УДК 57.044

Сенолитический потенциал DR5-селективного цитокина TRAIL в линиях клеток рака поджелудочной железы

А. А. Исакова[1,2*], Н. В. Антипова[2,3], Д. В. Мазур[2], Е. И. Иванова[1,2], Д. А. Долгих[1,2], М. П. Кирпичников[1,2], М. Э. Гаспарян[2], А. В. Яголович[1]

[1]Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234 Россия

[2]ГНЦ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

[3]Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва, 101000 Россия

*E-mail: alina.labbio@gmail.com

Поступила в редакцию 10.10.2025

Принята к печати 13.03.2026

DOI: 10.32607/actanaturae.27844

РЕФЕРАТ **Аденокарцинома поджелудочной железы является одним из наиболее агрессивных видов рака, лечение которого основано на применении стандартных химиопрепаратов, в частности гемцитабина. Химиотерапия может вызывать в опухолевых клетках остановку клеточного цикла и развитие сенесцентного фенотипа. Накопление сенесцентных клеток ограничивает пролиферацию опухоли с последующей секрецией факторов секреторного фенотипа, ассоциированного с сенесцентностью, вызывающих малигнизацию клеток микроокружения опухоли и метастазирование. Это делает актуальным поиск препаратов для сенолитической терапии. В данной работе на клеточных линиях рака поджелудочной железы человека, подвергнутых длительной инкубации с гемцитабином или доксорубицином, изучали сенолитические свойства мутантного варианта противоопухолевого цитокина TRAIL DR5-B, селективного к рецептору DR5. В клеточных линиях MIA PaCa-2 и PANC-1 оба препарата вызывали значительное повышение активности β-галактозидазы и экспрессии маркеров сенесцентности, таких как ингибиторы клеточного цикла p21 и p27; при этом DR5-B эффективно подавлял жизнеспособность этих клеток после воздействия химиопрепаратов. В клеточной линии BxPC-3 препараты не вызывали признаков сенесцентности, при этом цитотоксичность DR5-B практически не изменялась. В клетках линии AsPC-1 наблюдались некоторые признаки сенесцентности, однако эти клетки оставались резистентными к DR5-B, по-видимому, из-за сверхэкспрессии cFLIP. Таким образом, белок DR5-B имеет перспективы использования в качестве сенолитического препарата в терапии некоторых типов аденокарциномы поджелудочной железы.**

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА **аденокарцинома поджелудочной железы, сенесцентность, сенолитическая терапия, рецептор смерти DR5, TRAIL, DR5-B, гемцитабин, доксорубицин.**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ **GI – индекс ингибирования роста (growth inhibition index); SASP – секреторный фенотип, ассоциированный с сенесцентностью (senescence-associated secretory phenotype); TRAIL – цитокин семейства факторов некроза опухоли, лиганд, вызывающий апоптоз (Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand); РПЖ – рак поджелудочной железы.**

ВВЕДЕНИЕ

Протоковая аденокарцинома поджелудочной железы (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC, РПЖ) входит в число наиболее агрессивных злокачественных новообразований и отличается крайне низкой выживаемостью пациентов. Только у 20% пациентов с диагнозом РПЖ встречается локализованная форма, поддающаяся хирургической резекции в сочетании с предоперационной или адъювантной химиотерапией, однако даже после полной резекции опухоли заболевание часто рецидивирует [1]. Единственным вариантом лечения большинства

больных с неоперабельными случаями или метастазами является химиотерапия [2]. Наиболее часто с этой целью применяют гемцитабин и его комбинации с другими препаратами, наб-паклитаксел и схема Фолфиринокс (лейковорин, 5-фторурацил, иринотекан и оксалиплатин), но даже современные режимы терапии обеспечивают лишь ограниченное улучшение прогноза [3, 4]. Другие подходы, включая таргетную и иммунотерапию, до настоящего времени не показали значимой эффективности при раке поджелудочной железы, что связано с молекулярной гетерогенностью опухолей и иммуносупрессивным микроокружением [5].

Помимо цитотоксического эффекта, многие химиопрепараты, включая гемцитабин, индуцируют в опухолевых клетках состояние долговременной остановки клеточного цикла – сенесцентность. Сенесцентные клетки характеризуются арестом пролиферации, однако сохраняют метаболическую активность и участвуют в иммунных процессах. Такие клетки имеют увеличенные размеры и измененную морфологию, повышенную активность β-галактозидазы (SA-β-gal), активацию путей p53/p21 и p16 и продукции факторов секреторного фенотипа, ассоциированного с сенесцентностью (SASP, senescence-associated secretory phenotype).

В норме сенесцентность – это механизм, защищающий клетки от онкотрансформации и других нарушений [6]. Известно, что кратковременное воздействие SASP способствует иммунному надзору и регенерации тканей, тем самым ограничивая пролиферацию опухолевых клеток, тогда как хроническое накопление сенесцентных клеток формирует провоспалительное микроокружение, поддерживающее прогрессирование опухоли [7]. Важно отметить, что SASP считается ключевым проопухолевым фактором, поскольку посредством ауто- и паракринного механизма он способствует резистентности к терапии и метастазированию, трансформируя соседние клетки (как опухолевые, так и неопухолевые) и разрушая внеклеточный матрикс [8–10]. Кроме того, наличие плотной стромы, которая особенно выражена в РПЖ и препятствует иммунному надзору, усугубляет проблему накопления сенесцентных клеток и делает их вклад в прогрессию заболевания особенно значимым [11]. Это обосновывает поиск сенолитиков для избирательного устранения SASP-положительных клеток и снижения их негативного влияния на прогрессию рака.

