

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Biologie
BBI



Michaela Paroubková

Úloha buněčné senescence v karcinogenezi a stárnutí mozku
The role of cellular senescence in carcinogenesis and aging of the brain

Bakalářská práce

Vedoucí práce: MUDr. Zdeněk Hodný, CSc.

Praha, 2019

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

.....

Michaela Paroubková

Poděkování:

Mé poděkování patří především MUDr. Zdeňku Hodnému, CSc. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu psaní bakalářské práce věnoval. Dále bych chtěla poděkovat mé rodině a blízkým za veškerou jejich podporu.

Abstrakt:

Riziko chronických onemocnění se v průběhu života neustále zvyšuje. Díky pokročilé moderní medicíně a změnám životního stylu neustále stoupá průměrná délka života člověka, což zapříčiňuje i dramatický nárůst lidí trpících nemocemi spojených s pokročilým stářím, jako je ateroskleróza, Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba. Řada nedávných studií prokázala, že v tkáních stárnoucích nemocných dochází k akumulaci tzv. senescentních buněk, které jsou metabolicky aktivní, nicméně nejsou již schopny další proliferace a na rozdíl od terminálně diferencovaných buněk sekretují množství specifických faktorů, kterými výrazně ovlivňují okolní mikroprostředí. Úloha senescence jakožto protinádorové bariéry je známa již poměrně dlouho, nicméně její význam ve fyziologických procesech a stárnutí je osvětlován z velké části až v současné době. Zatímco se senescencí v periferních tkáních zabývá poměrně mnoho studií, příspěvek senescence k poklesu fyziologických funkcí stárnoucího centrálního nervového systému patří doposud mezi málo prozkoumané oblasti. Nedávno získané výsledky naznačují, že stárnutí i s ním spojené neurodegenerativní nemoci jsou doprovázeny zvýšeným sekrečním fenotypem senescentních buněk ne-neuronálního původu v mozku, který způsobuje nízkou, ale chronickou hladinu zánětu a výrazně tak může ovlivňovat průběh těchto chorob. Senescentní buňky v mozku tak mohou představovat nové terapeutické cíle pro léčbu neuropatologií centrální nervové soustavy (CNS) spojených se stárnutím. Cílem bakalářské práce je zpracování dosavadních poznatků o senescenci, její úloze v CNS a jejím vlivu na nádorová a neurodegenerativní onemocnění CNS.

Klíčová slova: buněčná senescence, neurodegenerativní onemocnění, stárnutí, senescentní sekretom, centrální nervový systém

Abstract:

The risk of developing many pathological conditions and ageing-related diseases increases persistently throughout a lifetime. A dramatic increase in the number of people suffering from one of these diseases, such as atherosclerosis, Alzheimer's disease or Parkinson's disease, is caused by constant elevation of human life's length due to advancements in modern medicine and changes in life style. Several recent studies have demonstrated that senescent cells accumulate in aged and ill tissues. Senescent cells are metabolically active, but unable of proliferation and unlike the terminally differentiated cells, they secrete many factors that contribute to the transformation of the tissue microenvironment. The role of senescence as anticancer barrier is known for a long time, but its importance in physiological processes and aging is mainly a matter of a recent time. While there is also a lot of studies focusing on cellular senescence in peripheral tissues, their involvement in or contribution to cognitive decline with aging of the central nervous system (CNS) remains relatively unknown. Recent data of many laboratories suggest that senescence-associated secretory phenotype of the non-neuronal senescent cells in brain can cause chronic level of inflammation and thus accompany aging and ageing-related diseases and

contribute to their progression. Thus, senescent cells in brain could be a new therapeutic target for aging-related neuropathologies of the CNS. The aim of this thesis is a compilation of a current knowledge about the role of senescence in the CNS with focus on cancer and neurodegenerative diseases of CNS.

Key words: cellular senescence, neurodegenerative diseases, aging, senescent secretome, central nervous system

Obsah:

Úvod	8
1 Buněčná senescence	9
1.1 Buněčná senescence in vitro	10
1.1.1 Charakteristika senescentních buněk	10
1.1.1.1 Morfologické vlastnosti a vnitřní změny senescentních buněk	10
1.1.1.2 Sekretom senescentních buněk	11
1.1.2 Indukce senescence	13
1.1.3 Molekulární mechanismy senescence	14
1.1.3.1 Signální dráha p53/p21 ^{waf1}	16
1.1.3.2 Signální dráha p16 ^{INK4a} /pRB	16
1.2 Buněčná senescence in vivo	17
1.2.1 Fyziologie buněčné senescence	17
1.2.2 Patofyziologie buněčné senescence	17
1.2.2.1 Buněčná senescence a zánět, zánět a nemoci	18
1.2.2.2 Úloha buněčné senescence ve stárnutí a chorobách spojených se stárnutím	18
2 Buněčná senescence v CNS	20
2.1 In vitro senescence	20
2.1.1 Senescence neuronů	20
2.1.2 Neurální kmenové buňky	22
2.1.3 Gliové buňky	23
2.1.3.1 Oligodendrocyty	23
2.1.3.2 Astrocyty	23
2.1.3.3 Ependymové buňky	24
2.1.3.4 Mikroglie	24
2.2 Buněčná senescence in vivo	25
2.3 Vztah buněčné senescence k neurodegenerativním chorobám	25
2.3.1 Nejčastější neurodegenerativní onemocnění spojená se senescencí	26
2.3.1.1 Alzheimerova choroba	26
2.3.1.2 Parkinsonova choroba	27
2.3.1.3 Další neurodegenerativní onemocnění	28
2.3.2 Vztah senescence k nádorovým onemocněním mozku	28
2.3.2.1 Glioblastoma multiforme	28
3 Senolytika	30
3.1 Terapeutické možnosti senolytik u nádorových chorob včetně nádorů v CNS	31
Závěr	33
Reference	34

Seznam použitých zkratek

- ATM – z angl. ataxia telangiectasia mutated
- ATR – z angl. ataxia telangiectasia and Rad3 related
- CDK – cyklin-dependentní kinázy
- CNS – central nervous system
- CSF – z angl. cerebrospinal fluid
- DDR – z angl. DNA damage response
- DNA-SCARS – z angl. segments with chromatin alternations reinforcing senescence
- DSBs – z angl. double strand breaks
- ECM – z angl. extracellular matrix
- EMT – z angl. epithelial mesenchymal transition
- GBM – z lat. glioblastoma multiforme
- GM-CSF – z angl. granulocyte – macrophage colony-stimulating factor
- GSCs – z angl. glioblastoma stem cells
- HAND – z angl. HIV associated neurocognitive disorders
- HGF – z angl. hepatocyte growth factor
- HSCs – z angl. hepatocyte stellate cells
- iCDK – inhibitor cyklin-dependentních kináz
- IL-(1-15) – interleukiny
- MDM2 – murine double minute 2 protein (u lidí nazýván HDM2)
- NF- κ B – nukleární faktor kappa B
- NGSCs – z angl. non-stem glioma cells
- NSCs - z angl. neural stem cells
- OIS – z angl. oncogene-induced senescence
- OPCs – z angl. oligodendrocyte progenitor cells
- PRR – z angl. pattern-recognizing receptors
- RNS – z angl. reactive nitrogen species
- ROS – z angl. reactive oxygen species
- SAHFs – z angl. senescence-associated heterochromatin foci
- SA- β -gal – z angl. senescence-associated β -galactosidase
- SASP – z angl. senescence-associated secretory phenotype
- SCAPs – z angl. senescent cell anti-apoptotic pathways
- UPR – z angl. unfolded protein response
- VEGF – z angl. vascular endothelial growth factor

Úvod

Díky neustálým pokrokům ve vědě a medicíně dochází k postupnému zvyšování průměrné délky lidského života. To s sebou přináší také mnohá rizika spojená s pokročilým věkem, jako je rozvoj různých geriatrických patologických změn včetně neurodegenerativních onemocnění, kterými bude patrně výhledově trpět stále větší množství lidí. Jako příklad můžeme uvést Alzheimerovu chorobu, vůbec nejčastější neurodegenerativní onemocnění, kterým trpělo v roce 2010 asi 150 tisíc Čechů a 4,7 milionu Američanů, přičemž se odhaduje, že do roku 2050 stoupne tento počet na více než pětinasobek. Nesmíme také zapomínat na obrovské emociální, sociální, lékařské a ekonomické výdaje spojené s léčbou těchto pacientů, které dalece převyšují péči o onkologicky nemocné nebo jedince trpící kardiovaskulárními chorobami, což činí z vývoje terapeutik zaměřených na zmírnění či zpoždění nástupu s věkem souvisejících neurodegenerací hlavní prioritou biomedicíny.

Řada vědců se proto již dlouhou dobu snaží pochopit mechanismy stárnutí a možnosti tento proces zvrátit či alespoň zpomalit. Novou nadějí pacientům nabízejí současné výsledky výzkumu dokazující akumulaci senescentních buněk v řadě starých či nemocných tkání. Tyto buňky charakteristické zastaveným buněčným cyklem v reakci na různé stresory mohou zásadním způsobem přispívat k průběhu těchto chorob, přičemž byly prokázány na modelových organismech pozitivní výsledky jejich odstranění z tkání. Pokud se prokáže, že senescentní buňky jsou příčinou a ne pouhým důsledkem neurodegenerací, znamenalo by to důležitý krok k vývoji účinných léků a perspektivně i prodloužení zdravé délky života.

Cílem této bakalářské práce je shrnutí dosavadních poznatků o senescenci a její úloze v neurodegenerativních onemocnění a karcinogenezi mozku.

1 Buněčná senescence

Biology je stárnutí definováno jako na věku závislý či s věkem narůstající pokles fyziologických funkcí vedoucí ke zvýšené úmrtnosti související s věkem a naopak snížení na věku závislé schopnosti reprodukce ¹. Stejně tak lze definovat i stárnutí na úrovni buněk – čili jako na věku závislý pokles buněčných funkcí včetně schopnosti buněčného dělení, komunikace nebo transportu, což vede k větší náchylnosti k buněčné smrti či k odstranění těchto buněk. Stárnutí se vyskytuje u všech typů buněk, včetně zárodečných linií a kmenových buněk ² a proto se značně liší projevy i důsledky napříč různými buněčnými typy.

