

ИЗМЕНЕНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО И ЛИЗОСОМНОГО КОМПАРТМЕНТОВ В УСЛОВИЯХ ХИМИОИНДУЦИРОВАННОЙ СЕНЕСЦЕНТНОСТИ

Р. О. Шаталова, Д. В. Шевырев 

Научный центр трансляционной медицины, Научно-технологический университет «Сириус», Федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

Старение связано с накоплением сенесцентных клеток, для которых характерно изменение функций, укорочение теломер, остановка клеточного цикла, устойчивость к апоптозу и метаболические нарушения. В последние годы широко изучают различные аспекты сенесценции не только в контексте старения, но и в отношении терапии опухолей, так как сенесценция в различных клетках опухоли может по-разному влиять на ход патологического процесса. Целью исследования было провести сравнительный анализ распространенных химиотерапевтических препаратов в контексте индукции сенесценции и влияния на митохондриальный и лизосомный компартменты фибробластов, выделенных из кожи мышей линии C57BL/6. Сенесценция клеток оценивали с помощью хромогенного и флуоресцентного методов определения активности фермента β -Gal. Окрашивание митохондрий проводили с использованием потенциалзависимого красителя MitoTracker® Orange, лизосомы окрашивали с помощью LysoTracker® Red. Для анализа использовали проточный цитометр BD LSRFortessa. В результате было выявлено значительное снижение митохондриального потенциала и усиление интенсивности флуоресценции лизосом в клетках с химиоиндуцированной сенесценцией. Использование разработанного нами интегрального индекса индукции сенесценции позволило установить, что влияние доксорубицина с точки зрения индукции сенесценции и влияния на митохондриальный и лизосомный компартменты выражено сильнее, чем у цисплатина, блеомицина и этопозида.

Ключевые слова: сенесценция, β -галактозидаза, SA- β -Gal, митохондрии, лизосомы, доксорубицин, цисплатин, блеомицин, этопозид

Финансирование: данная работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда, проект № 24-15-20003 <https://rscf.ru/project/24-15-20003/> (дата доступа 03 сентября 2025 г.).

Вклад авторов: Р. О. Шаталова — отработка условий культивирования, окрашивание клеток; Д. В. Шевырев — оформление рукописи, проведение проточной цитометрии, обработка данных цитометрии, статистическая обработка данных, концептуализация.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом университета «Сириус» (протокол заседания № 7.1 от 12 апреля 2024 г.), проведено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации.

 **Для корреспонденции:** Даниил Вадимович Шевырев
Олимпийский проспект, д. 1, г. Сочи, 354349, Россия; dr.daniil25@mail.ru; shevyrev.dv@talantiuspeh.ru

Статья получена: 06.09.2025 Статья принята к печати: 06.10.2025 Опубликована онлайн: 19.10.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.045

Авторские права: © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ALTERATIONS IN MITOCHONDRIAL AND LYSOSOMAL COMPARTMENTS UNDER CHEMOTHERAPY-INDUCED SENESCENCE

Shatalova RO, Shevyrev DV 

Translational Medicine Research Center, Sirius University of Science and Technology, Sirius Federal Territory, Krasnodar Krai, Russia

Cellular senescence is associated with the accumulation of senescent cells characterized by functional alterations, telomere shortening, cell cycle arrest, resistance to apoptosis, and metabolic dysregulation. In recent years, senescence has been extensively investigated not only in the context of aging but also in relation to cancer therapy, as senescence induction in various tumor cell types may differentially influence disease progression. The aim of this study was to comparatively evaluate commonly used chemotherapeutic agents with respect to their ability to induce senescence and their effects on mitochondrial and lysosomal compartments in primary dermal fibroblasts isolated from C57BL/6 mice. Cellular senescence was assessed using both chromogenic and fluorescent assays for β -galactosidase (β -Gal) activity. Mitochondria were labeled with the potential-sensitive dye MitoTracker® Orange, and lysosomes were stained with LysoTracker® Red. Flow cytometry analysis was performed using a BD LSRFortessa cytometer. Our results revealed a significant decrease in mitochondrial membrane potential and an increase in lysosomal fluorescence intensity in cells undergoing chemotherapy-induced senescence. Using an integrative senescence induction index developed in our laboratory, we demonstrated that doxorubicin exerts a more pronounced effect on senescence induction and on mitochondrial and lysosomal compartments compared to cisplatin, bleomycin, and etoposide.

Keywords: senescence, β -galactosidase, SA- β -Gal, mitochondria, lysosomes, doxorubicin, cisplatin, bleomycin, etoposide

Funding: This work was supported by Russian Science Foundation, Project No. 24-15-20003 (<https://rscf.ru/project/24-15-20003/> accessed September 3, 2025).

Author contribution: Shatalova RO — optimization of cell culture conditions, cell staining; Shevyrev DV — manuscript preparation, flow cytometry experiments, cytometry data processing, statistical analysis, conceptualization.

Compliance with ethical standards: The study was approved by the Ethics Committee of Sirius University (Protocol No. 7.1, April 12, 2024) and conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki.

 **Correspondence should be addressed:** Daniil V. Shevyrev
1 Olimpiyskiy Avenue, Sochi, 354349, Russia; Email: dr.daniil25@mail.ru; shevyrev.dv@talantiuspeh.ru

Received: 06.09.2025 Accepted: 06.10.2025 Published online: 19.10.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.045

Copyright: © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

В последние годы интерес к изучению клеточного старения и сенесцентности значительно возрос. Возрастное накопление сенесцентных клеток приводит к нарушению тканевых функций, а на системном уровне — к вялотекущему воспалению из-за продукции сенесцентными клетками ряда воспалительных факторов SASP (от англ. senescence associated secretory phenotype) [1, 2]. В отношении онкологических процессов роль сенесцентности двойственна — она может способствовать остановке роста опухоли, но при этом поддерживать выживание опухолевых клеток и создавать благоприятные условия для метастазирования [3, 4]. Например, сенесцентные опухоль-ассоциированные фибробласты формируют провоспалительное, ангиогенное и метаболически активное микроокружение, которое способствует выживанию и прогрессированию опухоли [5, 6]. Переход в сенесцентность может происходить под влиянием различных стрессов — от пролиферативного истощения до воздействия негативных физических, химических и биологических факторов, вызывающих различные нарушения в молекулярном аппарате клетки [7]. Метаболические сдвиги, которые происходят в сенесцентных клетках, связаны с нарушением работы митохондрий и переходом к анаэробному гликолизу, а также с нарушением процессов аутофагии [8, 9]. Снижение экспрессии генов FIS1, DRP1, MFF, отвечающих за разделение митохондрий, наряду с усилением экспрессии генов слияния MFN1 и MFN2 приводит к нарушению митохондриальной динамики в сенесцентных клетках [10, 11]. Результатом является увеличение массы митохондрий с формированием трубчатой митохондриальной сети, что в целом повышает устойчивость к окислительному стрессу через PINK1-опосредованный путь [12]. Иногда такие изменения рассматривают как один из способов адаптации к клеточному стрессу, и когда на начальных этапах перехода в сенесцентное состояние аэробная активность митохондрий еще сохранена, увеличение массы митохондрий создает риск избыточной продукции активных форм кислорода (АФК). Таким образом, подобное изменение морфологии митохондрий само по себе провоцирует клеточный стресс и способствует формированию провоспалительного фенотипа SASP [13]. Дальнейшее развитие митохондриальной дисфункции связано со снижением интенсивности окислительного фосфорилирования и переходом к анаэробному гликолизу, что отражается в снижении мембранныго потенциала митохондрий, приводит к снижению продукции АТФ и повышенному образованию АФК [14]. Избыток АФК и дефицит АТФ снижают активность вакуолярной АТФазы, что ведет к повышению рН лизосом и нарушает работу кислых гидролаз (протеаз, липаз и нуклеаз) [15, 16]. Вследствие этого снижается эффективность аутофагии, происходит накопление поврежденных белков и органелл (в том числе митохондрий), что в свою очередь усугубляет клеточный стресс [17]. Стress-индуцированная активация PI3K/Akt-пути, аутокринное влияние факторов SASP и накопление поврежденных белков активирует фактор mTOR, который в свою очередь подавляет активность главного регулятора биогенеза и регенерации лизосом — TFEB [18]. Это приводит к нарушению деградации содеримого аутофагосом и в клетке накапливаются поврежденные защелоченные лизосомы, которые перестают перерабатывать поврежденный материал и выступают скорее в роли хранилища [15, 19]. Гипертрофия лизосомного аппарата сопровождается компенсаторным повышением активности β -галактозидазы, которая

начинает проявлять активность в неоптимальном рН, близком к 6,0 (ассоциированная с сенесцентностью β -галактозидаза — SA- β -Gal) [20]. Это позволяет использовать оценку активности этого фермента в качестве маркера сенесцентных клеток [21].

