

УДК 576.5

## ПРОБЛЕМА ОБРАТИМОСТИ АПОПТОТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

### Обзор

© 2020 И.И. Захаров, М.А. Савицкая, Г.Е. Онищенко\*

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,  
119991 Москва, Россия; электронная почта: galina22@mail.ru

Поступила в редакцию 10.07.2020

После доработки 23.07.2020

Принята к публикации 23.07.2020

Апоптоз – наиболее изученный вариант регулируемой клеточной гибели, который на протяжении долгого времени считался необратимым. В настоящее время накапливается все больше данных, свидетельствующих о том, что ключевые события апоптоза, такие как появление фосфатидилсерина во внешнем монослое плазматической мембраны, пермеабилзация внешней мембраны митохондрий, активация каспаз, повреждение ДНК и блеббинг цитоплазмы, не являются необратимыми, а также могут участвовать в процессах нормальной жизнедеятельности клетки, не связанных с осуществлением программы апоптоза. Анастаз – восстановление жизнеспособности клетки после индукции апоптоза – может происходить после устранения проапоптотических воздействий. Это явление способствует выживанию поврежденных нормальных или опухолевых клеток. В данном обзоре описаны процессы, характерные для апоптоза, однако не приводящие к гибели, – как в ходе нормальной жизнедеятельности клеток, так и при анастазе. Понимание механизмов и последствий обратимости апоптотических процессов, с одной стороны, может способствовать совершенствованию существующих методов терапии различных заболеваний, в том числе злокачественных новообразований, а с другой – открывает новые возможности для защиты клеточных элементов тканей и органов от гибели при лечении дегенеративных патологий.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** апоптоз, обратимость апоптоза, анастаз, активация каспаз, МОМР, экстернализация фосфатидилсерина, блеббинг.

**DOI:** 10.31857/S0320972520100036

### ВВЕДЕНИЕ

Апоптоз – это вариант регулируемой клеточной гибели [1], широко распространенный в процессе онтогенетического развития многоклеточного организма. Апоптоз представляет собой последовательные молекулярные, структурные и физиологические преобразования клеток, завершающиеся их фрагментацией и утратой жизнеспособности, т.е. гибелью. Этот тип клеточной гибели играет важную роль во многих физиологических процессах, включая эмбриогенез, поддержание клеточного гомеостаза,

дифференцировку и морфогенез тканей, в то время как его нарушения являются признаком многих патологий – от дегенеративных синдромов до опухолей и аутоиммунных заболеваний.

Последовательность процессов апоптоза, механизмы его индукции и регуляции исследуют на протяжении пятидесяти лет. Существует несколько путей инициации апоптотической гибели, включая рецептор-зависимый путь (TRAIL, TNF $\alpha$  и FAS), митохондриальный и ядерный пути и путь с участием стресса ЭПР [1, 2]. Сигнальные пути апоптоза многоступенчаты и сложны, но для апоптоза, инициация которого включает митохондриальный путь, можно выделить два ключевых этапа: пермеабилзация внешней мембраны митохондрий (МОМР) и активация каскада эффекторных каспаз. МОМР нарушает энергетическую функцию митохондрий; активация каскада эффекторных каспаз, в свою очередь, ведет к деградации белков клетки и повреждению генома посредством эндонуклеаз CAD и ENDOG. Разрывы ДНК активируют p53 и еще в большей степени поддерживают

Принятые сокращения: МОМР – mitochondrial outer membrane permeabilization; AIF – apoptosis-inducing factor; BID – BH3 interacting-domain death agonist; CAD – caspase-activated DNase; ENDOG – endonuclease G; TRAIL – TNF-related apoptosis-inducing ligand; TNF $\alpha$  – tumor necrosis factor  $\alpha$ ; FASLG – FAS-ligand; XIAP – X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis; BCL2 – B-cell lymphoma 2; BCL-XL – B-cell lymphoma extra large; SMAC – second mitochondria-derived activator of caspases; PARP – poly(ADP-ribose) polymerase; ЭПР – эндоплазматический ретикулум.

\* Адресат для корреспонденции.

апоптотические сигнальные пути. Деградация ДНК, конденсация хроматина, фрагментация ядра и цитоплазмы с образованием апоптотических телец завершают апоптотическую клеточную гибель. Фосфатидилсерин (ФС), экспонированный на внешней стороне плазматической мембраны, служит сигналом «eat me» и стимулирует фагоцитоз апоптотических телец.

Апоптоз — наиболее изученный вид клеточной гибели. Неослабевающий интерес исследователей к данному явлению вызван рядом причин. Во-первых, существует фундаментальная биологическая проблема понимания роли апоптоза в поддержании баланса между клеточной пролиферацией и гибелью в разных тканях и органах животных и человека на протяжении всего онтогенетического существования организма. Во-вторых, в настоящее время хорошо известно, что в основе большого числа заболеваний самой разной природы, от инфекционных до генетических, лежат нарушения нормального течения апоптоза. Отсюда следует еще одна причина интереса к апоптотической гибели — действие многих терапевтических средств основано на блокировке или стимуляции процессов апоптоза.

Поиск все новых и новых химиотерапевтических препаратов для лечения различных заболеваний вызывает необходимость детального исследования отдельных звеньев апоптоза и определения того, какое из этих звеньев ведет к необратимой гибели клетки, т. е. является точкой невозврата (*point of no return*). В целом, исторически апоптоз считался необратимым процессом. Сложно представить, каким образом могут быть предотвращены катастрофические последствия пермеабиллизации наружной мембраны митохондрий и активации эффекторных каспаз. Однако со временем стали накапливаться данные о том, что течение процессов апоптоза может быть приостановлено, и клетка способна восстанавливать свое исходное состояние [3–6]. Важная роль апоптотической гибели как в физиологических, так и в патологических процессах требует изучения обратимости отдельных апоптотических событий и апоптоза в целом.

Проблема обратимости апоптотических процессов, которой посвящен данный обзор, включает в себя несколько аспектов. Так, необходимо проанализировать, могут ли определенные составляющие апоптоза участвовать в событиях клеточной жизни, не связанных с гибелью: дифференцировке, в том числе терминальной, клеточном старении и развитии патологических состояний клеток. Исследования в этом направлении показали, что белки, традиционно считающиеся участниками апоптоза, могут быть вов-

лечены в процессы, с ним не связанные [7, 8]. Кроме того, появились данные о том, что структурно-функциональные изменения определенных клеточных компартментов и органелл, наблюдаемые при апоптозе, могут являться звеньями иных нелетальных процессов, например, терминальной дифференцировки. К таким процессам можно отнести: экспонирование фосфатидилсерина в наружный монослой плазматической мембраны, блеббинг плазматической мембраны, пермеабиллизация мембран митохондрий. Это говорит о необходимости четкого определения явления обратимости апоптоза в целом и отличия проявления такой обратимости от нелетальных функций отдельных апоптотических процессов и белков.

Тема обратимости апоптоза предоставляет широкие возможности для исследований, и ее актуальность сложно переоценить. С одной стороны, обратимость апоптоза клеток новообразований открывает новый ранее неизвестный путь развития рецидивов и устойчивости после противоопухолевой терапии, основанной на апоптотической клеточной гибели. Понимание механизмов и последствий выживания клеток после инициации апоптоза и прекращения проапоптотического воздействия необходимо для улучшения существующих методов терапии, ликвидации побочных эффектов и разработки новых способов лечения. С другой стороны, изучение путей восстановления жизнеспособности клеток открывает новые механизмы сохранения и защиты клеточных элементов тканей и органов от апоптотической гибели в рамках терапии дегенеративных заболеваний, в том числе таких, как нейродегенеративные патологии, инфаркты, инсульты и СПИД.

### ТЕРМИНЫ ДЛЯ ОПИСАНИЯ ОБРАТИМОСТИ АПОПТОТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

В последние годы появляется все больше и больше данных, свидетельствующих о возможности обратимости апоптоза. Одно из первых определений, связанных с обратимостью апоптоза, — это «прерванный апоптоз» (*apoptosis interruptus*) [3]. Данный термин описывает выживание кардиомиоцитов в условиях сердечной недостаточности, несмотря на проявление классических признаков апоптоза: пермеабиллизацию внешней мембраны митохондрий, выход цитохрома *c* в цитозоль и активацию каспазы-3. Важной особенностью *apoptosis interruptus* является сохранение целостности ядра апоптотических кардиомиоцитов и крайне низкий уровень

активности эндонуклеазы CAD. Предполагается, что выживанию кардиомиоцитов способствует повышенная экспрессия антиапоптотических факторов XIAP, BCL2 и BCL-XL [3].

Albeck et al. в 2008 г. описали состояние клетки, названное «частичная клеточная гибель» (*partial cell death*) [4]. В работе были использованы модифицированные клетки культуры HeLa и индукция апоптоза посредством лиганда TRAIL. Состояние частичной клеточной гибели связывают с активацией эффекторных каспаз, недостаточной для завершения апоптоза, но способной вызвать повреждение генома и протеома у выживших клеток. Согласно данным литературы, такое состояние может развиваться вследствие подавления МОМР повышенной экспрессией BCL2. В результате проапоптотический SMAC не попадает из митохондрий в цитозоль в высокой концентрации, и не происходит достаточного ингибирования XIAP. Все это приводит к постепенной, а не лавинообразной активации каспазы-3, частичному расщеплению ее мишеней и слабой, но продолжительной активации систем повреждения ДНК; апоптоз не завершается, и клетка не погибает. Авторы отмечают вероятные патологические последствия частичной клеточной гибели [4].

В 2012 г. Tang et al. [6] показали, что выживание клеток HeLa возможно после индукции апоптоза посредством инкубации с этанолом. В исследованных клетках после прекращения воздействия этанолом наблюдались ключевые признаки апоптоза — МОМР, активация каспазы-3, блеббинг цитоплазмы и разрывы нитей ДНК, однако апоптоз не завершился, и клетки восстанавливали свою морфологию и жизнеспособность. В этой работе был введен термин «анастаз» (англ. *anastasis*, от греч. ἀνάστασις — «воскрешение») — выживание клетки после инициации апоптоза. В последующих исследованиях были получены новые данные об этом процессе, выдвинуты гипотезы об этапах анастаза, разработаны новые методы его обнаружения, изучена возможность обратимости апоптоза *in vivo*. Анастаз — на данный момент самый распространенный термин, означающий выживание клетки после инициации апоптоза как на ранних, так и на поздних стадиях этого типа клеточной гибели.

