

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Štěpán Kostílek

Indukce a detekce senescence *in vitro*
Induction and detection of senescence *in vitro*

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Konzultant: prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc.

Praha 2017

Prohlášení

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

V Praze.....

Podpis.....

Poděkování

Rád bych poděkoval své vedoucí práce paní prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za odborné vedení a trpělivost, kterou se mnou měla. Dále bych chtěl poděkovat panu prof. MUDr. Tomáši Eckschlagerovi, CSc. za rady a pomoc, které mi usnadnily tvorbu této práce. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat panu MVDr. Janu Hrabětovi, Ph.D. za cenné rady, ochotu, pomoc a hlavně za obrovskou trpělivost, kterou mi po celou dobu poskytoval. Také nemohu opomenout trpělivost a podporu rodiny nejen při psaní této práce, ale i během celého studia.

Abstrakt

V dnešní době jsou, i přes neustálý pokrok novodobé medicíny a terapeutických metod, jedním z nejrozšířenějších a nejzávažnějších problémů nádorová onemocnění. Počet pacientů s nádorovým onemocněním každoročně vzrůstá a navzdory učiněným pokrokům minulých let v této oblasti moderní medicíny jsou tato onemocnění stále velmi špatně léčitelná.

Předkládaná práce se zabývá indukcí a detekcí senescence vyvolané u dvou lidských buněčných linií, nádorové a nenádorové – lidské neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4 a lidské fibroblastové linii HDFn. Senescence byla indukována roztokem peroxidu vodíku anebo dlouhodobou kultivací. Detekce takto vyvolané senescence byla prováděna pomocí histochemického barvení X-Gal a rovněž vyhodnocením na základě morfologických změn buněk. V buněčné linii HDFn byly patrné senescentní buňky po obarvení kitem pro X-Gal. Podíl senescentních buněk stoupal s koncentrací peroxidu vodíku. V neuroblastomové linii nebyla senescence prokazatelná pomocí barvení kitem pro X-Gal, i když buňky ošetřené roztokem peroxidu vodíku vykazovaly morfologické rysy spojené se senescencí.

Klíčová slova: senescence, peroxid vodíku, fibroblasty, neuroblasty, SA- β -Gal

Abstract

Nowadays, despite the constant progress of modern medicine and therapeutic methods, one of the most widespread and most serious problems is cancer. The number of patients with cancer increases every year, and in spite of advances made in recent years in this field of medicine, it is still very difficult to find cure to these diseases.

This thesis deals with the induction and detection of senescence on two different human cell lines, one cancer derived and one normal cell line, the human neuroblastoma cell line UKF-NB-4 and the human fibroblast line HDFn. Senescence was induced by different concentrations of hydrogen peroxide solution or by long-term cultivation. Senescent cells were detected by histochemical staining of X-Gal as well as evaluation based on morphological changes of the cells. In the HDFn cell line, senescent cells were detected using X-Gal kit. The number of senescent cells increased proportionally with the concentration of hydrogen peroxide. In the neuroblastoma line, senescence was not detectable by X-Gal kit, although the cells treated with hydrogen peroxide exhibited morphological features associated with senescence.

Key word: senescence, hydrogen peroxide, fibroblasts, neuroblasts, SA- β -Gal

Obsah

Zkratky.....	2
1. Teoretický úvod.....	3
1.1. Buněčný cyklus.....	3
1.2. Nádorová buňka.....	5
1.2.1. Charakteristiky nádorové buňky.....	5
1.2.2. Neuroblastom.....	6
1.2.3. Morfologie neuroblastomových buněk.....	7
1.3. Lidské buněčné linie.....	7
1.3.1. Fibroblasty.....	7
1.3.2. Morfologie fibroblastů.....	8
1.4. Senescence.....	9
1.4.1. Morfologie senescentní buňky.....	10
1.4.2. Znaky typické pro senescentní buňku.....	11
1.4.3. Typy senescence.....	12
1.4.3.1. Replikativní senescence.....	12
1.4.3.2. Předčasná senescence.....	13
1.4.3.2.1. Senescence indukovaná stresem.....	14
1.4.3.2.2. Senescence indukovaná onkogeny.....	15
1.4.3.2.3. Senescence indukovaná ztrátou tumorových supresorů.....	17
1.4.4. Fenotyp asociovaný se senescencí (SASP).....	17
1.4.5. Vlastnosti senescentních buněk.....	18
2. Cíl práce.....	20
3. Materiály a metody.....	21
3.1. Materiály.....	21
3.1.1. Přístroje a pomůcky.....	21
3.1.2. Chemikálie.....	21
3.2. Metody.....	22
3.2.1. Zmrazení buněčných linií.....	22
3.2.2. Rozmrazení buněčných linií.....	22
3.2.3. Kultivace buněčných linií.....	23
3.2.4. „Pasážování“ buněčných linií.....	23
3.2.5. Kvantifikace (počítání) buněk.....	24
3.2.6. Ošetření buněk peroxidem vodíku.....	24
3.2.7. Histochemické barvení buněčných linií pomocí X-Gal.....	25
4. Výsledky.....	26
4.1. Indukce senescence v buněčné linii HDFn.....	26
4.2. Důkaz replikativní senescence.....	28
4.3. Indukce senescence v buněčné linii UKF-NB-4.....	29
5. Diskuze.....	31
6. Závěr.....	33
6. Seznam literatury.....	34

Zkratky

DDR	z angl. DNA-damage response
DNA SCARS	z angl. DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence
dNTPs	z angl. deoxynucleoside triphosphates
DSBs	z angl. double-strand breaks
GGP	z angl. partial chromosome gains and/or losses
GGW	z angl. whole chromosome gains and/or losses
GROs	z angl. growth-regulated oncogenes
INSS	z angl. International Neuroblastoma Staging System
NBL	z angl. neuroblastoma
OIS	z angl. oncogene-induced senescence
ROS	z angl. reactive oxygen species
SA- β -Gal	z angl. senescence-associated β -galactosidase
SASP	z angl. senescence-associated secretory phenotype
SAHF	z angl. senescence-associated heterochromatin foci
SIPS	z angl. stress induced premature senescence
TIF	z angl. telomere dysfunction–induced foci
VEGF	z angl. vascular endothelial growth factor

1. Teoretický úvod

Nádorová onemocnění se řadí na přední příčky v příčinách úmrtí po celém světě. Přestože byly v posledních desetiletích učiněny velké pokroky v léčbě nádorů, stále se jedná o závažný zdravotní problém, a proto je věnována obrovská snaha hledání nových diagnostických a terapeutických přístupů [1]. Zhoubné nádory jsou charakterizovány nekontrolovaným růstem buněk, který v konečných důsledcích vede k poškození organismu. Od výchozí expozice a prvních genetických změn často uplynou roky, než je nádor detekovatelný. Tou dobou je nádor často ve stádiu, kdy už je vyléčení nemožné [2]. Léčba nádorových onemocnění je komplikována především tím, že je nezbytné zcela zničit nikoliv buňky cizorodé, nýbrž buňky tělu vlastní. Ačkoliv se nádorové buňky nějakým způsobem odlišují od normálních buněk, a tím pádem by měly být rozpoznatelné imunitním systémem, často tyto odlišnosti nejsou dostačující a nejsou imunitním systémem rozpoznány. Nádorové buňky také mohou využívat mechanismy, díky kterým jsou schopné inhibovat imunitní systém [3].

Chemoterapeutika jsou navrhována tak, že cílí na rychle se dělící buňky, tedy nejen na buňky zhoubných nádorů, ale také na normální buňky. Z toho důvodu se během posledních několika let dostala do popředí nová generace léčby nádorů – cílená (biologická) léčba. Stejně jako konvenční chemoterapie využívá farmakologicky aktivní látky, které inhibují růst, indukují různé druhy buněčné smrti (nejen apoptózu, ale například i senescenci nebo autofagii) a zamezují šíření nádoru, ale jak už název napovídá, cílená terapie zasahuje specifičtěji terapeutické cíle v nádorech.

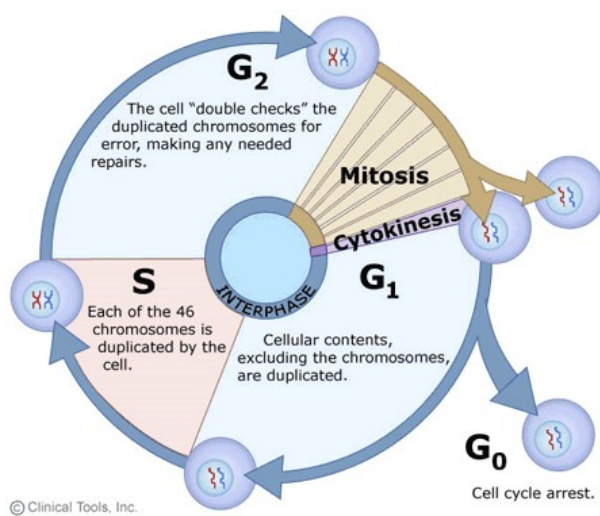
1.1. Buněčný cyklus

Buněčný cyklus je proces, při kterém dochází ke zmnožení veškerého obsahu buňky a jeho následnému přerozdělení do dvou dceřiných buněk. Celý tento cyklus je rozdělen do dvou částí. Těmito částmi je M-fáze, při níž dochází k mitóze a interfáze, ve které dochází ke všem nutným krokům nezbytným pro mitózu (replikace DNA, syntéza proteinů).

Interfázi lze navíc rozdělit na několik dalších po sobě jdoucích fází. Těmi jsou fáze G1, S a G2. Přičemž v S-fázi buňka replikuje DNA a ve fázích G1 a G2 dochází k syntéze proteinů nezbytných pro S, respektive M-fázi, integraci růstových faktorů, kontrole

a opravě DNA. Fáze G1 a G2 jsou nezbytné pro přípravu na rozdělení chromozomů a zmnožení obsahu buňky.

Během fáze G1 tedy dochází ke zvětšování buňky a její přípravě na S-fázi. Během fáze G1 má buňka možnost přejít do klidového stavu (fáze G0), kdy se růst buňky zastaví. Po této fázi nastupuje S-fáze, kdy dochází k samotné syntéze DNA. Za S-fází následuje fáze G2, kdy buňka rychle roste a množí se její organely. Fází G2 končí interfáze a nastupuje M-fáze. V M-fázi dojde k segregaci chromozomů a buněčného materiálu do dvou dceřiných buněk. Po M-fázi přechází buňka zpět do G1-fáze, a tím se celý cyklus uzavírá (obrázek 1).



Obrázek 1: Průběh buněčného cyklu, převzato z [4]

Všechny tyto procesy jsou během svého průběhu neustále sledovány celou řadou kontrolních a regulačních mechanismů, které se starají o řádný průběh buněčného cyklu. V každé z těchto fází se totiž vyskytují kontrolní body, jimiž musí buňka projít, než jí je umožněno přejít do další fáze. Pokud tyto kontrolní mechanismy v buňce nefungují, pak může nastat celá řada nežádoucích změn, které mohou vyústit i v maligní transformaci.

