

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-90-98>

Снижение способности клеток НСТ116 к выходу из стадии индуцированного терапией старения при увеличении длительности воздействия доксорубицином

Н.А. Персиянцева¹, С.Ю. Вихрова^{1,2}, М.С. Короткова^{1,2}, Д.Б. Казанский¹, В.В. Татарский³, М.А. Замкова^{1,3}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России; Россия, 119048 Москва, ул. Трубецкая, 8/2;

³ФГБУ «Институт биологии гена Российской академии наук»; Россия, 119334 Москва, ул. Вавилова, 34/5

Контакты: Мария Анатольевна Замкова zamkovam@gmail.com

Введение. Применение химиопрепаратов в низких концентрациях в связи с токсичностью их высоких доз приводит к развитию в опухолевых клетках фенотипа клеточного старения, характеризующегося остановкой прогрессии клеточного цикла и отсутствием деления, а также изменениями в транскрипционном и метаболическом профилях клеток. Негативным последствием этого фенотипа является приобретение отдельными клетками способности к выходу из нее и возврату к повторной пролиферации.

Цель исследования – оценить влияние длительности воздействия химиопрепаратом на способность клеток опухоли НСТ116 к выходу из стадии индуцированного старения.

Материалы и методы. Фенотип старения определяли с помощью анализа изменения активности β-галактозидазы, а также оценки распределения клеток по фазам цикла и уровня белков методом вестерн-блоттинга. Колонии окрашивали кристаллическим фиолетовым.

Результаты. Выявлено, что продолжительность инкубации клеток НСТ116 с низкой дозой доксорубицина влияет на их способность к возврату к повторной пролиферации: увеличение времени инкубации при одинаковой дозе препарата снижает колониюобразование. Длительность воздействия доксорубицином не изменяет процесс формирования фенотипа старения, что было подтверждено нами при анализе различных маркеров данной стадии (изменение активности β-галактозидазы, распределение клеток по фазам цикла, уровни белков p21 и p-γH2AX). Однако наблюдается замедление развития ответа клеток на повреждения ДНК, вызванные доксорубицином, в клетках, подвергнутых более продолжительной инкубации с ним (повышение активности β-галактозидазы, формирование полиплоидных клеток).

Заключение. Длительность воздействия доксорубицином на клетки рака НСТ116 влияет на долгосрочные последствия, снижая способность «стареющих» клеток к выходу из стадии старения при удлинении времени инкубации с препаратом.

Ключевые слова: НСТ116, доксорубин, клеточное старение, колониюобразование

Для цитирования: Персиянцева Н.А., Вихрова С.Ю., Короткова М.С. и др. Снижение способности клеток НСТ116 к выходу из стадии индуцированного терапией старения при увеличении длительности воздействия доксорубицином. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(1):90–8. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-90-98>

Decreasing the ability of HCT116 cells to escape from therapy induced senescence by increasing the duration of doxorubicin treatment

N.A. Persiyantseva¹, S. Yu. Vikhrova^{1,2}, M.S. Korotkova^{1,2}, D.B. Kazansky¹, V.V. Tatarsky³, M.A. Zamkova^{1,3}

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

²Sechenov First Moscow State Medical University, 8/2 Trubetskaya St., Moscow 119048, Russia;

³Institute of Gene Biology Russian Academy of Sciences; 34/5 Vavilova St., Moscow 119334, Russia

Contacts: Maria Anatolievna Zamkova zamkovam@gmail.com

Introduction. Due to the toxicity of high doses of chemotherapy, low concentrations used in cancer treatment leads to the development of senescence phenotype in tumor cells, characterized by a block in the cell cycle progression and the absence of division; changes in the transcriptional and metabolic profile of cells. A negative consequence of this stage is acquisition of individual cells the ability to escape from senescence and return to re-proliferation.

Aim. To estimate the effect of the duration of drug treatment of HCT116 tumor cells on their ability to escape from therapy induced senescence.

Materials and methods. The senescence phenotype was confirmed by the analysis of β -galactosidase activity; cell cycle analysis; estimation of protein levels by western blotting. Colonies were stained with crystal violet dye.

Results. In our study, we showed that the duration of HCT116 cells incubation with low-dose doxorubicin affects their ability to return to re-proliferation – increasing the treatment time using same drug dose reduces the process of colony formation. The duration of doxorubicin treatment does not affect the formation of the senescence phenotype, which was confirmed by analyzing different markers of this stage (changes in β -galactosidase activity, cell cycle analysis, assessment of p21 and γ H2AX protein levels). However, there is a delay in the development of cellular response to DNA damage caused by doxorubicin in cells exposed to prolong treatment protocol (increase in β -galactosidase activity, formation of polyploid cells).

Conclusion. The duration of doxorubicin treatment of HCT116 cancer cells affects long-term consequences, reducing the ability of senescent cells to escape this stage when the incubation time with the drug is extended.

