

УДК 577.24

ПРОГРАММИРУЕМАЯ ГИБЕЛЬ КЛЕТОК: ИСТОРИЧЕСКИЕ ЗАМЕТКИ ИЗ РОССИИ

Мини-обзор

© 2020 Б. Животовский^{1,2}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет фундаментальной медицины, 119991 Москва, Россия

² Институт медицины окружающей среды, Каролинский институт,
Стокгольм, Швеция; электронная почта: boris.zhivotovsky@ki.se

Поступила в редакцию 12.07.2020

После доработки 12.07.2020

Принята к публикации 16.07.2020

Исследование механизмов гибели клеток – одна из наиболее быстро развивающихся областей современной биомедицины. Особый интерес к этой проблеме возник в 1972 г. после опубликования статьи Kerr, Wyllie и Currie, в которой апоптоз, один из типов гибели клеток, впервые был рассмотрен как базовый биологический феномен, регулирующий гомеостаз тканей. Несколько российских групп, занимавшихся изучением механизмов индуцируемой радиацией гибели клеток, обратили внимание на схожесть между этими двумя механизмами. По некоторым объективным причинам эти работы долгое время не были доступны мировой общественности. В настоящем введении предпринята попытка восстановить цепь событий минувших дней.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: апоптоз, радиация, митохондрии, нуклеазы, протеазы.

DOI: 10.31857/S0320972520100012



К.П. Хансон (1936–2005)

Моему учителю посвящается!

То, что верно для бактерий, верно и для слона.

Жак Моно

ВВЕДЕНИЕ

У этих исторических заметок две цели. Первая – никогда непроходящая память и благодар-

ность моему Учителю и другу профессору Кайдо Хансону. Он учил тому, как надо относиться к научному исследованию, как не надо бояться сложностей и как надо критически смотреть на

результаты. Мне трудно судить о том, полностью ли я выполнял его наставления, но абсолютно честно скажу, что очень старался. Вторая цель — рассказать молодому поколению исследователей историю развития такого важного медико-биологического направления, как программируемая гибель клеток, и о роли российских исследователей в его разработке. Дело в том, что не только до, но и сразу после появления в 1972 г. принципиально важной для данной области знаний статьи Kerr, Wyllie и Currie [1], несколько российских групп стали очень серьезно заниматься изучением механизмов индуцируемой радиацией гибели клеток. Основная часть полученных в этих исследованиях результатов была опубликована на русском языке и, по известным причинам, долгое время они не были доступны мировой общественности. Впоследствии некоторые из них были переведены, опубликованы в международных журналах и признаны зарубежными коллегами. Так, в статье, написанной одним из пионеров исследования апоптоза A. Wyllie, среди ведущих мировых лабораторий, работающих в области апоптоза, была отмечена наша лаборатория радиобиологии в Ленинграде [2]. Сейчас, почти 50 лет спустя, очень хочется восстановить цепь событий минувших дней. И так...

КАК ЭТО БЫЛО?

Известно, что все биологические организмы, как одноклеточные, так и многоклеточные, смертны. К сожалению, вскоре после создания Шлейденом и Шванном теории клетки и обнаружения феномена ее деления и дифференцировки [3, 4] многие исследователи сфокусировали свое внимание на изучении механизмов клеточной пролиферации и изменению ее фенотипа и практически полностью игнорировали интерес к выяснению того, как клетка элиминируется. Carl Vogt был первым, кто описал процесс гибели клеток в хорде и прилегающем хряще у метаморфических жаб [5]. Однако это был пример единичного исследования. Вскоре стало понятно, что в процессе развития и в течение жизни большое количество клеток, как у позвоночных, так и беспозвоночных, погибает. Более того, в некоторых случаях таким образом удаляются целые ткани или органы, выполнившие свои функции. Предпринимались редкие попытки классифицировать различные виды клеточной гибели. Так, еще в 1951 г. Glucksmann предложил в соответствии с биологическим назначением подразделять «естественную» клеточную гибель на морфогенетическую, гистогенетическую и

