

Review

DETEKCIJA APOPTOZE

Vilim ŽLENDER

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb

Primljeno u prosincu 2005.

Prihvaćeno u ožujku 2006.

Apoptoza ili programirana smrt stanice ima vodeću ulogu u mnogim biološkim procesima. Njezino određivanje od velike je važnosti u različitim područjima moderne biologije, uključujući različite studije o embrionalnom razvoju, biologiji tumora te brojnim degenerativnim i imunodeficijntnim bolestima koje se povezuju s poremećajima u apoptozi. Mehanizam aktivacije i pokretanja apoptotskog procesa vrlo je kompleksan i prate ga specifične morfološke i biokemijske promjene stanica, koje često variraju ovisno o tipu stanica i specifičnim uvjetima okoline u kojoj rastu. Upravo zbog tog razloga bitno je upotrijebiti više različitih detekcijskih metoda koje će obuhvatiti različite stadije apoptoze kako bi se izbjegli lažno pozitivni ili lažno negativni rezultati. Svaka od danas poznatih i upotrebljivanih metoda ima svoje prednosti i nedostatke te ni za jednu od njih ne možemo reći da potpuno zadovoljava sve kriterije. U ovom radu prikazan je kratak pregled metoda koje se najčešće rabe pri detekciji apoptoza te osnovni morfološki i biokemijski procesi na kojima se te metode zasnivaju.

KLJUČNE RIJEČI: *aneksin V, elektroforeza, kaspaze, mikroskopija, protočna citometrija*

Apoptoza je programirana smrt stanice. Postoji velik broj metoda za detekciju i kvantifikaciju apoptoza. Njihov odabir ovisit će o tipu uzorka, tj. modelu proučavanja utjecaja određenih faktora na apoptozu stanice. Bitno je naglasiti da apoptozu treba detektirati dok su vidljive promjene prisutne (1). Naime, apoptoza pojedinačnih stanica traje od 6 h do 24 h, a konačne produkte fagocitiraju susjedne stanice i makrofazi ne ostavljajući nikakve tragove smrti stanice. U nekih srčanih bolesti apoptoza miocita može trajati i dulje, bez fragmentacije jezgre, ali uz intenzivno cijepanje i gubitak citoplazmatskih proteina (2).

Unutar različitih vrsta stanica promatranog tkiva apoptoza se može početi razvijati u različito vrijeme nakon dodavanja nekog inicijatora, a trajanje pojedinih morfoloških promjena može varirati od stanice do stanice (3).

Proučavanje i karakterizacija apoptoze već se dugi niz godina zasnivaju na različitim modelima *in vitro* i *in vivo*, uključujući i biljne organizme (4-6). Detekcija nije uvijek jednostavna jer ponekad apoptozu ne prate karakteristične morfološke promjene ili pak

fragmentacija DNA može biti posljedica nekroze. Detekcija apoptoze u uvjetima *in vivo* dodatno je otežana i ograničena zbog primjene isključivo neinvazivnih metoda, a otegotna okolnost je i činjenica da apoptozi svakoga trena podliježe manje od 2 % stanica kao dio fiziološkog procesa u održavanju homeostaze tkiva, što primjerice u slučaju zdrave jetre iznosi 1-5 apoptotskih stanica na 10.000 hepatocita. Zato su najbolji rezultati u detekciji apoptoza *in vivo* postignuti kod akutnih procesa gdje je pojavnost apoptotskih stanica privremeno visoka (odgovor tumora na kemoterapiju, akutne reakcije tkiva kod transplantacije itd.) (7).

