

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-46-56>

# Тамоксифен и регуляция стресс-индуцированного старения в клетках рака молочной железы

Е.И. Михеевич, О.Е. Андреева, Д.В. Сорокин, А.М. Щербаков, П.Б. Копнин, М.В. Гудкова, М.А. Красильников

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

**Контакты:** Михаил Александрович Красильников [krasilnikovm1@ya.ru](mailto:krasilnikovm1@ya.ru)

**Введение.** Известно, что опухолевые клетки не подвержены репликативному старению – как правило, за счет гиперактивации теломеразы, восстанавливающей длину теломер при каждом цикле деления. В то же время инициировать старение в опухолевых клетках оказалось возможным при действии сублетальных доз цитостатиков или облучении – это так называемое стресс-индуцированное, или нерепликативное старение, исследование механизма и способов регуляции которого является одной из актуальных задач современной онкологии.

**Цель исследования** – изучение механизмов доxorубин-индуцированного старения клеток рака молочной железы различного происхождения и возможных подходов к регуляции нерепликативного старения.

**Материалы и методы.** Эксперименты проводились на культивируемых *in vitro* клетках рака молочной железы MCF-7 и MDA-MB-231. Степень старения клеток оценивали по уровню активации  $\beta$ -галактозидазы, изменению морфологии клеток и активации p53/p21-сигналинга. Для исследования экспрессии/активности клеточных белков использовали колориметрические методы, репортерный анализ и иммуноблоттинг. Нокдаун ДНК метилтрансферазы 3A (DNMT3A) проводили по стандартной методике с применением лентивирусного вектора, кодирующего antisense RNA DNMT3A.

**Результаты.** Продемонстрирован потенцирующий эффект тамоксифена при развитии доxorубин-индуцированного старения, в том числе в эстрогеннезависимых клетках рака молочной железы. Обнаружено усиление нерепликативного старения в резистентных клетках, характеризующихся конститутивным подавлением экспрессии DNMT3A. Впервые установлено, что подавление DNMT3A в присутствии децитабина или при нокдауне DNMT3A обеспечивает усиление и сохранение нерепликативного старения в клетках MCF-7.

**Заключение.** Установлена возможность усиления и поддержания нерепликативного старения в клетках рака молочной железы в присутствии антиэстрогена тамоксифена, продемонстрировано значение DNMT3A в регуляции доxorубин-индуцированного старения.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, гормональная резистентность, тамоксифен, старение, DNMT3A

**Для цитирования:** Михеевич Е.И., Андреева О.Е., Сорокин Д.В. и др. Тамоксифен и регуляция стресс-индуцированного старения в клетках рака молочной железы. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(3):46–56.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-46-56>

## Tamoxifen and regulation of stress-induced senescence in breast cancer cells

E.I. Mikhaevich, O.E. Andreeva, D.V. Sorokin, A.M. Scherbakov, P.B. Kopnin, M.V. Gudkova, M.A. Krasil'nikov

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

**Contacts:** Mikhail Alexandrovich Krasil'nikov [krasilnikovm1@ya.ru](mailto:krasilnikovm1@ya.ru)

**Introduction.** Tumor cells are known not to undergo replicative aging – usually due to hyperactivation of telomerase, which restores telomere length during each cell division cycle. However, it is possible to induce aging in tumor cells through sublethal doses of cytostatics or irradiation – this is the so-called stress-induced or non-replicative senescence. Studying the mechanisms and regulatory pathways of this process is one of the important areas of modern oncology.

**Aim.** To investigate the mechanisms of doxorubicin-induced senescence in different breast cancer cell subtypes and to explore possible approaches to regulating non-replicative aging.

**Materials and methods.** The experiments were performed on *in vitro* cultured breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. Cellular senescence was assessed by  $\beta$ -galactosidase activity, morphological changes, and activation of the p53/p21 signaling

pathway. Colorimetric assays, reporter analysis, and immunoblotting were used to evaluate the expression and activity of cellular proteins. DNA methyltransferase 3A (DNMT3A) knockdown was achieved using a standard lentiviral vector encoding antisense RNA against DNMT3A.

**Results.** A potentiating effect of tamoxifen on doxorubicin-induced senescence – including in estrogen-independent breast cancer cells – was demonstrated. Enhanced non-replicative senescence was observed in resistant cells characterized by constitutive suppression of DNMT3A expression. For the first time, it was shown that DNMT3A suppression – either via decitabine treatment or DNMT3A knockdown – leads to an increase and maintenance of non-replicative senescence in MCF-7 cells.

**Conclusion.** The findings indicate that non-replicative senescence in breast cancer cells can be enhanced and sustained in the presence of the antiestrogen tamoxifen, and underscore the key role of DNMT3A in regulating doxorubicin-induced senescence.

**Keywords:** breast cancer, hormonal resistance, tamoxifen, aging, DNMT3A

**For citation:** Mikhaevich E.I., Andreeva O.E., Sorokin D.V. et al. Tamoxifen and regulation of stress-induced senescence in breast cancer cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = Advances in Molecular Oncology 2025;12(3):46–56. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-46-56>

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время старение и опухолевая трансформация рассматриваются как 2 основных пути клеточной дедифференцировки, ассоциированной с возрастом [1, 2]. Клетки стареющего организма оказываются перед выбором: либо дальнейшее сокращение теломер [3–5], прекращение деления и переход в состояние запрограммированного старения (senescence), либо иммортализация и злокачественная трансформация клеток [6, 7]. В целом речь идет о 2 независимых путях дедифференцировки, однако в последнее время появились данные о возможности частичного перехода опухолевых клеток в состояние senescence, в том числе на фоне противоопухолевой терапии [8, 9]. Подробно описаны феномены клеточного старения, индуцированного химиопрепаратами (chemotherapy-induced senescence) и облучением (radiation-induced senescence), суть которых заключается в торможении пролиферации и переходе опухолевых клеток в состояние частичного старения в условиях действия минимальных, сублетальных доз химиопрепаратов или облучения [10]. Механизм подобных изменений малоизучен, и дальнейшие исследования в этом направлении могут послужить основой для разработки новых подходов к противоопухолевой терапии.

Доксорубин – цитостатический препарат из группы антрациклиновых антибиотиков [11]. Он является интеркалирующим агентом, а также воздействует на клеточные мембраны и индуцирует накопление в клетке активных форм кислорода [12]. Доксорубин получен из *Streptomyces peucetius* var. *caesius* в 1970-е годы и широко используется для лечения таких опухолей, как рак молочной железы (РМЖ), легкого, желудка, яичников, неходжкинской и ходжкинской лимфом, сарком и ряда опухолей у детей [13, 14].

Известны 2 основных механизма действия доксорубина в опухолевой клетке:

- интеркаляция ДНК и нарушение процессов репарации ДНК, которые контролируются топоизомеразами;

- генерация свободных радикалов и повреждение ими клеточных мембран, ДНК и белков.

Доксорубин может индуцировать апоптоз клеток через 24 ч в дозозависимой манере [15, 16]. В отличие от апоптоза, старение – относительно стабильное состояние с активным метаболизмом [17]. Оно является более отсроченным по времени эффектом доксорубина. Как клетка делает выбор между гибелью или старением, пока до конца не изучено.

Действие сублетальных доз доксорубина на нормальные и опухолевые клетки сопровождается торможением клеточного деления и переходом клеток в состояние так называемого преждевременного, нерепликативного старения. Эффект сравнительно непродолжительный, и спустя определенное время после отмены химиопрепарата клетки могут возвращаться к активному росту.

**Цель исследования** – изучение механизма доксорубин-индуцированного старения в культивируемых *in vitro* клетках различных подтипов РМЖ и возможных путей усиления и поддержания индуцированного старения в опухолевых клетках.