Zatímco buněčné stárnutí je kontinuální proces provázející neproliferující buňky už od jejich vzniku po celý život, termín buněčná senescence je vyhrazen pro dělicí se buňky zastavené v buněčném cyklu působením různých stresových faktorů a jimi aktivovaných signálních drah. Z hlediska molekulárního mechanismu se jedná o dlouhodobou indukci inhibitorů cyklin-dependentních kináz v reakci na celou řadu nejrůznějších signálů, jako je například poškození DNA či aktivace onkogenů, která vede k zastavení buněčného cyklu v některém z jeho kontrolních bodů.

Stejně jako senescence není jen zástava buněčného cyklu, zástava buněčného cyklu ještě nutně nemusí znamenat senescenci. Senescentní buňky se liší od diferencovaných buněk v klidovém stavu v mnoha parametrech, mezi které patří například specifická sekrece cytokinů či růstových faktorů ³. Senescentní buňky procházejí řadou morfologických změn, vyznačují se změněnou expresí velkého množství (se senescencí asociovaných) genů ⁴ a naopak v přítomnosti mitogenních signálů nejsou schopny spustit expresi genů nutných k proliferaci ⁵.

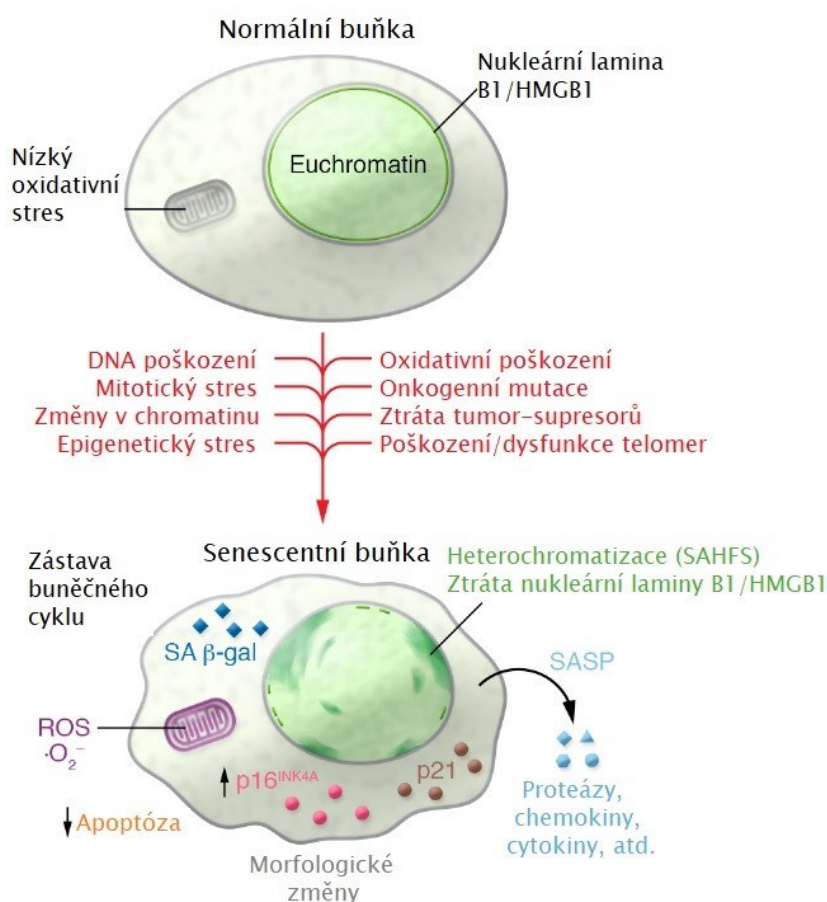
Senescence byla poprvé pozorována v primárních buněčných kulturách lidských embryonálních fibroblastů, které mohou být kultivovány *in vitro* jen omezenou dobu. Postupně ztrácejí schopnost se dělit, až dojde k úplnému zastavení buněčného cyklu. Takové buňky zůstávají životaschopné, ale navzdory vhodným podmínkám už nemohou dále proliferovat. Tento limit maximálního určitého počtu dělení popsal poprvé v roce 1961 Leonard Hayflick ⁶ a byl později po něm pojmenován jako „*Hayflickův limit*“.

Následně bylo také podáno několik důkazů o přítomnosti senescentních buněk *in vivo* ⁷.

1.1 Buněčná senescence in vitro

1.1.1 Charakteristika senescentních buněk

Senescence se v závislosti na typu buněk a induktoru vyskytuje jako velice heterogenní fenotyp, a protože není doposud znám žádný univerzální a naprosto spolehlivý marker senescence, není její detekce, především *in vivo*, vždy zcela jednoduchá. K prokázání senescentního fenotypu se proto obvykle používá kombinace několika markerů (Obrázek č. 1).



Obrázek č. 1: Buňky přecházejí po některém z mnoha vnějších či vnitřních stimulů do senescence s charakteristickými znaky, které jsou využívány jako markery senescence ⁸ (upraveno).

1.1.1.1 Morfologické vlastnosti a vnitřní změny senescentních buněk

Zástava buněčného cyklu a neschopnost dělení je sice hlavním, avšak ne jediným charakteristickým znakem senescence. Senescentní buňky spolu obvykle sdílí několik typických projevů včetně zploštělé, silně roztažené morfologie se zvětšeným jádrem, často jsou také mnohojaderné a/nebo polyploidní ⁹. V některých případech mohou vykazovat rozsáhlou vakuolizaci způsobenou

buněčnou odpovědí na nesbalené či špatně sbalené proteiny (UPR – z angl. *unfolded protein response*) v důsledku vzniku stresu endoplazmatického retikula či zvýšenou makroautofágií ¹⁰.

Senescentní buňky vykazují zvýšenou expresi lysozomální tzv. se senescencí-asociované β -galaktosidázy (SA β -gal). Tento enzym je aktivní a detekovatelný jak v senescentních, tak normálních buňkách při pH nižším než 4,0 – 4,5, odpovídající normálnímu prostředí lysozomu. Naopak díky expanzi lysozomálního kompartmentu se celková aktivita β -galaktosidázy zvyšuje a v kultuře senescentních buněk lze přítomnost SA β -gal prokázat i při suboptimálním pH 6. To bylo poprvé provedeno u senescentních lidských fibroblastů ¹¹, a využívá se jako jeden ze základních testů k detekci senescentních buněk jak *in vitro*, tak s limitacemi i *in vivo*.

Vyšší počet lysozomů může být zapříčiněn zvýšenou potřebou remodelace chromatinu ¹² a recyklace organel či akumulovaných nedegradovatelných proteinů makroautofágií ¹³. S tím je spojena ztráta laminu B1, která způsobuje zvýšenou neselektivní permeabilitu jaderného obalu, tudíž dochází k charakteristickému snížení barvení DNA v důsledku průniku jaderného chromatinu do cytoplazmy, který zde vytváří tzv. cytoplazmatické chromatinové fragmenty ¹².

Senescenci často doprovází také výskyt tzv. heterochromatinových fokusů (SAHF – z angl. *senescence associated heterochromatin foci*). Pravděpodobně se jedná o zbytky heterochromatinu.

Senescentní buňky také vykazují zvýšený počet jaderných tělísek PML ¹⁴, což jsou subjaderné proteinové komplexy vyskytující se v interchromatinovém prostoru. Jaderná tělíška PML obsahují stabilně nebo přechodně téměř dvě stě dalších proteinů a podílí se na mnoha biologických procesech probíhajících v jádře včetně transkripce, řízení apoptózy, vstupu do senescence či odpovědi na poškození DNA ¹⁵.

Při pokusech na diploidních lidských fibroblastech bylo také zjištěno, že při senescenci spuštěné poškozením DNA, především dvouvláknových zlomů DNA (DSBs – z angl. *double strand breaks*), dochází v jádře k dlouhodobé signalizaci odpovědi na poškození DNA (DDR – z angl. – *DNA damage response* – viz kap. 1.1.3). Předpokládá se, že se jedná se o místa trvalého poškození DNA se stabilně asociovanými proteiny DDR, někdy nazývaných jako tzv. „DNA-SCARS“ (z angl. *segments with chromatin alternations reinforcing senescence*) ¹⁶.

1.1.1.2 Sekretom senescentních buněk

S přechodem buněk do stádia senescence je také spojena změna jejich sekretomu, čili produkce látek do okolního prostředí. Sekretomy jednotlivých buněk se mohou navzájem lišit v závislosti na typu buňky, její funkci či případné patologii.

Spektrum faktorů, které senescentní buňky produkují, označujeme jako „*sekreční fenotyp asociovaný se senescencí*“, zkráceně SASP (z angl. *senescence-associated secretory phenotype*). Ten se vyskytuje nejen u buněk kultivovaných *in vitro*, ale také *in vivo*, například jako odpověď na poškození DNA chemoterapií. Senescentní buňky zvyšují expresi mnoha prozánětlivých a imunomodulačních látek,

zahrnujících cytokiny a chemokiny, růstové faktory nebo faktory přežití či smrti, které působí jak parakrinně (na okolí), tak i autokrinně (na buňky samotné) ¹⁷.

Hlavní skupinu tvoří již zmíněné „tkáňové hormony“ cytokiny, které v lidském těle působí jako hlavní mediátory imunitní odpovědi a zprostředkovatelé mezibuněčné komunikace. Některé složky SASP mohou potlačit nádorovou progresi vyvoláním senescence v okolních buňkách (IL-6, IL-8, IL-1 β , TGF- β atd.) ¹⁸ či aktivací imunitní odpovědi, která senescentní buňky zlikviduje (IL-1, IL-6, IL-8, IL-15, TGF- β atd.). Některé z těchto a dalších faktorů (IL-6, IL-8, MMP-3, VEGF, HGF atd.) ¹⁹ mohou naopak transformovat premaligní buňky na nádorové a podporovat růst či tvorbu metastáz.