DETEKTIRANJE MORFOLOŠKIH PROMJENA PRI APOPTOZI

Mikroskopija

Morfološke promjene koje prate početnu fazu apoptoze i aktivaciju inicijatorskih kaspaza jesu

gubitak mikrovila i stvaranje mjehurića na površini stanične membrane te skvrčavanje stanice (8). Tipičan redosljed morfoloških promjena kod adherentnih staničnih linija uključuje zaokruživanje stanica zbog gubitka veze s podlogom, ubrzano stvaranje i nestajanje mjehurića na površini stanice, skvrčavanje stanice, polagana protruzija izduženih bičeva kod nekih stanica i konačno "grozdoliko" pupanje površinske stanične membrane i eventualna liza stanice nalik nekrozi, nekoliko sati nakon početka apoptoze (3). Pokretanje ireverzibilnih apoptotskih procesa (aktivacija efektornih kaspaza i endonukleaza) rezultira kondenzacijom kromatina u rasponu od točaka pojačane gustoće uz jezgrinu ovojnicu, do konačne kružne ili srpolike distribucije kromatina uz promjenu volumena i oblika jezgre. U većini, ali ne i u svim tkivima, završno dolazi do fragmentacije stanice i formiranja malih apoptotskih tjelešaca. Neki autori smatraju da jedino promjene koje zahvaćaju jezgru imaju dijagnostičku vrijednost pri detekciji apoptoze (9), a te se promjene lakše mogu vizualizirati bojenjem fiksiranih staničnih kultura ili tkivnih rezova Giemsinom bojom ili primjenom različitih fluorescencijskih boja koje specifično boje DNA, primjerice propidijev jodid (PI), Hoechstova i druge (10).

Većina strukturnih promjena može se detektirati s pomoću svjetlosnog mikroskopa, dok finije, osobito intranuklearne promjene, zahtijevaju primjenu elektronske mikroskopije (11). U uvjetima *in vitro* prilikom detekcije apoptoze na kulturama stanica, često se uvode dodatni testovi i boje (MTT test, tripansko plavilo), koje omogućuju lakšu diferencijaciju živih stanica u odnosu na one u kojima su počeli smrtonosni procesi (12).

Neki aspekti funkcije i mehanizma apoptoze u biljnih stanica razlikuju se u odnosu na životinjske stanice. Tako primjerice u stanicama protoplasta dolazi do povećanja volumena središnje vakuole i kloroplasta, a time i do povećanja volumena protoplasta, što upućuje na važnu ulogu tih organela pri apoptozi biljnih stanica (4).

Konfokalni laserski pretražni mikroskop omogućava određivanje patoloških procesa na supstaničnoj i staničnoj razini, kao i na razini tkiva uz trodimenzionalni prikaz (13). Primjenom vitalnih boja koje upućuju na fago-lizosomatsku aktivnost i acidifikaciju tkiva (Lyso Tracker Red, akridin oranž) te dodatnog fotomultiplikatora i softvera za obradu i kategorizaciju rezultata fluorescencije, moguće je praćenje intenziteta apoptoze u pojedinim regijama embrija sisavaca tijekom embrionalnog razvoja

(14). Laserskom pretražnom mikroskopijom može se analizirati DNA "kometa" dobivenih kometnom tehnikom (15), kao i stanice ili embrije označeni aneksinom V (16).

Fluorescencijska mikroskopija također se u velikoj mjeri rabi pri detektiranju brojnih morfoloških i biokemijskih apoptotskih promjena koje se mogu vizualizirati primjenom specifičnih fluorokroma. Akridin oranž je metakromatski fluorokrom koji različito oboji dvostruke lomove DNA (zelena fluorescencija), naspram jednostrukih lomova DNA (crvena fluorescencija). Na osnovi toga moguće je pratiti promjene u kondenzaciji i denaturaciji kromatina tijekom apoptoze, počevši od zelene fluorescencije kromatinske mase na periferiji jezgre u početnoj fazi, do crvene fluorescencije fragmentirane jezgre i apoptotskih tjelešaca u kasnoj fazi apoptoze (17).

Primjena videomikroskopije izuzetno je korisna za vizualizaciju redosljeda morfoloških apoptotskih promjena pojedinačnih stanica u staničnim kulturama (3).