Позднее появился термин «абортивный апоптоз» (*abortive apoptosis*), описывающий выживание клеток MCF10A после сублетального облучения, индукции МОМР и активации каспазы-3 [9].

В 2015 г. Ichim et al. [10] предложили термин «неудачный апоптоз» (*failed apoptosis*) — выживание клеток после инициации апоптоза воз-

действием лигандом TRAIL или сублетальными дозами ряда химических агентов. Так же как при частичной клеточной гибели, неудачный апоптоз, по мнению авторов, включает пермеабиллизацию наружной мембраны лишь у части митохондрий [4], сублетальную активность каспазы-3 и повреждение ДНК за счет действия CAD, завершающееся выживанием клеток. Такие клетки, выживающие после реализации неполной программы апоптоза, в конечном итоге отличаются от исходных клеток, проявляя генетическую нестабильность, т.е. качество, характеризующее признаки онкогенеза [10, 11]. В этих работах не упоминается ранее введенный термин «анастаз», но определения, данные авторами, синонимичны этому термину. Важно отметить, что «абортивный апоптоз» и «неудачный апоптоз», в отличие от анастаза, не предполагают возможность восстановления жизнеспособности на поздних стадиях апоптоза.

Учитывая растущую популярность термина «*anastasis*» в англоязычной научной литературе, мы предлагаем использовать перевод этого термина — «анастаз» — для описания явления выживания клетки после индукции именно апоптотической клеточной гибели независимо от стадии, на которой развиваются процессы восстановления жизнеспособности клеток.

Согласно данным литературы, анастаз *in vivo* возможен [12], однако его нужно отличать от неапоптотической активации апоптотических каспаз. Также важно дифференцировать понятие анастаза от обратимости неапоптотических типов клеточной гибели, которая в последнее время также пробуждает большой исследовательский интерес [13, 14], однако до сих пор не получила четкого определения и обозначения.

## АПОПТОТИЧЕСКИЕ СОБЫТИЯ В НЕАПОПТОТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

Апоптоз представляет собой многоступенчатый процесс регулируемой гибели клеток, при котором различные события, связанные с утратой жизнеспособности, могут происходить как на морфологическом, так и на молекулярном уровне, последовательно или одновременно. Многие из этих событий традиционно рассматриваются как характерные признаки апоптоза и используются в качестве критериев для отнесения исследуемого типа клеточной гибели к апоптотическому. Примером могут служить появление фосфатидилсерина в наружном монослое плазматической мембраны, блеббинг, активация каспаз, пермеабиллизация наружной митохондриальной мембраны. Тем не менее суще-

ствуется целый ряд ситуаций, при которых эти признаки не сопровождаются дальнейшей апоптотической гибелью клетки, либо и вовсе встречаются в состояниях и процессах, не связанных с апоптозом и клеточной гибелью в целом. Так, показано, что ФС может переходить в наружный монослой плазматической мембраны и в ходе неапоптотических форм гибели клеток, например, некроптоза (программируемого некроза) [15]. Сходное явление характеризует также другие процессы, не связанные с апоптозом, такие как активация тромбоцитов [16], реакция клеток на гипоксию [17], злокачественная трансформация [18], дифференцировка, слияние клеток с формированием симпласта [19], миграция клеток [20]. ФС может присутствовать на поверхности некоторых нормальных клеток и постклеточных структур, в частности, форменных элементов крови — эритроцитов и тромбоцитов, где он выступает в качестве кофактора превращения протромбина в тромбин протромбиназным комплексом при активации системы свертывания крови.

Неапоптотический блеббинг часто связан с процессами клеточной подвижности [21], также встречается при цитокинезе в митозе, миграции, созревании и активации клеток иммунной системы, распластывании клеток на субстрате, при защитных реакциях на стресс, а также при пассировании культивируемых клеток с помощью трипсина [21, 22]. Примечательно, что неапоптотический блеббинг может сопровождать вирусные инфекции [21].

Каспазы, в том числе апоптотические, могут участвовать в воспалении, поддержании гомеостаза В-лимфоцитов, дифференцировке тканей, регенерации и развитии нейронов, образовании опухолей, старении, аутофагии, поддержании стабильности генома, а также в неапоптотических типах регулируемой клеточной гибели — пироптозе и некроптозе [7].

Остается открытым вопрос, каким образом активация апоптотических каспаз не всегда приводит к гибели клеток. Возможно, это достигается с помощью низкого уровня активности каспаз, недостаточного для индукции регулируемой гибели [23], либо благодаря ограничению их активности в пределах отдельных внутриклеточных компартментов или расщепления субстратов, не связанных с гибелью [8].

### ОБРАТИМОСТЬ АПОПТОТИЧЕСКИХ СОБЫТИЙ

Как уже упоминалось, события, традиционно считающиеся характерными признаками

апоптоза, участвуют в нормальных физиологических процессах, таких как дифференцировка или локомоция клеток, без последующей клеточной гибели. Немаловажный интерес представляют ситуации, при которых такие события происходят вследствие индукции апоптоза, но тем не менее, гибель не наступает, а клетка восстанавливает свою жизнеспособность посредством анастаза. С каждым годом количество данных, описывающих, каким образом апоптотические процессы могут быть остановлены или обращены вспять для обеспечения выживания клетки, быстро растет. Понимание обратимости отдельных апоптотических событий позволит создать полную картину механизмов анастаза.

**Восстановление после пермеабиллизации внешней мембраны митохондрий.** Митохондрии являются для клетки жизненно важным биоэнергетическим источником, а также играют центральную роль в процессе апоптоза. По мнению многих исследователей, пермеабиллизация внешней мембраны митохондрий считалась апоптотической точкой невозврата (*point of no return*), после прохождения которой выживание клетки невозможно [24]. Этот процесс приводит к нарушению энергетических функций митохондрий, выходу цитохрома *c* в цитозоль с последующей активацией каскада эффекторных каспаз и повреждению генома [10]. Однако, несмотря на такие катастрофические последствия, клетка способна восстановить нормальную жизнедеятельность после МОМР, что подтверждают недавние исследования.

Исторически МОМР считалась событием, происходящим по принципу «все или ничего». Однако ряд научных работ показал, что это не так: часть митохондрий могут сохранять целостность своей внешней мембраны на протяжении процесса апоптоза. Такая пермеабиллизация внешней мембраны только у части митохондрий возможна при инициации апоптоза под действием множества стимулов: индуктора апоптоза ВНЗ-миметика АВТ-737, который является аналогом проапоптотических белков ВНЗ и нейтрализует функции антиапоптотического белка BCL2 [10], лигандов клеточной гибели TRAIL [4], FASLG [25] и TNF $\alpha$  [26], желчной кислоты [25], протеасомного ингибитора MG132 [10], этопозида и паклитаксела [27], гиперэкспрессии BID [10], стауроспорина и ультрафиолетового излучения [26]. На данный момент в англоязычной литературе введены следующие термины, описывающие разную степень МОМР в клетке: *widespread MOMP* [27] — пермеабиллизация внешней мембраны большинства митохондрий клетки; *incomplete MOMP* [26], *minority MOMP* [10] и *limited MOMP* [27] — пер-

меабилитация внешней мембраны только некоторых митохондрий клетки. Если при индукции апоптоза происходит пермеабилитация наружной мембраны митохондрий, локализацию цитохрома *c* в клетке используют для оценки МОМР. Отличия между нарушением проницаемости внешней мембраны большинства митохондрий (wMOMР) и лишь части митохондрий (iMOMР) можно выявить, определив количество цитохрома *c* в цитозоле с помощью конфокальной микроскопии [27] — чем более диффузно окрашена цитоплазма, тем больше цитохрома *c* покинуло митохондрии, и, следовательно, тем больше митохондрий пермеабилитовано. На данный момент неизвестны конкретные механизмы, позволяющие части митохондрий сохранить целостность внешней мембраны, однако вероятным объяснением является протекторное влияние повышенной экспрессии антиапоптотических белков семейства BCL2 [25, 26].

Как после iMOMР, так и после wMOMР клетка способна восстановить свою жизнеспособность. Клетки HeLa и MDA-MB-231 могут возвращаться к нормальной жизнедеятельности после инкубации с этопозидом (100 мкМ) и паклитакселом (200 нМ) соответственно в течение 24 ч. При этом происходит пермеабилитация внешней мембраны большинства митохондрий (wMOMР), что было выявлено с помощью конфокальной микроскопии клеток, экспрессирующих Cyt-*c*-GFP. После снятия апоптотического воздействия лишь малая часть клеток, претерпевших wMOMР (2–5%), выживает и пролиферирует, а цитохром *c* в таких клетках снова локализуется в митохондриях [27]. При iMOMР и wMOMР часть митохондрий сохраняют свою структурную целостность и продолжают поставлять энергию, необходимую для восстановления клетки. В поздней стадии анастаза фрагментированные митохондрии способны сливаться и восстанавливать свою нормальную морфологию [6, 12]. Однако для успешного протекания анастаза клетке необходимо также ликвидировать последствия МОМР: ингибировать цитозольный цитохром *c*, устранить проапоптотические факторы и удалить поврежденные митохондрии.

