

APOPTOZA I AUTOFAGIA – MECHANIZMY I METODY DETEKCJI*

APOPTOSIS AND AUTOPHAGY –
MECHANISMS AND DETECTION METHODS

Karolina Weronika RUDNICKA, Ewelina SZCZĘSNA, Eliza MISZCZYK,
Magdalena MIKOŁAJCZYK-CHMIELA

Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Zakład Gastroimmunologii,
Uniwersytet Łódzki

Streszczenie: Apoptoza, przez dekady uważana za jedyny rodzaj programowanej śmierci komórki, pełni kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy organizmu. Wyniki badań, prowadzonych w ostatnich latach, dowodzą, że w zależności od typu komórki, rodzaju czynnika szkodliwego i jego intensywności komórka może być kierowana na drogę apoptozy lub ulegać innym, stosunkowo niedawno poznany typom programowanej śmierci. Zgodnie z wytycznymi Komitetu do spraw Nazewnictwa Śmierci Komórkowej – NCCD (*Nomenclature Committee on Cell Death*), wśród mechanizmów obumierania komórek poza apoptozą wyróżniono między innymi autofagię, katastrofę mitotyczną, anoikozę, paraptozę, degenerację Walleriana, entozę, oraz keratynizację. W powyżej pracy przedstawiono krótką charakterystykę wymienionych procesów, ze szczególnym uwzględnieniem apoptozy i autofagii oraz metod detekcji tych mechanizmów. Rozpatrzono także potencjalne powiązania pomiędzy programowaną i nieprogramowaną śmiercią komórki. Metodyka wykrywania typów śmierci komórkowej opiera się na technikach mikroskopowych, służących do obserwacji charakterystycznych zmian morfologicznych oraz na metodach genetycznych i biochemicznych, umożliwiających wykrycie odpowiednio genetycznych lub białkowych markerów zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych. Pomimo dostępności licznych metod badawczych, rozróżnienie poszczególnych rodzajów śmierci komórkowej zarówno programowanej, jak i nieprogramowanej nadal przysparza trudności. NCCD zaleca stosowanie co najmniej dwóch metod identyfikacji obumarłych komórek, np. mikroskopii i metod biochemicznych, umożliwiających ocenę różnych markerów danego procesu.

*Praca współfinansowana ze środków Funduszu Unijnego w ramach projektu „Stypendia wspierające innowacyjne projekty badawcze doktorantów”



oraz ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego przyznanych na realizację grantu o numerze N401 015136.

Słowa kluczowe: programowana śmierć komórki, apoptoza, autofagia, metody detekcji.

Summary: For a long time apoptosis has been considered the only type of programmed cell death responsible for the maintenance of homeostasis in the organism. However, the results of studies, which have been carried out for the last years, prove that depending on its type, the cell can be guided in different directions, which can result either in its survival or death. According to the NCCD Committee, apoptosis and autophagy are ranked as two types of cell death. The cell death, depending on its localization and its mechanism, has been divided into several subtypes and newly recognized types, such as: mitotic catastrophe, anoikosis, paraptosis, degeneration of Wallerian, entosis and cornification. This review was mainly focused on the characterization of mentioned processes with special attention paid to apoptosis, autophagy and detection methods. Moreover, a different view on the connections between programmed and unprogrammed cell death has been presented. The detection methods concerning different types of cell death in general can be divided into microscopic methods that allow the observation of typical morphological changes, and biochemical methods, based on the detection of extracellular and intracellular indicators. In spite of many available detection techniques, the distinction between particular types of cell death, both programmed and unprogrammed, often becomes impossible. For that reason, the NCCD Committee recommended to apply at least two detection methods (for example: microscopic and biochemical). Nevertheless, there are findings which suggest that many types of cell death should rather be considered as its stages and should not be divided into different processes.

Key words: programmed cell death, apoptosis, autophagy, detection methods.

WPROWADZENIE

Różnicowanie komórek, podobnie jak ich namnażanie i obumieranie jest naturalnym procesem fizjologicznym zachodzącym w każdym żywym organizmie. Występowanie sekwencji tych zdarzeń jest w każdej komórce zaprogramowane, innymi słowy genetycznie zakodowane.

Zainteresowanie mechanizmami programowanej śmierci komórkowej (PŚK) zwiększyło się po 1972 roku, kiedy J.F.R. Kerr wprowadził termin *apoptosis* i opisał ten proces w szczurzych komórkach wątroby poddanej doświadczalnemu niedokrwieniu [29]. Jednakże zjawisko to, pod swoją pierwotną nazwą *chromatolysis*, zostało zaobserwowane i opisane po raz pierwszy już w 1885 roku przez W. Flemminga [10].

Na początku lat 90. XX w. okazało się, że proces obumierania komórek jest znacznie bardziej skomplikowany, niż pierwotnie zakładano. W miarę pojawiania się kolejnych doniesień na temat mechanizmów śmierci komórkowej, wprowadzono ich podział na dwie kategorie. Wyróżniono programowaną (genetycznie kontrolowaną) oraz nieprogramowaną (genetycznie niekontrolowaną) śmierć komórki [6, 8, 10]. Śmierć nieprogramowana ma charakter przypadkowy i w kontekście żywotności komórki jest zjawiskiem ostatecznym, czyli nieodwracalnym. Jej mechanizm polega na przerwaniu ciągłości błony cytoplazmatycznej komórki, co prowadzi do lizy, tj. nekrozy. Zmiany nekrotyczne w komórce mogą być inicjowane uszkodzeniami mechanicznymi, termicznymi, ale także w wyniku działania czynników chemicznych i zwykle dotyczą większej liczby sąsiadujących ze sobą komórek [8].

Programowana śmierć komórki jest aktywnym, uporządkowanym i ściśle kontrolowanym procesem umożliwiającym eliminację komórek uszkodzonych, zbędnych, zakażonych lub zmutowanych. Odgrywa istotną rolę w rozwoju tkanek i jest

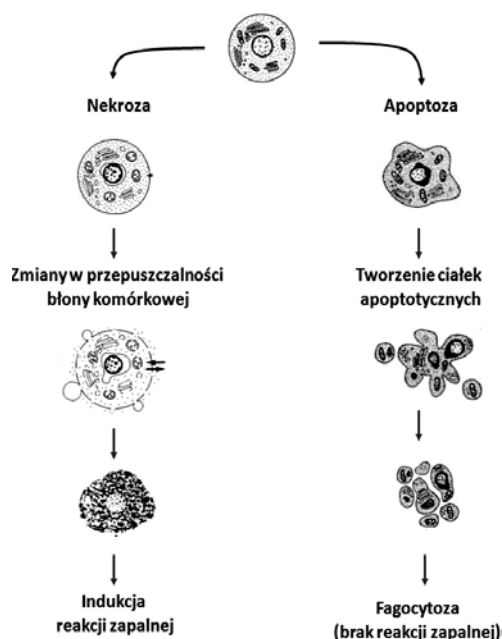
konieczna do utrzymania fizjologicznej homeostazy. Zachodzi podczas kształtowania narządów, co umożliwia kontrolę liczby komórek oraz usunięcie komórek zbędnych podczas organogenezy. Przykładem kontrolowanej eliminacji komórek jest zanikanie błony między palcami podczas formowania dłoni u zarodka ludzkiego, a także usuwanie nadmiaru komórek, które nie osiągnęły właściwego stopnia dojrzałości w czasie tworzenia połączeń między neuronami [14, 17, 52]. Sugeruje się, że zjawisko fizjologicznej śmierci komórki ma istotne znaczenie w biologii rozrodu, szczególnie podczas spermatogenezy. Podczas tego procesu spermatydy ulegają charakterystycznym przemianom morfologiczno-biochemicznym, m.in. dochodzi do kondensacji chromatyny jądrowej. Proces ten umożliwia dostosowanie rozmiarów DNA do zmniejszonej objętości jądra w dojrzałych plemnikach. U człowieka, jedno spermatogonium jest źródłem 100 spermatyd. Liczba ta znacząco odbiega od teoretycznej liczby 4096 spermatyd, co wskazuje na udział w tym procesie programowanej śmierci komórkowej [55].

Ponadto programowana śmierć jest konieczna do unieszkodliwienia komórek zakażonych lub zmutowanych, stanowiących zagrożenie dla funkcjonowania organizmu [27, 37, 49, 50]. Wykazano, iż zaburzenia w funkcjonowaniu mechanizmów PŚK odgrywają ważną rolę w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych m.in. w chorobie: Parkinsona, Alzheimerera, Huntingtona oraz w licznych chorobach zakaźnych, w tym z udziałem *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis* czy *Salmonella typhimurium* [2, 12, 23, 38, 68].

