

APOPTOZA ERYTROCYTÓW CZŁOWIEKA

APOPTOSIS IN HUMAN ERYTHROCYTES

Agnieszka MARCZAK

Katedra Termobiologii, Instytut Biofizyki, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie: Molekularny mechanizm apoptozy zależy od obecności w komórce określonych czynników apoptotycznych, które obecne są głównie w mitochondriach i jądrze. Dojrzałe erytrocyty człowieka nie mają organelli komórkowych. Przez długi czas uważano, że nie mogą one wchodzić na drogę apoptozy. Badania ostatnich lat zakwestionowały to twierdzenie. Punktem zwrotnym w tych badaniach było wykrycie w dojrzałych erytrocytach człowieka kaspaz – proteinaz cysteinowych, które odgrywają kluczową rolę w efektorowej fazie programowanej śmierci komórki. W niniejszej pracy przedstawiono przebieg apoptozy na różnych etapach rozwoju erytrocytów człowieka oraz w wybranych stanach patologicznych. Dokonano również omówienia programowanej śmierci komórki w erytrocytach w ujęciu ewolucyjnym na przykładzie erytrocytów płazów, gadów, ptaków i ssaków.

Słowa kluczowe: apoptoza, erytrocyty, komórki bezjądrzaste.

Summary: Until very recently, erythrocytes have been considered unable to undergo apoptosis, as they lack mitochondria and nuclei, key organelles in the apoptotic machinery of other cells. However, in most recent observations it does not seem to be the truth. The major spinning point in this research was finding caspases (cysteine proteases), that play the major role in programmed cell death, in humans mature erythrocytes. This article shows the progress of apoptosis in different stadia of humans erythrocytes development as well as in several pathological stadia. With regard to the evolutionary aspect the programmed cell death in erythrocytes of amphibians, reptiles, birds and mammals was also discussed.

Key words: apoptosis, erythrocytes, anucleated cells.

1. WSTĘP

Erytrocyty ssaków uważane są za pływające w osoczu pęcherzyki zawierające hemoglobinę. Rzeczywiście nie mają one jądra i mitochondrium, a więc nie mogą być traktowane jak komórki zawierające organella. Niemniej jednak erytrocyty od dawna były przedmiotem zainteresowania naukowców zajmujących się apoptozą, procesem przypisywanym pierwotnie tylko komórkom jądrzastym.

Apoptoza, czyli programowana śmierć komórki (ang. *Programmed Cell Death*, PCD) ma miejsce podczas całego rozwoju organizmu. W jej wyniku organizm pozbywa się nadmiaru niepotrzebnych komórek podczas różnicowania tkanek i narządów, a także eliminuje zainfekowane, uszkodzone czy też zmutowane komórki. Różne aspekty apoptozy omawiane były w polskich czasopismach [4, 24, 28, 29, 35, 42, 68, 71]. Dotyczyły one jednak komórek jądrzastych. Niniejszy artykuł przedstawia procesy PCD w erytrocytach ssaków, specyficznych komórkach pozbawionych jądra i innych organelli komórkowych.

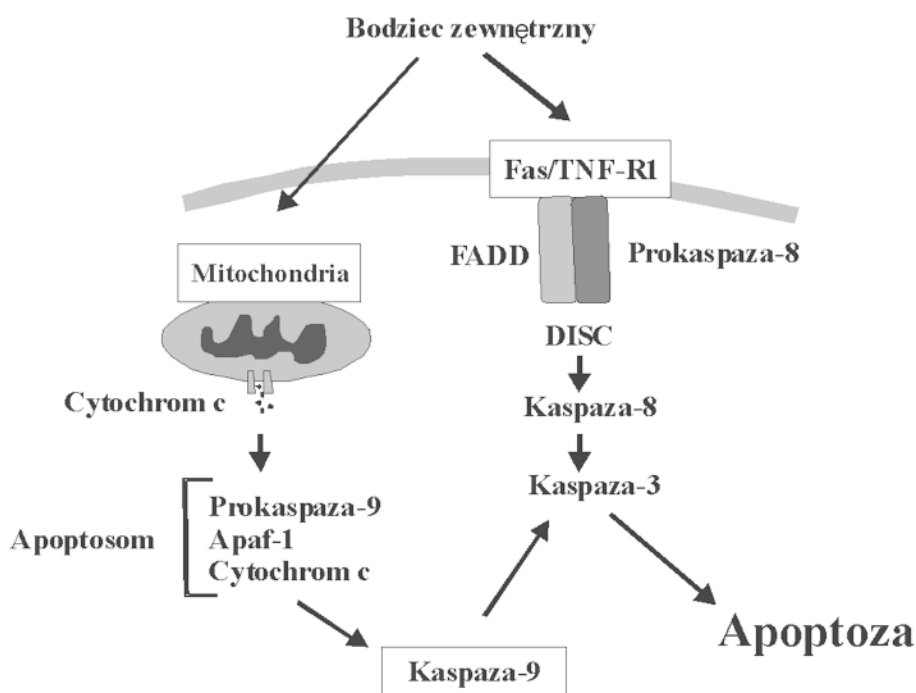
Zainteresowanie problemem apoptozy w erytrocytach wynikało z obserwacji, że komórki te, których czas życia wynosi u człowieka około 120 dni, są po tym czasie usuwane z krwioobiegu, a śmierć erytrocytów poprzedzona jest zmianami charakterystycznymi dla apoptozy. Następuje obkurczenie komórki, uwypuklenie błony plazmatycznej, utrata peryferycznych białek błonowych i asymetrii lipidów prowadząc do przemieszczania się fosfatydyloseryny z wewnętrznej do zewnętrznej monowarstwy. Zmiany te powodują, że erytrocyty są wychwytywane przez komórki fagocytyczne i niszczone. Dodatkowo już podczas erytropoezy usuwana jest w drodze apoptozy pewna frakcja prekursorów erytrocytów [41].

2. OGÓLNY MECHANIZM APOPTOZY

Proces prowadzący do apoptozy można podzielić na trzy fazy: początkową, efektorową i degradacyjną. Początkowa faza indukowana jest przez wiele czynników zewnętrznych, np. szok termiczny, stres oksydacyjny, aktywacja określonych receptorów błonowych i inne. Dalsze fazy apoptozy polegają na aktywacji w komórkach określonych procesów biochemicznych prowadzących w efekcie do śmierci komórki.

Kluczowe znaczenie dla przebiegu efektorowej fazy apoptozy przypisuje się proteinazom cysteinowym (kaspazom, ang. *caspase-cysteine-dependent aspartate specific protease*) [1, 35]. Są one syntetyzowane jako nieaktywne proenzymy (zymogeny) składające się z czterech podjednostek: NH_2 -terminalnej prodomeiny, o różnej wielkości, dwóch domen o masach cząsteczkowych ~ 10 kDa i ~ 20 kDa, połączonych krótkim fragmentem łącznikowym. Prodomena, która utrzymuje kaspazy w formie nieaktywnej, podczas aktywacji zostaje odszczepiona [57, 70]. Początkowo obecność tych enzymów stwierdzono tylko w komórkach jądrzastych, stąd też zjawisko apoptozy przypisywane było tylko takim komórkom. Doniesienia Bratosin i wsp. [9] oraz Berga i wsp. [3], którzy wykazali w dojrzałych erytrocytach człowieka obecność kaspaz i innych czynników apoptotycznych, zmieniły pogląd na tę sprawę. Wykazali oni, że erytrocyty zawierają prokaspazę 3 i prokaspazę 8 w ilościach porównywalnych z poziomem tych enzymów w komórkach Jurkat.