Keywords: HCT116, doxorubicin, senescence, colony formation

For citation: Persiyantseva N.A., Vikhrova S.Yu., Korotkova M.S. et al. Decreasing the ability of HCT116 cells to escape from therapy induced senescence by increasing the duration of doxorubicin treatment. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2024;11(1):90–8. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-1-90-98>

ВВЕДЕНИЕ

Применение высоких доз химиотерапевтических препаратов при лечении злокачественных новообразований сопровождается развитием неблагоприятных для организма побочных эффектов, вплоть до летального исхода [1]. Снижение частоты их возникновения и степени достигается за счет уменьшения доз препаратов, применения коротких интервальных курсов терапии и т. п. [2, 3]. Однако невысокие концентрации веществ приводят к формированию в опухолевых клетках фенотипа клеточного старения, характеризующегося отсутствием их пролиферации [4]. Установление стадии старения не является благоприятным исходом терапии, поскольку отдельные опухолевые клетки способны к выходу из нее и к возврату к повторной пролиферации, что вызывает рецидив опухоли [5].

Фенотип индуцированного терапией клеточного старения имеет характерные особенности [6]. Его развитие сопровождается повышением уровней белков p21 и p16, являющихся негативными регуляторами прогрессии клеточного цикла, вследствие чего происходит его остановка на стадии G1 или G2/M [7]. Изменяются размер и морфология клеток, повышается активность фермента β -галактозидазы, формируется секреторный фенотип. «Стареющая» клетка имеет особые транскрипционный и метаболический профили. Изменения, происходящие в клетке, направлены на устранение повреждений ДНК, вызванных действием химиопрепарата, и на поддержание ее жизнеспособности [4, 8].

В исследованиях с использованием модельных клеточных линий, находящихся в стадии индуцированного терапией старения, применяют разные схемы

индукции данной стадии, в частности различающиеся по времени инкубации с химиопрепаратом [9, 10]. В одних работах применяют короткое воздействие лекарственного средства (до 24 ч) [10, 11], тогда как в других — длительную инкубацию тех же клеток в присутствии препарата (от 3 до 7 дней, в зависимости от типа клеток) [9, 12]. В обоих случаях в клетках формируется фенотип старения. Однако остается непонятным влияние продолжительности воздействия химиопрепарата на долгосрочные последствия этой стадии, такие как степень развития секреторного фенотипа и опосредуемых им паракринных эффектов, способность отдельных клеток к повторной пролиферации после окончания действия лекарственного средства и др. Режимы (непрерывный режим, пульс-терапия, вариации длительности интервалов между воздействиями) и дозы препаратов во многом определяют эффективность химиотерапии [13]. Предлагаются математические модели, которые учитывают разные параметры, определяющие успех терапии [14]. Выявлено, что при одних схемах воздействия доксорубином клетки были способны к возобновлению пролиферации в долгосрочной перспективе, тогда как при других — нет [15].

Для выявления различий в развитии негативных долгосрочных последствий применения короткого и длительного воздействий химиотерапии на модельные культуры опухолевых клеток проведена оценка влияния продолжительности инкубации на способность отдельных клеток к выходу из стадии старения и формированию колоний. На клетках колоректального рака HCT116 мы показали, что при коротком протоколе воздействия (24 ч) на них доксорубином колониеобразующая способность «стареющих» клеток

была значительно выше, чем у тех же культур, прошедших более длительную инкубацию с данным химиопрепаратом. При этом в обоих случаях клетки приобретали фенотип старения, о чем свидетельствует наличие характерных для этой стадии признаков. Данные результаты указывают на то, что, несмотря на приобретение старения, процесс перепрограммирования транскрипции определенных генов, сопровождающий стадию старения, может различаться в клетках, подвергнутых разным по длительности воздействия протоколам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клетки и препарат. Клетки колоректального рака HCT116 культивировали в среде DMEM (C455п, «ПанЭко», Россия) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (S1810, Biowest, Южная Америка), антибиотика пенициллин/стрептомицин («ПанЭко», Россия) и глутамина («ПанЭко», Россия). Доксорубин (Sigma, США) разводили в дистиллированной воде для получения 10 мМ стокового раствора.

Окраска клеток для определения активности β -галактозидазы (SA- β -Gal и C12FDG). Иммуноцитохимическую окраску клеток проводили с использованием коммерческого набора (Cell Signaling, США) согласно протоколу производителя. Развитие окраски, отражающее активность β -галактозидазы, оценивали под микроскопом Nikon Eclipse Ti-S (Nikon, Япония; объектив 20 \times). Для анализа активности β -галактозидазы с помощью проточной цитофлуориметрии клетки HCT116, предварительно обработанные 300 мкМ хлорохина (Sigma, США) в течение 30 мин, окрашивали флуоресцентным красителем C12FDG (ThermoFisher Scientific, США) (2 ч в CO₂-инкубаторе). Анализ флуоресценции проводили в канале FITC на проточном цитофлуориметре (BD FACSAria™ III, BD Biosciences, США).

Клеточный цикл. Распределение клеток по фазам клеточного цикла проводили с помощью проточного цитофлуориметра. Клетки предварительно инкубировали в буфере (0,1 % цитрат натрия; 0,3 % NP-40; 100 мкг/мл РНКазы А; 50 мкг/мл пропидия иодида) в течение 30 мин. Анализ результатов проводили с помощью программы FlowJo_v10.8.1 (BD Biosciences, США).