W ciągu wielu lat badań nad PŚK pojawiały się kolejne terminy, opisujące wcześniej niepoznane i niesklasyfikowane typy programowanej śmierci. Ze względu na występowanie morfologicznych i biochemicznych różnic w obumierających komórkach wyróżniono pierwszy (I) i drugi (II) typ programowanej śmierci komórkowej, do których odpowiednio przyporządkowano apoptozę i autofagię. [8, 36]. Apoptoza jest najlepiej poznaną formą PŚK. Obecnie znane są molekularne mechanizmy kontrolujące ten proces. Natomiast autofagia, jako proces niedawno odkryty, wciąż jest przedmiotem intensywnych prac naukowych. Efektem prowadzonych badań jest coraz lepsza znajomość mechanizmów, induktorów i metod detekcji tego procesu.

APOPTOZA

W przeciwieństwie do komórek, które ulegają nekrozie, komórki w stanie śmierci apoptotycznej są obkurczone, ich chromatyna staje się skondensowana, a DNA ulega fragmentacji. Błona plazmatyczna tworzy charakterystyczne wpuklenia co ostatecznie prowadzi do utworzenia tzw. ciałek apoptotycznych zawierających krótkie (ok. 200 par zasad) odcinki DNA. Te pęcherzykowate struktury mają na zewnętrznej stronie błony komórkowej fosfatydyloserynę (PS), za której pośrednictwem są rozpoznawane i pochłaniane przez sąsiadujące komórki fagocytykujące. Eliminacja ciałek apoptotycznych przez makrofagi zapobiega rozwojowi reakcji zapalnej, która jest typowa dla procesu nekrozy (ryc. 1) [27, 29]. W zależności od typu komórki i rodzaju bodźca (m.in. reaktywne formy tlenu, promieniowanie jonizujące, czynniki pochodzenia



RYCINA 1. Schemat ogólny apoptozy i nekrozy [42]
 FIGURE 1. Basic stages of apoptosis and necrosis [42]

charakter kaskadowy: wzbudzenie kaspaz inicjatorowych (kaspazy-8,-9) pobudza kaspazy wykonawcze (np. kaspazę-3). Od tej chwili komórka kierowana jest na drogę nieodwracalnych zmian doprowadzających do jej śmierci. Dochodzi do enzymatycznego cięcia substratów, takich jak ICAD (inhibitor DNazy aktywowanej kaspazą-3), co z kolei indukuje degradację DNA z udziałem endonukleaz oraz hydrolizę białek PARP (polimeraza poli-ADP rybozy) (ryc. 2). Ostatecznie aktywacja kaspaz wykonawczych prowadzi do degradacji komponentów komórkowych i tworzenia ciałek apoptotycznych [51, 59].

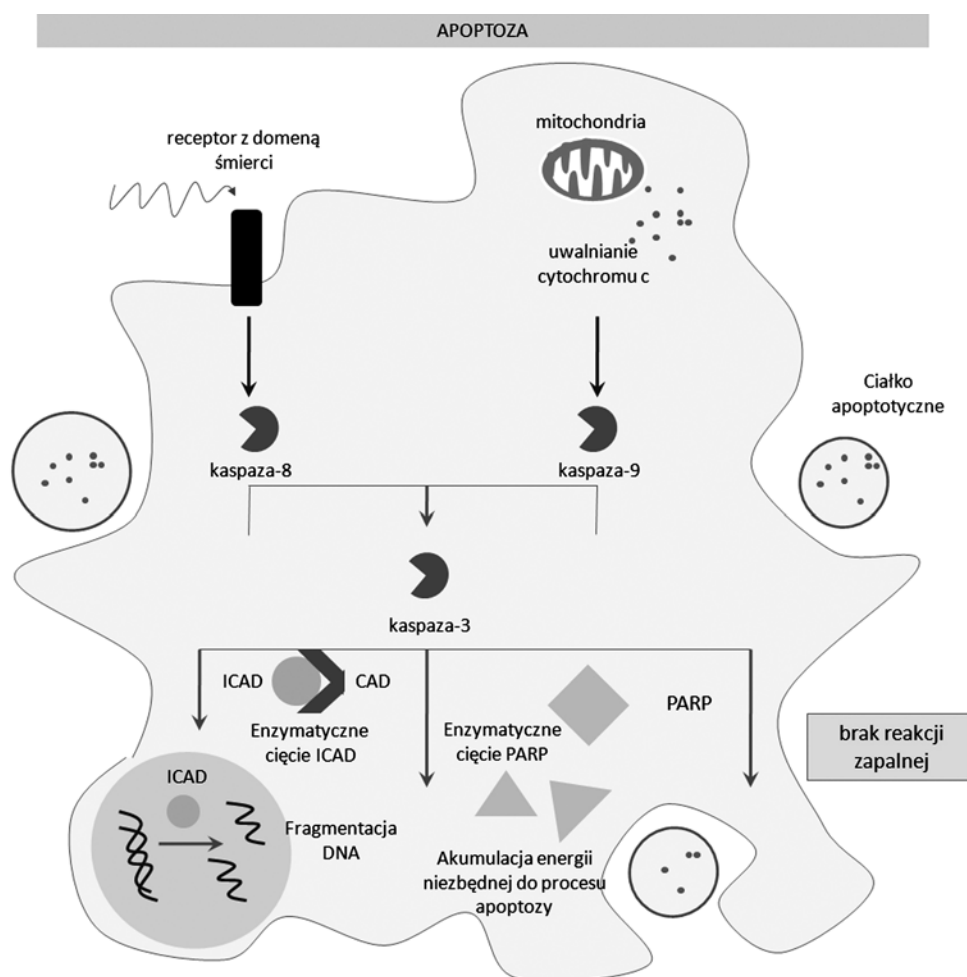
Metody detekcji apoptozy

Do metod najczęściej stosowanych w wykrywaniu procesu apoptozy w komórkach somatycznych należą techniki mikroskopowe z zastosowaniem odpowiednich znaczników i barwników, elektroforeza w żelu, metody histochemiczne, technika cytometrii przepływowej, metody opierające się na detekcji potencjału błonowego mitochondriów, testy immunoenzymatyczne ELISA umożliwiające wykrycie kaspaz, a także metoda *Western-blot* (tab. 1).

Najstarszą, ale nadal stosowaną metodą jakościową jest metoda mikroskopowa, która pozwala na obserwację komórkowych zmian morfologicznych, takich jak tworzenie ciałek apoptotycznych, obserwowanych przy użyciu mikroskopu elektronowego [4, 65]. Komórki apoptotyczne poddane barwieniu mogą być wykrywane przy użyciu mikroskopu świetlnego. W tym przypadku stosowane są barwniki wiążące się z kwasami nukleinowymi, np. hematoksylina oraz odczynnik Schiffa. W obrazie

bakteryjnego) apoptoza przebiega w różny sposób, uruchamiając przy tym odmienne szlaki biochemiczne. Do najlepiej poznanych należą: szlak wewnętrzny, związany z mitochondrium oraz szlak zewnętrzny, zależny od receptorów zakotwiczonych w błonie komórkowej, do których zalicza się cząsteczki rodziny TNF.

W wyniku uruchomienia obu szlaków sygnałowych rozpoczyna się proces depolaryzacji błony mitochondrialnej, uwalniany jest cytochrom c zaliczany do czynników indukujących śmierć komórki oraz dochodzi do aktywacji kaspaz, niszczących określone białka komórkowe [13, 14, 20]. Wszystkie poznane dotychczas kaspazy są syntetyzowane jako nieaktywne proenzymy, które w wyniku cięcia proteolitycznego są przekształcane w formę aktywną. Indukcja kaspaz ma



RYCINA 2. Zmiany biochemiczne i morfologiczne zachodzące podczas procesu apoptozy – schemat ogólny, stosowane skróty: CAD – DNAaza aktywowana kaspazą-3, ICAD – inhibitor DNAazy aktywowanej kaspazą-3, PARP – polimeraza poli(ADP-rybozy, zmodyfikowano wg [23]
 FIGURE 2. Biochemical and morphological changes in apoptotic cells – main stages of the process, abbreviations: CAD – caspase-3-activated DNase, ICAD – inhibitor of caspase-3-activated DNase, PARP – Poly(ADP-ribose)-polymerase, modified [23]

mikroskopowym widoczne są wybarwione fragmenty DNA otoczone błoną komórkową ciała apoptotycznego [67]. Kondensację DNA, charakterystyczną dla procesu apoptozy, można ocenić po wyznakowaniu komórek oranżem akrydyny i ich obserwacji pod mikroskopem fluorescencyjnym. Większość komórek będących w późnej fazie apoptozy charakteryzuje się fragmentacją DNA jądrowego, którą można wykazać po przeprowadzeniu rozdziału materiału komórkowego w polu elektrycznym techniką elektroforezy w żelu. Uzyskany obraz w formie tzw. „drabinkowego” wzoru DNA świadczy o pocięciu materiału genetycznego przez endonukleazy na odcinki około 200 par zasad. Fragmentacja DNA może być także wykryta metodami histochemicznymi, tj. techniką TUNEL, opierającą się na