Na rycinie 1 przedstawiono dwie drogi, którymi może przebiegać apoptoza [10]. Szlak zewnętrzny (ang. *extrinsic*) rozpoczyna się od pobudzenia receptorów Fas lub TNF-R należących do nadrodziny TNF-R (ang. *Tumour necrosis factor receptor*). Należą do nich między innymi receptory CD95, które wykryto na niedojrzałych

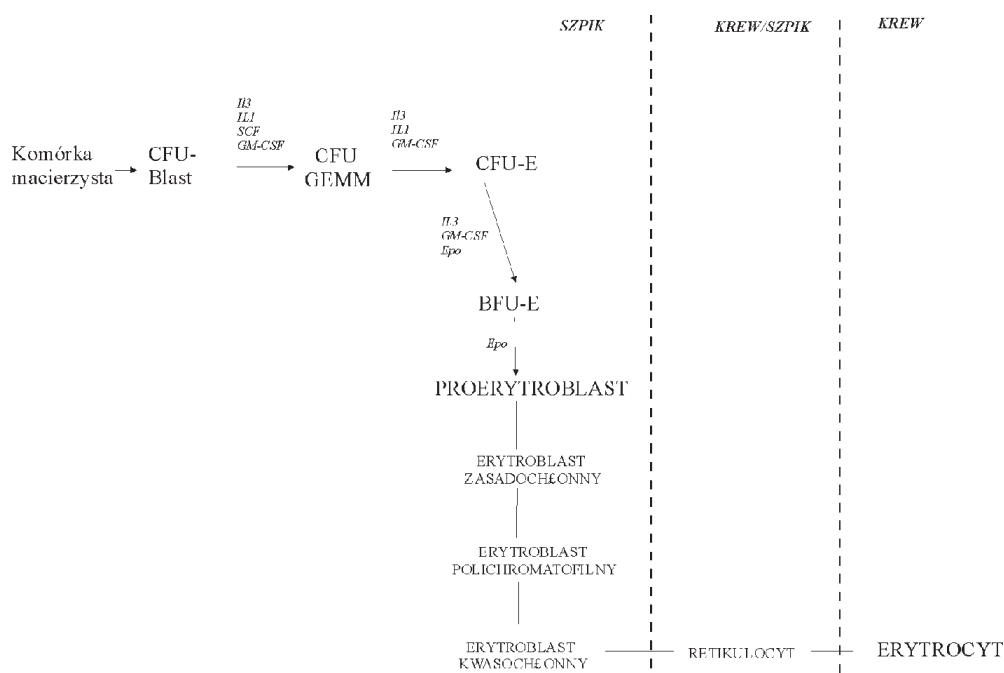


RYCINA 1. Schematyczne przedstawienie dwóch głównych dróg apoptozy [wg 10 za zgodą Elsevier]

erytroblastach. Cechą charakterystyczną receptorów śmierci jest obecność wewnątrzkomórkowej domeny zwanej domeną śmierci (ang. *death domain, DD*) [39, 65]. Na skutek związania liganda z receptorem dochodzi do oligomeryzacji receptora, a następnie do utworzenia kompleksu DISC (ang. *death-inducing signaling complex*) poprzez połączenie domen śmierci z białkiem adaptorowym FADD (ang. *fas associated death domain protein*) oraz z prokaspazą 8 [36]. Konsekwencją tego jest aktywacja przez autoproteolizę prokaspazy 8, która bezpośrednio aktywuje kaspazę 3 [69]. Drugi szlak wymaga udziału mitochondriów. Szereg reakcji z udziałem białek z rodziny Bcl-2 (BH3only oraz Bak) prowadzi do utworzenia kanałów uwalniających cytochrom c z przestrzeni międzybłonowej mitochondrium [37]. Wypływ cytochromu c inicjuje utworzenie kompleksu zwanego apoptosomem [63], w skład którego wchodzi cytochrom c, prokaspaza 9, ATP oraz cytozolowe białko Apaf 1 (ang. *apoptotic protease activating factor-1*). Utworzenie tego kompleksu jest niezbędne do oligomeryzacji, a następnie autoproteolizy prokaspazy 9, która jest bezpośrednim aktywatorem prokaspazy 3 [25].

3. POWSTAWANIE KRWINEK CZERWONYCH

Z uwagi na fakt, że podczas rozwoju erytrocytów następują zmiany w zawartości organelli komórkowych, procesy apoptozy należy śledzić w ścisłym powiązaniu z cyklem



RYCINA 2. Schemat erytropoezy [wg 15 w zmienionej postaci]: *Stem cell* – komórka macierzysta szpiku, CFU-Blast (*colony forming unit*) – komórka formująca kolonie komórek blastycznych, CFU-GEMM – komórka formująca kolonie dla szeregów czerwonych, granulocytarnego, płytkowego, monocytarnego, BFU-E (*base forming unit*) – inna forma komórki tworzącej kolonie dla szeregu erytrocytarnego, CFU-E – komórka CFU dla szeregu erytrocytarnego. Czynniki wzrostu dla poszczególnych linii: CSF (*colony stimulating factor*), IL – interleukiny, EPO – erytropoetyna

życia krwinek czerwonych. Cykl ten można podzielić na dwie fazy: pierwsza to erytropoeza, polegająca na tworzeniu dojrzałych erytrocytów w organach hematopoetycznych, druga ma za zadanie utrzymywanie stałej liczby dojrzałych erytrocytów w osoczu.

Krwinki czerwone w życiu pozapłodowym powstają z pierwotnych komórek szpiku (ryc. 2). Ich prekursor – proerytroblast jest typową komórką jądristą, w której zachodzi wiele różnorodnych procesów biochemicznych. W procesie dojrzewania erytroblast różnicuje się i rozpoczyna aktywne wychwytywanie żelaza, w cytoplazmie następuje zanik RNA i wzrost ilości białka – globiny. Erytroblast polichromatofilny zawiera niewielkie ilości mitochondriów i RNA w cytoplazmie, w której pojawia się hemoglobina. Następne stadium – erytroblast ortochromatofilny – cechuje się znacznym zwiększeniem zawartości hemoglobiny. Komórka praktycznie nie zawiera już mitochondriów i RNA, traci jądro i przechodzi w retikulocyt. Stanowi on ostatnie stadium dojrzewania i różnicowania komórek szpiku w kierunku erytrocytów. Okres ten trwa 7–10 dni [15].

Obecnie wiadomo, że za stymulację erytropoezy odpowiada hormon erytropoetyna (EPO). Przyspiesza ona proliferację komórek szeregu erytroidalnego (BFU-E, CFU-E) oraz

zapobiega zjawisku apoptozy komórek znajdujących się w końcowych etapach różnicowania i dojrzewania (CFU-E i proerytroblastów) z udziałem białka antyapoptotycznego Bcl-X_L [43]. Faktycznie, zablokowanie Bcl-X_L powoduje zatrzymanie w późnym stadium procesu erytropoezy, czego następstwem jest anemia hemolityczna. Natomiast usunięcie erytropoetyny powoduje aktywację kaspaz i śmierć erytroblastów [26].