В экспериментах на клеточных линиях РМЖ различного происхождения мы показали эффект преждевременного старения клеток, включая такие классические характеристики, как активация p53/p21-сигналинга, повышение активности β-галактозидазы, изменение морфологии при культивировании клеток с сублетальными дозами доксорубина. Продемонстрирована возможность индукции и поддержания senescence-фенотипа клеток РМЖ с помощью гормональных цитостатиков. Впервые обнаружено, что подавление экспрессии ДНК метилтрансфераз потенцирует эффект преждевременного старения и предотвращает реиндукцию опухолевого роста в клетках РМЖ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводились на культивируемых *in vitro* клетках РМЖ MCF-7 и MDA-MB-231.

**Клеточные культуры и реактивы.** Клетки РМЖ человека линий MCF-7 и MDA-MB-231 культивировали

в среде DMEM («ПанЭко», Россия), содержащей 4,5 г/л глюкозы, 10 % эмбриональной сыворотки телят (FBS, HyClone, США) и гентамицин (50 ед./мл) («ПанЭко», Россия) при 37 °C и 5 % CO<sub>2</sub>. Культивирование клеток выполняли в инкубаторе NU-5840E (NuAire, США). При анализе скорости роста количество клеток определяли с помощью МТТ-теста [18] с модификациями, описанными в работе [19]. Тест основан на восстановлении живыми клетками реагента МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2)-2,5-дифенилтетразол бромид) (AppliChem, Германия) в нерастворимые в культуральных средах кристаллы формазана.

**Определение активности β-галактозидазы.** Для определения активности β-галактозидазы клетки промывали 1 мл стерильного фосфатно-солевого буфера (PBS), фиксировали в 1 мл 2 % раствора формальдегида в течение 3–5 мин и отмывали в растворе PBS. Фиксированные клетки инкубировали 12–16 ч при 37 °C без CO<sub>2</sub> в растворе: 40 мМ фосфатно-цитратного буфера; рН 6,0; 5 мМ K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>; 5 мМ K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>; 2 мМ MgCl<sub>2</sub>; 150 мМ NaCl; 1 мг/мл X-Gal (5-бromo-4-хлоро-3-индоил-бета-D-галактопиранозид), затем отмывали в PBS и определяли количество окрашенных клеток под микроскопом.

**Репортерный анализ.** Для определения транскрипционной активности рецептора эстрогенов α (ERα) проводили трансфекцию клеток плазмидой, содержащей ген — репортер люциферазы, любезно предоставленной George Reid, под контролем промотора с эстроген-респонсивным элементом [20]. Для контроля за эффективностью и потенциальной токсичностью процедуры трансфекции применяли котрансфекцию клеток плазмидой, содержащей ген β-галактозидазы, как описано ранее в работе [19]. Активность люциферазы измеряли по протоколу производителя набора реагентов (Promega, США) на люминометре Tecan Infinite M200 Pro (Tecan, Швейцария). Активность люциферазы выражали в условных единицах как отношение уровня хемилюминесцентного сигнала к уровню оптической плотности, обнаруженной в тесте с β-галактозидазой [19].

**Иммуноблоттинг.** Для получения тотального клеточного экстракта к образцам клеток добавляли буфер следующего состава: 50 мМ Трис-HCl рН 7,4; 1 % Igepal CA-630; 150 мМ NaCl; 1 мМ тетраацетата этилендиамина; 1 мМ дитиотреитола; 1 мкг/мл аprotинина, лейпептина и пепстатина; 1 мМ фторида натрия и ортованадата натрия (Merck, США). Образцы клеточных экстрактов центрифугировали (10 000g, 10 мин, 4 °C, центрифуга Eppendorf 5417R) и проводили электрофорез и иммуноблоттинг, как описано ранее в работе [21]. В цитозольных экстрактах исследовали содержание Snail, p21, p53 и его формы, фосфорилированной по остатку Ser15, ERα, GREB1, циклина D1, CDK4, CDK6, PARP и его расщепленной формы (Cell Signaling Technology, США). Для контроля за эффективностью иммуноблоттинга использовали антитела

к α-тубулину (Cell Signaling Technology, США). Детекцию хемилюминесценции проводили по протоколу, описанному в работе D. Mruk и C. Cheng [22].

**Нокдаун ДНК-метилтрансферазы 3A (DNMT3A).** Для получения лентивирусных частиц упаковочные клетки HEK283FT (Thermo Fisher Scientific, США) котрансфицировали плазмидой pLKO.1-TRC (Addgene, США), кодирующей целевые шпилечные РНК (shRNA), и вспомогательными упаковочными плазмидами pΔR8.2 (Addgene, США) и pVSV-G (Addgene, США). Для получения shRNA DNMT3A использованы следующие праймеры: Forward 5' — CCGGGCCAAGGTCATTGCAGGA-ACTCGAGTTCTCTGCAATGACCTTGGCTTTTGTG-3'; Reverse 5' — AATTCAAAAAGCCAAGGTCATTGCAGGA-ACTCGAGTTCTCTGCAATGACCTTGGC-3'.

Трансфекцию проводили с использованием реагента GenJect-39TM (Molecta, Россия). Для получения вирусных частиц кондиционированную среду собирали через 24 и 48 ч после трансфекции. Клетки MCF-7 инкубировали с кондиционированной средой и 8 мкг/мл полибрена (Sigma, США). Для последующего отбора инфицированных клеток в течение 4–5 дней использовали пуромицин (Sigma, США) в концентрации 1 мкг/мл.

**Статистическая обработка данных.** Статистическую обработку полученных данных проводили в программе Microsoft Excel. Во всех случаях различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

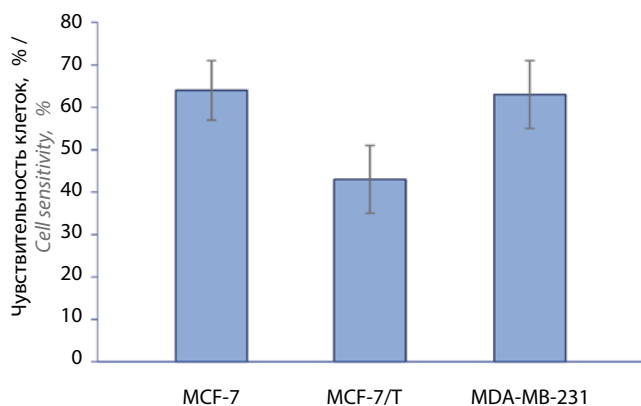
## РЕЗУЛЬТАТЫ

Эксперименты проводили на клетках эстрогензависимого РМЖ линии MCF-7 (люминальный А подтип), эстрогеннезависимой сублинии MCF-7/T, полученной в результате длительного культивирования клеток родительской линии в присутствии антиэстрогена тамоксифена, и клетках эстрогеннезависимого РМЖ MDA-MB-231 (трижды негативный рак).

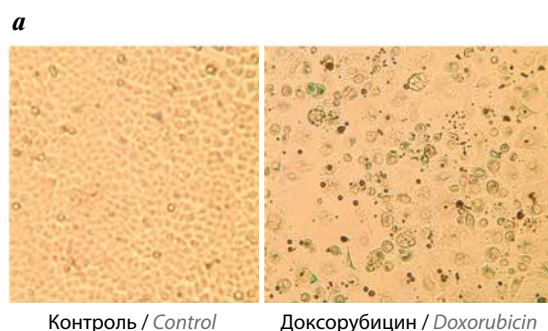
**Доксорубин-индуцированное старение клеток MCF-7.** Результаты сравнительного анализа чувствительности клеточных линий к доксорубину продемонстрировали относительно одинаковый уровень чувствительности клеток MCF-7 и MDA-MB-231; в то же время тамоксифенрезистентные клетки MCF-7/T отличались существенно более высокой чувствительностью к доксорубину (рис. 1).