В результате секвенирования РНК анастатических клеток культуры первичных гепатоцитов мыши было обнаружено значительное увеличение экспрессии белков аутофагии ATG12 и SQSTM1 [28]. Возможно, аутофагия участвует в ликвидации поврежденных митохондрий и цитозольного цитохрома *c* в анастатических клетках. Известно, что ATG12 и SQSTM1 отвечают за митофагию и регуляцию гомеостаза митохондрий [29], а увеличение экспрессии ATG12 спо-

собствует быстрой деградации цитохрома *c* в цитозоле при отсутствии активации каскада эффекторных каспаз [30]. В течение анастаза в первичных гепатоцитах мыши также обнаружено увеличение экспрессии белков теплового шока HSPB1, DNAJB1, HSPA1A и HSP90AA1 (человеческие гомологи — HSP27, HSP40, HSP70 и HSP90 соответственно) [28]. Шапероны HSP27 и HSP70 способны предотвращать выход цитохрома *c* из митохондрий [29]. Также известно, что HSP40 и HSP70 подавляют активацию проапоптотического белка BID каспазой 8 и транслокацию проапоптотического BAX в наружную мембрану митохондрий, а HSP27 подавляет митохондриальную транслокацию tBID [29]. Далее показано, что повышенная экспрессия глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) позволяет клеткам HeLa восстановить целостность внешней мембраны митохондрий, сохранить жизнеспособность и пролиферировать после индукции апоптоза актиномицином D в присутствии каспазного ингибитора [30]. Такое антиапоптотическое воздействие GAPDH наблюдается только в отсутствие активированных каспаз, однако можно предположить, что GAPDH играет роль в ликвидации МОМР в процессе анастаза. Все вышеперечисленные факторы могут являться потенциальными участниками механизмов анастаза, обеспечивающими удаление поврежденных митохондрий и деградацию цитохрома *c* в цитозоле, а также блокирующими реализацию митохондриального механизма апоптоза. Кроме того, важно отметить, что некоторые типы клеток, например, нейроны и кардиомиоциты, могут сохранять жизнеспособность после микроинъекции цитохрома *c* в цитоплазму [31]. Это позволяет предположить, что существуют механизмы деградации цитохрома *c* без активации апоптотического процесса.

Восстановление клеток после МОМР возможно и *in vivo*: при сердечной недостаточности многие кардиомиоциты претерпевают выход цитохрома *c* и активацию каспазы-3, однако в этих клетках не выявлено конденсации хроматина, блеббинга и фрагментации цитоплазмы, как и других признаков позднего апоптоза [3].

**Остановка каскада эффекторных каспаз.** Каскад эффекторных каспаз считается центральным событием апоптотической гибели, процессом, к которому приводит большинство путей инициации апоптоза. Активация эффекторных каспаз долгое время считалась необратимой, так как они поддерживают апоптоз через положительные обратные связи [4].

Однако в настоящее время существуют данные, подтверждающие возможность анастаза

даже после активации каскада эффекторных каспаз. Так, прижизненные наблюдения показали, что в клетках HeLa, экспрессирующих биосенсор к каспазе-3, происходит активация каспазы-3 после индукции клеточной гибели путем инкубации с этанолом [6, 12]. При этом такие клетки восстанавливали нормальную морфологию и функциональное состояние после удаления этанола из среды культивирования.

Анастаз после активации каспаз был обнаружен не только *in vitro*, но и *in vivo*. Выявление анастаза у лабораторных животных — технически сложная задача, так как анастатические клетки могут быть морфологически неотличимы от окружающих нормальных клеток. Tang et al. разработали биосенсор к эффекторным каспазам (*in vivo* CaspaseTracker) для *Drosophila*, состоящий из двух компонентов [12]. Активация каскада эффекторных каспаз в клетках с этим биосенсором вызывает временную экспрессию первого компонента — красного флуоресцентного белка. Второй компонент CaspaseTracker представляет собой зеленый флуоресцентный ядерный маркер (nucGFP), который постоянно экспрессируется после временной активации каскада каспаз в анастатических клетках и их потомках [12]. Также разработан биосенсор CasExpress, постоянно экспрессирующий nucGFP после временной активации каспазы-3 в клетках и их потомках, аналогичный по своему действию второму компоненту CaspaseTracker [32]. Исследования *Drosophila melanogaster* с биосенсором CaspaseTracker продемонстрировали, что после краткосрочного стрессового воздействия на животных (переохлаждение, голодание) происходит экспрессия зеленого и красного флуоресцентных белков в результате временной активации каспазы-3 в различных тканях, включая яичники [12, 33]. Нужно отметить, что биосенсоры были активированы как во время эмбриогенеза дрозофилы, так и во взрослом организме в различных тканях и органах, что может свидетельствовать об участии временной активации каскада каспаз в процессе развития насекомого [12, 32, 33].

Таким образом, можно сделать вывод, что активация эффекторных каспаз не является точкой невозврата. Одним из объяснений такой обратимости апоптотических событий может быть предположение о том, что неполная МОМР (iМОМР или wМОМР) вызывает ограниченный уровень активации каспаз 9, 7 и 3, которого недостаточно для полномасштабного осуществления гибели клетки, и жизнеспособность такой клетки может восстанавливаться [10]. Однако даже в этом случае клетке необходимо избавиться

от активированных каспаз, локализованных в цитозоле. Конкретный механизм ликвидации каспаз неизвестен, как и неизвестно, насколько одинаковы механизмы выживания при анастазе и сохранения жизнеспособности при физиологической неапоптотической активности каспаз. Среди предполагаемых путей можно отметить группу белков теплового шока. HSP27 связывается с прокаспазой 3 и препятствует ее активации. HSP27, HSP70 и HSP90 могут подавлять формирование апоптосомы и активацию каспазы 9 [29]. Усиление экспрессии MDM2, убиквитинлигазы, отправляющей p53 на протеасомную деградацию [34], характерно для анастатических клеток. В результате снижается экспрессия проапоптотического белка BAX. Также MDM2 способен активировать антиапоптотический белок XIAP [35], что приводит к ингибированию инициаторных и эффекторных каспаз [36]. В дальнейшем предстоит детально исследовать, какие из этих процессов характеризуют анастаз, а какие присущи нелетальным функциям апоптотических процессов.

**Репарация поврежденной ДНК.** Важным признаком поздних стадий апоптоза является разрушение ДНК. За этот процесс ответственны апоптотические нуклеазы, такие как AIF, CAD и ENDOG; эффекторные каспазы также расщепляют белок PARP, участвующий в репарации ДНК.

В последние годы стало известно, что анастаз может происходить даже на поздних стадиях клеточной гибели. Первичные гепатоциты мыши и фибробласты NIH3T3 после инкубации с этанолом способны к анастазу, несмотря на выход AIF и ENDOG из митохондрий и расщепление PARP [6]. В большинстве анастатических клеток наблюдаются разрывы ДНК и хромосомные aberrации, могут появляться микроядра, некоторые клетки претерпевают опухолевую трансформацию [6, 10, 28]. В клетках HeLa и U2OS наблюдается увеличение числа разрывов ДНК после инкубации с индуктором апоптоза ВНЗ-миметиком АВТ-737 [10]. Авторы данного исследования сделали вывод о том, что клетки с повреждениями ДНК являются клетками, восстановившими жизнеспособность после реализации определенных, но не всех событий апоптоза. Это может означать, что такие клетки прошли анастаз.

Если анастаз осуществляется даже на таких поздних стадиях клеточной гибели, то можно предположить, что существуют пути ингибирования разрушения ДНК, характерного для позднего апоптоза. Конкретные механизмы этих путей неизвестны, однако многие анастатические факторы могут играть роль в процес-

сах предотвращения повреждения ДНК. Одним таким фактором является убиквитинлигаза MDM2: она вызывает деградацию опухолевого супрессора p53 и, тем самым, подавляет ассоциированное с p53 развитие митохондриального механизма апоптоза и соответствующее повреждение ДНК. Показано, что в анастатических клетках уровень экспрессии MDM2 повышается [28]. Также известно, что ингибитор нуклеазы CAD (ICAD) и белок репарации ДНК PARP играют роль в процессе анастаза: экспрессия ICAD и PARP возвращается к исходным показателям после удаления апоптотического стимула [6].

Далее показано, что через 6 ч после снятия проапоптотического воздействия в первичных гепатоцитах мыши наблюдается снижение экспрессии генов, кодирующих различные гистоны (*Hist1h2ah*, *Hist1h2ad*, *Hist1h2ai* и др.) [28]. По мнению авторов, такое снижение экспрессии генов гистонов в течение анастаза может быть связано с ответом клетки на повреждение генома: недавнее исследование показало, что деградация гистонов может сопутствовать и способствовать репарации ДНК [37].

Белок теплового шока HSP70 также может играть роль в снижении повреждений ДНК в течение анастаза. HSP70 способен взаимодействовать с AIF и ENDOG и, тем самым, препятствовать деградации ДНК [29], уровень экспрессии HSP70 повышен в течение анастаза [28]. Также известно, что в ходе анастаза возрастает экспрессия генов *Big1*, *Cdkn1a* и *Trp53inp1*, участвующих в остановке клеточного цикла, это может способствовать репарации ДНК [28]. Аутофагия также может обеспечивать удаление не только поврежденных митохондрий, но и поврежденных хромосом и микроядер в анастатических клетках: экспрессия белков аутофагии ATG12 и SQSTM1 в первичных гепатоцитах мыши повышена через 3 ч и 6 ч после апоптоза [28]. В настоящее время остается неясным, какие именно типы аутофагии (базовая, митофагия, нуклеофагия) могут участвовать в процессе анастаза.

Несмотря на работу систем репарации в течение анастаза, клетка не может восстановить все повреждения ДНК. В подавляющем большинстве изученных случаев в анастатических клетках наблюдается накопление разрывов ДНК, образование микроядер и другие признаки генетических нарушений [5, 6, 9–11, 27]. Более того, в результате накопления повреждений ДНК опухолевые клетки могут становиться более злокачественными, а нормальные клетки — претерпевать опухолевую трансформацию [6, 9, 10, 27]. Последствия анастаза, связанные с этим,

подробно описаны ниже в соответствующем разделе.