TABELA 1. Metody wykrywania apoptozy – TABLE 1. Apoptosis detection methods

| Rodzaj metody | Techniki detekcji |
|---------------------------|---|
| Mikroskopia | obserwacja ciałek apoptotycznych (E, F, S), barwienie hematoksyliną i eozyną (S), barwienie oranżem akrydyny (F), użycie fluorescencyjnych cząsteczek lipofilnych (F), TUNEL (F), metody immunohistochemiczne (E, F, S) |
| Elektroforeza w żelu | barwienie DNA, <i>Western-blot</i> |
| Metody immunoenzymatyczne | pomiar markerów wewnątrzkomórkowych, np. kaspaz (ELISA) |
| Cytometria przepływową | barwienie JP i aneksyną V, użycie fluorescencyjnych cząsteczek lipofilnych, oznaczanie markerów apoptozy znakowanymi przeciwciałami monoklonalnymi |

E – mikroskopia elektronowa, F – mikroskopia fluorescencyjna, S – mikroskopia świetlna, JP – jodek propidyny

zastosowaniu znakowanych fluorescencyjnie lub enzymatycznie fragmentów dUTP, które w obecności odcinków DNA z wolną grupą 3'-OH, łączą się z nimi i są wykrywane za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego, cytometru przepływowego lub metod immunohistochemicznych. Metodą znajdującą zastosowanie w wykrywaniu fragmentów jednoniciowego DNA (ssDNA) jest technika z użyciem przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko charakterystycznej sekwencji nukleotydowej (polideoksytymidyny). Przeciwciała łączą się swoiście z miejscem docelowym tylko wtedy, gdy ssDNA składa się z co najmniej 30 par zasad [65, 67, 8].

Jedną z charakterystycznych zmian zachodzących podczas apoptozy i tworzenia ciałek apoptotycznych jest przemieszczenie na powierzchnię komórki fosfatydyloseryny (PS) zlokalizowanej w komórkach żywych po wewnętrznej stronie błony komórkowej. W ten sposób staje się ona dostępna dla aneksyny V, białka charakteryzującego się wysokim powinowactwem do PS oraz brakiem zdolności przenikania do wnętrza komórki. Sprzęgnięcie aneksyny V z barwnikiem fluorescencyjnym, np. izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC), umożliwia wykrycie translokacji PS w cytometrze przepływowym. W technice tej, w celu odróżnienia komórek apoptotycznych od nekrotycznych stosuje się dodatkowe barwienie jodkiem propidyny (JP), który łączy się z DNA. Barwnik ten nie przenika przez barierę lipidową, zatem znakuje tylko komórki ulegające nekrozie, pozbawione integralności błony komórkowej. W ten sposób, zieloną fluoresceinę emitować będą jedynie komórki w stanie apoptozy eksponujące na swojej powierzchni kompleks fosfatydyloseryny i aneksyny V. Natomiast komórki w stanie nekrozy, które związały JP, będą źródłem czerwonego świecenia. Ponadto w końcowym etapie apoptozy lub bezpośrednio po tym procesie, ciała apoptotyczne mogą ulegać rozpadowi. Proces ten określa się terminem apoptotycznej nekrozy [67].

Cechą typową dla procesu apoptozy jest obniżenie potencjału śród błonowego mitochondriów. Zjawisko to wykorzystano w opracowaniu nowych technik wykrywania procesu apoptozy. W celu detekcji tej właściwości stosuje się fluorescencyjne cząsteczki lipofilne, które w komórkach zdrowych agregują w mitochondriach, tworząc świecące na czerwono kompleksy polimerowe. Mitochondria komórek, które uległy apoptozie, mają obniżony potencjał błonowy,

co sprawia, że cząsteczki lipofilne pozostają w formie monomerycznej, emitując zieloną fluorescencję. Pomiaru nasilenia intensywności świecenia można dokonać przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego lub cytometru przepływowego [4, 67].

Techniką, która dzięki wysokiej czułości znalazła szerokie zastosowanie w ocenie procesu apoptozy, jest metoda immunoenzymatyczna ELISA pozwalająca na wykrywanie kaspaz inicjatorowych i/lub efektorowych w lizatach komórkowych. Metoda ta służy także do oceny jakościowej i ilościowej innych markerów apoptozy, będących regulatorami cyklu komórkowego, takich jak: Bax, Bcl-2, Apaf-1. Dostępność kilkudziesięciu typów przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko markerom zewnątrz- i wewnątrzkomórkowym apoptozy pozwala na szerokie stosowanie metody immunoenzymatycznej ELISA oraz technik immunohistochemicznych. W metodach tych białka będące markerami procesu apoptozy są rozpoznawane przez odpowiednie przeciwciała monoklonalne, a następnie, utworzone kompleksy są identyfikowane przez izotypowo-swoiste przeciwciała poliklonalne sprzężone z enzymem [4, 10].

Stosunkowo niedawno dostępne stały się metody z zastosowaniem interferencyjnego RNA (iRNA/siRNA) pozwalające na zablokowanie genów zaangażowanych w apoptozę. siRNA może służyć do stałego wyciszenia określonych genów w komórce lub generacji stabilnej linii komórkowej pozbawionej tych genów. Narzędzia takie pozwalają na ocenę wpływu określonych białek na przebieg apoptozy [4].

Procesy programowanej śmierci komórkowej, występujące w męskich komórkach płciowych są fizjologicznym, zaprogramowanym genetycznie etapem spermatogenezy, podczas którego eliminowane są komórki uszkodzone. Z drugiej strony, obumieranie plemników może być efektem i manifestacją obniżonej płodności lub bezpłodności. Rutynowa ocena jakości nasienia sprowadza się do mikroskopowej obserwacji morfologii, liczby i ruchliwości plemników. Obserwacja procesu apoptozy w tych komórkach jest utrudniona z uwagi na wysoki stopień upakowania chromatyny, znikomą ilość cytoplazmy oraz charakterystyczną budowę i rozmiary plemników. Zmiany morfologiczne typowe dla procesu apoptozy komórek somatycznych, np. obecność ciałek apoptotycznych nie są obserwowane w tych komórkach. W plemnikach pochodzących od mężczyzn z obniżoną płodnością Shen H. M. i wsp. wykazali występowanie pęknięć DNA, translokację fosfatydylocholino, jak również obecność kaspazy-3 [55]. Autorzy ci sugerują, że obecność pęknięć DNA oceniona metodą TUNEL pozwala na wykazanie zachodzącego w plemnikach procesu apoptozy, pozostającego w związku z obniżoną ruchliwością plemników i negatywnie skorelowanego z płodnością badanych mężczyzn [55].

AUTOFAGIA

Autofagia jest wysoce zachowawczym procesem występującym w komórkach eukariotycznych. Zjawisko to w różnym nasileniu wykryto zarówno w komórkach *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, jak i w komórkach ssaczych [47, 56]. W przeciwieństwie do apoptozy i nekrozy, autofagia nie jest jednoznacznie utożsamiana ze stanem śmierci komórkowej. Jest to mechanizm aktywowany w

odpowiedzi na warunki stresowe, którego efektem jest degradacja białek cytoplazmatycznych (uszkodzonych lub zbędnych) lub eliminacja całych organelli. W warunkach homeostazy fizjologicznej autofagia zachodzi na bardzo niskim poziomie, przyczyniając się do sprawnego obiegu białek w komórce oraz przeciwdziałając akumulacji białek uszkodzonych [3, 26, 31, 41].

W ujęciu ogólnym jest to proces, w którym zmienione białka cytoplazmatyczne lub organelle są zamykane w wakuoli o podwójnej błonie, tzw. autofagosomie, a następnie dostarczane lizosomom zawierającym enzymy, które hydrolizują zawartość powstałego autofagolizosomu [69]. Autofagia może funkcjonować jako strategia przetrwania komórki w warunkach ograniczonej dostępności substancji pokarmowych. Większość rozkładanych w autofagolizosomie komponentów jest źródłem składników odżywczych, umożliwiając komórce przeżycie przy możliwie najniższym zużyciu energii [15, 35].

Proces ten zachodzi we wszystkich komórkach w celu utrzymania homeostatycznych funkcji cytoplazmy, białek i organelli. Do szybkiego uruchomienia autofagii dochodzi, gdy zapotrzebowanie komórki na energię zwiększa się, a w wyniku stresu odżywczego, oksydacyjnego lub zakażenia, energia ta nie może być uzyskana. Wówczas następuje wychwytywanie własnych, cytoplazmatycznych komponentów komórkowych, które w wyniku działania enzymów lizosomalnych są degradowane do aminokwasów, nukleotydów i wolnych kwasów tłuszczowych. Odzyskiwane w ten sposób produkty wykorzystywane są m.in. do syntezy ATP. Autofagia została odkryta w komórkach ssaków, a dokładniej zbadana w komórkach drożdży, u których zidentyfikowano ponad 20 genów związanych z tym procesem, m.in. klaster genów *atg*, kodujących białka zaangażowane w indukcję autofagii, tworzenie i dojrzewanie autofagosomu oraz odzyskiwanie białek z dojrzałego autofagosomu. W proces autofagii zaangażowane są ponadto kompleksy białkowe t- i v-SNARE oraz białka Rab i GTP-azy determinujące fuzję autofagolizosomu z lizosomem. Autofagia jest procesem ewolucyjnie konserwatywnym, stąd większość genów *atg* opisanych u drożdży zidentyfikowano także u organizmów wyższych [21, 56].