В настоящее время существуют различные модели для изучения сенесцентности, как *in vivo*, так и *in vitro*. Цель данной работы — провести сравнительный анализ препаратов для химиотерапии (доксорубицин, цисплатин, блеомицин и этопозид) по способности индуцировать сенесцентность в культуре фибробластов кожи мышей, а также изучить сопутствующие изменения в митохондриальном и лизосомном компартментах, которые отражают ключевые аспекты метаболического и функционального состояния клеток и имеют большое значение для формирования и поддержания сенесцентного фенотипа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использовали первичные фибробласты кожи, полученные от мышей линии C57BL/6 в возрасте 4 и 19 месяцев (самцы). Животных содержали в виварии при 12-часовом световом цикле и обеспечивали неограниченным доступом к воде и стандартным сбалансированным лабораторным кормом. Эвтаназию осуществляли в соответствии с принципами гуманного обращения с лабораторными животными: под глубокой анестезией, индуцированной изофлураном, с последующей цервикальной дислокацией. Сразу после процедуры проводили забор необходимых биологических материалов. Анализ проводили на клетках молодых и старых мышей, так как предварительные тесты не выявили различий у клеток, полученных от мышей разного возраста, но находящихся на одном пассаже.

Выделение фибробластов кожи

Эвтаназию мышей проводили опытные специалисты с помощью цервикальной дислокации. Спинку выбирали триммером для животных, затем проводили дезинфекцию кожи 70%-м этиловым спиртом с экспозицией 2 мин до полного высыхания спирта. Участок кожи 2 × 2 см аккуратно отделяли с помощью стерильных ножниц и помещали в стерильный раствор холодного PBS с 1%-м раствором пенициллина-стрептомицина и 0,1%-м раствором хлоргексидина на 5 мин. Затем кожу промывали стерильным PBS и переносили в чашку Петри с холодным PBS. С помощью стерильных инструментов аккуратно удаляли подкожную жировую клетчатку, после чего лоскут кожи измельчали до фрагментов размером 1 мм^2 . Дальнейшую диссоциацию проводили в среде DMEM/F12 («ПанЭко», Россия) с добавлением коллагеназы IV до финальной концентрации 0,2% (Gibco, США) при 37 °C в течение 3 ч с периодическим помешиванием. После инкубации инактивацию фермента проводили добавлением 100%-й фетальной бычьей сыворотки FBS (Capricorn Scientific, Германия) до финальной концентрации 20%. Полученную суспензию фильтровали через сито с диаметром пор 40 $\mu\text{м}$ и отмывали центрифугированием в течение 5 мин при ускорении 300 г. Осадок мягко ресуспенсировали и высевали клетки в шестилуночные адгезионные планшеты (Fudau Biotech, Китай) в среде DMEM/F12 с 10% FBS и 1%-м раствором пенициллина-стрептомицина. Клетки инкубировали при 37 °C в атмосфере 5% CO_2 и пересевали по достижении конфлюэнтности 85%.

Оценка активности SA- β -Gal

Активность SA- β -Gal оценивали с помощью хромогенного субстрата β -галактозидазы — 5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-галактопиранозида (X-Gal), который при гидролизе ферментом приобретает интенсивное синее окрашивание. β -Галактозидаза присутствует в лизосомах большинства клеток и действует в оптимальном pH~4,2. Поэтому для селективного обнаружения сенесцентных клеток с повышенной активностью этого фермента окрашивание проводили при pH~6,0. Для этого клетки отмывали раствором PBS и фиксировали в 0,2%-м растворе глутаральдегида в течение 10 мин при комнатной температуре с последующим отмыванием раствором PBS. Окрашивание проводили в растворе со следующими концентрациями: 2-мМ цитратно-фосфатный буфер (pH 6,0), 50 мМ K₃[Fe(CN)₆], 50 мМ K₄[Fe(CN)₆], 5 мМ NaCl, 1 мМ MgCl₂ и 20 мг/мл X-Gal (в ДМСО) («СибЭнзим», Россия). После добавления окрашивающего буфера клетки переносили в термостат и инкубировали при 37 °C (атмосферный воздух) в течение 20–24 ч. Затем клетки дважды отмывали раствором PBS и визуализировали с помощью микроскопа AxioScope 5 (Carl Zeiss, Германия). Процентное содержание SA- β -Gal-позитивных клеток определяли вручную, подсчет проводился минимум в 3 полях зрения трех независимых лунок для каждого условия культивирования.

Для оценки активности SA- β -Gal в живых фибробластах использовали витальный краситель SPiDER- β Gal Cellular Senescence Detection Kit (Dojindo Laboratories, Япония), который также представляет собой флуоресцентный субстрат, специфичный для β -Gal. Для этого фибробlastы, культивируемые в 24-луночном планшете (NEST Biotechnologies, Китай), инкубировали в 1 мл полной среды в течение 1 ч в CO₂-инкубаторе при 37 °C с добавлением бафиломицина A1, который защелачивает лизосомы, подавляя активность вакуолярной АТФазы. Далее к клеткам добавляли субстрат SPiDER в конечной концентрации 1 мкмоль/л и инкубировали при тех же условиях на протяжении 1 ч. Избыток субстрата отмывали раствором PBS. Клетки снимали раствором трипсина-ЭДТА 0,25% и анализировали на проточном цитометре BD LSRFortessa (США).

Индукция сенесценции

Для индукции сенесценции использовали препараты для химиотерапии злокачественных заболеваний — доксорубицин, цисплатин, блеомицин и этопозид. Доксорубицин — это противоопухолевый антибиотик антрациклинового ряда, механизм действия которого связан с интеркаляцией между цепями ДНК и подавлением топоизомеразы II, что приводит к остановке репликации. Кроме того, доксорубицин усиливает выработку свободных радикалов хинонового типа, а также вытесняет гистоны из транскрипционно активного хроматина [22]. В целом его действие приводит к повреждению ДНК, а также транскриптомным и эпигенетическим нарушениям. Клетки чувствительны к препарату в S- и G2-фазах [22]. Цисплатин — это алкилирующий цитотоксический препарат, который вызывает образование внутринитевых и межнитевых сшивок ДНК, что приводит к нарушению репликации и транскрипции. Цисплатин вызывает остановку на стадии G1-, S- или G2-фазы клеточного цикла [23]. Блеомицин — это противоопухолевый препарат из группы гликопептидных

антибиотиков, который вызывает разрывы цепочек ДНК, по-видимому, благодаря продукции свободных радикалов. Блеомицин блокирует раннюю стадию G2-фазы клеточного цикла [24]. Этотозид — противоопухолевый препарат, который связывается с топоизомеразой II и блокирует ее действие. Это нарушает восстановление разрывов цепей ДНК, созданных топоизомеразой II для релаксации суперспиралей ДНК. Этотозид преимущественно действует в фазах G2 и S клеточного цикла [25]. В целом данные препараты вызывают генотоксический стресс — один из основных факторов развития сенесценции. По данным литературы для каждого индуктора был выбран диапазон тестируемых концентраций: для доксорубицина — 250, 350 и 450 нМ, для цисплатина — 5, 10 и 20 мкМ, для блеомицина — 10, 14 и 25 мкМ, для этотозида — 5, 10 и 20 мкМ. Для всех индукторов в средних и высоких концентрациях наблюдали выраженный цитотоксический эффект и гибель большинства клеток в первые 3–4 дня культивирования, что не соответствовало целям исследования. Анализ жизнеспособности проводили на лазерном микроскопе EVOSTM M5000 (ThermoFisher Scientific, США) при помощи акридинового оранжевого АО (визуализирует все ядроодержащие клетки) и пропидия йодида PI (окрашивает мертвые клетки). При низких дозах цитотоксический эффект был менее выражен, большинство клеток выживало и приобретало признаки сенесценции, что подтверждалось окрашиванием на X-Gal. В итоге была выбрана минимальная из тестируемых концентраций для каждого индуктора, когда жизнеспособность на 7-й день составляла более 95%. Клетки высевали в 24-луночные планшеты в среду DMEM/F12 («ПанЭко», Россия), содержащую 10% FBS (Capricorn Scientific, Германия), 2 мМ L-глутамин и 1% пенициллина-стрептомицина («ПанЭко», Россия), и инкубировали при температуре 37 °C и 5% CO₂ до достижения 60–70% конфлюэнтности. Затем среду меняли на 1% FBS и в соответствующие лунки вносили индукторы в итоговых концентрациях: 250 нМ раствор доксорубицина, 5 мкМ раствор цисплатина, 10 мкМ раствор блеомицина и 5 мкМ раствор этотозида. Инкубировали в стандартных условиях в течение 24 ч, затем тщательно отмывали и продолжали инкубировать в течение 6 дней в среде DMEM/F12 с 1% FBS, 2 мМ L-глутамина и 1% пенициллина-стрептомицина, обновление среды проводили каждые три дня. Также использовали контроли — культивирование в 10% FBS и в 1% FBS без добавления индукторов. Далее проводили окрашивание на X-Gal, SPiDER, а также окрашивание мито- и лизотрекерами.