Вестерн-блоттинг. Клетки HCT116 лизировали в буфере RIPA (150 мМ хлорида натрия; 1 % NP-40; 0,5 % дезоксихолата натрия; 0,1 % SDS; 50 мМ TRIS; pH 8,0). Для проведения электрофореза белков в полиакриламидном геле в лунку вносили 20 мкг белка. Белки переносили на мембрану PVDF (1620177, Bio-Rad, США). Для предотвращения неспецифического связывания антител мембрану инкубировали в 5 % нежирном молоке (Bio-Rad, США) в течение часа. Мембрану окрашивали следующими антителами: p21 (2947, Cell Signaling, США), PARP1 (A18303, Abclonal, Китай), cleaved PARP1 (5625, Cell Signaling, США), фосфо- γ H2AX (9718, Cell Signaling, США), β -актин

(AC026, Abclonal, Китай). Инкубацию проводили в течение ночи при температуре +4 °C. После отмывки от первичных антител мембрану обрабатывали вторичными антителами (анти-кролик), конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP) (7074, Cell Signaling, США) в течение 40 мин при комнатной температуре. Детекцию сигнала осуществляли с помощью хемилюминесцентного HRP-субстрата (Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad, США) на хемилюминесцентном ImageQuant LAS 4000, GE Healthcare, США).

Окраска кристаллическим фиолетовым. Клетки фиксировали 4 % раствором параформальдегида (Sigma, США) в течение 10 мин. После отмывки к ним добавляли кристаллический фиолетовый. Краситель отмывали дистиллированной водой.

Анализ колониеобразующей способности клеток. После инкубации с доксорубином клетки HCT116 рассеивали для анализа колониеобразующей способности по 10 000 клеток на лунку 6-луночного планшета (SPL Lifesciences, Корея) в трех повторях. Далее проводили окраску колоний с помощью кристаллического фиолетового (см. выше).

Статистический анализ. Оценку различий между выборками определяли с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Низкие дозы химиопрепаратов, в отличие от высоких, не вызывают в обработанных ими опухолевых клетках апоптоз, а приводят к становлению в них стадии клеточного старения [4, 16]. Для разных типов опухоли показаны определенные дозы препаратов, воздействие которыми индуцирует данный фенотип. Так, для клеток HCT116 100–200 нМ доксорубина приводят к формированию стадии старения [17, 18].

Мы воздействовали на клетки колоректального рака HCT116 200 нМ доксорубина в течение 24 ч (короткая инкубация) и 72 ч (длительная инкубация). Схема эксперимента представлена на рис. 1.

Для подтверждения установления в клетках фенотипа клеточного старения мы провели иммуноцитохимическую окраску клеток, чтобы определить активность β -галактозидазы (рис. 2, а). На 9-е сутки от начала эксперимента увеличение активности фермента наблюдалось в обоих экспериментальных протоколах воздействия. Данные результаты подтверждены с помощью проточной цитофлуориметрии с применением флуоресцентного красителя C12FDG, который также используется для детекции активности β -галактозидазы [19]. Кроме того, мы проследили динамику развития окраски и обнаружили, что при применении короткого протокола инкубации активность фермента начинала увеличиваться на 3-и сутки от начала эксперимента (анализ через 72 ч), тогда как при длительном воздействии доксорубина она проявлялась на 5-е сутки (анализ через 5 сут) (рис. 2, б).

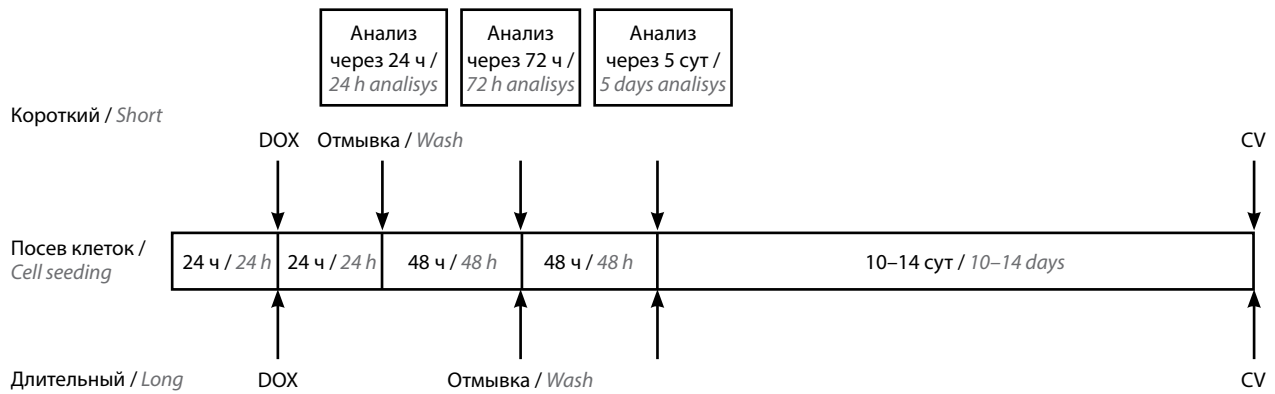


Рис. 1. Схема эксперимента. Вверху показан короткий протокол инкубации с доксорубицином (DOX), внизу — длительный. Началом эксперимента считали день внесения препарата в культуральную среду с клетками. CV — кристаллический фиолетовый
Fig. 1. Experimental design. The top shows a short incubation protocol with doxorubicin (DOX), the bottom — a long one. The day the drug was added to the culture medium was considered as the beginning of the experiment. CV — crystal violet dye