Podział autofagii

Degradacja białek, organelli i innych komponentów jest istotna dla utrzymania homeostazy zarówno samych komórek, jak i tkanek. Dwie główne drogi degradacji białek to ubikwitynacja, która unieczynnia białka o krótkim okresie półtrwania oraz autofagia, która obejmuje procesy dostarczania białek i organelli do lizosomów w celu ich degradacji [11, 16]. Obecnie wyróżnia się trzy rodzaje autofagowej degradacji komponentów komórkowych różniące się sposobem dostarczania substratów do lizosomów, a także mechanizmami regulacji.

1) Makroautofagia (dalej nazywana autofagią) jest procesem najczęściej indukowanym w warunkach stresowych. W początkowym etapie tego procesu dochodzi do oddzielenia składników cytoplazmy i/lub organelli podwójną błoną komórkową (fagoforem), co w efekcie prowadzi do utworzenia autofagosomu. Wówczas wskutek fuzji dojrzałego autofagosomu z lizosomem powstaje autofagolizosom. Poszczególne fazy tego mechanizmu (formowanie błony, wydłużanie, dojrzewanie, fuzja, degradacja) są regulowane przez ponad 14 białek, w komórkach drożdży zgrupowanych w klaster *Atg* (ryc. 3a) [39, 41].

2) Mikroautofagia polega na wprowadzeniu białek przeznaczonych do degradacji do wnętrza lizosomów i ich enzymatycznym strawieniu (ryc.3b) [41, 43].

3) Autofagia związana z białkami opiekuńczymi – CMA (ang. *Chaperone-Mediated Autophagy*) to mechanizm najczęściej przebiegający z udziałem białek opiekuńczych, których zadaniem jest wychwytywanie np. białek cytoplazmatycznych o niewłaściwej konformacji. W procesie tym jedynie białka (a nie organelle) ze swoistymi sekwencjami sygnałnymi są transportowane do światła lizosomu, gdzie ulegają degradacji [45, 46] (ryc. 3b).

Innym kryterium, według którego dokonywany jest podział autofagii są induktory tego procesu. Autofagia może być inicjowana przez czynniki środowiskowe lub zakaźne. Do czynników pierwszej grupy należą stres oksydacyjny lub odżywczy oraz związki chemiczne. W tej grupie wyróżnić należy induktory farmakologiczne m.in. rapamycynę, chloramfenikol, kofeinę oraz chemokiny IFN- γ , TNF- α oraz nanocząsteczki (np. cząsteczki stanowiące zanieczyszczenia powietrza) [31, 40, 60]. Autofagia indukowana przez czynniki mikrobiologiczne (tzw. ksenofagia) może z jednej strony prowadzić do eradykacji zakażenia, szczególnie gdy zawiedzie proces fagocytozy, a z drugiej zaś strony do wykorzystania autofagosomu jako miejsca namnażania patogennych bakterii lub wirusów [24, 38].

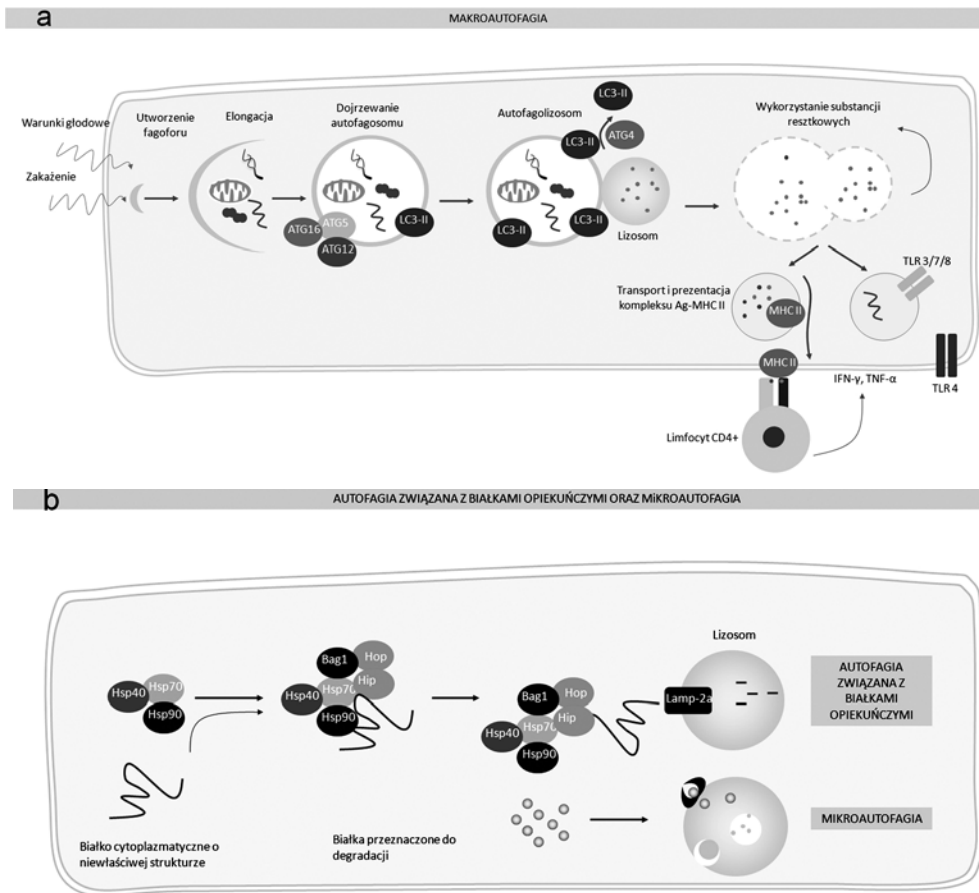
Z uwagi na lokalizację procesu autofagii wyróżniono: pyroptozę, która dotyczy makrofagów oraz mitofagię, czyli autofagię mitochondriów [1, 12, 22].

Proces pyroptozy został po raz pierwszy opisany w makrofagach zakażonych *Salmonella typhimurium*. Stwierdzono, że jego indukcja następuje gdy autofagia, aktywowana w makrofagach zakażonych mnożącymi się patogenami wewnątrzkomórkowymi, nie pozwala zwalczyć inwazji bakterii. Jest to szczególny rodzaj programowanej śmierci komórkowej, który w odróżnieniu od klasycznej autofagii prowadzi do wzbudzenia reakcji zapalnej. Pyroptoza indukowana jest przez kaspazę-1, proteazę lepiej znaną jako interleukina 1 β . Makrofagi, traktowane lipopolisacharydem (LPS) pałeczek Gram-ujemnych, uruchamiają pyroptozę i wraz z białkami adaptorowymi ASC, oraz kaspazą-1, tworzą kompleksy cytoplazmatyczne, tzw. pyroptosomy [23, 28, 72]. Sugeruje się, że indukcja odpowiedzi immunologicznej w przebiegu pyroptozy jest mechanizmem celowym. Napływ komórek immunokompetentnych, w sąsiedztwo zakażonych makrofagów zwiększa szansę na opanowanie inwazji bakterii (ryc. 4) [9, 62].

Mitofagia oznacza natomiast degradację mitochondriów w drodze autofagii i jest ściśle powiązana ze zjawiskiem katastrofy mitotycznej [1]. Chociaż istnienie mitofagii zostało odkryte stosunkowo dawno, to nadal nie wiadomo, czy mitochondria przeznaczone do degradacji są wybierane przypadkowo czy też z udziałem jakiegoś mechanizmu selekcji.