филогенетическую [6]. Saunders первым пришел к мысли о том, что гибель клеток в эмбриогенезе и морфогенезе может происходить в результате активации генетической программы, запускаемой особыми как внутритканевыми, так и внешними сигналами [7]. Однако первым, кто экспериментально подтвердил генетическую детерминированность гибели клеток и то, что этот процесс может быть не случайным, а регулируемым, был Richard Lockshin. На примере дегенерации межсегментальных мышц шелкопряда им было установлено наличие процесса «программируемой гибели клеток» и введен в практику этот термин [8]. В 1972 г. Kerr, Wyllie и Currie [1] опубликовали статью, которая привлекла пристальное внимание многих исследователей к данной проблеме. Авторы предложили рассматривать апоптоз, генетически запрограммированный тип гибели, как важное биологическое явление, регулирующее гомеостаз тканей. Как сказано выше, задолго до появления этой важной публикации и, соответственно, резко возросшему интересу к данному вопросу, в литературе имелись отдельные статьи на эту тему. Так, еще в 1950-е гг. особенное внимание уделялось изучению радиационно-индуцируемой гибели клеток. В радиобиологии было принято различать два типа клеточной гибели: репродуктивный и интерфазный. Первый — связывали с митотическим циклом и потерей клетки способности к делению. Второй, наоборот, происходил до вступления клетки в митоз и не связывался с циклом деления. Поэтому его называли «немитотической», «немедленной», «интерфазной» или «гибелью в отсутствие деления». Okada разделял три типа интерфазной гибели: 1) гибель некоторых видов неделящихся или ограниченно делящихся клеток (лимфоциты, тимоциты, энтероциты, клетки ростовой зоны хрусталика и т.д.) в первые часы после облучения в дозах от сотых долей до нескольких Грей; 2) гибель делящихся клеток в культуре при воздействии высоких доз излучения (десятки Грей); 3) гибель неделящихся или редко делящихся клеток (нервные и мышечные клетки, гепатоциты, кардиоциты и др.) при облучении сверхвысокими дозами (десятки и сотни Грей) [9]. В России эту проблему исследовали особенно детально. Так, в 1970-е гг. Хансон сформулировал гипотезу, согласно которой феномен радиационно-индуцируемой интерфазной гибели лимфоидных клеток впервые рассматривался как пример программируемой гибели клеток, апоптоза [10]. Данная гипотеза базировалась на собственных и накопленных в литературе экспериментальных данных и привела к дополнительному всплеску исследований этого феномена. Хансон рассмат-

ривал радиационную интерфазную гибель под принципиально новым углом зрения. Дело в том, что ионизирующее излучение не является единственным агентом, обладающим лимфолитическим действием. Аналогичные морфологические и молекулярные события разыгрываются в лимфоцитах в ответ на воздействия стероидных гормонов, алкилирующих агентов и некоторых других химических соединений. В пользу выдвинутой гипотезы свидетельствовали многие экспериментальные данные. Во-первых, было установлено, что независимо от характера начального воздействия, вызвавшего повреждение, реализуется единый механизм распада хроматина и наблюдается единая морфологическая картина гибели лимфоидных клеток. Во-вторых, было обнаружено существенное сходство молекулярных событий, происходящих при интерфазной гибели лимфоидных клеток и в процессе развертывания генетической программы дифференцировки, завершающейся, например, элиминацией клеточного ядра. В-третьих, было установлено, что ультрафиолетовое и гамма-излучения в дозах, вызывающих интерфазную гибель, способны включать программу эритродифференцировки лейкемических клеток. В-четвертых, было известно, что в процессе иммунодифференцировки и при стрессовых воздействиях определенная популяция лимфоцитов (клетки коркового слоя тимуса) погибает, выполняя свои физиологические функции в организме. Последнее рассматривалось как пример программируемой гибели клеток. Важно отметить, что эта гипотеза была впоследствии подтверждена очень детальной проверке многими лабораториями и признана научным сообществом [11, 12].

Исследования в области программируемой гибели клеток включают несколько периодов. Так, сначала была описана цитологическая картина физиологической гибели. Наиболее ранним морфологическим признаком в клетке была признана конденсация ядерного материала. Эти изменения детально описаны в статье Kerr et al. как характерные для апоптоза [1]. Накопленные результаты позволили предположить, что в основе гибели клеток лежат события, происходящие в ядре. Начался т.н. «ядерный период» в исследовании этого клеточного феномена. Действительно, в 1980 г. Wyllie опубликовал статью в «Nature», в которой показал, что описанная ранее типичная для апоптоза конденсация хроматина в обработанных глюкокортикоидами тимоцитах и опухолевых лимфоидных клетках тесно связана с межнуклеосомной фрагментацией хроматина и удалением нуклеосомных цепей, по-видимому, посредством активации

внутриклеточной, но не лизосомальной эндонуклеазы [13]. Следует подчеркнуть, что задолго до появления этой статьи была опубликована работа, описывающая *in vivo* деградацию хроматина облученных лимфоидных клеток с образованием регулярных фрагментов [14]. Эти данные были подтверждены несколькими научными группами [15, 16], и наличие межнуклеосомной фрагментации хроматина было признано одним из отличительных признаков апоптоза. Справедливости ради необходимо также отметить, что, используя достаточно простые биохимические методы еще до введения в научную литературу термина «апоптоз», было показано, что в результате воздействия гамма-облучения, гидрокортизона и дегранола в щитовидной железе крыс появляются низкомолекулярные продукты распада дезоксирибонуклеопротеинов [17], и определен белковый состав этих фрагментов эндонуклеолиза хроматина [18]. Впоследствии было установлено, что это и есть продукты межнуклеосомной деградации хроматина.