Окрашивание митохондрий и лизосом

Окрашивание митохондрий проводили в 24-луночных планшетах (NEST Biotechnologies, Китай) с помощью потенциалзависимого красителя MitoTracker Orange CMTM Ros (Invitrogen, США) в концентрации 0,4 μ M в среде DMEM/F12, содержащей 1% FBS, в инкубаторе при 37 °C и атмосфере 5% CO₂ в течение 30 минут. MitoTracker Orange свободно диффундирует через мембранны живых клеток и избирательно накапливается в активных митохондриях в зависимости от мембранныного потенциала. Окрашивание лизосом проводили в аналогичных условиях с помощью ацидотропного флуоресцентного зонда LysoTracker® Red DND-99 (Invitrogen, США) в концентрации 50 нМ, который в нейтральной среде свободно проникает через мембранны живых клеток. В кислой среде лизосома слабоосновная

часть протонируется и зонд теряет способность свободно проходить через мембранны. Это обеспечивает локальное накопление и четкое окрашивание кислых органелл, таких как лизосомы.

После окрашивания клетки снимали раствором трипсина-ЭДТА 0,25% и анализировали с помощью проточной цитометрии.

Статистический анализ

Обработку данных проточной цитометрии проводили с помощью программного обеспечения BD FACSDiva v9.0 и пакета программ FlowJo 10.8.1. Анализировали не менее 500 событий на образец, среднее число событий на образец составляло 2500. Статистический анализ данных проводили с помощью программы GraphPad Prism 9.3.1. Проверку выборок на соответствие распределению Гаусса осуществляли с помощью критерия Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова. Множественное сравнение выборок проводили методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим апостериорным анализом тестом Шидака. Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения ($Mean \pm SD$) для нормальных распределений и медианы и интерквартильного размаха ($Me \pm IQR$), если распределение не соответствовало распределению Гаусса.

Для сравнения выраженности воздействия препаратов мы применили интегральный индекс индукции сенесцентности (IISI), позволяющий комплексно оценить выраженность сенесцентного фенотипа по активности SA- β -Gal с учетом влияния на митохондрии и лизосомы клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При анализе индукции сенесцентности в первичных фибробластах кожи мыши с использованием хромогенного субстрата X-Gal было установлено, что все четыре индуктора — доксорубицин, цисплатин, блеомицин и этопозид — достоверно повышают долю сенесцентных клеток по сравнению с контролем (рис. 1).

А

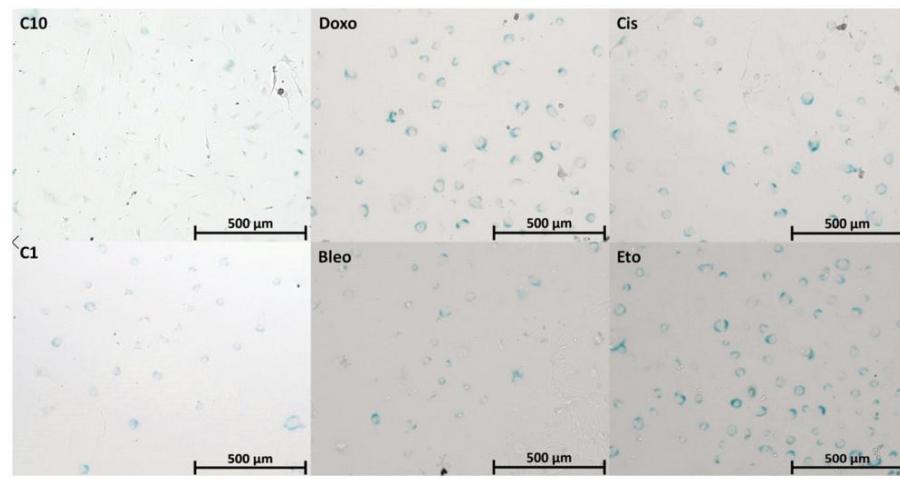


Рис. 1. А. Пример визуализации хромогенного окрашивания X-Gal в разных условиях культивирования. C10 — культивирование в 10% FBS, C1 — культивирование в 1% FBS, Doxo — доксорубицин, Cis — цисплатин, Bleo — блеомицин, Eto — этопозид. **Б.** Сравнительный анализ содержания SA- β -Gal-позитивных клеток в различных условиях культивирования (ANOVA, post hoc — тест Шидака, обсчет в девяти полях зрения в трех независимых лунках для каждого условия; Mean \pm SD; ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,005$, **** — $p < 0,001$).

Характерное синее окрашивание локализовалось преимущественно в цитоплазме фибробластов вокруг ядра и было равномерно выражено для всех индукторов (рис. 1А). Примечательно, что в условиях сывороточного голодания также наблюдалось повышение числа SA- β -Gal-позитивных клеток ($39 \pm 12\%$) в сравнении с культивированием при нормальном содержании сыворотки ($23 \pm 11\%$). Тем не менее, во всех условиях, где применяли индукторы, содержание SA- β -Gal-положительных клеток было значительно выше (60–87%) и под воздействием доксорубицина достигало $87,8 \pm 4,5\%$ (рис. 1В).

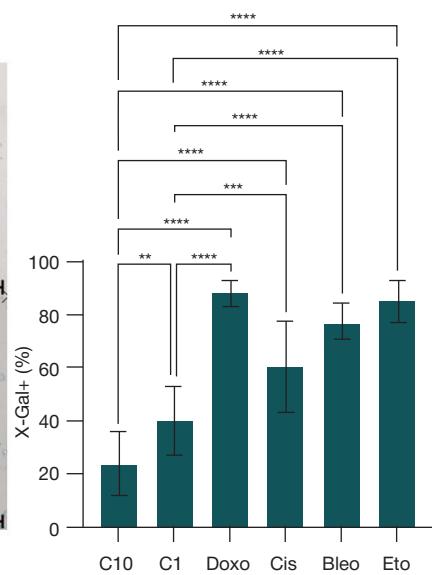
На следующем этапе проводили анализ индукции сенесцентности с помощью флуорогенного субстрата SPiDER в живых клетках методом проточной цитометрии. При оценке содержания SA- β -Gal-позитивных клеток границы популяции определяли по негативному контролю с бафиломицином A1 без добавления флуорогенного субстрата SPiDER. Результаты были сопоставимы с использованием X-Gal и паттерны распределения SA- β -Gal-позитивных клеток под воздействием индукторов были аналогичны при оценке двумя независимыми методами (рис. 2А, Б).

При оценке митохондриального компартмента были выявлены любопытные изменения (рис. 2В, Г). Интенсивность флуоресценции в канале детекции митотрекера (561-585/15) была относительно высокой при культивировании в полной среде, но в условиях сывороточного голодания значительно возрастила. При этом под воздействием индукторов сенесцентности ожидаемо происходило значимое снижение интенсивности флуоресценции, которое было особенно выраженным для доксорубицина.

Изменения затронули и лизосомный компартмент — при культивировании в нормальных условиях и при сывороточном голодании интенсивность флуоресценции в канале детекции лизотрекера (561-610/20) была сопоставимой, в то время как под воздействием индукторов значительно возрастила, достигая наибольших значений под влиянием доксорубицина и этопозида (рис. 2Д, Е).

Для оценки влияния индукторов по трем показателям одновременно — содержания SA- β -Gal-позитивных