Autofagia jako II typ programowanej śmierci komórki

Jak wspomniano wcześniej, w większości przypadków, autofagia jest mechanizmem „ratującym” komórkę, czyli umożliwiającym jej przeżycie. Zatem dlaczego proces ten uznano za II typ programowanej śmierci komórkowej? Otóż, okazało się, iż nadmierna autofagia może prowadzić do zmian patologicznych i w efekcie do śmierci komórki. Jednakże, w przeciwieństwie do apoptozy, autofagia jest zwykle procesem niezależnym od kaspaz, a ich aktywacja (o ile w ogóle następuje) rozpoczy-



RYCINA 3. Makroautofagia (a), mikroautofagia oraz autofagia z udziałem białek opiekuńczych (b) – schematy ogólne (na rycinie uwzględniono tylko organelle zaangażowane w opisywany proces), stosowane skróty: Ag – antygen, ATG 4/5/12/16 – białka związane z procesem autofagii, IFN- γ – interferon gamma, LC3-II – łańcuch lekki 3 białka-1 związanego z mikrotubulami, TLR 3/4/7/8 – receptory *Toll like*), TNF- α – czynnik martwicy guzów alfa, Hsp40, Hsp70, Hsp 90, Hip, Hop, Bag1 – rodzina antyapoptycznych białek opiekuńczych, Lamp-2a – białko błonowe związane z lizosomami-2a, zmodyfikowano wg [17]

FIGURE 3. Macroautophagy (a), microautophagy and chaperone-mediated autophagy (b) – basic stages of the processes (only organelles involved in the processes are shown), abbreviations: Ag – antigen, ATG 4/5/12/16 – autophagy related proteins, IFN- γ – interferone gamma, LC3-II – microtubule-associated protein1 light chain 3, TLR 3/4/7/8 – Toll like receptor, TNF- α – Tumor Necrosis Factor alpha, Hsp40, Hsp70, Hsp 90, Hip, Hop, Bag1 – family of antiapoptotic chaperone proteins, Lamp-2a – Lysosomal-associated membrane protein 2a, modified [17]

na się w późnym etapie. Zgodnie z najnowszymi doniesieniami szlak autofagii, z udziałem bekliny 1 oraz szlak apoptozy z udziałem białek Bcl-2, mogą się łączyć. Prawdopodobnie, autofagia jest aktywowana po nieskutecznej indukcji apoptozy [3, 70, 73]. W odróżnieniu od apoptozy, w procesie autofagii chromatyna nie ulega

kondensacji, ale ma miejsce intensywna wakuolizacja cytoplazmy. Ponadto dochodzi do degradacji organelli lub całej komórki, jednakże bez uwolnienia jej zawartości do środowiska, a więc bez wzbudzania reakcji zapalnej. W proces autofagii nie są zaangażowane kaspazy, nie dochodzi także do uszkodzenia mitochondriów. Ogromna liczba autofagosomów obserwowana jest w tkankach zwierzęcych podczas eliminacji zbędnych komórek w okresie rozwojowym (np. podczas przeobrażenia owadów) lub w okresie homeostazy (np. w trakcie inwolucji gruczołu laktacyjnego) [5, 71]. Autofagia umożliwia również przetrwanie komórek w warunkach stresu m.in. w sytuacji wyczerpania czynników wzrostu, niedotlenienia czy zakażeń bakteryjnych lub wirusowych [24, 38]. Ostatnie badania potwierdzają występowanie procesu autofagii w liniach komórek nowotworowych poddanych wpływowi chemioterapeutyków [50, 53].

Interakcje patogenów z procesem autofagii

Przetrwanie makroorganizmu w dużej mierze zależy od jego zdolności do walki z czynnikami zakaźnymi. Liczne drobnoustroje patogenne zakażając komórki gospodarza pozyskują składniki odżywcze, co pozwala na ich namnażanie i rozprzestrzenianie. Często jednak inwazja drobnoustrojów prowadzi do rozwoju ciężkich chorób, a nawet śmierci gospodarza. W walce z patogenami niezwykle ważna jest wczesna odpowiedź układu odpornościowego polegająca na wzbudzeniu reakcji zapalnej i aktywacji mechanizmów odpowiedzi wrodzonej, w której istotną rolę pełnią granulocyty i makrofagi. Mechanizmy determinujące skuteczność pochłaniania patogenów przez komórki żerne to fagocytoza i autofagia. Są to procesy kataboliczne, prowadzące do eliminacji m.in. obcych cząstek z wykorzystaniem lizosomów jako źródła enzymów degradujących. Cechą różniącą te procesy jest rodzaj neutralizowanego patogenu [11]. W ujęciu ogólnym, fagocytoza wzbudzana jest przez patogeny zewnątrzkomórkowe, natomiast autofagię indukują patogeny wewnątrzkomórkowe (w dużej mierze te gatunki, które są zdolne do ucieczki z fagosomu i/lub fagolizosomu). Układ immunologiczny przystosował obie odpowiedzi komórkowe do obrony przeciwko różnym mikroorganizmom. Patogeny wewnątrzkomórkowe dostają się bezpośrednio do cytozolu lub trafiają tam po wydostaniu się z fagosomu. W pierwszym etapie patogen otaczany jest podwójną błoną komórkową, a następnie zamykany w autofagosomie, na którego powierzchni dochodzi do ekspresji markerów autofagii m.in. LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain*). Po fuzji autofagosomu z lizosomem powstaje autofagolizosom. Jest to struktura o podwójnej błonie komórkowej zawierająca w swoim wnętrzu drobnoustroje przeznaczone do strawienia oraz enzymy lizosomalne. Dla porównania patogeny zewnątrzkomórkowe po etapie adhezji do komórki zostają pochłonięte i zamknięte w fagosomie, w którym wzbudzają akumulację fosfatydyloinozytolu (PI3P) poprzez aktywację kinazy-PI3 (PI3K). PI3P powoduje przyłączenie się LC3 bezpośrednio do błony fagosomu, co wspomaga rotację fagosomu do fagolizosomu, łącząc drogi autofagii i fagocytozy [18, 38].

Rola fagocytozy w obronie organizmu jest dobrze znana. Natomiast niewiele wiadomo na temat roli autofagii w patogenezie chorób inwazyjnych. Wydaje się, że autofagia jest procesem, który w zależności od rodzaju komórki, nasilenia zakażenia, gatunku i formy morfologicznej mikroorganizmu może prowadzić do przeżycia

komórki gospodarza lub faworyzować inwazję mikroorganizmu. W odniesieniu do bakterii zdolnych do ucieczki z fagosomu/fagolizosomu autofagia jest wykorzystywana przez drobnoustroje jako druga linia obrony przed strawieniem. Przykładami takich patogenów są *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* czy *Mycobacterium tuberculosis*. Są to wewnątrzkomórkowe patogeny, które opanowują komórki gospodarza i namnażają się w nich, ponieważ są w stanie uchronić się przed mechanizmami wewnątrzkomórkowego zabijania [23, 38, 68]. Drobnoustroje te dzięki enzymom litycznym mają zdolność ucieczki z fagosomu podczas fagocytozy. Ponadto blokują zakwaszenie fagosomu, w efekcie uniemożliwiając utworzenie fagolizosomu.

W przebiegu autofagii patogen otaczany jest podwójną błoną autofagosomu i wówczas po fuzji z lizosomem powstała struktura ulega degradacji. Co ciekawe, i ta linia obrony nie we wszystkich przypadkach jest skuteczna. Pałeczki z rodzaju *Coxiella* (LCV) wykorzystują autofagolizosomy jako źródło substancji odżywczych i miejsce replikacji. Po wnikięciu do komórki gospodarza, *Coxiella burnetii* ulega zamknięciu w fagosomie, a następnie dochodzi do fuzji autofagosomu z lizosomem [32]. Wewnątrz autofagolizosomu patogeny zużywają składniki odżywcze zawarte w autofagosomie oraz wykorzystują jego wnętrze jako niszę replikacyjną. Podobny mechanizm zaobserwowano u *Legionella pneumophila* i wirusa polio. Autofagia może również przyczyniać się do eliminacji drobnoustroju. Prątki gruźlicy, po pochłonięciu przez makrofagi, trafiają do fagosomu. Mikroorganizmy te hamują fuzję lizosomu z fagosomem. Wówczas uruchamiany jest proces autofagii jako alternatywnej drogi eliminacji drobnoustroju, która w przypadku tych bakterii okazuje się skuteczna [37, 38]. Rodzaje i efekty śmierci komórkowej indukowanej przez patogeny zależą od gatunku drobnoustroju oraz nasilenia i miejsca zakażenia (tab. 2). Liczne gatunki mikroorganizmów wykształciły szereg skutecznych metod modulujących mechanizmy śmierci komórkowej gospodarza, tak aby ostatecznie doprowadzić do inwazji komórek i rozwoju zakażenia. Można przypuszczać, że poznanie oddziaływań patogenów na szlaki programowanej śmierci komórkowej umożliwi lepsze zrozumienie patogenezy chorób przez nie wywoływanych.

Metody detekcji autofagii

Techniki wykrywania autofagii opierają się na mikroskopii elektronowej, metodach biochemicznych, technice rozdzielania w żelu, w polu elektrycznym oraz metodzie *Western-blot* [33] (tab. 3).

Metody z zastosowaniem mikroskopii elektronowej pozwalają na obserwację wewnątrzkomórkowych zmian morfologicznych, takich jak tworzenie autofagosomu. Jest to metoda stosowana od dawna, jakkolwiek powoli wypierana przez najnowsze techniki biochemiczne i molekularne. Jedną z metod alternatywnych wobec mikroskopii jest technika barwienia z zastosowaniem pochodnej kadaweryny MDC, która umożliwia wyznaczenie w komórce przedziałów o niskim potencjale elektrochemicznym [44, 34].

