

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie živočichů



Bakalářská práce

Mechanismy úniku z buněčné senescence - protinádorové bariéry.

Eliška Davidová

Školitel: MUDr. Zdeněk Hodný, CSc.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 15. května 2013

.....
Eliška Davidová

Poděkování:

V první řadě bych ráda poděkovala svému školiteli MUDr. Zdeňkovi Hodnému, CSc. za jeho pomoc a podporu při psaní této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat rodině za poskytnutí opory a přátelům za jejich ochotu a cenné rady.

Abstrakt:

Rakovina je jednou z nejnebezpečnějších nemocí moderního světa. Proto se mnoho světových laboratoří zabývá výzkumem příčin vedoucích k propuknutí této zákeřné nemoci. V této souvislosti bylo již dříve zjištěno, že normální živočišné buňky se nedělí nekonečně dlouho, nýbrž mají konečnou kapacitu svého replikačního života. Po uplynutí této doby podléhají buňky buď apoptotickým procesům nebo vstupují do tzv. senescence, fáze typické ukončenou proliferací, ovšem zachovanými metabolickými pochody. Dalším výzkumem bylo odhaleno, že senescence slouží jako účinný protinádorový program a v současné době je osvětlován její význam také v souvislosti s různými fyziologickými procesy či patologiemi spojenými se stárnutím. V této práci je kladen důraz především na roli senescence jako bariéry výskytu nádorových onemocnění a její účinnost. Je možné předpokládat, že pokud by senescentní zástava cyklu fungovala dokonale, výskyt rakoviny mezi lidmi by byl zaznamenán v podstatně nižší míře. Cílem bakalářské práce je zpracování dosavadních poznatků o fyziologických a patologických úlohách senescence a možných příčinách překonání této bariéry, jehož následkem může být právě nekontrolované buněčné dělení a nádorové bujení.

Klíčová slova: buněčná senescence, protinádorová bariéra, nádorové mikroprostředí, cytokiny

Abstract:

Cancer is one of the most dangerous diseases of the modern world. Therefore, many world laboratories engaged in research into the causes leading to the outbreak of this insidious disease. In this context, it has already been found that the normal animal cells do not divide indefinitely, but have a finite replicative life span. After this period, cells undergo either apoptotic processes or enter into so-called senescence, typical for proliferation arrest, but preserved metabolic processes. Further research has revealed that senescence serves as an effective anticancer program and currently is shed light on its significance in relation to various physiological or pathological processes associated with aging. In this work, the focus is on the role of senescence as a barrier for cancer development, and effectiveness. It can be assumed, that if the senescent cycle arrest functioned perfectly, the incidence of cancer among people would be recorded in much lower extent. The aim of this thesis is the current knowledge about the physiological and pathological roles of senescence and possible causes of overcoming this barrier, the result may be the uncontrolled cell division and tumorigenicity.

Key words: cellular senescence, tumor suppressor barrier, tumor microenvironment, cytokines

Obsah:

Seznam použitých zkratk:	5
1. Úvod:	6
1.1. Buněčná senescence	7
1.1.1. Morfologie senescentních buněk	7
1.1.2. Markery senescence	7
1.1.3. Sekretom senescentních buněk	8
2. Typy senescence	9
2.1. Replikační senescence	9
2.2. Předčasná senescence	9
3. Mechanismus navození a udržení senescence	11
3.1. Buněčný cyklus, jeho regulace a senescence	11
3.1.1. Role p53 a Rb	11
3.2. SASP	13
4. Fyziologická úloha senescence	14
4.1. Megakaryocyty jako fyziologicky senescentní buňky	14
4.2. Hojení ran a fibrózy	14
5. Patofyziologický význam senescence	16
5.1. Nádorová bariéra nebo promotor nádorů?	16
5.1.1. Přítomnost v časných stádiích nádorů	16
5.1.2. Rozvoj senescence po (neoadjuvantní) chemoterapii	16
5.1.3. Úloha cytokinů	17
5.1.4. Imunitní dohled	18
5.2. Senescence a stárnutí	19
6. Otázka nevratnosti senescence	21
6.1. Bypass senescence	21
6.1.1. Účinky chemoterapie	22
6.2. Neóza	22
6.2.1. Buňky Raju	23
6.2.2. Polyploidizace	24
7. Závěr	25
Seznam použité literatury	26

Seznam použitých zkratk:

CDK – cyclin-dependent kinases, cyklin-dependentní kinázy

DDR – DNA damage response, odpověď na poškození DNA

ECM – extracellular matrix, extracelulární matrix

EMT – epithelial-to-mesenchymal transition, epiteliálně-mezenchymální přechod

ET - etoposid

IL-1, -6, -8, -10 – interleukin 1, 6, 8, 10

INF - interferon

M2 – mortality stage 2, stádium úmrtnosti 2

MLS – mitotic life span, délka mitotického života

MN/PGs – multinucleate/polyploid giant cells, obrovské mnohojaderné/polyploidní buňky

NK buňky – natural killer, přirození zabíječi

NMC – neosis mother cell, neózová mateřská buňka

p15 – p15INK4b

p16 - p16INK4a

p18 – p18INK4d

p19 – p19ARF/INK4c

p21 - p21waf1/cip1

p27 – p27kip1

p57 – p57kip2

PML – promyelotic leukemia protein, (protein) promyelocytární leukémie

Rb – retinoblastoma protein, protein retinoblastomu

ROS – reactive oxygen species, reaktivní radikály kyslíku

SA β -gal – senescence-associated β -galactosidase, se senescencí-asociovaná β -galaktosidasa

TGF – transforming growth factor, transformující růstový faktor

TH1 – T-helper-1, pomocný T-lymfocyt 1

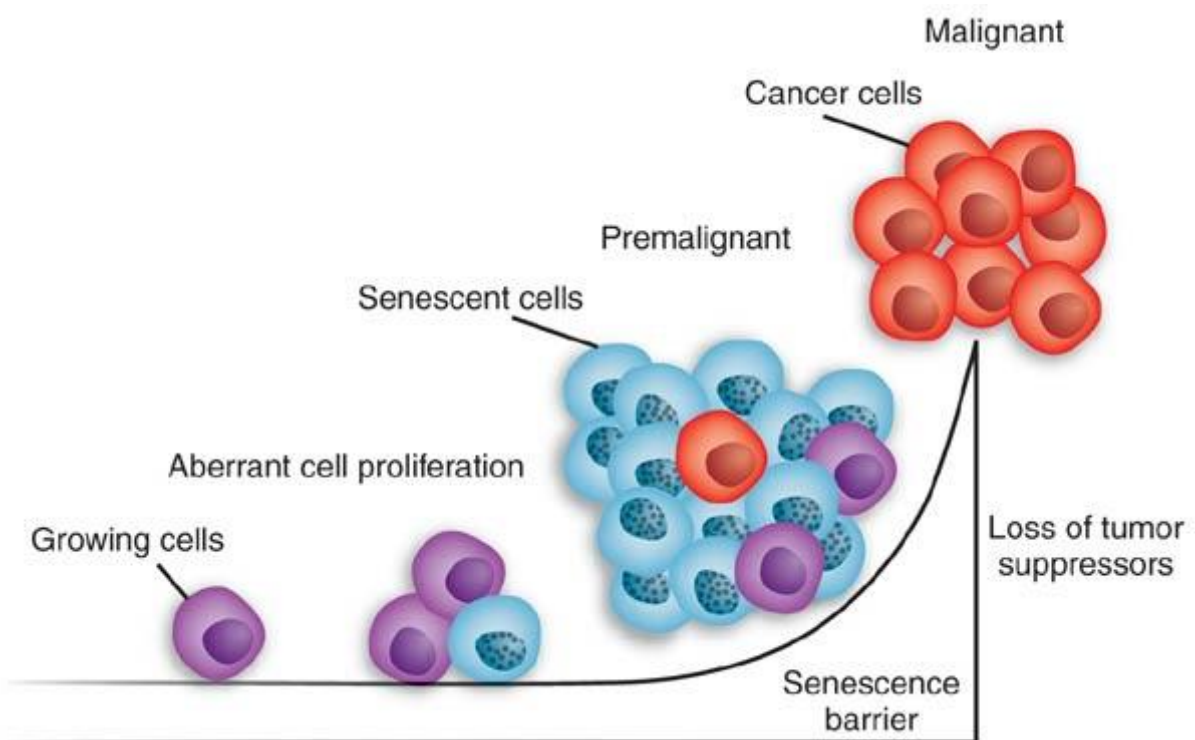
TNF – tumor necrosis factor, nádory nekrotizující faktor

TPO - trombopoetin

1. Úvod:

Rakovina je druhou nejčastější příčinou úmrtí u nás i ve světě. Každý rok zemře na rakovinu více než sedm milionů lidí a ročně je diagnostikováno téměř 11 milionů nových případů. (<http://rakovina-nador.zdrave.cz/svetovy-den-boje-proti-rakovine>).

Buněčná senescence, tedy ireverzibilní zástava buněčného cyklu je považována za bariéru bránící vzniku nádorů (Obrázek 1). Je všeobecně známo, že populace rakovinných buněk disponují neobvyklou délkou života; způsobenou mutacemi a poškozením DNA, proto se označují jako nesmrtelné. Senescence je mechanismus, který zabraňuje normálním, a za jistých okolností i nádorovým, buňkám s neopravitelným poškozením DNA v nelimitovaném růstu. Role senescence jako protinádorového programu byla prokázána *in vitro* i *in vivo*, avšak vzhledem ke stálému nárůstu pacientů s diagnostikovaným výskytem rakoviny a její časté rezistenci k léčbě zůstává otázkou, jak „odolná“ tato bariéra je. Shrnutí našich současných znalostí o možnostech buněk uniknout ze senescence je cílem této bakalářské práce.



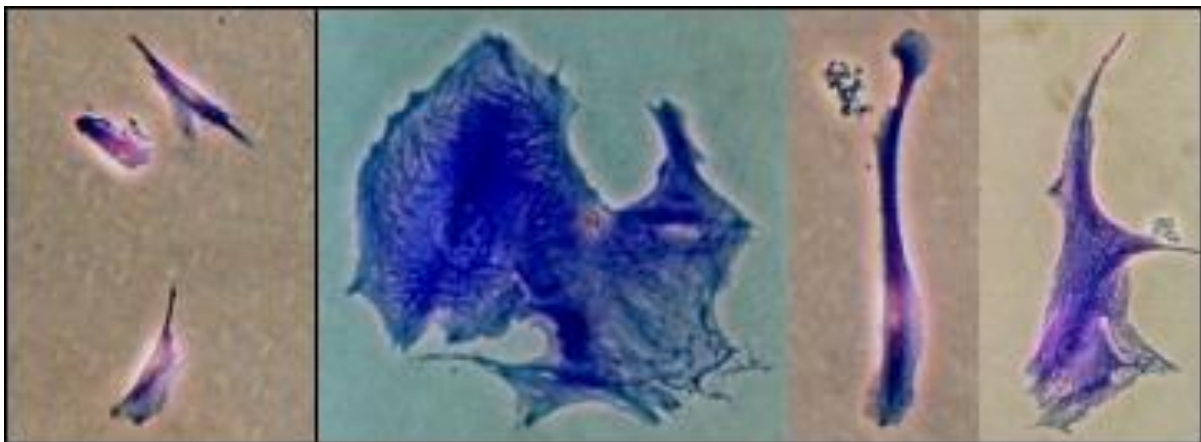
Obrázek 1: Senescence je bariérou vzniku nádorů (Narita and Lowe, 2005 - internetový zdroj: <http://www.csc.mrc.ac.uk/News/News/BehindBarrier/>)

1.1. Buněčná senescence

Většina normálních somatických buněk disponuje určitou konečnou kapacitou svého replikačního života (Hayflick and Moorhead, 1961). Po této proliferativní fázi nastává fáze neproliferativní, nazývaná též buněčná senescence. Tento protinádorový program tvoří ekvivalent programované buněčné smrti – apoptózy.