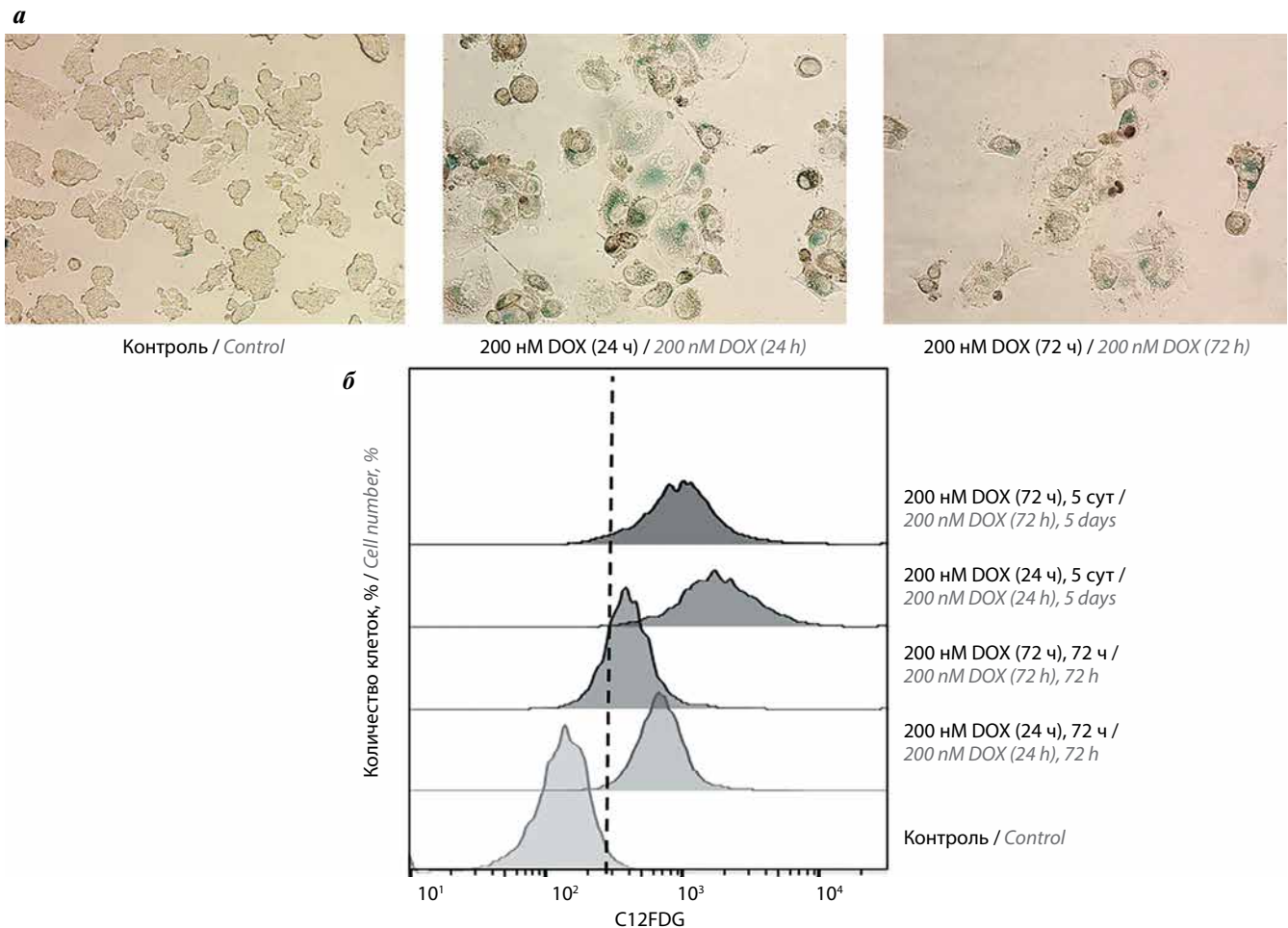


Рис. 2. Оценка активности β -галактозидазы в клетках HCT116, обработанных 200 нМ доксорубицином (DOX) в течение 24 и 72 ч, с помощью иммуноцитохимического окрашивания клеток (а) и метода проточной цитофлуориметрии с применением флуоресцентного красителя C12FDG (б): а — фиксацию и окраску клеток выполняли на 9-е сутки от начала эксперимента. Развитие окраски оценивали на световом микроскопе (объектив 20 \times); б — анализ активности β -галактозидазы проводили через 72 ч и 5 сут от начала эксперимента. Контроль — контрольные, не обработанные доксорубицином клетки в логарифмической фазе роста. Вследствие остановки деления клеток под действием доксорубицина их плотность не увеличивалась со временем, что позволяет использовать вышеуказанный контроль
Fig. 2. Estimation of β -galactosidase activity in HCT116 cells treated with 200 nM doxorubicin (DOX) for 24 and 72 h with immunocytochemical (a) and flow cytometry using the fluorescent dye C12FDG methods (b): a — cells were fixed and stained on the 9th day from the start of the experiment. Color development was assessed using a light microscope (objective 20 \times); b — analysis of β -galactosidase activity was carried out 72 h and 5 days from the beginning of the experiment. Control — doxorubicin-untreated cells in logarithmic growth phase. Due to the arrest of cell division under doxorubicin treatment, their density did not increase over time, which allows to use the above control

Характерным признаком стадии старения является прекращение деления клеток [20]. Анализ распределения клеток НСТ116 по фазам клеточного цикла показал остановку его прогрессии на стадии G2/M (4n), что отмечается уже через 24 ч инкубации с препаратом (рис. 3). На 3-и сутки от начала эксперимента наблюдалось повышение доли полиплоидных клеток (>4n) в группе, подвергнутой короткому протоколу воздействия (см. рис. 3). При 72-часовой инкубации с пре-

паратом количество полиплоидов возросло на 5-е сутки, но их было меньше по сравнению с 24-часовой обработкой. Таким образом, мы наблюдаем, что динамика развития ответа клеток, подвергнутых короткому воздействию доксорубина, «опережает» таковую в клетках, обработанных препаратом в течение 72 ч.