Известно, что в резистентных клеточных линиях РПЖ гемцитабин вместо апоптоза может вызывать развитие сенесцентного фенотипа, что сопровождается повышением уровня ингибиторов клеточного цикла p21 и p19, PML (белок промиелоцитарного лейкоза, ассоциированный с сенесцентностью) и рецептора DcR2; при этом сенесцентность может запускаться даже при наличии мутаций в гене *TP53* [12]. Показано, что в химиорезистентных клеточных линиях РПЖ сохраняются индуцированные гемцитабином сенесцентные клетки, но применение сенолитика ABT-263 (навитоклакс), ингибирующего антиапоптотические белки семейства Bcl-2, избирательно уничтожает гемцитабин-индуцированные сенесцентные клетки как *in vitro*, так и в опухолевых ксенотрансплантатах у мышей *in vivo*. Комбинация гемцитабина с ABT-263 обеспечивала более значительное снижение роста опухоли, чем монотерапия [13, 14]. Это подтверждает актуальность разработки сенолитических стратегий, направленных на активное устранение сенесцентных клеток. Однако многие из известных веществ с сенолитическими свойствами обладают высокой токсичностью [15], что делает необходимым поиск новых эффективных молекул с сенолитической активностью.

Помимо ингибиторов семейства Bcl-2, сенесцентные клетки опухолей демонстрируют уязвимость к активации экзогенного апоптотического пути через рецептор смерти TRAIL DR5. Показано, что селективные агонисты рецептора DR5 способны индуцировать каспазозависимый апоптоз в индуцированных химиотерапией опухолевых сенесцентных клетках [16]. При этом устойчивость сенесцентных клеток к DR5-опосредованной гибели во многом обеспечивается высоким уровнем антиапоптотического белка cFLIP, гомолога каспазы-8. Подавление этого механизма в сочетании с воздействием агонистами DR5 значительно усиливает сенолитический эффект как *in vitro*, так и *in vivo* [17].

В представленной работе оценена способность модифицированного рецептор-селективного цитокина TRAIL DR5-B (агониста DR5) вызывать апоптоз в сенесцентных клетках аденокарциномы поджелудочной железы, индуцированных применением химиопрепаратов гемцитабина и доксорубицина.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные линии и условия культивирования

Клеточные линии РПЖ (ATCC, США) поддерживали в стандартных условиях культивирования. Клетки AsPC-1 выращивали в среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия), BxPC-3, MIA PaCa-2 и PANC-1 – в среде DMEM («ПанЭко»). В состав ростовых сред входили фетальная сыворотка крупного рогатого скота (10%, Hyclone, США), L-глутамин (1–2 мМ, «ПанЭко») и антибиотики – пенициллин (100 Ед./мл) и стрептомицин (100 мкг/мл). Клетки культивировали при температуре 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO_2. Для от-

Таблица 1. Праймеры для ОТ-кПЦР

№	Ген	Последовательность (5′→3′)	
		Прямая	Обратная
1	p21 (*CDKN1A*-F110)	AGTCAGTTCCTTGTGGAGCC	CATTAGCGCATCACAGTCGC
2	p27 (*CDKN1B*-F115)	TGTTTCAGACGGTTCCCCAAA	CCATTCCATGAAGTCAGCGAT
3	cFLIP (*CFLAR*)	GGCTCCCCCTGCATCACATC	CCGCAGTACACAGGCTCCAGA

крепления клеток с культурального пластика применяли раствор трипсин-EDTA («ПанЭко»). Клетки пересевали каждые 3–4 дня при достижении 70–80% конфлюэнтности.

Обработка клеток препаратами

Для индукции сенесцентности использовали гемцитабин (Tocris, Великобритания) и доксорубицин (Tocris). Для оценки сенолитического действия агониста DR5 применяли рецептор-селективный мутантный вариант противоопухолевого цитокина TRAIL DR5-B, полученный и очищенный ранее [18, 19]. Клетки подвергали 7-дневной обработке химиопрепаратами в следующих концентрациях: AsPC-1 – 330 нМ гемцитабина, BxPC-3, MIA PaCa-2, PANC-1 – 33 нМ гемцитабина; BxPC-3 – 10 нМ доксорубицина, AsPC-1, MIA PaCa-2, PANC-1 – 50 нМ доксорубицина. Рабочие концентрации химиопрепаратов были определены в предварительных экспериментах методом титрования как дозы, вызывающие устойчивую остановку клеточного цикла без массивной гибели клеток (менее 20%).

Оценка жизнеспособности клеток

Жизнеспособность клеток определяли с помощью реагента WST-8 (ServiceBio, Китай). Клетки после 7-дневной инкубации с химиопрепаратами пересевали в 96-луночные планшеты (10 000 кл./лунку) в полной среде и через 24 ч добавляли DR5-B (0–500 нМ). Через 72 ч инкубировали с WST-8 в течение 3 ч, измеряя оптическую плотность при 450/595 нм. Данные нормировали по необработанному контролю, принятому за 100%. Значения IC_{50} рассчитывали в GraphPad Prism 10.4.0 по трехпараметрической модели log(inhibitor) vs. response.

Определение активности SA-β-gal в клетках

Сенесцентные клетки после 7-дневной инкубации с препаратами выявляли окрашиванием с субстратом X-Gal (1 мг/мл, TargetMol, США) по стандартному протоколу [20]. Клетки фиксировали 2% параформальдегидом, инкубацию проводили при 37°C в течение 24–48 ч до появления синего окрашивания, фотографировали с помощью инверсионного микроскопа Eclipse TS100-F (Nikon, Япония). Интенсивность окрашивания оценивали в программе ImageJ (NIH, США) по интегральной плотности сигнала с нормализацией на площадь и коррекцией по фону.