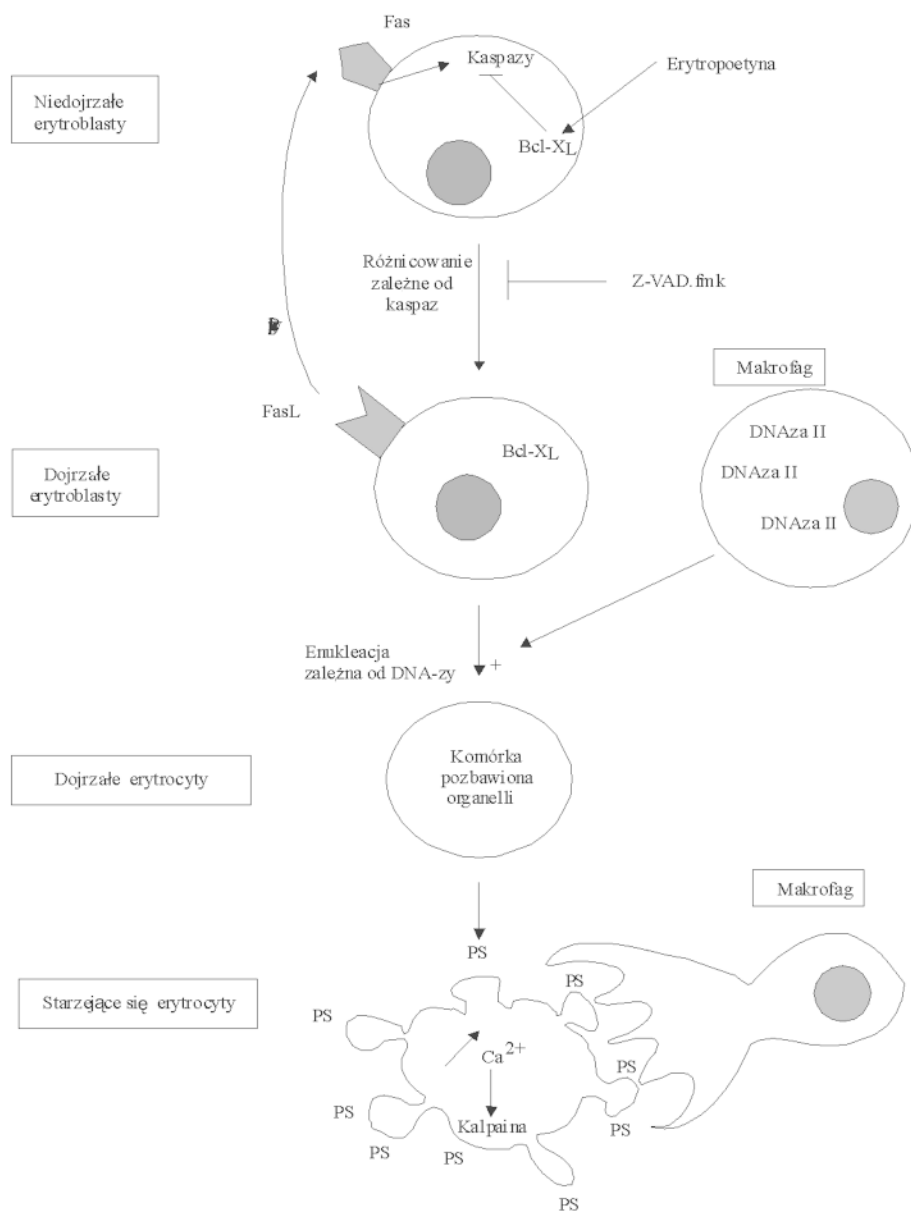
4. APOPTOZA W NIEDOJRZAŁYCH ERYTROCYTACH

Prekursory erytrocytów, które są komórkami zawierającymi organelle, podlegają pełnemu procesowi apoptozy. Pełny proces apoptozy obserwuje się również w stadiach patologicznych, takich jak β -talasemia czy idiomatycznie nabywana anemia sideroblastyczna. Ortochromatyczne erytroblasty ekspresując ligand CD95 stymulują receptor śmierci CD95, należący do rodziny receptorów śmierci Fas. Tworzy się w ten sposób pętla sprzężenia zwrotnego kontrolująca erytropoezę. W procesie dojrzewania erytroblastów dochodzi do pozbawienia komórek jądra, który to proces wymaga obecności makrofagów z ekspresją DNAzy II [14] (ryc. 3A).

Aktywacja kaspaz jest niezbędna do wytworzenia czerwonych krwinek. Inhibitor kaspazowy Z-VAD.fmk powoduje zahamowanie erytropoezy. Podczas dynamicznego podziału erytroblastów kaspazy-3, -6 i -7 ulegają wprawdzie proteolitycznej aktywacji i rozszczepiają białka jądrowe (lamina B i acinus), ale pozostawiają nienaruszony czynnik transkrypcyjny GATA-1 rozpoznający sekwencję nukleotydową GATA. Nie dochodzi także do ekspozycji fosfatydyloseryny na powierzchni komórki. Można więc przypuszczać, że pewne procesy programu apoptozy biorą udział w procesie podziału i pozbawiania jądra komórek erytroidalnych. Jednak kaspaza 3 nie powoduje żadnych widocznych skutków ubocznych w procesie erytropoezy, a nadekspresja białka antyapoptotycznego – Bcl-2 nie powoduje zaburzeń w procesie erytropoezy [14].

5. APOPTOZA W DOJRZAŁYCH ERYTROCYTACH SSAKÓW

Dojrzałe erytrocyty ssaków są pozbawione jądra i innych organelli komórkowych i w przeciwieństwie do większości innych komórek nie zawierają czynnika Apaf-1, cytochromu c i kaspazy 2, 6, 7 i 9. Mogłyby więc ulegać apoptozie tylko w obecności receptorów śmierci bez udziału mitochondriów. Początkowo Berg i wsp. [3] zaobserwowali, że choć prokaspazy, które są obecne w erytrocytach, mogą być aktywowane *in vitro* poprzez dodanie egzogennej kaspazy 6, nie ulegają jednak aktywacji w nieuszkodzonych erytrocytach zarówno podczas ich przechowywania, jak i w odpowiedzi na czynniki apoptotyczne. Nie zaobserwowano również w dojrzałych erytrocytach endogennych inhibitorów kaspaz, czyli XIAP, C-IAP1, C-IAP2 [73]. Przypuszczano, że brak aktywacji kaspaz w erytrocytach w warunkach *in vivo* jest spowodowana obecnością jakiegoś innego inhibitora apoptozy lub brakiem Apaf-1 i cytochromu c. Konsekwencją tego jest niezdolność do tworzenia aktywnych apoptosomów. Mandala



RYCINA 3. Zjawiska apoptotyczne w erytrocytach na różnych etapach różnicowania się komórki: Z-VAD.fmk – inhibitor kaspaz; PS – fosfatydyloseryna (wg [14] za zgodą)

i wsp. [51] natomiast wykazali, że prokaspaza 3 (32KDa) jest hydrolizowana do formy aktywnej (20 kDa) w odpowiedzi na stres oksydacyjny. Obecność aktywnej kaspazy 3 została potwierdzona poprzez obserwację, że lizat komórek erytrocytarnych powodował proteolizę jej substratu Ac-DEVD-pNA. Ponadto zastosowanie inhibitora kaspazy 3, Z-DEV-fmk, powodowało zablokowanie przemieszczania się fosfatydyloseryny z wewnętrznej monowarstwy błony na powierzchnię komórki. Prawdopodobnie aktywacja kaspazy 3 powoduje hamowanie aktywności translokazy aminofosfolipidowej (flipazy) zarówno poprzez bezpośrednie rozszczepienie proteolityczne translokazy, jak i, co jest bardziej prawdopodobne, poprzez pośredni wpływ na regulatory flipaz [51]. Translokaza aminofosfolipidowa odpowiedzialna jest za transport fosfatydyloseryny (PS) do wewnętrznej monowarstwy. Zaburzenia w funkcjonowaniu tego enzymu powodują ekspozycję tego fosfolipidu na powierzchni komórki, co jest jednym z oznak apoptozy.

