limfocita ima dvije važne funkcije. Prva je ta da vezanjem za površinske stanične receptore Fas (CD95) na mnogim stanicama u organizmu (osobito kada su inficirane ili se nalaze u blizini inficiranih stanica), pokreće vanjski put aktivacije apoptoze i tako sudjeluje u obrani organizma. Druga važna funkcija je sudjelovanje u procesu uklanjanja aktiviranih T-limfocita na kraju imunskog odgovora (6).

Čimbenike tumorske nekroze (TNF α) proizvode T-limfociti i aktivirani makrofazi kao odgovor na infekciju, a vežu se na površinske proteinske receptore stanica zvane TNFR1 (Tumor Necrosis Factor Receptor 1). Makrofazi nakon prepoznavanja stanice inficirane virusima otpuštaju TNF- α i pokreću apoptozu inficiranih stanica, kao i susjednih stanica koje nisu inficirane (23).

TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) član je TNF-ligand porodice, a veže se na DR4 i DR5-receptore. Pojavnost ovih liganda ustanovljena je u mnogim tkivima.

MEHANIZMI POKRETANJA APOPTOZE

Poznavanje čimbenika apoptoze i razumijevanje mehanizama njihova djelovanja preduvjet je za moguće upletanje u apoptotske procese (inhibicija, aktivacija), u svrhu liječenja bolesti uzrokovanih poremećajima u apoptozu. Možemo razlikovati vanjski put koji uključuje receptore smrti ili direktno djelovanje enzima citotoksičnih T-limfocita (perforin, granzim B), i unutrašnji put koji se još naziva mitohondralni. Ključni enzimi u cjelokupnom lancu zbivanja, neovisno o načinu pokretanja, jesu kaspaze koje cijepanjem specifičnih supstrata dovode do tipičnih biokemijskih i morfoloških promjena (24). Ti enzimi prisutni u citoplazmi stanice kao proenzimi aktiviraju se kaskadno proteolitičkim cijepanjem, a redosljed njihove aktivacije ovisi o načinu pokretanja apoptoze. Kaspaze svoju potpunu proteolitičku aktivnost postižu

kao tetrameri koji nastaju nakon dvostrukog cijepanja (25). Danas je poznato četrnaest članova porodice kaspaza koje se označavaju rednim brojevima 1-14, pri čemu prokaspaze 2, 8, 9 i 10 ubrajamo u inicijatorske, a prokaspaze 3, 6, i 7 u efektorne kaspaze (24).

Stanice sadržavaju i prirodne proteinske inhibitore kaspaza IAPs (Inhibitor of Apoptosis), koji mogu direktno inhibirati inicijatorske kaspaze 8 i 9 te efektorne kaspaze 3 i 7 (26).

Vanjski mehanizam pokretanja apoptoze

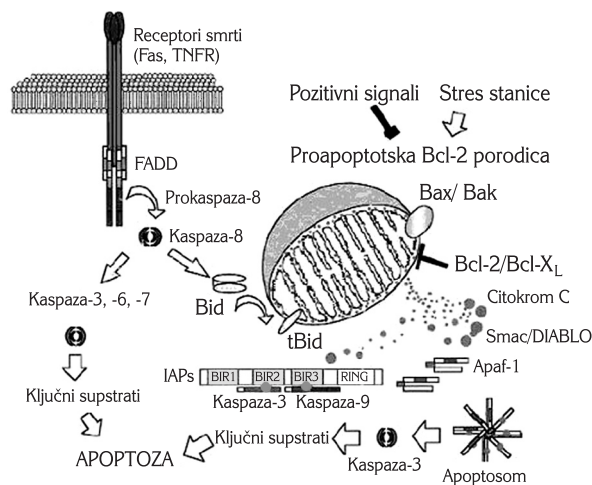
TNF-receptorska porodica (Fas, TNFR) skupina je membranskih proteina koja se proteže od vanjske do unutrašnje površine membrana stanica. Citoplazmatski dijelovi receptora nazivaju se domene smrti DD (Death Domain). Vežanjem FasL na Fas-receptor dolazi do receptorske trimerizacije, što rezultira intracelularnim grozdolikim nakupljanjem DD dijelova receptora s pomoću kompleksa proteina poznatih kao DISC (Death-Inducing-Signalling-Complex). Naime trimerizacija ide preko adapterskih molekula FADD (Fas-Associated-Death-Domain-Protein), koje imaju dva receptorska dijela odnosno dvije domene (27). Jedna domena također se naziva DD i veže se na DD-domenu Fas-receptora, a druga se domena naziva DED (Death-Effector-Domain) i odgovorna je za proslijeđivanje signala transdukcije vežanjem za prokaspazu 8. Time dolazi do njezina cijepanja i prelaska u aktivni oblik koji pokreće kaskadu kaspaza i razgradnju stanice putem apoptoze (28, 21). Vežanjem TNF-liganda za TNFR1-receptor pokreće se sličan put, osim što su u ovom slučaju adapterske molekule TRADD (TNFR-Associated Death Domain) koje imaju sposobnost vezanja različitih proteina na aktiviranom dijelu receptora. Ako se taj aktivirani dio veže na FADD-domene smrti, dolazi do aktiviranja prokaspaze 8 i kaskade kaspaza.

TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) pokretač smrti veže se na DR4 i DR5-receptore koji također imaju intracelularne domene smrti, ali su njihove adapterske molekule slabo poznate.

Citotoksični T-limfociti i NK-stanice, nakon što prepoznaju virusima inficirane stanice, vežu se za njih te s pomoću enzima perforina razgrađuju staničnu membranu čime omogućuju ulaz enzimu granzimu B. Granzim B je serin esteraza koja može direktno aktivirati kaspaze 3, 7, 8 i 10 i tako pokrenuti apoptozu.

U inhibitore apoptoze na razini receptora smrti ubrajamo FLIP (FasL Inhibitor Protein) porodicu

proteina koja ima dva člana, v-FLIP i c-FLIP. Ti proteini inhibiraju apoptozu pokrenutu aktivacijom Fas i TNFR1-receptora. Kao homolog kaspaze 8 FLIP se veže na Fas-FADD-kompleks, čime inhibira aktivaciju prokaspaze 8 (29). Signalni putovi apoptoze mogu se vidjeti na slici 1 (30).



Slika 1 Signalni putovi apoptoze (30)

Unutrašnji mehanizam pokretanja apoptoze

U slučajevima kada je oštećenje DNA uzrok pokretanja smrti stanice ključni protein je p53, koji je u normalnim stanicama prisutan u inaktivnom obliku. Gen za njegovu sintezu lociran je na sedamnaestom kromosomu a sudjeluje u procesima replikacije DNA i transkripcije. Sposobnost p53 da zaustavi rast stanice njegova je važna tumor-supresijska funkcija, a mnogi tumori odnosno tumorske stanice imaju mutiran gen za sintezu p53 proteina. Oštećenja DNA potiču transkripcijsku aktivnost p53 i njegovo nakupljanje u stanici, a posljedično dolazi do zaustavljanja staničnog ciklusa u G1-fazi i popravljivanja oštećene DNA ili do pokretanja apoptoze stanice ako su ta oštećenja nepopravljiva (31, 32). p53 može pokrenuti apoptozu tako da poremeti odnos proapoptotskih i antiapoptotskih mitohondralnih proteina Bcl-2 porodice, ili da inducira gene koji povećavaju produkciju reaktivnih spojeva kisika, koji su snažni aktivatori oštećenja mitohondrija i apoptoze.

U uvjetima ozbiljnijeg stresa (zračenja, kemoterapija) povezana je uloga p53 s apoptozom normalnih, zdravih stanica različitih osjetljivih tkiva kao što su stanice hematopoetskog i imunskog sustava, stanice gastrointestinalnog trakta i stanice kože te se takva oštećenja javljaju kao nuspojave antitumorske terapije (32).

Poznato je najmanje petnaest proteina u Bcl-2 skupini koji se dijele na proapoptotske kao što su Bad, Bax, Bak, Bcl-xl, Bag, Bid, Bik, Hrk, i antiapoptotske kao što su Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1, Bfl-1, Bcl-1, A1 (33). Omjer proapoptotskih i antiapoptotskih čimbenika određuje osjetljivost stanice na apoptozu (14). Evolucijski očuvana Bcl-2 porodica omogućuje izučavanje putova smrti stanice na primitivnim organizmima kao što je *Caenorhabditis elegans*. Bcl-2 homolozi ovog nematoda nazivaju se CED-3 (34, 35).