Количественная ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-кПЦР)

Суммарную РНК выделяли реагентом ExtractRNA («Евроген», Россия), концентрацию определяли на спектрофотометре NanoDrop One C (Thermo Fisher Scientific, США). кДНК синтезировали с использованием MMLV RT («Евроген») по инструкции производителя. Реакции ПЦР в реальном времени проводили на приборе LightCycler 96 (Roche, Швейцария) с реагентом qPCRmix-HS SYBR («Евроген») при стандартных условиях. Отсутствие неспецифичных продуктов контролировали по кривым плавления. Внутренний контроль – 18S рРНК. Относительные уровни экспрессии генов рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$; различия считали значимыми при $p < 0.05$. Праймеры для выявления экспрессии $p21^{Waf1}$, $p27^{KIP1}$ и cFLIP перечислены в *табл. 1*.

Проточная цитометрия

Поверхностную экспрессию рецептора DR5 детектировали методом проточной цитометрии. Клетки после 7-дневной обработки химиопрепаратами открепляли раствором EDTA, инкубировали в течение 1 ч при 4°C с моноклональным антителом к DR5 (клон DR5-01-1) (GeneTex, США), затем трижды промывали FACS-буфером и инкубировали в течение 1 ч при 4°C с вторичными антителами DyLight 488 (GeneTex, США). Изотипический контроль с IgG1 мыши окрашивали параллельно. Детекцию проводили на цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter, США), уровень DR5 выражали как ΔMFI относительно изотипического контроля.

Анализ динамики роста клеток

Клетки для оценки динамики их роста подсчитывали после 7-дневной инкубации с химиопрепаратами с использованием камеры Горяева. Живые клетки определяли по исключению трипанового синего. Для расчета индекса ингибирования роста (GI) применяли формулу:

$$GI\ (\%) = (N_{обр} - N_0) / (N_{контроль} - N_0) \times 100.$$

Значения GI интерпретировали следующим образом: GI = 100% – рост как в контроле; GI ≈ 0% – полная остановка пролиферации на уровне посева; GI < 0% – цитотоксичность.

Анализ транскриптомных данных

Данные РНК-секвенирования панкреатических клеточных линий получены из базы DepMap (Omics Expression Protein-Coding Genes, нормализованные значения log2(TPM+1)) [21, 22]. Анализировали экспрессию генов интереса в исследуемых линиях. Обработку и визуализацию данных выполняли в среде R версии 4.3.2 (R Foundation for Statistical Computing, Австрия; https://www.r-project.org/) с использованием пакета ggplot2 (версия 3.4.4).

Статистический анализ

Статистическую обработку данных выполняли с использованием программы GraphPad Prism 10.4.0. Эксперименты выполняли в трех повторах; результаты представлены как среднее ± SEM. Различия оценивали методом ANOVA (или Welch's ANOVA при неоднородности дисперсий) с тестом Даннетта; значимыми считали $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование индукции сенесцентности в клеточных линиях РПЖ гемцитабином и доксорубицином

Известно, что РПЖ характеризуется выраженной генетической и фенотипической гетерогенностью, проявляющейся в различиях клеточных моделей *in vitro* [23]. Ранее было показано, что клеточные линии РПЖ по-разному реагируют на химиопрепараты и способны в разной степени формировать сенесцентный фенотип [13, 14, 24]. В наших экспериментах исследовали четыре линии РПЖ человека: MIA PaCa-2, PANC-1, BxPC-3 и AsPC-1. Для индукции сенесцентности использовали гемцитабин – препарат, применяемый в клинике для лечения РПЖ, а также известный модельный химиопрепарат доксорубицин, способный вызывать повреждение ДНК и индуцировать сенесцентность [25, 26]. Оба препарата применяли в субтоксичных концентрациях, подобранных в предварительных экспериментах (до 20% клеточной гибели). Клеточную сенесцентность подтверждали по нескольким критериям, таким как оценка скорости роста клеток, окрашивание на активность фермента SA-β-gal, а также относительная экспрессия p21 и p27 [27].

Исследованные клеточные линии демонстрировали различную восприимчивость к индукции сенесцентности. Окрашивание на активность SA-β-gal

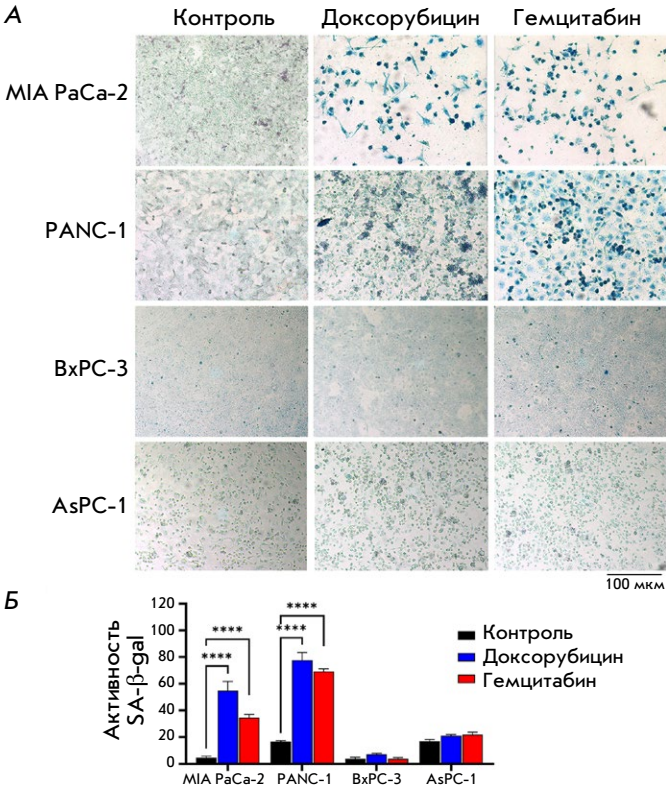

Рис. 1. Активация SA-β-gal в клеточных линиях РПЖ MIA PaCa-2, PANC-1, BxPC-3 и AsPC-1 после 7-дневной инкубации с доксорубицином и гемцитабином в субтоксических дозах. *А* – окрашивание клеток на активность SA-β-gal. Масштаб 100 мкм. *Б* – количественный анализ интенсивности окрашивания (среднее ± SEM, $n = 3$, ****$p < 0.0001$)

выявило выраженное накопление позитивно окрашенных клеток в линиях MIA PaCa-2 и PANC-1, тогда как линии BxPC-3 и AsPC-1 не имели явного окрашивания (*рис. 1А*). Количественный анализ интенсивности окрашивания в программе ImageJ подтверждает эти наблюдения (*рис. 1Б*). Уровень окраски клеток MIA PaCa-2 возрастал в 7 и 11 раз, а PANC-1 – в 4 и 5 раз после воздействия гемцитабином и доксорубицином соответственно. В клеточных линиях AsPC-1 и BxPC-3 достоверные изменения окраски на активность SA-β-gal зафиксированы не были (*рис. 1Б*).