Б



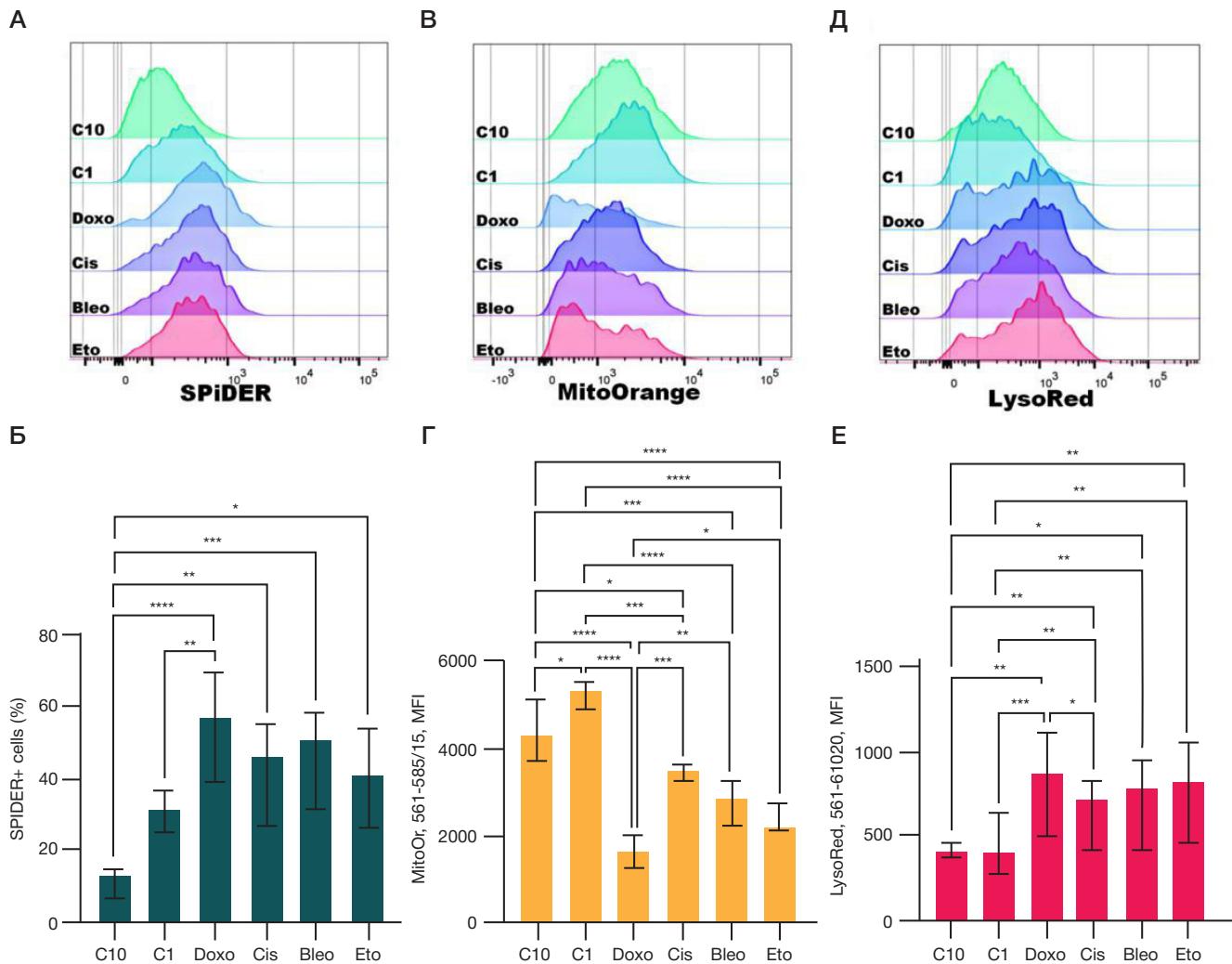


Рис. 2. В верхнем ряду представлены гистограммы распределения SA-β-Gal-позитивных клеток по SPiDER (A), при окрашивании митохондрий с помощью MitoOrange (B), а также при окрашивании лизосом зондом LysoRed (D). Гистограммы отражают контрольные условия (C10 — культивирование в 10% FBS, C1 — культивирование в 1% FBS) и воздействие индукторов (Doxo — доксорубицин, Cis — цисплатин, Bleo — блеомицин, Eto — этопозид). Для построения гистограмм использовали объединенные образцы для каждого условия культивирования — по четыре образца в каждом условии для фибробластов, полученных от каждой из двух мышей. В целом распределения на гистограммах отражают повышение содержания SA-β-Gal-позитивных клеток, снижение митохондриального потенциала и гипертрофию лизосомального аппарата под влиянием индукторов сенесценции, что согласуется с результатами статистического анализа. Нижний ряд: статистический анализ содержания SA-β-Gal-позитивных клеток по SPiDER (Б), оценка активности митохондрий по MitoOrange (Г) и оценка лизосомального компартамента по LysoRed (Е). Объем выборки для каждого варианта окрашивания и каждого условия культивирования составил $n = 12$ (по 6 независимых реплик для фибробластов, полученных от каждой из двух мышей). Анализ реплик проводили в разные дни; Me ± IQR; * — $p < 0.05$, ** — $p < 0.01$, *** — $p < 0.005$, **** — $p < 0.001$.

клеток, снижения митохондриального потенциала и степени гипертрофии лизосомального аппарата — нами был разработан интегральный индекс индукции сенесценции (IISI):

$$IISI = \frac{\%SPiDER_i^+}{\%SPiDER_{C1}^+} \times \left(\frac{MFI_{C10}^{mito}}{MFI_i^{mito}} + \frac{MFI_i^{lyso}}{MFI_{C10}^{lyso}} \right),$$

где $\%SPiDER_i^+$ и $\%SPiDER_{C1}^+$ — это содержание SA-β-Gal-позитивных клеток под влиянием конкретного индуктора сенесценции и в условиях сывороточного голодания соответственно. MFI_{C10}^{mito} и MFI_i^{mito} — медианы интенсивности флуоресценции митотрекера в контроле с 10% FBS и в условиях индукции сенесценции соответственно. MFI_i^{lyso} и MFI_{C10}^{lyso} — медианы интенсивности флуоресценции лизотрекера в условиях индукции сенесценции и в контроле с 10% FBS соответственно.

Использование IISI позволило установить, что в наших условиях среди всех индукторов наибольшее влияние по всем трем показателям оказывает доксорубицин (рис. 3).

Таким образом, нами был проведен сравнительный анализ изменений митохондриального и лизосомного аппаратов в первичных фибробластах мыши в контексте химиотерапевтической индукции сенесценции, где влияние доксорубицина оказалось наиболее значимым. Тем не менее, стоит отметить, что данный индекс является инструментом сравнительного анализа в условиях данной работы и его абсолютное значение не интерпретируется.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании с помощью двух независимых методов детекции сенесценции — хромогенного окрашивания X-Gal и флуорогенного субстрата SPiDER мы подтвердили, что доксорубицин, цисплатин, блеомицин и этопозид достоверно увеличивают долю SA-β-Gal-позитивных клеток, что свидетельствует о развитии химиоиндуцированной сенесценции [26]. Наиболее выраженный эффект наблюдался под воздействием доксорубицина, который значительно повышал долю

X-Gal-позитивных клеток ($87,8 \pm 4,5\%$) и демонстрировал наибольшую активность в интегральной оценке по разработанному нами индексу индукции сенесцентности (IIS).

Любопытно, что в условиях сывороточного голодания также происходило повышение содержания SA- β -Gal-позитивных клеток. Это согласуется с тем, что снижение митогенной стимуляции и пролиферативной активности может сопровождаться фенотипическими признаками старения даже в отсутствие экзогенных повреждающих факторов [27]. По-видимому, это связано с тем, что сыворотка содержит антиоксидантные системы (альбумин, глутатион, аскорбиновую кислоту, токоферолы и др.) [28], и при длительном сывороточном голодании антиоксидантная емкость среды истощается, а вследствие базального уровня митохондриального дыхания возникает избыток АФК, который не может быть эффективно нейтрализован. Это может приводить к генотоксическому стрессу и вызывать переход клеток в сенесцентное состояние [28, 29]. Интересно, что в таких условиях также происходило значительное повышение сигнала от потенциалзависимого красителя митохондрий MitoTracker Orange, что, по-видимому, отражает процесс адаптации к условиям метаболического стресса (за счет сниженной концентрации инсулина в среде с низкой концентрацией сыворотки) через интенсификацию аэробного гликолиза [30, 31]. Стоит отметить, что воздействие индукторов происходило также в условиях сывороточного голодания, но приводило к значимому снижению сигнала от потенциалзависимого красителя митохондрий MitoTracker Orange, особенно под воздействием доксорубицина. Кроме того, изменение флуоресцентного сигнала от красителя MitoTracker Orange может быть связано, как с изменением мембранных потенциала митохондрий ($\Delta\Psi_m$), так и с изменением митохондриальной массы. По-видимому, снижение сигнала под воздействием индукторов связано в первую очередь со снижением митохондриального потенциала, что перекрывает эффект от возможного увеличения массы митохондрий. Такое состояние типично для устойчивой сенесцентности, когда большое число нефункциональных митохондрий не может обеспечить необходимый уровень продукции АТФ и клетка переходит к получению энергии через анаэробный гликолиз [32, 33]. Последнее связывают с выделением в окружающую среду такими клетками ряда промежуточных продуктов метаболизма: лактата, пирувата, аланина и др., которые могут использоваться соседними опухолевыми клетками в качестве дополнительных источников энергии [34].

Сывороточное голодание *in vitro*, как и другие формы метаболического стресса и энергетического дефицита, активирует TFEB (от англ. transcription factor EB) благодаря активации AMPK и подавления mTORC1 [35, 36]. Это обеспечивает адаптацию клеток через активацию аутофагии и других процессов, в ходе которых происходит переработка клеточных компонентов, что обеспечивает клетки энергией и необходимыми веществами, поддерживая их жизнеспособность [37]. В наших условиях сывороточное голодание не приводило к достоверному увеличению сигнала от LysoTracker Red. По-видимому, это связано с интенсификацией процессов биогенеза и обновления лизосом в условиях сывороточного голодания [38, 39]. При этом под влиянием всех индукторов наблюдалось значительное увеличение сигнала от лизотрекера, что скорее всего свидетельствует о значимом увеличении массы лизосомного аппарата, которое перекрывает эффект от возможного защелачивания

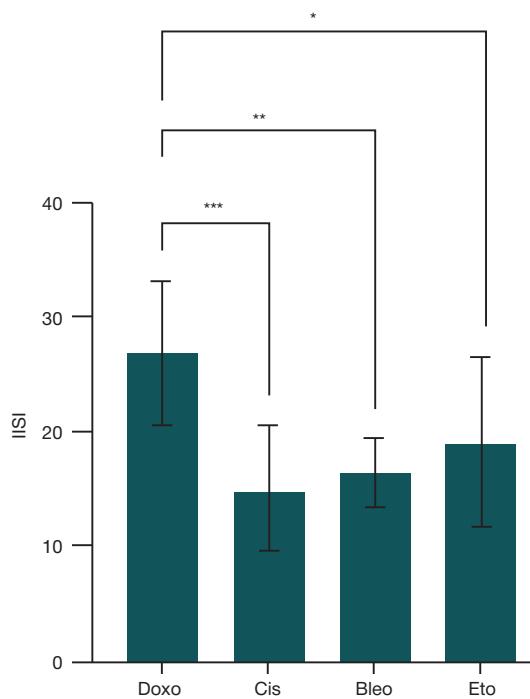


Рис. 3. Сравнительный анализ интегрального индекса индукции сенесцентности (IIS), который отражает суммарный эффект воздействия каждого индуктора по трем оцениваемым показателям. Doxo — доксорубицин, Cis — цисплатин, Bleo — блеомицин, Eto — этопозид. Mean \pm SD, $n = 8$; * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,005$

лизосом и связанного с ним снижения накопления ацидотропного зонда LysoTracker Red. Стоит отметить, что гипертрофия лизосомного аппарата — это типичный признак сенесцентных клеток, который возникает для компенсации лизосомных нарушений [40]. Наибольший эффект отмечался под воздействием доксорубицина. Что наряду с повышенной долей SA- β -Gal-позитивных клеток подтверждает концепцию о том, что накопление лизосом является не просто побочным явлением, а функциональной чертой сенесцентного состояния, связанной с истощением адаптационного резерва клеток [41].