1.1.1. Morfologie senescentních buněk

Senescentní buňky nejsou od normálně fungujících buněk rozeznatelné pouze díky zástavě buněčného cyklu a neschopnosti dělení, nýbrž se zřetelně odlišují také svým fenotypem. Morfologicky jsou senescentní buňky zploštělé, silně roztažené a se zvětšeným jádrem (Obrázek 2), často mnohojaderné a/nebo polyploidní s vysokou frekvencí jaderných abnormalit (Dell'Orco and Whittle, 1994). Jsou metabolicky aktivní a dlouhodobě životaschopné, avšak neodpovídají na silné mitogenní a některé apoptotické podněty. Buňky se zastaveným růstem se nacházejí převážně v G1/S, případně G2/M fázi buněčného cyklu (Chen et al., 2000).



Obrázek 2: Normální lidské fibroblasty (vlevo) a fibroblasty vykazující senescentní morfologii (tři obrázky vpravo) (www.senescence.info)

1.1.2. Markery senescence

Ačkoli program zástavy buněčného růstu je studován již přes 50 let, univerzální ukazatel pro všechny typy senescentních buněk nebyl dosud objeven. Existuje však několik markerů, které jsou známé svou přítomností či expresí v buňkách podléhajících senescenci. Mohu jmenovat například výše zmíněnou zástavu buněčného cyklu v G1/S fázi a typickou změnu morfologie buněk. Dále také expresi genů inhibujících cyklin-dependentní kinázy, např.: p16INK4A (p16) a p21waf1/cip1 (p21), což jsou vlastní efekторы senescence.

Nejčastěji se však k detekci přítomnosti senescentních buněk používá se senescenci-asociovaná β -galaktosidasa (SA β -gal) (Dimri et al., 1995). Její zvýšené množství je důsledkem expanze lyzozomů senescentních buněk (Lee et al., 2006) a exprese je natolik zvýšená, že na rozdíl od normálního stavu, kdy je SA β -gal detekována pouze při pH 4,5, v kultuře senescentních buněk můžeme její přítomnost prokázat i při suboptimálním pH 6 (Gary et al., 2005). Nevýhodou použití SA β -gal je její nevhodnost pro stanovení senescence v živém organismu, protože aktivita tohoto enzymu se výrazně liší mezi jednotlivými typy buněk tkání, což znesnadňuje stanovení *in vivo* a jednoznačné určení, že se jedná o senescentní buňku.

Dalším markerem senescence je nádorový supresor protein PML (promyelocytární leukémie). Vyrůstající množství jaderných tělísek PML bylo dosud popsáno u všech typů senescence (Janderova-Rossmislova et al., 2007).

1.1.3. Sekretom senescentních buněk

Pojmem sekretom jsou souhrnně označovány všechny látky produkované buňkami do okolního prostředí. Různé buňky organismu se mezi sebou liší mimo jiné právě charakterem produkovaných látek, který se mění v závislosti na buněčném typu a funkci, ale i například po patologické či jiné přeměně buňky. Celková změna sekreční činnosti buněk je spojena i s jejich přechodem do stadia senescence. Senescentní buňky produkují mimo jiné řadu různých cytokinů, chemokinů a růstových faktorů, které mohou zahrnovat i desítky různých molekul, jak je tomu například v případech reakce na poškození DNA ionizujícím zářením či chemickými látkami (Coppe et al., 2008; Novakova et al. 2010). Spektrum faktorů produkované senescentními buňkami se souhrnně nazývá „sekreční fenotyp asociovaný se senescencí“ z anglického SASP (senescence-associated secretory phenotype). Sekreční fenotyp působí jak autokrinně na senescentní buňky samotné, tak i parakrinně na jejich sousedy. Hlavní skupinou produktů jsou rozličné rozpustné faktory, jejichž nejvýznamnější složku tvoří prozánětlivé cytokiny. Cytokiny, někdy také nazývané „tkáňové hormony“, jsou v lidském těle hlavními mediátory imunitní odpovědi a podílejí se na mezibuněčné komunikaci. Prozánětlivé cytokiny (IL1, IL6, IL8 a TNF α), a morfogeny (z rodiny TGF β - někteří členové skupiny BMP, GDF apod.) produkované senescentními buňkami tedy mohou napodobovat situaci hojení poškozené tkáně a aktivovat buňky imunitního systému. SASP ovlivňuje mikroprostředí senescentních buněk, napomáhá udržování homeostázy senescentních buněk a způsobuje útlum proliferace u buněk v bezprostředním okolí. Jak bude uvedeno dále, sekretované látky však mohou mít také nežádoucí účinky. Příkladem jsou projevy chronického zánětu, indukce množení nebo naopak navození senescence, či epiteliálně-mezenchymální přechod (EMT) (Ansieau et al., 2008), který je sice fyziologickým projevem během hojení tkání, ale i základem invazivity zhoubných nádorů.

2. Typy senescence

Stabilní zástava buněčného cyklu není výsledkem pouze jediného procesu, nýbrž může být indukována mnoha různými způsoby, které se dají rozdělit do dvou základních skupin.

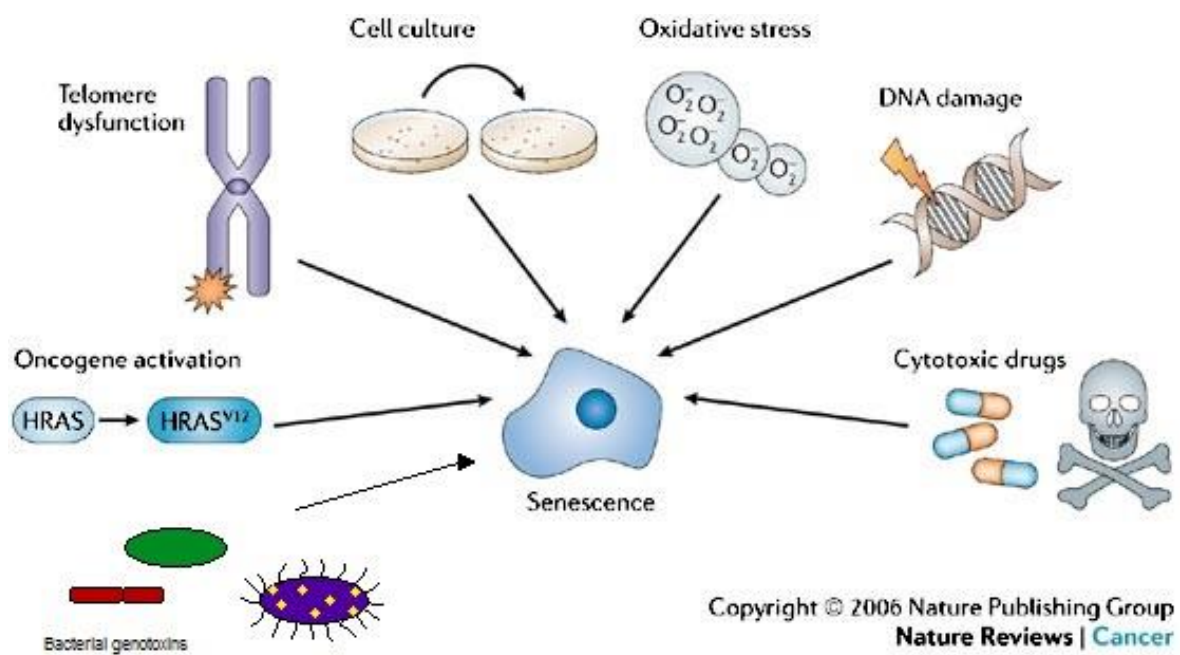
2.1. Replikační senescence

Tento typ senescence byl objeven jako první (Hayflick and Moorhead, 1961) a donedávna byl také pokládán za hlavní příčinu ukončení buněčné proliferace. Replikační senescence je způsobena vyčerpáním mitotického potenciálu buněk, ke kterému dochází následkem narušení telomer (Allsopp et al., 1995). Telomery jsou koncové části eukaryotických chromosomů, které slouží k jejich ochraně před degradací a fúzí, avšak v průběhu dělení buněk dochází k jejich poškození spojeným s jejich zkrácením. Tento limitovaný počet mitotických dělení se nazývá Hayflickův limit (Hayflick, L., 1965) a liší se v závislosti na buněčném typu (například lidské embryonální plicní fibroblasty přecházejí do senescence asi po 50-ti a lidské kmenové mesenchymální buňky po 20-ti zdvojeních).

2.2. Předčasná senescence

Předčasná senescence (nazývaná také senescence indukovaná) se v poslední době jeví jako klíčová pro studium vzniku nádorů. Tento druh senescence nastává vlivem působení různých procesů v buněčném mikroprostředí, pravděpodobně i nezávisle na poškození telomer. Uvádím zde několik známých příčin poškození DNA následovaného aktivací senescence (Obrázek 3).

- Chemické látky (např. protinádorová chemoterapeutika, inhibitory replikace) - vyvolávají genotoxický stres a poškození DNA, jehož důsledkem je indukce senescence (Michishita et al., 1999).
- Onkogeny - způsobují jednak zvýšenou produkci volných radikálů kyslíku (aktivovaný Ras), jednak replikační stres, který vede opět k poškození DNA indukujícímu senescenci (Serrano et al., 1996; Lee et al., 1999).
- Oxidační stres (peroxid vodíku apod.) – reaktivní formy kyslíku způsobují oxidační poškození buněk, které může vyústit až v navození předčasné senescence (Toussaint et al., 2000).
- Cytokiny – jsou hlavní složkou sekretomu senescentních buněk a mají parakrinní účinky na okolní buňky, u nichž mohou též navodit senescenci (Hubackova et al., 2012).
- Bakteriální genotoxiny - mohou vyvolat neopravitelné poškození DNA a tím i senescenci (Blazkova et al., 2010).



Obrázek 3: Možné příčiny navození senescence (Collado and Serrano, 2006 - upraveno).