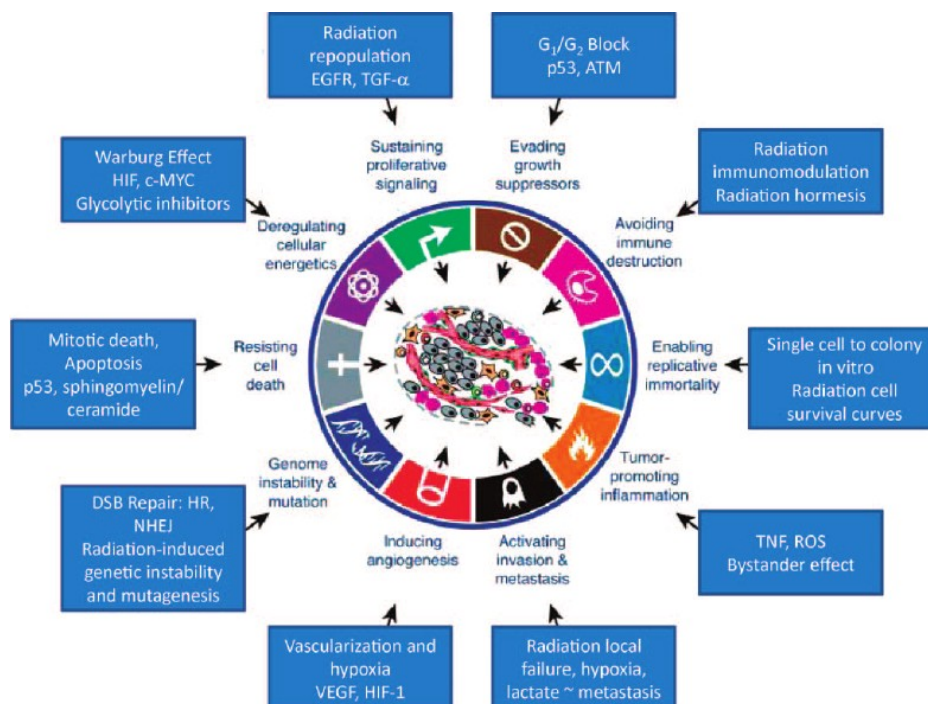
1.2. Nádorová buňka

1.2.1. Charakteristiky nádorové buňky

Pro nádorovou buňku je charakteristická schopnost neomezené replikace. Samotná replikace buňky je ovšem velmi přísně kontrolována celou řadou buněčných mechanismů a počet replikací je limitován. Po překročení tohoto počtu se pak buňka může vydat dvěma směry. První možností je vyvolání senescence, kdy dojde k zastavení proliferace (stále ale funguje metabolický aparát buňky) a druhou možností je podlehnoutí buněčné smrti a definitivní zánik dané buňky. Nádorová buňka však nepodléhá ani jedné z těchto možností, ale stává se z ní buňka „nesmrtelná“.

Při změně zdravé buňky na nádorovou tedy musí dojít k celé řadě procesů, které jsou vyvolány řadou různých faktorů. Díky tomu je poškozena genetická informace zdravých buněk, a tím se mění regulační pochody. Změna regulačních pochodů buňky pak může vyvolat její nekontrolovatelné dělení anebo ztrátu její diferenciace.

Nádorová buňka je charakterizována 10 základními znaky, mezi které patří potlačení apoptózy, nekonečný replikační potenciál, stimulace proliferace a další (obrázek 2).



Obrázek 2: 10 základních znaků nádorových buněk, převzato z [5]

1.2.2. Neuroblastom

Neuroblastom (NBL) je jedním z nejčastěji se vyskytujících solidních nádorů u dětí (90 % všech diagnostikovaných případů je u dětí do 5 let). S rostoucím věkem však jejich četnost v populaci klesá, přičemž u adolescentů je výskyt tohoto typu nádoru vzácný.

Typickým znakem NBL je jeho heterogenita, přičemž pravděpodobnost vyléčení závisí na mnoha faktorech. Mezi tyto faktory patří věk v době diagnózy, rozsah nemoci, biologické vlastnosti nádoru a další. Zatímco jistá část nádorů podléhá spontánní regresi, další skupina neuroblastomů na léčbu nereaguje nebo po počáteční příznivé odpovědi záhy recidivuje.

Existuje celá řada příčin vzniku (NBL). Mezi ty nejpodstatnější patří hlavně alelické delece na chromozomu 1 a 11, zmnožení materiálu DNA (ploidie) a amplifikace protoonkogenu MYCN. Delece určité části chromozomu buňky, v tomto případě nejčastěji krátkého raménka chromozomu 1 (30 % NBL) anebo dlouhého raménka chromozomu 11 (40 % NBL), může mít za následek ztrátu funkce určitých tumorových supresorových genů, což může přispět ke vzniku nádorového bujení.

Další z příčin je zmnožení genetické informace. V tomto případě se jedná o změnu počtu chromozomů nebo jejich částí. Klasická lidská buňka ve svém jádře obsahuje dvě kopie 23 chromozomů. V buňkách NBL ovšem může docházet ke změně tohoto počtu. Podle nového počtu chromozomů je lze následně rozdělit na triploidní či téměř triploidní (58 – 80 chromozomů), téměř diploidní (35 – 37 chromozomů) a téměř tetraploidní (81 – 103 chromozomů) [6]. Tato změna v počtu chromozomů, ať už se jedná o zmnožení, či ztrátu celého chromozomu (GGW) anebo o zmnožení, či ztrátu části chromozomu (GGP), má vliv na prognózu pacienta. U pacientů s NBL bylo dokázáno, že ti s GGW mají lepší prognózu než pacienti s GGP [7]. NBL v klinickém stádiu 1, 2 a 4S (podle INSS) měly častěji GGW, zatímco GGP se vyskytoval častěji u NBL pacientů ve stádiu 3 a 4S. Posledním a patrně nejvýznamnějším prognostickým faktorem je amplifikace protoonkogenu MYCN. Za amplifikaci MYCN lze považovat až stav, kdy je v buňce více než deset kopií tohoto protoonkogenu. Tato amplifikace bývá spojena s pokročilými stádii NBL, jeho rychlou progresí a špatnou prognózou. Při porovnání pacientů s amplifikací MYCN a bez ní, bylo prokázáno, že celková míra přežití byla výrazně vyšší u pacientů bez amplifikace MYCN [8].

1.2.3. Morfologie neuroblastomových buněk

Jedná se o maligní nádor sympatického nervového systému, který vzniká během fetálního nebo raně postfetálního období života. Vzhledem k jeho původu se vzniklé nádory mohou objevit v jakékoliv části sympatického nervového systému. Nejčastěji se však jedná o nádory v oblasti břicha, pánve, hrudi a krku. Tyto nádory obecně vykazují variabilní spektrum histopatologických fenotypů i biologického chování jako je spontánní regrese a agresivita.

1.3. Lidské buněčné linie

Experimenty s buněčnými kulturami prohlubují vědomosti v mnoha oblastech biologických a lékařských věd. Díky nim můžeme v laboratoři zkoumat molekulární podstatu rozličných fyziologických i patofyziologických procesů lidského organismu, nebo testovat toxické či potencionálně léčivé látky. V současnosti jsou k dispozici buněčné linie odvozené od řady zdravých i nádorových buněk různých živočišných druhů.

1.3.1. Fibroblasty

Fibroblasty jsou základní buňky pojivové tkáně mezenchymálního původu. V organismu jsou zodpovědné za celou řadu pochodů jako je syntéza extracelulární matrix v pojivové tkáni, která zahrnuje tvorbu kolagenů a fibronektinu [9], [10] a tvorbu biochemických mediátorů, jako jsou růstové faktory a proteázy [11]. Během vývoje organismu jsou epiteliálně-mezenchymální interakce v tkáních nezbytné pro vývoj celé řady orgánů (plíce, oči). Další podstatnou funkcí fibroblastů v organismu je jejich role v hojení ran. Kromě toho mají fibroblasty vztah s různými chorobami. Bez ohledu na to, ať už jsou propojované s příčinami těchto nemocí anebo s fibrózou doprovázející proces hojení.

Na fibroblasty je obvykle nahlíženo jako na jednotnou skupinu buněk s obdobnými vlastnostmi bez ohledu na to, z jaké části organismu pocházejí. Tento pohled byl ovšem změněn, neboť se stalo zřejmým, že fibroblasty nejsou statickou buněčnou populací, ale že jsou velmi heterogenní [10], [12], [13]. Tato fenotypická heterogenita byla nalezena nejen u fibroblastů z různých částí organismu, ale i u fibroblastů z jedné části organismu vystavených různým podmínkám [14].

I přes výzkum zabývající se fibroblasty a jejich běžné používání v laboratořích, pro ně neustále schází specifický marker. Jedním z navržených markerů pro fibroblasty byl fibroblast-specifický protein-1 (FSP-1) [15], [16]. Ovšem ani FSP-1 není čistě specifický pro tuto buněčnou linii, neboť je také exprimován řadou jiných buněčných typů, jakými jsou nádorové buňky nebo leukocyty [17]. V současné době tedy neexistuje žádný specifický marker, existují ovšem markery pro orgánově specifické podskupiny fibroblastů (tabulka 1).

Proteiny	Funkce	Vyskytuje se i u dalších buněčných linií
α SMA	Protein spojovaný s intermediálními filamenty	Buňky hladkého svalstva, pericyty, myoepitální buňky
Kadherin-9	Ca dependentní adhezí molekula	Neurony, nádorová vaskulatura
CD40	Člen rodiny TFF α receptorů	Řada antigen prezentujících buněk
CD248 (TEM1)	Receptor kolagenu	Pericyty, endoteliální buňky
Col1a1	Syntéza kolagenu I. Typu	Osteoblasty, chondroblasty
DDR2	Receptor pro kolagen vázající tyrosinovou kinázu	Buňky hladkého svalstva, endoteliální buňky
FAP1	Serinová proteáza (gelatináza)	Aktivované melanocyty
FSP1/S100A4	Ca vázající s intermediálními filamenty spojovaný protein	Buňky hladkého svalstva, invazivní nádorové buňky
FSA	Fibronktin vázající protein	Monocyty/makrofágy
HSP47	Kolagen vázající serpin chaperon	Monocyt/makrofágy, řada kolagen produkujících buněk
PDGFRb	Receptor pro tyrosin kinázu	Buňky hladkého svalstva, pericyty
Prolyl-4-hydroxyláza	Biosyntéza kolagenu	Endoteliální buňky, epiteliální buňky
THY1/CD90	Molekula buněčné adheze	Leukocyty, endoteliální buňky, progenitorové buňky
Vimentin	Protein spojovaný s intermediálními filamenty	Endoteliální buňky, buňky hladkého svalstva, pericyty, myoepiteliální buňky

Tabulka 1: Běžně užívané fibroblastové markery, převzato z [18]

1.3.2. Morfologie fibroblastů

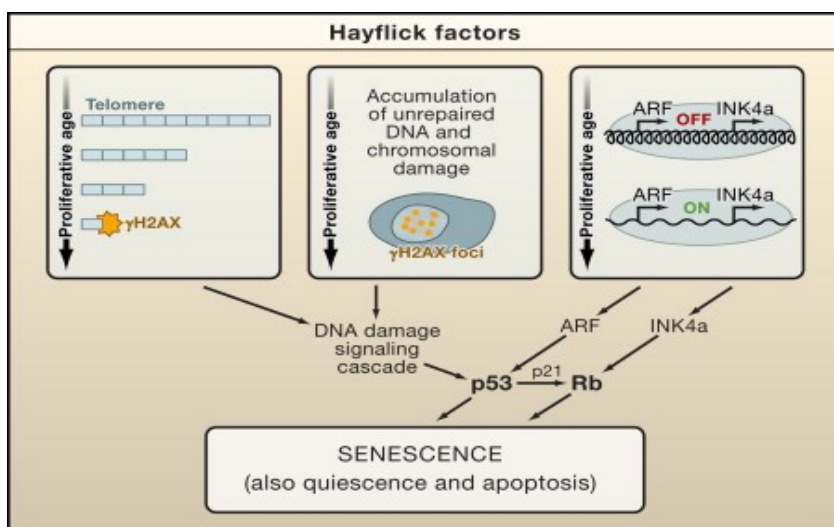
Morfologicky se jedná o zploštělé, protáhlé buňky s postranními výběžky z hlavního těla buňky sloužícími k interakci s okolními buňkami. Fibroblasty oproti jiným buněčným typům postrádají bazální membránu a mají, především ve své aktivní formě, výrazný Golgiho aparát a hrubé endoplazmatické retikulum.