Protočna citometrija

Citometrija je jednostavna, kvantitativna i visokoinformativna metoda za određivanje apoptoze na razini pojedinačnih stanica, pri čemu je dovoljan relativno malen broj stanica u ispitivanom uzorku (18, 19). Različite morfološke i biokemijske promjene apoptoze stanice mogu se iskoristiti za citometrijsko određivanje, počevši od skvrčavanja stanice i posljedičnih promjena svjetlosnog signala citometra, preko aktivacije kaspaza (cistein aspartil proteaze), gubitka mitohondrijskoga membranskog potencijala, aktivacije endogenih endonukleaza koja rezultira redistribucijom fosfatidil serina, pa do konačnog gubitka integriteta stanice i formiranja apoptotskih tijela (20). Prednost ove metode je mogućnost kombiniranja rezultata dobivenih s pomoću prednjeg i bočnoga svjetlosnog snopa (zbog promjene promjera apoptotskih stanica i konformacije unutrašnjih staničnih struktura) s rezultatima analize staničnih markera, tj. specifičnih fluorescentnih protutijela za pojedine apoptotske molekule kao što su Fas, FasL, Bcl-2, p53, fosfatidil serin itd. (21-23). Virusna monoklonska protutijela obilježena fluorokromom mogu se iskoristiti za razlučivanje pojave apoptoze u stanicama inficiranim virusom ili susjednim neinficiranim stanicama (24).

DETEKTIRANJE BIOKEMIJSKIH PROMJENA PRI APOPTOZI

Važnije biokemijske karakteristike apoptoze su ove: porast koncentracije Ca^{2+} iona, aktivacija endonukleaza i transglutaminaza, fragmentacija DNA, translokacija fosfatidil serina s unutrašnje strane na vanjsku stranu stanične membrane, kaskadna aktivacija kaspaza, izlazak citokroma C i AIF (engl. *Apoptosis Inducing Factor*) i druge (10).

Aneksin V

U početnoj fazi apoptoze dolazi do premještanja fosfolipida fosfatidil serina s unutrašnje strane na vanjsku stranu stanične membrane, što fagocitima omogućava prepoznavanje apoptotskih stanica i apoptotskih tjelešaca te njihovo uklanjanje bez izazivanja upalnog procesa. Aneksin V je protein iz skupine aneksina koji označen fluorescencijskim bojama specifično veže fosfatidil serin te se kao takav rabi za detektiranje apoptoze s pomoću protočne citometrije (25-27) ili fluorescencijske mikroskopije (28). Postoji i modificirana metoda analize slike (engl. *image analysis*) gdje je fluorescencijski mikroskop povezan s računalom preko videokamere, koja se uspješno rabi za određivanje apoptoze s pomoću aneksina V (29). Od boja za obilježavanje najviše se rabi FITC (fluorescin izotiocijanat), ali i druge, primjerice GFP (zeleni fluorescentni protein) i izopropil- β -D-tiogalaktozid (30). Aneksin V je vrlo specifična metoda, osobito u početnoj fazi apoptoze kada je očuvana cjelovitost stanične membrane, jer nakon cijepanja i fragmentacije DNA postupno dolazi i do promjene propusnosti stanične membrane. Jednako tako aneksin V će se vezati i na fosfatidil serin s unutrašnje strane stanične membrane ako je narušena njezina cjelovitost, kao primjerice u slučaju nekroze stanice. Kako bi se mogle razlikovati nekrotične, žive i apoptotske stanice, uvodi se dodatno bojenje s PI koji zbog velike molekularne mase ne prolazi kroz cjelovitu staničnu membranu. Ako je stanična membrana oštećena, PI će ući u stanicu i obojiti staničnu jezgru zbog velikog afiniteta prema nukleinskim kiselinama (29). U kombinaciji PI s drugim bojama niske molekularne mase (DAPI, Hoechst 33342/33258, Calcein-AM) koje specifično boje DNA i prolaze staničnu membranu, moguće je dodatno olakšati vizualizaciju apoptotskih i nekrotičnih stanica (31). S obzirom na to da se metoda može primijeniti samo na živim stanicama, potreban je poseban standardiziran

tretman stanica tijekom pripreme uzorka i bojenja (32). Otegotna okolnost pri uporabi aneksina V i interpretaciji rezultata je i činjenica da eksternalizacija fosfatidil serina nije prisutna u svim stanicama tijekom apoptoze (svoga oko 30%) i da se javlja relativno rano nakon segmentiranja stanične jezgre (33).