3. Mechanismus navození a udržení senescence

3.1. Buněčný cyklus, jeho regulace a senescence

Buněčný cyklus je definován dobou od vystoupení buňky z klidové fáze (G0), až do stadia, kdy dojde opět k rozdělení na dvě buňky dceřiné. Tato etapa, trvající podle typu buňky po různé časové období, má dvě stadia: M fázi - mitotická fáze, dochází k dělení jádra a buňky a interfázi – období, kdy se buňka nedělí. Interfázi dále dělíme na G1 fázi – 1. přípravná fáze, dochází k opravám genomu, buňka roste a připravuje se na syntézu DNA; S fázi – syntetická fáze, dochází k replikaci DNA a G2 fázi – 2. přípravná fáze, organely se zdvojují a buňka se připravuje na M fázi.

V každé fázi buněčného cyklu existují body kontrolující jeho správný průběh a zabraňující vstupu do další fáze, jsou-li objeveny chyby v klíčových procesech nezbytných pro bezchybné rozdělení buňky. Celý průběh cyklu je pak ovládán řadou regulátorů, které řídí průchod buňky jednotlivými fázemi. Nejdůležitějšími regulátory buněčného cyklu jsou cyklin-dependentní kinázy (CDK), jejichž funkce spočívá ve fosforylaci proteinů zodpovědných za regulaci buněčného cyklu. Typ a aktivita konkrétní CDK je řízena cykliny, jejichž hladiny se mění podle toho, v jaké fázi cyklu se buňka zrovna nachází. Působení komplexů CDK je dále řízeno inhibitory cyklin-dependentních kináz, mezi něž řadíme proteiny p15INK4b, p16INK4a, p18INK4d, p19INK4c, p21cip1, p27kip1 a p57kip2.

Pro navození senescentního fenotypu je důležitá aktivace signalizační kaskády (*Obrázek 4*), známé jako odpověď na poškození DNA (DDR – z anglického „DNA damage response“), která, jak již název napovídá, vzniká v reakci na poškození DNA. Klíčovým výstupem této kaskády je aktivace kontrolních bodů buněčného cyklu vedoucí k inhibici CDK, a to aktivací exprese inhibitorů CDK ([Cerqueira et al., 2009](#)). CDK jsou pak tlumeny po celou dobu reparace příslušného poškození DNA. Pokud však není možné poškození opravit, dochází v podstatě k trvalé aktivaci kontrolních bodů buněčného cyklu, k nepřetržitému působení inhibitorů CDK a rozvoji senescence. Zde je nutné zdůraznit spojení „v podstatě trvalé“, neboť jak bude popsáno dále, odblokování této inhibice může vést k uvolnění ze senescence a tak pravděpodobně i k rozvoji rakoviny.

3.1.1. Role p53 a Rb

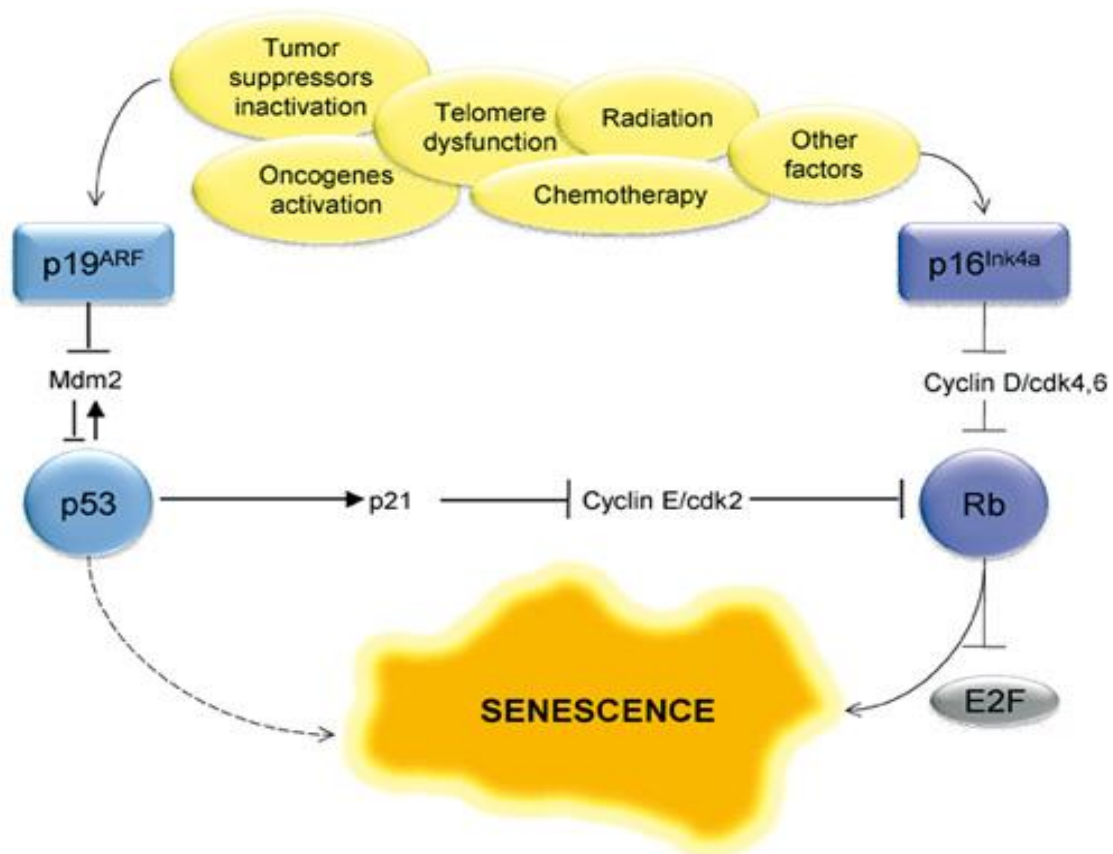
Buněčná senescence je mnohakový proces, v němž se uplatňují signály z řady různých stimulů, jejichž působením dochází ke stabilní zástavě buněčného cyklu. Zásadní úlohu v této spleti regulátorů a efektorů hrají proteiny p53 a Rb.

p53 je transkripční faktor, který aktivuje transkripci genů navozujících apoptózu a regulátorů buněčného cyklu, především p21. Významná role p53 v rozvoji senescence byla potvrzena v mnoha

experimentech, které mimo jiné dokázaly, že reaktivace p53 v nádorových buňkách vede k indukci senescence, produkci zánětlivých cytokinů a aktivaci imunity (Xue et al., 2007).

Rb dráha představuje další bariéru proliferace poškozených buněk. Růst potlačující efekt Rb je modulován jeho fosforylací a defosforylací. Hypofosforylovaný Rb inhibuje transkripční faktor E2F, čímž zabraňuje přechodu z G1 fáze do S fáze buněčného cyklu, a k zástavě buněčného cyklu v G1/S fázi. CDK4 a CDK6 fosforylují Rb, čímž uvolňují E2F z komplexu s Rb a umožňují buňkám přechod z G1 do S fáze. Hlavním, ale ne jediným, regulátorem Rb je inhibitor CDK p16, jehož exprese je regulována rozličnými stresy a v konečném důsledku působí defosforylací Rb (Novakova, 2010).

Rb dráha tedy poskytuje druhou překážku v případě, že by došlo ke ztrátě funkce p53. Tento mechanismus tvoří silnou bariéru proti karcinogenezi v lidských buňkách. Myši a krysy, jako nejvíce používaná laboratorní zvířata, ovšem nedisponují tak masivní bariérou a jsou více náchylné k rozvoji nádorů. U buněk těchto živočichů často stačí inaktivace jednoho z faktorů p53 či p16/Rb k imortilizaci. Toto ukazuje, že déle žijící živočichové jsou lépe chráněni proti vnějším stresům a onkogenezi (Melk et al., 2003).



Obrázek 4: Modely aktivace DDR a navození senescence (Chuaire-Noack et al., 2010)

3.2. SASP

Pro udržení senescentního fenotypu jsou podstatné nejen výše zmíněné trvalé působení inhibitorů CDK, ale také vlastní produkty senescentních buněk. Již v úvodu této práce jsem popisovala, co je to sekretom, a že slouží senescentním buňkám ke komunikaci s prostředím. Součástí této komunikace je také produkce cytokinů (*Tabulka 1*), tzv. „tkáňových hormonů“, která se spouští při trvalé signalizaci o poškození DNA (Rodier et al., 2009). Překvapivě některé sekretované cytokiny mají schopnost navodit poškození DNA a senescentní stav u okolních, normálně se množících buněk a zároveň posilují senescenci buněk, které je produkují (Acosta et al., 2008; Kuilman et al., 2008). Senescentní buňky tedy sekretují látky s autokrinním a parakrinním účinkem.

Skupina cytokinů	Funkce cytokinu		
	prozánětlivé	protizánětlivé	antivirové
Interleukiny	IL-1, IL-6, IL-8	IL-10	
Interferony			IFN α , IFN β , IFN γ
Chemokiny	GRO α , IL-8		
Transformující růstové faktory	TGF α	TGF β	
Tumor nekrotizující faktory	TNF α , TNF β		

Tabulka 1: Cytokiny produkované senescentními buňkami

Poškození DNA však nemusí být jedinou příčinou spuštění senescentního programu. Výsledky některých experimentů ukázaly, že k zastavení proliferace může dojít i změnami ve struktuře chromatinu způsobenými cytotoxickými léky. Například acetylace histonů na promotoru genu p21 vyvolá senescenci (Rebbaa et al., 2006) skrze indukci exprese genu p21.

4. Fyziologická úloha senescence

Ačkoliv úloha buněčné senescence v nádorové supresi je dlouho studována (Bartkova et al., 2006), její fyziologická úloha a příspěvek k nenádorovým patologiím se dostala do centra pozornosti teprve v nedávné době. Pro celistvost poznatků o tomto mechanismu však musím představit dva doposud popsané fyziologické jevy, v nichž hraje senescence významnou roli.