1.4. Senescence

Poprvé byla buněčná senescence pozorována již v roce 1961 týmem pod vedením Hayflicka, který při kultivaci lidských embryonálních fibroblastů *in vitro* zjistil, že tyto buňky mají určitý definovaný počet buněčných dělení, tzv. Hayflickův limit [19]. Po dosažení tohoto limitu se v buňkách zastavuje buněčný cyklus, ztrácí se odpověď na růstové faktory a mění se morfologie [20]. Tímto se somatické buňky liší od buněk nádorových, které na rozdíl od nich nemají definovaný proliferační limit, a tedy nepodléhají těmto změnám. Podstatné je, že senescentní buňky i přes svou neschopnost proliferovat mohou zůstat životaschopné v prostředí *in vitro* po velmi dlouhou dobu. To samé ovšem nelze tvrdit o senescentních buňkách v prostředí *in vivo*, ve kterých může po určité době dojít k různým odpovědím organismu na tyto buňky. Ty buď v organismu přežívají po určitou dobu (může se jednat i o několik let) [21], nebo jsou z organismu odstraněny fagocyty [22].

Buněčná senescence je tedy stresovou odpovědí na celou řadu pro buňku nevýhodných situací, při které dojde k nezvratné zástavě proliferace daných buněk. V určitých speciálních případech ovšem lze proces senescence zvrátit – například postupnou inaktivací určitých tumorových supresorových genů může dojít k reaktivaci proliferace [23]. Zástava buněčného cyklu a tedy proliferace buněk může být vyvolána hned několika mechanismy jako je poškození DNA, zkracování telomer, narušení chromatinu nebo různé epigenetické dereprese na INK4a a ARF lokusu (díky upregulaci CDKN2A jímž jsou kódovány) [20]. Tyto faktory tedy hrají důležitou roli ve stárnutí buněk a omezují tak jejich nadměrnou proliferaci, čímž chrání buňky před nekontrolovaným dělením a tím pádem organismus před rakovinným bujením.

Pro vyvolání senescence je ovšem nutná společná kombinace alespoň tří mechanismů jako molekulárního základu, jmenovitě upregulace lokusu CDKN2A, zkrácení telomer a akumulace poškozené DNA (obrázek 3, str 10). Takováto kombinace je následně řízena tumorovými supresorovými proteiny p53 a Rb.

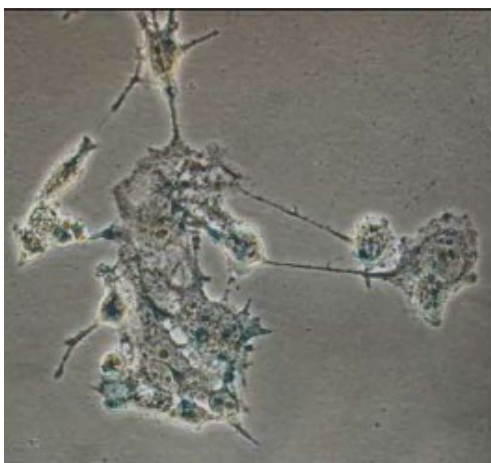


Obrázek 3: Hayflickovy faktory indukující senescenci, převzato z [20]

Senescentní buňky hrají důležitou roli v ochraně organismu před stárnutím, současně se však i na jeho stárnutí podílejí. Na stárnutí se tyto buňky mohou podílet nejen svou akumulací v organismu (v případě fyziologického stárnutí je zvýšení počtu senescentních buněk měřitelné, ale mírné [24]), ale i svým vlivem na kmenové buňky – snižují jejich regenerační potenciál.

1.4.1. Morfologie senescentní buňky

V typické senescentní buňce nedochází jen k zastavení buněčného cyklu, ale i k celé řadě morfologických a fenotypických změn. Hlavním rysem senescentních buněk je jejich zvětšení a zploštění (obrázek 4, str. 11). Senescentní buňky často bývají mnohjaderné a někdy dochází i k jejich rozsáhlé vakuolizaci v důsledku stresu způsobeným rozvinutím proteinů v endoplazmatickém retikulu [25]. Zploštění senescentních buněk bývá typické pro senescenci vyvolanou stresem nebo poškozením DNA. Další možnou změnou je hvězdicovitý tvar senescentních buněk, který je pozorován hlavně u senescence indukované expresí BRAFE600 nebo umlčením genu p400 [21], [26].



Obrázek 4: Senescentní buňka, převzato z [27]

1.4.2. Znaky typické pro senescentní buňku

Senescentní buňky vykazují hned několik pro ně typických znaků. Mezi tyto znaky patří zastavení buněčného cyklu, změna sekrečních mechanismů a změna morfologie. Ovšem ani jeden z nich není specifický pouze pro senescenci a ne každá senescentní buňka musí nutně vykazovat všechny tyto znaky, a proto je nezbytné, aby byly tyto buňky detekovány pomocí kombinace těchto znaků. Prvním podstatným znakem je neustálá metabolická činnost senescentní buňky i přes zastavení její proliferace. Dalším významným znakem je zabránění vzniku apoptózy (senescentní buňky jsou částečně rezistentní vůči apoptóze díky své vysoké hladině antiapoptického proteinu Bcl-2 [28]).

Mezi další znaky senescentních buněk patří tzv. DNA SCARS (DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence) (v případě umístění na telomerách se jedná o TIF (telomere dysfunction–induced foci)) [29], což jsou trvale poškozené úseky DNA, jenž vznikly důsledkem genomového poškození během indukce senescence. Některé senescentní buňky dokonce obsahují pozměněný chromatin (SAHF), jedná se o cytologicky detekovatelný chromatin obsahující určité proliferační geny [30], který připomíná klasický heterochromatin.

Pro důkaz senescence neexistuje žádný specifický marker, je tedy nutné používat markery asociované se senescencí. Takovéto markery se zaměřují na morfologické změny, ztrátu proliferace, nárůst aktivity SA- β -Gal, produkci SAHF a na inhibitory buněčného cyklu jako jsou p16INK4A (působí jako inhibitor buněčného cyklu), p15INK4B, p21CIP1,

p53, DEC1 a DCR2 [31]. Další možnou cestou by bylo zaměřit se na markery pro faktory spojené se záněty jako je IL-6 a IL-8. Ovšem ani toto řešení není stoprocentní, neboť zatím není jasné, zda by tyto markery bylo možné využít pro všechny typy tkání.

Asi nejvýznamnějším a nejčastěji používaným markerem pro senescenci je SA- β -Gal (enzym katalyzující hydrolýzu β -galaktosidů na monosacharidy v senescentních buňkách, jehož reakční optimum je při pH 6,0), ale ani tento marker není specifický pouze pro senescenci, neboť lze předpokládat, že i jiné nesenescenční buňky na něj mohou být pozitivní. V tomto případě by se třeba mohlo jednat o buňky inhibované kontaktem nebo o buňky s nedostatkem živin v séru [32-34].

Pro důkaz senescence buněk je tedy vždy ideální použít nejlépe alespoň tři různé markery, neboť dosud neexistuje žádný čistě specifický marker jen pro senescenci. Z toho důvodu je vhodné vždy použít jeden marker pro proliferaci (třeba Ki-67 nebo BrdU) a další dva co nejlépe zvolené markery pro důkaz senescence.

1.4.3. Typy senescence

Senescenci buněk lze rozdělit na dvě základní skupiny, a to na předčasnou senescenci a na senescenci replikativní [35].

V případě replikativní senescence se jedná o přirozené zastavení buněčného cyklu po překročení určitého počtu dělení (tzv. Hayflickův limit). Toto zastavení závisí čistě na délce telomer. Druhý typ senescence, tedy předčasná senescence (není indukovaná nedostatečnou délkou nebo nefunkčností telomer), má výraznou roli v potlačení nádorového bujení a může být vyvolána hned celou řadou různých faktorů. Do této skupiny patří senescence indukovaná stresem (SIPS), onkogen-indukovaná senescence (OIS) a senescence vyvolaná ztrátou nádorového supresoru. Indukce předčasně senescence tedy způsobí zastavení proliferace dané buňky, tím dojde k zabránění nekontrolovatelné proliferace a díky tomu se poškozená DNA nepředá dceřiným buňkám.

1.4.3.1. Replikativní senescence

Replikativní senescence byla poprvé zmíněna roku 1961 Hayflickem a spol., kteří stanovili definovaný počet buněčných dělení předtím, než k ní dojde (počet dělení je však

druhově a tkáňově specifické). Podle Hayflicka lze proliferaci buněk rozdělit do tří fází. Fáze I odpovídá pomalé proliferaci buněk, obvykle před prvním „pasážováním“, jedná se tedy o čas, kdy dochází k ustanovení kultury. Po ní přichází fáze II, při které buňky rychle proliferují a nakonec přichází fáze III, kdy se proliferace buněk opět zpomalí, až nakonec úplně ustane. Přechod buněk do fáze III, tedy značí konec schopnosti buněk proliferovat, to ovšem neznamená konec životaschopnosti buněk a konec jejich metabolické aktivity.

V řadě lidských buněčných linií dochází k výskytu replikativní senescence jako důsledku ztráty koncových úseků chromozomů [36], telomer, během každého dalšího dělení buněk. K replikativní senescenci tedy v organismu dojde, pokud není buňka schopna zabránit zkracování vlastních telomer.

Obnovu a prodloužení telomer u různých organismů a také u člověka zajišťuje enzym telomeráza. Ten je ovšem v dostatečném množství přítomen pouze v kmenových, zárodečných a nádorových buňkách. U nádorových buněk však není telomeráza jediným mechanismem ochrany telomer před zkracováním, jednou z dalších možností je využití rekombinace [37].

Replikativní senescenci lze tedy také použít jako model pro stárnutí buněk, neboť část genů odpovídajících za opravu poškozené DNA vedoucí k předčasné senescenci rovněž odpovídá fenotypu předčasného stárnutí.

1.4.3.2. Předčasná senescence

V organismu je předčasná senescence vyvolána celou řadou faktorů. Tento typ senescence nastává při vzniku natolik závažného poškození DNA, že na něj není buňka schopna reagovat spuštěním opravných mechanismů a může tedy dojít buď ke spuštění apoptózy anebo k indukci senescence.

Vzhledem k tomu, že telomery v buňkách nejsou zkrácené na svou mezní délku a jsou tedy dostatečně dlouhé, tak se nejedná o senescenci replikativní, ale o senescenci předčasnou. Mezi faktory vyvolávající předčasnou senescenci patří oxidační stresy, působení chemoterapeutik, mutace nebo zvýšená exprese onkogenu a ztráta nádorových supresorů.

1.4.3.2.1. Senescence indukovaná stresem

Senescence indukovaná stresem je fenomén, při kterém se zastavuje proliferace buněk díky působení různých stresových podmínek, a to bez ohledu na délku jejich telomer [35]. V podmínkách *in vitro* může dojít k vyvolání předčasné senescence působením stresu vyvolaným mnoha mechanismy. Těmi mohou být ionizační záření nebo některá cytostatika (hydroxymočovina, doxorubicin a cisplatina). Dalším z mechanismů vyvolávající stres je kultivace buněčné kultury za nesprávných podmínek, ať už se jedná o nedostatek živin v živném mediu nebo o nadbytek kyslíku. Samotný proces kultivace buněk může už sám o sobě působit stresově, neboť jen samotné přemístění buněk z živého organismu do kultury mění přirozené podmínky buněk – jsou izolovány a nejsou tedy v kontaktu s ostatními buněčnými typy, se kterými byly v kontaktu v organismu. Tento problém lze překonat využitím tzv. „feeder layer“. Mnohem lepších výsledků kultivace lze dosáhnout simulací přirozenějšího prostředí, kdy kultura „narostou“ nejprve buňky s podpůrnou funkcí ovlivněné tak, aby nebyly schopny dalšího dělení, například ozářením nebo mitomycinem. Například buňky z centrálního nervového systému dobře rostou na předem vyrostlé vrstvě fibroblastů. Připravená vrstva podpůrných buněk plní funkci substrátu, který označujeme anglickým termínem „feeder layer“ [38]. Už jen jedna ze zmíněných stresových situací pak může v buňkách vyvolat předčasnou senescenci [39]. Při působení stresu se buňky mohou adaptovat [23], tuto schopnost ovšem ztrácejí, pokud stres přesáhne adaptační možnosti buňky a pak dochází k jejímu poškození, které vyvolá celou řadu mnohdy až extrémních odpovědí, jako je třeba nekróza.