Należy sobie jednak zdawać sprawę, że również inne proteazy komórkowe, na przykład kalpaina, mogą aktywnie uczestniczyć w procesie apoptozy. Kalpaina to proteaza cysteinowa aktywowana jonami wapnia. Biorą one udział w wielu procesach komórkowych, w tym proliferacji, migracji i śmierci komórki w drodze zarówno apoptozy, jak i nekrozy [60, 74]. Kalpaina występuje w postaci dwóch izoenzymów: kalpaina I (μ -kalpaina), aktywnej w obecności jonów wapniowych w stężeniu μ M i kalpaina II (m-kalpaina), działającej w obecności tego kationu w stężeniu mM. Każda z izoform jest zbudowana z 28 kDa podjednostki, która jest identyczna dla każdej izoformy i unikatowej o masie 80 kDa [58]. Według licznych badań kalpaina związana jest również z apoptozą w komórkach jądrzastych. Na przykład farmakologiczne zahamowanie aktywności kalpain może zapobiec śmierci różnych typów komórek, w tym komórek nerwowych [5,48,67].

W erytrocytach stwierdzono obecność μ -kalpaina [14]. Pod wpływem Ca^{2+} jest ona przekształcana do aktywnej postaci, która odpowiedzialna jest za degradację licznych białek komórkowych m.in. spektryny. Rozszczepia ona wiązania peptydowe wewnątrz łańcucha białkowego, nie wykazując przy tym specyficzności wobec aminokwasów [74]. Kalpaina po aktywacji wywołują proces apoptozy poprzez proteolityczną aktywację kaspaz (w szczególności kaspaz 3, 9 i 12) [56] bądź inaktywację białek antyapopto-tycznych z rodziny Bcl-2 [11,23,76]. W wielu badaniach podkreślano istnienie wzajemnego współdziałania między kaspazami i kalpainami. Rosnące dowody wskazują na to, że wszystkie rodzaje proteaz mogą zastępować siebie nawzajem w procesie apoptotycznym [74].

Dojrzałe erytrocyty, pozbawione już jądra i innych organelli komórkowych, mogą być *in vitro* pobudzane do starzenia się poprzez dodanie zewnątrzkomórkowego Ca^{2+} lub jonoforu Ca^{2+} . Czynniki te wywołują aktywację μ -kalpaina i wyzwalają zależne od μ -kalpaina zmiany kształtu komórki i zmiany w strukturze błony plazmatycznej. W szczególności obserwowane jest ekspozycję PS na powierzchni komórki podobne jak podczas apoptozy w komórkach jądrzastych [14]. Proces ten kończy się rozpadem erytrocytów i fagocytozą w obecności makrofagów (ryc. 3C).

Ciekawe jest, że w procesie starzenia się erytrocytów *in vitro* występuje zaburzenie homeostazy jonowej. Dochodzi do aktywacji enzymów proteolitycznych. Inhibitory proteaz cysteinowych, takie jak Ac-DEVD-CHO czy leupeptyna, zapobiegają wszystkim właściwościom procesu starzenia się erytrocytów wywołanymi jonoforami Ca^{2+} [14].

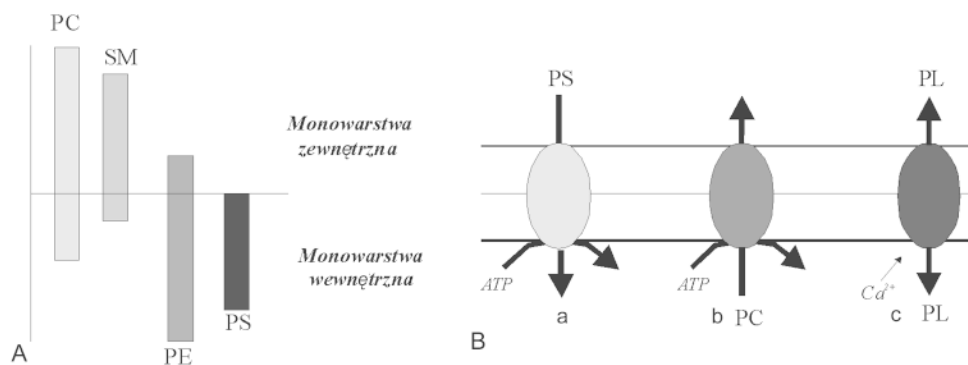
6. ROLA BŁONY KOMÓRKOWEJ W APOPTOZIE

Kaskadę zdarzeń apoptotycznych mogą inicjować uszkodzenia białkowo-lipidowej błony komórkowej. W erytrocytach, które są pęcherzykami wypełnionymi hemoglobina, błona komórkowa ma szczególne znaczenie w inicjowaniu apoptozy. Wykazano, że komórki jądrzaste w stadium apoptozy cechuje zwiększona peroksydacja lipidów [59], a stymulacja receptorów powierzchniowych błony aktywuje sfingomielinazę, która hydrolizuje sfingomielinę do ceramidu i cholicy. Ceramid, aktywujący zależną od niego serynowo-treoninową kinazę białkową, jest uważany za wtórny przekaźnik sygnałów apoptotycznych [31, 38, 61].

Błona komórkowa erytrocytów jest złożoną strukturą, w której można wyróżnić trzy obszary: matrycę białkowo-lipidową, która stanowi centralną warstwę błony, szkielet błony, czyli zespół białek peryferyjnych znajdujący się po wewnętrznej stronie dwuwarstwy lipidowej i glikokaliks, który ogranicza błonę od środowiska zewnętrznego.

Lipidy w błonach biologicznych rozmieszczone są w sposób asymetryczny. Fosfolipidy zawierające cholinę, a więc fosfatydylocholina (PC) i prawie cała sfingomielina (SM) występują na ogół w zewnętrznej monowarstwie. Fosfolipidy zawierające terminalną grupę aminową, fosfatydyloseryna (PS) i fosfatydylo-etanolo-amina (PE), występują preferencyjnie w wewnętrznej, kontaktującej się z cytoplazmą, monowarstwie błony [40] (ryc.4A).