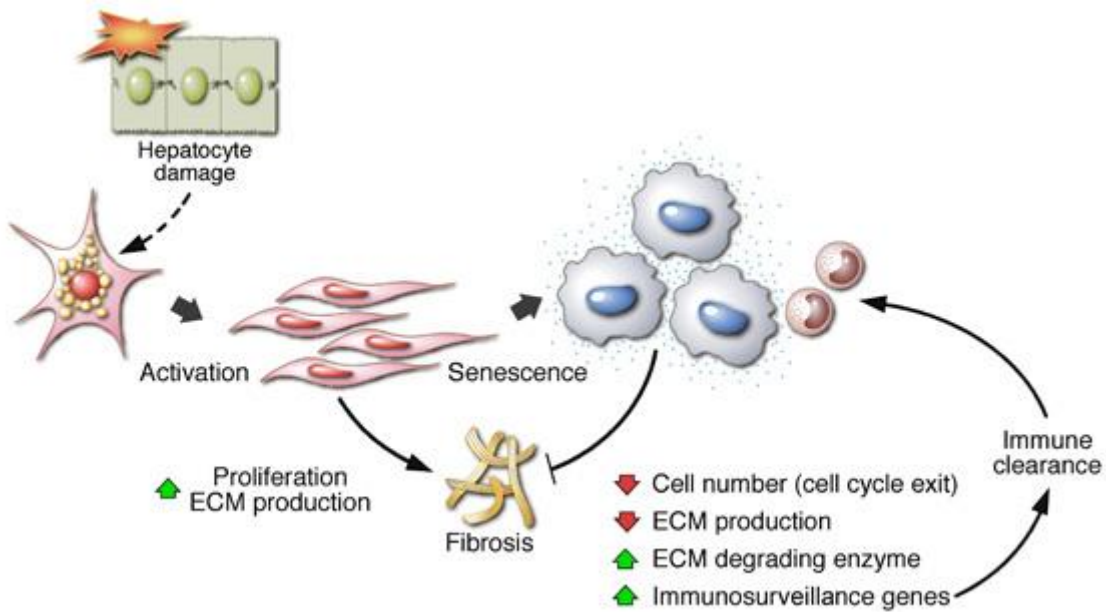
4.1. Megakaryocyty jako fyziologicky senescentní buňky

Megakaryocyty jsou polyploidní obrovské buňky v kostní dřeni, z jejichž malých úlomků cytoplazmy vznikají krevní destičky. Destičky pak vstupují do krevního řečiště a účastní se tvorby sraženin v místech poškození tkáně. Zralé megakaryocyty se diferencují z prekursorových buněk pod vlivem hormonu trombopoetinu (TPO). Nedávná studie ukazuje, že součástí tohoto normálního procesu diferenciace je vstup zralých megakaryocytů do stádia ukončeného buněčného dělení odpovídajícího senescenci (Besancenot et al., 2010). Z jejich výsledků vyplývá, že hlavní úlohu zde hraje právě TPO, druh nezánětlivého cytokinu, který v časném stupni diferenciace megakaryocytů vyvolává jejich proliferaci, zatímco v pozdějším stádiu vede jeho aktivita k syntéze p21, čímž způsobuje zástavu buněčného cyklu následovanou produkcí krevních destiček. Zralé megakaryocyty vykazují všechny markery senescentních buněk - poškození DNA, sekreci prozánětlivých cytokinů, apod. Překvapivé je také zjištění, že zhoubné megakaryocyty nepodléhají senescenci vlivem TPO, což může vysvětlovat jejich nadměrné množení.

4.2. Hojení ran a fibrózy

Hojení ran je reakcí na fyzické poranění, chronické infekce či chemické poškození a sestává se nejméně ze tří navzájem provázaných fází: zánětu, tvorby nové tkáně a remodelace tkáně. Pro druhou fázi, tedy vznik tkáně nové, je klíčová tvorba mezibuněčné hmoty (extracelulární matrix – ECM) fibroblasty. Produkce ECM, nazývaná fibróza, udržuje tkáňovou integritu po dobu hojení poškození. Z nevelkého množství prací na toto téma mohu uvést příkladem článek, v němž se autoři zabývají akumulací senescentních buněk ve fibrotických játrech laboratorních myši (Krizhanovsky et al., 2008). V reakci na smrt hepatocytů se jaterní hvězdčovitě buňky množí a vytváří ECM, která je základem fibrotického procesu. Zde bylo zjištěno, že senescence aktivních hvězdčovitých buněk limituje akumulaci fibrotické tkáně (Obrázek 5) a pokud dojde k odstranění regulátorů senescence, je následkem nadměrná produkce této tkáně. Navíc senescentní hvězdčovitě buňky redukovat expresi

ECM, zvyšují sekreci enzymů degradujících ECM a především na svém povrchu exprimují ligand pro receptor NK (natural killer) buněk imunitní odpovědi, čímž podporují vlastní odstranění imunitním systémem. Dalším výzkumem byl za původce indukce senescence u fibroblastů podílejících se na hojení ran určen protein CCN1 (Jun et al., 2010).



Obrázek 5: Buněčná senescence aktivních hvězdicovitých buněk omezuje fibrózy (Krizhanovsky et al., 2008)

5. Patofyziologický význam senescence

5.1. Nádorová bariéra nebo promotor nádorů?

Jak je uvedeno výše, senescence je buněčný program pokládáný za protinádorovou bariéru (Sager, 1991). Výzkumy na různých modelových organismech byl tento fakt mnohokrát potvrzen, přesto se stále objevují experimenty s výsledky dokazujícími i opačné působení senescence (Coppe et al., 2006; Parrinello et al., 2005). Takzvaná teorie antagonistické pleiotropie předpokládá, že některé geny selektované ke zlepšení zdatnosti mladého organismu mohou mít škodlivé efekty pro organismus starší. To se týká také trvalé zástavy buněčného cyklu a může vysvětlit, proč se rakovina objevuje častěji s postupujícím věkem (Krtolica et al., 2001).

5.1.1. Přítomnost v časných stádiích nádorů

Jak je stále zdůrazňováno, stabilní zástava buněčného cyklu je ekvivalentem programované buněčné smrti – apoptózy, a její primární funkcí je chránit organismus před rozvojem rakoviny. Zatím však v této práci nebyly uvedeny dostatečně jasné doklady tohoto tvrzení. Jako prokazatelný důkaz zde proto uvádím odhalení přítomnosti obecně přijímaných markerů aktivované cesty reakce na poškození DNA v časném stádiu vývoje nádorů – myšleno před vykazovanou genomovou nestabilitou a maligní přeměnou. Jinak řečeno, výskyt senescentních buněk byl prokázán v prekancerózních stádiích, zatímco v plně vyvinutých zhoubných nádorech nikoli (Collado et al., 2005; Bartkova et al., 2006, Di Micco et al., 2006). V reakci na nadměrnou stimulaci buněčné proliferace v prekancerózních lézích, vedoucí k replikačnímu stresu a poškození DNA, je aktivována DDR, která následně způsobí zástavu buněčného cyklu nebo apoptózu (Bartkova et al., 2005; Gorgoulis et al., 2005). Tento objev vede k tvrzení, že buňky časných nádorových stádií aktivují DDR, aby zabránily karcinogenezi.

5.1.2. Rozvoj senescence po (neoadjuvantní) chemoterapii

Pro rozvoj karcinogenního onemocnění je charakteristické rychlé množení a prodloužená délka mitotického života (MLS - z anglického „mitotic life span“) nádorových buněk. Právě toho využívá léčba rakoviny protinádorovou chemoterapií, kdy cytotoxická látka podávaná pacientovi cíleně zabíjí mitotické buňky, bohužel bez ohledu na to, zdali jsou tyto buňky nádorové. To omezuje nejen okruh pacientů, u nichž může být tato léčba použita, ale hlavně velikost použité dávky chemoterapeutik. Užívání chemoterapeutik nepřispívá ani fakt, že po jejich indikaci vzrůstá rezistence nádorových buněk.

Protože stěžejním cílem působení chemoterapeutik je DNA, není překvapivé, že její poškození může kromě buněčné smrti vyvolat také senescenci (Schmitt et al., 2002). Tento vývoj je vlastně docela běžný - například u pacientek s diagnostikovanou rakovinou prsu léčených chemoterapeutiky byl výskyt senescentních buněk v nádorech 41%, zatímco u neléčených pacientek to bylo pouze 10% (te Poele et al., 2002). A proto se mnoho světových laboratoří zabývá myšlenkou navození zástavy buněčného cyklu namísto cíleného zabíjení (nejen) nádorových buněk a snaží se o vývoj léčiv selektivně indukujících buněčnou senescenci. Většina těchto eventuálních prosenescentních terapií se zaměřuje na inhibici telomerázy nebo regulaci aktivit CDK (Campaner et al., 2010). Ovšem nevýhodou jejich případného využití v léčbě rakoviny by mohlo být nechtěné vyvolání patologií, na jejichž rozvoji se senescence podílí (viz kapitoly 4.2. a 5.2.).

Prozatím se vyvolání senescence v důsledku aplikace chemoterapeutik využívá ve zdravotnictví při tzv. neoadjuvantní terapii, kdy je pacient vystaven působení 3 různých chemoterapeutik v nízkých koncentracích, což má za následek navození senescence. Tento druh terapie se uplatňuje před plánovaným chirurgickým odstraněním nádoru. Cílem je zmenšení nádoru, které usnadní jeho operativní vyjmutí, a také předejít rozšíření nádorových buněk do okolních tkání a orgánů během operace.

5.1.3. Úloha cytokinů

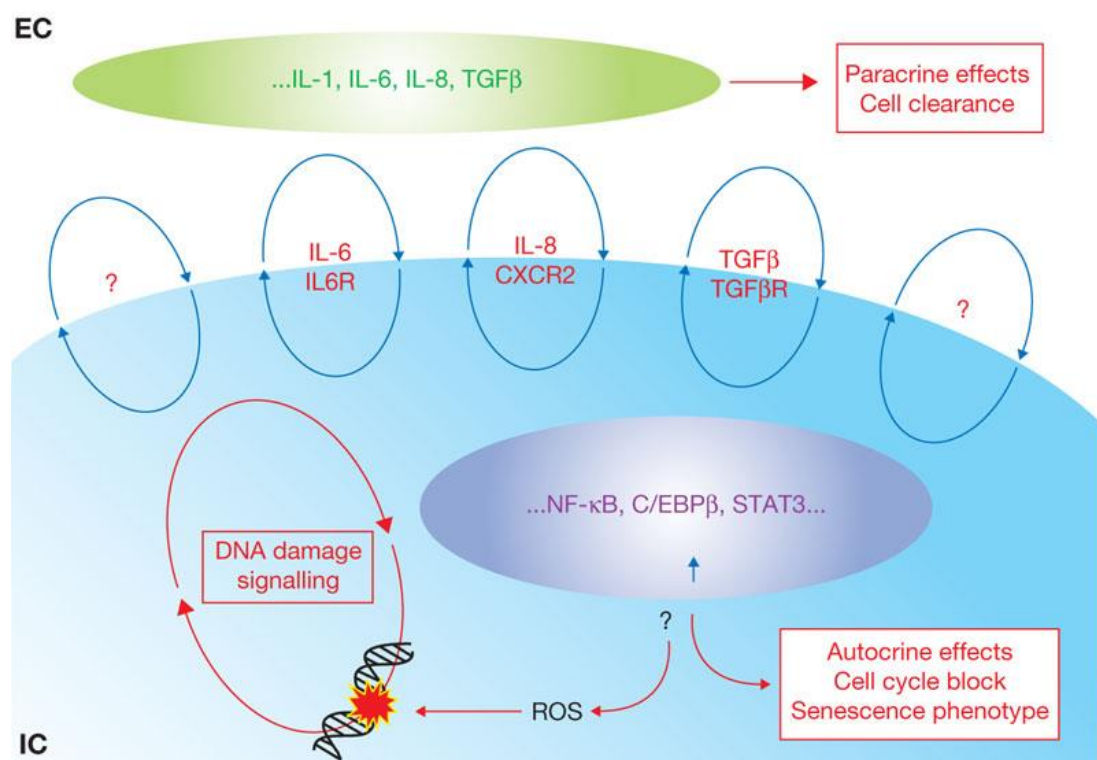
Jak bylo popsáno výše, senescentní buňky ovlivňují sousední buňky díky parakrinní cytokinové signalizaci, která může mít nádorově supresivní charakter. Senescentní buňky jsou také často nalézány v preiniciálních stádiích rozvoje nádorů. Předchozí studie dokonce svědčí o vztahu mezi senescencí, karcinogenezí a zánětem (Redon et al., 2010).