Jednou z nejčastějších příčin indukce senescence je působení reaktivních forem kyslíku (ROS) [40], které mohou v buňkách způsobit léze DNA, ty pak mohou indukovat senescenci [41-44]. ROS jsou běžně produkovány v buňkách. Mezi orgány, jež je produkují patří mitochondrie a peroxisomy obsahující oxidační enzymy. V normálních podmínkách jsou ROS regulovány antioxidantními systémy organismu tak, aby nedocházelo k poškození DNA. Problém nastává až s překročením určitého množství ROS, které již buňka není schopna zvládnout. Tyto nestálé oxidační formy kyslíku jsou často zodpovědné za jednovláknové zlomy, poškození kostry DNA, proteinů, lipidů anebo za zkracování telomer [45], [46]. To se může promítnout během replikace, kdy pak dochází ke vzniku dvouvláknových zlomů (double strand breaks, DSB) [44].

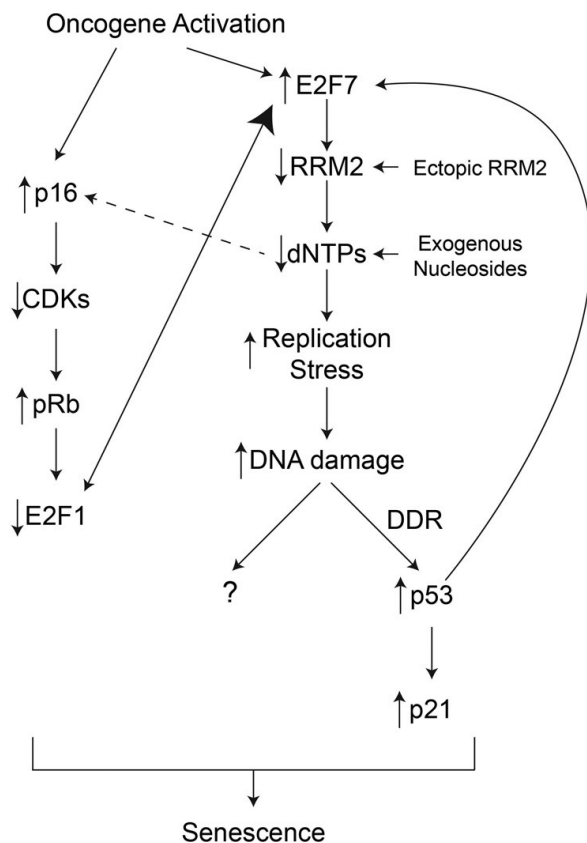
DSBs jsou natolik silným induktorem senescence, že už přítomnost jednoho DSB v DNA může znamenat zastavení buněčného cyklu [47].

V experimentech *in vitro* se nejčastěji používá k indukci senescence roztok peroxidu vodíku (jeho fyziologické koncentrace se v buňce podílí na syntetických a metabolických drahách). Výhodou peroxidu vodíku je jeho schopnost proniknout buněčnými membránami a reagovat s Cu^{2+} a Fe^{2+} za vzniku reaktivního OH^\cdot [48], [49]. Samotné důsledky oxidačního stresu nakonec závisí na typu buněk a jejich schopnosti produkce antioxidantů. Rovněž průměrná délka života organismu může mít vliv na schopnost snášet oxidační stres. Bylo totiž prokázáno, že dlouhověké organismy mají větší rezistenci vůči oxidačnímu stresu a nižší hodnoty ROS vyprodukované mitochondriemi než organismy s krátkým životem.

1.4.3.2.2. Senescence indukovaná onkogeny

K senescenci indukované onkogeny dochází aktivací některého z onkogenů jako je RAS nebo BRAF [50]. Aktivace tohoto onkogenu vede ke zvýšení počtu buněk v S-fázi buněčného cyklu. Nárůst počtu buněk v S-fázi následně vyvolá DNA replikační stres, který vede k odpovědi na poškození DNA (DNA-damage response, DDR) [51], [52].

DNA replikační stres a z něj vyplývající DDR způsobí zastavení buněk ve fázi S jejich buněčného cyklu, to je zapříčiněno buď rozpadem anebo zdržením replikačních vidliček během replikace DNA. Výsledkem je následná aktivace a upregulace kaskády pro p53/p21 a p16/pRb [53] (obrázek 5, str. 16).



Obrázek 5: Dráhy OIS (oncogene-induced senescence), převzato z [54]

Aktivace těchto drah poté vede k expresi pro senescenci typických markerů jako je SAHF (senescence-associated heterochromatin foci) a zvýšená aktivita SA-β-Gal (senescence-associated β-galactosidase) [24].

Regulace OIS je silně ovlivněna množstvím dostupných deoxynukleosidtrifosfátů (dNTPs) v buňce. Při biosyntéze dNTPs hraje významnou roli ribonukleotidreduktáza (RNR). RNR se skládá ze dvou velkých katalytických podjednotek RRM1 a dvou malých regulačních podjednotek RRM2 a p53R2 [55]. RRM2 plní důležitou roli v S-fázi buněčného cyklu, kdy kontroluje syntézu dNTPs. Naproti tomu p53R2 pomáhá během G0/G1-fáze buněčného cyklu dodávat dNTPs nezbytné pro opravu DNA a syntézu mitochondriální DNA [56]. Bylo dokázáno, že snížení dostupných dNTPs v buňce indukuje zástavu buněčného cyklu v S-fázi [57], [58]. Celý tento proces je velmi složitý a ještě nebyl řádně prozkoumán. Lze ovšem říci, že OIS jde považovat za mechanismus ochraňující buňky před maligní transformací.

1.4.3.2.3. Senescence indukovaná ztrátou tumorových supresorů

Podobně jako IOS může být senescence také vyvolána ztrátou tumorového supresoru. V dnešní době je známá indukce senescence ztrátou tumorových supresorů PTEN a NF1. Poprvé tento typ senescence prokázal Pandolfi se svými kolegy, když dokázali, že inaktivace genu PTEN u myších embryonálních fibroblastů vyvolá senescenci doprovázenou indukcí p53 [59]. Obdobně bylo prokázáno, že delece NF1 způsobí předčasnou senescenci *in vitro*, přičemž je část senescentních markerů „up-regulovaná“ a současně s tím je snížena aktivita drah ERK a AKT [60]. Indukci tohoto typu senescence lze však vyvolat jen u některých buněčných linií.

1.4.4. Fenotyp asociovaný se senescencí (SASP)

Buňky se svým okolím komunikují celou řadou způsobů, jedním z nejdůležitějších je jejich sekreční činnost. Buňky tak mohou ovlivňovat nejen ostatní buňky v blízkém okolí, ale i buňky vzdálené anebo samy sebe (autokrinní působení). Vznik senescence, ať již replikativní nebo předčasný, je provázen nejen zastavením buněčného cyklu, ale i změnou sekreční činnosti buněk (dojde k vytvoření SASP). Tato změna je jednou z nejvýznamnějších přeměn senescentní buňky a poskytuje nám možnost vysvětlit různé pochody v organismu jako je stárnutí a choroby s ním spojené.

Změna sekreční činnosti senescentních buněk se projevuje uvolněním velkého množství různých látek, jako jsou například chemokiny a cytokiny. Řada z těchto faktorů (IL-6 a IL-8) funguje parakrinně a může indukovat senescenci ve svém okolí [61], [62]. Další funkcí SASP naopak může být komunikace poškozené buňky s okolními buňkami, které připravuje na opravu. Případně může stimulovat likvidaci senescentních buněk imunitním systémem. Cytokiny produkované senescentními buňkami ovšem mohou rovněž stimulovat blízké nádorové buňky. Z toho lze usuzovat, že celá řada faktorů SASP může mít jak pozitivní, tak i negativní vliv na organismus.

Z řady faktorů SASP je nutno uvést faktory ovlivňující proliferaci buněk jako jsou GROs (growth-regulated oncogenes) [63], [64], VEGF (vascular endothelial growth factor) [65] nebo výše zmíněné interleukiny IL-6 a IL-8, které mohou stimulovat nebo zamezit proliferaci v závislosti na fyziologickém kontextu. Další z vlastností IL-6, IL-8 a několika dalších faktorů je jejich schopnost podporovat zánět. Chronický zánět poté často způsobuje

různé choroby včetně nemocí spojenými se stářím [66]. Pro celou řadu těchto faktorů SASP ovšem platí, že je pro ně nezbytné značné poškození DNA. Na druhou stranu ne všechny faktory SASP jsou striktně spojeny s poškozením DNA [67].

1.4.5. Vlastnosti senescentních buněk

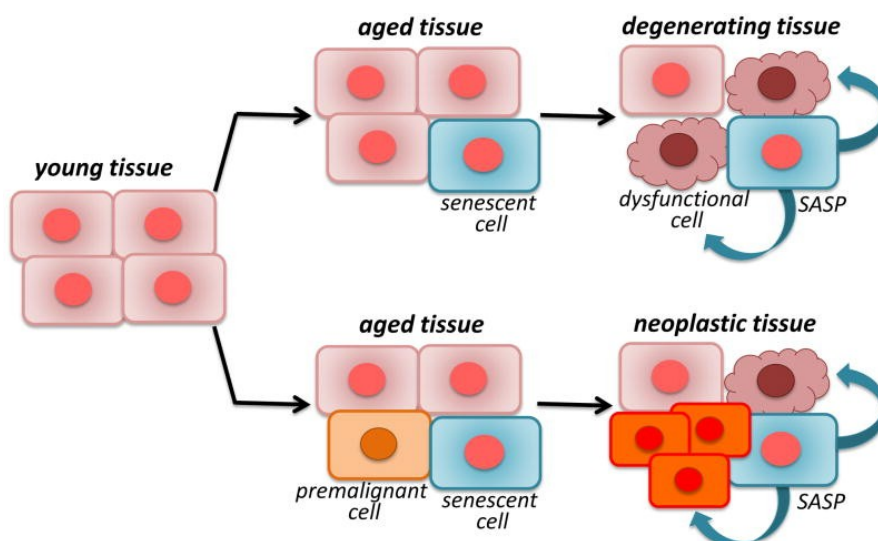
Díky svému pozměněnému sekrečnímu mechanismu mohou senescentní buňky ovlivňovat okolní buňky novými způsoby. V buňkách v jejich bezprostředním okolí mohou vyvolávat senescenci, tlumit proliferaci pomocí sekrece inhibičních faktorů nebo dokonce zabraňovat nádorovému bujení. Jak bylo zmíněno v předchozí kapitole, mohou být senescentní buňky zodpovědné za tvorbu zánětů. Vznik akutního zánětu bývá zpravidla pro organismus prospěšný, neboť za něj zodpovědné senescentní buňky slouží jako chemoatraktanty pro buňky imunitního systému. Další funkcí imunitního systému organismu je likvidace těchto senescentních buněk. Jinou významnou aktivitou senescentních buněk je stimulace lokální imunitní odpovědi likvidující onkogen-exprimující buňky, a to až u buňky které podstoupily senescenci indukovanou onkogenem, nebo onkogenem-přeměněné buňky, které se senescencí vyhnuly [68]. Podstatnou vlastností senescentních buněk je také zastavení jejich buněčného cyklu, čímž dojde k ukončení jejich proliferace a tak pokud byla senescence vyvolána třeba neopravitelným poškozením DNA, nedochází k přenosu této poškozené DNA na dceřiné buňky.