В клетках НСТ116 отсутствует экспрессия гена *CDKN2A* (белок p16), поэтому оценка развития фенотипа старения проводилась с помощью анализа из-

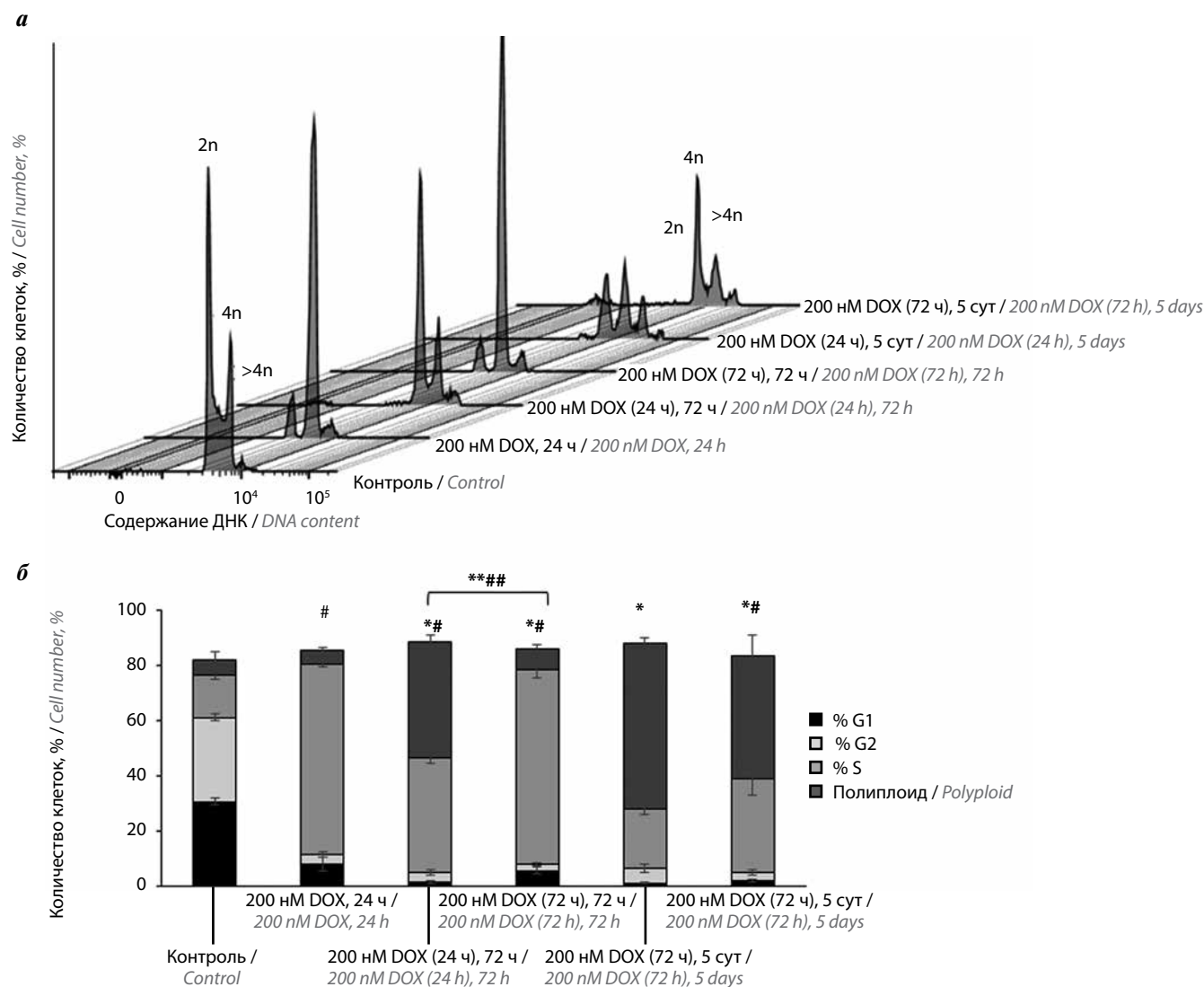


Рис. 3. Анализ распределения клеток НСТ116, подвергнутых короткой и длительной инкубациям с доксорубином (DOX), по фазам клеточного цикла. Оценку проводили через 24, 72 ч и 5 сут от начала эксперимента: а – репрезентативные результаты одного из трех повторов; б – гистограмма, отражающая распределение клеток по фазам клеточного цикла. Сравнительная оценка доли полиплоидов (*) и клеток в стадии G2/M (**) в экспериментальных группах по сравнению с контролем ($p < 0,01$), а также количества полиплоидов (**) и клеток в стадии G2/M (**) между двумя экспериментальными группами (24- и 72-часовое воздействие) ($p < 0,01$) на 3-и сутки от начала эксперимента. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,01$. Контроль – контрольные, не обработанные доксорубином клетки в логарифмической фазе роста. Вследствие остановки деления клеток под действием доксорубина, их плотность не увеличивалась со временем, что позволяет использовать вышеуказанный контроль