Доксорубицин оказал наиболее выраженный эффект по совокупности параметров, превосходя другие препараты. По-видимому, это связано с многокомпонентным механизмом его действия: интеркаляция в ДНК, ингибирование топоизомеразы II, генерация АФК и повреждение митохондриальной ДНК [22]. Таким образом, доксорубицин оказался наиболее эффективным индуктором сенесцентности в культуре первичных фибробластов мыши и имел наиболее выраженное токсическое действие в отношении митохондрий.

Современная онкология все чаще сталкивается с проблемой двойственности действия различных химиотерапевтических агентов [42, 43]. Эффективная остановка роста опухоли может быть одновременно сопряжена с запуском процессов, которые способствуют рецидиву, метастазированию и развитию побочных эффектов [44–46]. Центральным элементом этого парадокса, по-видимому, является баланс между прямой цитотоксичностью в отношении опухолевых клеток и индукцией сенесцентности как в опухоли, так и в нормальных тканях [6, 45]. С одной стороны, развитие сенесцентности в опухоли может сохранять опухолевые клетки, обеспечивать их дополнительными питательными веществами, обеспечивать ангиогенез и условия для метастазирования [5, 6]. С другой стороны, сенесцентность

обеспечивает устойчивую остановку пролиферации опухолевых клеток, а воспалительные факторы SASP могут привлекать клетки иммунной системы и повышать эффективность иммунобиологического надзора [47–49]. Поэтому необходимы дальнейшие *in vitro* и *in vivo* исследования, направленные не только на изучение цитотоксического потенциала противоопухолевых агентов, но и на оценку их «сеногенного» и иммуногенного потенциалов.

ВЫВОДЫ

В ходе данного исследования было показано, что все тестируемые химиотерапевтические агенты (доксорубицин, цисплатин, блеомицин и этопозид) способны эффективно индуцировать сенесценцию в первичных фибробластах кожи мыши. Это подтверждается достоверным увеличением доли SA- β -Gal-позитивных клеток как при использовании хромогенного окрашивания X-Gal, так и при оценке с помощью флуорогенного субстрата SPiDER в живых клетках. Наиболее выраженный эффект наблюдался при обработке доксорубицином, который приводил к формированию сенесценческого фенотипа у 87,5% клеток (X-Gal). Сывороточное голодание также способствовало повышению содержания с признаками

сенесценции, однако в значительно меньшей степени по сравнению с индукторами. Параллельно с активацией SA- β -Gal было выявлено снижение митохондриального мембранных потенциала и гипертрофия лизосомного аппарата — ключевые признаки сенесценческого фенотипа, наиболее ярко проявлявшиеся под действием доксорубицина и этопозида. Для комплексной оценки эффективности индукторов был разработан интегральный индекс индукции сенесценции (IISI), объединяющий три ключевых параметра: долю сенесценческих клеток, состояние митохондрий и лизосом. Согласно этому индексу, доксорубицин продемонстрировал наибольшую способность индуцировать сенесценцию по совокупности всех показателей. Полученные данные подчеркивают различия в потенциале химиотерапевтических агентов вызывать сенесценцию и указывают на доксорубицин как наиболее мощный индуктор среди исследованных соединений в условиях данной модели. Поскольку тестируемые индукторы показали различия в фенотипе сенесценции фибробластов, изучение их иммуногенности может быть ключевым для разработки иммунологически обоснованных терапевтических стратегий, так как иммуномодулирующая активность химиотерапевтических препаратов не менее значима, чем их цитотоксичность.

Литература

1. Aquino-Martinez R, Eckhardt BA, Rowsey JL, Fraser DG, Khosla S, Farr JN, Monroe DG. Senescent cells exacerbate chronic inflammation and contribute to periodontal disease progression in old mice. *J Periodontol.* 2021; 92 (10): 1483–95. DOI: 10.1002/JPER.20-0529. Epub 2021 Jan 6. PMID: 33341947; PMCID: PMC8281492.
2. Tripathi U, Misra A, Tchekkonia T, Kirkland JL. Impact of Senescent Cell Subtypes on Tissue Dysfunction and Repair: Importance and Research Questions. *Mech Ageing Dev.* 2021; 198: 111548. DOI: 10.1016/j.mad.2021.111548. Epub 2021 Aug 2. PMID: 34352325; PMCID: PMC8373827.
3. Schosserer M, Grillari J, Breitenbach M. The Dual Role of Cellular Senescence in Developing Tumors and Their Response to Cancer Therapy. *Front Oncol.* 2017; 7: 278. DOI: 10.3389/fonc.2017.00278. PMID: 29218300; PMCID: PMC5703792.
4. Ma L, Yu J, Fu Y, He X, Ge S, Jia R, et al. The dual role of cellular senescence in human tumor progression and therapy. *MedComm* (2020). 2024; 5 (9): e695. DOI: 10.1002/mco2.695. PMID: 39161800; PMCID: PMC11331035.
5. Coppé JP, Kauser K, Campisi J, Beauséjour CM. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J Biol Chem.* 2006; 281 (40): 29568–74. DOI: 10.1074/jbc.M603307200. Epub 2006 Jul 31. PMID: 16880208.
6. Luo J, Sun T, Liu Z, Liu Y, Liu J, Wang S, et al. Persistent accumulation of therapy-induced senescent cells: an obstacle to long-term cancer treatment efficacy. *Int J Oral Sci.* 2025; 17 (1): 59. DOI: 10.1038/s41368-025-00380-w. PMID: 40750580; PMCID: PMC12317027.
7. 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. PMID: 33855023; PMCID: PMC8039141.
8. Sabbatinielli J, Pratichizzo F, Olivieri F, Procopio AD, Rippo MR, Giuliani A. Where Metabolism Meets Senescence: Focus on Endothelial Cells. *Front Physiol.* 2019; 10: 1523. DOI: 10.3389/fphys.2019.01523. PMID: 31920721; PMCID: PMC6930181.
9. Aman Y, Schmauck-Medina T, Hansen M, Morimoto RI, Simon AK, Bjedov I, Palikaras K, Simonsen A, Johansen T, Tavernarakis N, Rubinsztein DC, Partridge L, Kroemer G, Labbadia J, Fang EF. Autophagy in healthy aging and disease. *Nat Aging.* 2021; 1 (8): 634–50. DOI: 10.1038/s43587-021-00098-4. Epub 2021 Aug 12. PMID: 34901876; PMCID: PMC8659158.
10. Panfilova A, Zubareva T, Mironova E, Mazzoccoli G, Marasco MGP, Balazovskaia S, et al. Mitochondrial proteins as biomarkers of cellular senescence and age-associated diseases. *Aging (Albany NY).* 2025; 17. DOI: 10.18632/aging.206305. Epub ahead of print. PMID: 40856658.
11. Chen W, Zhao H, Li Y. Mitochondrial dynamics in health and disease: mechanisms and potential targets. *Signal Transduct Target Ther.* 2023; 8 (1): 333. DOI: 10.1038/s41392-023-01547-9. PMID: 37669960; PMCID: PMC10480456.
12. Murata H, Takamatsu H, Liu S, Kataoka K, Huh NH, Sakaguchi M. NRF2 Regulates PINK1 Expression under Oxidative Stress Conditions. *PLoS One.* 2015; 10 (11): e0142438. DOI: 10.1371/journal.pone.0142438. PMID: 26555609; PMCID: PMC4640816.
13. Zlotorynski E. Defective mitochondria ignite the SASP. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020; 21 (4): 179. DOI: 10.1038/s41580-020-0228-x. PMID: 32076133.
14. Suski JM, Lebiedzinska M, Bonora M, Pinton P, Duszynski J, Wieckowski MR. Relation between mitochondrial membrane potential and ROS formation. *Methods Mol Biol.* 2012; 810: 183–205. DOI: 10.1007/978-1-61779-382-0_12. PMID: 22057568.
15. Li W, Kawaguchi K, Tanaka S, He C, Maeshima Y, Suzuki E, Toi M. Cellular senescence triggers intracellular acidification and lysosomal pH alkalinized via ATP6AP2 attenuation in breast cancer cells. *Commun Biol.* 2023; 6 (1): 1147. DOI: 10.1038/s42003-023-05433-6. PMID: 37993606; PMCID: PMC10665353.
16. Song Q, Meng B, Xu H, Mao Z. The emerging roles of vacuolar-type ATPase-dependent Lysosomal acidification in neurodegenerative diseases. *Transl Neurodegener.* 2020; 9 (1): 17. DOI: 10.1186/s40035-020-00196-0. PMID: 32393395; PMCID: PMC7212675.
17. Chung CY, Shin HR, Berdan CA, Ford B, Ward CC, Olzmann JA, et al. Covalent targeting of the vacuolar H⁺-ATPase activates autophagy via mTORC1 inhibition. *Nat Chem Biol.* 2019; 15 (8): 776–85. DOI: 10.1038/s41589-019-0308-4. Epub 2019 Jul 8. PMID: 31285595; PMCID: PMC6641988.
18. Omolekan TO, Chamcheu JC, Buerger C, Huang S. PI3K/AKT/mTOR Signaling Network in Human Health and Diseases.