Proapoptotski proteini prisutni su u citosolu kao senzori staničnog oštećenja ili stresa, dok se antiapoptotski proteini nalaze u intermembranskom prostoru mitohondrija. Članovi Bcl-2 porodice reguliraju broj i tip ionskih kanala u unutrašnjoj membrani mitohondrija, pri čemu Bad i Bax preko interakcije s antiapoptotskim proteinima dovode do stvaranja većih ionskih kanala kroz koje izlaze citokrom c i druge proapoptotske molekule. Otpušteni citokrom c veže se uz medijatorske molekule Apaf-1 koje aktiviraju kaspaze 9, a one potom i kaskadu drugih kaspaza (21, 30, 36). Taj kompleks citokroma c, Apaf-1, kaspaza 9 i ATP-a naziva se apoptozom (2).

Osim citokroma c, mitohondriji sadržavaju i druge apoptotske faktore kao što su AIF (Apoptosis-Inducing Factor) i endonukleaza G. Ta endonukleaza izlazi iz mitohondrija za vrijeme apoptoze i djelomično je odgovorna za internukleosomsko cijepanje DNA neovisno o kaspazama (37, 38).

U ranoj fazi apoptoze vanjska membrana mitohondrija postaje propusna za proteine, što rezultira otpuštanjem topljivih intermembranskih mitohondralnih proteina, dok na unutrašnjoj membrani dolazi do slabljenja transmembranskog potencijala ($\Delta\Psi_m$) što se može određivati kao indikator ranih apoptotskih promjena u uvjetima *in vivo* (39).

Bcl-2 porodica regulira mnoge putove, ali čini se da ima manji utjecaj na interakcije receptor-ligand. Tako npr. smrtonosni signali CD-95-receptora mogu zaobići kontrolu Bcl-2 porodice. Bax sadržava mjesta za vezanje p53 proteina tako da je njegova funkcija i regulirana ovisno o oštećenju DNA i porastu p53 u citosolu stanice.

NAČINI MORFOLOŠKE KARAKTERIZACIJE APOPTOZE

Kao parametri za određivanje apoptoze rabe se morfološki i biokemijski pristupi (14).

Postoje jednostavne metode koje se rutinski rabe za procjenu apoptoze stanica različitih tkivnih rezova, kultura stanica i svježe izoliranih stanica. Ove se metode temelje na otkrivanju morfoloških specifičnosti apoptotskih stanica svjetlosnom mikroskopijom (40). Apoptotske se stanice mogu prepoznati na osnovi morfoloških promjena (skvrčavanje stanice, kondenzacija kromatina, zbite vakuole unutar stanice). Preporuča se brojenje barem sto stanica u nekoliko različitih polja, a rezultat se izražava kao postotak stanica u apoptozi (100 x broj apoptotskih stanica/ukupan broj stanica). Za morfološku karakterizaciju rabe se i druge mikroskopske tehnike poput elektronske mikroskopije (3, 41) i konfokalne laser-skenirajuće mikroskopije (42, 43).

Protočnom citometrijom mogu se otkriti i kvantificirati apoptotske i nekrotične stanice (17, 44).

Za određivanje apoptoze može se rabiti kometski test koji je oblik mikroelektroforeze pojedinačnih stanica (44, 45, 46). To je pouzdana metoda koja zahtijeva veći broj apoptotskih stanica.

Usavršavanjem i modificiranjem razvijene su neke nove metode poput kvantitativnog DNA difuzijskog pokusa (47).

Fragmenti DNA mogu se otkriti i enzimatskim označavanjem slobodnih 3-OH skupina s modificiranim nukleotidima poput biotina, digoksigenina, fluorescina (48).

TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP Nick and Labeling) rabi se za označavanje jednostrukih i dvostrukih prekida DNA lanca s pomoću terminalne deoksiribonukleotidil transferaze (49). Prednost metoda s označavanjem 3'OH krajeva mogućnost je otkrivanja ranih lomova DNA tijekom apoptoze (44).

Određivanje fosfatidilserina na površini apoptotskih stanica s pomoću aneksin-V afinitetnog testa pokazalo se kao vrlo pouzdana metoda na kulturama životinjskih stanica (50).

Imunohistokemijske metode (51), određivanja aktivnosti endonukleaza (24, 52, 53), ekspresije proapoptotskih i antiapoptotskih gena (41), kao i drugih markera apoptoze (9), otvaraju široke mogućnosti u razvijanju i unaprjeđivanju novih detekcijskih metoda.