**Ликвидация экстернализованного фосфатидилсерина.** Анастаз после экстернализации ФС обнаружен *in vitro* в клетках карциномы молочной железы мыши MOD [38], первичных кардиомиоцитах мыши и клетках культуры HL1 [6, 12]. Восстановление клеток после экстернализации ФС также возможно *in vivo*. Фосфатидилсерин, меченный аннексином V, при индукции апоптоза ишемическим стрессом в кардиомиоцитах мыши и кролика первоначально обнаруживался на поверхности плазматической мембраны, позднее — внутри выживших клеток в составе везикул. В конечном итоге ФС не регистрировался на поверхности кардиомиоцитов, подвергавшихся ишемии [39]. Эти результаты свидетельствуют о возвращении ФС во внутренний монослой плазматической мембраны и восстановлении асимметричности распределения фосфолипидов, что говорит об обратимости ранних этапов апоптоза.

Известно, что клетки, выжившие после временной индукции апоптоза, сохраняют ФС, экспонированный во внешнем монослое, только в течение нескольких часов [6, 12]. Предполагается, что анастазирующим клеткам необходимо избавиться от экстернализованного фосфатидилсерина, чтобы избежать фагоцитоза. Вероятно, ликвидация фосфатидилсерина из внешнего монослоя плазматической мембраны является важной составляющей анастаза, хотя молекулярный механизм этого процесса остается неизвестным.

**Слияние апоптотических телец.** Финальной стадией апоптоза является распад клетки на апоптотические тельца с их последующим фагоцитозом. Однако есть данные, свидетельствующие о том, что анастаз может протекать даже после фрагментации клетки. Прижизненные наблюдения продемонстрировали, что после временной инкубации культуры HeLa со стауропорином апоптотические тельца способны сливаться и образовывать клетки с морфологией, которая выглядит вполне нормальной [29]. Фрагменты клеток легочной карциномы H446 также могут сливаться после временной индукции апоптоза воздействием этанола [12]. Анастатические клетки имели повышенное число микроядер и хромосомных aberrаций [6, 28]. Это свидетельствует о неспособности апоптотических телец с поврежденными хромосомами правильно соединяться с образованием одноядерной клетки, что, в свою очередь, может усиливать анеуплоидию опухолевых клеток [6, 12].

В настоящее время механизмы слияния апоптотических телец и последующего восста-

новления нормальной морфологии и функций клетки остаются неизвестными. Как уже упоминалось, недавние исследования демонстрируют важную роль экспонирования фосфатидилсерина на внешнюю сторону плазматической мембраны в процессах слияния клеток, таких как образование миотубул, слияние поврежденных аксонов и слияние макрофагов [29]. Можно предположить, что апоптотические тельца с экстернализованным ФС используют похожие механизмы для слияния и восстановления клетки.

### ЭТАПЫ АНАСТАЗА

Анастаз не является мгновенным событием. От удаления проапоптотического стимула до восстановления нормального функционирования и морфологии клетки проходит период времени, который возможно поделить на отдельные этапы. В настоящее время материалов, затрагивающих проблему последовательности процессов анастаза, крайне мало. Sun et al. в 2017 г. [40] провели исследование транскриптома клеток HeLa в различные сроки после снятия проапоптотического воздействия. Они выявили две фазы анастаза: раннюю пролиферативную и позднюю миграционную фазы, отличающиеся группами экспрессируемых генов [40].

Для индукции апоптоза клетки HeLa инкубировали с 5%-ным этанолом в течение 3 ч. В культуре выявляли клетки с блеббингом, сжатием цитоплазмы и выходом цитохрома *c* в цитозоль. Окрашивание флуоресцентным зондом к каспазе-3 продемонстрировало ее активацию ~ в 75% клеток. После замены культуральной среды с этанолом на среду без этанола клетки восстановили нормальную уплощенную морфологию. Было произведено секвенирование РНК необработанных клеток, клеток после 3 ч инкубации с этанолом, а также клеток через 1, 2, 3, 4, 8 и 12 ч после прекращения инкубации с этанолом. Восстановление нормальной уплощенной морфологии произошло уже через ~ 4 ч. Для проверки результатов анализа транскриптома была использована ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией. Способность к анастазу и экспрессия генов также были исследованы в клетках HeLa после воздействия стауроспорина и после комбинированного воздействия TNF $\alpha$  и циклогексимида, а также в клетках глиомы человека H4 после инкубации с этанолом. Необходимо отметить, что лишь 5,6% клеток восстановили нормальную жизнедеятельность после инкубации с TNF $\alpha$  и циклогексимидом, что мо-

жет быть связано с высокой аффинностью TNF $\alpha$  к его рецептору [40].

Анализ данных секвенирования РНК методом главных компонент выявил различия в двух группах анастазирующих клеток: клеток через 1–4 ч после снятия проапоптотического воздействия (ранняя фаза) и клеток через 8 и 12 ч (поздняя фаза). Эти две группы значительно отличались друг от друга и от исходных клеток, не подвергавшихся проапоптотическим воздействиям. Для сравнения транскрипции генов в ранней и поздней фазе анастаза была использована программа AutoSOME, анализ Gene Ontology (GO) и анализ сигнальных путей на основе Киотской энциклопедии генов и геномов (KEGG). Обнаружено, что в ранней фазе анастаза усиливается экспрессия 1172 генов, включая следующие группы генов (по GO): «регуляция клеточного цикла», «регуляция пролиферации», «регуляция клеточной гибели», «ответ на клеточный стресс», «модификация хроматина» и «регуляция транскрипции». Экспрессия генов последней группы («регуляция транскрипции») была значительно увеличена [40]. Кратковременная инкубация клеток HeLa и U2OS с сублетальной дозой ингибитора транскрипции актиномина D сразу после удаления проапоптотического стимула значительно снижает число восстановившихся клеток [6]. В совокупности эти данные подтверждают ключевую роль транскрипции новых мРНК в анастазе. Также в ранней фазе анастаза повышена активность сигнальных путей, связанных с регуляцией клеточного цикла и выживанием клетки, таких как TGF $\beta$ , MAPK и Wnt (по KEGG). Данные об усилении экспрессии генов регуляции клеточного цикла и активации пролиферации подтверждают тот факт, что в течение ~11 ч после удаления проапоптотического стимула число клеток HeLa возрастало, а затем темпы роста популяции уменьшились [40].

В поздней фазе анастаза усиливается экспрессия 759 генов из следующих групп (по GO): «процессинг некодирующих РНК», «биогенез рибосом» и «экспрессия генов»; также повышена активность посттранскрипционных процессов (транспорт РНК, процессинг белков и эндоцитоз), формирования фокальных контактов и регуляции актинового цитоскелета (по KEGG). Усиление экспрессии генов регуляции адгезии и актинового цитоскелета могут свидетельствовать о том, что клетки через 8–12 ч после начала восстановления способны к миграции. Данная гипотеза была подтверждена моделированием раны *in vitro*: рана в монослое клеток в поздней фазе анастаза закрылась быстрее, чем рана в монослое контрольных клеток. Также большинство анаста-



зирующих клеток имело более продолговатую веретенообразную форму [40].

Часть генов ранней фазы анастаза также экспрессируются и во время апоптоза. Это позволяет предположить, что клетка «рассчитывает на выживание». Накопление мРНК, необходимых для анастаза, начинается еще до удаления апоптотического стимула, что объясняет быстрое восстановление жизнедеятельности клетки. Одна из них, мРНК транскрипционного фактора SNAIL, который имеет антиапоптотический эффект, может способствовать выживанию опухолевых клеток [41]. После индукции апоптоза инкубацией с этанолом и стауропоорином РНК-интерференция SNAIL препятствует восстановлению клеток HeLa и приводит к повышенному расщеплению PARP1 — белка, участвующего в репарации ДНК.

В рамках работы Seervi et al. [27] был проведен протеомный анализ клеток HeLa и MDA-MB-231 после инкубации с паклитакселом и этопозидом. Анализ результатов с использованием системы классификации PANTHER показал, что экспрессия белков трех сигнальных путей (ядерно-цитоплазматического транспорта, сигнального пути Ras и Redox-пути) повышена в анастатических клетках HeLa. Одним из ключевых белков ядерного экспорта является экспортин 1 (XPO1). Лептомицин В (специфический ингибитор XPO1) уменьшает число анастатических клеток HeLa и MDA-MB-231, т.е. клеток, восстановивших жизнеспособность после активации апоптоза. Сайленсинг XPO1 вызывает схожий эффект — нарушение восстановления жизнеспособности апоптотических клеток. Эти данные подтверждают важную роль ядерно-цитоплазматического транспорта в анастазе. Более того, ингибирование XPO1 существенно уменьшает устойчивость анастатических клеток к повторному воздействию паклитакселом и этопозидом, а также препятствует повышению их способности к миграции и инвазии. Основываясь на этих данных, можно предположить, что ингибирование ядерного экспорта предотвращает усиление злокачественности клеток в результате анастаза.

Важным фактом является то, что часть клеток может выжить в условиях проапоптотического стимула без инициации апоптоза. Анализ протеома данных клеток не выявил значительных отличий в экспрессии белков от контрольной группы [27]. Эти данные подтверждают, что в популяции присутствуют клетки, устойчивые к проапоптотическому воздействию. В дальнейшем необходимо более детальное исследование экспрессии генов таких клеток для понимания механизмов подобной резистентности (таблица).

## ПОСЛЕДСТВИЯ АНАСТАЗА

Очевидным и важным последствием анастаза является само выживание клетки, вступившей в апоптоз. С одной стороны, для опухолевых клеток такое восстановление может увеличить риск рецидива и развития устойчивости после радиационной или химиотерапии. Для успешного лечения злокачественных новообразований необходимо дополнительное подавление анастаза или новые методики, основанные на индукции неапоптотической клеточной гибели. С другой стороны, анастаз в рамках терапии нейродегенеративных заболеваний открывает новые механизмы сохранения и защиты ценных нервных клеток от гибели. Это касается и других дегенеративных патологий. Не менее важным последствием анастаза является приобретение клетками новых, зачастую злокачественных свойств. В результате повреждения ДНК апоптотическими нуклеазами нормальные клетки могут претерпевать опухолевую трансформацию, а уже имеющиеся опухоли — прогрессировать. Также анастаз может играть роль в метастазировании, образовании стволовых клеток опухоли и приобретении лекарственной устойчивости после онкотерапевтических воздействий.