Zánět je odpovědí organismu na poškození tkáně. V zásadě má chránit tkáň před infekcí a zastávat tak obrannou funkci. Nicméně v mnoha případech má setrvalá zánětlivá reakce pro organismus spíše sebepoškozující účinky. V souladu s tímto tvrzením je fakt, že zánět je znám jako klíčová složka pro rozvoj nádorů, podle všeho proto, že zánětlivé buňky vytvářejí atraktivní prostředí pro růst nádorů. Tkáňové mikroprostředí je totiž určujícím faktorem, zdali a jak se bude zhoubné bujení vyvíjet. Zánětlivá reakce probíhající jako odpověď na poškození tkáně je obvykle limitována dobou, po kterou se zranění hojí. V případě tkáně vytvářející prostředí, které podporuje nádorové bujení, se však tato chová jako neustále poškozená, takže se zánět stává chronickým. Imunitní buňky pak produkují reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) opakovaně způsobují poškození DNA. Charakter a doba trvání zánětu závisí především na cytokinovém profilu prostředí, kde hrají klíčovou roli prozánětlivý cytokin TNF α a jeho antagonist, protizánětlivý faktor TGF β . Hlavními producenty cytokinů jsou imunitní buňky makrofágy, které jsou zpětně také aktivovány produkovanými cytokiny.

Zde se jeví jako důležitá úloha buněk podléhajících senescenci, sekretujících prozánětlivé cytokiny. Kromě výše zmíněné podpory růstu nádorů mají tyto cytokiny také způsobilost ještě více posílit senescentní fenotyp skrze generování ROS, poškození DNA nebo aktivaci p53 (Acosta et al., 2008). Nejvýraznějšího zvýšení produkce senescentními buňkami dosáhly cytokiny IL-8 a IL-6, které jsou schopné upevnit senescentní zástavu růstu díky pozitivní zpětné vazbě zahrnující signalizaci přes transkripční faktory NF- κ B a C/EBP β (Acosta et al. 2008; Kuilman et al., 2008), a které zřejmě patří mezi další důležité regulátory zástavy proliferace. Jako jiné příklady cytokinů hrajících význačnou roli ve studiu senescence mohou uvést například GRO α , ATM, INF γ , TNF α či cytokiny z rodiny TGF β . (Obrázek 6)

Jaká je tedy pozitivní a asi i zásadní funkce sekrečního fenotypu senescentních buněk? Zřejmě ta, že produkované cytokiny mohou aktivovat imunitní systém k eliminaci senescentních buněk z tkáně (viz níže).

Podstatné také je, že k sekreci cytokinů senescentními buňkami dochází pouze v případě rozvoje trvalého poškození DNA (Rodier et al., 2009).



Obrázek 6: Buněčná senescence je udržována společným působením několika autokrinních regulátorů a „DNA damage response“ (Bartek et al., 2008)

5.1.4. Imunitní dohled

Senescentní buňky produkují chemokiny a cytokiny, které regulují zástavu růstu a spouští imunitní reakci, jež je příčinou imunitou zprostředkovaného očištění tkáně od těchto poškozených

buněk. Základem tohoto tzv. senescentního dohledu jsou u myši buňky specifické imunity CD4+ T-lymfocyty. Aktivované T-lymfocyty kooperují s buňkami nespecifické imunity, konkrétně s monocyty a/nebo makrofágy, které přímo zprostředkují likvidaci senescentních buněk (Kang et al., 2011). Důležité je zmínit, že pokud nejsou senescentní buňky odstraněny, dochází k rozvoji hepatocelulárního karcinomu. Senescentní dohled je významný faktor protinádorové bariéry, který ilustruje, jak může být senescence zapojena v imunitním dohledu nad rakovinným bujením díky podpoře imunitních odpovědí proti antigenům exprimovaným v pre-maligních senescentních buňkách.

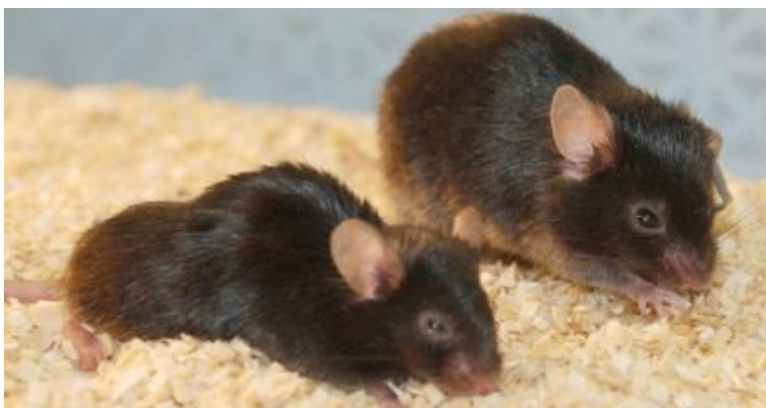
Dalším dosud popsaným mechanismem, kterým jsou odstraňovány senescentní, ale i nádorové buňky z organismu je jejich zabíjení NK-buňkami (natural killers), lymfocyty specifické imunity, jejichž hlavním nástrojem je produkce cytotoxických granulí. Právě exocytóza granul je nezbytná pro charakteristické cytotoxické zabíjení senescentních fibroblastů a hvězdovitých buněk zprostředkované NK-buňkami (Sagiv et al., 2012). Tato forma imunitní odpovědi je důležitá při odstraňování senescentních buněk v regulaci fibrózy jater.

Imunitní systém hraje dvojí roli - jednak odstraňuje senescentní buňky, jednak je sám schopen senescenci navodit - sekrecí cytokinů. V této souvislosti se nově zdá být významná úloha TH1 (T-helper-1) lymfocytů produkujících cytokiny $IFN\gamma$ (Interferon γ), které ve spolupráci s cytokiny TNF (tumor necrosis factor) způsobují navození senescence v nádorových buňkách (Braumüller et al., 2013). Tento jev by mohl být zásadní pro pokrok v léčbě rakoviny uměle navozeným zastavením buněčného dělení.

5.2. Senescence a stárnutí

Není náhodou, že s postupujícím věkem se zvyšuje frekvence výskytu různých patologií, z nichž především nádorová onemocnění jsou v posledních letech diskutovaným problémem číslo jedna. Vzhledem k tomu, že senescence je uváděna jako hlavní mechanismus zabraňující propuknutí nádorového bujení, není divu, že hromadění buněk ve stadiu zástavy buněčné proliferace je taktéž spojováno se stárnutím (Dimri et al., 1995; Jeyapalan et al., 2007). Nicméně není k zamyšlení pouze vliv postupujícího věku na množství senescentních buněk v organismu, ale opačně také vliv hromadění senescentních buněk na stárnutí tkání. Lze jmenovat například doloženou schopnost senescentních fibroblastů ovlivnit, narušením tkáňové homeostázy, morfologickou i funkční diferenciací savčích epiteliálních buněk, což může vysvětlit ztrátu funkce a organizace tkáně, kterážto je typickou známkou stárnutí (Parrinello et al., 2005).

Nejlepší příklad vztahu mezi hromaděním senescentních buněk v organismu a patologiemi spojenými s pokročilým věkem organismu poskytuje studie koncipovaná na základě transgenní strategie (Baker et al., 2011). Zde byl za použití poznatků o expresi p16, inhibitoru CDK, senescentními buňkami vytvořen transgenní myší model, u něhož byla vlivem chemoterapeutika Rosiglitazonu uměle vyvolána senescence. Tyto myši pak vykazovaly mnohé patologie spojené se stářím, jako například srdeční arytmie nebo tuhnutí arteriálních stěn. U těchto transgenních modelů mělo rovněž ošetření léčivem vyvolat eliminaci všech p16-pozitivních buněk, tedy ideálně všech senescentních buněk, což se také potvrdilo. V tkáních, v nichž buňky exprimující p16 přispívají k rozvoji patologií souvisejících se stárnutím (tuková tkáň, kosterní svalstvo či oko), vedlo očistění od senescentních buněk k opožděnému nástupu těchto projevů. Dokonce i léčba zahájená v pozdějším stádiu života vedla ke zmírnění projevů již nastalých potíží (Obrázek 7). Výsledky tohoto experimentu naznačují, že léčebné zákroky zaměřené na odstranění senescentních buněk nebo blokace jejich účinků, mohou v budoucnosti pomoci zmírnit či zcela zastavit rozvoj nemocí, objevujících se v závislosti na postupujícím věku.



Obrázek 7: Vpředu transgenní myš před aplikací léčiva, vzadu myš po ošetření léčivem a eliminaci všech p16-pozitivních buněk. Můžeme vidět, že odstranění senescentních buněk vedlo k „omlazení“ myši. (Baker et al., 2011)

6. Otázka nevratnosti senescence

Jelikož je senescence považována za nevratný protinádorový program, vyvstává otázka jak je možné, že je ročně nově diagnostikováno takové množství nádorových onemocnění, a že je rakovina u lidí druhou nejčastější příčinou úmrtí. Možné vysvětlení je dvojí: 1) buňky se mutacemi v mechanismech navozujících senescenci (např. dráhy p53 a Rb) do senescence nedostanou; 2) buňky se ze senescence dokáží *in vivo* vymanit. Chtěla bych se věnovat především druhé možnosti - mechanismům, kterými je buňka s poškozenou DNA schopná uniknout ze senescence a dál pokračovat v proliferaci.

6.1. Bypass senescence

Anglický výraz *bypass* znamená v českém překladu *obejít něco/někoho* či *vyhnout se něčemu*, což myslím přesně definuje níže popsanou snahu o vyobrazení mechanismů, kterými je možné zvrátit procesy zastavující buněčný cyklus a uvádějící buňku do senescence.