LITERATURA

1. Hall PA, Coates PJ, Ansari B, Hopwood D. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract:

- the importance of apoptosis. *J Cell Sci* 1994;107:3569-77.
2. Zhang Y, Herman B. Ageing and apoptosis. *Mech Ageing Dev* 2002;123:245-60.
 3. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57.
 4. Buttian R, Gobë G. Apoptosis in the mammalian kidney: incidence, effectors, and molecular control in normal development and disease states. *Adv Pharmacol* 1997;41:369-81.
 5. Savill J. Apoptosis and the kidney. *J Am Soc Nephrol* 1994;5:12-21.
 6. Duke CR, Ojcius DM, Young JDE. Cell Suicide in health and disease. *Sci Am* December 1996;48-55.
 7. Vermes I, Haanen C. Apoptosis and programmed cell death in health and disease. *Adv Clin Chem* 1994;31:177-246.
 8. Mohammed M, Laurent G, Mingeot-Leclercq MP, Henryk ST, Cumps J, Tulkens MP. Apoptosis in renal proximal tubules of rats treated with low doses of aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:665-75.
 9. Schumer M, Colombel CM, Sawczuk SI, Gobë G, Connor J, O'Toole MK, i sur. Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. *Am J Pathol* 1992;140:831-8.
 10. Corcoran BG, Lori F, Dean PJ, Treinen Moslen M, Nicotera P, Oberhammer FA, i sur. Apoptosis: molecular control point in toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994;128:169-81.
 11. Bascó Z, Everson BR, Eliason FJ: The DNA of Annexin V-binding apoptotic cells is highly fragmented. *Cancer Res* 2000;60:4623-8.
 12. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata SA. Caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998;391:43-50.
 13. Ihara T, Tsukiko Y, Masao S, Hiroki O, Yoshio U. The process of ultrastructural changes from nuclei to apoptotic body. *Virchows Arch* 1998;433:443-7.
 14. Rust C, Gores GJ. Apoptosis and liver disease. *Am J Med* 2000;108: 567-74.
 15. Lecoeur H. Review Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases. *Exp Cell Res* 2002;277:1-14.
 16. Zakeri Z, Lockshin AR. Cell death during development. *J Immunol Methods* 2002;265:3-20.
 17. Vermes IHC, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods* 2000;243:167-90.
 18. Williams GT, Smith CA, Spooner E, Dexter TM, Taylor DR. Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature* 1990;343:76-8.
 19. Kovač Z. Smrt stanice. U: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z, urednici. *Patofiziologija*. 5. izdanje. Zagreb: Med naklada; 2002. str.123-31.
 20. Davis AM, Ryan HD. Review article Apoptosis in the Kidney. *Toxicol Pathol* 1998;26:810-25.
 21. Vaux DL. Apoptosis and toxicology-what relevance? *Toxicology* 2002;181-182: 3-7.
 22. Lee HC, Wei YH. Mitochondrial role in life and death of the cell. *J Biomed Sci* 2000;7:2-15.
 23. Choi C, Chae C. Expression of tumour necrosis factor- α is associated with apoptosis in lungs of pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Res Vet Sci* 2002;72:45-9.
 24. Köhler C, Sten O, Boris Z. Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *J Immunol Methods* 2002;265:97-111.
 25. Zimmerman CK, Green RD. How cell die: Apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immunol* 2000;108:99-103.
 26. Miller KL. An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends Cell Biol* 1999;9:323-8.
 27. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995;81:505-12.
 28. Faubion W, Gores G. Death receptors in liver biology and pathobiology. *Hepatology* 1999;29:1-4.
 29. Sánchez-Torres LE, Vargas FD. Apoptosis: the phenomenon and its determination. *Téc Pecú Méx* 2003;41(1):49-62.
 30. Zimmerman KC, Douglas RG. How cells die: Apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:99-103.
 31. Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, Morris RG, Bird CC, Hooper ML, i sur. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 1993;362:849-52.
 32. Komarova AE, Gudkov VA. Chemoprotection from p53-dependent apoptosis: potential clinical applications of the p53 inhibitors. *Biochem Pharmacol* 2001;62:657-67.
 33. Adams J, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;281:1322-6.
 34. Yuan JS, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1- β -converting enzyme. *Cell* 1993;75:641-52.
 35. Parrish J, Li L, Klotz K, Ledwich D, Wang X, Xue D. Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. Elegans*. *Nature* 2001;412:90-4.
 36. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinvasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, i sur. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91:479-89.
 37. Widlak P, Li YL, Wang X, Garrard TW. Action of Recombinant Human Apoptotic Endonuclease G on Naked DNA and Chromatin Substrates. *J Biol Chem* 2001;276:48404-09.