- Cells. 2024; 13 (17): 1500. DOI: 10.3390/cells13171500. PMID: 39273070; PMCID: PMC11394329.
19. Loo TM, Zhou X, Tanaka Y, Sugawara S, Yamauchi S, Kawasaki H, et al. Senescence-associated lysosomal dysfunction impairs cystine deprivation-induced lipid peroxidation and ferroptosis. *Nat Commun.* 2025; 16 (1): 6617. DOI: 10.1038/s41467-025-61894-9. PMID: 40731111; PMCID: PMC12307602.
20. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci.* 2000; 113 (Pt 20): 3613–22. DOI: 10.1242/jcs.113.20.3613. PMID: 11017877.
21. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92 (20): 9363–7. DOI: 10.1073/pnas.92.20.9363. PMID: 7568133; PMCID: PMC40985.
22. Kciuk M, Gielecińska A, Mujwar S, Kołat D, Kałuzińska-Kołat Ź, Celik I, et al. Doxorubicin-An Agent with Multiple Mechanisms of Anticancer Activity. *Cells.* 2023; 12 (4): 659. DOI: 10.3390/cells12040659. PMID: 36831326; PMCID: PMC9954613.
23. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014; 740: 364–78. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025. Epub 2014 Jul 21. PMID: 25058905; PMCID: PMC4146684.
24. Dorr RT. Bleomycin pharmacology: mechanism of action and resistance, and clinical pharmacokinetics. *Semin Oncol.* 1992; 19 (2 Suppl 5): 3–8. PMID: 1384141.
25. Montecucco A, Zanetta F, Biamonti G. Molecular mechanisms of etoposide. *EXCLI J.* 2015; 14: 95–108. DOI: 10.17179/excli2015-561. PMID: 26600742; PMCID: PMC4652635.
26. Lubberts S, Meijer C, Demaria M, Gietema JA. Early ageing after cytotoxic treatment for testicular cancer and cellular senescence: Time to act. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2020; 151: 102963. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2020.102963. Epub 2020 May 7. PMID: 32446180.
27. Wiley CD, Campisi J. The metabolic roots of senescence: mechanisms and opportunities for intervention. *Nat Metab.* 2021; 3 (10): 1290–301. DOI: 10.1038/s42255-021-00483-8. Epub 2021 Oct 18. PMID: 34663974; PMCID: PMC8889622.
28. Zhang Y, Xu YY, Sun WJ, Zhang MH, Zheng YF, Shen HM, et al. FBS or BSA Inhibits EGCG Induced Cell Death through Covalent Binding and the Reduction of Intracellular ROS Production. *Biomed Res Int.* 2016; 2016: 5013409. DOI: 10.1155/2016/5013409. Epub 2016 Oct 18. PMID: 27830147; PMCID: PMC5088332.
29. Stival A, Silva A, Valadares M. Qualitative and quantitative evaluation of Fetal Bovine Serum composition: toward ethical and best quality in vitro science. *NAM Journal.* 2025. doi: org/10.1016/j.namjnl.2025.100047.
30. Liu Y, Birsoy K. Metabolic sensing and control in mitochondria. *Mol Cell.* 2023; 83 (6): 877–89. DOI: 10.1016/j.molcel.2023.02.016. PMID: 36931256; PMCID: PMC10332353.
31. Choi EJ, Oh HT, Lee SH, Zhang CS, Li M, Kim SY, et al. Metabolic stress induces a double-positive feedback loop between AMPK and SQSTM1/p62 conferring dual activation of AMPK and NFE2L2/NRF2 to synergize antioxidant defense. *Autophagy.* 2024; 20 (11): 2490–510. DOI: 10.1080/15548627.2024.2374692. Epub 2024 Jul 10. PMID: 38953310; PMCID: PMC11572134.
32. Fumagalli M, Rossello F, Mondello C, d'Adda di Fagagna F. Stable cellular senescence is associated with persistent DDR activation. *PLoS One.* 2014; 9 (10): e110969. DOI: 10.1371/journal.pone.0110969. PMID: 25340529; PMCID: PMC4207795.
33. Ajoolabady A, Pratico D, Bahijri S, Eldakhakhny B, Tuomilehto J, Wu F, et al. Hallmarks and mechanisms of cellular senescence in aging and disease. *Cell Death Discov.* 2025; 11 (1): 364. DOI: 10.1038/s41420-025-02655-x. PMID: 40759632; PMCID: PMC12322153.
34. Dou X, Fu Q, Long Q, Liu S, Zou Y, Fu D, et al. PDK4-dependent hypercatabolism and lactate production of senescent cells promotes cancer malignancy. *Nat Metab.* 2023; 5 (11): 1887–910. DOI: 10.1038/s42255-023-00912-w. Epub 2023 Oct 30. Erratum in: *Nat Metab.* 2024; 6 (5): 980. DOI: 10.1038/s42255-024-01054-3. Erratum in: *Nat Metab.* 2024; 6 (7): 1416. DOI: 10.1038/s42255-024-01069-w. PMID: 37903887; PMCID: PMC10663165.
35. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012; 13 (4): 251–62. DOI: 10.1038/nrm3311. PMID: 22436748; PMCID: PMC5726489.
36. Zhang S, Sheng H, Zhang X, Qi Q, Chan CB, Li L, et al. Cellular energy stress induces AMPK-mediated regulation of glioblastoma cell proliferation by PIKE-A phosphorylation. *Cell Death Dis.* 2019; 10 (3): 222. DOI: 10.1038/s41419-019-1452-1. Erratum in: *Cell Death Dis.* 2025; 16 (1): 447. DOI: 10.1038/s41419-025-07700-2. PMID: 30833542; PMCID: PMC6399291.
37. Shang L, Chen S, Du F, Li S, Zhao L, Wang X. Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108 (12): 4788–93. DOI: 10.1073/pnas.1100844108. Epub 2011 Mar 7. PMID: 21383122; PMCID: PMC3064373.
38. Lee C, Lamech L, Johns E, Overholtzer M. Selective Lysosome Membrane Turnover Is Induced by Nutrient Starvation. *Dev Cell.* 2020; 55 (3): 289–97.e4. DOI: 10.1016/j.devcel.2020.08.008. Epub 2020 Sep 10. PMID: 32916093; PMCID: PMC8337093.
39. Ebner M, Puchkov D, López-Ortega O, Muthukottiappan P, Su Y, Schmid C, et al. Nutrient-regulated control of lysosome function by signaling lipid conversion. *Cell.* 2023; 186 (24): 5328–46.e26. DOI: 10.1016/j.cell.2023.09.027. Epub 2023 Oct 25. Erratum in: *Cell.* 2025; 188 (9): 2560. DOI: 10.1016/j.cell.2025.04.009. PMID: 37883971.
40. Hwang ES, Yoon G, Kang HT. A comparative analysis of the cell biology of senescence and aging. *Cell Mol Life Sci.* 2009; 66 (15): 2503–24. DOI: 10.1007/s00018-009-0034-2. Epub 2009 May 7. PMID: 19421842; PMCID: PMC11115533.
41. Tan JX, Finkel T. Lysosomes in senescence and aging. *EMBO Rep.* 2023; 24 (1): e57265. DOI: 10.15252/embr.202357265. Epub 2023 Oct 9. PMID: 37811693; PMCID: PMC10626421.
42. D'Alterio C, Scala S, Sozzi G, Roz L, Bertolini G. Paradoxical effects of chemotherapy on tumor relapse and metastasis promotion. *Semin Cancer Biol.* 2020; 60: 351–61. DOI: 10.1016/j.semcan.2019.08.019. Epub 2019 Aug 24. PMID: 31454672.
43. Behranvand N, Nasri F, Zolfaghari Emameh R, Khani P, Hosseini A, Garsen J, Falak R. Chemotherapy: a double-edged sword in cancer treatment. *Cancer Immunol Immunother.* 2022; 71 (3): 507–26. DOI: 10.1007/s00262-021-03013-3. Epub 2021 Aug 5. Erratum in: *Cancer Immunol Immunother.* 2022; 71 (3): 527. DOI: 10.1007/s00262-021-03034-y. PMID: 34355266; PMCID: PMC10992618.
44. Middleton JD, Stover DG, Hai T. Chemotherapy-Exacerbated Breast Cancer Metastasis: A Paradox Explainable by Dysregulated Adaptive-Response. *Int J Mol Sci.* 2018; 19 (11): 3333. DOI: 10.3390/ijms1911333. PMID: 30373101; PMCID: PMC6274941.
45. Hwang HJ, Kang D, Shin J, Jung J, Ko S, Jung KH, et al. Therapy-induced senescent cancer cells contribute to cancer progression by promoting ribophorin 1-dependent PD-L1 upregulation. *Nat Commun.* 2025; 16 (1): 353. DOI: 10.1038/s41467-024-54132-1. PMID: 39753537; PMCID: PMC11699195.
46. Guillou J, Petit C, Toutain B, Guette C, Lelièvre E, Coqueret O. Chemotherapy-induced senescence, an adaptive mechanism driving resistance and tumor heterogeneity. *Cell Cycle.* 2019; 18 (19): 2385–97. DOI: 10.1080/15384101.2019.1652047. Epub 2019 Aug 9. PMID: 31397193; PMCID: PMC6738909.
47. Jiao D, Zheng X, Du X, Wang D, Hu Z, Sun R, et al. Immunogenic senescence sensitizes lung cancer to LUNX-targeting therapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2022; 71 (6): 1403–17. DOI: 10.1007/s00262-021-03077-1. Epub 2021 Oct 21. PMID: 34674012; PMCID: PMC9123058.
48. Liu Y, Lomeli I, Kron SJ. Therapy-Induced Cellular Senescence: Potentiating Tumor Elimination or Driving Cancer Resistance and Recurrence? *Cells.* 2024; 13 (15): 1281. DOI: 10.3390/cells13151281. PMID: 39120312; PMCID: PMC11312217.
49. Marin I, Boix O, Garcia-Garijo A, Sirois I, Caballe A, Zarzuela E, et al. Cellular Senescence Is Immunogenic and Promotes Antitumor Immunity. *Cancer Discov.* 2023; 13 (2): 410–31. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-22-0523. PMID: 36302218; PMCID: PMC7614152.