Dużym ograniczeniem w detekcji autofagii u wyższych eukariontów jest brak markerów o wysokiej specyficzności. Praktycznie jedynym wskaźnikiem molekularnym autofagii jest wysoce specyficzne białko LC3. Białko to występuje w dwóch postaciach: cytoplazmatycznej (LC3-I) oraz w formie związanej z powierzchnią

TABELA 2. Interakcje patogenów z mechanizmami śmierci komórkowej [12]
 TABLE 2. The interactions of pathogens with mechanisms of cell death [12]

| Patogen | Jednostka chorobowa | Charakterystyka | Mechanizm patogenności | Indukowany mechanizm | Efekt |
|-----------------------------------|--|--|--|--|--|
| <i>Legionella pneumophila</i> | Choroba legionistów | FW, G-, pałeczka, ruchliwa | Hamowanie fuzji fagosom - lizosom indukcja autofagii | Pyroptoza (ostre zakażenie) Autofagia (łagodne zakażenie) | Usunięcie patogenu Przetrwanie patogenu |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | Salmonelloze zapalenie żołądka i jelit | FW, G-, pałeczka, ruchliwa | przeżyte i namnażanie w SCV, wydzielanie do cytozolu białek indukujących autofagię lub pyroptozę | Pyroptoza (przy ostrym zakażeniu) Autofagia | Usunięcie patogenu Usunięcie patogenu |
| <i>Helicobacter pylori</i> | Wrzody żołądka, rak żołądka | G-, pałeczka, ruchliwa | namnażanie w autofagosomie | Autofagia, Apoptoza | Przetrwanie patogenu (inwazja) |
| <i>Shigella flexneri</i> | Biegunka | FW, G-, pałeczka, nieruchliwa | Ucieczka z fagosomu do cytozolu, indukcja autofagii | Pyroptoza | Usunięcie patogenu |
| <i>Francisella tularensis</i> | Tularemia, gorączka | FW, G-, ziarniakopaleczka, nieruchliwa | Ucieczka z fagosomu do cytozolu, hamowanie ekspresji genów atg5, przeżyte w autofagosomie | Pyroptoza Autofagia | Usunięcie patogenu Usunięcie patogenu |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | Listerioza | FW, G+, pałeczki, ruchliwe w niższej temp. | Ucieczka z fagosomu do cytozolu, rozpoznanie bakterii przez PGRP-LE, indukcja autofagii | Pyroptoza Autofagia | Usunięcie patogenu Usunięcie patogenu |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | Szkarlatyna, sepsa | G+, ziarniaki, nieruchliwe | Wnikanie do cytoplazmy, przeżyte, przy silnym zakażeniu indukcja autofagii | Autofagia | Usunięcie patogenu |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | Gruźlica | FW, Gram – zniebarwione, pałeczki, nieruchliwe | Hamowanie zakwaszania fagosomu, blokada łączenia fagosomu z lizosomem, indukcja autofagii | Apoptoza Autofagia Onkoza | Usunięcie patogenu Usunięcie patogenu Przetrwanie patogenu |

FW – fakultatywnie wewnątrzkomórkowe, G+/- – Gram dodatnie/ujemne, SCV – *Salmonella* Containing Vacicle

TABELA 3. Metody wykrywania autofagii – TABLE 3. Autophagy detection methods

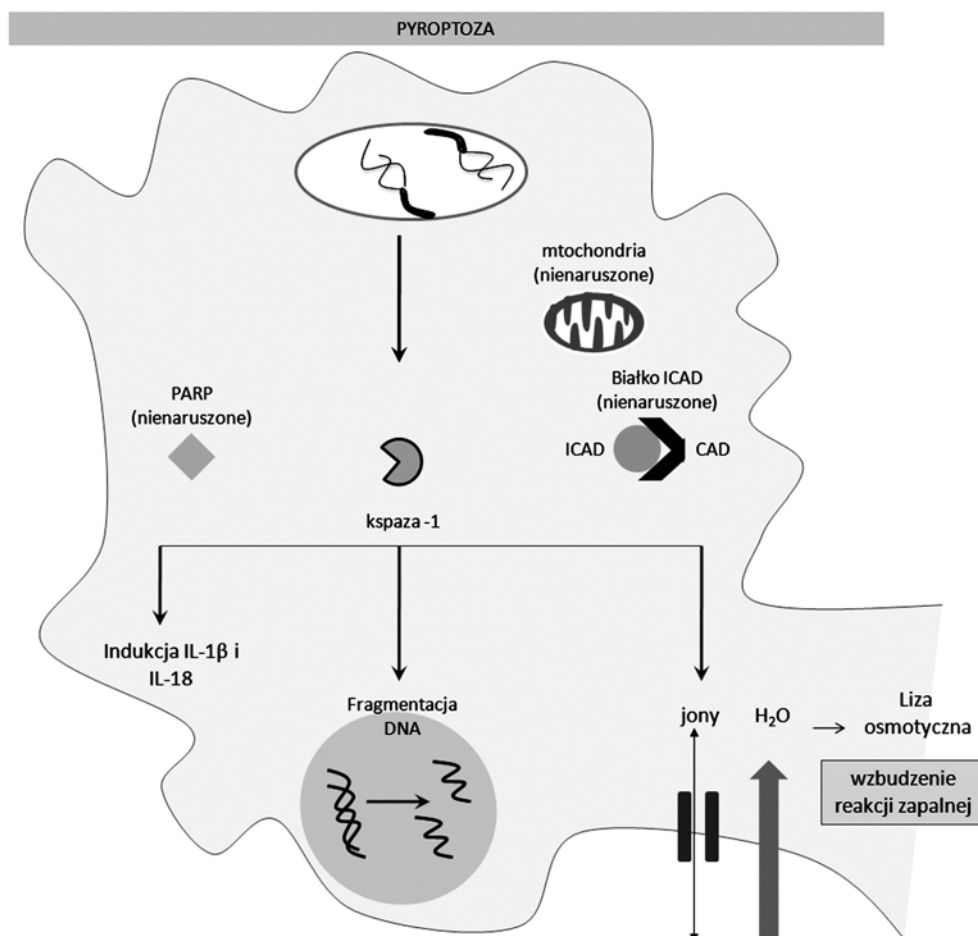
| Typ metody | Metoda detekcji |
|--|---|
| Mikroskopowe | barwienie oranżem akrydyny (F), obserwacja ciałek autofagosomalnych (E, F, S), formowanie i akumulacja autofagosomów (E, F), lokalizacja: GFP-Atg8 (E, F) i GFP-LC3 (F), znakowanie MDC (F) |
| Biochemiczne | aktywność kinazy Atg1, inaktywacja enzymów peroksymalnych, degradacja znakowanych białek cytozolowych |
| Ocena modyfikacji białek autofagosomalnych | ekspresja Atg8, aktywność Atg4B, cięcie Atg8-GFP, fosforylacja Atg13, degradacja Fox3 |

E – mikroskopia elektronowa, F – mikroskopia fluorescencyjna, S – mikroskopia świetlna, GFP – białko zielonej fluorescencji (*green fluorescence protein*), MDC – pochodna kadaweryny

autofagosomu. Stężenie białka LC3-II koreluje z liczbą autofagosomów obecnych w komórce. Poziom LC3-I jest zmienny w różnych typach komórek, dlatego sugeruje się ocenę stosunku formy wolnej LC3-I do związanej LC3-II. Ograniczeniem tej metody jest szybka degradacja autofagosomu, a wraz z nim związanego białka LC3-II, która następuje w wyniku fuzji autofagosomu z lizosomem. Stąd w wielu procedurach stosowany jest jednocześnie dodatek inhibitorów proteaz lizosomalnych, które uniemożliwiają trawienie oznaczanych markerów. Odpowiednikiem cząsteczki LC3-II obecnej w komórkach ludzkich jest białko Atg8 pełniące analogiczną funkcję podczas autofagii zachodzącej w komórkach drożdży. Poznanie i zamierzona konstrukcja genów kodujących białko LC3 znakowanych np. białko zielonej fluorescencji – GFP (*green fluorescence protein*) pozwala na stworzenie bakteryjnych lub zwierzęcych modeli, u których badanie procesu autofagii byłoby możliwe *in vivo* [30, 48, 74]. Obecnie trwają intensywne prace nad optymalizacją powyższych metod oraz poszukiwaniem całkiem nowych markerów tego procesu. Niedawno opisano sposób oceny aktywności białka Atg4B. Duże kontrowersje wzbudza pomiar dehydrogenazy mleczanowej (LDH), dotychczas rezerwowany dla stwierdzenia obniżonej aktywności metabolicznej komórki, lub dezintegracji błony komórkowej. Metoda ta nie pozwala na identyfikację określonego mechanizmu śmierci komórki [33, 69]. Równie mało specyficznym testem jest ocena stężenia ATP w lizatach komórkowych. Wysoki poziom ATP obserwowany jest tylko w komórkach aktywnych metabolicznie, natomiast w komórkach w stanie nekrozy lub apoptozy gwałtownie spada. Wyniki uzyskiwane przy pomocy tej metody nie pozwalają jednak na określenie typu mechanizmu śmierci komórkowej. Technika ta może służyć jako dodatkowa metoda stwierdzająca obniżenie aktywności komórki i powinna być stosowana w połączeniu z metodą bardziej specyficzną np. oceną stężenia LC3-I/II [69].