38. Susin AS, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, i sur. Two Distinct Pathways Leading to Nuclear Apoptosis. *J Exp Med.* 2000;192: 571-9.
39. Castedo M, Ferri K, Roumier T, Me'tivier D, Zamzami N, Kroemer G. Quantitation of mitochondrial alterations associated with apoptosis. *J Immunol Methods* 2002;265:39-47.
40. Plaa LG, Cherbonneau M, Hayes AW. Principles and methods of Toxicology. Philadelphia: Taylor & Francis; 2001.
41. Mirakian R, Nye K, Palazzo FF, Goode AW, Hammond LJ. Methods for detecting apoptosis in thyroid disease. *J Immunol Methods* 2002;265:161-75.
42. Smith GJ, Bagnell CR, Bakewell WA, Black KA, Bouldin TW, Earnhardt TS, i sur. Application of confocal scanning laser microscopy in experimental pathology. *J Electron Microscop Technol* 1991;18:38-49.
43. Zucker MR, Hunter ES, Rogers MJ. Apoptosis and morphology in mouse embryos by confocal laser scanning microscopy. *Methods* 1999;18:473-80.
44. Sgonc R, Gruber J. Apoptosis detection: an overview. *Exp Gerontol* 1998;33:525-33.
45. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980;68:251-306.
46. Choucroun P, Gillet D, Dorange G, Sawicki B, Dewitte DJ. Comet assay and early apoptosis. *Mutat Res* 2001;478:89-96.
47. Singh PN. A simple method for accurate estimation of apoptotic ceels. *Exp Cell Res* 2000;256:328-37.
48. Gold R, Schmied M, Rothe G, Zischler H, Brietschopf H, Wekerle H, i sur. Detection of DNA fragmentation in apoptosis: application of in situ nick translation to cell culture systems and tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1993;41:1023.
49. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119(3): 493-501.
50. Pläsier B, Lloyd DR, Paul GC, Thomas CR, Al-Rubeai M. Automatic image analysis for quantification of apoptosis in animal cell culture by annexin-V affinity assay. *J Immunol Methods* 1999;229:81-95.
51. Ikeyama S, Nakui T, Nishibe T, Furukawa S, Goryo M, Okada K. Apoptosis of proliferative cortical tubular epithelia in chronic progressive nephrosis of rats. *J Vet Med Sci* 2000;62(4):367-74.
52. Walker PR, Leblanc J, Smith B, Pandey S, Sikorska M. Detection of DNA Fragmentation and Endonucleases in Apoptosis. *Methods: Companion Methods Enzymol* 1999;17:329-38.
53. Grabarek J, Darzynkiewicz Z. In situ activation of caspases and serine proteases during apoptosis detected by affinity labeling their enzyme active centers with fluorochrome-tagged inhibitors. *Exp Hematol* 2002;30:982-9.

Summary

APOPTOSIS - PROGRAMMED CELL DEATH

During the evolution, multi-cellular organisms have developed various protective mechanisms against environmental insults. Apoptosis is one of physiological mechanisms where in fact a cell itself actively induces its own death. In contrast to necrosis where the cell death occurs usually as a result of severe physical or chemical extra cellular factors accompanied by inflammatory reactions of tissue, the apoptotic process starts without signs and symptoms of inflammation, and generally starts from the inside of the cell, involving the use of energy and active synthesis of specific proteins. Apoptosis is important for the right balance between the loss of old, non-functional cells and the formation of new ones in certain organs and tissues. In addition, it is a specific answer of an organism to a number of pathological conditions. Thus apoptosis plays a very important role both in physiologic and pathologic processes in the body throughout the life of an organism. A normal development of embryo and foetus is impossible without a very intensive apoptotic process. The dysfunction of the apoptotic mechanism is associated with a number of diseases in humans and animals. The apoptosis starts by triggering different intra- and intercellular signals and stimulations, which involve a number of extrinsic or intrinsic apoptotic pathways resulting in caspase cascade activation. Caspases belongs to the family of cysteine proteases, and have a central role in facilitating a number of morphological and biochemical changes during the programmed cell death. The understanding of these complex pathways offers new approaches to clinical treatment of fatal human diseases. The promising possibilities of application of the knowledge about the mechanism of apoptosis in the treatment of human diseases make the research in this field challenging and exciting.

KEY WORDS: *Bcl-2 family, caspases, homeostasis, death receptors, necrosis, p53*

REQUESTS FOR REPRINTS:

Vilim Žlender, dr. vet. med.
Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada
p.p. 291, HR-10001 Zagreb
E-mail: Vilim.Zlender@imi.hr