Utrzymanie asymetrii jest możliwe dzięki powolnej poprzecznej dyfuzji lipidów między warstwami błony, interakcji białko-lipid i transportowi z udziałem białek. Wyróżnia się trzy klasy transporterów fosfolipidów: flipazy, w tym translokazę aminofosfolipidową, które transportują aktywnie lipidy z zewnętrznej monowarstwy do wewnętrznej, flopazy



RYCINA 4. Schematyczne rozmieszczenie podstawowych fosfolipidów w dwuwarstwie lipidowej (A) oraz transportery wewnątrz błonowe fosfolipidów w komórkach eukariotycznych (B) (B wg [13] za zezwoleniem), fosfatydylocholina (PC) i sfingomielina (SM) umiejscowione są głównie w zewnętrznej monowarstwie, podczas gdy fosfatydyloetanolamina (PE) i fosfatydyloseryna (PS) lokują się w monowarstwie wewnętrznej. Ta asymetria jest utrzymywana dzięki (a) flipazie fosfatydyloseryny. W niektórych tkankach wymagana jest obecność flopazy PC (b). Za przypadkowe rozmieszczenie fosfolipidów odpowiadają niespecyficzne skramblazy, aktywowane jonami Ca^{2+}

– aktywnie transportujące lipidy w kierunku odwrotnym oraz aktywowane przez jony wapnia skramblazy, transportujące lipidy biernie w obie strony [13] (ryc. 4B). Nagromadzenie lipidów po jednej stronie błony może indukować zagięcia i w konsekwencji zmianę kształtu komórki [22].

Lipidy pozostają w ścisłym powiązaniu z białkami błony. Interakcja ta również umożliwia utrzymanie asymetrycznego rozmieszczenia lipidów. Podstawowym białkiem szkieletu błonowego jest spektryna, która stanowi około 25% masy białek błonowych. Składa się ona z dwóch przeplatających się łańcuchów (α -220 kDa i β -240 kDa) tworzących dimer. Wykazano, że spektryna może łączyć się z fosfatydyloseryną, składnikiem dwuwarstwy lipidowej zlokalizowanym w warstwie wewnętrznej błony. Badania z wykorzystaniem liposomów zbudowanych z fosfatydyloseryny (PS) wykazały, że w wiązaniu tym uczestniczą łańcuchy zarówno α spektryny, jak i β . Miejscami o wysokim powinowactwie do PS okazały się: α 8, α 9–10, β 12, β 13, β 14. Wykazano również powinowactwo do PS w niehomologicznej N-terminalnej domenie łańcucha β . Godne uwagi jest też fakt, że miejsca wiązania PS są skupione w pobliżu miejsc przyłączania ankiry i białka pasma 4.1, czyli białek, które uczestniczą w przyłączaniu spektryny do błony komórkowej. Spektryna bowiem połączona jest z dwuwarstwą lipidową poprzez białko ankiry, która tworzy most między tetramerem spektryny a białkiem transbłonowym pasma 3 oraz poprzez połączenie między białkiem pasma 4.1 a glikoforiną C [16].

Liczne doniesienia wskazują, że interakcja spektryny i PS wpływa na stabilność błony. Bezpośrednie oddziaływanie spektryny z PS w błonie może modulować jej interakcje z białkami i wynikiem tego mogą być lipidowe domeny bogate w PS, obserwowane w błonie erytrocytarnej. Przejście PS do warstwy powierzchniowej jest sygnałem dla usuwania komórki przez makrofagi [20, 27].

Eksternalizacja PS ma miejsce w początkowych etapach apoptozy [19]. Zaburzenia te prowadzą do zmian właściwości powierzchniowych komórki. W błonie, w której lipidy rozmieszczone są asymetrycznie, monowarstwa cytoplazmatyczna ma bardziej ujemny wypadkowy ładunek elektryczny niż ekstracytoplazmatyczna strona błony. Kwasy tłuszczowe fosfatydylocholiny i sfingomieliny są bardziej nasycone niż kwasy tłuszczowe wchodzące w skład fosfatydyloetanolaminy i fosfatydyloseryny, stąd asymetrii rozmieszczenia głów polarnych fosfolipidów towarzyszy asymetria rozmieszczenia kwasów tłuszczowych, która powoduje, że wewnętrzna monowarstwa jest nieco bardziej płynna. Utrata tych właściwości powoduje przejście komórek w stan prokoagulacyjny [49], obserwuje się wzrost adhezyjności [64] i właściwości agregacyjnych [72]. Komórki takie stają się rozpoznawalne przez komórki fagocytyczne – makrofagi [7,20,21]. W warunkach fizjologicznych procesy apoptozy są podstawą rozwoju organizmu i homeostazy.

7. ROLA KANAŁÓW KATIONOWYCH W INICJOWANIU APOPTOZY

Komórka ulegająca apoptozie uruchamia kaskadę zdarzeń biochemicznych, które w ostateczności prowadzą do jej śmierci. W początkowym etapie procesu apoptozy w większości komórek jest obserwowany wzrost wewnątrzkomórkowego, cytozolowego stężenia wapnia. Wapń jest uniwersalnym wewnątrzkomórkowym przekaźnikiem kontrolującym różne procesy w komórce [6]. Jony wapnia odgrywają ważną rolę w przekazywaniu sygnału do apoptozy w odpowiedzi na różne czynniki patologiczne [32].

Kanały kationowe w błonach erytrocytarnych są otwierane w wyniku szoku osmotycznego i stresu oksydacyjnego [17,34,45]. Mogą być również aktywowane poprzez usunięcie wewnątrzkomórkowego i zewnątrzkomórkowego Cl^- [17, 34]. Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} stymuluje skramblazy, prowadzi do zaburzeń asymetrii lipidów błonowych i stymuluje wrażliwe na jony wapnia kanały K^+ , w wyniku czego dochodzi do utraty K^+ i w następstwie do obkurczenia komórki [45, 46, 55]. Interesujące jest, że traktowanie erytrocytów jonoforem jonomycyny czy A23187, które wywołują zmiany w stężeniu Ca^{2+} wewnątrz komórki, powoduje szybką zmianę kształtu komórki, tworzenie wypustek błonowych, eksternalizację fosfatydyloseryny, czyli typowe zjawiska występujące podczas apoptozy w komórkach jądrzastych [3,9,14]. Prowadzi to również do aktywacji kalpain, ale nie aktywuje kaspaz.

Erytrocyty inkubowane z A23187 były szybko wychwytywane przez makrofagi. Preinkubacja z inhibitorami proteaz zapobiegała wychwytywaniu erytrocytów przez makrofagi zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* [33].

Lang i wsp. [46] wykazali, że szok osmotyczny i stres oksydacyjny, które wywoływały apoptozę w komórkach jądrzastych [30, 54], powodowały również przemieszczenie fosfatydyloseryny na powierzchnię komórki w erytrocytach człowieka, co przejawiało się w wiązaniu aneksyny do błony komórkowej. Wykonane później eksperymenty w celu wyjaśnienia komórkowych mechanizmów tego zjawiska wykazały, że obydwa czynniki powodują otwarcie kanałów wapniowych i wzrost stężenia cytozolowego Ca^{2+} . Zastosowanie amiloridu, inhibitora kanałów kationowych [17, 34] hamuje całkowicie ten proces.

W komórkach apoptotycznych obserwuje się zmniejszenie wartości komórkowego pH, które może być związane z aktywacją wymiennika jonowego, antyportu $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ [18, 53] i zmianą zawartości Ca^{2+} w komórce.

8. APOPTOZA W DOJRZAŁYCH ERYTROCYTACH JĄDRZASTYCH

Erytrocyty z płodu ssaków [66], podobnie jak erytrocyty płazów, gadów i ptaków [62, 75] zawierają jądro i te komórki mogą przechodzić typowy proces apoptozy. Erytrocyty z ludzkiego płodu krążące we krwi matki przechodzą proces apoptozy *in situ* [62].