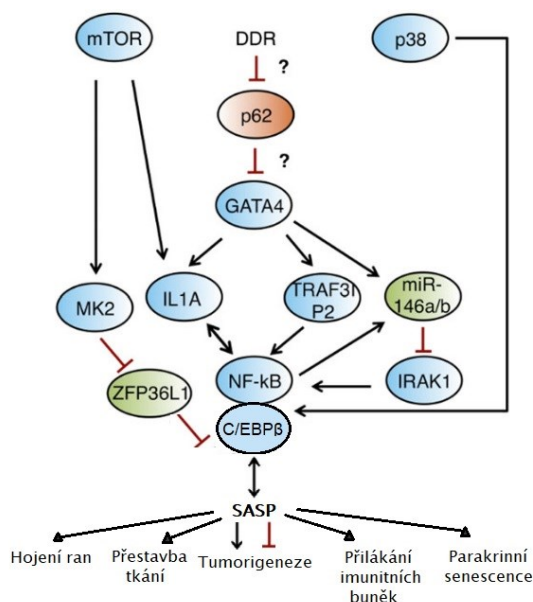
Je třeba zdůraznit, že působení SASPu je ve specifickém kontextu pleiotropní. SASP zásadním způsobem ovlivňuje tkáňové mikroprostředí, fyziologicky může napomáhat udržování homeostázy, hojení ran a tkáňového poškození, tlumit či podporovat proliferaci okolních buněk, nebo skrze aktivaci imunitních buněk navozovat stav podobný hojení poškozené tkáně. Při dlouhém setrvání senescentních buněk v tkáních může docházet také k negativním účinkům, jako je navození (druhotné) senescence v okolních buňkách, podpora množení nádorových buněk, vyvolání chronického zánětu či podpora epiteliálně mesenchymálního přechodu (EMT – z angl. *epithelial mesenchymal transition*) ²⁰, který je za normálních okolností sice běžnou součástí hojení ran, nicméně se ale také podílí na invazivitě zhoubných nádorů a vzniku metastáz.

SASP je regulován na mnoha úrovních, včetně transkripce, translace, stability mRNA, či autokrinních a parakrinních zpětnovazebných smyček, které mohou daný signál mnohonásobně zvýšit. Ačkoliv bylo objeveno mnoho mechanismů podílejících se na indukci SASP, jako je aktivace dráhy MAP kinázy p38 ²¹ či signální dráhy mTOR ²², DDR ²³ nebo cGAS/STING ²⁴, k úplnému pochopení indukce SASP za specifických podmínek je zapotřebí další výzkum.

Expresi látek SASPu je kontrolována dvěma hlavními transkripčními faktory – NF- κ B ²⁵ a C/EBP β ²⁶, které mají esenciální úlohu v iniciaci imunitní odpovědi, a je, jak zmíněno výše, silně ovlivněna řadou pozitivních i negativních zpětnovazebných smyček. Například exprese genu TRAF3IP2 či IL1A může stimulovat expresi NF- κ B, která zároveň zvyšuje expresi IL1A, stejně jako některé složky SASPu mohou zpětně pozitivně ovlivňovat expresi NF- κ B ²⁶. Příkladem negativní zpětné vazby pak může být zvýšená exprese mikroRNA miR146a a miR146b u senescentních buněk se silným sekrečním fenotypem, která reprimuje regulátor NF- κ B – IRAK1 ²⁷ a sekreci látek tak omezuje.

Dalším důležitým regulátorem senescence a především SASPu je transkripční faktor GATA4 ²⁸. V senescentních buňkách dochází vlivem poškození DNA k aktivaci kináz ATM a ATR a tím ke stabilizaci proteinu GATA4, který je za normálních okolností v komplexu p62-GATA4 směřován k proteosomální degradaci. GATA4 může ovlivnit expresi mnoha genů důležitých pro senescentní fenotyp a zprostředkovat transkripci genů kódujících některé ze složek SASP (IL-6, IL-8, CXCL1, GMCSF, proteázy a inhibitory ECM atd.) a to především regulací aktivity NF- κ B přes TRAF3IP2 a IL1A či miR146a a miR146b. Bylo zjištěno, že na rozdíl od zástavy buněčného cyklu funguje tato dráha

nezávisle na ektopické indukci p16^{INK4a} a p21^{waf1/cip1} 17,29, což vysvětluje poměrně dlouhý časový úsek mezi zástavou cyklu a nástupem sekrečního fenotypu senescentních buněk.



Obrázek č. 2: Schéma regulace SASP skrze mechanismus DDR i mechanismy na DDR nezávislé (upraveno³⁰).

1.1.2 Indukce senescence

Senescence může být vyvolána řadou různých stimulů. Ve většině případů je jejím spouštěčem odpověď na neopravitelné či setrvalé poškození DNA nebo rozsáhlý stres, který následně aktivuje příslušné signální dráhy nutné ke spuštění senescentního fenotypu.

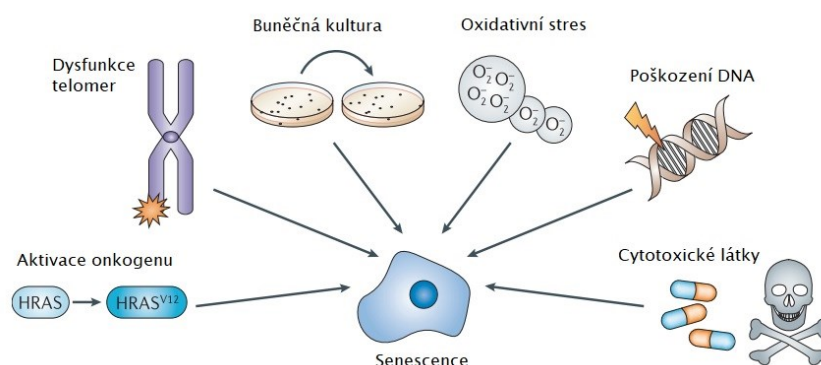
Jak již bylo zmíněno, senescence byla poprvé pozorována u kultury lidských fibroblastů⁶, a protože byla charakterizována jako vyčerpání mitotického potenciálu buňky následované úplnou zástavou buněčného cyklu, byla nazvána senescencí replikační. Jedním z hypotetických mechanismů, jak by mohla buňka detekovat počet svých dělení, je kontrola délky telomer, hexanukleotidových repetitiv 5'-TTAGGG-3' na konci chromozomů eukaryotických organismů. Podle hypotézy Watsona a Olovnikova není DNA polymeráza díky jednosměrné replikaci a linearitě chromozomové DNA schopna doreplikovat celé vlákno DNA, což může být příčinou postupného zkracování telomer. V momentě, kdy by byly telomery příliš krátké, by mohlo dojít k zastavení cyklu. Je zřejmé, že telomery se během kultivace lidských buněk zkracují, ale zda se v tomto procesu uplatňuje výše uvedený mechanismus, není jednoznačně prokázáno. Některé práce naznačují, že poškození telomer dvouvláknovým zlomem hraje v indukcii senescence skutečně roli, protože oprava dvouvláknových zlomů je v oblasti telomery blokována specifickými telomerickými vazebnými proteiny shelterinového komplexu³¹, a k opětovnému prodloužení telomery může dojít pouze aktivitou enzymu telomerázy nebo homologní rekombinací.

Vliv na vstup do senescence má rovněž oxidační stres způsobený zvýšenou hladinou volných radikálů kyslíku (ROS – z angl. *reactive oxygen species*). Telomery bohaté na snadno oxidovatelnou bázi guanin jsou na oxidační stres citlivé a bylo prokázáno, že antioxidační kapacita buněk koreluje s jejich proliferační kapacitou a stupněm zkrácení telomer³². Jakékoliv neopravitelné poškození telomer je pak detekováno příslušnými mechanismy a spouští se kaskáda podobná DDR¹⁶.

Senescence může být indukována také onkogeny (OIS – z angl. *oncogene-induced senescence*)³³. Onkogeny Ras/Raf nebo c-myc stimulují v buňce neplánovanou replikaci DNA, což navozuje replikační stres, který vede k aktivaci DDR, indukci senescence či buněčné smrti^{34,35}.

Dalším z možných způsobů, jak vyvolat senescenci či apoptózu, je aplikace ionizujícího záření či chemických látek poškozujících DNA, včetně těch, které se využívají v léčbě rakoviny (H_2O_2 ³⁶, 5-azacytidin³⁷, gama záření³⁸, cisplatina³⁹ atd.), způsobujících genotoxický stres a neopravitelné poškození DNA. Podobné účinky mohou mít také některé bakteriální genotoxiny (např. toxiny náležející do rodiny tzv. cytoletálních distenzních toxinů, CDT). Příkladem může být HdCDT produkovaný patogenní gram-negativní bakterií *Haemophilus ducreyi*⁴⁰.

K indukci senescence může dojít také parakrinním působením genotoxických cytokinů, které jsou jednou z hlavních složek SASPu⁴¹.



Obrázek č. 3: Některé z možných stimulů představující stresové podmínky schopné navodit senescenci (upraveno⁴²).