**Анастаз вызывает повреждения ДНК, хромосомные аберрации и геномную нестабильность.** Как уже было отмечено, анастаз может происходить даже на поздних стадиях апоптоза, когда системы разрушения ДНК, такие как ENDOG и CAD, уже задействованы, и начинается фрагментация ядра и цитоплазмы. В большинстве исследований, посвященных обратимости апоптоза, в популяциях анастатических клеток обнаружены разрывы ДНК, хромосомные аберрации, мутации, анеуплоидия и появление клеток с микроядрами.

Индукция апоптоза с помощью этанола в культурах HeLa, первичных гепатоцитов мыши и клеток культуры N1H3T3 приводит к увеличению числа клеток с микроядрами после снятия проапоптотического воздействия, что является важным признаком повреждения ДНК и хромосомных аберраций [6]. После прекращения инкубирования с этанолом также наблюдается увеличение числа клеток с повреждениями ДНК; метод ДНК-комет подтверждает накопление множества одно- и двунитевых разрывов. Еще одним последствием проапоптотического воздействия этанолом является расщепление важного компонента системы репарации ДНК — PARP, что также может способствовать накоплению поврежденных ДНК в анастатических клетках [6].

Обработка клеток глиобластомы человека LN18 и мезенхимальных эмбриональных фиб-

Гены, экспрессия которых изменяется в процессе анастаза

№	Полное название гена	Обозначение гена	Изменение экспрессии	Ссылки
<b>Подавление апоптоза</b>				
1	Mouse double minute 2	<i>Mdm2</i>	повышение	[28]
2	BCL2-associated athanogene 3	<i>Bag3</i>	повышение	[28]
3	Heat shock protein beta-1, HSP27 homolog	<i>Hspb1</i>	повышение	[28]
4	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1	<i>Dnajb1</i>	повышение	[28]
5	Heat shock protein 1A, HSP70 homolog	<i>HSPa1a</i>	повышение	[28]
6	HSP90 homolog	<i>HSP90aa1</i>	повышение	[28]
7	Rac family small GTPase 2	<i>RAC2</i>	повышение	[27]
8	Rac family small GTPase 3	<i>RAC3</i>	повышение	[27]
9	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha	<i>PIK3R1</i>	повышение	[27]
<b>Остановка клеточного цикла</b>				
10	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	<i>Btg1</i>	повышение	[28]
11	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1	<i>p21/Cdkn1a</i>	повышение	[28]
12	Tumor protein p53-inducible nuclear protein 1	<i>Trp53inp1</i>	повышение	[28]
<b>Компенсация повреждения ДНК</b>				
13	Histone cluster 1, H2ah histone	<i>Hist1h2ah</i>	понижение	[28]
14	Histone cluster 1, H2ad histone	<i>Hist1h2ad</i>	понижение	[28]
15	Histone cluster 1, H2ai histone	<i>Hist1h2ai</i>	понижение	[28]
<b>Деградация поврежденных компонентов клетки</b>				
16	Autophagy related 12	<i>Atg12</i>	повышение	[28]
17	Sequestosome-1	<i>Sqstm1</i>	повышение	[28]
<b>Регуляция транскрипции</b>				
18	Activating transcription factor 3	<i>Atf3</i>	повышение	[28, 40]
19	FBJ osteosarcoma oncogene	<i>Fos</i>	повышение	[28, 40]
20	FBJ osteosarcoma oncogene B	<i>Fosb</i>	повышение	[28, 40]
21	Jun oncogene	<i>Jun</i>	повышение	[28, 40]
22	Jun-B oncogene	<i>Junb</i>	повышение	[28, 40]
<b>Ядерный транспорт</b>				
23	Exportin 1	<i>XPO1</i>	повышение	[27]
24	Nuclear transport factor 2	<i>NUTF2</i>	повышение	[27]
25	Ran-specific binding protein 1	<i>RANBP1</i>	повышение	[27]
<b>Миграция и инвазия</b>				
26	Snail family transcriptional receptor 1	<i>Snail1</i>	повышение	[28]
27	Snail homolog 1	<i>Snai1</i>	повышение	[28]
28	Matrix metalloproteinase 9	<i>Mmp9</i>	повышение	[28]
29	Matrix metalloproteinase 10	<i>Mmp10</i>	повышение	[28]
30	Matrix metalloproteinase 13	<i>Mmp13</i>	повышение	[28]
<b>Ангиогенез</b>				
31	Angiopoietin-like 4	<i>Angptl4</i>	повышение	[28]
32	Vascular endothelial growth factor A	<i>Vegfa</i>	повышение	[28]
33	Placenta growth factor	<i>PGF</i>	повышение	[40]
34	Ephrin B1	<i>EFNB1</i>	повышение	[40]
35	Ephrin B2	<i>EFNB2</i>	повышение	[40]
36	Ephrin type-A receptor 2	<i>EPHA2</i>	повышение	[40]
37	Ephrin type-B receptor 2	<i>EPHB3</i>	повышение	[40]

Примечание. Гены разделены на группы по их предполагаемым функциям. Данные получены на клетках культуры HeLa [27, 40], HepG2 и первичных гепатоцитах мыши [28]. Результаты получены с помощью анализа протеома и подтверждены методом ПЦР в реальном времени.

робластов (MEF) *in vitro* сублетальными концентрациями TRAIL и FASLG (индукторами рецептор-зависимого пути апоптоза), а также цисплатином, который активирует ядерный механизм апоптоза, вызывает мутации в локусе фосфорибозилтрансферазы (HPRT) [11]. Фосфорилированный гистон H2AX ( $\gamma$ H2AX) является маркером повреждений ДНК. Цитометрический анализ показал дозозависимое увеличение количества клеток LN18 и MEF с внутриядерными фокусами  $\gamma$ H2AX после обработки всеми перечисленными индукторами. Сайленсинг мРНК каспазы 8 или РНК-интерференция CAD предотвращают повреждение ДНК и мутации HPRT. Это подтверждает ключевую роль каспаз и CAD в дестабилизации генома анастатических клеток [11].

Сразу после инкубации клеток HeLa и U2OS с ВНЗ-миметиком АВТ-737 было выявлено увеличение числа разрывов ДНК [10]. Как уже упоминалось, это показывает анализ фокусов  $\gamma$ H2AX и метод ДНК-комет. Роль нуклеазы CAD в повреждении ДНК при действии сублетальных доз АВТ-737 была проанализирована на клетках HeLa и U2OS, в которых методом редактирования генома CRISPR/Cas9 был создан дефицит гена, кодирующего CAD. Для доказательства участия каспазы-3 в повреждениях генома при действии сублетальными дозами АВТ-737 были использованы клетки MCF-7 с делецией гена каспазы-3. Оказалось, что клетки HeLa и U2OS, дефицитные по CAD, и клетки MCF-7 с делецией гена каспазы-3 устойчивы к воздействию АВТ-737, что еще раз подтверждает участие каскада каспаз и CAD в возникновении повреждений ДНК. Важно отметить, что в этих экспериментах была показана корреляция уровня повреждения ДНК со степенью iMOMP. Это может свидетельствовать о связи между уровнем активности митохондриального механизма апоптоза и степенью повреждения ДНК в клетках, восстановивших свою жизнеспособность, т.е. в анастатических клетках.

Более того, было обнаружено, что сублетальные дозы АВТ-737 могут вызывать повреждение ДНК и *in vivo*: после инъекции мышам АВТ-737 происходило увеличение числа  $\gamma$ H2AX в клетках прямой кишки. При этом не наблюдалось увеличения частоты апоптотической гибели.

Связь между восстановлением жизнеспособности клеток после неполной пермеабиллизации наружной мембраны митохондрий и повреждением генома была продемонстрирована также на модифицированных клетках линии MeJusO. В этих клетках можно индуцировать экспрессию VID на разном уровне. Оказалось, что экспрессия сублетальной дозы VID индуцирует

iMOMP, частичный выход цитохрома *c* в цитозоль и повреждение ДНК. Эти нарушения можно предотвратить с помощью повышенной экспрессии BCL-XL или воздействием Q-VD-OPh — ингибитора активации каспаз-3, 8 и 9. Сублетальная доза FASLG также приводит к повреждению ДНК в клетках U2OS, и эти нарушения генома могут быть предотвращены гиперэкспрессией BCL-XL или ингибированием каспаз [10].

Инкубация клеток с АВТ-737 или экспрессия VID способствуют не только повреждению ДНК, но также хромосомным aberrациям и геномной нестабильности. Периодическая обработка клеток HeLa и U2OS сублетальными дозами АВТ-737 или сублетальная экспрессия VID в течение 5 или 10 пассажей приводит к значительному и дозозависимому увеличению числа клеток с микроядрами. Повышение экспрессии BCL-XL или ингибирование каспаз Q-VD-OPh предотвращает появление микроядер, что подтверждает роль iMOMP в развитии геномной нестабильности [10]. Воздействие сублетальными дозами АВТ-737 также способствует амплификации генов *in vitro* в клетках протоковой аденокарциномы поджелудочной железы мыши (PDAC), иммортализованных эмбриональных фибробластах мыши 3T3-SA и клетках фибросаркомы мыши WENI-S. Гиперэкспрессия BCL-XL в этих клетках предотвращает амплификацию генов [10].

Сублетальное облучение клеток может вызывать повреждение ДНК с участием каспазы-3. Liu et al. в 2015 г. [9] показали, что после радиационной обработки (ионизирующее излучение  $^{56}\text{Fe}$ ) в клетках культуры MCF10A, IMR90 и первичных эмбриональных фибробластах мыши наблюдается повышение уровня  $\gamma$ H2AX, и это увеличение коррелирует с количеством активированной каспазы-3 и апоптотической нуклеазы ENDOG. Важно отметить, что число индуцированных радиацией фокусов  $\gamma$ H2AX повышено даже через 3 месяца после облучения. Нокдаун каспазы-3 значительно снижает уровень повреждения ДНК, в то время как нокдаун каспазы 7 вызывает меньший эффект. Экспрессия белка p53 сохраняется на повышенном уровне в течение 10 дней после облучения клеток, однако остается неясным, как присутствие этого белка связано с повреждением ДНК в анастатических клетках: нокдаун p53 не влияет на образование фокусов  $\gamma$ H2AX [9].