Fluorescin diacetat

Premda se tipična morfološka definicija apoptoze temelji na promjenama u jezgri, prethodne, rane promjene također se rabe za determinaciju. Skvrčavanje stanice je uobičajena, rana karakteristika svih apoptotičkih modela. Laserska skenirajuća citometrija pojedinačnih stanica složena je metoda koja se zasniva na više parametara i više različitih laserskih snopova. Jedan od parametara je promjena intenziteta fluorescencije stanica obojenih fluorescin diacetatom, kao posljedica promjene stanične hidrolitičke aktivnosti i smanjenja staničnog volumena u ranoj fazi apoptoze. Hidroliza nefluorescentnog fluorescin diacetata u fluorescirajući fluorescin, kao i nakupljanje fluorescina u stanici pokazatelj su stanične enzimske aktivnosti i očuvanja integriteta stanične membrane. Kako je stanična aktivnost u početnoj fazi apoptoze manja zbog smanjenja staničnog volumena i skvrčavanja stanice, tako je i fluorescencija slabija. Uz pomoć kaspaznih inhibitora dokazano je da te promjene prethode aktivaciji kaspaza 3 i da nisu ovisne o njihovoj aktivaciji. Ova metoda omogućuje praćenje biofizičkih promjena pojedinačnih stanica koje podliježu apoptozi, kvantitativna je i može se iskoristiti pri određivanju specifične rezistencije na apoptozu pojedinačnih stanica ili subpopulacija stanica nakon tretiranja različitim spojevima (34).

Aktivacija kaspaza

Inicijatorske kaspaze 2, 8, 9 i 10 enzimski su skupina na vrhu kaspazne hijerarhije, koje cijepanjem aktiviraju drugu subpopulaciju kaspaza poznatih pod nazivom efektorne kaspaze 3, 6 i 7. Ta je aktivacija regulirana članovima bcl-2-porodice mitohondrijskih proteina i ključna je za nastavak ireverzibilne progresije apoptoze. Kaspaze 3 razgrađuju različite citoplazmatske i jezgrine proteine te aktiviraju nukleaze, što posljedično dovodi do cijepanja DNA na fragmente od 200 do 300 bp (baznih parova) (35).

Determinacija aktivnosti kaspaza provodi se s pomoću različitih metoda poput "immunoblotting" analize kaspaza ili razgrađenoga specifičnog kaspaznog supstrata, analize aktivnosti enzima cijepanjem

umjetnih supstrata, kao i različitim modifikacijama tih tehnika uz upotrebu konfokalne i fluorescencijske mikroskopije ili protočne citometrije.

Ograničenja u serološkoj detekciji kaspaza nastaju stoga što protutijela prepoznaju prodomene, kako neaktivnih proenzimskih oblika, tako i aktiviranih kaspaza. Zbog toga je potrebno potvrditi rezultate određivanjem katalitičke aktivnosti kaspaza (36). Određivanje enzimске aktivnosti zasniva se na primjeni novih umjetnih boja, tj. supstrata. Jedan od supstrata za kaspaze 3 je PhiPhiLux, koji se može primijeniti na živim, intaktnim stanicama. Aktivirane kaspaze 3 cijepaju taj supstrat pri čemu nastaju fragmenti koji se akumuliraju u citoplazmi stanice i teško prolaze kroz intaktnu staničnu membranu (9). Na tržištu su prisutni i različiti kaspazni supstrati označeni fluorokromima, kao i gotovi testovi koji se zasnivaju na otpuštanju fluorokroma nakon cijepanja supstrata od strane kaspaza i fluorometrijskom određivanju intenziteta fluorescencije.

Konjugat fluoroizotiocijanata (FITC) i ireverzibilnog inhibitora kaspaza Z-VAD-FMK (Promega) (engl. *Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-fluoromethylketone*) koji prolazi kroz staničnu membranu, može se iskoristiti za procjenu aktivnosti kaspaza *in situ*. U tom slučaju inhibicija aktivnosti kaspaza i porast unutarstanične fluorescencije pokazatelj su ukupne aktivnosti kaspaza u stanici (37).