Дальнейшие эксперименты *in vitro* показали, что процесс распада хроматина требует участия нуклеазы, зависящей от наличия ионов кальция и магния. Многие лаборатории включились в ее активный поиск и установление механизмов ее активации [19]. В это же время появились первые данные о возможном участии протеаз в регуляции апоптоза. Так, было показано, что гомолог IL1 β -converting enzyme, белок Ced-3, необходим для активации программируемой гибели клеток нематоды *C. elegans* [20]. Впоследствии оказалось, что IL1 β -converting enzyme представляет собой один из белков большого семейства, названного каспазами [21]. Интересно отметить, что в это же время появилась работа Филипповича с сотр., в которой впервые было установлено, что ингибиторы протеаз способны существенно замедлить деградацию ядерной ДНК в тимоцитах, подвергнутых облучению либо действию дексаметазона [22]. Важно, что ни гистоны, ни белки ядерного матрикса тимоцитов не подвергались протеолизу после таких воздействий. Более того, впервые было показано, что деградация хроматина в этих условиях не была обусловлена активацией Ca/Mg-зависимой эндонуклеазы. Впоследствии работы из лабораторий Nagata и Wang продемонстрировали, что распад генетического материала действительно не связан с Ca/Mg-зависимой эндонуклеазой, но зависит от протеолитического расщепления каспазой-3 ингибитора эндонуклеазы (ICAD/DFF45), приводившего к активации каспазо-зависимой эндонуклеазы (CAD/DFF40) [23–26]. Впоследствии, в работах Nagata и Horvitz, было обнаружено, что ДНК апоптоти-

ческих клеток как человека, так и нематоды *C. elegans* может быть разрушена не только клеточно-автономно в умирающих клетках с помощью CAD/DFF40, но также с помощью ДНКазы II в лизосомах фагоцитов после поглощения апоптотических клеток [27, 28].

С накоплением данных об участии цитоплазматических протеаз в апоптозе сформировалось мнение, что главными в развитии апоптотической гибели являются цитоплазматические события, т.е. фокус исследований сместился с «ядра в цитоплазму». Действительно, участие каспаз в активации двух основных путей апоптоза, рецепторного и митохондриального, подтверждало данное предположение. Особенно это подтвердилось при выявлении белков-мишеней каспаз. Так, впервые Lazebnik et al., установили, что активная цитоплазматическая протеаза (позднее было показано, что это каспаза-3) способна расщеплять ядерный белок PARP, нарушая репарацию поврежденной ДНК и приводя к ее деградации [29]. Возвращаясь в историю, следует подчеркнуть, что задолго до обнаружения PARP как первого субстрата каспаз, Уманский с сотр. наблюдали снижение поли(ADP-рибоза) полимеразной активности через 2–3 час после облучения тимоцитов [30]. Более того, это снижение по времени совпадало с активацией межнуклеосомной деградации хроматина в облученных клетках [31]. Одновременно Филиппович с сотр. установили, что NAD-поли(ADP-рибоза) полимеразная система, не является пусковым механизмом в радиационно-индуцированной гибели тимоцитов, но регулирует радиационный ответ этих клеток на повреждение [32, 33]. Интересно, что этот эффект наиболее четко воспроизводился в радиочувствительных, нежели в радиоустойчивых тканях. Как отмечено выше, на «лидирующую» роль цитоплазмы в апоптозе указывал также факт расщепления каспазой-3 ингибитора каспазо-зависимой эндонуклеазы, что приводило к ее активации в ядре [23–26].