References

1. Aquino-Martinez R, Eckhardt BA, Rowsey JL, Fraser DG, Khosla S, Farr JN, Monroe DG. Senescent cells exacerbate chronic inflammation and contribute to periodontal disease progression in old mice. *J Periodontol.* 2021; 92 (10): 1483–95. DOI: 10.1002/JPER.20-0529. Epub 2021 Jan 6. PMID: 33341947; PMCID: PMC8281492.
2. Tripathi U, Misra A, Tchkonia T, Kirkland JL. Impact of Senescent Cell Subtypes on Tissue Dysfunction and Repair: Importance and Research Questions. *Mech Ageing Dev.* 2021; 198: 111548. DOI: 10.1016/j.mad.2021.111548. Epub 2021 Aug 2. PMID: 34352325; PMCID: PMC8373827.
3. Schosserer M, Grillari J, Breitenbach M. The Dual Role of Cellular Senescence in Developing Tumors and Their Response to Cancer Therapy. *Front Oncol.* 2017; 7: 278. DOI: 10.3389/fonc.2017.00278. PMID: 29218300; PMCID: PMC5703792.
4. Ma L, Yu J, Fu Y, He X, Ge S, Jia R, et al. The dual role of cellular senescence in human tumor progression and therapy. *MedComm* (2020). 2024; 5 (9): e695. DOI: 10.1002/mco2.695. PMID: 39161800; PMCID: PMC11331035.
5. Coppé JP, Kausler K, Campisi J, Beauséjour CM. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J Biol Chem.* 2006; 281 (40): 29568–74. DOI: 10.1074/jbc.M603307200. Epub 2006 Jul 31. PMID: 16880208.
6. Luo J, Sun T, Liu Z, Liu Y, Liu J, Wang S, et al. Persistent accumulation of therapy-induced senescent cells: an obstacle to long-term cancer treatment efficacy. *Int J Oral Sci.* 2025; 17 (1): 59. DOI: 10.1038/s41368-025-00380-w. PMID: 40750580; PMCID: PMC12317027.
7. 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. PMID: 33855023; PMCID: PMC8039141.
8. Sabbatinelli J, Pratichizzo F, Olivieri F, Procopio AD, Rippo MR, Giuliani A. Where Metabolism Meets Senescence: Focus on Endothelial Cells. *Front Physiol.* 2019; 10: 1523. DOI: 10.3389/fphys.2019.01523. PMID: 31920721; PMCID: PMC6930181.
9. Aman Y, Schmauck-Medina T, Hansen M, Morimoto RI, Simon AK, Biedov I, Palikaras K, Simonsen A, Johansen T, Tavernarakis N, Rubinsztein DC, Partridge L, Kroemer G, Labbadia J, Fang EF. Autophagy in healthy aging and disease. *Nat Aging.* 2021; 1 (8): 634–50. DOI: 10.1038/s43587-021-00098-4. Epub 2021 Aug 12. PMID: 34901876; PMCID: PMC8659158.
10. Panfilova A, Zubareva T, Mironova E, Mazzoccoli G, Marasco MGP, Balazovskaia S, et al. Mitochondrial proteins as biomarkers of cellular senescence and age-associated diseases. *Aging* (Albany NY). 2025; 17. DOI: 10.18632/aging.206305. Epub ahead of print. PMID: 40856658.
11. Chen W, Zhao H, Li Y. Mitochondrial dynamics in health and disease: mechanisms and potential targets. *Signal Transduct Target Ther.* 2023; 8 (1): 333. DOI: 10.1038/s41392-023-01547-9. PMID: 37669960; PMCID: PMC10480456.
12. Murata H, Takamatsu H, Liu S, Kataoka K, Huh NH, Sakaguchi M. NRF2 Regulates PINK1 Expression under Oxidative Stress Conditions. *PLoS One.* 2015; 10 (11): e0142438. DOI: 10.1371/journal.pone.0142438. PMID: 26555609; PMCID: PMC4640816.
13. Zlotorynski E. Defective mitochondria ignite the SASP. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020; 21 (4): 179. DOI: 10.1038/s41580-020-0228-x. PMID: 32076133.
14. Suski JM, Lebiedzinska M, Bonora M, Pinton P, Duszynski J, Wieckowski MR. Relation between mitochondrial membrane potential and ROS formation. *Methods Mol Biol.* 2012; 810: 183–205. DOI: 10.1007/978-1-61779-382-0_12. PMID: 22057568.
15. Li W, Kawaguchi K, Tanaka S, He C, Maeshima Y, Suzuki E, Toi M. Cellular senescence triggers intracellular acidification and lysosomal pH alkalinized via ATP6AP2 attenuation in breast cancer cells. *Commun Biol.* 2023; 6 (1): 1147. DOI: 10.1038/s42003-023-05433-6. PMID: 37993606; PMCID: PMC10665353.
16. Song Q, Meng B, Xu H, Mao Z. The emerging roles of vacuolar-type ATPase-dependent Lysosomal acidification in neurodegenerative diseases. *Transl Neurodegener.* 2020; 9 (1): 17. DOI: 10.1186/s40035-020-00196-0. PMID: 32393395; PMCID: PMC7212675.
17. Chung CY, Shin HR, Berdan CA, Ford B, Ward CC, Olzmann JA, et al. Covalent targeting of the vacuolar H+-ATPase activates autophagy via mTORC1 inhibition. *Nat Chem Biol.* 2019; 15 (8): 776–85. DOI: 10.1038/s41589-019-0308-4. Epub 2019 Jul 8. PMID: 31285595; PMCID: PMC6641988.
18. Omolekan TO, Chamcheu JC, Buerger C, Huang S. PI3K/AKT/mTOR Signaling Network in Human Health and Diseases. *Cells.* 2024; 13 (17): 1500. DOI: 10.3390/cells13171500. PMID: 39273070; PMCID: PMC11394329.
19. Loo TM, Zhou X, Tanaka Y, Sugawara S, Yamauchi S, Kawasaki H, et al. Senescence-associated lysosomal dysfunction impairs cystine deprivation-induced lipid peroxidation and ferroptosis. *Nat Commun.* 2025; 16 (1): 6617. DOI: 10.1038/s41467-025-61894-9. PMID: 40731111; PMCID: PMC12307602.
20. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci.* 2000; 113 (Pt 20): 3613–22. DOI: 10.1242/jcs.113.20.3613. PMID: 11017877.
21. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92 (20): 9363–7. DOI: 10.1073/pnas.92.20.9363. PMID: 7568133; PMCID: PMC40985.
22. Kciuk M, Gielecińska A, Mujwar S, Kołat D, Kałuzińska-Kołat Ź, Celik I, et al. Doxorubicin-An Agent with Multiple Mechanisms of Anticancer Activity. *Cells.* 2023; 12 (4): 659. DOI: 10.3390/cells12040659. PMID: 36831326; PMCID: PMC9954613.
23. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014; 740: 364–78. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025. Epub 2014 Jul 21. PMID: 25058905; PMCID: PMC4146684.
24. Dorr RT. Bleomycin pharmacology: mechanism of action and resistance, and clinical pharmacokinetics. *Semin Oncol.* 1992; 19 (2 Suppl 5): 3–8. PMID: 1384141.
25. Montecucco A, Zanetta F, Biamonti G. Molecular mechanisms of etoposide. *EXCLI J.* 2015; 14: 95–108. DOI: 10.17179/excli2015-561. PMID: 26600742; PMCID: PMC4652635.
26. Lubberts S, Meijer C, Demaria M, Gietema JA. Early ageing after cytotoxic treatment for testicular cancer and cellular senescence: Time to act. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2020; 151: 102963. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2020.102963. Epub 2020 May 7. PMID: 32446180.
27. Wiley CD, Campisi J. The metabolic roots of senescence: mechanisms and opportunities for intervention. *Nat Metab.* 2021; 3 (10): 1290–301. DOI: 10.1038/s42255-021-00483-8. Epub 2021 Oct 18. PMID: 34663974; PMCID: PMC8889622.
28. Zhang Y, Xu YY, Sun WJ, Zhang MH, Zheng YF, Shen HM, et al. FBS or BSA Inhibits EGCG Induced Cell Death through Covalent Binding and the Reduction of Intracellular ROS Production. *Biomed Res Int.* 2016; 2016: 5013409. DOI: 10.1155/2016/5013409. Epub 2016 Oct 18. PMID: 27830147; PMCID: PMC5088332.
29. Stival A, Silva A, Valadares M. Qualitative and quantitative evaluation of Fetal Bovine Serum composition: toward ethical and best quality *in vitro* science. *NAM Journal.* 2025. doi: org/10.1016/j.namjnl.2025.100047.
30. Liu Y, Birsoy K. Metabolic sensing and control in mitochondria. *Mol Cell.* 2023; 83 (6): 877–89. DOI: 10.1016/j.molcel.2023.02.016. PMID: 36931256; PMCID: PMC10332353.
31. Choi EJ, Oh HT, Lee SH, Zhang CS, Li M, Kim SY, et al. Metabolic stress induces a double-positive feedback loop between AMPK and SQSTM1/p62 conferring dual activation of AMPK and NFE2L2/NRF2 to synergize antioxidant defense. *Autophagy.* 2024; 20 (11): 2490–510. DOI: 10.1080/15548627.2024.2374692. Epub 2024 Jul 10. PMID: 38953310; PMCID: PMC11572134.
32. Fumagalli M, Rossiello F, Mondello C, d'Adda di Fagagna F. Stable cellular senescence is associated with persistent DDR activation. *PLoS One.* 2014; 9 (10): e110969. DOI: 10.1371/journal.pone.0110969. PMID: 25340529; PMCID: PMC4207795.