Velký vliv mají senescentní buňky i při potlačování zhoubného bujení, i když se však často maligní buňky buď senescencí vyhnou anebo jí zablokují inhibicí jejich kritických mediátorů. Přesto má senescence velký potenciál v léčení zhoubných nádorů. V dnešní době je totiž většina chemoterapeutik zaměřena na likvidaci nádorové buňky a ne na její inhibici, jak tomu je u senescence, což umožňuje přistupovat k léčbě z trochu jiného úhlu pohledu.

Senescentní buňky nemají v organismu jen pozitivní vliv, ale značná část jich na něj může mít i vliv negativní. To, že přispívají ke stárnutí a k celé řadě nemocí s ním spojeným je již známo. Jak již bylo dříve zmíněno při změně z normální buňky na senescentní, dochází k celé řadě procesů, až už se jedná o morfologické změny, zastavení buněčného cyklu nebo ke změně sekrečního mechanismu. Právě změna

sekrečního mechanismu může podstatně ovlivnit celý organismus, protože díky produkovaným cytokinům může senescentní buňka negativně ovlivňovat nejen své blízké okolí, ale i buňky vzdálené. Ve většině případů jsou příčinou degenerativních změn v organismu právě sekretované proteiny [69]. Senescentní buňky se podílí na celé řadě problémů spojených se stárnutím, ať už se jedná o stavy akutní nebo chronické. S tím je spojená jejich schopnost vyvolat nejen zánět akutní, ale i chronický, který může souviset s patofyziologií chorob spojených právě se stárnutím. V takovémto případě už je daný zánět pro organismus nežádoucí. Mezi choroby spojené se stárnutím se řadí arteroskleróza, Alzheimerova choroba, zhoubné nádory a další.

Problém senescentních buněk rovněž spolu se stářím narůstá. To by mohlo být zapříčiněno několika důvody. Za prvé je to pokles a degradace funkce imunitního systému během stárnutí organismu [70], [71]. Imunitní systém sice likviduje senescentní buňky v organismu, ale s narůstajícím věkem přesto dochází k jejich akumulaci právě jako důsledek snížení výkonnosti imunitního systému. Dalším z důvodů by mohl být postupný nárůst oxidačního stresu v organismu, a tím i senescence vyvolaná stresem. Ačkoli mají senescentní buňky hlavně tumor-supresorovou roli, tak i přesto můžou v organismu, díky svému SASP, podporovat maligní fenotypy a růst nádorů. Spolu se stárnutím totiž dochází nejen k akumulaci senescentních buněk, ale i buněk premaligních [72], které by mohly být ovlivněny SASP senescentních buněk a mohlo by tak dojít k jejich přeměně na maligní (obrázek 6).



Obrázek 6: Změny buněčných typů ve stárnoucí tkáni, převzato z [69]

2. Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bylo indukovat senescenci v podmínkách *in vitro* ve vybraných buněčných liniích, a to v lidské fibroblastové linii HDFn a buněčné linii UKF-NB-4 odvozené od neroblastomu vysokého rizika.

Pro úspěšnou realizaci této práce bylo nutné postupovat podle následujících dílčích kroků:

1. Kultivace buněčných linií
2. Indukce senescence
3. Histochemické barvení buněk

3. Materiály a metody

3.1. Materiály

3.1.1. Přístroje a pomůcky

inkubátor Jouan Igo 150

laminární box Jouan MSC 12

vodní lázeň Grant

mikroskop Olympus IX51

fotoaparát Olympus Camedia C-5050

vortex Genie-2

pH metr CyberScan 510 pH

centrifuga Heitich UNIVERSAL 320

centrifuga Heitich UNIVERSAL 320R

laboratorní váhy ScalTec SBC 41

TC20™ Automated Cell Counter

Millipore Direct-Q 3

Peha-Soft nitrilové rukavice bez pudru

pipety Eppendorf

špičky na pipety Biosphere®

sterilní mikrofiltry 0,22 TPP®

10 mL plastové zkumavky TPP®

50 mL plastové zkumavky TPP®

destičky 24 jamek TPP®

25 cm² kultivační lahev Sigma®

75 cm² kultivační lahev Sigma®

3.1.2. Chemikálie

Advanced DMEM medium Gibco™

IMDM medium Gibco™

dimethylsulfoxid (DMSO) Sigma®

PBS tablety (1 tableta Gibco™ Invitrogen K do 500ml destilované vody)

trypsin Sigma®

FBS Gibco™

30% v/v peroxid vodíku Sigma®

histoshemický kit pro barvení senescentních buněk Sigma®

3.2. Metody

3.2.1. Zmrazení buněčných linií

Buněčné linie jsou uchovávány v tekutém dusíku nebo v hlubokomrazících boxech při teplotě $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$. Samotné buňky se nachází v prostředí media s vysokým obsahem proteinů a dimethylsulfoxidem (medium s 10% DMSO), který se používá jako kryoprotektant. Zmrazením buněčných linií jsme schopni zachovat danou buněčnou linii na dlouhou dobu a zajistit i její genetickou stabilitu.

Typicky jsou buňky určené ke zmrazení připravovány jako při „pasážování“ (viz. kapitola 3.2.4.) až do kroku, kdy dojde k přidání nového media. Poté se buněčná suspenze centrifuguje (2 min, 300 RPM, bez chlazení, centrifuga Heitich UNIVERSAL 320). Po centrifugaci se supernatant slijí a vzniklá peleta se resuspenduje v mediu s 10% v/v dimethylsulfidu (DMSO). Výsledná buněčná suspenze se rozdělí do připravených označených kryozkumavek (po 1,0 mL do každé kryozkumavky). Kryozkumavky s buněčnou suspenzí se následně na 2 až 3 dny umístí do mrazícího boxu s teplotou nastavenou na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, odkud se poté přemístí do hlubokomrazícího boxu s teplotou $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.2. Rozmrazení buněčných linií

Při rozmrazování buněk je nejprve zapotřebí pomocí vodní lázně nastavené na teplotu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ rozpustit zmraženou suspenzi buněk a následně rozmrazené medium s 10% DMSO co nejrychleji z kryozkumavky slít tak, aby v ní zbyla pouze „peletka“, neboť roztok DMSO je pro buňky toxický. Peletka se poté musí rozsuspendovat v 1,0 mL předem připraveného předeřátého media, které se následně přeneso do zkumavky s 9,0 mL předem připraveného čistého media. Takto získaná suspenze se centrifuguje po dobu 2 min a 300 RPM, načez se supernatant slijí a „peletka“ se opět rozsuspenduje

v 10,0 mL připraveného media. Tuto suspenzi pak přeneseme do příslušné označené kultivační nádoby.

3.2.3. Kultivace buněčných linií

První kultivovanou buněčnou linií byla lidská fibroblastová linie HDFn. Tato linie byla inkubována v mediu Advanced DMEM (GIBCO) obohaceném 10% fetálního telecího séra (FBS – GIBCO). Kultivace této buněčné linie probíhala za standardních podmínek – 5 % CO₂ a 37 °C v inkubátoru Jouan Igo 150. „Pasážování“ se provádí v pravidelných časových intervalech (každé 2 až 3 dny). Po odlití starého media byly buňky uvolněny z povrchu kultivačních nádob pomocí 10% trypsinu v PBS zahřátém na 37 °C. Po uvolnění buněk od povrchu kultivačních lahviček, byly buňky resuspendovány v malém množství nového, čistého media (obohacené o 10% FBS). Část této suspenze byla z kultivační lahvičky odebrána a zbytek byl doplněn do požadovaného množství novým médiem (vyhřátým na 37 °C). Výsledné množství media v kultivačních lahvičkách vždy odpovídalo velikosti jednotlivých lahviček. Pro kultivaci této buněčné linie bylo využíváno dvou různých kultivačních lahviček s kultivační plochou 25 cm² a 75 cm² (Sigma®).

Druhou kultivovanou buněčnou linií byla lidská neroblastomová buněčná linie UKF-NB-4. Pro kultivace této linie bylo používáno IMDM medium (GIBCO) obohacené o 10% FBS. Kultivace této linie probíhala v inkubátoru při 37 °C a 5% nasycení CO₂. Linie UKF-NB-4 byla „pasážována“ v pravidelných časových intervalech (každé 2 až 3 dny) obdobně jako buňky HDFn.

3.2.4. „Pasážování“ buněčných linií

Při „pasážování“ buněk (neboli subkultivaci) se snižuje počet buněk v mediu a současně se medium obměňuje. U adherentní buněčné linie, kdy buňky vytváří monovrstvy, je zapotřebí je nejprve uvolnit od stěny kultivační lahvičky. K uvolnění buněk se nejčastěji využívá roztok trypsinu. Po každém „pasážování“ je nutné na kultivační lahvičku poznamenat nezbytné údaje (číslo „pasáže“, druh buněčné linie, datum vytvoření „pasáže“ a eventuálně použité medium). Časový interval „pasážování“ závisí na počtu

nasazených buněk v novém mediu a tedy na čase než rovnoměrně pokryjí dno kultivační nádoby (vytvoří monovrstvu).

3.2.5. Kvantifikace (počítání) buněk

Buňky v buněčných suspenzích byly kvantifikovány (počítány) dvěma způsoby. Nejprve byly počítány pomocí Bürkerovy komůrky pod mikroskopem. V tomto případě se pod mikroskopem počítají jednotlivé buňky na dvou vybraných hranách ze čtyř každého ze čtverců v Bürkerově komůrce.

Později se počet buněk měřil pomocí přístroje TC20™ Automated Cell Counter, kdy se 10,0 µL buněčné suspenze pipetovalo do speciálního sklíčka, které se poté vkládalo do daného přístroje a celý následný postup počítání buněk již byl plně automatizovaný.

3.2.6. Ošetření buněk peroxidem vodíku

Buněčná linie v kultivační lahvičce byla převedena na suspenzi, stejně jako při „pasážování“, jen bylo vynecháno doplnění nového media do požadovaného objemu a v takto vzniklé suspenzi byly spočítány buňky. Do označených zkumavek s novým mediem byla následně pipetována buněčná suspenze tak, aby výsledný počet buněk v novém mediu odpovídal požadovanému množství. Tyto buněčné suspenze byly poté pipetovány do jednotlivých jamek kultivační destičky (24 jamková kultivační destička – po 1,0 mL suspenze do každé jamky) a tyto kultivační destičky byly inkubovány přes noc v inkubátoru za standardních podmínek (37 °C, 5 % CO₂), načež byly druhý den ošetřeny roztokem peroxidu vodíku.

Roztoky peroxidu vodíku byly připraveny ředěním zásobního 30% (v/v) roztoku peroxidu vodíku mediem používaným pro daný typ buněčných linií. Po vytvoření požadovaných koncentrací roztoku byly tyto roztoky pipetovány (po odstranění starých medií) do jednotlivých jamek kultivační destičky. Následně byly buňky inkubovány v mediu s peroxidem vodíku po dobu 2 hodin v inkubátoru za standardních podmínek (37 °C, 5 % CO₂). Po uplynutí inkubační doby bylo medium s peroxidem vodíku v jednotlivých jamkách kultivačních destiček nahrazeno novým mediem vhodným

pro daný typ buněčné linie. Takto ošetřené buňky byly přes noc ponechány v inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂) a druhý den byly barveny pomocí histochemického kitu pro X-Gal.