Senescence je proces vyvíjející se v reakci na působení různých stresorů, které by teoreticky mohly přeměnit normální buňku v buňku nádorovou. Jak již bylo uvedeno, vstup buňky do stádia senescence je závislý na expresi inhibitorů cyklin-dependentních kináz. Ústřední roli tu hrají nádorový supresor p53, který inhibuje vývoj buněčného cyklu, a nádorový supresor Rb, který způsobuje potlačení exprese genů odpovědných za proliferaci. V kapitole 3.1. jsem se o funkci inhibitorů CDK v regulaci buněčného cyklu a o jejich významu při rozvoji senescence zmínila. Zdůraznila jsem zde také, že je nutné trvalé působení těchto inhibitorů, aby nedošlo k úniku buněk ze senescence a případnému rozvoji rakoviny, což bylo rozličnými experimenty také prokázáno (Beausejour et al., 2003). Inaktivace jakéhokoli inhibitoru CDK či proteinů p53 nebo Rb - mutací, epigenetickými mechanismy nebo virovou infekcí, může vést k obejití senescentní kontroly buněčného cyklu a způsobit, že buňky dále pokračují v proliferaci. Po dalších 20-ti až 30-ti populačních zdvojení začíná tzv. terminální mitotická krize (nazývaná také M2, z anglického „Mortality stage 2“), během níž vykazují buňky, díky nabytým chromosomálními abnormalitám, apoptotickou smrt (Wright et al., 1989). Některé buňky však mohou ve vzácných případech pokračovat dále v dělení a plodit „nesmrtelné“ buněčné linie, které jsou základem rakovinného bujení. Například vyřazení inhibitoru p21 (de Carne Trecesson et al., 2011) nebo jen jednoho ze dvou genů pro protein Rb stačí k vyhnutí se senescenci (Wei et al., 2003). Ovšem nic není tak jednoduché, jak se zdá. V procesech, které vyvolávají a udržují senescenci, se uplatňuje obrovské množství různých genů, jejichž případné mutace mohou ovlivnit další vývoj buněčného cyklu a nástup senescence (Leal et al., 2007). Například

neúčinný gen Runx2 způsobuje ztrátu exprese p19 a p21 (Zaidi et al., 2007), ribosomální protein Rplp1 vyvolává nárůst E2F1, čímž ovlivňuje protein Rb (Artero-Castro et al., 2009) nebo inhibitor aktivátoru plasminogenu (PAI-1) ovlivněn p53 je nezbytný pro indukci senescence (Kortlever et al., 2006).

6.1.1. Účinky chemoterapie

V návaznosti na kapitolu 5.1.2., v níž jsem se zabývala možnostmi indukce senescence vlivem chemoterapeutických léčiv, bych nyní ráda věnovala pozornost procesům, které způsobují znovunabytí proliferativního potenciálu těchto senescentních buněk a které mohou mít za následek případnou rezistenci k používanému léčivu.

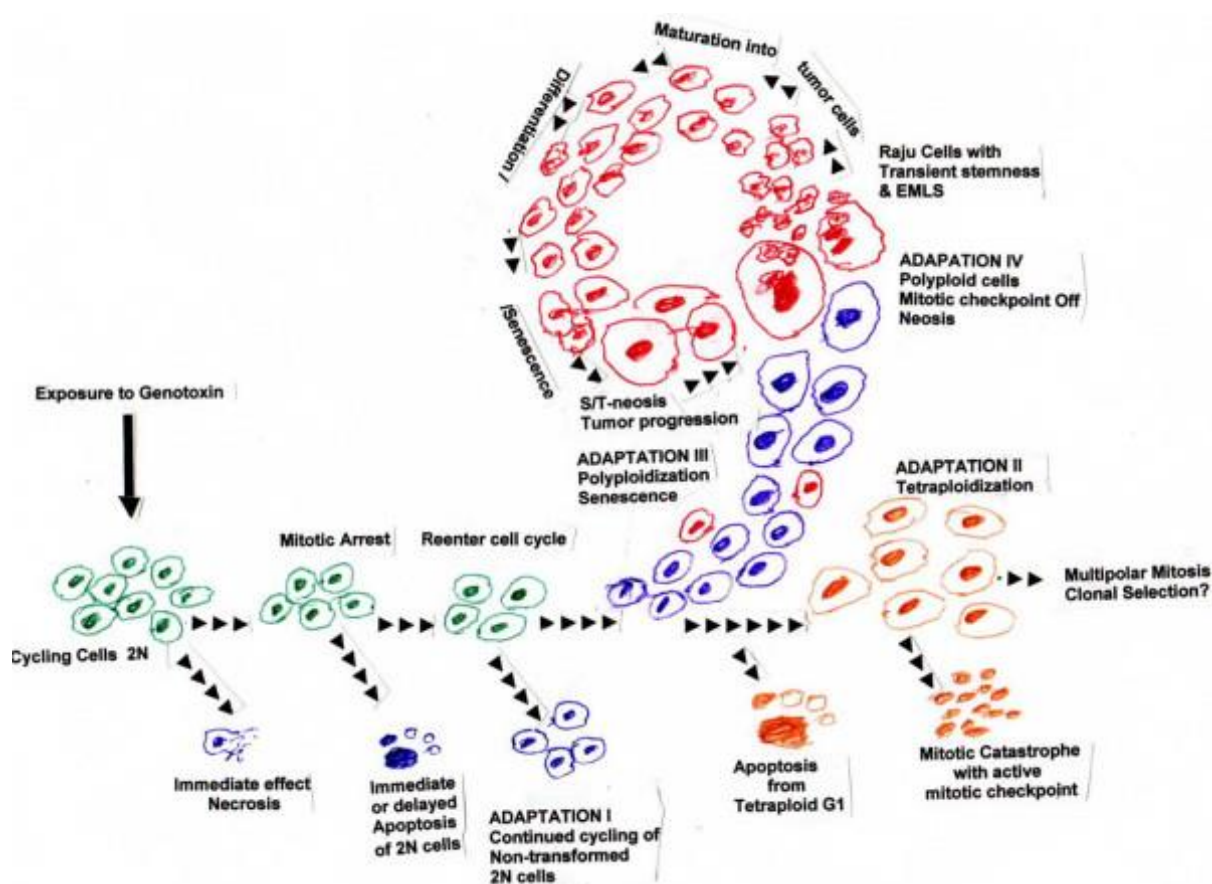
Nádorové buňky v reakci na ošetření chemoterapeutiky a radiací podléhají zástavě růstu a osvojují si znaky typické pro senescenci (Elmore et al., 2005). Tento jev je označován jako zrychlená buněčná senescence (ACS – z anglického „accelerated cellular senescence“) a jeho přítomnost byla dokázána *in vitro* i *in vivo*. Většina těchto senescentních buněk však ve výsledku obchází zástavu růstu a vrací se zpět do cyklu. Tento proces je bohužel docela běžný a u mnoha pacientů můžeme po genotoxické léčbě pozorovat minimálně částečný návrat rakoviny, často spojený s rezistencí k původně užitému léčivu. U některých z těchto obnovených nádorů byly nalezeny mutace v genech pro p53 a p16 (Schmitt et al., 2002), u jiných zase zvýšená produkce CDK (Roberson et al., 2005).

6.2. Neóza

Tento jev byl poprvé popsán a pojmenován roku 2003 skupinou kanadských vědců (Sundaram et al., 2004), kteří sledovali časné buněčné události během nádorové transformace buněk C3H10T1/2. Tyto buňky byly vystaveny působení etoposidu (ET) – inhibitoru topoizomerázy II (etoposid je cytostatikum používané k léčbě některých nádorů), nebo mutagennímu ionizujícímu záření, což mělo v prvních několika dnech za následek úmrtnost okolo 20% buněk za den, přičemž buňky vykazovaly znaky mitotické krize způsobené poškozením DNA. Dále byl pozorován pokles počtu jednojaderných buněk doprovázený nárůstem obrovských mnohoaderných/polyploidních (MN/PGs) buněk. Okolo 14. dne po zahájení pokusu prodělala malá část buněk MN/PGs asymetrickou cytokinezi, která dala vzniknout několika malým jednojaderným buňkám. Velké buňky MN/PGs byly nazvány jako neozové mateřské buňky (NMCs) a jejich produkty jako buňky Raju. Celý jev byl pak pojmenován termínem neóza. (Obrázek 8)

Asi 8% buněk MN/PGs produkovalo neživotaschopné buňky Raju, které se nemohly oddělit od mateřské buňky a podlehly apoptóze. Tyto NMCs nakonec zemřely, aniž by se staly producenty buněk

Raju, tento proces byl nazván „neotická krize“. Ostatní NMCs zemřely po tom, co daly vzniknout přibližně 10-ti buňkám Raju. V další fázi experimentu bylo 10 vzniknuvších buněk Raju označeno a znovu vystaveno rentgenovému záření, to mělo za následek spontánní produkci MN/PGs, z nichž některé prodělaly sekundární neózu. Označené buňky byly také testovány v porovnání s mateřskými buňkami C3H10T1/2 na vnímavost k léčivu etoposidu. Výsledkem bylo, že zatímco všechny mateřské buňky do několika dní zemřely, část označených buněk přežila, vytvořila kolonie a produkovala MN/PGs, které po asi 8 týdnech též podlely sekundární neóze.



Obrázek 8: Tvorba buněk Raju procesem nazvaným Neóza (Sundaram et al., 2004)

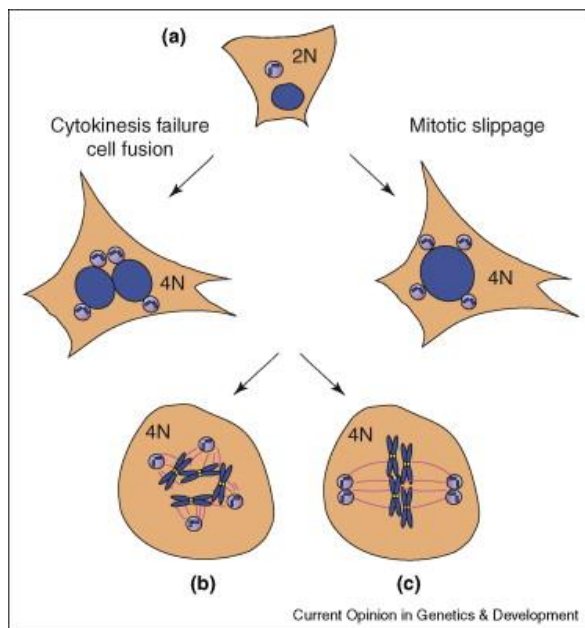
6.2.1. Buňky Raju

Buňky Raju byly popsány jako v průměru 6-10 μm velké buňky, mající charakteristický kontraktilní pohyb během jejich vzniku, oddělování a pohybu od NMC. Jsou unikátní tím, že přechodně vykazují některé vlastnosti podobné vlastnostem kmenových buněk, jako například prodloužený, ovšem limitovaný MLS, expresi telomerázy či potenciál k rozmnožování. Buňky Raju se účastní symetrického mitotického dělení bezprostředně poté, co se osamostatní, jejich mitotické deriváty narůstají do větších velikostí a během několika dní dozrávají v nádorové buňky – tvoří kolonie zralých buněk s dobře definovanou jadernou membránou a zřetelnými jádérky. V průběhu mitotického dělení a zrání

pravděpodobně buňky Raju podléhají chybné diferenciaci a postupně ztrácejí charakter kmenových buněk. Ke konci jejich prodlouženého, ovšem limitovaného MLS, nádorové buňky spontánně vstupují do fáze senescence. Ovšem vzhledem k tomu, že funkce genů kontrolujících dráhu pro navození a udržení senescenčního fenotypu jsou v těchto buňkách narušeny, některé z buněk mají dobrý předpoklad pro prodělání sekundární/terciální neózy, což přispívá k heterogenitě a kontinuitě růstu nádorů (Sundaram et al., 2004).