Bratosin i wsp. [8, 9] wykazali, że programowana śmierć komórki może być indukowana w dojrzałych erytrocytach żaby poprzez zwiększenie napływu Ca^{2+} do komórki dzięki zastosowaniu jonoforu A 23178. Proces ten jest hamowany przez inhibitory proteaz cysteinowych (kaspaz i kalpain) – Ac-DEVD-cmk i leupeptyny. Obserwowano przy tym obniżenie potencjału błony mitochondrialnej ($\Delta\Psi_m$), aktywację kaspazy 3 oraz kondensację i fragmentację chromatyny. Obserwacje mikroskopowe wykazały ponadto zmiany morfologiczne komórki, utratę dwuwklęsłego kształtu, pojawienie się pęcherzyków i utworzenie ciałek apoptotycznych. Miało miejsce również przemieszczenie PS na powierzchnię komórki.

Weil i wsp. [74] zaobserwowali apoptozę w erytrocytach kurcząt wywołaną działaniem staurosporyny i cykloheksimidu zarówno w obecności, jak i przy braku osocza. Obserwowano zmianę kształtu komórki, przemieszczenie PS na powierzchnię komórki, kondensację i fragmentację chromatyny. W przeciwieństwie natomiast do komórek żaby (*Rana*) nie notowano aktywacji kaspaz. Proces apoptozy nie był tu hamowany przez inhibitor kaspaz Z-VAD-fmk.

Analizując proces apoptozy w ujęciu ewolucyjnym można zauważyć, że erytrocyty płazów mają wszystkie główne składniki procesu apoptotycznego, jakie obserwuje się w komórkach jądrazystych. W procesie ewolucji w erytrocytach ptaków nastąpiła inaktywacja kaspaz [75], podczas gdy u ssaków w procesie różnicowania erytrocytów dochodzi do zaniku zarówno jądra, jak i mitochondriów. W procesie ewolucji erytrocyty narażone były na zwiększający się stres oksydacyjny, który przyspiesza proces starzenia się komórek. Ceną, jaką musiały zapłacić za przeżycie, było pozbawienie erytrocytów mitochondriów, co spowodowało uproszczenie procesu apoptozy z uwagi na brak aktywnych apoptosomów. Pociągnęło to jednak za sobą również skrócenie życia erytrocytów. Mitochondria bowiem, chociaż uczestniczą w procesie programowanej śmierci komórki, są też kluczowe dla procesów uzyskiwania energii i tym samym dla życia komórek [8].

9. APOPTOZA W WYBRANYCH SCHORZENIACH GENETYCZNYCH ZWIĄZANYCH Z ERYTROCYTAMI

Choroby o podłożu genetycznym, takie jak anemia sierpowata [44], talasemia [50], upośledzenie przemian glukozy-6-fosforanu [52], powodują skrócenie czasu życia erytrocytów. Skrócenie to jest dość drastyczne. Okres półtrwania krwinek osób chorych na anemię sierpowatą wynosi 6 dni [2], talasemię – 15 dni [77], u osób z upośledzoną przemianą glukozy-6-fosforanu – 22 dni [12].

Erytrocyty pochodzące od osób chorych na wszystkie trzy schorzenia genetyczne są w porównaniu z komórkami osób zdrowych bardziej wrażliwe na takie czynniki, jak stres oksydacyjny i niedobór glukozy. Dodatkowo erytrocyty sierpowate i wykazujące upośledzenie przemian glukozy są bardziej wrażliwe na szok osmotyczny. Ta zwiększona wrażliwość na stres jest powodem skrócenia czasu życia erytrocytów osób cierpiących na te schorzenia genetyczne [44, 47].

Stres oksydacyjny i szok osmotyczny uszkodzają erytrocyty przynajmniej częściowo poprzez te same mechanizmy, to jest aktywację kanałów kationowych. Wzrost wrażliwości komórek z defektami genetycznymi może być wtórnym efektem uwrażliwienia kanałów kationowych bądź wzrostu aktywności skramblaz i późniejszej kaskady zdarzeń biochemicznych i molekularnych. Nie jest to jednak wyłącznie ta przyczyna. Badania z użyciem jonomycyny wykazały bowiem różnice we wrażliwości różnych typów komórek na ten czynnik. Erytrocyty osób z upośledzeniem przemian glukozy-6-fosforanu wykazywały zwiększoną wrażliwość na ten czynnik.

10. PODSUMOWANIE

Programowana śmierć komórki to złożony proces, w wyniku którego organizm eliminuje uszkodzone komórki. W przypadku erytrocytów człowieka powstaje semantyczny problem zastosowania nazwy apoptoza na określenie procesów prowadzących do śmierci tych komórek. Należałoby wyróżnić dwa następujące po sobie procesy. Po pierwsze dojrzałe erytrocyty, będące pozbawionymi organelli pęcherzykami wypełnionymi hemoglobina powstały prawdopodobnie na skutek krótkotrwałej aktywacji kaspaz w początkowym etapie różnicowania komórek. Ponieważ prekursor erytrocytów – proerytroblast – jest typową komórką jądristą zawierającą organella komórkowe, nie wyklucza się tu udziału mitochondrium.

Również podczas starzenia się erytrocytów człowieka zakończonego ich śmiercią mają miejsce zjawiska charakterystyczne dla procesu apoptozy. W dojrzałych erytrocytach, tak jak w klasycznej apoptozie komórek jądristych, śmierci zawsze towarzyszy obecność fosfatydyloseryny na powierzchni komórki, wypuklenia błony plazmatycznej i obkurczenie komórki. Zachodzi pytanie, czy procesy te są na tyle podobne, aby można było mówić o apoptozie w bezjądrzystych erytrocytach człowieka. Wykrycie w dojrzałych erytrocytach człowieka kaspaz stanowi ważny krok w tych rozważaniach. Podczas śmierci wywołanej czynnikami apoptotycznymi, jak na przykład stres oksydacyjny czy szok osmotyczny, dochodzi do aktywacji tych enzymów w erytrocytach. Fakt ten, jak również potwierdzony udział jonów Ca^{2+} , przemawiałyby za uznaniem procesów zachodzących w erytrocytach za apoptozę. Ostateczne rozstrzygnięcie tego problemu nie jest jednak jeszcze w tym momencie możliwe.

11. LITERATURA

- [1] ABRAHAM MC, SHAHAM S. Death without caspases, caspases without death. *Trends in Cell Biol* 2004; **14**: 184–193.
- [2] BENIAMIN LJ, MANNING JM. Enhanced survival of sickle erythrocytes upon treatment with glyceraldehyde. *Blood* 1986; **67**: 544–546.
- [3] BERG CP, ENGELS IH, ROTHBART A, LAUBER K, RENZ A, SCHLOSSER SF, SCHULZE-OSTHOFF K, WESSELBORG S. Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis. *Cell Death Differ* 2001; **8**: 1197–1206.