3.2.7. Histochemické barvení buněčných linií pomocí X-Gal

Buňky ošetřené roztokem peroxidu o určité koncentraci a inkubované určitou dobu jsou obarveny pomocí barvicího kitu pro X-Gal (Sigma-Aldrich). Barvení začíná rozehrátím jednotlivých chemikálií z kitu ve vodní lázni o teplotě 37 °C. Roztok X-Gal se musí před samotným barvením rozehrávat 1,5 hodiny. Zbytek chemikálií z kitu stačí rozehrávat až v průběhu samotného barvení. Pro barvení je nejprve nutno odebrat medium z jednotlivých jamek destičky, načež se jednotlivé jamky promyjí 1,0 mL PBS. Po promytí jednotlivých jamek se do nich pipetuje 1,5 mL fixačního pufru (pufr s formaldehydem - nutno ředit zásobní roztok 10x) a buňky se v něm „fixují“ 6 až 7 minut při laboratorní teplotě. Během „fixace“ buněk je nutno si připravit barvicí směs. Do připravené zkumavky se pro přípravu 10,0 mL barvicí směsi pipetuje 1,0 mL barvicího roztoku (pufr o pH 6,0), 0,125 mL reagentu B (ferikyanid draselný), 0,125 mL reagentu C (ferokyanid draselný), 0,250 mL X-Gal roztoku (chromogenní substrát pro galaktosidázu) a 8,50 mL čisté vody. Tento roztok je následně nutné promíchat pomocí „vortexu“ a přefiltrovat přes 0,22 µm filtr a ohřát na 37 °C.

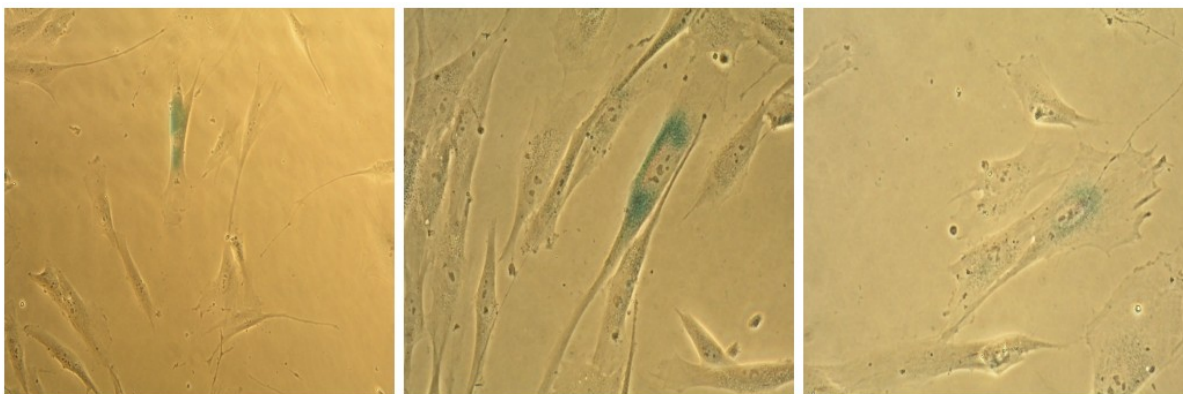
Poté co jsou buňky v jamkách „zafixovány“ pomocí fixačního pufru se z nich tento pufr odstraní a každá jamka se 3x promyje PBS. Po promytí jamek se do nich pipetuje 1,0 mL barvicí směsi a takto obarvené buňky se nechají inkubovat přes noc v inkubátoru při teplotě 37 °C a 0 % CO₂. Druhý den lze pak buňky pozorovat pod mikroskopem a sledovat jejich zbarvení – senescentní buňky se projeví modro-zeleným zbarvením.

4. Výsledky

Dvě vybrané buněčné linie – neuroblastomová buněčná linie UKF-NB-4 a fibroblasty HDFn byly po dobu 2 hodin vystaveny různým koncentracím peroxidu vodíku. Poté jim bylo vyměněno medium za nové (bez přítomnosti roztoku peroxidu vodíku) a buňky v něm byly ponechány do druhého dne. V takto ošetřených buňkách byla poté prokazována senescence, a to pomocí pozorování morfologických změn spojených se senescencí nebo pomocí histochemického barvení X-Gal (Sigma) sledovaným pod mikroskopem.

4.1. Indukce senescence v buněčné linii HDFn

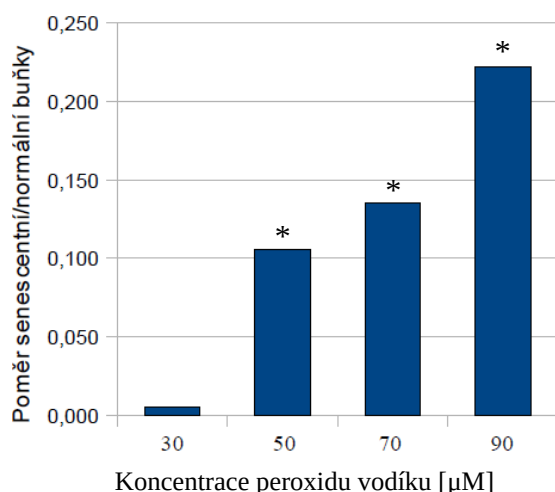
V této buněčné linii bylo pracováno s koncentracemi peroxidu vodíku v rozmezí 25 a 200 μM , tyto koncentrace byly postupně optimalizovány na čtyři testované koncentrace, a to 30 μM , 50 μM , 70 μM a 90 μM roztoky peroxidu vodíku. Buňky HDFn byly 2 hodiny ponechány v roztoku peroxidu vodíku o čtyřech různých koncentracích (30 μM , 50 μM , 70 μM a 90 μM). Některé z takto ošetřených buněk vykazovaly morfologické změny odpovídající senescenci a byly tedy následně barveny X-Gal pro její potvrzení (obrázek 7).



Obrázek 7: Senescentní buňky HDFn obarvené X-Gal po ošetření peroxidem vodíku (A, C 30 μM ; B 70 μM); Zvětšení 200x (A), 400x (B, C)

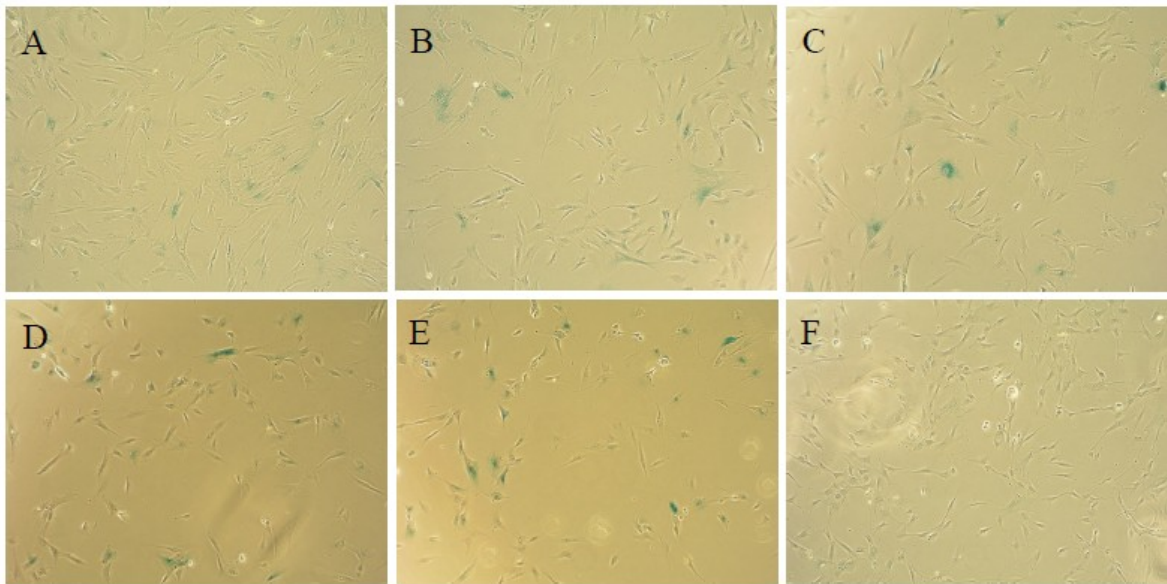
Zastoupení senescentních buněk obarvených X-Gal stoupalo v závislosti na koncentraci peroxidu vodíku. Nejméně senescentních buněk se vyskytovalo v jamce s nejmenší koncentrací peroxidu vodíku (30 μM) a naopak nejvíce se jich vyskytovalo

v jamce s největší koncentrací peroxidu vodíku (90 μM) – ověřeno počítáním buněk pod mikroskopem. Jamka s 30 μM roztokem peroxidu vodíku obsahovala ve třech měřeních jen jednu senescentní buňku (1/66, 0/49 a 0/58), zatímco u ostatních koncentrací jejich počet narůstal. 50 μM roztok obsahoval 2/26, 8/68 a 9/74 senescentních buněk, 70 μM roztok obsahoval 10/95, 7/60 a 13/84 senescentních buněk a poslední 90 μM roztok peroxidu vodíku obsahoval 24/87, 18/79 a 13/80 senescentních buněk (graf 1).



Graf 1: Poměr senescentních a nesenescentních buněk v jamkách ošetřených různými koncentracemi peroxidu vodíku; * $p < 0,01$

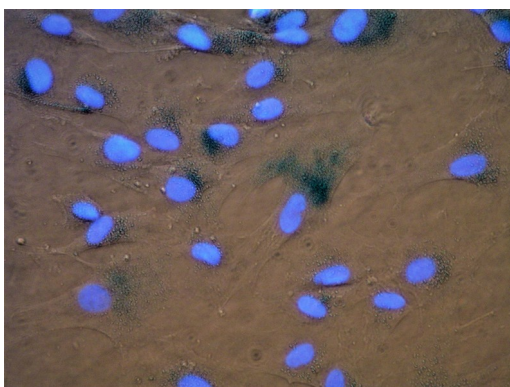
Později byl pokus opakován pro pět nových koncentrací peroxidu vodíku z optimalizovaného rozmezí 30 μM až 70 μM a to 30 μM , 40 μM , 50 μM , 60 μM a 70 μM . Za použití těchto koncentrací se potvrdily výsledky získané v předchozích pokusech – počet senescentních buněk vzrůstal v závislosti na koncentraci peroxidu vodíku. Nárůst počtu senescentních buněk s rostoucí koncentrací lze vidět v obrázku 8 (str. 28).



Obrázek 8: Histochemicky obarvená buněčná linie HDFn vystavená různým koncentracím peroxidu vodíku – 30 μM roztok peroxidu vodíku (A), 40 μM roztok peroxidu vodíku (B), 50 μM roztok peroxidu vodíku (C), 60 μM roztok peroxidu vodíku (D), 70 μM roztok peroxidu vodíku (E) a kontrola bez peroxidu vodíku (F); Zvětšení 100x

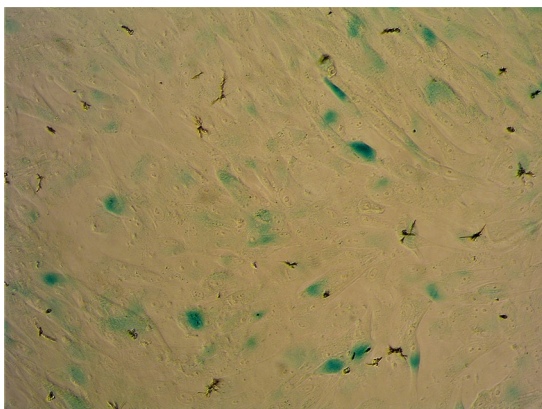
4.2. Důkaz replikativní senescence

Buněčná linie HDFn byla dlouhodobě „pasážována“ tak, aby se podařilo navodit replikativní senescenci. První důkaz replikativní senescence byl získán ve 26. subkultivaci, kdy byly buňky HDFn histochemicky barveny pomocí X-Gal (Sigma), jejich jádra byla obarvena pomocí DAPI (obrázek 9) a pozorovány pod mikroskopem.