Fig. 3. Cell cycle analysis of HCT116 cells subjected to short and long incubation with doxorubicin. The assessment was carried out 24 h, 72 hours and 5 days from the start of the experiment: a – a representative result from one of three biological replicates is shown; б – histogram reflecting the distribution of cells according to the phases of the cell cycle. Comparative assessment of the proportion of polyploids (*) and cells in the G2/M stage in the experimental groups compared with the control ($p < 0.01$), as well as the number of polyploids (**) and cells in the G2/M stage (**) between two experimental groups (24- and 72-hour exposure) ($p < 0.01$) on the 3rd day from the beginning of the experiment. The differences were considered statistically significant at $p < 0.01$. Control – doxorubicin-untreated cells in logarithmic growth phase. Due to the arrest of cell division under doxorubicin treatment, their density did not increase over time, which allows to use the above control

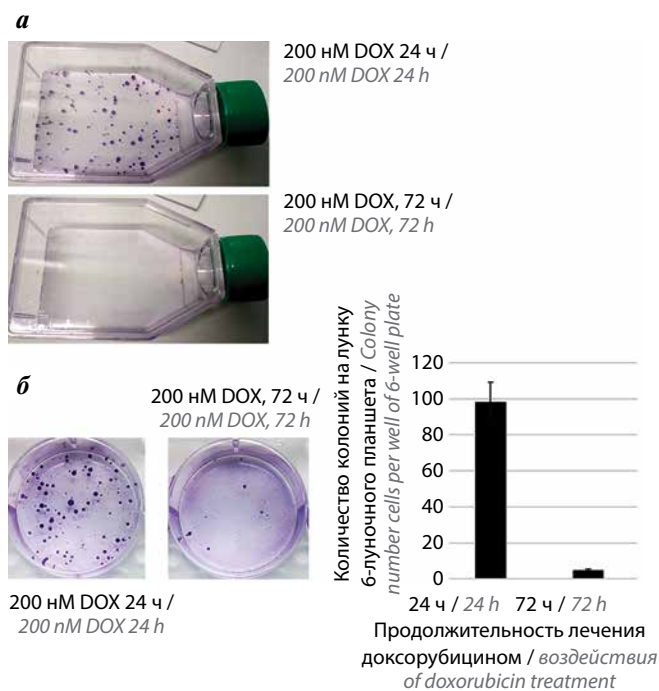


Рис. 5. Анализ способности клеток HCT116, подвергнутых короткой и длительной инкубациям с доксорубицином, к выходу из стадии клеточного старения. Клетки подвергали 24- и 72-часовому воздействию и окрашивали кристаллическим фиолетовым через 10–14 сут от начала эксперимента (по мере развития сформированных колоний, без пересева) (а). Оценка колониобразующей способности клеток через 3 сут после начала эксперимента (б, слева). Клетки рассевали на колонии по 10 000 клеток на лунку 6-луночного планшета в обеих экспериментальных группах. Окрашку проводили кристаллическим фиолетовым через 10–14 сут (по мере развития сформированных колоний). Гистограмма, отображающая количество сформировавшихся колоний на лунку 6-луночного планшета ($n = 6$) через 10–14 сут после воздействия на клетки доксорубицином (24 и 72 ч) (б, справа)

Fig. 5. Analysis of the ability of HCT116 cells subjected to short and long incubation with doxorubicin to escape from senescence. Cells were treated with doxorubicin for 24 and 72 h and stained with crystal violet 10–14 days from the start of the experiment (as the colonies develop, without subculture) (a). Assessment of the colony-forming ability of cells – 3 days after the start of the experiment, the cells were seeded into colonies of 10,000 cells per well of 6-well plate in both experimental groups (b, left). Staining was carried out with crystal violet dye after 10–14 days (as the colonies develop) (b, right) Histogram shows the number of colonies per well of 6-well plate ($n = 6$) in 10–14 days after doxorubicin treatment (24 and 72 h)

некоторое время после прекращения действия препарата. Использовались 2 протокола инкубации с 200 нМ: 24-часовой (короткий) и 72-часовой (длительный). Клетки приобретали фенотип старения в обоих случаях, что было подтверждено анализом специфических маркеров данной стадии (оценка активности β -галактозидазы, распределения клеток по фазам клеточного цикла, уровней белка p21 и фосфорилированной формы гистона γ H2AX). Однако долгосрочные последствия применения разных протоколов показали значительные различия в поведении клеток. В результате 24-часовой обработки клеток доксорубицином образовалось множество колоний, что указывает на приобретение «стареющими» клетками из данной экспериментальной группы способности к возврату к пов-

торной пролиферации. Мы не обнаружили подобный эффект при применении длительного протокола. Авторы других исследований также указывают на различия в ответе клеток на длительность воздействия химиопрепаратом [26].