В середине 1990-х гг., благодаря серии работ X. Wang, было высказано предположение о том, что важные события в развитии апоптоза связаны с митохондриями [34, 35]. Прежде всего было показано, что, находясь в цитоплазме, митохондриальный белок, цитохром *c*, способствует сборке комплекса апоптосомы, что ведет к последовательной активации каспазы-9 и каспазы-3 [36]. Начался «митохондриальный период» в исследовании апоптоза. Услышав доклад Wang на Гордоновской конференции и прочитав его статью в журнале «Cell», я вспомнил давние радиобиологические исследования в которых было показано значение цитохрома *c* в развитии

радиационной гибели клеток. Как отмечено выше, намного раньше «эпохи» апоптоза гибель клеток достаточно интенсивно изучалась в радиационной биологии, поскольку именно гибель клетки является конечным результатом воздействия ионизирующего излучения. Исследования изменений в биоэнергетике клетки, вызванных радиацией, были одной из наиболее активно развивающихся областей радиобиологии в 1950-х и 1960-х гг. [37–40]. Изучение механизмов ранней массовой гибели клеток в радиочувствительных тканях в 1950-х гг. выявило подавление окислительного фосфорилирования в митохондриях тимуса и селезенки [38]. В одной из ранних работ мой учитель К. Хансон показал, что данное явление не наблюдалось в митохондриях, выделенных из радиорезистентных тканей [41]. Подавление окислительного фосфорилирования обнаруживалось через 30–60 мин после общего рентгеновского облучения крыс в относительно низких дозах облучения (50–100 сГр) [41, 42]. В радиочувствительных тканях подавление окислительного фосфорилирования сопровождалось образованием пикнотических ядер (апоптотических телец) [42]. Было установлено, что в митохондриях тимуса наблюдается замедление переноса электронов между цитохромами *b* и *c*, что можно объяснить снижением содержания цитохрома *c* после облучения [39]. В качестве одной из причин называлось ослабление связывания цитохрома *c* с внутренней мембраной митохондрий [43]. Интересно, что добавление экзогенного цитохрома *c* стимулировало скорость потребления кислорода митохондриями, выделенными из радиочувствительных, но не из радиорезистентных тканей облученных крыс [44, 45]. Потеря цитохрома *c* не была результатом его пассивного выхода из митохондрий, поскольку дополнительное промывание митохондриальной фракции изотоническим буфером не вызывало дальнейшего снижения скорости дыхания митохондрий [44]. Интересно, что облучение изолированных митохондрий *in vitro* не влияло на содержание цитохрома *c* [44]. Таким образом, было высказано предположение, что нарушение переноса электронов в дыхательной цепи митохондрий радиочувствительных тканей обусловлено регулируемым высвобождением цитохрома *c* из митохондрий и его появлением в цитозоле [40, 44]. Интересно отметить, что выход цитохрома *c* был заметно меньше, когда он находился в полностью восстановленном состоянии, а не частично окислен или подвержен альтернативным изменениям окисления-восстановления. В поддержку этих более ранних наблюдений спустя почти 30 лет появились исследования о механизмах высвобождения цитохро-

ма *c* из митохондрий в клетках, подвергшихся облучению [46], и о важности окислительно-восстановительного состояния цитохрома *c* в процессе активации каспазы в цитозольных экстрактах [47]. Впоследствии многие из этих данных были подтверждены с использованием более точных методов исследования. Так, было установлено что появление цитохрома *c* в цитозоле представляет собой двухступенчатый процесс. Поскольку цитохром *c* находится на внешней стороне внутренней мембраны митохондрий в комплексе с кардиолипином, это взаимодействие должно быть сначала разрушено для создания растворимого пула гемопротейна. Было установлено, что солюбилизация цитохрома *c* включает нарушение электростатических и/или гидрофобных связей, которые этот белок обычно поддерживает с кардиолипином [48]. Этому нарушению способствует селективное перекисное окисление кардиолипина [49]. Как только цитохром *c* солюбилизован, пермеабиллизация наружной митохондриальной мембраны с помощью Вах/Vak достаточна, чтобы позволить экструзию этого белка в экстрамитохондриальную среду [50]. Было объяснено, каким образом добавление экзогенного цитохрома *c* способно восстановить работу цепи переноса электронов [51]. Наконец, с помощью инвазивного подхода было показано, что микроинъекция цитохрома *c* во все исследованные типы клеток индуцировала в них апоптоз [52].

Интересно, что облучение вызывало лишь умеренное снижение уровня АТФ в клетках тимуса, селезенки и некоторых раковых клетках [45]. Это наблюдение показало, что потеря цитохрома *c* митохондриями не была существенной, чтобы заметно влиять на выработку АТФ митохондриями, или что эту потерю нельзя было компенсировать с помощью гликолиза. Значительно позже появились исследования, подтверждавшие идею, что высвобождение цитохрома *c* совместно с поддержанием жизненно необходимого внутриклеточного пула АТФ необходимы для реализации программы апоптоза [53, 54]. В работах Reed [55] и Schendel [56] обсуждались два возможных пути апоптоза, в которых принимает участие высвобождаемый из митохондрий цитохром *c*. Один из них включает активацию каскада каспаз путем взаимодействия высвобожденного гемопротейна с Araf-1 и про-каспазой-9 в цитозоле [36], тогда как другой связан с замедлением транспорта митохондриальных электронов, что ведет не только к нарушению продукции АТФ, но и генерации активных форм кислорода. Этот второй путь очень похож на тот, который описал Scaife много лет назад [45].