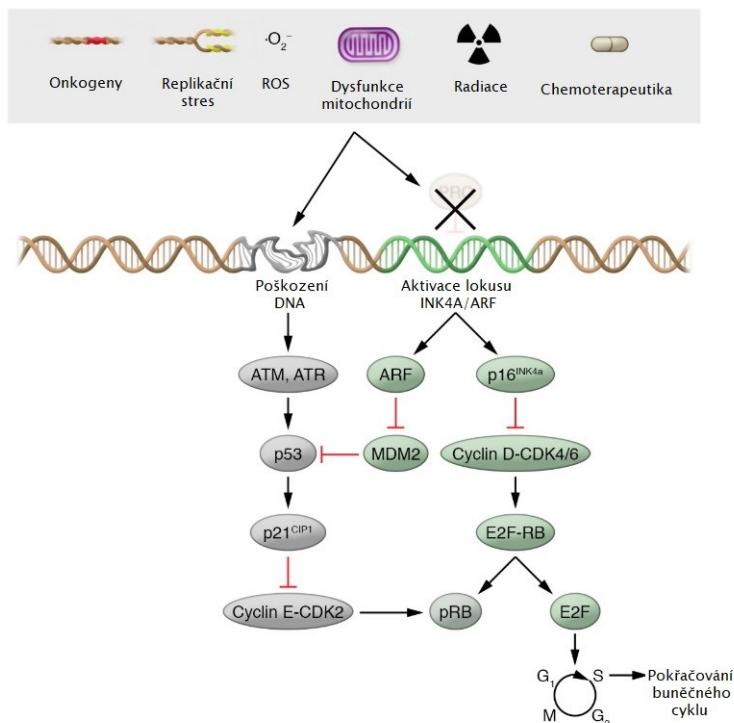
1.1.3 Molekulární mechanismy senescence

Kontinuita buněčného cyklu závisí na velmi přesné regulaci jednotlivých kroků, jako je časově správná aktivace i deaktivace mnoha enzymů či proteinů hrajících důležitou roli v procesech regulujících buněčný cyklus, čímž buňka zabráňuje vzniku defektů a jejich potenciálního šíření do dalších generací. V každé fázi cyklu monitorují správný průběh tzv. kontrolní body buněčného cyklu, které jsou schopné v případě zjištění chyby v některém z procesů nezbytných pro bezchybné rozdělení buňky cyklus zastavit. V jednotlivých fázích hrají důležitou roli také regulátory buněčného cyklu. Těmi bezesporu nejdůležitějšími jsou cyklin-dependentní kinázy, které v aktivní formě fosforylují proteiny zodpovědné za regulaci cyklu. Aktivita Cdk je regulována cykliny, jejichž hladina se mění v závislosti na konkrétní

fázi buněčného cyklu. Aktivita cyklin-Cdk komplexů může být v průběhu cyklu ovlivněna přítomností inhibitorů cyklin-dependentních kináz. Ty se dělí do dvou rodin – INK4 a Cip/Kip. Rodina INK4 je tvořena čtyřmi iCdk – p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c}, p19^{INK4d}, které inhibují komplexy Cdk4-6/D. Rodina Cip/Kip zahrnuje tři iCdk – p21^{waf1/cip1}, p27^{kip1} nebo p57^{kip2}, které inhibují jak Cdk4-6/D, tak i Cdk2/A-E.

Pro senescentní buňky je důležitý především přechod z G1 do S fáze, který je u proliferujících buněk podmíněn expresí specifických genů kódujících proteiny důležité pro replikaci DNA. Jejich exprese je regulována rodinou transkripčních faktorů E2F, které jsou v G1 fázi inaktivovány tvorbou komplexu s proteinem z retinoblastomové rodiny (pRb), který buňce brání ve vstupu do S fáze. Běžně je pRb v pozdní G1 fázi hyperfosforylován cyklin-dependentními kinázami (Cdk-4/Cdk-6 aktivovanými cyklinem D či Cdk-2 aktivovanou cyklinem E ⁴³). Takto modifikovaný pRb již není schopen vázat E2F, uvolňuje ho a umožňuje tak spuštění transkripce genů potřebných pro iniciaci S fáze ⁴⁴.

Jak již bylo řečeno, většina buněk přechází do senescence v odpovědi na různé formy extenzivního stresu či detekci poškození DNA, což spouští mechanismus DDR a aktivaci mnoha signálních kaskád včetně dvou pro senescenci zcela zásadních nádorově supresorových drah – p53/p21^{waf1} a p16^{INK4A}/pRb. Výsledkem DDR je pak aktivace kontrolních bodů buněčného cyklu vedoucí k inhibici Cdk aktivací exprese iCdk ⁴⁵. Cdk jsou pak inhibovány po celou dobu procesu reparace a při neopravitelném poškození dochází k nepřetržité aktivaci kontrolních bodů a tedy i expresi iCdk a hypofosforylaci pRb. Následuje trvalá zástava buněčného cyklu a navození senescentního fenotypu.



Obrázek č. 4: Zástava buněčného cyklu může být vyvolána různými druhy stresorů. Dráha p53/ p21^{waf1/cip1} může být spuštěna mechanismem DDR při poškození DNA či aktivací lokusu INK4A/ARF přes p14^{ARF} (myši p19^{ARF}). Signální dráha p16^{INK4a}/pRb je spuštěna aktivací lokusu INK4A/ARF. Výsledkem je inaktivace Cdk, hypofosforylace pRb a následné zastavení buněčného cyklu (upraveno ⁴⁶).

1.1.3.1 Signální dráha p53/p21^{waf1}

Nádorově supresorový protein p53 je transkripční faktor hrající klíčovou roli v regulaci senescentní signalizace indukcí exprese iCdk p21^{waf1/cip1}. V lidských zhoubných nádorech bývá p53 až v polovině případů inaktivován. Za normálních okolností je tento protein neustále syntetizován, bezprostředně ubiquitinován E3 protein-ligázou MDM2/MDM4, jejíž gen je rovněž jedním z cílových genů p53, a degradován v proteasomu.

Jednou z cest aktivace p53 v reakci na buněčný stres je inhibice degradace komplexu p53 s MDM2. Dochází k tomu dvěma základními mechanismy. Prvním z nich je rychlá odpověď, kdy je v reakci na poškození DNA aktivována kináza ATM, která poté fosforyluje p53 a MDM2. Tím dochází k autofosforylaci MDM2, její autoubiquitinaci a proteasomální degradaci a stabilizaci p53.

Druhým mechanismem je exprese proteinu p14^{ARF} (u myši p19^{ARF}), jehož promotor je v normálních buňkách reprimován transkripčním faktorem TBX2. Vlivem DDR či nadprodukcí E2F klesá aktivita TBX2, což vede ke zvýšené produkci p14^{ARF}. p14^{ARF} brání vzniku komplexu p53-MDM2 a stabilizuje tak p53.

Expres p21^{waf1/cip1} hraje důležitou roli v iniciaci senescence⁴⁷, ale nemusí nutně přetrvávat po celou dobu senescentního fenotypu⁴⁸, proto je vhodným markerem senescence jen v kombinaci s dalšími senescentními markery.

1.1.3.2 Signální dráha p16^{INK4a}/pRB

Pokud je stres způsobující senescenci dočasný, může indukce p53 navodit klidový stav a opravu DNA a za předpokladu, že není aktivována dráha p16^{INK4a}/pRb, může dojít k inaktivaci p53 a buňce je dovoleno pokračovat v cyklu⁴⁹. Trvalý stres nebo přítomnost dalších signálů může aktivovat inhibitor Cdk – p16^{INK4a}, který přispívá k trvalému zastavení buněčného cyklu⁵⁰.

V lidských senescentních buňkách figuruje dráha p16^{INK4a}/pRb buď primárně skrze své vlastní signalizování nebo sekundárně ve spolupráci s dráhou p53/p21^{waf1/cip1}. Za normálních okolností se na promotor p16^{INK4a} váže onkogen BMI-1, patřící do Polycomb rodiny transkripčních faktorů, a reprimuje tak expresi p16^{INK4a}. Při detekci poškození DNA či přítomnosti stresu vyvolávajícího senescenci dochází k aktivaci lokusu INK4A/ARF a spuštění exprese p16^{INK4a}, který poté inhibuje komplex Cdk4-6/D. Protein pRb tak nemůže být fosforylován aktivovanými Cdk a dochází k zástavě buněčného cyklu.

1.2 *Buněčná senescence in vivo*

1.2.1 *Fyziologie buněčné senescence*

Zatímco kontribuce senescentních buněk k nádorové transformaci je již poměrně dlouho studována, jejich význam v běžné fyziologii a nenádorových patologiích je záležitostí spíše novějších studií.

Klíčovou úlohu ve fyziologických procesech má především SASP, skrze který mohou senescentní buňky velmi výrazně ovlivňovat mikroprostředí i buňky v jejich okolí. V závislosti na kontextu mohou některé ze sekretovaných látek přispívat k zástavě cyklu a zabraňovat tak potenciálně maligní transformaci⁵¹, jiné mohou být zdrojem chronického zánětu¹⁷ či tumorigeneze⁵².

Poměrně dobře je popsána úloha senescentních buněk v hojení ran v reakci na fyzické poranění či jakékoli jiné poškození, včetně infekce. Pro vznik nové tkáně v místě poranění je klíčová fibróza, čili tvorba extracelulární matrix (ECM) fibroblasty, která udržuje tkáňovou integritu po dobu hojení poškození. Vliv senescentních buněk na tento proces byl studován například na fibrotických játrech laboratorních myší⁵³, kde v reakci na smrt hepatocytů dochází k množení jaterních hvězdčovitých buněk (HSCs – z angl. *hepatocyte stellate cells*), které poté vytvářejí ECM. V místě poškození jater dochází k akumulaci senescentních buněk, z nichž většina pochází z aktivovaných HSCs, které zastavením svého buněčného cyklu a snížením exprese genů kódujících komponenty ECM, tvorbu ECM limitují a zabraňují tak následnému chronickému poškození jater. Tuto funkci podporuje také zjištění, že vyřazení některých regulátorů senescence z funkce mělo za následek pokles počtu senescentních buněk a expanzi fibrotické tkáně. Senescentní HSCs exprimují na svém povrchu také ligand pro receptor NK buněk a podporují tak vlastní odstranění z tkáně nespecifickým imunitním systémem. Zvýšenou expresí matrixových metaloproteináz by senescentní buňky také mohly přispívat k odstranění fibrilárních proteinů, nicméně přímé důkazy pro toto zatím chybí.

V kůži se senescentní fibroblasty podílejí na rychlejším uzavření tkáně sekrecí růstového faktoru AA, který indukuje diferenciaci myofibroblastů⁵⁴. Byla prokázána také důležitá úloha senescentních buněk v embryonálním vývoji. Příkladem může být jejich podíl na udržení rovnováhy jednotlivých buněčných populací v průběhu vývoje endolymfatického váčku vnitřního ucha⁵⁵. Porucha v signalizaci buněčné senescence tak může vyústit v závažné vývojové defekty⁷.