После воздействия стауроспорином также, как и после облучения, наблюдается формирование фокусов  $\gamma$ H2AX в ядрах первичных эмбриональных фибробластов мыши; нокдаун каспазы-3 почти полностью предотвращает данный

эффект [9]. Облучение мышей C57BL/6 вызывает хромосомные aberrации в клетках костного мозга. *Casp3<sup>-/-</sup>* C57BL/6 мыши в меньшей степени подвержены хромосомным aberrациям в результате облучения [9]. Это еще раз свидетельствует об участии процессов обратимости апоптоза в возникновении генетической нестабильности клеток.

Существует одна положительная сторона повышения генетической нестабильности опухолевых клеток в результате анастаза: мутации могут привести к опухолевой прогрессии, однако они также увеличивают число и разнообразие неоантигенов опухоли. Согласно последним исследованиям, увеличение числа мутаций и неоантигенов повышает вероятность распознавания злокачественных клеток иммунной системой и может повысить эффективность иммунологических методов противоопухолевой терапии [42].

**Анастаз способствует опухолевой трансформации и прогрессии.** Значительное число недавних исследований подтверждает, что клетки, выжившие после сублетального воздействия множеством различных апоптотических индукторов, претерпевают схожие изменения, связанные с повреждением ДНК: аккумулируют мутации, амплифицированные гены и хромосомные aberrации. Геномная нестабильность может приводить к опухолевой трансформации нормальных клеток и в сочетании со стимулирующей эпителиально-мезенхимального перехода и ангиогенеза способствовать прогрессии злокачественных новообразований.

Активация каспазы-3 играет важную роль в опухолевом гомеостазе и прогрессии. Например, клетки рака прямой кишки HCT116 с нокдауном каспазы-3 имеют существенно более низкую способность к субстрат-независимому росту, инвазии и формированию метастазов, чем HCT116, содержащие функциональную каспазу-3. Также нокдаун каспазы-3 увеличивает чувствительность к радиационной терапии как *in vitro*, так и *in vivo*: темпы пролиферации *Casp3<sup>-/-</sup>* HCT116 после облучения различными дозами рентгеновского излучения значительно ниже, чем у HCT116 дикого типа [43].

Клетки MCF10A, получившие сублетальную дозу радиации, приобретают способность к субстрат-независимому росту, что является важным признаком опухолевой трансформации. При этом клетки с повышенной активностью каспазы-3 с большей частотой формировали субстрат-независимые колонии, чем клетки с более низкой активностью данного фермента. РНК-интерференция и нокдаун гена каспазы-3 значительно снижают способность облученных

клеток MCF10A к субстрат-независимому росту. Такие данные в очередной раз подтверждают важную роль каспазы-3 в опухолевой трансформации клеток. Эти клетки после облучения также образуют опухоли при инъекции в мышью C57BL/6 *Nude* [9].

Ген *MLL (KMT2A)* смешанной лейкемии часто подвергается перестройкам и является важным участником онкогенной программы для различных типов лейкемии. Исторически считалось, что мутации *MLL* связаны с терапией ингибиторами топоизомеразы II. Однако современные исследования продемонстрировали возможное участие каскада каспаз в этом процессе: ингибирование активности каспазы-3 и CAD снижает частоту мутаций в локусе *MLL* [44]. Учитывая важную роль каспазы-3 и CAD в апоптозе, можно предположить, что анастаз также способствует онкогенным мутациям.

Индукция рецепторного пути апоптоза также может способствовать опухолевой прогрессии. TRAILR используется в качестве мишени селективных противоопухолевых химиотерапий, так как клетки многих типов опухолей имеют повышенную экспрессию TRAILR. Современные исследования показывают, что TRAILR-сигналинг играет роль в опухолевой прогрессии [45]. В мышинных моделях рака легкого и поджелудочной железы человека (NSCLC и PDAC) активация рецептора TRAILR2 стимулирует пролиферацию, миграцию и инвазию опухолевых клеток. Нокдаун *Trail* в модели аденокарциномы поджелудочной железы мыши увеличивает шансы на выживание животного и уменьшает частоту метастазирования. Данные клинических исследований подтверждают гипотезу о роли TRAILR в злокачественной трансформации и прогрессии опухолей: высокая экспрессия TRAILR2 коррелирует с низкой вероятностью выживания мышей и развитием метастазов в случаях рака прямой кишки [45]. Это позволяет предположить, что именно анастатические клетки, которые возникли после индукции апоптоза за счет активации рецепторного механизма с участием TRAILR2, являются клеточными источниками более злокачественного и метастазирующего типа опухолей.

Как и TRAILR, FAS может выполнять несколько онкогенных функций, включая стимуляцию пролиферации и миграции [46]. Ингибирование сигнального пути FAS блокирует опухолевую трансформацию в различных мышинных моделях [47].

Примечательной особенностью анастаза является то, что антиапоптотические факторы, необходимые для выживания и восстановления

клетки, стимулируют эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) [48]. ЭМП — смена фенотипа клетки с эпителиального на мезенхимальный. Клетка теряет полярность, адгезию к соседним клеткам и приобретает способности к миграции и инвазии, характерные для мезенхимальных клеток. ЭМП играет важную роль в заживлении ран и эмбриональном развитии, а также участвует в прогрессии опухолей и метастазировании.

Исследование транскриптома клеток HeLa в разные промежутки времени в течение анастаза [40] показало, что через 8–12 ч после снятия проапоптотического воздействия активны сигнальные пути, ассоциированные с формированием фокальных контактов и перестройкой актинового цитоскелета [27, 40]. Помимо этого, экспрессия транскрипционного фактора SNAIL1, как уже упоминалось, значительно увеличена и необходима для протекания анастаза в клетках HeLa [40]. SNAIL1 подавляет синтез E-кадгерина и тем самым стимулирует ЭМП. Сигнальные пути TGF $\beta$ , Ras/MAPK и Wnt также активны на ранней стадии анастаза; все эти пути ассоциированы не только с выживанием, но и с ЭМП. Экспрессия матричных металлопротеаз MMP9, MMP10, MMP13 — ферментов, необходимых для преодоления клеткой базальной мембраны в процессе инвазии, — увеличена в поздней стадии анастаза [28, 40]. Таким образом, анастаз способен стимулировать ЭМП и способствовать метастазированию клеток новообразований.

Анастаз может благоприятствовать трансформации клеток опухолей в опухолевые стволовые клетки. Опухолевые стволовые клетки более устойчивы к лекарственным воздействиям и часто являются причиной рецидивов новообразований. Недавнее исследование продемонстрировало повышенную экспрессию маркера стволовости CD44 в некоторых анастатических клетках рака молочной железы MCF-7, T47D и MDA-MB-231 *in vitro* и *in vivo*. Предварительное подавление или стимуляция метилирования ДНК нарушает стволовую трансформацию раковых клеток, что свидетельствует о важной роли эпигенетической регуляции в этом процессе [49].

Известно, что в ходе анастаза происходит увеличение продукции факторов ангиогенеза [28, 40]. Экспрессия ангиогенных факторов семейства эфринов (EFNB1, EFNB2) и их рецепторов значительно увеличена в течение анастаза в клетках HeLa [40]. Экспрессия фактора роста плаценты (PGF) значительно повышена на протяжении суток после индукции апоптоза в клетках HeLa. PGF связывается с рецептором VEGF

и способствует ангиогенезу путем стимуляции пролиферации и миграции клеток эндотелия [50]. Экспрессия ангиопоэтин-подобного белка 4 (ANGPL4) и фактора роста сосудов A (VEGFA) также повышена в течение анастаза в культурах клеток HepG2 и первичных гепатоцитах мыши [28]. С одной стороны, стимуляция ангиогенеза благоприятствует быстрому восстановлению тканей после ишемии или других повреждений. Однако развитие новых кровеносных сосудов также может способствовать злокачественной трансформации и метастазированию опухолевых клеток, и вместе с другими онкогенными последствиями анастаза создает крайне опасное сочетание.

**Анастаз способствует приобретению лекарственной устойчивости.** Одним из важных последствий повреждения ДНК, геномной нестабильности и увеличения частоты мутаций в результате анастаза является ускорение отбора опухолевых клеток, устойчивых к лекарственным воздействиям. Так, после индукции апоптоза этопозидом и паклитакселом клетки HeLa и MDA-MB-231 становятся более устойчивыми к повторному воздействию — доля выживших анастатических клеток выше на 15–30% [27]; это свидетельствует о возникновении лекарственной устойчивости к этопозиду и паклитакселу. Культивирование клеток лимфомы мыши LuVcl2-6 и LuVcl2-9 с периодической обработкой ВН-3-миметиком АВТ-199 (также известен как венетоклакс) приводит к приобретению устойчивости к воздействию АВТ-199 и частичной устойчивости к другим противоопухолевым препаратам; мутации в семействе генов *Bcl2* предотвращают связывание белка с ВН-3-миметиком. Можно предположить, что повреждение ДНК и аккумуляция мутаций в результате сублетального проапоптотического воздействия АВТ-199 способствует приобретению лекарственной устойчивости к данному препарату [51]. После длительного воздействия TRAIL клетки *Bax*<sup>-/-</sup> НСТ116 теряют чувствительность к TRAIL в результате снижения экспрессии TRAILR и приобретают устойчивость к комбинированному воздействию TRAIL и бортезомиба или MG-132 [52].