При исследовании влияния доксорубина на активность β-галактозидазы установлено, что культивирование клеток MCF-7 в присутствии 0,2 мкМ этого препарата в течение 3 сут с последующим переводом в среду без него сопровождается выраженным повышением активности β-галактозидазы на фоне частичного блока пролиферации и характерных изменений морфологии клеток, в том числе увеличения размеров, изменения формы и пластичности клеток (рис. 2, а).

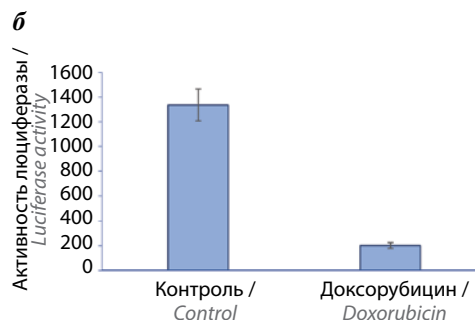
Как известно, индуцированное химиопрепаратами преждевременное старение сопровождается активацией p53-сигналинга, определяющего в итоге остановку клеточного деления и переход клеток в состояние



**Рис. 1.** Чувствительность клеток рака молочной железы к доксорубину. Клетки MCF-7, MDA-MB-231 и MCF-7/T культивировали в присутствии 0,2 мкМ доксорубина в течение 3 сут с дальнейшим определением количества выживших клеток с помощью МТТ-теста. Представлено количество выживших клеток в процентах относительно контроля  
**Fig. 1.** Sensitivity of breast cancer cells to doxorubicin. MCF-7, MDA-MB-231 and MCF-7/T cells were cultured in the presence of 0.2  $\mu$ M doxorubicin for 3 days with subsequent determination of the cell viability using the MTT test. The number of viable cells is shown as a percentage of the control



**Рис. 2.** Влияние доксорубина на активность  $\beta$ -галактозидазы и профиль сигнальных белков в клетках MCF-7. Клетки MCF-7, культивированные в течение 3 сут в отсутствие (контроль) или в присутствии 0,2 мкМ доксорубина с последующим переводом в стандартную среду и окрашкой на  $\beta$ -галактозидазу (а) и иммуноблоттингом белков (б). Представлены результаты одного из 3 независимых экспериментов  
**Fig. 2.** Effect of doxorubicin on  $\beta$ -galactosidase activity and signaling protein profile in MCF-7 cells. MCF-7 cells cultured for 3 days in the absence (control) or presence of 0.2  $\mu$ M doxorubicin (doxorubicin), followed by transfer to standard medium and staining for  $\beta$ -galactosidase (a) and immunoblotting of proteins (b). Results from one of three independent experiments are presented

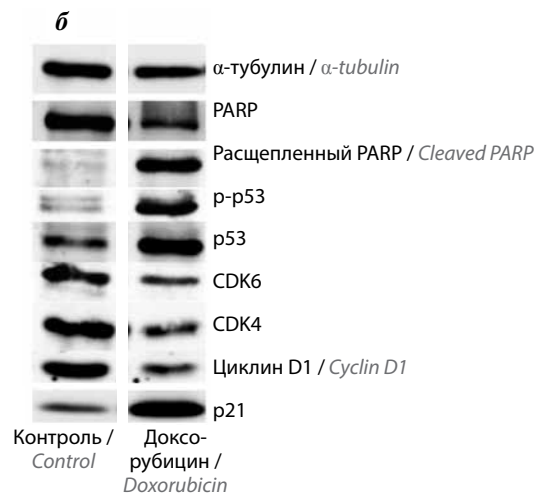


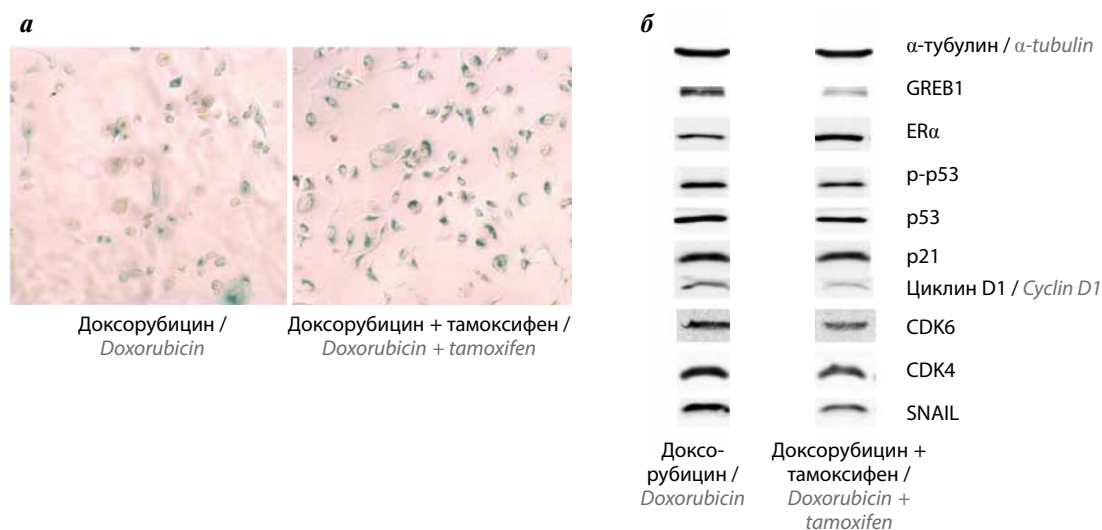
**Рис. 3.** Доксорубин и эстрогеновый сигналинг в клетках MCF-7. Клетки MCF-7 культивировали в течение 3 сут без добавок или в присутствии 0,2 мкМ доксорубина с его последующей отменой на 5 сут. Представлены результаты иммуноблоттинга образцов клеток с антителами к рецептору эстрогенов  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) (а) и определения транскрипционной активности ER $\alpha$  методом репортерного анализа (б)  
**Fig. 3.** Doxorubicin and estrogen signaling in MCF-7 cells. MCF-7 cells were cultured in the absence or in the presence of 0.2  $\mu$ M doxorubicin for 3 days, followed by its withdrawal for 5 days. The results of immunoblotting of cell samples with antibodies to estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) (a) and determination of ER $\alpha$  transcriptional activity by reporter assay (b) are presented

senescence. Анализ профиля сигнальных белков в клетках MCF-7, предобработанных доксорубином, выявил типичную для нерепликативного старения активацию p53 и p21, сопровождавшуюся подавлением экспрессии циклинзависимых киназ CDK 4 и 6 (рис. 2, б).

Результаты исследования влияния доксорубина на эстрогеновый сигналинг показали существенное снижение экспрессии рецептора эстрогенов (рис. 3, а) и подавление транскрипционной активности последнего (рис. 3, б).

**Влияние тамоксифена на доксорубин-индуцированное старение клеток MCF-7.** В какой мере подавление эстрогенового сигналинга ассоциировано с развитием доксорубин-индуцированного старения? Для ответа на этот вопрос проведен анализ влияния антиэстрогена тамоксифена на эффективность нерепликативного старения клеток. Обнаружено, что культивирование клеток MCF-7, предобработанных доксорубином, в присутствии тамоксифена сопровождается значительным повышением активности  $\beta$ -галактозидазы (рис. 4, а). Тамоксифен приводит к подавлению эстрогенового сиг-