6.2.2. Polyploidizace

Ze všech různých bodů kontrolujících buněčný cyklus je nejdůležitější kontrola mitózy, nazývaná spindle checkpoint, která je považována za primární obranu proti aneuploidii a zajišťuje přesnou segregaci chromozomů za účelem vytvoření geneticky identických dceřinných buněk (Weaver et al. 2005). Pokud je spindle checkpoint defektní, část senescenčních buněk může uniknout tzv. mitotické katastrofě a následkem inhibice mitózy nebo selháním cytokineze se stát tetraploidními (Obrázek 9) (Andreassen et al., 2001). Právě u subpopulace těchto tetraploidních buněk bylo pozorováno, že prochází neotickým dělením.



Obrázek 9: Tetraploidie je příčinou genetické nestability. Tetraploidní buňky vznikají inhibicí mitózy, chybné cytokinezi nebo i fúzí buněk. (Ganem et al., 2007)

Neóza byla již studována několika nezávislými laboratořemi a na různých tkáňových kulturách (Walen, 2004). V této práci je však nejdůležitější zmínit vztah, jaký má neóza vůči diskutované senescenci. Často bývá předpokládáno, že obejití senescence je krokem ke vzniku nádorů. Nyní je však dokázáno, že neózou vznikající buňky neobcházejí senescenci, ale namísto toho jsou generované z plně senescenčních buněk (Gosselin et al., 2009).

Několik studií naznačuje, že neóza je zřejmě základním mechanismem podílejícím se na karcinogenezi.

7. Závěr

Senescence se zdá být ústředním mechanismem pro pochopení a studium zhoubných nádorových onemocnění, jejichž výskyt u lidí se stále zvyšuje. Studie funkcí buněčné senescence v normálních fyziologických procesech je v začátcích. Stejně tak je nemnoho zjištěno o úloze senescentních buněk v rozvoji patologií uvnitř stárnoucího organismu. Oba tyto procesy jsou však nesmírně důležité a jejich další výzkum jistě přinese mnohá užitečná zjištění na poli vědy a medicíny. Především se však jedná o odpověď otázku léčby nádorových onemocnění, která je stále mlhavá. Formou literární rešerše jsem se zde pokusila přiblížit dosud poznané informace o relativně novém jevu buněčné senescence, který, jak se ukazuje, sehrává velmi důležitou roli v obraně organismu proti přeměně vlastních normálních buněk v buňky nádorové. Poukázala jsem také na to, že zástava buněčného cyklu není zcela nevratná, jak se původně myslelo, že prostřednictvím genových mutací a snad i jiných mechanismů je možné senescenci obejít, či zvrátit a že i samotné působení senescentních buněk v organismu může mít nádory podporující efekt. Výsledky studií dokazují, že buněčná senescence je zřejmě klíčovým faktorem v hledání úspěšné cesty léčby rakoviny a další bádání bude mít bezpochyby vliv na budoucí pokrok v boji proti této obávané chorobě.

Seznam použité literatury

- Acosta, J. C., A. O'Loghlen, A. Banito, M. V. Guijarro, A. Augert, S. Raguz, M. Fumagalli, *et al.* "Chemokine Signaling Via the Cxcr2 Receptor Reinforces Senescence." [In eng]. *Cell* 133, no. 6 (Jun 13 2008): 1006-18.
- Allsopp, R. C., and C. B. Harley. "Evidence for a Critical Telomere Length in Senescent Human Fibroblasts." *Exp Cell Res* 219, no. 1 (Jul 1995): 130-6.
- Andreassen, Paul R., Françoise B. Lacroix, Olivier D. Lohez, and Robert L. Margolis. "Neither P21waf1 nor 14-3-3{Sigma} Prevents G2 Progression to Mitotic Catastrophe in Human Colon Carcinoma Cells after DNA Damage, but P21waf1 Induces Stable G1 Arrest in Resulting Tetraploid Cells." *Cancer Res* 61, no. 20 (October 1, 2001 2001): 7660-68.
- Ansieau, S., J. Bastid, A. Doreau, A. P. Morel, B. P. Bouchet, C. Thomas, F. Fauvet, *et al.* "Induction of Emt by Twist Proteins as a Collateral Effect of Tumor-Promoting Inactivation of Premature Senescence." [In eng]. *Cancer Cell* 14, no. 1 (Jul 8 2008): 79-89.
- Baker, D. J., T. Wijshake, T. Tchkonja, N. K. LeBrasseur, B. G. Childs, B. van de Sluis, J. L. Kirkland, and J. M. van Deursen. "Clearance of P16ink4a-Positive Senescent Cells Delays Ageing-Associated Disorders." [In eng]. *Nature* 479, no. 7372 (Nov 10 2011): 232-6.
- Bartek, Jiri, Zdenek Hodny, and Jiri Lukas. "Cytokine Loops Driving Senescence." *Nat Cell Biol* 10, no. 8 (2008): 887-89.
- Bartkova, J., N. Rezaei, M. Liontos, P. Karakaidos, D. Kletsas, N. Issaeva, L. V. Vassiliou, *et al.* "Oncogene-Induced Senescence Is Part of the Tumorigenesis Barrier Imposed by DNA Damage Checkpoints." *Nature* 444, no. 7119 (Nov 30 2006): 633-7.
- Bartkova, Jirina, Zuzana Horejsi, Karen Koed, Alwin Kramer, Frederic Tort, Karsten Zieger, Per Guldberg, *et al.* "DNA Damage Response as a Candidate Anti-Cancer Barrier in Early Human Tumorigenesis." *Nature* 434, no. 7035 (2005/04//print 2005): 864-70.
- Beausejour, C. M., A. Krtolica, F. Galimi, M. Narita, S. W. Lowe, P. Yaswen, and J. Campisi. "Reversal of Human Cellular Senescence: Roles of the P53 and P16 Pathways." *Embo J* 22, no. 16 (Aug 15 2003): 4212-22.
- Besancenot, R., R. Chaligne, C. Tonetti, F. Pasquier, C. Marty, Y. Lecluse, W. Vainchenker, S. N. Constantinescu, and S. Giraudier. "A Senescence-Like Cell-Cycle Arrest Occurs During Megakaryocytic Maturation: Implications for Physiological and Pathological Megakaryocytic Proliferation." [In eng]. *PLoS Biol* 8, no. 9 (2010).
- Blazkova, H., K. Krejcikova, P. Moudry, T. Frisan, Z. Hodny, and J. Bartek. "Bacterial Intoxication Evokes Cellular Senescence with Persistent DNA Damage and Cytokine Signalling." *J Cell Mol Med* 14, no. 1-2 (Jan 2010): 357-67.
- Campaner, S., M. Doni, P. Hydbring, A. Verrecchia, L. Bianchi, D. Sardella, T. Schleker, *et al.* "Cdk2 Suppresses Cellular Senescence Induced by the C-Myc Oncogene." [In eng]. *Nat Cell Biol* 12, no. 1 (Jan 2010): 54-9; sup pp 1-14.
- Cerqueira, A., D. Santamaria, B. Martinez-Pastor, M. Cuadrado, O. Fernandez-Capetillo, and M. Barbacid. "Overall Cdk Activity Modulates the DNA Damage Response in Mammalian Cells." [In eng]. *J Cell Biol* 187, no. 6 (Dec 14 2009): 773-80.
- Collado, Manuel, Jesus Gil, Alejo Efeyan, Carmen Guerra, Alberto J. Schuhmacher, Marta Barradas, Alberto Benguria, *et al.* "Tumour Biology: Senescence in Premalignant Tumours." *Nature* 436, no. 7051 (2005/08/04/print 2005): 642.
- Collado, Manuel, and Manuel Serrano. "The Power and the Promise of Oncogene-Induced Senescence Markers." *Nat Rev Cancer* 6, no. 6 (2006/06//print 2006): 472-76.
- Coppe, J. P., K. Kauser, J. Campisi, and C. M. Beausejour. "Secretion of Vascular Endothelial Growth Factor by Primary Human Fibroblasts at Senescence." *J Biol Chem* 281, no. 40 (Oct 6 2006): 29568-74.
- Coppe, J. P., C. K. Patil, F. Rodier, Y. Sun, D. P. Munoz, J. Goldstein, P. S. Nelson, P. Y. Desprez, and J. Campisi. "Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous

- Functions of Oncogenic Ras and the P53 Tumor Suppressor." [In eng]. *PLoS Biol* 6, no. 12 (Dec 2 2008): 2853-68.
- de Carne Trecesson, S., Y. Guillemin, A. Belanger, A. C. Bernard, L. Preisser, E. Ravon, E. Gamelin, *et al.* "Escape from P21-Mediated Oncogene-Induced Senescence Leads to Cell Dedifferentiation and Dependence on Anti-Apoptotic Bcl-XI and Mcl1 Proteins." [In eng]. *J Biol Chem* 286, no. 15 (Apr 15 2011): 12825-38.
- Dell'Orco, R. T., and W. L. Whittle. "Nuclear Matrix Composition and in Vitro Cellular Senescence." *Exp Gerontol* 29, no. 2 (Mar-Apr 1994): 139-49.
- Dimri, G. P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, *et al.* "A Biomarker That Identifies Senescent Human Cells in Culture and in Aging Skin in Vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, no. 20 (Sep 26 1995): 9363-7.
- Elmore, L. W., X. Di, C. Dumur, S. E. Holt, and D. A. Gewirtz. "Evasion of a Single-Step, Chemotherapy-Induced Senescence in Breast Cancer Cells: Implications for Treatment Response." *Clin Cancer Res* 11, no. 7 (Apr 1 2005): 2637-43.
- Ganem, N. J., Z. Storchova, and D. Pellman. "Tetraploidy, Aneuploidy and Cancer." [In eng]. *Curr Opin Genet Dev* 17, no. 2 (Apr 2007): 157-62.
- Gary, Ronald K., and Susan M. Kindell. "Quantitative Assay of Senescence-Associated [Beta]-Galactosidase Activity in Mammalian Cell Extracts." *Analytical Biochemistry* 343, no. 2 (2005/8/15 2005): 329-34.
- Gorgoulis, V. G., L. V. Vassiliou, P. Karakaidos, P. Zacharatos, A. Kotsinas, T. Liloglou, M. Venere, *et al.* "Activation of the DNA Damage Checkpoint and Genomic Instability in Human Precancerous Lesions." *Nature* 434, no. 7035 (Apr 14 2005): 907-13.
- Gosselin, K., S. Martien, A. Pourtier, C. Vercamer, P. Ostoich, L. Morat, L. Sabatier, *et al.* "Senescence-Associated Oxidative DNA Damage Promotes the Generation of Neoplastic Cells." [In eng]. *Cancer Res* 69, no. 20 (Oct 15 2009): 7917-25.
- Hayflick, L. "The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains." *Exp Cell Res* 37 (Mar 1965): 614-36.
- Hayflick, L., and P. S. Moorhead. "The Serial Cultivation of Human Diploid Cell Strains." *Exp Cell Res* 25 (Dec 1961): 585-621.
- Chen, Q. M., J. Liu, and J. B. Merrett. "Apoptosis or Senescence-Like Growth Arrest: Influence of Cell-Cycle Position, P53, P21 and Bax in H₂O₂ Response of Normal Human Fibroblasts." *Biochem J* 347, no. Pt 2 (Apr 15 2000): 543-51.
- Chuaire-Noack, Lilian, Magda Carolina Sánchez-Corredor, and Sandra Rocío Ramírez-Clavijo. "The Dual Role of Senescence in Tumorigenesis." *International Journal of Morphology* 28 (2010): 37-50.
- Janderova-Rossmeislova, Lenka, Zora Novakova, Jana Vlasakova, Vlada Philimonenko, Pavel Hozak, and Zdenek Hodny. "Pml Protein Association with Specific Nucleolar Structures Differs in Normal, Tumor and Senescent Human Cells." *J Struct Biol* 159, no. 1 (2007/7 2007): 56-70.
- Jeyapalan, J. C., M. Ferreira, J. M. Sedivy, and U. Herbig. "Accumulation of Senescent Cells in Mitotic Tissue of Aging Primates." *Mech Ageing Dev* 128, no. 1 (Jan 2007): 36-44.
- Jun, J. I., and L. F. Lau. "The Matricellular Protein Ccn1 Induces Fibroblast Senescence and Restricts Fibrosis in Cutaneous Wound Healing." [In eng]. *Nat Cell Biol* 12, no. 7 (Jul 2010): 676-85.
- Kang, T. W., T. Yevsa, N. Woller, L. Hoenicke, T. Wuestefeld, D. Dauch, A. Hohmeyer, *et al.* "Senescence Surveillance of Pre-Malignant Hepatocytes Limits Liver Cancer Development." [In eng]. *Nature* 479, no. 7374 (Nov 24 2011): 547-51.
- Kortlever, R. M., P. J. Higgins, and R. Bernards. "Plasminogen Activator Inhibitor-1 Is a Critical Downstream Target of P53 in the Induction of Replicative Senescence." [In eng]. *Nat Cell Biol* 8, no. 8 (Aug 2006): 877-84.
- Krizhanovsky, V., M. Yon, R. A. Dickins, S. Hearn, J. Simon, C. Miething, H. Yee, L. Zender, and S. W. Lowe. "Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis." [In eng]. *Cell* 134, no. 4 (Aug 22 2008): 657-67.