Динамика ответа клеток на доксорубицин также различалась между двумя исследуемыми группами. Так, в ходе анализа распределения клеток по фазам клеточного цикла мы обнаружили, что формирование полиплоидов при коротком протоколе инкубации происходит на 3-и сутки от начала эксперимента, тогда как при 72-часовом воздействии – на 5-е сутки, т.е. и в первом, и во втором случае приблизительно через 2 сут после удаления доксорубицина из культуральной среды. Похожая динамика наблюдается и в отношении активности β -галактозидазы (см. рис. 2, в и 3). Процесс полиплоидизации является своего рода приспособительным механизмом, направленным на сохранение выживаемости клеток, подвергнутых стрессовому воздействию [27, 28]. По данным некоторых исследований, результатом деполиплоидизации является возврат «стареющих» клеток к повторной пролиферации [29, 30]. В настоящей работе мы показали, что только клетки, подвергнутые короткому протоколу воздействия, были способны к процессу колониобразования, несмотря на то, что формирование полиплоидов наблюдалось в обеих экспериментальных группах (с разницей по времени появления).

Формирование полиплоидных клеток обратно коррелирует с динамикой уровня циклина B1. Мы наблюдали повышение его количества через 24 и 72 ч от начала воздействия, что соответствовало преобладанию клеток в фазе G2/M, и снижение уровня этого белка на 5-е сутки эксперимента, что сопровождалось значительным увеличением доли полиплоидов (см. рис. 3). Данные результаты согласуются с другим исследованием, в котором также отмечалось наличие негативной корреляции между уровнем циклина B1 и долей полиплоидов при распределении клеток по фазам цикла [23].

Таким образом, мы показали, что, несмотря на установление фенотипа старения в клетках, подвергнутых разному по продолжительности воздействию одинаковой (низкой) дозой доксорубицина (200 нМ), они имеют различные долгосрочные последствия пребывания в этой стадии. Способность к выходу из нее и возврату к повторной пролиферации преобладает у клеток, прошедших короткую инкубацию с препаратом. Разная динамика развития ответа может указывать на различия в степени повреждения/скорости репарации ДНК (уровень гистона γ H2AX), активации определенных сигнальных путей, что, несомненно, требует проведения дальнейших исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, способность отдельных клеток, находящихся в стадии индуцированного низкой дозой

доксорубина старения, к выходу из этой стадии зависит от продолжительности воздействия. Наблюдается значительное преобладание повторно делящихся клеток в группе, подвергнутой короткому протоколу