Так как основным признаком сенесцентных клеток является остановка пролиферации, этот показатель количественно оценивали с использованием индекса клеточного роста (GI). Полученные значения GI свидетельствовали о выраженном ингибировании пролиферации в клетках MIA PaCa-2, PANC-1 и AsPC-1 с незначительным цитотоксическим эффектом (MIA PaCa-2: −10% при обработке доксорубицином и гемцитабином; PANC-1: −25%

для доксорубицина, 5% – для гемцитабина; AsPC-1: 0% и −18%) *(рис. 2А)*. Доксорубицин практически не ингибировал пролиферацию клеток BxPC-3 (*рис. 2А*), а гемцитабин повышал GI до 159%, что можно объяснить адаптивными механизмами пролиферации в условиях субтоксического стресса. Подобный рост после обработки гемцитабином наблюдали и ранее, где низкие дозы препарата стимулировали метастазирование в ксенографтной модели BxPC-3 *in vivo* [28]. Этот феномен согласуется с концепцией химиотерапевтического гормезиса, предполагающей, что субтоксичные дозы цитостатиков могут вызывать не угнетение, а стимуляцию роста и прогрессию опухоли [29].

Повышение экспрессии ингибиторов циклин-зависимых киназ p21 и p27 отражает активацию механизмов стойкой остановки клеточного цикла, что подтверждает формирование сенесцентного фенотипа опухолевых клеток [30, 31]. По данным ОТ-кПЦР, гемцитабин и доксорубицин вызывали повышение экспрессии p21/p27 в MIA PaCa-2 и AsPC-1, тогда как в PANC-1 уровень p21 увеличивался лишь под действием гемцитабина, а p27 – только после применения доксорубицина (*рис. 2Б*). В линии клеток BxPC-3 значимых изменений не наблюдалось, а уровень p27 даже несколько снижался после обработки гемцитабином. Известно, что индукция экспрессии p21 и p27 при сенесцентности во многом определяется статусом гена *TP53* (p53), а линии РПЖ характеризуются выраженной гетерогенностью по этому признаку. Индукция p21 и p27 различалась между линиями и не зависела напрямую от статуса p53. В клетках PANC-1 и BxPC-3 наблюдался несогласованный рост маркеров или отсутствие изменений, что согласуется с частично дефектной транскрипционной активностью мутантного p53 в этих клетках [32]. В клетках MIA PaCa-2 и AsPC-1 независимо от мутаций или отсутствия p53 химиопрепараты вызывали выраженную индукцию p21 и p27, что, вероятно, указывает на активацию p53-независимых путей формирования сенесцентности (например, через p73/TAp63 или TGF-β/SMAD) [33, 34].

В клетках AsPC-1, несмотря на рост p21/p27 и снижение GI (*рис. 2А,Б*), активность SA-β-gal не изменялась (рис. *1А*). Подобное несоответствие может быть, согласно данным из базы DepMap, связано с высоким базальным уровнем экспрессии гена β-галактозидазы *GLB1* (*рис. 2В*) или ограниченной способностью клеток к увеличению лизосомной массы, определяющей активность SA-β-gal.

Известно, что одним из ключевых факторов, поддерживающих клеточную устойчивость и предотвращающих старение, является FOXO3 (транскрипционный фактор семейства FOXO), регулирующий экспрессию генов стресс-ответа [35]. Недавно было показано, что повышение активности FOXO3 обеспечивает устойчивость клеток к стрессу, снижает активность SA-β-Gal, ограничивает SASP и способствует сохранению тканевого гомеостаза [36]. По данным DepMap экспрессия *FOXO3* была минимальной в MIA PaCa-2 и высокой в клетках AsPC-1, BxPC-3 и PANC-1 (*рис. 2В*). Формирование классического сенесцентного фенотипа в MIA PaCa-2 может быть связано с дефицитом опосредованных FOXO3 защитных механизмов [35].

Таким образом, химиопрепараты вызывали сенесцентность в трех из четырех линий (MIA PaCa-2, PANC-1, AsPC-1), наиболее выраженную в MIA PaCa-2.

Исследование сенолитической активности DR5-селективного цитокина TRAIL DR5-B на клеточных линиях РПЖ с сенесцентностью, индуцированной химиопрепаратами

Ранее нами был получен рецептор-селективный мутантный вариант противоопухолевого цитокина TRAIL DR5-B, который избирательно связывается рецептором смерти DR5 [18]. Этот белок показал повышенную цитотоксическую активность на различных линиях опухолевых клеток как *in vitro*, так и *in vivo*, что обусловлено отсутствием аффинности к рецепторам-ловушкам TRAIL DcR1 и DcR2, повышение которых ассоциировано с сенесцентностью [37, 38]. Для оценки сенолитического потенциала DR5-B исследовали его цитотоксичность на клеточных линиях РПЖ после предынкубации с доксорубицином или гемцитабином. Известно, что химиопрепараты повышают экспрессию рецептора DR5 в опухолевых клетках [39, 40]. После 7 дней инкубации с гемцитабином или доксорубицином наблюдали значительное повышение поверхностной экспрессии рецептора DR5 в клетках MIA PaCa-2 (225% после гемцитабина и 64% после доксорубицина), PANC-1 (87% после гемцитабина и 83% после доксорубицина) и AsPC-1 (92% после гемцитабина и 41% после доксорубицина) (*рис. 3А,Б*). Значимое увеличение уровня экспрессии DR5 на поверхности клеток BxPC-3 (46%) отмечено только после воздействия гемцитабином.