1.2.2 *Patofyziologie buněčné senescence*

Buněčná senescence byla vždy pokládána primárně za účinnou protinádorovou bariéru, což dokazuje například nález senescentních buněk v preiniciálních (benigních) stádiích nádorů, kde v reakci na nadměrné mitogenní signály aktivují buňky dráhu DDR a přecházejí do senescence či apoptózy, aby tak zabránily karcinogenezi⁵⁶.

Jak bylo uvedeno výše, senescence však může mít také negativní účinky. Bylo prokázáno, že ve stárnoucích tkáních dochází k akumulaci senescentních buněk, které zde prostřednictvím svého sekrečního fenotypu mohou působit chronický zánět a přispívat tak k rozvoji řady patologií. Jiné studie ukázaly, že senescentní fibroblasty mohou v kultuře stimulovat proliferaci premaligních epiteliálních buněk či jejich nádorovou transformaci *in vitro* a urychlovat růst nádorů *in vivo* ⁵⁷. Zdá se, že pro senescenci tedy platí teorie tzv. antagonistické pleiotropie, která předpokládá, že geny, které jsou v mladém organismu selektovány a zdatnost jedince zvyšují, mohou mít ve stáří na organismus naopak škodlivý vliv ⁵².

1.2.2.1 Buněčná senescence a zánět, zánět a nemoci

Jak již bylo uvedeno, látky, které senescentní buňky produkují, mohou přispívat nejen ke správnému průběhu fyziologických procesů, jako je hojení ran, ale také ke tkáňové dysfunkci a rozvoji mnoha patologií. Například proteázy, které jsou běžnou součástí SASP, mohou narušovat tkáňovou strukturu štěpením membránových receptorů, proteinů extracelulární matrix či jiných komponent tkáňového prostředí. IL-6 či IL-8 zase mohou v některých epitelech vyvoláním EMT stimulovat tkáňovou fibrózu ⁵⁸.

Důležitou roli v obraně organismu před infekcí hraje zánět. Akutní zánětlivá odpověď způsobuje masivní lokální poškození prostřednictvím ROS či RNS a je navržena tak, aby působila pouze dočasně. Působí-li ve tkáni trvale, může ji naopak poškozovat. Tkáňové prostředí je také klíčovým faktorem ovlivňujícím rakovinné bujení. Tkáně obsahující buňky sekretující zánětlivé látky toto bujení podporují a chovají se jako neustále poškozené.

V případě trvalého poškození DNA začnou senescentní buňky produkovat cytokiny, které mohou imunitní systém aktivovat a stimulovat tak své odstranění z tkáně ²³. Cytokiny, zejména prozánětlivý TNF α , zásadním způsobem ovlivňují také charakter a dobu trvání zánětlivé reakce. Nejprodukovanejšími cytokiny jsou IL-6 a IL-8, které mohou zástavu proliferace posilovat skrze své pozitivní zpětné působení, mezi další prozánětlivé cytokiny produkované senescentními buňkami patří například IL-1, IL-10, GRO α či INF γ .

1.2.2.2 Úloha buněčné senescence ve stárnutí a chorobách spojených se stárnutím

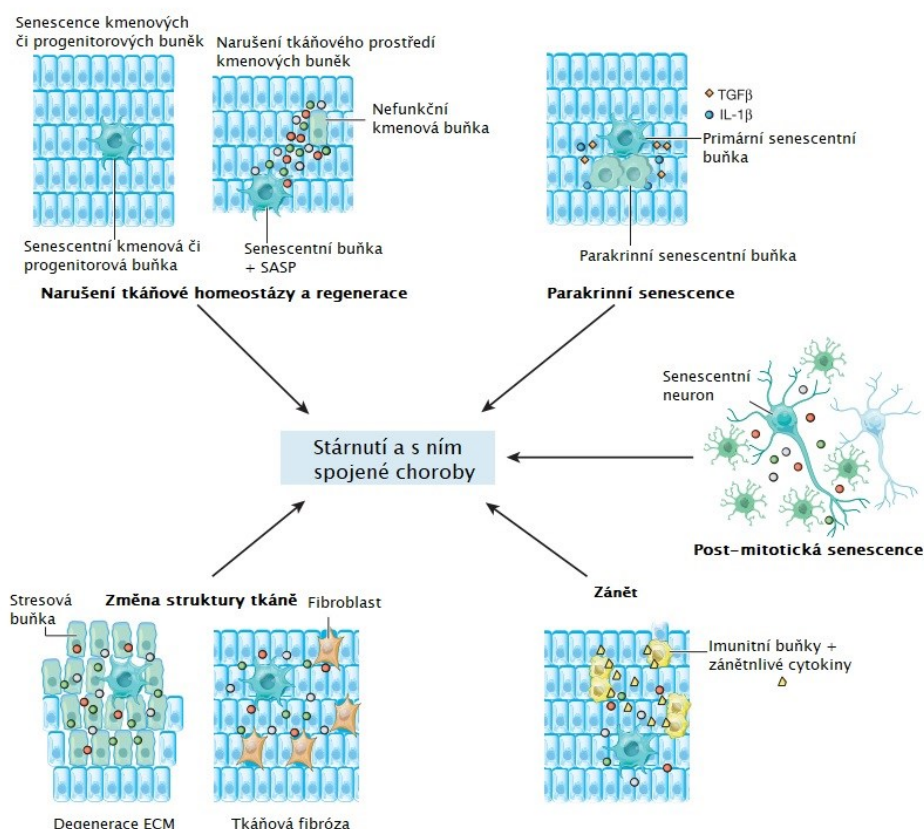
S postupujícím věkem dochází ve tkáních hlodavců, primátů včetně lidí k akumulaci senescentních buněk pravděpodobně díky snížené funkci stárnoucího imunitního systému. Jejich zvýšené množství bylo prokázáno ve tkáních postižených některou z chorob spojených se stářím, jako je Alzheimerova choroba, osteoartritis, Parkinsonova choroba či rakovina, kde senescentní buňky přispívají ke zhoršené funkci tkáně a podporují rozvoj těchto chorob. Senescentní buňky se paradoxně podílejí na snížení regenerační funkce tkání, což naznačuje i vysoká náchylnost progenitorových buněk myšího progeroidního modelu k přechodu do senescence ⁵⁹. Produkci specifických látek mění charakter mikroprostředí a narušují tkáňovou homeostázu, což má negativní vliv také na funkci kmenových buněk.

Značné zlepšení regeneračního potenciálu bylo totiž prokázáno u starých kmenových buněk po vystavení mikroprostředí mladého organismu ⁶⁰.

Přestože bylo prokázáno, že počet senescentních buněk a jejich markerů v různých tkáních s přibývajícím věkem stoupá, korelace ještě nemusí nutně znamenat kauzalitu.

První přímý důkaz o příspěvku senescentních buněk k patologiím souvisejícím s věkem podaly studie na BubR1 progeroidním myším modelu. Odstranění senescentních buněk pozitivních na p16^{INK4a}, buď genetickou inaktivací p16^{INK4a} či cíleně indukovanou apoptózou, vedlo k prevenci jejich hromadění v některých tkáních a tím k zábraně vzniku tří hlavních fenotypů stárnutí – kataraktě, sarkopenii a ztrátě podkožního tuku, v případě likvidace již akumulovaných senescentních buněk pak ke zmírnění progresu již rozvinutých chorob kosterního svalstva či tukové tkáně doprovázejících stárnutí ^{61,62}. Tuto hypotézu podporují také výsledky studií využitím myšího modelu s hyperaktivním p53, kdy vlivem zvýšené aktivity nádorově supresorového proteinu p53 sice nedochází k rozvoji rakoviny, ale tyto myši vykazují známky předčasného stárnutí, jako je sarkopenie, osteoporóza, snížená schopnost hojení ran či snížená fertilita ⁶³.

Většina tkání disponuje poměrně stálým počtem buněk, a proto může akumulace senescentních buněk ohrozit obnovu tkáně.



Obrázek č. 5: Buněčná senescence přispívá ke stárnutí tkání, jejich poškození i k chorobám spojených se stárnutím mnoha různými mechanismy, včetně narušení funkce kmenových buněk, změny tkáňového mikroprostředí, parakrinní indukce senescence, stimulace sterilního zánětu tkáně atp. (upraveno ⁶⁴).

2 Buněčná senescence v CNS

Mozek je pravděpodobně jedna z vůbec nejsložitějších tkání komplexních organismů, řídící kognitivní funkce, osobnost i všechny životně důležité tělesné procesy. Pokles, či dokonce úplná ztráta těchto funkcí může mít fatální dopady. Stejně tak jako prakticky v každé jiné tkáni dochází v mozku s přibývajícím věkem k rozvoji nízkého stupně chronického sterilního zánětu ⁶⁵, který je pokládán za příčinu, či alespoň hlavního přispěvatele k většině ne-li ke všem patologiím projevujícím se s věkem. Tyto patologické změny stárnoucího mozku zahrnují významný pokles populace některých neuronů, dendritické a axonální arborizace, počtu dendritických trnů, postsynaptické hustoty, presynaptických markerů, synapsí či celkového kortikálního objemu. Takovéto změny jak na úrovni buněk tak i celé tkáně mohou mít negativní dopad na všechny výše zmíněné funkce mozku.

Důležitým zdrojem zánětu v mozku jsou gliové buňky, především aktivované mikroglie, které za normálních okolností sice poskytují neuronům metabolickou či strukturální podporu, nicméně s postupujícím věkem mohou chronickou tvorbou prozánětlivých látek (cytokinů, ROS, RNS atp.) negativně ovlivňovat okolní neurony.

Recentní studie z řady laboratoří navíc prokázaly přítomnost senescentních buněk v savčím mozku, kde mohou sekrecí jednotlivých složek SASPu výrazně přispívat k přerušování buněčných kontaktů potřebných pro funkci interakce neuronů a glií, která je esenciální pro udržení funkce a homeostázy mozku ⁶⁶, či mohou přispívat chronickým zánětem k neurodegenerativním onemocněním. V souvislosti s demyelinizací a axonálním poškozením pacientů s roztroušenou sklerózou byla *in vivo* objevena také dysfunkce telomer zkrácených působením ROS ⁶⁷.