INNE TYPY ŚMIERCI KOMÓRKI

Zgodnie z najnowszą klasyfikacją typów śmierci komórki zaproponowaną przez NCCD, oprócz apoptozy oraz autofagii i jej podtypów można także wyróżnić inne



RYCINA 4. Zmiany biochemiczne i morfologiczne zachodzące podczas procesów pyroptozy indukowanych czynnikami zakaźnymi: CAD – DNAaza aktywowana kaspazą-3, ICAD – inhibitor DNAazy aktywowanej kaspazą-3, PARP – polimeraza poli(ADP-rybozy), zmodyfikowano wg [23]

FIGURE 4. Biochemical and morphological changes observed during pyroptosis initiated by microbial inducers, abbreviations: CAD – caspase-3-activated DNase, ICAD – inhibitor of caspase-3-activated DNase, PARP – poly(ADP-ribose) polymerase, modified [23]

formy śmierci komórkowej. Są to tzw. „atypowe” mechanizmy śmierci, których precyzyjne określenie sprawia wiele trudności.

Katastrofa mitotyczna jest rodzajem śmierci komórki, następującym krótko po nieprecyzyjnym podziale mitotycznym. Charakterystyczne zmiany morfologiczne tego procesu, często są wynikiem nierównomiernej segregacji chromosomów do komórek potomnych, co skutkuje brakiem lub obecnością dwóch lub większej liczby jąder [7, 58].

Apoptoza występująca w komórkach adherentnych, wywołana przez utratę przyczepności do powierzchni lub do innych komórek, nazywana jest **anoikozą** (*anoikosis*). Oprócz

charakterystycznej drogi indukcji tego procesu, molekularny mechanizm anoikozy odpowiada temu, który zachodzi podczas klasycznej apoptozy [36, 58].

Paraptoza jest terminem odnoszącym się do programowanej śmierci komórki, która jest wzbudzana przez insulinopodobny czynnik wzrostu I. Przebiega z rozległą wakuolizacją cytoplazmy i pęcznieniem mitochondrium, ale nie wykazuje cech charakterystycznych dla apoptozy. Paraptoza nie jest hamowana przez inhibitory kaspaz, ani też przez ekspresję antyapoptotycznych białek Bcl-2. Wciąż nie wiadomo ostatecznie, czy paraptoza reprezentuje odrębny typ śmierci komórkowej [36, 61].

Degeneracja Walleriana jest formą komórkowego katabolizmu, który ma miejsce w układzie nerwowym. Część neuronu lub sam akson ulega degeneracji, która nie ma wpływu na żywotność pozostałej części komórki, dlatego termin ten nie opisuje rzeczywistego procesu śmierci komórkowej.

Entoza, pierwotnie opisywana jako forma „komórkowego kanibalizmu” opisanego w limfoblastach pacjentów z chorobą Huntingtona, została zgłoszona jako nowy typ śmierci komórkowej, podczas której jedna żywa komórka pochłania sąsiadującą z nią, żywą komórkę. Proces ten wykryto także w komórkach raka piersi MCF-7, w których nie stwierdzono ani obecności kaspazy-3, ani bekliny-1, co wyklucza zachodzenie procesów autofagii i apoptozy. Na tej podstawie podejrzewa się, iż entoza jest procesem indukowanym, wtedy gdy inne reakcje kataboliczne są zahamowywane.

Zespół NCCD w 2009 roku wyróżnił także inne formy śmierci komórkowej, między innymi keratynizację, zachodzącą w komórkach skóry, nekroptozę czy też pyronekrozę [36, 66].

Powiązanie programowanej i nieprogramowanej śmierci komórki

Charakterystyczne zmiany zachodzące podczas procesu apoptozy obejmują m.in.: obkurczanie komórki, kondensację chromatyny oraz powstawanie ciałek apoptotycznych. Struktury te następnie są pochłaniane przez sąsiadujące z nimi komórki fagocytyczne, głównie przez makrofagi. Jednak komórki apoptotyczne nie zawsze są rozpoznawane podczas fagocytozy. Wówczas mogą podlegać tzw. apoptotycznej nekrozie. Terminologia ta wydaje się zaskakująca, ponieważ nekroza i apoptoza są powszechnie znane jako dwie różne, pod względem mechanizmów, formy śmierci komórki. Jednak według Majno G. i wsp. nekroza nie jest odrębnym rodzajem śmierci komórkowej, ale ostatecznym efektem każdego procesu obumierania komórek [42, 61]. Charakteryzuje się pęcznieniem komórki, często z towarzyszącą kondensacją chromatyny. Ostatecznie nekroza prowadzi do lizy całej komórki wraz z jądrem, co wzbudza reakcję zapalną. Komórki apoptotyczne, które nie są fagocytowane, wykazują kilka cech nekrozy, jednak zwykle nie powodują stanu zapalnego. Prawdopodobnie dzieje się tak dlatego, że liczba ciałek apoptotycznych jest niewielka, a stężenie uwolnionych chemoatraktantów jest niewystarczające dla mobilizacji komórek zapalnych [42, 64]. Innym ważnym procesem zaliczanym do nieprogramowanej śmierci komórki jest onkoza, odkryta przed stuleciem przez Recklinghausena, który zaobserwował ją w osteocytach. Majno G. [42] zaproponowali używanie terminu „onkoza” dla każdego typu śmierci komórki, charakteryzującej się

jej pęcznieniem, podczas gdy termin „nekroza” został zarezerwowany dla ostatecznego rezultatu śmierci komórki, czyli jej rozpadu na drodze lizy [19, 42].

Apoptoza i nekroza powszechnie uznawane są za dwie różne formy śmierci komórkowej. Jednak w cytowanych pracach, zawarte są sugestie aby traktować te procesy jako ciąg zachodzących po sobie zdarzeń. Pojawienie się kolejnych systemów klasyfikacji PŚK, z wyróżnieniem autofagii i jej odmian, coraz bardziej komplikuje ich podział i ustalenie odpowiednich markerów umożliwiających identyfikację poszczególnych procesów [54]. Pomimo ustalonych przez NCCD definicji i podziałów dotyczących PŚK, często granica między tymi procesami jest bardzo trudna do wyznaczenia. Biorąc pod uwagę sugestie wielu autorów, w celu określenia typu śmierci komórki, należy wykryć co najmniej dwa markery danego procesu, przy zastosowaniu różnych technik badawczych [36, 57, 63].

LITERATURA

- [1] ABELIOVICH H. Mitophagy: The life-or-death dichotomy includes yeast. *Autophagy* 2007; **3**: 275–277.
- [2] ARRASATE M, MITRA S, SCHWEITZER ES, SEGAL MR, FINKBEINER S. Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 2004; **431**: 805.
- [3] BAEHRECKE EH. Autophagy: Dual roles in life and death? *Nature Reviews Mol Cell Biol* 2005; **6**: 505–510.
- [4] BARRETT KL, WILLINGHAM JM, GARVIN AJ, WILLINGHAM MC. Advances in cytochemical methods for detection of apoptosis. *J Histochem Cytochem* 2001; **49**(7): 821–832.
- [5] BERRY DL, BAEHRECKE EH. Autophagy functions in programmed cell death. *Autophagy* 2008; **4** (3): 359–360.
- [6] BLAGOSKLONNY MV. Cell death beyond apoptosis. *Leukemia* 2000; **14**:1502–1508.
- [7] BROKER LE, KRUYT FAE, GIACCONE G. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer* 2005; **11**(9): 3155–3162.
- [8] BURSCH W, ELLINGER A, GERNER C, FRÖHWEIN U, SCHULTE-HERMANN R. Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others? *Ann NY Acad Sci* 2000; **926**: 1–12.
- [9] BURSCH W, KARWANA A, MAYER M, DORNETSHUBER J, FRÖHWEIN U, SCHULTE-HERMANN R, FAZI B, DI SANO F, PIREDDAL, PIACENTINI M, PETROVSKI G, FÉSÜS L, GERNER C. Cell death and autophagy: cytokines, drugs, and nutritional factors. *Toxicology* 2008; **254** (3): 147–157. Epub.
- [10] BURSCH W. Multiple cell death programs: Charon's lifts to Hades. *FEMS Yeast Res* 2004; **5**(2): 101–110.
- [11] BURSCH W. The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ* 2001; **8**: 569–581.
- [12] CHEN H, CHAN DC. Mitochondrial dynamics-fusion, fission, movement and mitophagy-in neurodegenerative diseases. *Hum Mol Gen* 2009; **11**: 169–176.
- [13] CHIPUK JE, GREEN DR. Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; **6**(3): 268–275.
- [14] CLARKE PGH. Developmental cell death: Morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol* 1990; **181**: 195–213.
- [15] CODOGNO P, MEIJER AJ. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ* 2005; **12**, Suppl 2: 1509–1518.
- [16] COLOMBO MI, GUTIERREZ MG, ROMANO PS. The two faces of autophagy. *Autophagy* 2006; **2**(3): 162–164.
- [17] CUERVO AM, BERGAMINI E, BRUNK UT, DROGE W, FRENCH M, TERMAN A. Autophagy and aging. *Autophagy* 2005; **1** (3): 131–140.
- [18] CUERVO AM. Autophagy: many paths to the same end. *Mol Cell Biochem* 2004; **263**(1–2): 55–72.
- [19] DEBNATH J, BAEHRECKE EH, KROEMER G. Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy* 2005; **1** (2): 66–74.