Наблюдалась выраженная сенсибилизация клеток MIA PaCa-2 к DR5-B со значительным снижением IC_{50} препарата: в 1.9 раза после обработки гемцитабином и в 5 раз после воздействия доксорубицина (*рис. 3В, табл. 2*). Предынкубация с химиопрепаратами также усиливала чувствительность клеток PANC-1 к DR5-B: IC_{50} DR5-B был в 1.8 и в 2.7 раза ниже после обработки гемцитабином и доксоруби-

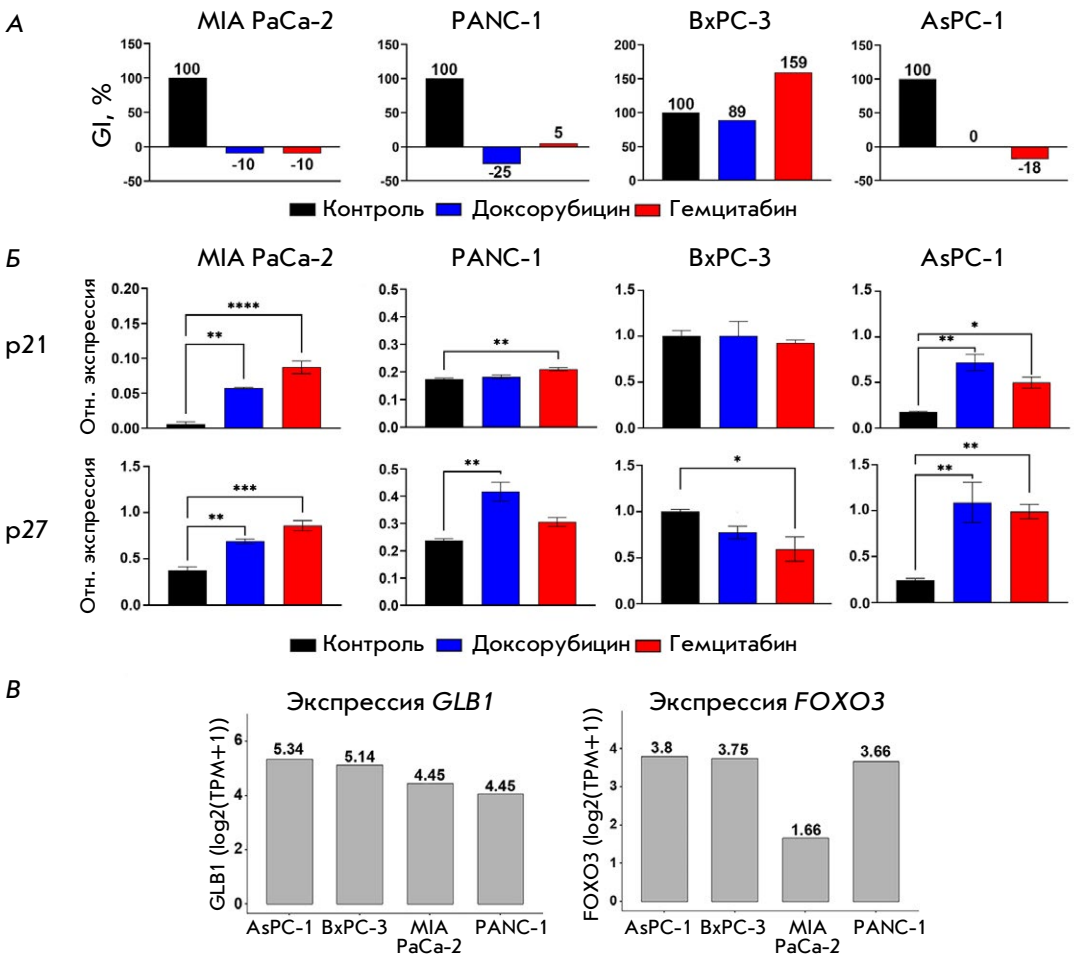

Рис. 2. Молекулярные и функциональные признаки сенесцентности в клеточных линиях РПЖ после воздействия доксорубицином или гемцитабином. *А* – индекс ингибирования роста (GI) после 7-дневной инкубации с химиопрепаратами. *Б* – относительная экспрессия генов *CDKN1A* (p21) и *CDKN1B* (p27) по данным ОТ-кПЦР (среднее ± SEM, $n = 3$, $^{*}p < 0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$, $^{****}p < 0.0001$). *В* – экспрессия генов *GLB1* и *FOXO3* в клеточных линиях РПЖ (log2(TPM+1)) согласно данным RNA-seq из базы DepMap

цином соответственно. Чувствительность клеток BxPC-3 к DR5-B после инкубации с химиопрепаратами практически не изменялась. Следует отметить, что фенотип этих клеток не соответствовал ни одному из критериев сенесцентного фенотипа.

В резистентных к DR5-B клетках AsPC-1 сенолитический эффект DR5-B полностью отсутствовал (*рис. 3В*), что, вероятно, связано с высоким уровнем антиапоптотического белка cFLIP, экспрессия которого возрастала после воздействия химиопрепаратов (рис. *3Г*). Известно, что уровень супрессора клеточной гибели cFLIP варьирует между клеточными линиями РПЖ, а его повышение ассоциируется с устойчивостью к DR5-зависимому апоптозу [41, 42]. По нашим данным, уровень экспрессии cFLIP был максимальным в клетках AsPC-1, снижался в BxPC-3 и не влиял на чувствительность MIA PaCa-2 и PANC-1. В связи с этим перспективной может быть стратегия комбинированного воздействия, при которой ингибирование cFLIP усиливает чувствительность сенесцентных клеток к активации DR5, как показано ранее на ряде моделей [17].