Дальнейшие исследования показали, что протекание не только апоптоза, но и других типов гибели не является работой лишь одного из внутриклеточных компартментов, а включает их тесное взаимодействие.

Важно отметить, что многие из полученных радиобиологами данных впоследствии были использованы и подтверждены при исследовании радиационного поражения в результате Чернобыльской аварии, особенно у людей, занятых очисткой территории. Так, в качестве одного из подходов биологической дозиметрии был использован анализ распада хроматина в клетках крови. В определенных диапазонах доз была получена прямая зависимость между дозой облучения и уровнем накопления фрагментов деградации хроматина.

К сожалению, многие из российских лабораторий, занимающихся проблемой гибели клеток, в силу различных обстоятельств прекратили свои исследования. Однако появились новые группы, которые рассматривали гибель клеток с более широких позиций. Так, В.П. Скулачев для описания программируемой гибели организма по аналогии с феноменом гибели клеток, апоптозом, предложил использовать термин «феноптоз» [57]. В отличие от случая «острого» феноптоза, примером которого автор рассматривал смерть горбуши сразу после окончания нереста, примером «мягкого», растянутого во времени феноптоза было предложено рассматривать процесс старения. Было постулировано, что программа старения закодирована в геноме в виде цепи летальных биохимических событий, инициированных в митохондриях активными формами кислорода (МАФК). Если так, то ингибитором этой программы мог бы служить антиоксидант, специфически направляемый в митохондрии. Эта интересная идея В.П. Скулачева нашла подтверждение во многих работах [58, 59]. Молекулярные механизмы таких видов программируемой гибели клеток, как апоптоз, некроптоз, аутофагия, ферроптоз и др., во многом расшифрованы. Недавно была предпринята попытка выяснения молекулярных механизмов, лежащих в основе феноптоза. Было установлено, что «умеренная» деполяризация внутренней мембраны митохондрий достаточна для полного ингибирования накопления МАФК, что является одним из важнейших компонентов регуляции старения и феноптоза [60]. Детальная расшифровка молекулярных механизмов феноптоза требует дополнительных исследований.

В последние 10 лет в России наблюдается ренессанс в изучении как фундаментальных аспектов программируемой гибели клеток, так и ее роли в патогенезе различных заболеваний,

прежде всего онкологических. Этому способствовало создание, благодаря Мегагранту Российского правительства, лаборатории на факультете фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова (Животовский Б.), активной работе лабораторий на биологическом факультете (Онищенко Г. Е., Скулачев В.П.), на физическом факультете (Пантелеев М.А.), лаборатории в Институте цитологии и генетики в Новосибирске (Лаврик И.Н.), лаборатории в Институте цитологии (Барлев Н.А., Piacentini M.) и Технологическом университете (Melino G.) в Санкт-Петербурге. Немаловажное значение имело создание новых зондов для исследования гибели клеток в лабораториях С.А. и К.А. Лукьяновых. Есть надежда, что такая тенденция будет продолжена, и российские исследователи вновь внесут свой вклад в развитие одной из ключевых медико-биологических проблем.

Важность того, что большое количество клеток в различных тканях самоуничтожается при нормальном развитии и при многочисленных патологиях не вызывает сомнений. Данный номер журнала «Биохимия», выходящий к 10-