Учитывая результаты данных исследований, можно предположить, что вне зависимости от выбранного апоптотического индуктора анастаз может способствовать развитию лекарственной устойчивости. Важно отметить, что возможно появление не только специфической устойчивости к противоопухолевому агенту, но и потеря чувствительности к некоторым комбинированным терапиям. Таким образом, анастаз может явиться еще одним механизмом



Позитивные и негативные последствия обратимости апоптоза. Представлены доказанные экспериментально и предполагаемые физиологические функции анастаза, а также его патологические эффекты. (С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

развития множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) опухолевых клеток. Так как приобретение лекарственной устойчивости после периода противоопухолевой химиотерапии играет ключевую роль в рецидивах новообразований, исследование роли анастаза в формировании такой устойчивости требует самого пристального внимания и более широкого исследования.

На протяжении длительного времени апоптоз считался необратимым процессом. Относительно недавно появились данные о возможности выживания клеток после инициации апоптоза [5, 6]. В различных работах были предприняты попытки найти «точку невозврата» — апоптотическое событие, после которого клетка неминуемо погибает. Обилие результатов исследо-

ваний, полученных в последние годы, ставит под сомнение существование такой универсальной «точки». Обратимость отдельных апоптотических событий в рамках апоптоза и анастаза в целом обнаружены в разнообразных модельных системах как *in vitro*, так и *in vivo*; также наблюдается обратимость апоптоза, протекающего по различным механизмам инициации, включая рецептор-зависимый [4, 25, 26], митохондриальный [9, 10], ядерный [9, 26, 27] и с участием стресса ЭПР [10]. Обнаружено, что выживание клетки возможно даже на поздних стадиях апоптоза, несмотря на пермеабиллизацию внешней мембраны митохондрий [4, 10, 25–27], разрушение ДНК апоптотическими нуклеазами [5, 6, 9–11, 27] и распад клетки на апоптотические тельца [29].

Возможно, мы получим более полное понимание апоптоза и анастаза, если будем рассмат-

ривать обратимый апоптотический процесс как взаимодействие проапоптотических и антиапоптотических сигналов. Недавние исследования подтверждают, что синтез мРНК некоторых факторов выживания, необходимых для анастаза, начинается еще во время воздействия апоптотическим стимулом [28, 40] — таким образом клетка «готовится» выжить. Если апоптотический стимул достаточно силен и продолжителен, возможна устойчивая активация проапоптотических сигналов, запуск положительных обратных связей и быстрое завершение апоптоза. Если апоптотический стимул оказывается кратковременным или сублетальным, клетка может инициировать апоптоз, но не достичь необходимого уровня проапоптотических сигналов — апоптотического плато [4]. Неустойчивый баланс проапоптотических и антиапоптотических факторов может сместиться как в сторону гибели, так и в сторону выживания.

Возникает вопрос, может ли анастаз, как и отдельные апоптотические события, играть роль в физиологических процессах? Апоптотические каспазы, чья активность не приводит к запуску гибели клеток, принимают участие в развитии и регенерации многих тканей, таких как волокна хрусталика, форменные элементы крови, костная ткань. Также активность каспаз важна при развитии и дифференцировке нервной ткани и в осуществлении функциональной активности центральной нервной системы [7]. Анастаз в сочетании с компенсаторной пролиферацией может служить механизмом восстановления после повреждения тканей организма. Этим же целям может служить анастаз в сочетании с аутофагией (рисунок).

Временная активация апоптотических каспаз возможна и в половых клетках *D. melanogaster in vivo* после переохлаждения или голодания животных [12]. Вероятно, анастаз служит механизмом усиления мутагенеза в ответ на внешний стресс, что, в свою очередь, может способствовать ускорению отбора более приспособленных организмов. Однако геномная нестабильность, ассоциированная с анастазом, также может являться причиной появления генетических заболеваний (рисунок).

Как и проблема анастаза, обратимость неапоптотических видов клеточной гибели на данный момент исследована недостаточно. Лишь в последние годы были опубликованы данные, свидетельствующие о возможности выживания клеток после инициации ферроптоза [14], некроптоза и пироптоза [13]. Дальнейшее изучение обратимости неапоптотических видов клеточной гибели расширит понимание физиологических процессов, ассоциированных с этими типами гибели клеток, и положит основы для разработки новых методов терапии заболеваний, связанных с гибелью или выживанием клеток.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (19-015-0023).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., et al. (2018) Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death, *Cell Death. Differ.*, **25**, 486-541, doi: 10.1038/s41418-017-0012-4.
- Savitskaya, M. A., and Onishchenko, G. E. (2015) Mechanisms of apoptosis, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 1613-1627, doi: 10.1134/S0006297915110012.
- Narula, J., Haider, N., Arbustini, E., and Chandrashekar, Y. (2006) Mechanisms of disease: apoptosis in heart failure — seeing hope in death, *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.*, **3**, 681-688, doi: 10.1038/npcardio0710.
- Albeck, J. G., Burke, J. M., Aldridge, B. B., Zhang, M., Lauffenburger, D. A., and Sorger, P. K. (2008) Quantitative analysis of pathways controlling extrinsic apoptosis in single cells, *Mol. Cell*, **30**, 11-25, doi: 10.1016/j.molcel.2008.02.012.
- Tang, H. L., Yuen, K. L., Tang, H. M., and Fung, M. C. (2009) Reversibility of apoptosis in cancer cells, *Br. J. Cancer*, **100**, 118-122, doi: 10.1038/sj.bjc.6604802.
- Tang, H. L., Tang, H. M., Mak, K. H., Hu, S., Wang, S. S., Wong, K. M., Wong, C. S. T., Wu, H. Y., Law, H. T., Liu, K., Talbot Jr., C. C., Lau, W. K., Montell, D. J., and Fung, M. C. (2012) Cell survival, DNA damage, and oncogenic transformation after a transient and reversible apoptotic response, *Mol. Biol. Cell*, **23**, 2240-2252, doi: 10.1091/mbc.E11-11-0926.
- Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., and Kumar, S. (2015) Old, new and emerging functions of caspases, *Cell Death Differ.*, **22**, 526-539, doi: 10.1038/cdd.2014.216.
- Espinosa-Oliva, A. M., García-Revilla, J., Alonso-Bellido, I. M., and Burguillos, M. A. (2019) Brainiac caspases: beyond the wall of apoptosis, *Front. Cell Neurosci.*, **13**, 500, doi: 10.3389/fncel.2019.00500.
- Liu, X., He, Y., Li, F., Huang, Q., Kato, T. A., Hall, R. P., and Li C.-Y. (2015) Caspase-3 promotes genetic instability and carcinogenesis, *Mol. Cell*, **58**, 284-296, doi: 10.1016/j.molcel.2015.03.003.
- Ichim, G., Lopez, J., Ahmed, S. U., Muthalagu, N., Giampazolias, E., et al. (2015) Limited mitochondrial permeabilization causes DNA damage and genomic instability in the absence of cell death, *Mol. Cell*, **57**, 860-872, doi: 10.1016/j.molcel.2015.01.018.