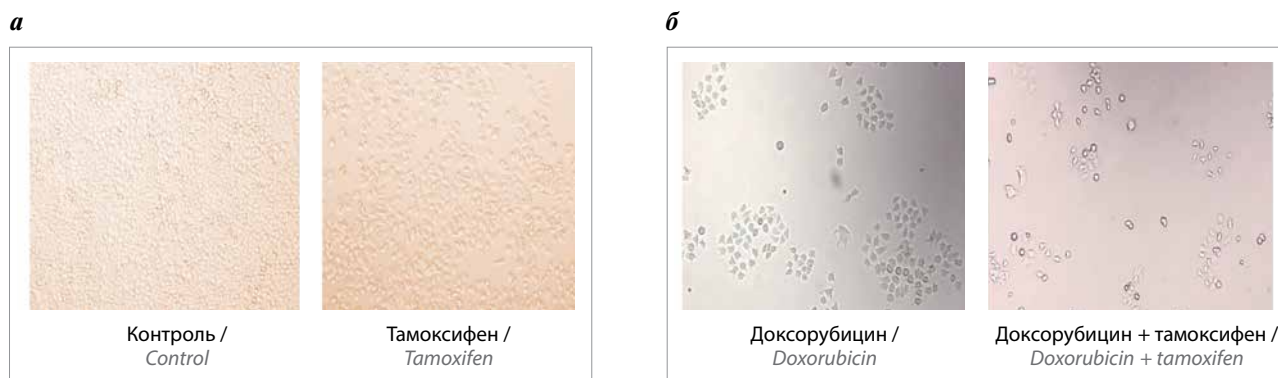


**Рис. 4.** Влияние тамоксифена на активность  $\beta$ -галактозидазы и профиль сигнальных белков в клетках MCF-7, предобработанных доксорубицином: а — окраска на  $\beta$ -галактозидазу; б — иммуноблоттинг белков. Клетки MCF-7 культивировали в течение 3 сут в присутствии 0,2 мкМ доксорубицина с его последующей отменой и культивированием в течение 3 сут без добавок (доксорубицин) и в присутствии 5 мкМ тамоксифена (доксорубицин + тамоксифен). Представлены результаты одного из 3 независимых экспериментов

**Fig. 4.** Effect of tamoxifen on  $\beta$ -galactosidase activity and signaling protein profile in MCF-7 cells pretreated with doxorubicin: a — staining for  $\beta$ -galactosidase; б — immunoblotting of proteins. MCF-7 cells were cultured for 3 days in the presence of 0.2  $\mu$ M doxorubicin, then withdrawn and cultured for 3 days without additions (doxorubicin) and in the presence of 5  $\mu$ M tamoxifen (doxorubicin + tamoxifen). Results of one of three independent experiments are presented

налинга на фоне практически неизменной экспрессии ER и частичному снижению ростового сигналинга без заметной активации апоптотических белков (рис. 4, б), что поддерживает клетки в состоянии пролиферативного блока и старения. Следует отметить, что действие этого препарата на исходные клетки MCF-7 в отсутствие доксорубицина не сопровождается сколько-нибудь заметным накоплением  $\beta$ -галактозидазы и клеточным старением (рис. 5, а), что свидетельствует о необходимости преактивации апоптотического сигналинга p53/p21 при нерепликативном старении клеток.

При оценке пролиферативного статуса доксорубицин-индуцированных клеток мы показали, что после отмены препарата клетки постепенно, в течение 10 сут, переходят к стадии активной пролиферации. Добавление тамоксифена поддерживает senescence-фенотип клеток и предотвращает реиндукцию опухолевого роста (рис. 5, б). Полученные результаты свидетельствуют о потенциальной способности тамоксифена поддерживать клеточный арест и усиливать эффект преждевременного старения клеток эстрогензависимого РМЖ.



**Рис. 5.** Тамоксифен и регуляция опухолевого роста: а — окраска на  $\beta$ -галактозидазу клеток MCF-7 до (контроль) и после (тамоксифен) культивирования с тамоксифеном (5 мкМ, в течение 3 сут); б — световая микроскопия клеток MCF-7, культивированных в течение 3 сут в присутствии 0,2 мкМ доксорубицина и затем 10 сут в среде без доксорубицина без добавок (доксорубицин) и в присутствии 5 мкМ тамоксифена (доксорубицин + тамоксифен)

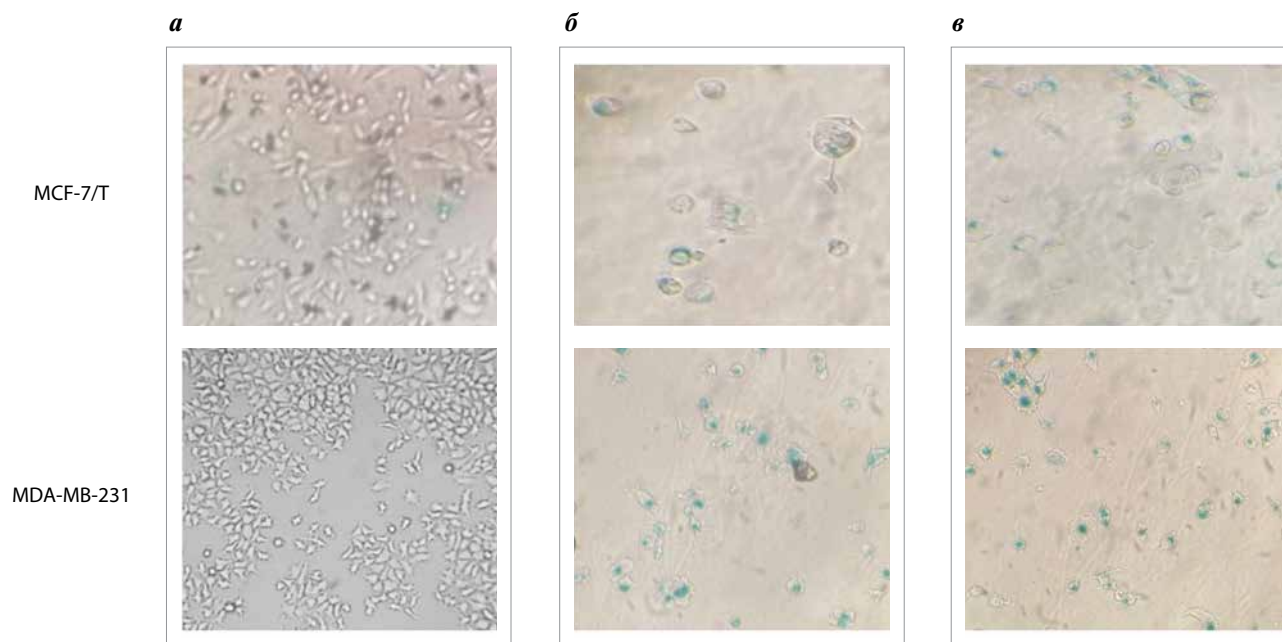
**Fig. 5.** Tamoxifen and regulation of tumor growth: a —  $\beta$ -galactosidase staining of MCF-7 cells before (control) and after (tamoxifen) cultivation with tamoxifen (5  $\mu$ M, 3 days); б — light microscopy of MCF-7 cells cultured for 3 days in the presence of 0.2  $\mu$ M doxorubicin and then 10 days in medium without doxorubicin without additions (doxorubicin) and in the presence of 5  $\mu$ M tamoxifen (doxorubicin + tamoxifen)

**Доксорубин-индуцированное старение клеток эстрогеннезависимого рака молочной железы.** Как известно, резистентность клеток РМЖ к тамоксифену, как врожденная, так и приобретенная, является одним из основных факторов, ограничивающих противоопухолевый эффект гормональной терапии. С учетом описанного выше участие тамоксифена в поддержании доксорубин-индуцированного старения представляло безусловный интерес и обуславливает важность исследования эффективности индуцированного старения в тамоксифенрезистентных клетках РМЖ. Эксперименты проводились на модели врожденной гормональной резистентности — на клетках трижды негативного РМЖ MDA-MB-231 и на клетках с приобретенной резистентностью к тамоксифену MCF-7/T, полученных в результате длительного культивирования родительских клеток MCF-7 с этим препаратом. Как отмечалось выше, выявлено, что чувствительность к рост-ингибирующему действию доксорубина клеток MCF-7 сравнима с чувствительностью клеток MDA-MB-231, в то время как клетки MCF-7/T отличались существенно более высокой чувствительностью к этому препарату (см. рис. 1). Как и в случае с клетками MCF-7, прекультивирование резистентных клеток MCF-7/T и MDA-MB-231 с доксорубином в течение 3 сут приводит к индукции характерных для стареющих клеток изменений: активации  $\beta$ -галактозидазы, клеточному аресту (рис. 6)

и активации p53/p21-сигналинга (рис. 7). При этом резистентные клетки MCF-7/T отличаются значительно более выраженной активацией  $\beta$ -галактозидазы под действием доксорубина, что коррелирует с большей чувствительностью этих клеток к рост-ингибирующему действию данного препарата. Добавление тамоксифена сопровождается дополнительной активацией  $\beta$ -галактозидазы, причем даже в рецептор-отрицательных клетках MDA-MB-231, что свидетельствует о возможных рецепторнезависимых эффектах этого лекарственного средства.