Obrázek 9: Snímek z fluorescenčního mikroskopu - buňky HDFn (subkultivace č. 26) byly barveny histochemicky pomocí X-Gal (Sigma), jádra buněk barvena DAPI; Zvětšení 200x

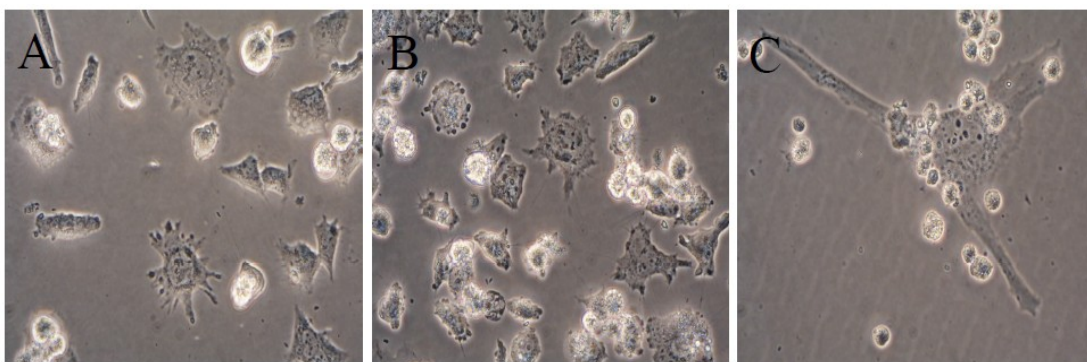
Další kultivace se „dařila“ až do 29. „pasáže“, ve které buňky již téměř vůbec neproliferovaly (běžně byly buňky této buněčné linie „pasážovány“ každé 2 až 3 dny, ale v této „pasáži“ nebylo třeba „pasážovat“ buňky ani po 8 dnech). Takto získané buňky byly histochemicky barveny pomocí X-Gal (Sigma) a sledovány pod mikroskopem pro důkaz replikativní senescence (obrázek 10).



Obrázek 10: Důkaz replikativní senescence buněk HDFn (subkultivace č. 29) pomocí histochemického barvení X-Gal (Sigma); Zvětšení 200x

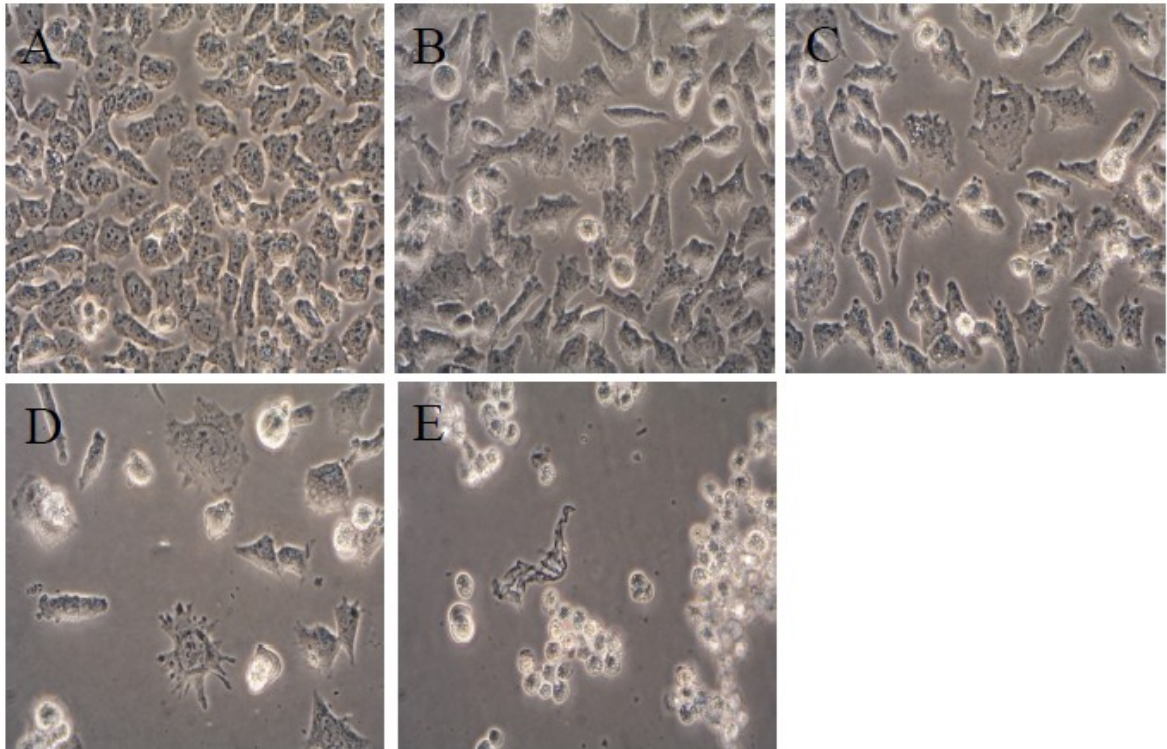
4.3. Indukce senescence v buněčné linii UKF-NB-4

Buňky UKF-NB-4 byly vystaveny po dobu 2 hodin 25, 50, 100 a 200 μM roztoku peroxidu vodíku, aby se zjistilo, zda takto peroxidem ošetřené buňky podléhají senescenci. V buňkách se projevil morfologické změny odpovídající senescenci (obrázek 11). Následně byl proveden pokus prokázat senescenci buněk v této buněčné linii pomocí histochemického barvení X-Gal (Sigma).



Obrázek 11: Morfologické změny v buňkách UKF-NB-4 vyvolané působením 100 μM (A , B - zvětšení 200x) a 200 μM peroxidu vodíku (C - zvětšení 400x)

Morfologické změny se projevily při všech testovaných koncentracích – počet buněk morfologicky odpovídající senescentním buňkám se zvyšoval s danou koncentrací. Při dvou nejvyšších koncentracích – 100 μM a 200 μM došlo v porovnání s menšími koncentracemi k likvidaci většiny buněk (obrázek 12).



Obrázek 12: Morfologické změny buněk UKF-NB-4 a jejich likvidace různými koncentracemi peroxidu vodíku. Pokles přeživších buněk odpovídá narůstající koncentraci peroxidu vodíku v jednotlivých jamkách – kontrola bez přidaného peroxidu vodíku (A), 25 μM roztok peroxidu vodíku (B), 50 μM roztok peroxidu vodíku (C), 100 μM roztok peroxidu vodíku (D) a 200 μM roztok peroxidu vodíku (E); Zvětšení 200x

Barvení buněk pomocí X-Gal (Sigma):

Barvení buněk UKF-NB-4 pomocí kitu X-Gal nebylo úspěšné. Experiment za použití tohoto barvení byl opakován několikrát, ale v žádném případě nedošlo k očekávanému zmodránění senescentních buněk (funkčnost barvicího kitu byla prokázána dříve, a to při barvení buněk HDFn – potvrzení senescence). Další možností prokázání senescence by byl důkaz zvýšené exprese proteinů p21 a p53 pomocí elektroforézy a následného western-blotu, který již nebyl součástí této práce.

5. Diskuze

Tato práce se zabývá indukcí senescence ve dvou buněčných liniích, jednou z nich je lidská fibroblastová linie, která především sloužila k optimalizaci používaných metod a k indukci replikativní senescence. K vyvolání replikativní senescence došlo už ve 26. a později ve 29. „pasáži“, čímž byl potvrzen určitý počet buněčných dělení, než dojde k zastavení buněčného cyklu.

Druhou linií byla neuroblastomová buněčná linie, u které bylo cílem indukovat senescenci za účelem zastavení proliferace. Buňky této buněčné linie byly vystaveny peroxidu vodíku v koncentracích vyšších než je hranice fyziologických hladin. Tyto zvýšené koncentrace peroxidu vodíku měly za následek vyvolání senescence indukované stresem. Tato senescence ovšem nebyla potvrzena pomocí histochemického barvení, ale pouze nálezem typických morfologických změn. Pro další experimenty by proto bylo vhodné zvolit jiné markery než je test za využití s-galaktosidázy.

Senescence je jednou z buněčných odpovědí na stres. Jak již bylo dříve zmíněno, tak může mít na organismus nejen pozitivní, ale i negativní účinek. Stále nám ovšem chybí plné porozumění role senescence v buněčných mechanismech. Je však již prokázáno, že senescence má v raném věku protinádorové účinky, ale později je jednou z hlavních příčin stárnutí. S rostoucím věkem dochází totiž ke zvyšování počtu senescentních buněk v organismu. Vzhledem k tomu, že jednou z jejich pozitivních vlastností je oprava poraněné tkáně, dalo by se teoreticky předpokládat, že s rostoucím počtem senescentních buněk by se měla zlepšovat regenerace organismu. K tomu ovšem nedochází, spíše naopak narůstá počet se stářím spojených chorob. Z toho lze usuzovat, že pozitivní vliv mají senescentní buňky na organismus pouze pokud se na poškozeném místě vyskytují jen přechodně, jak bylo dokázáno při pozorování senescentních buněk v kůži během hojení a během stárnutí [73].

Případně lze indukci senescence využít jako terapeutického procesu, přičemž jí může být dosaženo ionizačním zářením nebo chemoterapií poškozující DNA [74]. Tím ale opět narůstá počet senescentních buněk v organismu, které jej mohou poškodit. Z toho důvodu je zapotřebí tyto buňky nějakým způsobem odstranit. Příznivé výsledky by mohla přinést kombinace léčby, která by indukovala senescenci nádorových buněk a současně by byla schopna je následně odstranit z organismu. Problémem by ovšem mohlo být

samotné odstranění senescentních buněk. Ty se totiž účastní celé řady buněčných procesů a jejich odstranění tak může mít nepředvídatelný vliv na celý organismus. I přesto by mohla být indukce senescence používána jako jedna z terapeutických možností léčení rakoviny.

6. Závěr

V obou testovaných buněčných liniích vystavených působení různých koncentrací peroxidu vodíku byly patrné fenotypické znaky spojené se senescencí. V lidské fibroblastové buněčné linii HDFn byly patrné senescentní buňky po obarvení kitem pro X-Gal. Současně byla v této linii patrná závislost počtu senescentních buněk na koncentraci roztoku peroxidu vodíku, což bylo dokázáno počítáním β -Gal-pozitivních senescentních buněk.

Ve druhé buněčné linii, tedy v lidské neuroblastomové linii UKF-NB-4, nebyla senescence prokazatelná pomocí barvení kitu pro X-Gal, i když buňky ovlivněné roztokem peroxidu vodíku vykazovaly morfologické rysy spojené právě se senescencí.

6. Seznam literatury

- [1] Shewach, D.S., Kuchta, R.D.: Introduction to Cancer Chemotherapeutics. *Chemical Reviews*. 2009, 109, 2859-2861
- [2] Tacar, O., Sriamornsak, P., Dass, C.R.: Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2013, 65, 157-170
- [3] Stiborová, M.: Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace [online]. 2004 [cit. 2017-02-22]
- [4] [http://www2.le.ac.uk/projects/vgec/schoolscolleges/topics/cellcycle-mitosis-meiosis;](http://www2.le.ac.uk/projects/vgec/schoolscolleges/topics/cellcycle-mitosis-meiosis) 24.7.2017
- [5] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011;144:646–674
- [6] Kaneko Y, Kanda N, Maseki N, Sakurai M, Tsuchida Y, Takuto T, Okabe I, Sakurai M. Different karyotypic patterns in early and advanced stage neuroblastomas. *Cancer Research*. 1987;47:311–8
- [7] Tomioka N, Oba S, Ohira M, Misra A, Fridlyand J, Ishii S, Nakamura Y, Isogai E, Hirata T, Yoshida Y, Todo S, Kaneko Y, Albertson DG, Pinkel D, Feuerstein BG, Nakagawara A. Novel risk stratification of patients with neuroblastoma by genomic signature, which is independent of molecular signature. *Oncogene*. 2008;27:441–9
- [8] Nakazawa A, Haga C, Ohira M, Okita H, Kamijo T, Nakagawara A. Correlation between the International Neuroblastoma Pathology Classification and genomic signature in neuroblastoma. *Cancer Science*. 2015;106:766-771
- [9] Kanekar S, Hirozanne T, Terracio L, Borg TK. Cardiac fibroblasts: form and function. *Cardiovascular Pathology*. 1998;7:127–133
- [10] Fries KM, Blieden T, Looney RJ, Sempowski GD, Silvera MR, Willis RA, Phipps RP. Evidence of Fibroblast Heterogeneity and the Role of Fibroblast Subpopulations in Fibrosis. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 1994;72:283–292
- [11] Souders CA, Bowers SL, Baudino TA. Cardiac fibroblast: The renaissance cell. *Circulation Research*. 2009; 105:1164–1176