- [4] BIELAK-ŻMIJEWSKA A. Mechanizmy oporności komórek nowotworowych na apoptozę. *Kosmos* 2003; **52**: 157–171.
- [4] BLOMGREN K, ZHU C, WANG X, KARLSSON JO, LEVERIN AL, BAHR BA, MALLARD C, HAGBERG H. Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of „pathological apoptosis”? *J Biol Chem* 2001; **276**: 10191–10198.
- [5] BOOTMAN MD, COLLINS TJ, PEPPIN CM, PROTHERO LS, MAC KENZIE L, DE SMET P, TRAVERS M, TOVEY SC, SEO JT, BERRIDGE MJ, CICCIO LINI F, LIPP P. Calcium signaling – an overview. *Cell Dev Biol* 2001; **12**: 3–10.
- [6] BRATOSIN D, ESTAQUIER J, AMEISEN JC, MONTREUIL J. Molecular and cellular mechanisms of erythrocyte programmed cell death: impact on blood transfusion. *Vox Sang* 2002; **83**: 307–310.
- [7] BRATOSIN D, ESTAQUIER J, SLOMIANY C, TISSIER JP, QUATANNENS B, BULAI T, MITROFAN L, MARINESCU A, TRANDABURU I, AMEISEN JC, MONTREUIL J. On the evolution of erythrocyte programmed cell death: apoptosis of *Rana esculenta* nucleated red blood cells involves cysteine protease activation and mitochondrion permeabilization. *Biochimie* 2004; **86**: 183–192.
- [8] BRATOSIN D, ESTAQUIER J, PETIT F, ARNOULT D, QUATANNENS B, TISSIER JP, SLOMIANNY C, SARTIAUX C, ALONSO C, HUART JJ, MONTREUIL J, AMEISEN JC. Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death Differ* 2001; **8**: 1143–1156.
- [9] CECATELLI S, TAMM C, SLEEPER E, ORRENIUS S. Neural stem cells and cell death. *Toxicology Letters* 2004; **149**: 59–66.
- [10] CHEN M, HE H, ZHAN S, KRAJEWSKI S, REED JC, GOTTLIEB RA. Bid is cleaved by calpain to an active fragment *in vitro* and during myocardial ischemia/reperfusion. *J Biol Chem* 2001; **276**: 30724–30728.
- [11] CORASH L, SPIELBERG S, BARTSOCAS C, BOXER L, STEINHERZ R, SHEETZ M, EGAN M, SCHLESSLEMAN J, SCHULMAN JD. Reduced chronic hemolysis during high-dose vitamin E administration in Mediterranean-type glucose-6-phosphate. *N Engl J Med* 1980; **303**: 416–420.
- [12] DALEKE D. Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J Lipid Res* 2003; **44**: 233–242.
- [13] DAUGAS E, CANDE C, KROEMER G. Erythrocytes: death of a mummy. *Cell Death Differ* 2001; **8**: 1131–1133.
- [14] DĄBROWSKI Z. Fiziologia krwi. Wybrane zagadnienia. Wydaw. Nauk. PWN 1998.
- [15] DELAUNAY J. Molecular Basis of Red Cell Membrane Disorders. *Acta Haematol* 2002; **108**: 210–218.
- [16] DURANTON C, HUBER SM, LANG F. Oxidation induces a Cl(–)-dependent cation conductance in human red blood cells. *J Physiol* 2002; **539**: 847–855.
- [17] EASTMAN A. Survival factors, intracellular signal transduction, and the activation of endonuclease in apoptosis. *Semin Cancer Biol* 1995; **6**: 45–52.
- [18] FADOK VA, VOELKER DR, CAMPBELL PA, COHEN JJ, BRATTON DL, HENSON PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992; **148**: 2207–2216.
- [19] FADOK VA, BRATTON DL, FRASCH SC, WARNER ML, HENSON PM. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* 1998; **5**: 551–562.
- [20] FADOK VA, BRATTON DL, HENSON PM. Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J Clin Invest* 2001; **108**: 957–962.
- [21] FARGE E, DEVEAUX PF. Shape changes of giant liposomes induced by an asymmetric transmembrane distribution of phospholipids. *Biophys J* 1992; **61**: 347–357.
- [22] GAO G, DOU QP. N-terminal cleavage of bax by calpain generates a potent proapoptotic 18-kDa fragment that promotes bcl-2-independent cytochrome C release and apoptotic cell death. *J Cell Biochem* 2000; **80**: 53–72.
- [23] GRĄDZKA I. Apoptoza: decyzja należy do mitochondrium. *Post Biochem* 2000; **46**: 2–16.
- [24] GREEN DR, REED JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; **281**: 1309–1312.
- [25] GREGOLI PA, BONDURANT MC. Function of caspases in regulating apoptosis caused by erythropoietin deprivation in erythroid progenitors. *J Cell Physiol* 1999; **178**: 133–143.
- [26] GRIMSLEY C, RAVICHANDRAN KS. Cues for apoptotic cell engulfment: eat me, don't-eat-me and come-get-me signals. *Trends Cell Biol* 2003; **13**: 648–656.
- [27] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Molekularne mechanizmy apoptozy indukowanej poprzez aktywację błonowych receptorów z nadrodziny TNF-R. *Post Biochem* 1998; **44**: 8–21.

- [28] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Apoptoza i nowotwory. *Post Biol Kom* 2000; **27** supl: 9–44.
- [29] GULBINS E, JEKLE A, FERLINZ K, GRASSME H, LANG F. Physiology of apoptosis. *Am J Physiol* 2000; **279**: 605–615.
- [30] HAIMOVITZ-FRIEDMAN A, KAN CC, EHLEITER D, PERSAUND RS, MCLONGHLIN M, FUKS Z, KOLESNICK RN. Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J Exp Med* 1994; **180**: 525–535.
- [31] HAJNOCZKY G, DAVIES E, MADESH M. Calcium signaling and apoptosis. *Biochem Biophys Res Comm* 2003; **304**: 445–454.
- [32] HOLCIK M. Do mature red blood cells die by apoptosis? *Trends Genet* 2002; **18**: 121.
- [33] HUBER SM, GAMPER N, LANG F. Chloride conductance and volume-regulatory nonselective cation conductance in human red blood cell ghosts. *Pflugers Arch* 2001; **441**: 551–558.
- [34] KILIAŃSKA ZM, MIŚKIEWICZ A. Kaspazy kręgowców; ich rola w przebiegu apoptozy. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 129–152.
- [35] KISCHKE FC, LAWRENCE DA, TINEL A, LEBLANC H, VIRMANI A, SCHOW P, GAZDAR A. Death receptor recruitment of endogenous caspase 10 and apoptosis initiation in the absence of caspase 8. *J Biol Chem* 2001; **276**: 466396–46646.
- [36] KLUCK RM, BOSSY-WETZEL E, GREEK DR, NEWMYER DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; **275**: 1132–1136.
- [37] KOLESNICK RN, HAIMOVITZ-FRIEDMAN A, FUKS Z. The sphingomyelin signal transduction pathway mediates apoptosis for tumor necrosis factor, Fas, and ionizing radiation – Review. *Biochem Cell Biol* 1994; **72**: 471–474.
- [38] KRAMMER PH. CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv Immunol* 1999; **71**: 163–210.
- [39] KUYPERS FA. Red cell membrane damage. *J Heart Valve Dis* 1998; **7**: 387–395.
- [40] KUYPERS FA, JONG DE. The role of phosphatidylserine in recognition and removal of erythrocytes. *Cell Mol Biol* 2004; **50**: 147–158.
- [41] LACHOWICZ A, RĘBAS E, ŻYLIŃSKA L, LACHOWICZ L. Różnorodne aspekty działania kinaz białkowych w apoptozie. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 111–122.
- [42] LACRONIQUE V, VARLET P, MAYEUX P, PORTENA, GISSEBRECHT S, KAHN A, LACOMBE c. Bcl-2 targeted overexpression into the erythroid lineage of transgenic mice delays but does not prevent the apoptosis of erythropoietin – deprived erythroid progenitors. *Blood* 1997; **90**: 3050–3056.
- [43] LANG F, BUSCH GL, RITTER M, VOLKL H, WALDEGGER S, GULBINS E, HAUSSINGER D. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 1998; **78**: 247–306.
- [44] LANG KS, DURANTON C, POEHLMANN H, MYSSINA S, BAUER C, LANG F, WIEDER T, HUBER SM. Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes. *Cell Death Differ* 2003; **10**: 249–256.
- [45] LANG KS, MYSSINA S, TANNEUR V, WIEDER T, HUBER SM, LANG F, DURANTON M. Inhibition of erythrocyte cation channels and apoptosis by ethylisopropylamiloride. *Arch Pharmacol* 2003; **367**: 391–396.
- [46] LANG KS, ROLL B, MYSSINA S, SCHITTENHELM M, SCHEEL-WALTER HG, KANZ L, FRITZ J, LANG F, HUBER SM, WIEDER T. Enhanced erythrocyte apoptosis in sickle cell anemia, thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Cell Physiol Biochem* 2002; **12**: 365–372.
- [47] LANKIEWICZ S, MARC LC, TRUC BN, KROHN AJ, POPPE M, COLE GM, SAIDO TC, PREHN JH. Activation of calpain I converts excitotoxic neuron death into a caspase-independent cell death. *J Biol Chem* 2000; **275**: 17064–17071.
- [48] LUBIN B, CHIU D, BASTACKY J, ROELOFSEN B, VAN DEENEN LL. Abnormalities in membrane phospholipids organization in sickled erythrocytes. *J Clin Invest* 1981; **67**: 1643–1649.
- [49] MACH-PASCUAL S, DARBELLAY R, PILOTTO PA, BERIS P. Investigation of microcytosis: a comprehensive approach. *Eur J Haematol* 1996; **57**: 54–61.
- [50] MANDAL D, MOITRA PK, SAHA S, BASU J. Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes. *FEBS Letters* 2002; **513**: 184–188.
- [51] MAY J, MEYER CG, GROSSTERLINDEN L, ADEMOWO OG, MOCKENHAUPT FP, OLUMESE PE, FALUSI AG, LUZZATTO L, BIENZLE U. Red cell glucose-6-phosphate dehydrogenase status and pyruvate kinase activity in a Nigerian population. *Trop Med Int Health* 2000; **5**: 119–123.
- [52] MCCONKEY DJ, ORRENIUS S. The role of calcium in the regulation of apoptosis. *J Leukocyte Biol* 1996; **59**: 775–783.