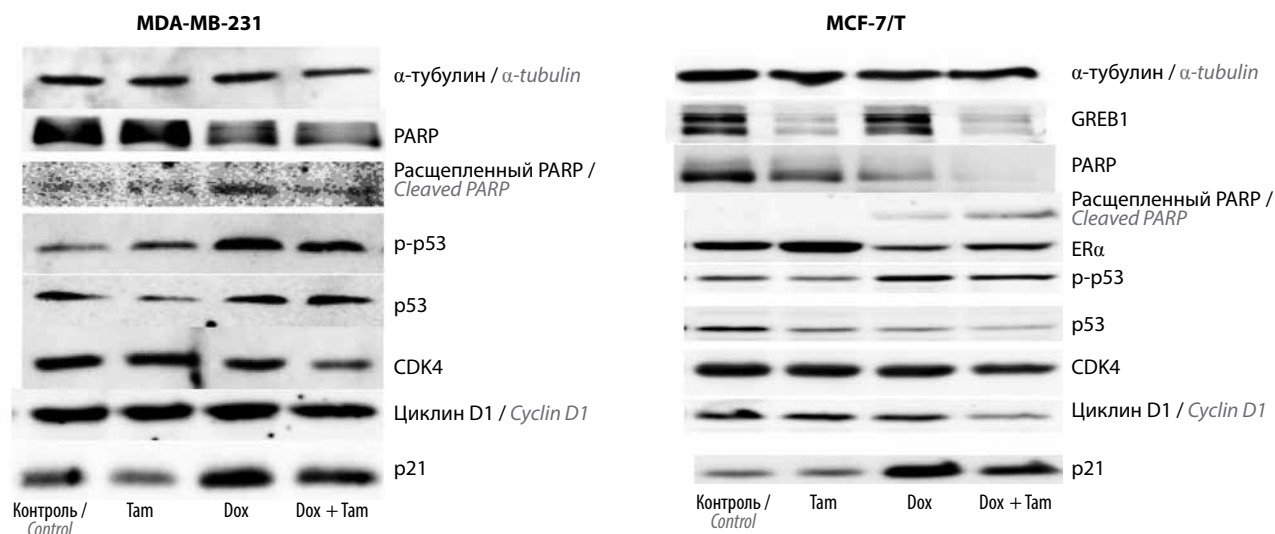
Следует отметить, что если клетки MCF-7 экспрессируют p53 дикого типа, то для клеток MDA-MB-231 характерна онкогенная мутация p53-R280K, блокирующая апоптотический потенциал p53 [23]. Согласно представленным результатам, несмотря на мутантный p53, клетки MDA-MB-231 отвечают на доксорубин и активацией p21 — одного из основных физиологических блокаторов клеточного цикла, и остановкой клеточного деления, что свидетельствует о реализации в данном случае p53-независимого механизма блока пролиферации и апоптоза.

В целом полученные данные свидетельствуют о плейотропных эффектах тамоксифена в клетках РМЖ, приводящих, в том числе в эстрогеннезависимых клетках, к частичному клеточному аресту и дополнительной стимуляции нерепликативного старения.



**Рис. 6.** Тамоксифен и резистентные клетки. Клетки MCF-7/T и MDA-MB-231 культивировали в течение 3 сут без добавок (а) и в присутствии 0,2 мкМ доксорубина (б, в) с последующей отменой доксорубина и продолжением культивирования без добавок (б) и в присутствии 5 мкМ тамоксифена (в) в течение 3 сут. Окраска на  $\beta$ -галактозидазу

**Fig. 6.** Tamoxifen and resistant cells. MCF-7/T and MDA-MB-231 cells were cultured for 3 days without additions (a) and in the presence of 0.2  $\mu$ M doxorubicin (б, в), followed by withdrawal of doxorubicin and continued cultivation without additions (б) and in the presence of 5  $\mu$ M tamoxifen (C) for 3 days. Staining for  $\beta$ -galactosidase

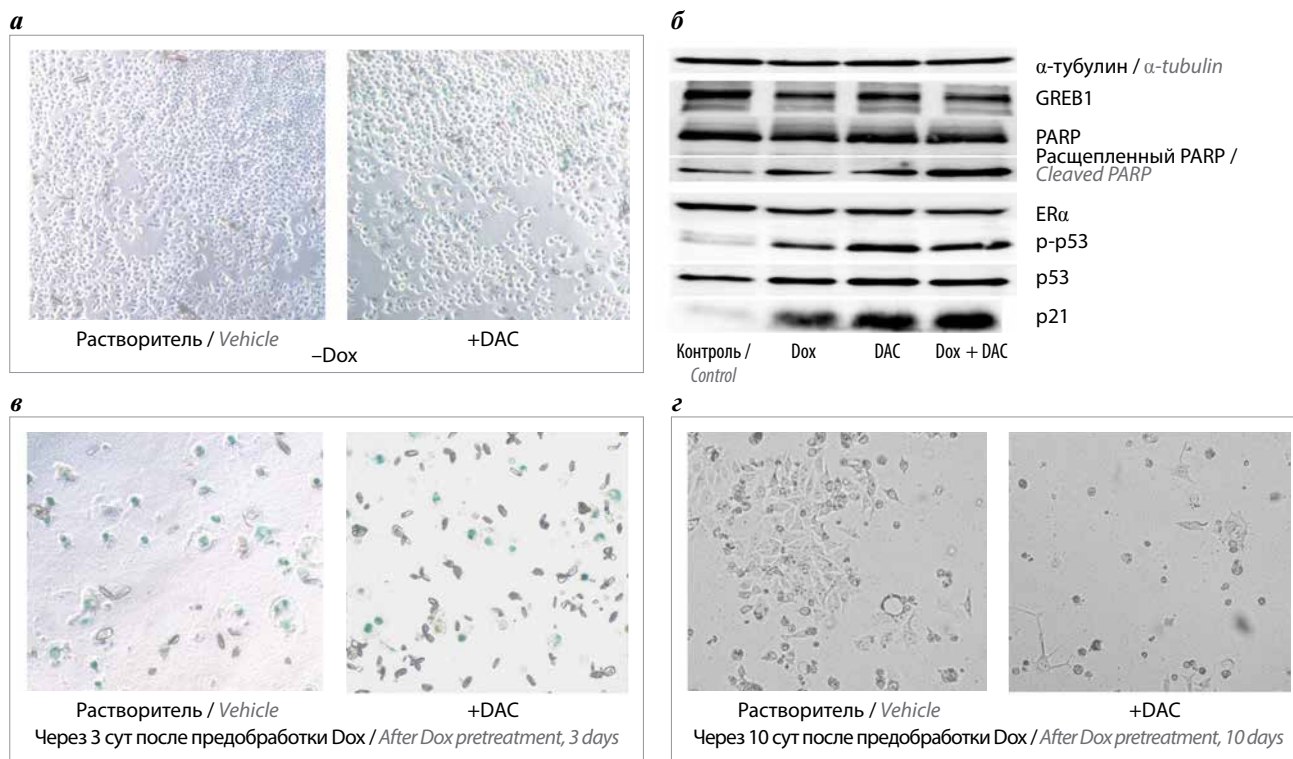


**Рис. 7.** Тамоксифен и резистентные клетки: иммуноблоттинг образцов клеток. Клетки MCF-7/T и MDA-MB-231 культивировали с доксорубицином (Dox) и тамоксифеном (Tam) по схеме, приведенной на рис. 6. Представлены результаты одного из 3 независимых экспериментов. ERα — рецептор эстрогенов α.