Detekcija kaspaza rabi se kao biokemijski marker apoptoze, ali kako postoje podaci o aktivaciji kaspaza i u neapoptotskim slučajevima, za njihovu potpunu i vjerodostojnu detekciju potrebno je kombinirati morfološke i biokemijske metode (36).

Lamin B

Aktivnost efektornih kaspaza koje cijepaju vitalne dijelove stanice rabi se za detekciju apoptoze, pri čemu najveću primjenu i pouzdanost ima imunoreaktivnost lamina B. Lamini A, B i C su glavni strukturni proteini jezgrine ovojnice smješteni na njezinoj unutrašnjoj strani. Njihova razgradnja tijekom apoptoze uzrokuje strukturne promjene jezgre i konačno gubitak njezina integriteta i fragmentaciju. S pomoću protutijela na lamin B moguće je imunohistokemijski odrediti pozitivan signal, tj. prstenasto obojenje kod stanica koje nisu u apoptozi i negativan signal kod stanica koje su u kasnijoj fazi apoptoze (9). Imunocitokemijska metoda za detekciju lamina B s pomoću protočne

citometrije pokazala se manje pouzdanom metodom u usporedbi s aneksinom V i TUNEL-om (32).

Gel elektroforeza

Jedna od najčešće upotrebljivanih metoda za detekciju apoptoze temelji se na razdvajanju fragmenata DNA u gelu, pri čemu se nakon bojenja etidij bromidom mogu uočiti fragmenti uniformnog razmaka, poput "ljestvica" (38, 33). Elektroforeza je sigurno jedna od metoda izbora za detekciju apoptoze u kulturama stanica ili u tkivima gdje do smrti stanica dolazi na više-manje sinkroniziran način (metamorfoza insekata i vodozemaca, embriogeneza), ali nije primjerena za većinu ostalih razvojnih sustava gdje proces stanične smrti nije masovniji i sinkroniziran (16, 33).

Kometni test

Gel elektroforeza pojedinačnih stanica ili kometni test jedna je od metoda koja se rabi za kvalitativnu i kvantitativnu procjenu genotoksičnosti. Pod utjecajem električnog polja fragmenti DNA putuju prema anodi različitom brzinom, ovisno o svojoj veličini, stvarajući obris nalik kometu. Prema podacima o dužini repa i postotku DNA u repu izračunava se "repi moment", na osnovi kojega se mogu razlikovati apoptotske stanke od nekrotičnih stanica (15). Apoptoza stanice u svojoj početnoj fazi može dati tipičnu sliku kometa koja bi se pogrešno mogla okarakterizirati kao rezultat genotoksičnog učinka (39, 40). Jednako tako, ova metoda zbog brzine apoptotskog procesa i osjetljive detekcije već vrlo malog broja lomova DNA, nije pogodna za kvantitativno određivanje apoptoze (41).

TUNEL

TUNEL (engl. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) jedna je od češćih metoda za detekciju i kvantifikaciju apoptoze. Postoji više metoda za detekciju apoptoze koje se temelje na označavanju slobodnih 3'-OH-krajeva fragmenata DNA s pomoću modificiranih nukleotida (biotin-dUTP, digoksigenin-dUTP, fluorescin-dUTP), u reakciji kataliziranoj egzogenim enzimima, i to terminalnom deoksinukleotidil transferazom (TdT) za dvostruke lomove DNA i DNA-polimerazom za jednostruke lomove. TUNEL podrazumijeva obilježavanje 3'-OH-krajeva pomoću nukleotida označenog fluorescin izotiocijanatom (fluorescin-dUTP). Uzorci se mogu analizirati s pomoću protočne

citometrije (20, 42, 43) ili svjetlosne, fluorescencijske (21) i elektronske mikroskopije (44). Enzimski markeri, peroksidaza (POD) i alkalna fosfataza (AP), rabe se u dva modificirana TUNEL-testa prilikom detekcije apoptoze pojedinačnih stanica svjetlosnim mikroskopom (45). S obzirom na to da je postupak označavanja kompleksan i uključuje mnogo reagensa, mogući su lažno negativni rezultati pa je stoga nužno uključiti pozitivnu i negativnu kontrolu (20). Metoda obilježavanja 3'OH-krajeva fragmenata DNA ima višestruke prednosti pri analizi kliničkog materijala (uzorci dobiveni biopsijom tumora), kako bi se dobio uvid o indukciji apoptoze nakon primijenjene protutumorske terapije (46). Iako je TUNEL jedna od najspecifičnijih metoda za detekciju apoptoze, postoji mogućnost lažno pozitivnog označavanja lomova u molekuli DNA stanica koje nisu u apoptozi (nekrotične stanice, Okazaki fragmenti u S-fazi staničnog ciklusa), međutim njihov je broj znatno manji od broja fragmenata apoptotskih stanica (16, 32, 29, 47).