Ačkoliv úlohou senescence v periferních tkáních se zabývá řada laboratoří, buněčná senescence CNS je zatím velmi málo prozkoumána.

2.1 *In vitro* senescence

2.1.1 *Senescence neuronů*

S postupujícím studiem mechanismů senescence vyvstala otázka, zda mohou typické senescentní změny (kromě zástavy buněčného cyklu) podstoupit také neproliferující terminálně diferenciované buňky.

Mezi tyto buňky patří také neurony, které jak v CNS tak v periférii s postupujícím věkem akumulují různé formy poškození DNA ⁶⁸. Za jejich vznik je zodpovědná především tvorba reaktivních forem kyslíku, která je díky vysoké metabolické aktivitě v mozku u neuronů poměrně vysoká. Tvorba ROS pak přispívá jak k nepatologickému stárnutí mozku, tak i k různým patologiím CNS, včetně chorob spojených se stářím.

Ačkoliv akumulace poškození DNA ve stárnoucích neuronech a dalších postmitotických buňkách je již poměrně dlouho známým fenoménem, první důkaz o přítomnosti senescentních markerů přineslo až studium Purkyňových buněk a kortikálních neuronů stárnoucích myší. Bylo prokázáno, že při poškození DNA spouští neurony prostřednictvím p21^{waf1/cip1} dráhu DDR, zvyšují produkci prozánětlivých látek (IL-6), vykazují známky akumulace heterochromatinových ložisek, přítomnosti oxidačního stresu, hromadění lipofuscinu a dochází v nich k akumulaci SA-β gal. Na okolnost, že je protein p21^{waf1/cip1} nezbytný pro navození senescentního fenotypu neuronů dráhou DDR, poukazuje i to, že u myší s ablací genu kódujícího p21^{waf1/cip1} byla exprese těchto senescentních markerů značně redukována⁶⁹.

Jak bylo uvedeno, k detekci senescentních buněk se využívá celá řada markerů, přičemž většina studií se opírá o přítomnost SA β-galaktosidázy. Její zvýšená hladina byla zaznamenána v mnoha oblastech stárnoucího hlodavčího mozku, včetně hippocampu (mimo gyrus dentatus)⁷⁰, kortexu a cerebella⁶⁹. Nutno však poznamenat, že SA β-gal není příliš vhodným markerem senescence *in vitro*. V buněčné kultuře je totiž detekovatelná zvýšená aktivita SA β-gal už u poměrně mladých neuronů, které ovšem nevykazují přítomnost žádných dalších markerů senescence. Nicméně v neuronech stárnoucích myší *in vivo* dochází k výrazné indukci její aktivity, což podporuje předchozí zjištění, že neurony v pokročilém věku přecházejí do fenotypu podobného senescenci⁷¹.

Dalším z možných problémů jednoznačného určení senescentního fenotypu je, že většina studií, které se senescencí neuronů zabývají, tento fenotyp často vyhodnocuje převážně na základě přítomnosti jednoho určitého markeru, což vzhledem k vysoké heterogenitě neuronů a možnou přítomností některých markerů i mimo senescentní fenotyp (viz výše – SA β-gal) nemusí být vhodné.

V neokortexu dospělých myší byla také prokázána zvýšená exprese iCDK – p15^{Ink4b}, p18^{Ink4c} (v dendritech); p16^{Ink4a} (v jádře); p27^{Kip1} (v jádře i cytoplasmě)⁷² a zvýšené množství s věkem akumulovaného lipofuscinu v některých jádrech mozku⁷³.

Senescence lidských neuronů byla studována především v kontextu patologií CNS, které často korelují se zvýšenou hladinou oxidačního stresu a chronického zánětu spojeného s věkem. Protein p16^{Ink4a} byl například na rozdíl od odpovídajících kontrol přítomný v pyramidálních neuronech pacientů s AD (z angl. *Alzheimer's disease*), zatímco přítomnost p21^{waf1/cip1} či p27^{Kip1} nebyla nalezena ani v jednom případě. Pyramidální neurony byly dále pozitivní na p15^{Ink4b}, p18^{Ink4c} a p19^{Ink4d}⁷⁴. Zvýšená hladina p16^{Ink4a} a GATA4 byla zaznamenána také v pyramidálních neuronech starších lidských mozků²⁸.

Některá data také naznačují, že k aktivaci dráhy p53-p21^{waf1/cip1} a následné expresi genů SASP může docházet například i při ztrátě funkce genu MECP2, který je mutován u žen s Rettovým syndromem⁷⁵.

Zda se v případě neuronů jedná skutečně o senescenci v pravém slova smyslu není prozatím jednoznačně prokázáno, nicméně existují studie, které ukazují, že i neurony mohou skrze signalizaci DDR spustit dráhu p21^{waf1/cip1} a následnou expresí senescentních markerů narušovat tkáňové mikroprostředí podobně jako buňky schopné dělení⁶⁹.

2.1.2 Neurální kmenové buňky

Neurální kmenové buňky jsou schopné produkce neuronů a gliových buněk, a proto jsou zcela esenciální pro udržení homeostázy CNS. Nacházejí se ve třech oblastech mozku – v subventrikulární zóně bočních komor, subgranulární zóně gyru dentatu hipokampu a v čichovém bulbu.

I dospělé neurální kmenové buňky (NSCs – z angl. *neural stem cells*) trpí s postupujícím věkem poklesem schopnosti proliferace a zvýšenou pravděpodobností zástavy buněčného cyklu ⁷⁶. To vede k postupné ztrátě neurogeneze a regeneračního potenciálu, která může do značné míry přispět ke stárnutí CNS a rozvoji některých neurodegenerativních onemocnění.

Ačkoli mechanismy zodpovědné za tento se stářím související pokles funkce NSCs zůstávají z velké části neobjasněné, jednou z možných příčin může být mimo jiné také s věkem narůstající hladina regulátorů senescence, jako je p16^{INK4a}, p21^{waf1/cip1} či p53 ⁷⁷.

K výzkumu mechanismů stárnutí kmenových buněk se využívá například účinků hydroxyurey (HU), která blokuje ribonukleotidreduktázu a tím i replikaci a opravu DNA, zvyšuje riziko vzniku DSBs v oblasti replikačních vidlic a buněčný i mitochondriální stres. Dočasné vystavení postnatálních NSCs jejím účinkům vedlo nejen k zastavení buněčného cyklu a rozvinutí senescentní morfologie, ale také ke zvýšené expresi genů spojených se senescencí, zvýšené hladině senescentních regulátorů (p16^{INK4a}, p21^{waf1/cip1}, p53) a dysfunkci opravných mechanismů DNA. Chronická akumulace poškození DNA spolu s poklesem schopnosti poškození opravit byla doprovázena zvýšenou hladinou intracelulárních ROS a sníženou apoptózou. V důsledku toho byla značně snížena proliferační a neurogení diferenciální kapacita NSCs ⁷⁸.

NSCs, zvláště ty přítomné v subgranulární zóně v gyru dentatu, jsou na poškození DNA způsobené okolním stresem citlivé. Jejich jednorázové vystavení radiaci vede například ke snížení produkce nových neuronů v hipokampu, což nabízí mimo jiné vysvětlení poklesu kognitivních funkcí u onkologických pacientů podstupujících radioterapii ⁷⁹. Neurogeneze v hipokampu má totiž zásadní roli v učení a paměti a narušení jejího průběhu se může podílet i na některých neurodegenerativních onemocněních.

S věkem spojený pokles proliferace progenitorových buněk v subventrikulární zóně a neurogeneze v čichovém bulbu myši koreluje se zvýšenou expresí p16^{INK4a}. U stárnoucích myši deficientních na p16^{INK4a} pak byl zjištěn prokazatelně nižší pokles těchto funkcí, což naznačuje negativní vliv p16^{INK4a} na funkci progenitorových buněk ⁷⁷.

Pro funkci kmenových buněk je důležitá také rovnováha mezi ROS a antioxidanty. Některé studie dokonce naznačují, že tvorba intercelulárních ROS, které aktivují celou řadu signálních drah, jejichž výsledkem může být další poškození DNA, senescence či apoptóza, je primárním faktorem způsobujícím stárnutí kmenových buněk ⁸⁰. V této souvislosti bylo také prokázáno, že aplikace ginsenosidu Rg1, který inaktivuje volné radikály a zvyšuje účinky antioxidantních enzymů, podporuje

neurogenezi v gyrus dendatus, diferenciaci NSCs v neurony v hipokampu, a snížením exprese genů spojených se senescencí chrání NSCs před vstupem do senescence^{81,82}.

Další ze studií prokazující přítomnost senescentního fenotypu NSCs je práce zabývající se vlivem proteinu MECP2, který funguje jako chromatinový remodelátor a jehož gen bývá u pacientů s Rettovým syndromem až v 90% mutován. Snížená exprese tohoto genu má za následek redukci proliferační kapacity, zvýšení počtu senescentních NSCs a akumulaci ložisek neopravené DNA⁸³.

2.1.3 Gliové buňky

2.1.3.1 Oligodendrocyty

Oligodendrocyty jsou terminálně diferenciované buňky s malým tělem a velkým počtem malých výběžků a jejich hlavní funkcí je tvorba myelinové pochvy okolo axonů neuronů v CNS. To, že by mohly tyto k oxidačnímu stresu citlivé⁸⁴ buňky vstoupit do senescence, naznačuje fakt, že ve stárnoucích lidských mozcích byla u těchto buněk zaznamenána zvýšená hladina SA β -gal a akumulace oxidačního poškození DNA⁸⁵. Senescence oligodendrocytů by mohla být také důvodem vzniku lézí v bílé hmotě, které jsou charakteristické demyelinizací neuronů a objevují se s přibývajícím věkem, či u některých neurodegenerativních onemocnění včetně Alzheimerovy choroby^{86,87}.