**Fig. 7.** Tamoxifen and resistant cells: Immunoblotting of cell samples. MCF-7/T and MDA-MB-231 cells were cultured with doxorubicin (Dox) and tamoxifen (Tam) as shown in fig. 6. Results from one of three independent experiments are shown. ERα — estrogen receptor α.

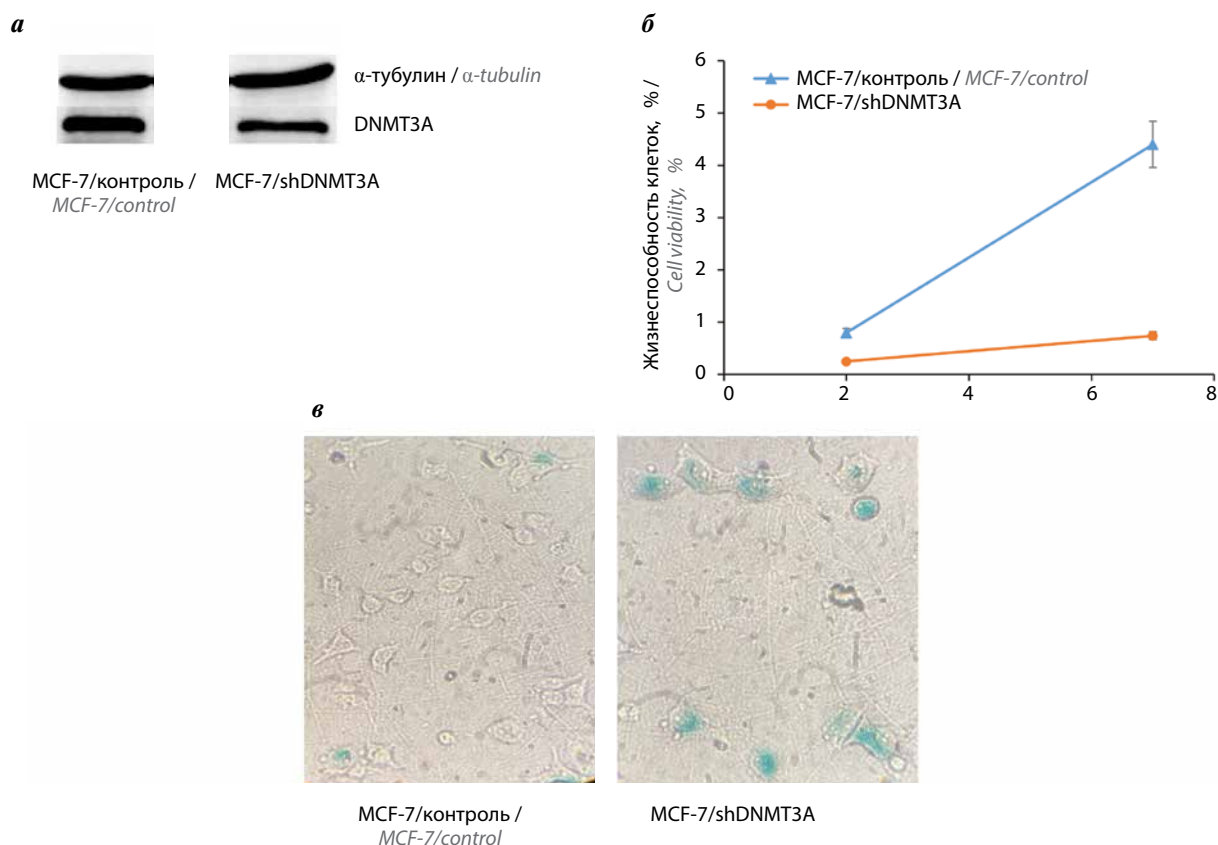
**ДНК метилтрансферазы, апоптотический сигналинг и нерепликативное старение.** Согласно полученным ранее данным, длительное культивирование клеток MCF-7 с тамоксифеном приводит к выраженному по-

давлению экспрессии и активности DNMT3A. Мы продемонстрировали, что формирование эстрогеннезависимого фенотипа может быть ассоциировано с конститутивным подавлением DNMT3A и активацией



**Рис. 8.** Децитабин и доксорубин-индуцированное старение клеток MCF-7. Клетки MCF-7 без обработки (а) и предобработанные доксорубицином (Dox) (б) культивировали в отсутствие или в присутствии ингибитора DNMT децитабина (DAC) в течение 3 сут с последующим определением активности β-галактозидазы, затем проводили иммуноблоттинг клеточных экстрактов (в). Восстановление клеточного роста через 10 сут после предобработки доксорубицином и культивирования клеток с децитабином — световая микроскопия (г). ERα — рецептор эстрогенов α.

**Fig. 8.** Decitabine and doxorubicin-induced senescence of MCF-7 cells. MCF-7 cells, untreated (a) and pretreated with doxorubicin (b), were cultured in the absence or presence of the DNMT inhibitor decitabine (DAC) for 3 days, followed by determination of β-galactosidase activity, then immunoblotting was performed of cell extracts (v). Restoration of cell growth 10 days after doxorubicin pretreatment and cell cultivation with decitabine — light microscopy (g). ERα — estrogen receptor α.



**Рис. 9.** Нокдаун ДНК-метилтрансферазы 3A (DNMT3A) и чувствительность клеток MCF-7 к доксорубицин-индуцированному старению. Экспрессия DNMT3A в клетках, трансфицированных shDNMT3A (а). Восстановление роста (б) и активность β-галактозидазы (в) в контрольных и shDNMT3A-трансфицированных клетках после предобработки доксорубицином

**Fig. 9.** DNA-methyltransferase 3A (DNMT3A) knockdown and sensitivity of MCF-7 cells to doxorubicin-induced senescence. DNMT3A expression in shDNMT3A-transfected cells (a). Growth restoration (б) and β-galactosidase activity (в) in control and shDNMT3A-transfected cells after doxorubicin pretreatment

апоптотического сигналинга. Эти изменения характерны также для клеток MCF-7/T и MDA-MB-231 [24].

В проведенных экспериментах для исследования роли DNMT в индукции нерепликативного старения клетки MCF-7 без обработки и предобработанные доксорубицином культивировали в присутствии ингибитора DNMT децитабина с последующим определением активности β-галактозидазы и экспрессии профильных сигнальных белков. Как и в случае с тамоксифеном, действие децитабина на необработанные клетки не приводило к повышению активности β-галактозидазы (рис. 8, а). В то же время культивирование с децитабином клеток, предобработанных доксорубицином, поддерживало высокий уровень β-галактозидазы, сопровождалось стимуляцией в клетках p53-сигналинга (рис. 8, б, в) и приводило к последующему торможению реиндукции опухолевого роста (рис. 8, г).

Участие DNMT3A в регуляции нерепликативного старения подтверждено в экспериментах по нокдауну DNMT3A при трансфекции shRNA DNMT3A. Мы показали, что подавление экспрессии DNMT3A (рис. 9, а) приводит к заметному снижению скорости роста (рис. 9, б)

и поддержанию высокого уровня (рис. 9, в) β-галактозидазы в клетках MCF-7, предобработанных доксорубицином.