летию создания Лаборатории исследования механизмов апоптоза в МГУ им. М.В. Ломоносова, посвящен обсуждению этого феномена с различных позиций. В этот выпуск вошли статьи и обзоры как молодых сотрудников Лаборатории, так и коллег из вышеперечисленных лабораторий и исследовательских центров. Очень надеюсь, что этот выпуск заинтересует читателей журнала «Биохимия», а также широкий круг исследователей в данной области знаний.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (19-15-00125). Работа лабораторий также поддерживается грантами РФФИ (18-29-09005), Шведского (190345) и Стокгольмского (181301) противораковых фондов.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая работа не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br. J. Cancer*, **26**, 239-257, doi: 10.1038/bjc.1972.33.
- Wyllie, A. H. (1988) Apoptosis, *ISI Atlas of Science: Immunology*, **1**, 192-196.
- Schleiden, M. J. (1838) Beiträge zur phyto-genesis, *Arch. Anat. Physiol. Wiss. Med.*, 137-176.
- Schwann, T. (1839) Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum der Thiere und Pflanzen, Sander, Berlin.
- Vogt, C. (1842) Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*), Solothurn: Jent und Gassmann.
- Glücksman, A. (1951) Cell deaths in normal vertebrate ontogeny, *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, **26**, 59-86, doi: 10.1111/j.1469-185x.1951.tb00774.x.
- Saunders, J. W. (1966) Death in embryonic systems, *Science*, **154**, 604-612, doi: 10.1126/science.154.3749.604.
- Lockshin, R. A., and Williams, C. M. (1965) Programmed cell death: cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the Pernyi silkworm, *J. Insect. Physiol.*, **11**, 123-133, doi: 10.1016/0022-1910(65)90099-5.
- Okada, S. (1970) Radiation biochemistry (Altman, K. L., Gerber, G. B., and Okada, Sh., eds.) Vol. 2, Tissue and Body Fluids, Academic Press, New York, London, pp. 247-307.
- Hanson, K. P. (1979) Radiation-induced cell death, *Radiobiology*, **19**, 814-820 (in Russian).
- Umansky, S. R. (1982) Genetic program of cell death: hypothesis and some applications, *Ach. Modern Biol.*, **93**, 139-148 (in Russian).
- Yamada, T., and Ohyama, H. (1988) Radiation-induced interphase death of rat thymocytes is internally programmed (apoptosis), *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, **53**, 65-75, doi: 10.1080/09553008814550431.
- Wyllie, A. H. (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation, *Nature*, **284**, 555-556, doi: 10.1038/284555a0.
- Cole, L. J., and Ellis, M. E. (1957) Radiation-induced changes in tissue nucleic acids; release of soluble deoxy-polynucleotides in the spleen, *Radiat. Res.*, **7**, 508-517, PMID: 13485392.
- Ermolaeva, N. V., and Vodolazskaya, N. A. (1970) Separation on phosphate cellulose of deoxyribonucleoproteins formed after irradiation and *in vitro* treatment with enzymes, *Biochemistry*, **35**, 641-647.
- Skalka, M., Matyášová, J., and Cejková, M. (1975) DNA in chromatin of irradiated lymphoid tissues degrades *in vivo* into regular fragments, *FEBS Lett.*, **72**, 271-274, doi: 10.1016/0014-5793(76)80984-2.
- Vodolazskaya, N. A., and Ermolaeva, N. V. (1974) Comparative analysis of the state of DNA and histone fraction in DNP and salt extracts of rat thymus after gamma radiation, as well as the introduction of degranol and hydrocortisone, *Radiobiology*, **14**, 651-655.
- Vodolazskaya, N. A., and Ermolaeva, N. V. (1971) Study of the decay products of deoxyribonucleoproteins induced by gamma irradiation, hydrocortisone and degranol in the thyroid gland of rats by the methods of separation into phosphate cellulose and viscometry, *Radiobiology*, **11**, 335-358.
- Zhivotovsky, B., Wade, D., Nicotera, P., and Orrenius, S. (1994) Role of nucleases in apoptosis, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **105**, 333-338, doi: 10.1159/000236778.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., and Horvitz, H. R. (1993) The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme, *Cell*, **75**, 641-652, doi: 10.1016/0092-8674(93)90485-9.
- Zhivotovsky, B., Burgess, D. H., Vanags, D. M., and Orrenius, S. (1997) Involvement of cellular proteolytic