- [12] Jelaska A, Strehlow D, Korn JH. Fibroblast heterogeneity in physiological conditions and fibrotic disease. *Springer Seminars in Immunopathology*. 1999;21:385–395
- [13] Sugimoto H, Mundel TM, Kieran MW, Kalluri R. Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biology & Therapy*. 2006;5:1640–1646
- [14] Chang HY, Chi JT, Dudoit S, Bondre C, van de Rijn M, Botstein D, Brown PO. Diversity, topographic differentiation and positional memory in human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 2002;99:12877–12882
- [15] Strutz F, Okada H, Lo CW, Danoff T, Carone RL, Tomaszewski JE, Neilson EG. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *The Journal of the Cell Biology*. 1995;130:393–405
- [16] Rossini M, Cheunsuchon B, Donnert E, Ma LJ, Thomas JW, Neilson EG, Fogo AB. Immunolocalization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1), its receptor (FGFR-1), and fibroblast-specific protein-1 (FSP-1) in inflammatory renal disease. *Kidney International*. 2005;68:2621–2628
- [17] Mazzucchelli L. Protein S100A4: Too long overlooked by pathologists? *American Journal of Pathology*. 2002;160:7–13
- [18] Krenning G., Zeisberg E. M., Kalluri R. The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *Journal of Cellular Physiology*. 2010;225:631–637
- [19] Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*. 1961;25:585–621
- [20] Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell*. 2007;130:223–33
- [21] Michaloglou C, Liesbeth C. W. Vredeveld, Maria S. Soengas, Christophe Denoyelle, Thomas Kuilman, Chantal M. A. M. van der Horst, Donné M. Majoor, Jerry W. Shay, Wolter J. Mooi & Daniel S. Peeper. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*. 2005;436:720–724
- [22] Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovsky V, Cordon-Cardo C, Lowe S. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*. 2007;445:656–60

- [23] Beausejour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P, Campisi J. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *The EMBO Journal*. 2003;22:4212–22
- [24] Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubeli I, Pereira-Smith O. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 1995;92:9363–9367
- [25] Denoyelle C, Abou-Rjaily G, Bezrookove V, Verhaegen M, Johnson TM, Fullen DR, Pointer JN, Gruber SB, Su LD, Nikiforov MA, Kaufman RJ, Bastian BC, Soengas MS. 2006. Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nature Cell Biology* 8: 1053–1063
- [26] Chan HM, Narita M, Lowe SW, Livingston DM. The p400 E1A-associated protein is a novel component of the p53 → p21 senescence pathway. *Genes & Development* 2005;19: 196–201
- [27] Mishra PK, Raghuram GV, Panwar H, Jain D, Pandey H, Maudar KK. Mitochondrial oxidative stress elicits chromosomal instability after exposure to isocyanates in human kidney epithelial cells. *Free Radical Reseyrch*. 2009;43:718–728
- [28] Ghobrial I. M., Witzig T. E., Adjei A. A., Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA A Cancer Journal for Clinicians*. 2005;55, 178-94
- [29] Herbig U, Ferreira M, Condel L, Carey D, Sedivy JM. Cellular senescence in aging primates. *Science*. 2006;311:1257
- [30] Narita M, Nunez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ, Lowe SW. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*. 2003;113:703–16
- [31] Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, Benguría A, Zaballos A, Flores JM, Barbacid M, Beach D, Serrano M. Tumour biology: Senescence in premalignant tumours. *Nature*. 2005;436: 642
- [32] Severino J, Allen RG, Balin S, Balin A, Cristofalo VJ Is β -galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo? *Experimental Cell Research*. 2000;257: 162–171

- [33] Going JJ, Stuart RC, Downie M, Fletcher-Monaghan AJ, Keith WN 'Senescence-associated' β -galactosidase activity in the upper gastrointestinal tract. *The Journal of Pathology*. 2002;196: 394–400
- [34] Yang N-C, Hu M-L. The limitations and validities of senescence associated- β -galactosidase activity as an aging marker for human foreskin fibroblast Hs68 cells. *Experimental Gerontology*. 2005;40: 813–819
- [35] Sikora E., Arendt T., Bennett M., Narita M. Impact of cellular senescence signature on ageing research. *Ageing Research Reviews*. 2011;10:146–152
- [36] Itahana K., Campisi J., Dimri G. P. Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology*. 2004;5:1–10
- [37] Cesare A. J., Reddel R. R. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nature Reviews Genetics*. 2010;11, 319–33
- [38] GIBCO INVITROGEN. *Cell culture basics: Handbook*. 2014
- [39] Sherr CJ, DePinho RA. Cellular senescence: Mitotic clock or culture shock? *Cell*. 2000;102: 407–410
- [40] Loft S., Høgh Danielsen P., Mikkelsen L., Risom L., Forchhammer L., Moller P. Biomarkers of oxidative damage to DNA and repair. *Biochemical Society Transactions*. 2008;36, 1071–1076
- [41] Chen QM, Prowse KR, Tu VC, Purdom S, Linskens MH. Uncoupling the senescent phenotype from telomere shortening in hydrogen peroxide-treated fibroblasts. *Experimental Cell Research*. 2001;265:294–303
- [42] Nogueira V, Park Y, Chen CC, Xu PZ, Chen ML, Tonic I, Unterman T, Hay N. Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis. *Cancer Cell*. 2008;14:458–70
- [43] Parrinello S, Samper E, Krtolica A, Goldstein J, Melov S, Campisi J. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nature Cell Biology*. 2003;5:741–47
- [44]. Sedelnikova OA, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Georgakilas AG, Bonner WM. Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. *Mutation Research*. 2010;704:152–59

- [45] Negre-Salvayre A, Salvayre R, Augé N, Ramplona R, Portero-Otín M. Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2009;11:3071–109
- [46] von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends in Biochemical Science*. 2002;27:339–44
- [47] DiLeonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes & Development*. 1994;8:2540–51
- [48] Maynard S, Swistowska AM, Lee JW, Liu Y, Liu ST, Da Cruz AB, Rao M, De Souza-Pinto NC, Zeng X, Bohr VA. Human embryonic stem cells have enhanced repair of multiple forms of DNA damage. *Cell Stem Cells*. 2008;26:2266–74
- [49] Chaudhari P, Ye Z, Jang YY. Roles of reactive oxygen species in the fate of stem cells. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2014;20:1881–90
- [50] Yaswen P, Campisi J. Oncogene-induced senescence pathways weave an intricate tapestry. *Cell*. 2007;128:233–234
- [51] Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, Luise C, Schurra C, Garre M, Nuciforo PG, Bensimon A, Maestro R, Pelicci PG, d'Adda di Fagagna F. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*. 2006;444:638–642
- [52] Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, Karakaidos P, Kletsas D, Issaeva N, Vassiliou LV, Kolettas E, Niforou K, Zoumpourlis VC, Takaoka M, Nakagawa H, Tort F, Fugger K, Johansson F, Sehested M, Andersen CL, Dyrskjot L, Orntoft T, Lukas J, Kittas C, Helleday T, Halazonetis TD, Bartek J, Gorgoulis VG. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*. 2006;444:633–637
- [53] Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*. 1997;88:593–602
- [54] Katherine M Aird, Rugang Zhang. Metabolic alterations accompanying oncogene induced senescence. *Molecular & Cellular Oncology*. 2014;1(3):e963481
- [55] Nordlund P, Reichard P. Ribonucleotide reductases. *Annual Review of Biochemistry*. 2006;75:681–706

- [56] Hakansson P, Hofer A, Thelander L. Regulation of mammalian ribonucleotide reduction and dNTP pools after DNA damage and in resting cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006;281:7834–7841
- [57] Bianchi V, Pontis E, Reichard P. Changes of deoxyribonucleoside triphosphate pools induced by hydroxyurea and their relation to DNA synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 1986;261:16037–16042
- [58] Matsumoto M, Rey DA, Cory JG. Effects of cytosine arabinoside and hydroxyurea on the synthesis of deoxyribonucleotides and DNA replication in L1210 cells. *Advances in Enzyme Regulation*. 1990;30:47–59
- [59] Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin H-K, Dotan ZA, Niki M, Koutcher JA, Scher HI, Ludwig T, Gerald W, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. 2005. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 436: 725–730
- [60] Courtois-Cox S, Genter Williams SM, Reczek EE, Johnson BW, McGillicuddy LT, Johannessen CM, Hollstein PE, MacCollin M, Cichowski K. A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence. *Cancer Cell*. 2006;10: 459–472
- [61] Acosta JC, O’Loughlen A, Banito A, Guijarro MV, Augert A, Raguz S, Fumagalli M, Da Costa M, Brown C, Popov N, Takatsu Y, Melamed J, d’Adda di Fagagna, Bernard D, Hernando E, Gil J. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell*. 2008;133:1006–18
- [62] Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LC, Douma S, van Doom R, Desmet CJ, Aarden LA, Mooi WJ, Peeper DS. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell*. 2008;133:1019–31
- [63] Coppe JP, Patil CK, Rodier F, Krtolica A, Beausejour C, Parrinello S, Hodgson JG, Chin K, Despres PY, Campisi J. A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. *PLoS ONE*. 2010;5:e9188
- [64] Yang G, Rosen DG, Zhang Z, Bast RC, Mills GB, Colacino JA, Mercado-Uribe I, Liu J. The chemokine growth-regulated oncogene 1 (Gro-1) links RAS signaling to the senescence of stromal fibroblasts and ovarian tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 2006;103:16472–77
- [65] Coppe JP, Kauser K, Campisi J, Beausejour CM. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006;281:29568–74

- [66] Chung HY, Cesari M, Anton S, Marzetti E, Giovannini S, Seo AY, Carter C, Yu BP, Leeuwenburgh C. Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Research Reviews*. 2009;8:18–30
- [67] Rodier F, Coppé J-P, Patil CK, Hoeijmakers WAM, Muñoz DP, Raza SR, Freund A, Campeau E, Davalos AR, Campisi J. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nature Cell Biology*. 2009;11:973–979
- [68] Kang T, Yevsa T, Woller N, Hoenicke L, Wuestefeld T, Dauch D, Hohmeyer A, Gereke M, Rudalska R, Potapova A, Iken M, Vucur M, Weiss S, Heikenwalder M, Khan S, Gil J, Bruder D, Manns m, Schirmacher P, Tacke F, Ott M, Leudde T, Longerich T, Kubicka S Zender L. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature*. 2011;479:547–51
- [69] Campisi J, Andersen JK, Kapahi P, Melov S. Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease? *Seminars in Cancer Biology*. 2011;21:354–59
- [70] McElhaney JE, Effros RB. Immunosenescence: what does it mean to health outcomes in older adults? *Current Opinion on Immunology*. 2009;21:418–242
- [71] Rosenstiel P, Derer S, Till A, Häsler R, Eberstein H, Bewig B, Nikolaus S, Nebel A, Schreiber S. Systematic expression profiling of innate immune genes defines a complex pattern of immunosenescence in peripheral and intestinal leukocytes. *Genes & Immunity*. 2008;9:103–14
- [72] Hastay P, Campisi J, Hoeijmakers J, van Steeg H, Vijg J. Aging and genome maintenance: Lessons from the mouse? *Science*. 2003;299:1355–9
- [73] Velarde MC, Flynn JM, Day NU, Melov S, Campisi J. Mitochondrial oxidative stress caused by Sod2 deficiency promotes cellular senescence and aging phenotypes in the skin. *Aging*. 2012;4:3-12
- [74] Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, LeBrasseur Nk, Childs BG, van de Sluis B, Kirkland JL, van Deursen JM. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*. 2011;479:232–236