Полученные результаты свидетельствуют, что селективный агонист рецептора DR5, белок DR5-B, проявляет сенолитический эффект в клетках, формирующих зрелый сенесцентный фенотип, тогда как линии, сохраняющие пролиферативный потенциал или характеризующиеся высоким уровнем антиапоптотических регуляторов (таких как cFLIP), остаются устойчивыми к его действию. Эти данные подчеркивают, что при разработке новых терапевтических подходов следует учитывать гетерогенность клонального состава опухолей. При этом нацеливание на рецептор DR5 в сочетании с подавлением ключевых антиапоптотических факторов может быть перспективной стратегией избирательной элиминации сенесцентных клеток РПЖ, индуцированных химиотерапией.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования последних десятилетий показали, что сенолитические препараты представляют исключительный интерес для разработки новых методов противоопухолевой терапии, таких как сено-

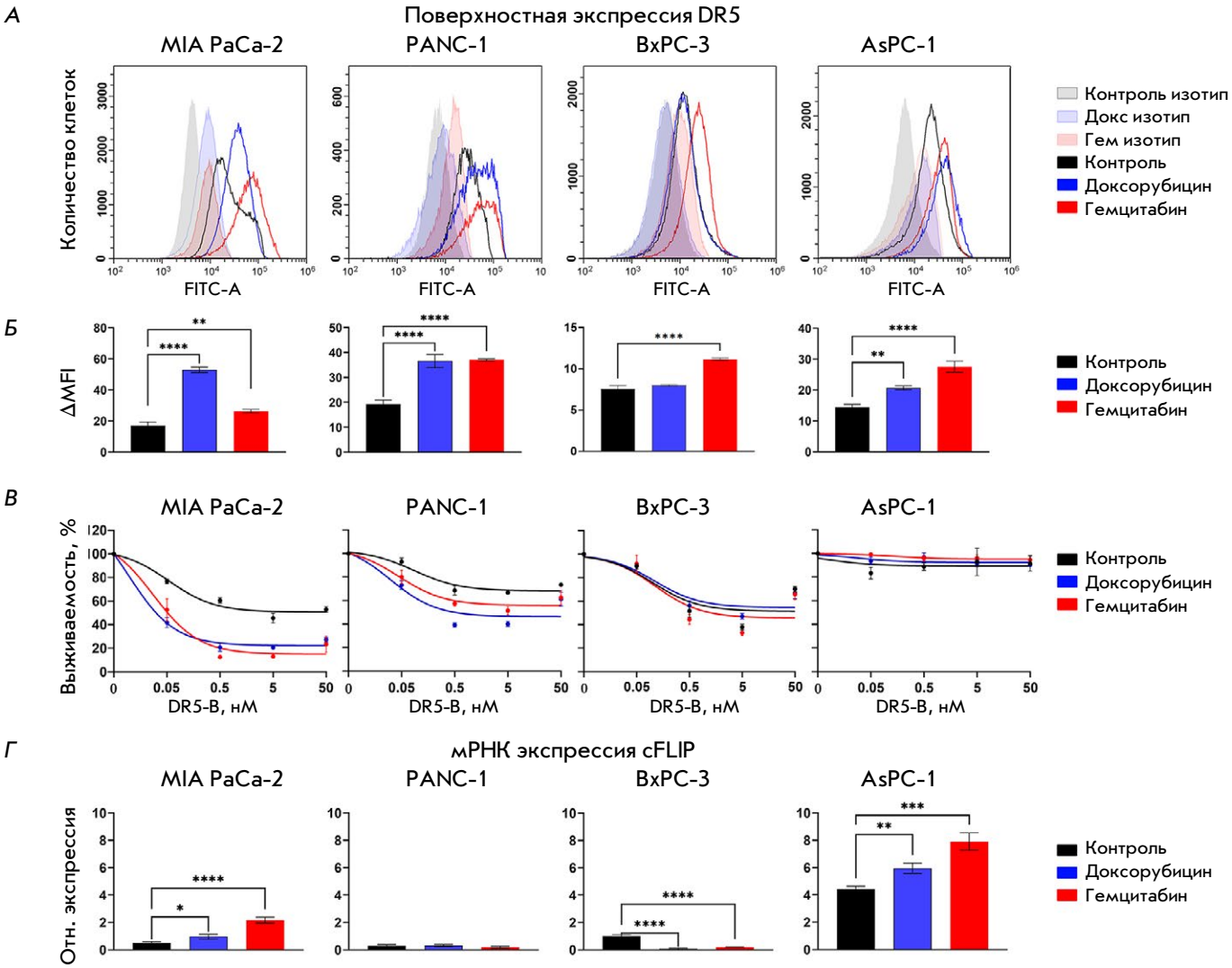

Рис. 3. Цитотоксичность DR5-B на клеточных линиях РПЖ после предынкубации с химиопрепаратами. *А* – экспрессия рецептора DR5 в клеточных линиях РПЖ после 7-дневной инкубации с доксорубицином или гемцитабином, гистограммы проточной цитометрии (FITC-A). *Б* – значения ΔMFI (anti-DR5-изотип) (среднее ± SEM, $n = 3$, $^{**}p < 0.01$, $^{****}p < 0.0001$). *В* – жизнеспособность опухолевых клеток после инкубации с DR5-B в течение 72 ч. *Г* – экспрессия cFLIP по данным ОТ-кПЦР (среднее ± SEM, $n = 3$, $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$, $^{****}p < 0.0001$)

Таблица 2. Значения IC_{50} DR5-B в клеточных линиях РПЖ после 7-дневной предобработки химиопрепаратами

Клеточная линия	Контроль	Гемцитабин	Доксорубицин
PANC-1	0.085 ± 0.037	0.044 ± 0.018	0.031 ± 0.019
MIA PaCa-2	0.054 ± 0.015	0.027 ± 0.008	0.0096 ± 0.0028
BxPC-3	0.102 ± 0.067	0.113 ± 0.074	0.109 ± 0.051
AsPC-1	н.о.	н.о.	н.о.