инкубации. Используемые протоколы воздействия приводят к становлению фенотипа клеточного старения, однако динамика ответа на вызванные повреждения ДНК различается между двумя группами.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Schirmacher V. From chemotherapy to biological therapy: a review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *Int J Oncol* 2019;54(2):407–19. DOI: 10.3892/ijo.2018.4661
- Cockrell C., Axelrod D.E. Optimization of dose schedules for chemotherapy of early colon cancer determined by high-performance computer simulations. *Cancer Inform* 2019;18:1176935118822804. DOI: 10.1177/1176935118822804
- De Souza R., Zahedi P., Badame R.M. et al. Chemotherapy dosing schedule influences drug resistance development in ovarian cancer. *Mol Cancer Ther* 2011;10 (7):1289–99. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0058
- Zamkova M.A., Persiyantseva N.A., Tatarskiy V.V. et al. Therapy-induced tumor cell senescence: mechanisms and circumvention. *Biochemistry (Mosc)* 2023;88(1):86–104. DOI: 10.1134/S000629792301008X
- Yang L., Fang J., Chen J. Tumor cell senescence response produces aggressive variants. *Cell Death Discov* 2017;3:17049. DOI: 10.1038/cddiscovery.2017.49
- Fitsiou E., Soto-Gamez A., Demaria M. Biological functions of therapy-induced senescence in cancer. *Semin Cancer Biol* 2022; 81:5–13. DOI: 10.1016/j.semcancer.2021.03.021
- Kumari R., Jat P. Mechanisms of cellular senescence: cell cycle arrest and senescence associated secretory phenotype. *Front Cell Dev Biol* 2021;9:645593. DOI: 10.3389/fcell.2021.645593
- Hernandez-Segura A., Nehme J., Demaria M. Hallmarks of cellular senescence. *Trends Cell Biol* 2018;28 (6):436–53. DOI: 10.1016/j.tcb.2018.02.001
- El-Far A.H., Darwish N.H.E., Mousa S.A. Senescent colon and breast cancer cells induced by doxorubicin exhibit enhanced sensitivity to curcumin, caffeine, and thymoquinone. *Integr Cancer Ther* 2020;19:1534735419901160. DOI: 10.1177/1534735419901160
- Mosieniak G., Sliwinska M.A., Alster O. et al. Polyploidy formation in doxorubicin-treated cancer cells can favor escape from senescence. *Neoplasia* 2015;17(12):882–93. DOI: 10.1016/j.neo.2015.11.008
- Bojko A., Staniak K., Czarnecka-Herok J. et al. Improved autophagic flux in escapers from doxorubicin-induced senescence/polyplody of breast cancer cells. *Int J Mol Sci* 2020;21(17). DOI: 10.3390/ijms21176084
- Pacifico F., Mellone S., D'Incalci M. et al. Trabectedin suppresses escape from therapy-induced senescence in tumor cells by interfering with glutamine metabolism. *Biochem Pharmacol* 2022;202:115159. DOI: 10.1016/j.bcp.2022.115159
- Mathur D., Taylor B.P., Chatila W.K. et al. Optimal strategy and benefit of pulsed therapy depend on tumor heterogeneity and aggressiveness at time of treatment initiation. *Mol Cancer Ther* 2022;21(5):831–43. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-21-0574
- Borges F.S., Iarosz K.C., Ren H.P. et al. Model for tumour growth with treatment by continuous and pulsed chemotherapy. *Biosystems* 2014;116:43–8. DOI: 10.1016/j.biosystems.2013.12.001
- Howard G.R., Jost T.A., Yankeelov T.E. et al. Quantification of long-term doxorubicin response dynamics in breast cancer cell lines to direct treatment schedules. *PLoS Comput Biol* 2022; 18 (3):e1009104. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1009104
- Wang B., Kohli J., Demaria M. Senescent cells in cancer therapy: friends or foes? *Trends Cancer* 2020;6(10):838–57. DOI: 10.1016/j.trecan.2020.05.004
- Kitada K., Pu F., Toi M. Occurrence of senescence-escaping cells in doxorubicin-induced senescence is enhanced by PD0332991, a cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor, in colon cancer HCT116 cells. *Oncol Lett* 2019;17(1):1153–9. DOI: 10.3892/ol.2018.9657
- Chang B.D., Swift M.E., Shen M. et al. Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99 (1):389–94. DOI: 10.1073/pnas.012602599
- Cahu J., Sola B. A sensitive method to quantify senescent cancer cells. *J Vis Exp* 2013;78:50494. DOI: 10.3791/50494
- Ewald J.A., Desotelle J.A., Wilding G. et al. Therapy-induced senescence in cancer. *J Natl Cancer Inst* 2010;102 (20):1536–46. DOI: 10.1093/jnci/djq364
- Myohanen S.K., Baylin S.B., Herman J.G. Hypermethylation can selectively silence individual p16ink4A alleles in neoplasia. *Cancer Res* 1998;58(4):591–3.
- Gruosso T., Mieulet V., Cardon M. et al. Chronic oxidative stress promotes H2AX protein degradation and enhances chemosensitivity in breast cancer patients. *EMBO Mol Med* 2016;8(5):527–49. DOI: 10.15252/emmm.201505891
- Kikuchi I., Nakayama Y., Morinaga T. et al. A decrease in cyclin B1 levels leads to polyploidization in DNA damage-induced senescence. *Cell Biol Int* 2010;34(6):645–53. DOI: 10.1042/CBI20090398
- Saleh T., Tyutyunyk-Massey L., Gewirtz D.A. Tumor cell escape from therapy-induced senescence as a model of disease recurrence after dormancy. *Cancer Res* 2019;79(6):1044–6. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3437
- Afifi M.M., Crncec A., Cornwell J.A. et al. Irreversible cell cycle exit associated with senescence is mediated by constitutive MYC degradation. *Cell Rep* 2023;42(9):113079. DOI: 10.1016/j.celrep.2023.113079
- Lupertz R., Watjen W., Kahl R. et al. Dose- and time-dependent effects of doxorubicin on cytotoxicity, cell cycle and apoptotic cell death in human colon cancer cells. *Toxicology* 2010;271(3):115–21. DOI: 10.1016/j.tox.2010.03.012
- Anatskaya O.V., Vinogradov A.E. Polyploidy and myc proto-oncogenes promote stress adaptation via epigenetic plasticity and gene regulatory network rewiring. *Int J Mol Sci* 2022;23(17):9691. DOI: 10.3390/ijms23179691
- Meierjohann S. Effect of stress-induced polyploidy on melanoma reprogramming and therapy resistance. *Semin Cancer Biol* 2022;81:232–40. DOI: 10.1016/j.semcancer.2021.02.005
- Puig P.E., Guilly M.N., Bouchot A. et al. Tumor cells can escape DNA-damaging cisplatin through DNA endoreduplication and reversible polyploidy. *Cell Biol Int* 2008;32(9):1031–43. DOI: 10.1016/j.cellbi.2008.04.021
- Sikora E., Czarnecka-Herok J., Bojko A. et al. Therapy-induced polyploidization and senescence: coincidence or interconnection? *Semin Cancer Biol* 2022;81:83–95. DOI: 10.1016/j.semcancer.2020.11.015

Благодарности

Авторы выражают благодарность А.М. Щербакову за ценные комментарии.

Acknowledgments

The authors express their gratitude to A.M.

Вклад авторов

Н.А. Персиянцева: постановка экспериментов, обработка результатов;

С.Ю. Вихрова, М.С. Короткова: постановка экспериментов;

Д.Б. Казанский, В.В. Татарский: техническое обеспечение работы;

М.А. Замкова: постановка экспериментов, обработка результатов, написание текста статьи.

Authors' contributions

N.A. Persiyantseva: performed experiments, analyzed results;

S.Yu. Vikhrova, M.S. Korotkova: performed experiments;

D.B. Kazansky, V.V. Tatarsky: technical support of study;

M.A. Zamkova: performed experiments, analyzed results, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Н.А. Персиянцева / N.A. Persiyantseva: <https://orcid.org/0000-0002-2097-5986>

Д.Б. Казанский / D.B. Kazansky: <https://orcid.org/0000-0002-4179-8421>

В.В. Татарский / V.V. Tatarsky: <https://orcid.org/0000-0002-9080-5683>

М.А. Замкова / M.A. Zamkova: <https://orcid.org/00000-0002-4687-7444>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00212; <https://www.rscf.ru/project/22-24-00212/?CODE=22-24-00212>).

Funding. The work was carried out with financial support from the Russian Science Foundation (grant No. 22-24-00212; <https://www.rscf.ru/project/22-24-00212/?CODE=22-24-00212>).