11. Lovric, M. M., and Hawkins, C. J. (2010) TRAIL treatment provokes mutations in surviving cells, *Oncogene*, **29**, 5048–5060, doi: 10.1038/onc.2010.242.
12. Tang, H. L., Tang, H. M., Marie Hardwick, J., and Fung, M. C. (2015) Strategies for tracking anastasis, a cell survival phenomenon that reverses apoptosis, *J. Vis. Exp.*, **16**, 1–13, doi: 10.3791/51964.
13. Gong, Y. N., Crawford, J. C., Heckmann, B. L., and Green, D. R. (2019) To the edge of cell death and back, *FEBS J.*, **286**, 430–440, doi: 10.1111/febs.14714.
14. Tang, H. M., and Tang, H. L. (2019) Cell recovery by reversal of ferroptosis, *Biol. Open*, **8**, 1–10, doi: 10.1242/bio.043182.
15. Shlomovitz, I., Speir, M., and Gerlic, M. (2019) Flipping the dogma – phosphatidylserine in non-apoptotic cell death, *Cell Commun. Signal.*, **17**, 139, doi: 10.1186/s12964-019-0437-0.
16. Rote, N. S., Ng, A. K., Dostal-Johnson, D. A., Nicholson, S. L., and Siekman, R. (1993) Immunologic detection of phosphatidylserine externalization during thrombin-induced platelet activation, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **66**, 193–200, doi: 10.1006/clin.1993.1025.
17. Boyle, E. M., Pohlman, T. H., Cornejo, C. J., and Verrier, E. D. (1996) Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: ischemia-reperfusion, *Ann. Thor. Surg.*, **62**, 1868–1875, doi: 10.1016/s0003-4975(96)00950-2.
18. Riedl, S., Rinner, B., Asslaber, M., Schaidler, H., Walzer, S., Novak, A., Lohner, K., and Zwegg, D. (2011) In search of a novel target – phosphatidylserine exposed by non-apoptotic tumor cells and metastases of malignancies with poor treatment efficacy, *Biochim. Biophys. Acta*, **1808**, 2638–2645, doi: 10.1016/j.bbame.2011.07.026.
19. Van den Eijnde, S. M., van den Hoff, M. J., Reutelingsperger, C. P., van Heerde, W. L., Henfling, M. E., Vermeij-Keers, C., Schutte, B., Borgers, M., and Ramaekers, F. C. (2001) Transient ex-pression of phosphatidylserine at cell-cell contact areas is required for myotube formation, *J. Cell. Sci.*, **114** (Pt. 20), 3631–3642.
20. Vogt, E., Ng, A. K., and Rote, N. S. (1996) A model for the antiphospholipid antibody syn-drome: monoclonal antiphosphatidylserine antibody induces intrauterine growth restriction in mice, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **174**, 700–777, doi: 10.1016/s0002-9378(96)70453-2.
21. Charras, G., and Paluch, E. (2008) Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **9**, 730–736, doi: 10.1038/nrm2453.
22. Khajjah, M. A., and Luqmani, Y. A. (2016) Involvement of membrane blebbing in immunological disorders and cancer, *Med. Princ. Pract.*, **25** Suppl. 2, 18–27, doi: 10.1159/000441848.
23. Aram, L., Yakobi-Sharon, K., and Arama, E. (2017) CDPs: caspase-dependent non-lethal cellular processes, *Cell Death Differ.*, **24**, 1307–1310, doi: 10.1038/cdd.2017.111.
24. Green, D. R., Goldstein, J. C., Waterhouse, N. J., Juin, P., and Evan, G. I. (2000) The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant, *Nat. Cell. Biol.*, **2**, 156–162, doi: 10.1038/35004029.
25. Xu, Y., Surman, D. R., Diggs, L., Xi, S., Gao, S., et al. (2020) Bile acid-induced “Minority MOMP” promotes esophageal carcinogenesis while maintaining apoptotic resistance via Mcl-1, *Oncogene*, **39**, 877–890, doi: 10.1038/s41388-019-1029-6.
26. Tait, S. W. G., Parsons, M. J., Llambi, F., Bouchier-Hayes, L., Connell, S., Muñoz-Pinedo, C., and Green, D. R. (2010) Resistance to caspase-independent cell death requires persistence of intact mitochondria, *Dev. Cell.*, **18**, 802–813, doi: 10.1016/j.devcel.2010.03.014.
27. Seervi, M., Sumi, S., Chandrasekharan, A., Sharma, A. K., and Santhosh-Kumar, T. R. (2019) Molecular profiling of anastatic cancer cells: potential role of the nuclear export pathway, *Cell Oncol.*, **42**, 645–661, doi: 10.1007/s13402-019-00451-1.
28. Tang, H. M., Talbot, Jr., C. C., Fung, M. C., and Tang, H. L. (2017) Molecular signature of anastasis for reversal of apoptosis, *F1000Research*, **6**, 43, doi: 10.12688/f1000research.10568.1.
29. Tang, H. M., and Tang, H. L. (2018) Anastasis: recovery from the brink of cell death, *R. Soc. Open Sci.*, **5**, 180442, doi: 10.1098/rsos.180442.
30. Colell, A., Ricci, J.-E., Tait, S., Milasta, S., Maurer, U., et al. (2007) GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation, *cell*, **129**, 983–997, doi: 10.1016/j.cell.2007.03.045.
31. Potts, M. B., Vaughn, A. E., McDonough, H., Patterson, C., and Deshmukh, M. (2005) Reduced Apaf-1 levels in cardiomyocytes engage strict regulation of apoptosis by endogenous XIAP, *J. Cell Biol.*, **171**, 925–930, doi: 10.1083/jcb.200504082.
32. Ding, A. X., Sun, G., Argaw, Y. G., Wong, J. O., Easwaran, S., and Montell, D. J. (2016) CasExpress reveals widespread and diverse patterns of cell survival of caspase-3 activation during development *in vivo*, *Elife*, **5**, 1–20, doi: 10.7554/eLife.10936.
33. Tang, H. M., Fung, M. C., and Tang, H. L. (2018) Detecting anastasis *in vivo* by caspase-tracker biosensor, *J. Vis. Exp.*, **132**, 54107, 1–12, doi: 10.3791/54107.
34. Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., and Oren, M. (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53, *Nature*, **387**, 296–299, doi: 10.1038/387296a0.
35. Gu, L., Zhu, N., Zhang, H., Durden, D. L., Feng, Y., and Zhou, M. (2009) Regulation of XIAP translation and induction by MDM2 following irradiation, *Cancer Cell*, **15**, 363–375, doi: 10.1016/j.ccr.2009.03.002.
36. Flanagan, L., Sebastia, J., Tuffy, L. P., Spring, A., Lichawska, A., Devocelle, M., Prehn, J. H. M., and Rehm, M. (2010) XIAP impairs Smac release from the mitochondria during apoptosis, *Cell Death Dis.*, **1**, 1–13, doi: 10.1038/cddis.2010.26.
37. Hauer, M. H., Seeber, A., Singh, V., Thierry, T., Sack, R., Amitai, A., Kryzhanovska, M., Eglinger, J., Holcman, D., Owen-Hughes, T., and Gasser, S. M. (2017) Histone degradation in response to DNA damage enhances chromatin dynamics and recombination rates, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **24**, 99–107, doi: 10.1038/nsmb.3347.
38. Geske, F. J., Lieberman, R., Strange, R., and Gerschenson, L. E. (2001) Early stages of p53-induced apoptosis are reversible, *Cell Death Differ.*, **8**, 182–191, doi: 10.1038/sj.cdd.4400786.
39. Kenis, H., Zandbergen, H. R., Hofstra, L., Petrov, A. D., Dumont, E. A., Blankenberg, F. D., Haider, N., Bitsch, N., Gijbels, M., Verjans, J. W. H., Narula, N., Narula, J., and Reutelingsperger, C. P. M. (2010) Annexin A5 uptake in ischemic myocardium: demonstration of reversible phosphatidylserine externalization and feasibility of radionuclide imaging, *J. Nucl. Med.*, **51**, 259–267, doi: 10.2967/jnumed.109.068429.
40. Sun, G., Guzman, E., Balasanyan, V., Conner, C. M., Wong, K., Zhou, H. R., Kosik, K. S., and Montell, D. J. (2017) A molecular signature for anastasis, recovery from the brink of apoptotic cell death, *J. Cell Biol.*, **216**, 3355–3360, doi: 10.1083/jcb.201706134.
41. Wan, Z., Pan, H., Liu, S., Zhu, J., Qi, W., Fu, K., Zhao, T., and Liang, J. (2015) Downregulation of SNAIL sensitizes Hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by regulating the NF-κB pathway, *Oncol. Rep.*, **33**, 1560–1566, doi: 10.3892/or.2015.3743.
42. Germano, G., Lamba, S., Rospo, G., Barault, L., Magri, A., et al. (2017) In-activation of DNA repair triggers neoanti-



- gen generation and impairs tumour growth, *Nature*, **552**, 1-5, doi: 10.1038/nature24673.
43. Zhou, M., Liu, X., Li, Z., Huang, Q., Li, F., and Li, C.-Y. (2018) Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells, *Int. J. Cancer*, **143**, 921-930, doi: 10.1002/ijc.31374.
  44. Betti, C. J., Villalobos, M. J., Diaz, M. O., and Vaughan, A. T. M. (2003) Apoptotic stimuli initiate MLL-AF9 translocations that are transcribed in cells capable of division, *Cancer Res.*, **63**, 1377-1381.
  45. Von Karstedt, S., Conti, A., Nobis, M., von Karstedt, S., Conti, A., et al. (2015) Cancer cell-autonomous TRAIL-R signaling promotes KRAS-Driven cancer progression, invasion, and metastasis, *Cancer Cell*, **27**, 561-573, doi: 10.1016/j.ccell.2015.02.014.
  46. Peter, M. E., Hadji, A., Murmann, A. E., Brockway, S., Putzbach, W., Pattanayak, W., and Ceppi, P. (2015) The role of CD95 and CD95 ligand in cancer, *Cell Death Differ.*, **22**, 549-559, doi: 10.1038/cdd.2015.3.
  47. Hadji, A., Ceppi, P., Murmann, A. E., Hadji, A., Ceppi, P., et al. (2014) Death induced by CD95 or CD95 ligand elimination, *Cell Rep*, **7**, 208-222, doi: 10.1016/j.celrep.2014.02.035.
  48. Chakraborty, S., Mir, K. B., Seligson, N. D., Nayak, D., Kumar, R., and Goswami, A. (2020) Integration of EMT and cellular survival instincts in reprogramming of programmed cell death to anastasis, *Cancer Metastasis Rev.*, **39**, 553-566, doi: 10.1007/s10555-020-09866-x.
  49. Xu, Y., So, C., Lam, H. M., Fung, M. C., and Tsang, S. Y. (2018) Apoptosis reversal promotes cancer stem cell-like cell formation, neoplasia (United States), **20**, 295-303, doi: 10.1016/j.neo.2018.01.005.
  50. De Falco, S. (2012) The discovery of placenta growth factor and its biological activity, *Exp. Mol. Med.*, **44**, 1-9, doi: 10.3858/emmm.2012.44.1.025.
  51. Fresquet, V., Rieger, M., Carolis, C., García-Barchino, M. J., and Martinez-Climent, J. A. (2014) Acquired mutations in BCL2 family proteins conferring resistance to the BH3 mimetic ABT-199 in lymphoma, *Blood*, **123**, 4111-4119, doi: 10.1182/blood-2014-03-560284.
  52. Somasekharan, S. P., Koc, M., Morizot, A., Micheau, O., Sorensen, P. H. B., Gaide, O., Andera, L., and Martinou, J.-C. (2013) TRAIL promotes membrane blebbing, detachment and migration of cells displaying a dysfunctional intrinsic pathway of apoptosis, *Apoptosis*, **18**, 324-336, doi: 10.1007/s10495-012-0782-6.

## THE PROBLEM OF APOPTOTIC PROCESSES REVERSIBILITY

### Review

I. I. Zakharov, M. A. Savitskaya, and G. E. Onischenko\*

*Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119234 Moscow, Russia; E-mail: galina22@mail.ru*

Received July 10, 2020

Revised July 23, 2020

Accepted July 23, 2020

Apoptosis is the best understood variant of regulated cell death, which has been considered irreversible for a long time. To date, an increasing amount of data has been accumulating indicating that key events of apoptosis, such as the externalization of phosphatidylserine, mitochondrial outer membrane permeabilization, caspase activation, DNA damage, and cytoplasmic blebbing are not irreversible and can be involved in the normal cell functioning not associated with the induction of apoptosis. Anastasis – cell recovery after induction of apoptosis – can occur following elimination of proapoptotic stimuli. This can facilitate survival of damaged or tumor cells. This review describes key processes of apoptosis, which do not necessarily lead to cell death during normal cell activity as well as anastasis. Understanding mechanisms and consequences of apoptotic processes reversibility, on the one hand, could contribute to the improvement of existing therapeutic approaches for various diseases, including malignant neoplasms, and, on the other hand, could open up new possibilities for protecting cellular elements of tissues and organs from death during treatment of degenerative pathologies.

**Keywords:** apoptosis, apoptosis reversibility, anastasis, caspase activation, MOMP, PS externalization, blebbing