Přestože přesvědčivé důkazy o senescenci oligodendrocytů zatím chybí, podařil se tento fenotyp prokázat u progenitorových buněk oligodendrocytů (OPCs – z angl. *oligodendrocyte progenitor cells*). OPCs jako prekurzory oligodendrocytů hrají důležitou roli v procesu remyelinizace. Senescence OPCs, charakteristická zástavou buněčného cyklu s protáhlou morfológií a zvýšenou hladinou SA β -gal, může být vyvolána například přenesením buněk do média s vysokou koncentrací séra. Kultivace OPCs v séru způsobuje zvýšenou expresi genu *Ecr4* (z angl. *esophageal cancer related gene 4*), který je v mnoha nádorech nefunkční a který skrze redukci cyklinů D1 a D3 a defosforylaci pRb navozuje senescentní fenotyp. Zajímavé bylo zjištění, že exprese *Ecr4* i SA β -gal se s věkem zvyšuje jak u OPCs, tak u NSCs a jeho zvýšená hladina byla zaznamenána i v neuronech⁸⁸.

2.1.3.2 Astrocyty

Astrocyty jsou nejpočetnějším buněčným typem mozku. Mají důležitou roli v udržování normální fyziologie mozku, ochraně neuronů před oxidačním poškozením a skrze sekreci modulačních látek (ATP, růstové faktory, glutamát, cytokiny atp.). Poskytují neuronům metabolickou podporu, udržují homeostázu mozku a hematoencefalickou bariéru a jsou zodpovědné za odstraňování extracelulárního glutamátu. Disponují také přítomností PRR (z angl. *pattern-recognizing receptors*) a schopností sekrece chemokinů a cytokinů, což napovídá o jejich úloze v imunitní ochraně mozku.

S postupujícím věkem kumulují astrocyty mnoho změn, které přispívají ke snížení jejich správné funkce, což může mít nepříznivý vliv na stárnoucí mozek. Schopnost astrocytů vstoupit do senescence

naznačila například studie na *in vitro* modelu stárnoucích astrocytů potkana⁸⁹, kde byla zjištěna zvýšená hladina SA β -gal, snížená mitochondriální aktivita a také silná produkce ROS.

Indukovat senescenci a SASP u kultivovaných hlodavčích astrocytů lze aplikací mnoha látek. Například aplikace toxického TCDD dioxinu spouští senescenci skrze WNT/ β -kateninovou signální dráhu vedoucí ke zvýšené produkci ROS. Přítomny jsou charakteristické známky senescence – zvýšená hladina SA β -gal, p16^{Ink4a} a p21^{waf1/cip1}⁹⁰. Dalším příkladem může být odpověď na stres vyvolaná H₂O₂ či laktacystinem, kdy kultury astrocytů přecházejí do klasického senescentního fenotypu s typicky roztaženou morfologií, zástavou buněčného cyklu, akumulací SA β -gal a zvýšenou expresí p16^{Ink4a}, p21^{waf1/cip1} a p53⁹¹. Podobných výsledků lze dosáhnout také působením amoniaku⁹² či oxidantu paraquatu⁹³.

Senescence astrocytů vyvolaná oxidačním stresem způsobuje v lidských astrocytech změnu regulace transkripce některých genů. Bylo zjištěno, že zatímco u genů spojených s vývojem a diferenciací nervového systému či buněčného cyklu byla regulace snížena, u genů spojených se zánětem tomu bylo naopak⁹⁴. Zajímavé je také to, že senescentní astrocyty snižují regulaci mimo jiné i genů důležitých pro jejich aktivaci. Astrocyty se aktivují v reakci na různé patologické činitele nebo v průběhu neurodegenerativních onemocnění, což vyvolává otázku, zda by cílená indukce senescence v těchto buňkách mohla této aktivaci, přispívající k patologii těchto onemocnění, zabránit.

Zvýšené množství astrocytů pozitivních na p16^{Ink4a}, matrix metalloproteinázu 1 (MMP1) a sekreci IL-6 vyvolanou aktivací dráhy p38MAPK bylo zaznamenáno také v mozkové tkáni starších lidí či pacientů s AD⁹⁵, což svědčí o akumulaci senescentních buněk v CNS se zvyšujícím se věkem a naznačuje jejich možnou úlohu u neurodegenerativních onemocnění člověka.

2.1.3.3 Ependymové buňky

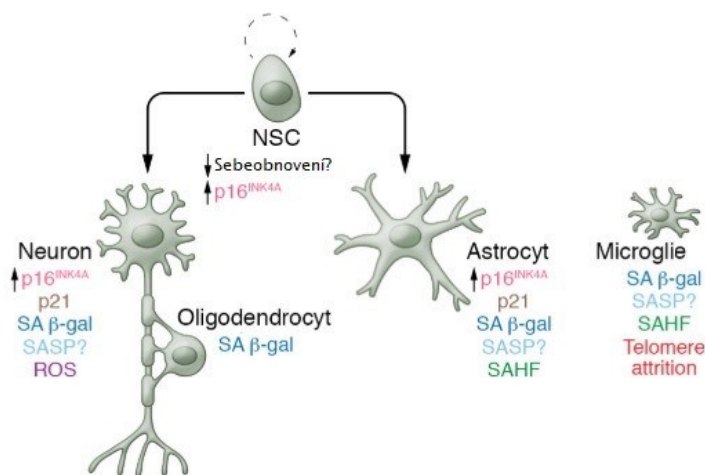
Ependymové buňky tvoří vnitřní povrch mozkových komor a centrálního míšního kanálu. S postupujícím věkem vykazují mnoho změn včetně zploštělé a protažené morfologie, vytvářejí výrůstky paralelní se stěnou komory v několika vrstvách, které upevňují spoje mezi buňkami. Cytoplazma ependymových buněk starých myší obsahovala vyšší počet intermediálních filament, lipidových kapének či denzních tělísek⁹⁶. O senescenci ependymových buněk však nejsou zatím žádné důkazy.

2.1.3.4 Mikroglie

Mikroglie jsou malé buňky mesenchymálního původu se stěžejní funkcí v imunitní odpovědi CNS na patogeny či poranění. V přítomnosti odpovídajícího stimulu se buňky mikroglie aktivují a sekretují cytokiny, prostaglandiny, růstové faktory, produkují ROS a stimulují fagocytózu. Ačkoliv v mládí fungují neuroprotektivně, ve starém organismu mohou svou chronickou aktivací působit neurotoxicky nebo se podílet na patologii neurodegenerativních onemocnění.

Přechod mikroglíí do senescentního fenotypu by mohl být jedním z vysvětlení, proč staré mikroglie kumulují mnohé morfologické i funkční změny, včetně zvýšené sekrece některých zánětlivých

látek, a neschopnosti řádně odpovídat na přicházející stimuly. Mikroglie kultivované po izolaci ze starších myší vykazují v porovnání s kontrolami zvýšenou expresi IL-6, IL-1 β , a TNF- α ⁹⁷, charakteristickou pro senescenci. Opakovaná aktivace mikroglie vyvolaná působením lipopolysacharidu (LPS) *in vitro* vede k zastavení buněčného cyklu, přítomnosti SAHFů a zvýšené expresi SA β -gal a p53 ⁹⁸. Přítomnost senescentních mikroglíí by mohla přispívat k rozvoji chronického zánětu v mozku spojeného se stárnutím. Mikroglie jsou během života aktivovány mnohokrát, se zvyšujícím věkem proto přibývá počet buněk, které vstoupí do senescence a produkcí komponent SASP přispívají ke změně tkáňového prostředí a tím k rozvoji patologických změn.

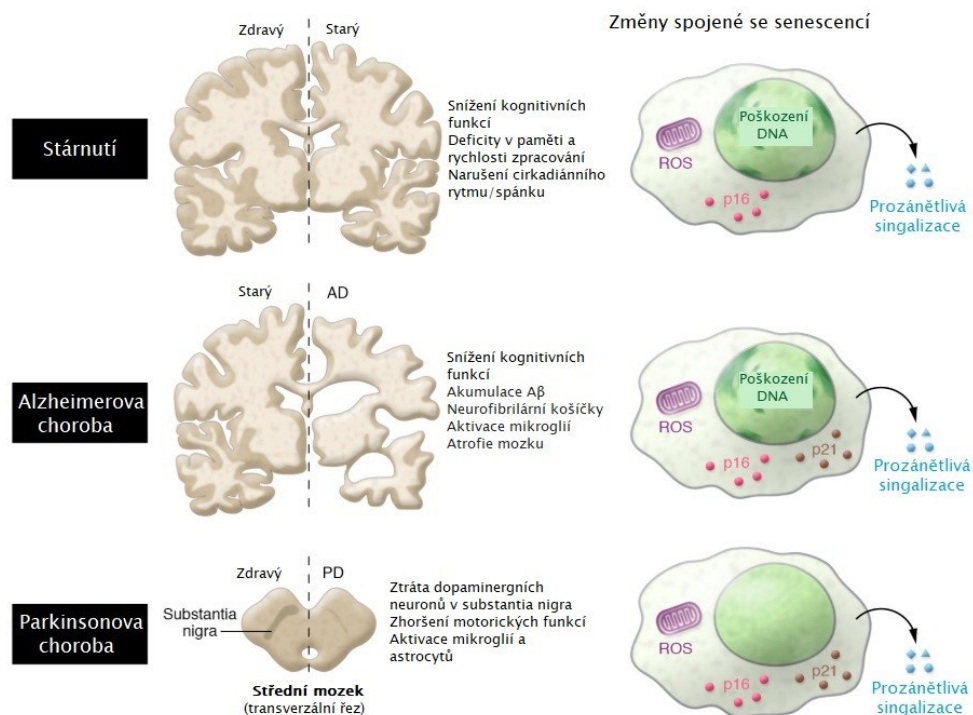


Obrázek č. 7: Přítomnost některých senescentních markerů u různých buněčných typů CNS ve stárnoucí mozkové tkáni či při patologiích (upraveno ⁸).