литическая терапия [43]. Популярной стратегией считается так называемый «двойной удар», при котором раковые клетки сначала приобретают уязвимость под действием химиопрепаратов, индуцирующих их старение, а затем уничтожаются сенолитическими агентами. Сенолитическая терапия может предотвратить метастазирование опухоли, возникновение резистентности к лечению и реци-

див за счет избирательной элиминации опухолевых сенесцентных клеток. Стремительное развитие области сопровождается активным ростом числа доклинических и клинических испытаний. Эти исследования определят будущее сенолитической терапии, оценят ее безопасность и эффективность для пациентов. В данной работе впервые показана сенолитическая активность агониста рецептора смерти DR5, а именно, рецептор-селективного варианта противоопухолевого цитокина TRAIL DR5-B, на клеточных линиях аденокарциномы поджелудочной железы после воздействия химиопрепаратами доксорубицином и гемцитабином. Нацеливание на рецептор DR5 может стать перспективной стратегией селективной элиминации сенесцентных опухолевых клеток в сочетании с подавлением ключевых факторов резистентности клеток к апоптозу. Для оценки терапевтического потенциала препарата DR5-B в качестве сенолитического агента потребуются доклинические испытания на животных моделях. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда грант № 24-24-00222 (https://rscf.ru/project/24-24-00222/).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lo VCK, Goodwin RA, Vickers MM. The role of systemic therapy in borderline resectable and locally advanced pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Cancer Metastasis Treat.* 2022;8:30. doi:10.20517/2394-4722.2022.48
2. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res.* 2014;74(11):2913-2921. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0155
3. Peshin S, Takrori E, Kodali NA, Bashir F, Singal S. Advances in the Management of Pancreatic Cancer: Current Strategies and Emerging Therapies. *Int J Mol Sci.* 2025;26(15):7055. doi:10.3390/ijms26157055
4. Neoptolemos JP, Kleeff J, Michl P, Costello E, Greenhalf W, Palmer DH. Therapeutic developments in pancreatic cancer: current and future perspectives. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018;15(6):333-348. doi:10.1038/s41575-018-0005-x
5. Ma Y, Zhang F, Yang Y. Recent advances in the treatment of pancreatic cancer. *Holist Integr Oncol.* 2024;3(1):34. doi:10.1007/s44178-024-00089-6
6. Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol.* 2011;192(4):547-556. doi:10.1083/jcb.201009094
7. Borodkina AV, Deryabin PI, Giukova AA, Nikolsky NN. “Social Life” of Senescent Cells: What Is SASP and Why Study It? *Acta Naturae.* 2018;10(1):4-14. doi:10.32607/20758251-2018-10-1-4-14
8. Lau L, David G. Pro- and anti-tumorigenic functions of the senescence-associated secretory phenotype. *Expert Opin Ther Targets.* 2019;23(12):1041-1051. doi:10.1080/14728222.2019.1565658
9. Faget DV, Ren Q, Stewart SA. Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2019;19(8):439-453. doi:10.1038/s41568-019-0156-2
10. Liu K, Huang H, Zhang M, et al. When therapy-induced senescence meets tumors: A double-edged sword: A review. *Medicine (Baltimore).* 2025;104(24):e42886. doi:10.1097/MD.0000000000042886
11. Cortesi M, Zanoni M, Pirini F, et al. Pancreatic Cancer and Cellular Senescence: Tumor Microenvironment under the Spotlight. *Int J Mol Sci.* 2021;23(1):254. doi:10.3390/ijms23010254
12. Song Y, Baba T, Mukaida N. Gemcitabine induces cell senescence in human pancreatic cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;477(3):515-519. doi:10.1016/j.bbrc.2016.06.063
13. Jaber S, Warnier M, Leers C, et al. Targeting chemoresistant senescent pancreatic cancer cells improves conventional treatment efficacy. *Mol Biomed.* 2023;4:4. doi:10.1186/s43556-023-00116-4
14. Hoque MM, Iida Y, Kotani H, Harada M. Senolysis of gemcitabine-induced senescent human pancreatic cancer cells. *Cancer Rep.* 2024;7(4):e2075. doi:10.1002/cnr2.2075
15. Lelarge V, Capelle R, Oger F, Mathieu T, Le Calvé B. Senolytics: from pharmacological inhibitors to immunotherapies, a promising future for patients’ treatment. *Npj Aging.* 2024;10(1):12. doi:10.1038/s41514-024-00138-4
16. Soto-Gamez A, Wang Y, Zhou X, Seras L, Quax W, Demaria M. Enhanced extrinsic apoptosis of therapy-induced senescent cancer cells using a death receptor 5 (DR5) selective agonist. *Cancer Lett.* 2022;525:67-75. doi:10.1016/j.canlet.2021.10.038
17. Wang L, Jin H, Jochems F, et al. cFLIP suppression and DR5 activation sensitize senescent cancer cells to senolysis. *Nat Cancer.* 2022;3(11):1284-1299. doi:10.1038/s43018-022-00462-2
18. Gasparian ME, Chernyak BV, Dolgikh DA, et al. Generation of new TRAIL mutants DR5-A and DR5-B with improved selectivity to death receptor 5. *Apoptosis.* 2009;14(6):778-787. doi:10.1007/s10495-009-0349-3
19. Yagolovich AV, Artykov AA, Dolgikh DA, Kirpichnikov MP, Gasparian ME. A New Efficient Method for Production of Recombinant Antitumor Cytokine TRAIL and Its Receptor-Selective Variant DR5-B. *Biochem Mosc.* 2019;84(6):627-636. doi:10.1134/S0006297919060051
20. Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-βgal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc.* 2009;4(12):1798-1806. doi:10.1038/nprot.2009.191
21. DepMap, Broad. DepMap Public 25Q3. Published online 2025. https://depmap.org
22. Arafeh R, Shibue T, Dempster JM, Hahn WC, Vazquez F. The present and future of the Cancer Dependency Map. *Nat Rev Cancer.* 2025;25(1):59-73. doi:10.1038/s41568-024-00763-x
23. Dreyer SB, Chang DK, Bailey P, Biankin AV. Pancreatic Cancer Genomes: Implications for Clinical Management and Therapeutic Development. *Clin Cancer Res.* 2017;23(7):1638-1646. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-2411
24. Jeiroshi A, Deng J, Xu Z, et al. Navigating the paradox of senescence and chemoresistance in pancreatic cancer. *Semin Cancer Biol.* 2025;114:60-72. doi:10.1016/j.semcancer.2025.06.007
25. De Nunzio V, Aloisio Caruso E, Centonze M, et al. Delta-9 desaturase reduction in gastrointestinal cells induced to senescence by doxorubicin. *FEBS Open Bio.* 2025;15(3):462-473. doi:10.1002/2211-5463.13945