- machinery in apoptosis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **230**, 481-488, doi: 10.1006/bbrc.1996.6016.
22. Soldatenko, V. A., Denisenko, M. F., Alferova, T. M., and Filippovich, I. V. (1991) Chromatin degradation during the death of thymic lymphocytes under the influence of radiation or dexamethasone: the need for a preliminary proteolysis stage, *Radiobiology*, **31**, 180-187.
 23. Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD, *Nature*, **391**, 43-50, doi: 10.1038/34112.
 24. Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S. (1998) Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis, *Nature*, **391**, 96-99, doi: 10.1038/34214.
 25. Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1997) DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis, *Cell*, **89**, 175-184, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80197-x.
 26. Liu, X., Li, P., Widlak, P., Zou, H., Luo, X., Garrard, W. T., and Wang, X. (1998) The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 8461-8466, doi: 10.1073/pnas.95.15.8461.
 27. Wu, Y. C., Stanfield, G. M., and Horvitz, H. R. (2000) NUC-1, a *Caenorhabditis elegans* DNase II homolog, functions in an intermediate step of DNA degradation during apoptosis, *Genes Dev.*, **14**, 536-548, PMID: 10716942.
 28. Kawane, K., Fukuyama, H., Kondoh, G., Takeda, J., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., and Nagata, S. (2001) Requirement of DNase II for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver, *Science*, **292**, 1546-1549, doi: 10.1126/science.292.5521.1546.
 29. Lazebnik, Y. A., Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Poirier, G. G., and Earnshaw, W. C. (1994) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE, *Nature*, **371**, 346-347, doi: 10.1038/371346a0.
 30. Zotova, R. N., Umansky, S. R., and Tokarskaya, V. I. (1983) Mechanism of chromatin degradation in thymocytes of irradiated rats. Part 6. Post-radiation changes in the activity of poly (ADP/ribose)-polymerase, *Radiobiology*, **23**, 152-156.
 31. Nelipovich, P. A., Nikonova, L. V., and Umansky, S. R. (1988) Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase as a possible reason for activation of Ca²⁺/Mg²⁺-dependent endonuclease in thymocytes of irradiated rats, *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, **53**, 749-765, doi: 10.1080/09553008814551111.
 32. Denisenko, M. F., Belovskaya, L. N., Soldatenkov, V. A., Smirnova, T. N., and Filippovich, I. V. (1987) Poly(ADP-ribose)ylation of proteins determines the pool of endogenous NAD and the radiosensitivity of thymic lymphocytes, *Radiobiology*, **27**, 737-742.
 33. Denisenko, M. F., Soldatenkov, V. A., Belovskaya, L. N., and Filippovich, I. V. (1989) Is the NAD-poly (ADP-ribose) polymerase system the trigger in radiation-induced death of mouse thymocytes? *Int. J. Radiat. Biol.*, **56**, 277-285, doi: 10.1080/09553008914551441.
 34. Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome *c*, *Cell*, **86**, 147-157, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80085-9.
 35. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., and Wang, X. (1997) Cytochrome *c* and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade, *Cell*, **91**, 479-489, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80434-1.
 36. Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X. (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome *c*-dependent activation of caspase-3, *Cell*, **90**, 405-413, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80501-2.
 37. Ashwell, G., and Hickman, J., (1952) Effects of X-irradiation upon the enzyme systems of the mouse spleen, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **80**, 407-413, doi: 10.3181/00379727-80-19639.
 38. Van Bekkum, D. W. (1957) The effect of X-rays on phosphorylation *in vivo*, *Biochim. Biophys. Acta*, **25**, 487-492, doi: 10.1016/0006-3002(57)90518-8.
 39. Scaife, J. F. (1964) The nature of the radiation-induced lesion of the electron transport chain of thymus mitochondria, *Can. J. Biochem.*, **42**, 431-434, doi: 10.1139/o64-050.
 40. Manoilo, S. E. (1968) *Primary Mechanisms of the Biological Action of Ionizing Radiation*, Medicine, Leningrad.
 41. Hanson, K. P., and Mytareva, L. V. (1967) Mechanisms of the effect of ionizing radiation on oxidative phosphorylation in animals, *Proc. Acad. Sci. (Estonia)*, **16**, 80-87.
 42. Van Bekkum, D. W., DeVries, M. J., and Klowen, H. M. (1964) Biochemical and morphological changes in lymphatic tissues following partial-body irradiation, *Int. J. Radiat. Biol.*, **8**, 395-401.
 43. Scaife, J. F., and Hill, B. (1963) Uncoupling of oxidative phosphorylation by ionizing radiation. II. The stability of mitochondrial lipids and cytochrome *c*, *Can. J. Biochem.*, **41**, 1223-1227, PMID: 13976477.
 44. Manoilo, S. E., and Hanson, K. P. (1964) The effect of exogenous cytochrome *c* on oxidative phosphorylation in mitochondria of tissues isolated from irradiated animals, *Vopr. Med. Chem.*, **10**, 410-416.
 45. Scaife, J. F. (1966) The effect of lethal doses of X-irradiation on the enzymatic activity of mitochondrial cytochrome *c*, *Can. J. Biochem.*, **44**, 433-439, PMID: 4289628.
 46. Kharbanda, S., Pandey, P., Schofield, L., Israels, S., Roncinske, R., Yoshida, K., Bharti, A., Yuan, Z. M., Saxena, S., Weichselbaum, R., Nalin, C., and Kufe, D. (1997) Role for Bcl-xL as an inhibitor of cytosolic cytochrome *c* accumulation in DNA damage-induced apoptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 6939-6942, doi: 10.1073/pnas.94.13.6939.
 47. Hampton, M. B., Zhivotovsky, B., Slater, A. F. G., Burgess, D. H., and Orrenius, S. (1998) Importance of the redox state of cytochrome *c* during caspase activation in cytosolic extracts, *Biochem. J.*, **329**, 95-99, doi: 10.1042/bj3290095.
 48. Ott, M., Robertson, J. D., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. (2002) Cytochrome *c* release from mitochondria proceeds by a two-step process, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 1259-1263, doi: 10.1073/pnas.241655498.
 49. Kagan, V. E., Tyurin, V. A., Jiang, J., Tyurina, Y. Y., Ritov, V. B., Amoscato, A. A., Osipov, A. N., Belikova, N. A., Kapralov, A. A., Kini, V., Vlasova, I. I., Zhao, Q., Zou, M., Di, P., Svistunenko, D. A., Kurnikov, I. V., and Borisenko, G. G. (2005) Cytochrome *c* acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors, *Nat. Chem. Biol.*, **1**, 223-232, doi: 10.1038/nchembio727.
 50. Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. (2005) Cardiolipin oxidation sets cytochrome *c* free, *Nat. Chem. Biol.*, **1**, 188-189, doi: 10.1038/nchembio0905-188.
 51. Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J. E., Bonzon, C., Sullivan, B. A., Green, D. R., and Newmeyer, D. D. (2005) BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly, *Mol. Cell*, **17**, 525-535, doi: 10.1016/j.molcel.2005.02.003.
 52. Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Brustugun, O. T., and Doskeland, S. O. (1998) Injected cytochrome *c* induces apoptosis, *Nature*, **391**, 449-450, doi: 10.1038/35060.