В целом полученные данные свидетельствуют о том, что подавление DNMT3A относится к числу факторов, поддерживающих нерепликативное старение опухолевых клеток, и позволяют рассматривать соединения — негативные регуляторы DNMT3A — в качестве агентов, стабилизирующих состояние клеточного старения и предотвращающих реиндукцию опухолевого роста.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Хорошо известно, что одним из ключевых свойств опухолевой клетки является иммортализация — отсутствие репликативного старения, характерного для соматических клеток [25]. В его основе лежит исходно ограниченное (в результате неизбежного сокращения длины теломер, концевых повторов ДНК, при каждом цикле деления) число делений, которое может претерпеть соматическая клетка. В подавляющем большинстве опухолевых клеток репликативное старение не происходит благодаря гиперактивации теломера-

зы — фермента, восстанавливающего длину теломера. Такая способность опухолевых клеток к неограниченному делению во многом определяет высокий уровень злокачественности опухолей, их быстрый рост и распространение по всему организму.

В то же время сравнительно недавно обнаружен эффект так называемого нерепликативного старения опухолевых клеток, индуцированный сублетальными дозами химиопрепаратов или облучением. Клетки после такого воздействия не погибают, но прекращают делиться и постепенно приобретают фенотип классических стареющих клеток (*senescence phenotype*), для которого характерны гиперактивация  $\beta$ -галактозидазы, изменение морфологии, снижение ростового сигналинга и активация апоптотического сигналинга. Характерной особенностью стареющих клеток является формирование специфического секрета — SASP (*senescence-associated secretory phenotypes*), в состав которого входят биологически активные соединения разнонаправленного действия, в том числе цитокины, ростовые факторы, хемокины, проапоптотические факторы и проч. [26, 27]. Установлено, что определенную роль в реализации эффектов SASP играют экзосомы, продуцируемые стареющими клетками и доставляющие в окружающие клетки-реципиенты отдельные факторы SASP [28, 29]. Основное внимание исследователей направлено на изучение дистанционных, пара- и аутокринных эффектов SASP, определяющих собственно дальнейшую судьбу стареющих опухолевых клеток. Существуют 2 варианта нерепликативного старения: оно оказывается необратимым, и в опухолевых клетках в течение неопределенного времени поддерживается *senescence*-фенотип, или происходит реиндукция опухолевого роста, и клетки возвращаются к стадии активной пролиферации. Оба варианта в той или иной степени регулируются факторами SASP [30, 31]. Отдельный интерес представляют паракринные эффекты SASP, а именно — влияние клеток, находящихся в состоянии нерепликативного старения, на окружающие ткани. В первую очередь это индукция *senescence*-подобных и опухолеподобных изменений в окружающих клетках, в том числе хромосомной нестабильности, метаболического репрограммирования, а также активация сигнальных каскадов, что может стимулировать процесс нерепликативного старения или опухолевую трансформацию в окружающей ткани [32].

Современные подходы к исследованию нерепликативного старения опухолевых клеток включают разработку способов предотвращения реиндукции опухолевого роста и поддержания клеток в состоянии *senescence* и поиск и изучение соединений-синолитиков, направленно воздействующих на *senescence*-клетки и снижающих паракринную активность SASP-факторов.

В настоящей работе использована модель доксорубицин-индуцированного старения клеток РМЖ. По данным литературы [33] и результатам нашего ис-

следования, культивирование клеток MCF-7 с сублетальными дозами доксорубицина приводит к формированию характерного фенотипа классических стареющих клеток — пролиферативному блоку, повышению активности  $\beta$ -галактозидазы, активации p53/p21-сигналинга. Установлено, что присутствие антиэстрогена тамоксифена усиливает и поддерживает клеточный арест и сопровождается резким повышением активности  $\beta$ -галактозидазы, что свидетельствует о свойстве этого препарата потенцировать доксорубицин-индуцированное старение клеток РМЖ. Такой же потенцирующий эффект тамоксифена подтвержден в экспериментах на тамоксифенрезистентной сублинии MCF-7/T, отличающейся изначально более высокой чувствительностью к доксорубицину и относительно низкой — к рост-ингибирующему действию тамоксифена. И в наших предыдущих исследованиях, и в работах других авторов отмечалась возможность off-target-эффектов тамоксифена, развивающихся без участия эстрогенового сигналинга [34–36]. Скорее всего, в случае с тамоксифенрезистентными клетками мы сталкиваемся с подобным действием данного препарата, результатом которого является усиление эффектов нерепликативного старения. Подтверждением этому являются результаты экспериментов на клетках трижды негативного РМЖ MDA-MB-231: добавление тамоксифена к доксорубицин-индуцированным клеткам сопровождалось усилением пролиферативного блока и гиперактивацией  $\beta$ -галактозидазы. Таким образом, тамоксифен можно отнести к соединениям, усиливающим и поддерживающим клетки РМЖ в состоянии нерепликативного старения.

Ранее мы обнаружили, что клетки резистентного РМЖ, такие как MCF-7/T и MDA-MB-231, гиперчувствительные к доксорубицин-индуцированному старению, отличаются низким уровнем DNMT3A, и показали возможность негативной регуляции DNMT3A тамоксифеном [24]. Результаты настоящей работы продемонстрировали, что подавление DNMT3A в присутствии децитабина или при нокдауне DNMT3A с помощью shRNA обеспечивает усиление и сохранение *senescence*-фенотипа в клетках MCF-7, что позволяет рассматривать снижение активности DNMT3A как один из факторов, участвующих в поддержании нерепликативного старения клеток.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования установлена возможность усиления и поддержания нерепликативного старения в клетках РМЖ в присутствии антиэстрогена тамоксифена независимо от степени гормональной зависимости клеток, что, скорее всего, является следствием нереперторной активности тамоксифена. Впервые установлено, что подавление экспрессии ДНК метилтрансферазы 3A потенцирует эффект преждевременного старения и предотвращает реиндукцию опухолевого роста в клетках РМЖ.

## Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Di Micco R., Krizhanovsky V., Baker D. et al. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2021;22(2):75–95. DOI: 10.1038/s41580-020-00314-w
- Sedrak M.S., Cohen H.J. The Aging-cancer cycle: mechanisms and opportunities for intervention. *Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2023;78(7):1234–8. DOI: 10.1093/gerona/glac247
- Razgonova M.P., Zakharenko A.M., Golokhvast K.S. et al. Telomerase and telomeres in aging theory and chronographic aging theory (review). *Mol Med Rep* 2020;22(3):1679–94. DOI: 10.3892/mmr.2020.11274
- Hornsby P.J. Telomerase and the aging process. *Exp Gerontol* 2007;42(7):575–81. DOI: 10.1016/j.exger.2007.03.007
- Rossiello F., Jurk D., Passos J.F. et al. Telomere dysfunction in ageing and age-related diseases. *Nat Cell Biol* 2022;24(2):135–47. DOI: 10.1038/s41556-022-00842-x
- Montégut L., López-Otín C., Kroemer G. Aging and cancer. *Mol Cancer* 2024;23(1):106. DOI: 10.1186/s12943-024-02020-z
- Colucci M., Sarill M., Maddalena M. et al. Senescence in cancer. *Cancer Cell* 2025;43(7):1204–26. DOI: 10.1016/j.ccell.2025.05.015
- Schmitt C.A., Wang B., Demaria M. Senescence and cancer – role and therapeutic opportunities. *Nat Rev Clin Oncol* 2022;19(10):619–36. DOI: 10.1038/s41571-022-00668-4
- Wang L., Lankhorst L., Bernards R. Exploiting senescence for the treatment of cancer. *Nat Rev Cancer* 2022;22(6):340–55. DOI: 10.1038/s41568-022-00450-9
- Guillon J., Petit C., Toutain B. et al. Chemotherapy-induced senescence, an adaptive mechanism driving resistance and tumor heterogeneity. *Cell Cycle* 2019;18(19):2385–97. DOI: 10.1080/15384101.2019.1652047
- Bisht A., Avinash D., Sahu K.K. et al. A comprehensive review on doxorubicin: mechanisms, toxicity, clinical trials, combination therapies and nanoformulations in breast cancer. *Drug Deliv Transl Res* 2025;15(1):102–33. DOI: 10.1007/s13346-024-01648-0
- Van der Zanden S.Y., Qiao X., Neeffes J. New insights into the activities and toxicities of the old anticancer drug doxorubicin. *The FEBS J* 2021;288(21):6095–111. DOI: 10.1111/febs.15583
- Arcamone F., Cassinelli G., Fantini G. et al. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng* 1969;11(6):1101–10. DOI: 10.1002/bit.260110607
- Cortés-Funes H., Coronado C. Role of anthracyclines in the era of targeted therapy. *Cardiovasc Toxicol* 2007;7(2):56–60. DOI: 10.1007/s12012-007-0015-3
- Huang Z., Lin S., Long C. et al. Notch signaling pathway mediates Doxorubicin-driven apoptosis in cancers. *Cancer Manag Res* 2018;10:1439–48. DOI: 10.2147/cmars.160315
- Synowiec E., Hoser G., Białkowska-Warzecha J. et al. Doxorubicin differentially induces apoptosis, expression of mitochondrial apoptosis-related genes, and mitochondrial potential in BCR-ABL1-expressing cells sensitive and resistant to imatinib. *BioMed Res Int* 2015;2015:673512. DOI: 10.1155/2015/673512
- Karabici M., Alptekin S., Firtina Karagonlar Z. et al. Doxorubicin-induced senescence promotes stemness and tumorigenicity in EpCAM-/CD133-nonstem cell population in hepatocellular carcinoma cell line, HuH-7. *Mol Oncol* 2021;15(8):2185–202. DOI: 10.1002/1878-0261.12916
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65(1–2):55–63. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4
- Scherbakov A.M., Komkov A.V., Komendantova A.S. et al. Steroidal pyrimidines and dihydropyrimidines as novel classes of anticancer agents against hormone-dependent breast cancer cells. *Front Pharmacol* 2017;8:979. DOI: 10.3389/fphar.2017.00979
- Reid G., Hübner M.R., Métivier R. et al. Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol Cell* 2003;11(3):695–707. DOI: 10.1016/s1097-2765(03)00090-x
- Shchegolev Y., Sorokin D., Scherbakov A. et al. Upregulation of Akt/Raptor signaling is associated with rapamycin resistance of breast cancer cells. *Chem Biol Inter* 2020;330:109243. DOI: 10.1016/j.cbi.2020.109243
- Mruk D.D., Cheng C.Y. Enhanced chemiluminescence (ECL) for routine immunoblotting: An inexpensive alternative to commercially available kits. *Spermatogenesis* 2011;1(2):121–2. DOI: 10.4161/spmg.1.2.16606
- Bae Y.-H., Shin J.-M., Park H.-J. et al. Gain-of-function mutant p53-R280K mediates survival of breast cancer cells. *Genes Genomics* 2014;36(2):171–8. DOI: 10.1007/s13258-013-0154-9
- Andreeva O.E., Sorokin D.V., Vinokurova S.V. et al. The effect of DNA methyltransferase 3A suppression in progression of the resistance phenotype in breast cancer cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2023;10(4):149–56. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-4-149-156
- Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646–74. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013
- Faget D.V., Ren Q., Stewart S.A. Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer. *Nat Rev Cancer* 2019;19(8):439–53. DOI: 10.1038/s41568-019-0156-2
- Niklander S.E., Lambert D.W., Hunter K.D. Senescent cells in cancer: wanted or unwanted citizens. *Cells* 2021;10(12):3315. DOI: 10.3390/cells10123315
- Kadota T., Fujita Y., Yoshioka Y. et al. Emerging role of extracellular vesicles as a senescence-associated secretory phenotype: Insights into the pathophysiology of lung diseases. *Mol Aspects Med* 2018;60:92–103. DOI: 10.1016/j.mam.2017.11.005
- Jakhar R., Crasta K. Exosomes as emerging pro-tumorigenic mediators of the senescence-associated secretory phenotype. *Int J Mol Sci* 2019;20(10):2547. DOI: 10.3390/ijms20102547
- Yamauchi S., Takahashi A. Cellular senescence: mechanisms and relevance to cancer and aging. *J Biochem* 2025;177(3):163–9. DOI: 10.1093/jb/mvae079
- Shimizu K., Inuzuka H., Tokunaga F. The interplay between cell death and senescence in cancer. *Sem Cancer Biol* 2025;108:1–16. DOI: 10.1016/j.semcancer.2024.11.001
- Gorgoulis V., Adams P.D., Alimonti A. et al. Cellular Senescence: defining a path forward. *Cell* 2019;179(4):813–27. DOI: 10.1016/j.cell.2019.10.005
- Ewald J. A., Desotelle J.A., Wilding G. et al. Therapy-induced senescence in cancer. *J Nat Cancer Inst* 2010;102(20):1536–46. DOI: 10.1093/jnci/djq364
- Semreen M.H., Alniss H., Cacciatore S. et al. GC-MS based comparative metabolomic analysis of MCF-7 and MDA-MB-231 cancer cells treated with tamoxifen and/or paclitaxel. *J Proteomics* 2020;225:103875. DOI: 10.1016/j.jpro.2020.103875
- Lin H., Ai D., Liu Q. et al. Natural isoflavone glabridin targets PI3Kγ as an adjuvant to increase the sensitivity of MDA-MB-231 to tamoxifen and DU145 to paclitaxel. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2024;236:106426. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2023.106426
- Sorokin D., Shchegolev Y., Scherbakov A. et al. Metformin restores the drug sensitivity of mcf-7 cells resistant derivatives via the cooperative modulation of growth and apoptotic-related pathways. *Pharmaceuticals (Basel)* 2020;13(9):206. DOI: 10.3390/ph13090206

**Вклад авторов**

Е.И. Михаевич, П.Б. Копнин: постановка экспериментов, анализ результатов, подготовка иллюстративного материала, редактирование;  
О.Е. Андреева, Д.В. Сорокин: постановка экспериментов, анализ результатов;  
А.М. Щербаков, М.В. Гудкова: анализ результатов, подготовка иллюстративного материала, редактирование;  
М.А. Красильников: разработка концепции и дизайна экспериментов; анализ результатов, подготовка иллюстративного материала, написание текста статьи.

**Authors' contributions**

E.I. Mikhaevich, P.B. Kopnin: setting up experiments, analyzing results, preparing illustrative material, editing;  
O.E. Andreeva, D.V. Sorokin: setting up experiments, analyzing the results;  
A.M. Scherbakov, M.V. Gudkova: analysis of results, preparation of illustrative material, editing;  
M.A. Krasil'nikov: development of the concept and design of experiments; analysis of results, preparation of illustrative material, article writing.

**ORCID авторов / ORCID of authors**

Е.И. Михаевич / E.I. Mikhaevich: <https://orcid.org/0000-0002-1299-9080>  
О.Е. Андреева / O.E. Andreeva: <https://orcid.org/0000-0002-6015-6619>  
Д.В. Сорокин / D.V. Sorokin: <https://orcid.org/0000-0002-1264-7405>  
А.М. Щербаков / A.M. Scherbakov: <https://orcid.org/0000-0002-2974-9555>  
П.Б. Копнин / P.B. Kopnin: <https://orcid.org/0000-0002-2078-4274>  
М.В. Гудкова / M.V. Gudkova: <https://orcid.org/0000-0003-2694-5232>  
М.А. Красильников / M.A. Krasil'nikov: <https://orcid.org/0000-0002-5902-7633>

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

**Conflicts of interest.** All authors declared that there are no conflicts of interest.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 24-15-00173; <https://rscf.ru/project/24-15-00173/>).

**Funding.** This work was supported by Russian Science Foundation (grant No. 24-15-00173; <https://rscf.ru/project/24-15-00173/>).

Статья поступила: 18.07.2025. Принята к публикации: 01.08.2025. Опубликована онлайн: 06.10.2025.

Article submitted: 18.07.2025. Accepted for publication: 01.08.2025. Published online: 06.10.2025.