26. Karabicici M, Alptekin S, Fırtına Karagonlar Z, Erdal E. 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):2185-2202. doi:10.1002/1878-0261.12916
27. Wang L, Lankhorst L, Bernards R. Exploiting senescence for the treatment of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2022;22(6):340-355. doi:10.1038/s41568-022-00450-9
28. Sugisawa N, Miyake K, Higuchi T, et al. Induction of Metastasis by Low-dose Gemcitabine in a Pancreatic Cancer Orthotopic Mouse Model: An Opposite Effect of Chemotherapy. *Anticancer Res.* 2019;39(10):5339-5344. doi:10.21873/anticanres.13726
29. Gaya A, Akle CA, Mudan S, Grange J. The Concept of Hormesis in Cancer Therapy – Is Less More? *Cureus.* 2015;7(4):e261. doi:10.7759/cureus.261
30. Flores JM, Martín-Caballero J, García-Fernández RA. p21 and p27 a shared senescence history. *Cell Cycle.* 2014;13(11):1655-1656. doi:10.4161/cc.29147
31. 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
32. Jahedi H, Fahud AL, Lim CL. Role of p53 family isoforms in enhancing aggressiveness and chemoresistance in pancreatic cancer (Review). *World Acad Sci J.* 2019;1(5):236-246. doi:10.3892/wasj.2019.23
33. Zhou Y, Nakajima R, Shirasawa M, et al. Expanding Roles of the E2F-RB-p53 Pathway in Tumor Suppression. *Biology.* 2023;12(12):1511. doi:10.3390/biology12121511
34. Donovan J, Slingerland J. Transforming growth factor-β and breast cancer: Cell cycle arrest by transforming growth factor-β and its disruption in cancer. *Breast Cancer Res.* 2000;2(2):116. doi:10.1186/bcr43
35. Martins R, Lithgow GJ, Link W. Long live FOXO: unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity. *Aging Cell.* 2016;15(2):196-207. doi:10.1111/acel.12427
36. Lei J, Xin Z, Liu N, et al. Senescence-resistant human mesenchymal progenitor cells counter aging in primates. *Cell.* 2025;188(18):5039-5061.e35. doi:10.1016/j.cell.2025.05.021
37. Gasparian ME, Bychkov ML, Yagolovich AV, Dolgikh DA, Kirpichnikov MP. Mutations enhancing selectivity of antitumor cytokine TRAIL to DR5 receptor increase its cytotoxicity against tumor cells. *Biochem Mosc.* 2015;80(8):1080-1091. doi:10.1134/S0006297915080143
38. Yagolovich AV, Artykov AA, Karmakova TA, et al. Genetically Modified DR5-Specific TRAIL Variant DR5-B Revealed Dual Antitumor and Protumoral Effect in Colon Cancer Xenografts and an Improved Pharmacokinetic Profile. *Transl Oncol.* 2020;13(4):100762. doi:10.1016/j.tranon.2020.100762
39. Min K jin, Woo SM, Shahriyar SA, Kwon TK. Elucidation for modulation of death receptor (DR) 5 to strengthen apoptotic signals in cancer cells. *Arch Pharm Res.* 2019;42(1):88-100. doi:10.1007/s12272-018-01103-y
40. Artykov AA, Belov DA, Shipunova VO, et al. Chemotherapeutic Agents Sensitize Resistant Cancer Cells to the DR5-Specific Variant DR5-B more Efficiently than to TRAIL by Modulating the Surface Expression of Death and Decoy Receptors. *Cancers.* 2020;12(5):1129. doi:10.3390/cancers12051129
41. Kauh J, Fan S, Xia M, et al. c-FLIP Degradation Mediates Sensitization of Pancreatic Cancer Cells to TRAIL-Induced Apoptosis by the Histone Deacetylase Inhibitor LBH589. *PLoS One.* 2010;5(4):e10376. doi:10.1371/journal.pone.0010376
42. König C, Ivanisenko NV, Ivanisenko VA, Kulms D, Lavrik IN. Pharmacological targeting of caspase-8/c-FLIPL heterodimer enhances complex II assembly and elimination of pancreatic cancer cells. *Commun Biol.* 2025;8:4. doi:10.1038/s42003-024-07409-6
43. Czajkowski K, Herbet M, Murias M, Piątkowska-Chmiel I. Senolytics: charting a new course or enhancing existing anti-tumor therapies? *Cell Oncol Dordr Neth.* 2025;48(2):351-371. doi:10.1007/s13402-024-01018-5