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Citoplazmatski fragmenti DNA (mono- i oligonukleosomatski) mogu se također detektirati s pomoću imunoenzimskog testa ELISA, koristeći se monoklonskim protutijelima na DNA i histone (48, 49).

Promjena mitohondrijskoga transmembranskog potencijala

Tijekom apoptoze mijenja se propusnost vanjske membrane mitohondrija koja postaje propusna za proteine, dok se na unutrašnjoj strani mitohondrijske membrane smanjuje transmembranski potencijal $\Delta\Psi_m$. Posljedično, topljivi intermembranski proteini poput citokroma C i AIF (*Apoptosis-Inducing Factor*) otpuštaju se u citoplazmu stanice i pokreću daljnju aktivaciju kaspaza. Promjene membranskog potencijala i translokacija proteina mogu se iskoristiti za detekciju tih ranih apoptotskih događaja na osnovi fluorokromskog označavanja i njihova određivanja citofluorimetrijski ili fluorescencijskim mikroskopom (50).

Spektroskopija

Infracrvena spektroskopija razvija se dugi niz godina kao laboratorijska i klinička metoda za ranu detekciju apoptoze tumorskih stanica, nakon primijenjene protutumorske terapije u uvjetima *in*

in vivo. Postoji direktna povezanost između pojave apoptoze i promjena u spektru infracrvenog zračenja zbog strukturnih promjena staničnih proteina i DNA koje prate apoptozu (1, 51). Jednako tako metaboličke promjene koje prate apoptozu mogu se pratiti s pomoću različitih markera (^{31}P , ^1H , ^{13}C) na osnovi fenomena magnetske rezonancije. U tu se svrhu za analizu rabi spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (52, 7).

LITERATURA

1. Liu KZ, Mantsch HH. Apoptosis-induced structural changes in leukemia cells identified by IR spectroscopy. *J Mol Structure* 2001;265-566:299-304.
2. Communal C, Sumandea M, Tombe P, Narula J, Solaro RJ, Hajjar RJ. Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:6252-6.
3. Collins JC, Schandl CA, Young KK, Vasely J, Willingham MC. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem Cytochem* 1997;45:923-34.
4. Watanabe M, Setoguchi D, Uehara K, Ohtsuka W, Watanabe Y. Apoptosis-like cell death of *Brassica napus* leaf protoplast. *New Phytol* 2002;156:417-26.
5. Sun Y, Zhou J, Dai Y, Zhai Z. Menadione-induced apoptosis and its mechanism in plants. *Chin Sci Bull* 2000;45:350-4.
6. Hao-Ming C, Jun Z, Yao-Ren D. Cleavage of lamin-like protein in *in vivo* and *in vitro* apoptosis of tobacco protoplasts induced by heat shock. *FEBS Lett* 2000;480:165-8.
7. Brauer M. *In vivo* monitoring of apoptosis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003;27:323-31.
8. Corcoran BG, Fix L, Jones DP, Moslen MT, Nicotera P, Oberhammer FA, Buttyan R. Apoptosis: molecular control point in toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994;128:169-81.
9. Huppertz B, Frank HG, Kaufmann P. The apoptosis cascade – morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anat Embryol* 1999;200:1-18.
10. Kosmider B, Osiecka R, Ciesielska E, Szmigiero L, Zyner E, Ochocki J. Induction of apoptosis and necrosis in lymphocytes by the cis-Pt(II) complex of 3-aminoflavone in comparison with cis-DDP. *Mutat Res* 2004;558:169-79.
11. 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.
12. Minervini F, Fornelli F, Flynn KM. Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenon, deoxinivalenol