33. Ajoolabady A, Pratico D, Bahijri S, Eldakhakhny B, Tuomilehto J, Wu F, et al. Hallmarks and mechanisms of cellular senescence in aging and disease. *Cell Death Discov.* 2025; 11 (1): 364. DOI: 10.1038/s41420-025-02655-x. PMID: 40759632; PMCID: PMC12322153.
34. Dou X, Fu Q, Long Q, Liu S, Zou Y, Fu D, et al. PDK4-dependent hypercatabolism and lactate production of senescent cells promotes cancer malignancy. *Nat Metab.* 2023; 5 (11): 1887–910. DOI: 10.1038/s42255-023-00912-w. Epub 2023 Oct 30. Erratum in: *Nat Metab.* 2024; 6 (5): 980. DOI: 10.1038/s42255-024-01054-3. Erratum in: *Nat Metab.* 2024; 6 (7): 1416. DOI: 10.1038/s42255-024-01069-w. PMID: 37903887; PMCID: PMC10663165.
35. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012; 13 (4): 251–62. DOI: 10.1038/nrm3311. PMID: 22436748; PMCID: PMC5726489.
36. Zhang S, Sheng H, Zhang X, Qi Q, Chan CB, Li L, et al. Cellular energy stress induces AMPK-mediated regulation of glioblastoma cell proliferation by PIKE-A phosphorylation. *Cell Death Dis.* 2019; 10 (3): 222. DOI: 10.1038/s41419-019-1452-1. Erratum in: *Cell Death Dis.* 2025; 16 (1): 447. DOI: 10.1038/s41419-025-07700-2. PMID: 30833542; PMCID: PMC6399291.
37. Shang L, Chen S, Du F, Li S, Zhao L, Wang X. Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108 (12): 4788–93. DOI: 10.1073/pnas.1100844108. Epub 2011 Mar 7. PMID: 21383122; PMCID: PMC3064373.
38. Lee C, Lamech L, Johns E, Overholtzer M. Selective Lysosome Membrane Turnover Is Induced by Nutrient Starvation. *Dev Cell.* 2020; 55 (3): 289–97.e4. DOI: 10.1016/j.devcel.2020.08.008. Epub 2020 Sep 10. PMID: 32916093; PMCID: PMC8337093.
39. Ebner M, Puchkov D, López-Ortega O, Muthukottiappan P, Su Y, Schmied C, et al. Nutrient-regulated control of lysosome function by signaling lipid conversion. *Cell.* 2023; 186 (24): 5328–46.e26. DOI: 10.1016/j.cell.2023.09.027. Epub 2023 Oct 25. Erratum in: *Cell.* 2025; 188 (9): 2560. DOI: 10.1016/j.cell.2025.04.009. PMID: 37883971.
40. Hwang ES, Yoon G, Kang HT. A comparative analysis of the cell biology of senescence and aging. *Cell Mol Life Sci.* 2009; 66 (15): 2503–24. DOI: 10.1007/s00018-009-0034-2. Epub 2009 May 7. PMID: 19421842; PMCID: PMC11115533.
41. Tan JX, Finkel T. Lysosomes in senescence and aging. *EMBO Rep.* 2023; 24 (11): e57265. DOI: 10.15252/embr.202357265. Epub 2023 Oct 9. PMID: 37811693; PMCID: PMC10626421.
42. D'Alterio C, Scala S, Sozzi G, Roz L, Bertolini G. Paradoxical effects of chemotherapy on tumor relapse and metastasis promotion. *Semin Cancer Biol.* 2020; 60: 351–61. DOI: 10.1016/j.semancer.2019.08.019. Epub 2019 Aug 24. PMID: 31454672.
43. Behravand N, Nasri F, Zolfaghari Emameh R, Khani P, Hosseini A, Garsse J, Falak R. Chemotherapy: a double-edged sword in cancer treatment. *Cancer Immunol Immunother.* 2022; 71 (3): 507–26. DOI: 10.1007/s00262-021-03013-3. Epub 2021 Aug 5. Erratum in: *Cancer Immunol Immunother.* 2022; 71 (3): 527. DOI: 10.1007/s00262-021-03034-y. PMID: 34355266; PMCID: PMC10992618.
44. Middleton JD, Stover DG, Hai T. Chemotherapy-Exacerbated Breast Cancer Metastasis: A Paradox Explainable by Dysregulated Adaptive-Response. *Int J Mol Sci.* 2018; 19 (11): 3333. DOI: 10.3390/ijms19113333. PMID: 30373101; PMCID: PMC6274941.
45. Hwang HJ, Kang D, Shin J, Jung J, Ko S, Jung KH, et al. Therapy-induced senescent cancer cells contribute to cancer progression by promoting ribophorin 1-dependent PD-L1 upregulation. *Nat Commun.* 2025; 16 (1): 353. DOI: 10.1038/s41467-024-54132-1. PMID: 39753537; PMCID: PMC11699195.
46. Guillou J, Petit C, Toutain B, Guette C, Lelièvre E, Coqueret O. Chemotherapy-induced senescence, an adaptive mechanism driving resistance and tumor heterogeneity. *Cell Cycle.* 2019; 18 (19): 2385–97. DOI: 10.1080/15384101.2019.1652047. Epub 2019 Aug 9. PMID: 31397193; PMCID: PMC6738909.
47. Jiao D, Zheng X, Du X, Wang D, Hu Z, Sun R, et al. Immunogenic senescence sensitizes lung cancer to LUNX-targeting therapy. *Cancer Immunol Immunther.* 2022; 71 (6): 1403–17. DOI: 10.1007/s00262-021-03077-1. Epub 2021 Oct 21. PMID: 34674012; PMCID: PMC9123058.
48. Liu Y, Lomeli I, Kron SJ. Therapy-Induced Cellular Senescence: Potentiating Tumor Elimination or Driving Cancer Resistance and Recurrence? *Cells.* 2024; 13(15): 1281. DOI: 10.3390/cells13151281. PMID: 39120312; PMCID: PMC11312217.
49. Marin I, Boix O, Garcia-Garijo A, Sirois I, Caballe A, Zarzuela E, et al. Cellular Senescence Is Immunogenic and Promotes Antitumor Immunity. *Cancer Discov.* 2023; 13 (2): 410–31. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-22-0523. PMID: 36302218; PMCID: PMC7614152.