- [53] MICHEA L, FERGUSON DR, PETERS EM, ANDREWS PM, KIRBY MR, BURG MB. Cell cycle delay and apoptosis are induced by high salt and urea in renal medullary cells. *Am J Physiol* 2000; **278**: 209–218.
- [54] MYSSINA S, LANG PA, KEMPE DS, KAISER S, HUBER SM, WIEDER T, LANG F. Cl⁻ channel blockers NPPB and niflumic acid blunt Ca²⁺-induced erythrocyte “apoptosis”. *Cell Physiol Biochem* 2004; **14**: 241–248.
- [55] NAKAGAWA T, YUAN J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 2000; **150**: 887–894.
- [56] NICHOLSON DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptosis cell death. *Cell Death Differ* 1999; **6**: 1028–1042.
- [57] NOWAK JZ, ZAWILSKA JB. Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału. Wydaw. Nauk. PWN, Warszawa 2004.
- [58] OJEDA F, DIEHL HA, FOLCH H. Radiation induced membrane changes and programmed cell death: possible interrelationships. *Scanning Microsc* 1994; **8**: 645–651.
- [59] PERRIN BJ, HUTTENLOCHER A. Calpain. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; **34**: 722–725.
- [60] PUSHKAREVA M, OBEID LM, HANNUN YA. Ceramide: an endogenous regulator of apoptosis and growth suppression. *Immunol Today* 1995; **16**: 294–297.
- [61] SAKAMOTO MK, MIMA S, TAKAHUSHI KP, TANIMURA T. Apoptotic cell death of erythrocytes in *Xenopus* larvae exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol Pathol* 1997; **25**: 398–402.
- [62] SALVESEN GS, RENATUS M. Apoptosome: the seven-spoked death machine. *Dev Cell* 2002; **2**: 256–257.
- [63] SCHLEGEL RA, MCEVOY AL, WILLIAMSON P. Membrane phospholipids asymmetry and the adherence of loaded red blood cells. *Bibl Haematol* 1985; **51**: 150–156.
- [64] SCHMITZ I, KIRCHHOF S, KRAMMER PH. Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; **32**: 1123–1136.
- [65] SEKIZAWA A, SAMURA O, ZHEN DK, FALCO V, FARINA A, BIANCHI DW. Apoptosis in fetal nucleated erythrocytes circulating in maternal blood. *Prenat Diagn* 2000; **20**: 886–889.
- [66] SHIRAIISHI K, NAITO K, YOSHIDA K. Inhibition of calpain but not caspase protects the testis against injury after experimental testicular torsion of rat. *Biol Reprod* 2000; **63**: 1538–1548.
- [67] SIKORA E. Mechanizmy śmierci programowanej komórek (apoptozy). *Post Bioch* 1994; **40**: 150–160.
- [68] STENNICKIE HR, JURGENSMEIER JM, SHIN H, DEVERAUX Q, WOLF BB, YANG X, ZHOU Q. Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem* 1998; **273**: 27084–27090.
- [69] STENNICKIE HR, SALVESEN GS. Caspases – controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1477**: 299–306.
- [70] SULEJCZAK D. Apoptoza i metody jej identyfikacji. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 527–568.
- [71] WALI RK, JAFFE S, KUMAR N, SORGENTE N, KALRA VK. Increased adherence of oxidant treated human and bovine erythrocytes to cultured endothelial cells. *J Cell Physiol* 1987; **133**: 25–36.
- [72] WALSH M, LUTZ RJ, COTTER TG, O’CONNOR R. Erythrocyte survival is promoted by plasma and suppressed by a Bak-derived BH3 peptide that interacts with membrane-associated Bcl-X_L. *Blood* 2002; **99**: 3439–3448.
- [73] WANG KKW. Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci* 2000; **23**: 20–26.
- [74] WEIL M, JACOBSON MD, RAFF CM. Are caspases involved in the death of cells with a transcriptionally inactive nucleus? Soem and chicken erythrocytes. *J Cell Biol* 1998; **10**: 369–377.
- [75] YAMAMOTO AM, ZAITSU M, ISHII E, YATSUKI H, MIZUTANI S, EGUCHI M, IHARA K, OKAMURA T, HARA T, MIYAZAKI S. High frequency of fusion transcripts of exon 11 and exon 4/5 in AF-4 gene is observed in cord blood, as well as leukemic cells from infant leukemia patients with t(4;11)(q21;q23). *Leukemia* 1998; **12**: 1467–1472.
- [76] YANG XY, QU Q, YANG TY, CHAN WC, CHU JX, CHEN Z, NING AL, LIU FJ, LIN ZX, ZHOU YL. Treatment of the thalassemia syndrome with splenectomy. *Hemoglobin* 1988; **12**: 601–608.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 07.01.2005 r.

Przyjęto: 04.04.2005 r.

90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16,

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