- and fumonisins B1 in a human erythroleukemia cell line. *Toxicol In Vitro* 2004;18:21-8.
13. Smith GJ, Bagnell CR, Bakewell WE, Black KA, Bouldin TW, Earnhardt TS, Hook GE, Pryzwansky KB. Application of confocal scanning laser microscopy in experimental pathology. *J Electron Microscop Technol* 1991;18:38-49.
 14. Zucker RM, Hunter ES, Rogers JM. Apoptosis and morphology in mouse embryos by confocal laser scanning microscopy. *Methods* 1999;18:473-80.
 15. Fairbairn DW, Walburger DK, Fairbairn JJ, O'Neill KL. Key morphologic changes and DNA strand breaks in human lymphoid cells: discriminating apoptosis from necrosis. *Scanning* 1996;18:407-16.
 16. Zakeri Z, Lockshin RA. Cell death during development. *J Immunol Methods* 2002;265:3-20.
 17. Dobrucki J, Darzynkiewicz Z. Chromatin condensation and sensitivity of DNA *in situ* to denaturation during cell cycle and apoptosis - a confocal microscopy study. *Micron* 2001;32:645-52.
 18. Warrington RC, Norum JN, Hilchey JL, Watt C, Fang WD. A simple, informative, and quantitative flow cytometric method for assessing apoptosis in cultured cells. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003;27:231-43.
 19. Jayaraman S. Intracellular determination of activated caspases (IDAC) by flow cytometry using a pancaspase inhibitor labeled with FITC. *Cytometry* 2003;56A:104-12.
 20. Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods* 2000;243:167-90.
 21. Sánchez-Torres LE, Vargas FD. Apoptosis: the phenomenon and its determination. *Téc Pecu Méx* 2003;41:49-62.
 22. Lund PK, Westvik JB, Joř GB, řvstebř JR, Haug KBF, Kierulf P. Flow cytometric evaluation of apoptosis, necrosis and recovery when culturing monocytes. *J Immunol Methods* 2001;252:45-55.
 23. Mirakian R, Nye K, Palazzo FF, Goode AW, Hammond LJ. Methods for detecting apoptosis in thyroid diseases. *J Immunol Methods* 2002;265:161-75.
 24. McSharry JJ. Analysis of virus-infected cells by flow cytometry. *Methods* 2000;21:249-57.
 25. Roser S, Pool-Zobel BL, Rechkemmer G. Contribution of apoptosis to responses in the comet assay. *Mutat Res* 2001;497:169-75.
 26. Müller G, Rosner H, Rohrmann B, Erler W, Geschwend G, Gräfe U, Burkert B, Möller U, Diller R, Sachse K, Köhler H. Effects of the mycotoxin ochratoxin A and some of its metabolites on the human cell line THP-1. *Toxicology* 2003;184:69-82.
 27. Vamvakopoulos JE, Green C. HGM-CoA reductase inhibition aborts functional differentiation and triggers apoptosis in cultured primary human monocytes: a potential mechanism of statin-mediated vasculoprotection. *BMC Cardiovascular Disorders* 2003;3/6:1471-2261.
 28. Shouman Y, Feng X, O'Connell PJ. Apoptosis detection by annexin V binding: a novel method for the quantitation of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1998;217:61-70.
 29. 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.
 30. Ernst JD, Yang L, Rosales JL, Broaddus VC. Preparation and characterization of an endogenously fluorescent annexin for detection of apoptotic cells. *Anal Biochem* 1998;260:18-23.
 31. Gatti R, Belletti S, Orlandini G, Bussolati O, Dall'Asta V, Gazzola GC. Comparison of annexin V and Calcein-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy. *J Histochem Cytochem* 1998;46:895-900.
 32. Kylarová D, Procházková J, Mad'arová J, Bartoš J, Lichnovský V. Comparison of the TUNEL, lamin B and annexin V methods for the detection of apoptosis by flow cytometry. *Acta Histochem* 2002;104:367-70.
 33. Willingham MC. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *J Histochem Cytochem* 1999;47:1101-9.
 34. Zurgil N, Sunray M, Shafran Y, Afrimzon E, Deutch M. A novel approach for on line monitoring of apoptotic cell shrinkage in individual live lymphocytes. *J Immunol Methods* 2003;281:37-49.
 35. Bascó Z, Everson BR, Eliason FJ. The DNA of Annexin V-binding apoptotic cells is highly fragmented. *Cancer Res* 2000;60:4623-8.
 36. Köhler C, Orrenius S, Zhivotovsky B. Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *J Immunol Methods* 2002;265:97-110.
 37. Voronina E, Wessel GM. Apoptosis in sea urchin oocytes, eggs, and early embryos. *Mol Reprod Dev* 2001;60:553-61.
 38. 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.
 39. Phoucroun P, Gillet D, Dorange G, Sawicki B, Dewitte JD. Comet assay and early apoptosis. *Mur Res* 2001;478:89-96.
 40. Roser S, Pool-Zobel BL, Rechkemmer G. Contribution of apoptosis to responses in the comet assay. *Mut Res* 2001;497:169-75.
 41. Olive PL, Frazer G, Banáth JP. Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay. *Radiat Res* 1993;136:130-6.
 42. Ehemann V, Sykora J, Vera-Delgado J, Lange A, Otto HF. Flow cytometric detection of spontaneous apoptosis in human breast cancer using the TUNEL-technique. *Cancer Lett* 2003;194:125-31.