- Krtolica, A., S. Parrinello, S. Lockett, P. Y. Desprez, and J. Campisi. "Senescent Fibroblasts Promote Epithelial Cell Growth and Tumorigenesis: A Link between Cancer and Aging." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, no. 21 (Oct 9 2001): 12072-7.
- Kuilman, T., C. Michaloglou, L. C. Vredevelde, S. Douma, R. van Doorn, C. J. Desmet, L. A. Aarden, W. J. Mooi, and D. S. Peeper. "Oncogene-Induced Senescence Relayed by an Interleukin-Dependent Inflammatory Network." [In eng]. *Cell* 133, no. 6 (Jun 13 2008): 1019-31.
- Leal, J. F. M., J. Fominaya, A. Cascon, M. V. Guijarro, C. Blanco-Aparicio, M. Leonart, M. E. Castro, *et al.* "Cellular Senescence Bypass Screen Identifies New Putative Tumor Suppressor Genes." *Oncogene* 27, no. 14 (2007): 1961-70.
- Lee, Andrew C., Brett E. Fenster, Hideki Ito, Kazuyo Takeda, Nancy S. Bae, Tazuko Hirai, Zu-Xi Yu, *et al.* "Ras Proteins Induce Senescence by Altering the Intracellular Levels of Reactive Oxygen Species." *J. Biol. Chem.* 274, no. 12 (March 19, 1999 1999): 7936-40.
- Lee, B. Y., J. A. Han, J. S. Im, A. Morrone, K. Johung, E. C. Goodwin, W. J. Kleijer, D. DiMaio, and E. S. Hwang. "Senescence-Associated Beta-Galactosidase Is Lysosomal Beta-Galactosidase." *Aging Cell* 5, no. 2 (Apr 2006): 187-95.
- Melk, A., W. Kittikowit, I. Sandhu, K. M. Halloran, P. Grimm, B. M. Schmidt, and P. F. Halloran. "Cell Senescence in Rat Kidneys in Vivo Increases with Growth and Age Despite Lack of Telomere Shortening." [In eng]. *Kidney Int* 63, no. 6 (Jun 2003): 2134-43.
- Michishita, E., K. Nakabayashi, T. Suzuki, S. C. Kaul, H. Ogino, M. Fujii, Y. Mitsui, and D. Ayusawa. "5-Bromodeoxyuridine Induces Senescence-Like Phenomena in Mammalian Cells Regardless of Cell Type or Species." *J Biochem (Tokyo)* 126, no. 6 (Dec 1999): 1052-9.
- Narita, M., and S. W. Lowe. "Senescence Comes of Age." [In eng]. *Nat Med* 11, no. 9 (Sep 2005): 920-2.
- Novakova, Z., S. Hubackova, M. Kosar, L. Janderova-Rossmeislova, J. Dobrovolna, P. Vasicova, M. Vancurova, *et al.* "Cytokine Expression and Signaling in Drug-Induced Cellular Senescence." *Oncogene* 29, no. 2 (2010): 273-84.
- Nováková, Zora. Cytokine expression in chemically-induced senescence. Prague, 2010. PhD thesis. Charles University, Faculty of Science. Academy of Science of the Czech Republic, Institute of Experimental Medicine, Institute of Molecular Genetics.
- Parrinello, S., J. P. Coppe, A. Krtolica, and J. Campisi. "Stromal-Epithelial Interactions in Aging and Cancer: Senescent Fibroblasts Alter Epithelial Cell Differentiation." *J Cell Sci* 118, no. Pt 3 (Feb 1 2005): 485-96.
- Rebbaa, A., X. Zheng, F. Chu, and B. L. Mirkin. "The Role of Histone Acetylation Versus DNA Damage in Drug-Induced Senescence and Apoptosis." [In eng]. *Cell Death Differ* 13, no. 11 (Nov 2006): 1960-7.
- Redon, C. E., J. S. Dickey, A. J. Nakamura, I. G. Kareva, D. Naf, S. Newsheem, T. B. Kryston, *et al.* "Tumors Induce Complex DNA Damage in Distant Proliferative Tissues in Vivo." [In eng]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, no. 42 (Oct 19 2010): 17992-7.
- Roberson, Rachel S., Steven J. Kussick, Eric Vallieres, Szu-Yu J. Chen, and Daniel Y. Wu. "Escape from Therapy-Induced Accelerated Cellular Senescence in P53-Null Lung Cancer Cells and in Human Lung Cancers". *Cancer Res* 65, no. 7 (April 1, 2005 2005): 2795-803.
- Rodier, F., J. P. Coppe, C. K. Patil, W. A. Hoeijmakers, D. P. Munoz, S. R. Raza, A. Freund, *et al.* "Persistent DNA Damage Signalling Triggers Senescence-Associated Inflammatory Cytokine Secretion." [In eng]. *Nat Cell Biol* 11, no. 8 (Aug 2009): 973-9.
- Sager, R. "Senescence as a Mode of Tumor Suppression." [In eng]. *Environ Health Perspect* 93 (Jun 1991): 59-62.
- Sagiv, A., A. Biran, M. Yon, J. Simon, S. W. Lowe, and V. Krizhanovsky. "Granule Exocytosis Mediates Immune Surveillance of Senescent Cells." [In Eng]. *Oncogene* (Jul 2 2012).
- Serrano, M., H. Lee, L. Chin, C. Cordon-Cardo, D. Beach, and R. A. DePinho. "Role of the Ink4a Locus in Tumor Suppression and Cell Mortality." [In eng]. *Cell* 85, no. 1 (Apr 5 1996): 27-37.

- Schmitt, C. A., J. S. Fridman, M. Yang, S. Lee, E. Baranov, R. M. Hoffman, and S. W. Lowe. "A Senescence Program Controlled by P53 and P16ink4a Contributes to the Outcome of Cancer Therapy." *Cell* 109, no. 3 (May 3 2002): 335-46.
- Sundaram, M., D. L. Guernsey, M. M. Rajaraman, and R. Rajaraman. "Neosis: A Novel Type of Cell Division in Cancer." [In eng]. *Cancer Biol Ther* 3, no. 2 (Feb 2004): 207-18.
- Toussaint, O., E. E. Medrano, and T. von Zglinicki. "Cellular and Molecular Mechanisms of Stress-Induced Premature Senescence (Sips) of Human Diploid Fibroblasts and Melanocytes." *Exp Gerontol* 35, no. 8 (Oct 2000): 927-45.
- Walen, K. H. "Spontaneous Cell Transformation: Karyoplasts Derived from Multinucleated Cells Produce New Cell Growth in Senescent Human Epithelial Cell Cultures." [In eng]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 40, no. 5-6 (May-Jun 2004): 150-8.
- Weaver, Beth A.A., and Don W. Cleveland. "Decoding the Links between Mitosis, Cancer, and Chemotherapy: The Mitotic Checkpoint, Adaptation, and Cell Death." *Cancer Cell* 8, no. 1 (2005/7 2005): 7-12.
- Wei, W., U. Herbig, S. Wei, A. Dutriaux, and J. M. Sedivy. "Loss of Retinoblastoma but Not P16 Function Allows Bypass of Replicative Senescence in Human Fibroblasts." [In eng]. *EMBO Rep* 4, no. 11 (Nov 2003): 1061-6.
- Wright, W. E., O. M. Pereira-Smith, and J. W. Shay. "Reversible Cellular Senescence: Implications for Immortalization of Normal Human Diploid Fibroblasts." [In eng]. *Mol Cell Biol* 9, no. 7 (Jul 1989): 3088-92.
- Xue, W., L. Zender, C. Miething, R. A. Dickins, E. Hernando, V. Krizhanovsky, C. Cordon-Cardo, and S. W. Lowe. "Senescence and Tumour Clearance Is Triggered by P53 Restoration in Murine Liver Carcinomas." *Nature* 445, no. 7128 (Feb 8 2007): 656-60.
- Zaidi, S. K., S. Pande, J. Pratap, T. Gaur, S. Grigoriu, S. A. Ali, J. L. Stein, *et al.* "Runx2 Deficiency and Defective Subnuclear Targeting Bypass Senescence to Promote Immortalization and Tumorigenic Potential." [In eng]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, no. 50 (Dec 11 2007): 19861-6.

Internetové zdroje:

<http://rakovina-nador.zdrave.cz/svetovy-den-boje-proti-rakovine/>
staženo 16.4.2013

<http://www.senescence.info/>
staženo 4.5.2013

<http://www.csc.mrc.ac.uk/News/News/BehindBarrier/>
staženo 4.5.2013