53. Eguchi, Y., Shimizu, S., and Tsujimoto, Y. (1997) Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis, *Cancer Res.*, **57**, 1835-1840, PMID: 10232605.
54. Leist, M., Single, B., Castoldi, A. F., Kühnle, S., and Nicotera, P. (1997) Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis, *J. Exp. Med.*, **185**, 1481-1486, doi: 10.1084/jem.185.8.1481.
55. Reed, J. (1997) Cytochrome *c*: can't live with it – can't live without it, *Cell*, **91**, 559-562, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80442-0.
56. Schendel, S. L., Montal, M., and Reed, J. C. (1998) Bcl-2 family proteins as ion-channels, *Cell Death Differ.*, **5**, 372-380, doi: 10.1038/sj.cdd.4400365.
57. Skulachev, V. P. (1997) Aging is a specific biological function rather than the result of a disorder in complex living systems: biochemical evidence in support of Weismann's hypothesis, *Biochemistry (Moscow)*, **62**, 1394-1399, PMID: 9467841.
58. Libertini, G. (2012) Classification of phenoptotic phenomena, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 707-715, doi: 10.1134/S0006297912070024.
59. Walker, R. F. (2017) On the causes and mechanisms of phenoptosis, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 1820-1841, doi: 10.1134/S0006297917120069.
60. Vyssokikh, M. Y., Holtze, S., Averina, O. A., Lyamzaev, K. G., Panteleeva, A. A., Marey, M. V., Zinovkin, R. A., Severin, F. F., Skulachev, M. V., Fasel, N., Hildebrandt, T. B., and Skulachev, V. P. (2020) Mild depolarization of the inner mitochondrial membrane is a crucial component of an anti-aging program. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 6491-6501, doi: 10.1073/pnas.1916414117.

PROGRAMMED CELL DEATH: HISTORICAL NOTES FROM RUSSIA

Mini-review

B. Zhivotovsky^{1,2}

¹ Faculty of Basic Medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

² Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden; E-mail: boris.zhivotovsky@ki.se

Received July 12, 2020

Revised July 12, 2020

Accepted July 16, 2020

The investigation of cell death mechanisms is one of the fastest growing areas of modern biomedicine. A particular interest in this research topic arose in 1972 after publication of an article by Kerr, Wyllie, and Currie, in which apoptosis, one of the types of cell death, was first considered as a basic biological phenomenon regulating tissue homeostasis. Several Russian groups involved in the investigation of the mechanisms of radiation-induced cell death have drawn attention to the similarity between these two mechanisms. Unfortunately, these studies have been for a long time inaccessible to the international scientific community. These introductory remarks attempt to restore the chain of events that have taken place during the past 50 years

Keywords: apoptosis, radiation, mitochondria, nucleases, proteases