43. Bromidge TJ, Howe DJ, Johnson SA, Phillips MJ. Adaptation of the TdT assay for semi-quantitative flow cytometric detection of DNA strand breaks. *Cytometry* 1995;20:257-60.
44. Colitti M, Musetti R, Stefanon B. Detection of apoptosis-inducing factor in involuting mammary tissue by immunoelectron microscopy. *Micron* 2004;35:307-10.
45. Dubská L, Metalová E, Míšek I. Detection of apoptosis in paraffin embedded tissues: the influence of tissue type and fixation. *Acta Vet Brno* 2002;71:529-33.
46. Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 1993;53:1945-51.
47. Handzel MJ, Nishioka WA, Raymond Y, Allis CD, Bazett-Jones DP, Th'ng JPH. Chromatin condensation is not associated with apoptosis. *J Biol Chem* 1998;273:24470-8.
48. Kim JH, Park DC, Kim JW, Choi YK, Lew YO, Kim DH, Jung JK, Lim YA, Namkoong SE. Antitumor effect of GnRH agonists in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1999;74:170-80.
49. Bidinger B, Torres R, Rossetti RG, Brown L, Beltre R, Burstein S, Lian JB, Stein GS, Zurier RB. Ajulemic acid, a nonpsychoactive cannabinoid acid, induces apoptosis in human T lymphocytes. *Clin Immunol* 2003;108:95-102.
50. Castedo M, Ferri K, Roumier T, Métivier D, Zamzami N, Kroemer G. Quantitation of mitochondrial alterations associated with apoptosis. *J Immunol Methods* 2002;265:39-47.
51. Brindle KM. Detection of apoptosis in tumors using magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Adv Enzyme Regul* 2002;42:101-12.
52. Hakumäki JM, Brindle KM. Techniques: Visualizing apoptosis using nuclear magnetic resonance. *Trends Pharmacol Sci* 2003;24:146-9.

Summary

DETECTION OF APOPTOSIS

Apoptosis or programmed cell death is the most important process in a huge number of biological processes. Its detection is very important for different fields of modern biology including embryonic development, tumour biology and numerous degenerative and immunodeficiency syndromes associated with apoptotic disorders. The mechanism of apoptosis activation is very complex and accompanied by specific morphological and biochemical cell changes that differ depending on the cell type and conditions in which the cell grows. For this reason it is essential to use several methods to detect different steps of apoptosis and thus avoid false positive or false negative results. All known and used methods have some advantages and disadvantages, but none completely meets the desired conditions. This short review presents the methods most frequently used to detect apoptosis and the biological and biochemical processes which provide the bases for these methods.

KEY WORDS: *annexin V, caspases, electrophoresis, flow cytometry, microscopy*

REQUESTS FOR REPRINTS:

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