- [20] DONEPUDI M, MAC SWEENEY A, BRIAND C. Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Mol Cell* 2003; **11**: 543–549.
- [21] ESKELINEN EL, SAFTIG P. Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1793**(4): 664–673.
- [22] FERRI KF, KROEMER G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* 2001; **3**: 255–263.
- [23] FINK SL, COOKSON BT. Pyroptosis and host cell death responses during *Salmonella* infection. *Cellular Microbiology* 2007; **9**(11): 2562–2570.
- [24] GALLUZZI L, VICENCIO JM, KEPP O, TASDEMIR E, MAIURI MC, KROEMER G. To die or not to die: that is the autophagic question. *Curr Mol Med* 2008; **8**(2): 78–91.
- [25] GLICK D, BARTH S, MACLEOD KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* 2010; **221**(1): 3–12.
- [26] GOZUACKI D, KIMCHI A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 2004; **23**: 2891–2906.
- [27] HORDYJEWSKA A, PASTERNAK K. Apoptotyczna śmierć komórki. *Adv Clin Exp Med* 2005; **14**: 545–554.
- [28] KELEKAR A. Autophagy. *Ann NY Acad Sci* 2005; **1066**: 259–271.
- [29] KERR JFR, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British J Cancer* 1972; **26**: 239–257.
- [30] KETTELER R, SEED B. Quantitation of autophagy by luciferase release assay. *Autophagy* 2008; **4** (6): 801–806.
- [31] KIFFIN R, BANDYOPADHYAY U, CUERVO AM. Oxidative stress and autophagy. *Antioxid Redox Signal* 2006; **8**(1–2): 152–162.
- [32] KITANAKA C, KUCHINO Y. Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. *Cell Death Differ* 1999; **6**: 508–515.
- [33] KLIONSKY DJ, CUERVO AM, SEGLAN PO. Methods for monitoring autophagy from yeast to human. *Autophagy* 2007; **3** (3): 181–206.
- [34] KLIONSKY DJ. The correct way to monitor autophagy in higher Eukaryotes. *Autophagy* 2005; **1** (2): 65.
- [35] KOURTIS N, TAVERNARAKIS N. Autophagy and cell death in model organisms. *Nature Publishing Group* 2009; **16**: 21–30.
- [36] KROEMER G, GALLUZZI L, VANDENABEELE P, ABRAMS J, ALNEMRI ES, BAEHRECKE EH, BLAGOSKLONNY MV, EL-DEIRY WS, GOLSTEIN P, GREEN DR, HENGARTNER M, KNIGHT RA, KUMAR S, LIPTON SA, MALORNI W, NUÑEZ G, PETER ME, TSCHOPP J, YUAN J, PIACENTINI M, ZHIVOTOVSKY B, MELINO G. Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 2009; **16**(1): 3–11.
- [37] LABBE K, SALEH M. Cell death in the host response to infection. *Nature Group* 2008; **15**: 1339–1349.
- [38] LANCELLOTTI M, PEREIRA RF, CURY GG, HOLLANDA LM. Pathogenic and opportunistic respiratory bacteria-induced apoptosis. *Braz J Infect Dis* 2009; **13**(3): 226–231.
- [39] LEVINE B, KLIONSKY DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 2004; **6**: 463–477.
- [40] LEVINE B, YUAN J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Inv* 2005; **115**: 2679–2688.
- [41] LOCKSHIN RA, ZAKERI Z. Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; **36**(12): 2405–2419.
- [42] MAJNO G, JORIS I. Apoptosis, oncosis and necrosis. *Am J Pathol* 1995; **146**: 3–15.
- [43] MARIÑO G, LÓPEZ-OTÍN C. Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology. *Cell Mol Life Sci* 2004; **61**(12): 1439–1454.
- [44] MARTINET W, DE MEYER GR, ANDRIES L, HERMAN AG, KOCKX MM. Detection of autophagy in tissue by standard immunohistochemistry: possibilities and limitations. *Autophagy* 2006; **2**(1): 55–57.
- [45] MASSEY A, KIFFIN R, CUERVO AM. Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; **36**(12): 2420–2434.
- [46] MASSEY AC, ZHANG C, CUERVO AM. Chaperone-mediated autophagy in aging and disease. *Curr Top Dev Biol* 2006; **73**: 205–235.
- [47] MEIJER AJ, CODOGNO P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *J Cell Biol* 2010; **190**(4): 533–539.
- [48] MIZUSHIMA N. Methods for monitoring autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; **36**(12): 2491–2502.
- [49] NIXON RA. Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *J Cell Sci* 2007; **1**(120): 4081–4091.

- [50] OKADA H, MAK TW. Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* 2004; **4**: 592–603.
- [51] PERFETTINI JL, KROEMER G. Caspase activation is not death. *Nat Immunol* 2003; **(4)**: 308–310.
- [52] QU X, ZOU Z, SUN Q, LUBY-PHELPS K, CHENG P, HOGAN RN, GILPIN C, LEVINE B. Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell* 2007; **128**: 931–946.
- [53] RICCI MS, WEI-XING ZONGB A. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *The Oncologist* 2006; **11**: 342–357.
- [54] SANJUAN MA, GREEN DR. Eating for good health. *Autophagy* 2008; **4(5)**: 607–611.
- [55] SHEN HM, DAI J, CHIA SE, LIM A, ONG CN. Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Human Reprod* 2002; **(5)**: 1266–1273.
- [56] SCOTT RC, SCHULDINER O, TP N. Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Dev Cell* 2004; **(7)**: 167–178.
- [57] SHINTANI T, KLIONSKY DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* 2004; **306**: 990–995.
- [58] SPERANDIO S, DE B I, BREDESEN DE. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 14376–14381.
- [59] STĘPIEŃ A, IZDEBSKA M, GRZANKA A. Rodzaje śmierci komórki. *Post Hig Med Dośw* 2007; **61**: 420–428.
- [60] STERN ST, JOHNSON DN. Role for nonmaterial-autophagy interaction in neurodegenerative disease. *Autophagy* 2008; **4(8)**: 1097–1100.
- [61] TAIT SWG, GREEN DR. Caspase independent cell death: leaving the set without the final cut. *National Institute of Health Public Access. Author Manuscript* 2008; **27 (50)**: 6452–6461.
- [62] TAL MC, IWASAKI A. Autophagy and innate recognition systems. *Curr Top Microbiol Immunol* 2009; **335**: 107–121.
- [63] TODDE V, VEENHUIS M, VAN DER KLEI IJ. Autophagy: principles and significance in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1792(1)**: 3–13.
- [64] TSUJIMOTO Y, SHIMIZU S. Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ* 2005; **12(2)**: 1528–1534.
- [65] VAN CRAUCHTEN S, VAN DEN BROECK W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anatomia Histologia Embryologia* 2008; **31**: 214–223.
- [66] VICENCIO JM, GALLUZZI L, TAJEDDINE N, ORTIZ C, CRIOLLO A, TASDEMIR E, MORSELLI E, BEN YOUNES A, MAIURI MC, LAVANDERO S, KROEMER G. Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path—a mini-review. *Gerontology* 2008; **54(2)**: 92–99.
- [67] WILLINGHAM MC. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *Histochem Cytochem* 1999; **47(9)**: 1101–1110.
- [68] YA-HUI W, JIUNN-JONG W, HUAN-YAO L. The autophagic induction in *Helicobacter pylori*-infected macrophage. *Society of Experimental Biology and Medicine* 2008: 171–180.
- [69] YANG C, KLIONSKY DJ. New insights into autophagy using a multiple knockout strain. *Autophagy* 2008; **4, 8**: 1073–1075.
- [70] YANG YP, LIANG ZQ, GU ZL, QIN ZH. Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta Pharmacol Sin* 2005; **26(12)**: 1421–1434.
- [71] YU L, ALVAA, SU H, DUTT P, FREUNDT E, WELSH S, BAEHRECKE EH, LENARDO MJ. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science* 2004; **304**: 1500–1502.
- [72] YU L, LENARDO MJ, BAEHRECKE EH. Autophagy and caspases: a new cell death program. *Cell Cycle* 2004; **3(9)**: 1124–1126.
- [73] YUE Z, JIN S, YANG C. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 15077–15082.
- [74] ZAKERI Z, MELENDEZ A, LOCKSHIN RA. Detection of autophagy in cell death. *Methods Enzymol* 2008; **442**: 289–306.

Redaktor prowadzący – M. Nowicki

Otrzymano: 23.11. 2010 r.

Przyjęto: 23.02. 2011 r.

mgr Karolina Weronika Rudnicka

Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Uniwersytet Łódzki

ul. S. Banacha 12/16; 90-237 Łódź

e-mail: rudnicka@biol.uni.lodz.pl