2.2 Buněčná senescence *in vivo*

2.3 Vztah buněčné senescence k neurodegenerativním chorobám

Ačkoli je úloze senescence v patologických stavech spojených se stářím v dnešní době věnováno poměrně velké úsilí, význam senescence v patologii neurodegenerativních onemocnění je zatím nejasný. Věk je primárním rizikovým faktorem rozvoje neurodegenerativních nemocí CNS, včetně Alzheimerovy choroby, frontotemporální demence (FTD) či Parkinsonovy choroby (PD), pro které je charakteristická především dysfunkce či smrt neuronů. V reakci na neuronální poškození dochází k aktivaci gliových buněk, které poté v mozku vytvářejí zánětlivé prostředí. K tomuto zánětu mohou sekrecí zánětlivých látek přispívat i senescentní buňky, jejichž akumulace a následný příspěvek k patologii byl prokázán ve stárnoucích periferních tkáních mnoha organismů. Vzhledem k rychlému nárůstu rizikových věkových skupin by mohl výzkum úlohy senescentních buněk v neurodegenerativních onemocněních přinést zcela nový pohled na jejich léčbu.



Obrázek č. 8: Přítomnost markerů senescence v tkáni normálně stárnoucího mozku a mozku postiženého Alzheimerovou či Parkinsonovou chorobou (upraveno⁸).

2.3.1 Nejčastější neurodegenerativní onemocnění spojená se senescencí

2.3.1.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je, jak bylo uvedeno, vůbec nejrozšířenějším chronickým, progresivním onemocněním CNS u lidí a nejčastější příčinou demence lidí středního a vyššího věku. Je charakteristická patologickou hyperfosforylací τ -proteinu, který v neuronech vytváří tzv. neurofibrilární košičky, a ukládáním amyloidu β ($A\beta$), který v neuropilu tvoří tzv. Alzheimerovské plaky, v jejichž oblasti dochází k neurodegeneraci a odumírání neuronů, tvorbě gliového lemu a sterilnímu zánětu.

Ve snaze odstranit špatně složené proteiny, jako je $A\beta$, dochází k aktivaci gliových buněk, zejména mikroglie, které poté začnou produkovat spektrum prozánětlivých látek včetně cytokinů, chemokinů, molekul komplementu či růstových faktorů. Tato aktivace se stává chronickou a zánět spolu s agregáty $A\beta$ a zvýšeným množstvím ROS a RNS a dalších sekretovaných toxických látek může způsobit pokles funkce neuronů či dokonce jejich odumření.

$A\beta$ zvyšuje v kulturách astrocytů izolovaných z AD pacientů aktivitu SA β -gal, expresi $p16^{INK4A}$, sekreci MMP1 a IL-6 (prostřednictvím aktivace dráhy p38MAPK)⁹⁵ a zvyšuje i počet SA β -gal pozitivních buněk. Mozky pacientů s AD vykazují také vyšší množství astrocytů kumulujících poškození DNA, což lze považovat za další z možných markerů senescentních buněk⁹⁹.

Takto postižená mozková tkáň obsahuje také vysoké množství mikroglie, které v přítomnosti $A\beta$ přecházejí do senescence, charakteristické zvýšenou přítomností SA β -gal, sekrecí IL-1 β , TNF- α

a MMP-2. Senescentní mikroglie tak mohou chronickou tvorbou zánětlivých látek výrazně přispívat k výraznému poškození neuronů.

2.3.1.2 Parkinsonova choroba

Parkinsonova choroba je druhým nejčastějším neurodegenerativním onemocněním CNS. Je charakteristická degenerativním zánikem neuronů *pars compacta substantiae nigrae*, ale i dalších jader mozkového kmene, kortexu a periferních ganglií a přítomností ložisek špatně sbaleného presynaptického proteinu α -synukleinu v cytoplazmě neuronů, tzv. Lewyho tělísek, což vede k postupné ztrátě funkce neuronů a následnému poklesu motorických funkcí.

Vliv vnějšího prostředí způsobený některými toxiny či genetické predispozice k rozvoji PD hrají roli pouze u minimálního počtu pacientů s PD, za nejrizikovější faktor je považován věk. Proč u některých lidí nemoc propukne a u jiných nikoliv, není prozatím známo.

Jednou z možných příčin úbytku neuronů v *substantia nigra*, středně frontálním kortexu a hipokampu pacientů s PD by kromě ztráty jejich funkce patologickým hromaděním špatně sbalených proteinů mohla být i aktivace některých proteinů buněčného cyklu, jako je fosforylovaný pRb, která může následnou změnou lokalizace transkriptů genů buněčného cyklu způsobovat smrt neuronů v těchto oblastech¹⁰⁰.

Společným znakem pacientů s PD i myších modelů PD je mimo jiné s věkem spojená akumulace aktivovaných mikroglíí a astrocytů. Existuje několik studií, které se zabývají příspěvkem těchto buněk vykazujících známky senescentního fenotypu k patologii Parkinsonovy choroby. V porovnání s kontrolními tkáněmi obsahují oblasti mozku postižené PD vyšší množství astrocytů se zvýšenou expresí p16^{INK4A} a některých komponent SASP, jako MMP3, IL-6, IL-1 α s IL-8⁹³. Akumulace aktivovaných mikroglíí a astrocytů by pak mohla vést ke zvýšené lokální koncentraci zánětlivých mediátorů a ROS a vytvářet tak chronický zánět schopný působit neurodegenerativní změny. To potvrzují také výsledky studie na potkaním modelu PD, kde zamezení mikroglíální aktivace vedlo k redukci Lewyho tělísek, prevenci degenerace dopaminergních neuronů a celkovému zlepšení progresu PD¹⁰¹.

V cerebrospinální tekutině (CSF – z angl. *cerebrospinal fluid*) pacientů s PD bylo zaznamenáno zvýšené množství některých komponent SASP, jako TGF- α , IL-1, IL-2, IL-4, a IL-6¹⁰². K tvorbě CSF dochází v mozkových komorách, a proto by přítomnost těchto látek mohla odrážet i jejich hladiny v mozkové tkáni. Cytokiny produkované v mozku mohou také volně procházet do krevního řečiště, což by odpovídalo nálezů značně vyšších hladin IL-2, IL-10, IL-4, IL-6, TNF α , and INF γ v sérech pacientů s PD¹⁰³. Ačkoliv byla v různých oblastech lidského mozku *in vivo* prokázána vyšší hladina těchto i některých dalších složek SASP, není jasné, zda se jedná skutečně o součásti SASP nebo pouze důsledek lokálních zánětů.

Zajímavé bylo také zjištění, že chronické vystavení některým toxinům může také způsobit PD. Oxidant paraquat využívaný jako herbicid v některých rozvojových zemích je silně spojen s rozvojem

PD, indukuje u astrocytů přechod do senescence, přičemž akumulace senescentních astrocytů byla doložena také v *substantia nigra* pacientů s PD⁹³.

2.3.1.3 Další neurodegenerativní onemocnění

Existuje také několik studií zabývajících se vlivem senescentních buněk na rozvoj i dalších neurodegenerativních onemocnění. Například *corpus callosum* myšního modelu roztroušené sklerózy, autoimunitního onemocnění bílé hmoty CNS, pro které je charakteristická ztráta myelinizace, obsahovalo oproti kontrolám vyšší množství gliových buněk pozitivních na SA β -gal a lipofuscin, což naznačuje vztah mezi počtem senescentních gliových buněk a demyelinizací a tedy i postupnou ztrátou některých funkcí CNS.

K vývoji různých patologických stavů obvykle spojených s předčasným stárnutím včetně poklesu neurologických funkcí (HAND – z angl. *HIV-associated neurocognitive disorders*) dochází také u pacientů s HIV. Bylo zjištěno, že podání některých vysoce aktivních antiretrovirotik při terapii HIV vyvolává u astrocytů senescenci. Sekreční fenotyp astrocytů poté v mozku nemocných s HIV vytváří chronický zánět, který by mohl být příčinou vzniku HANDu u těchto pacientů¹⁰⁴.

2.3.2 Vztah senescence k nádorovým onemocněním mozku

Incidence nádorových onemocnění lidí s věkem stoupá, a proto lze na karcinogenezi nahlížet jako na jedno z onemocnění spojených s pokročilým věkem. Transformace normální buňky v buňku nádorovou je podmíněna nejen deregulací proliferace, ale také vyřazením funkce některé z klíčových komponent senescence, jako p16^{INK4A} či p53, jejichž geny bývají u nádorů často mutované.

Senescence je vnímána jako důležitý mechanismus zamezení vzniku nádorového bujení, tedy jako primární bariéra bránící dělení buněk s poškozeným genomem. Současné studie však také ukazují, že přítomnost senescentních buněk v nádorových tkáních může zvyšovat prostřednictvím SASPu maligní potenciál nádorových buněk, či urychlit vznik nádoru jako takového¹⁷. Proto aby senescence skutečně působila jako protinádorová bariéra, by senescentní buňky měly být z tkání odstraňovány. Pokud k tomuto procesu nedochází, hromadění senescentních buněk a jejich vliv na tkáňové mikroprostředí může vést až ke vzniku nádoru¹⁰⁵. Nabízí se tak vysvětlení příčiny vyššího rizika rozvoje nádorů u imunodeficientních pacientů s HIV či starších lidí, kdy snížená funkce imunitního systému umožňuje hromadění senescentních buněk ve tkáních a rozvoj chronického zánětu, který je považován za jeden z hlavních endogenních příčin vzniku nádorových onemocnění¹⁰⁶.

2.3.2.1 Glioblastoma multiforme

Primárních nádorů CNS je celá řada. Existuje také mnoho různých typů lišících se především lokalizací, stupněm malignity či typem buněk, ze kterých nádor vznikl. Řada extrakraniálních solidních nádorů vytváří sekundární metastázy v mozku. Vůbec nejčastějším a nejmalignějším nádorem mozku je

astrocytom typu IV, nazývaný také glioblastoma multiforme (GBM). Je odvozen od astrocytů a nejčastěji bývá lokalizován v mozkových hemisférách. Bez léčby umírají pacienti s GBM zhruba do tří měsíců, s léčbou se jen zřídka dožívají déle než dva roky po stanovení diagnózy.

Základem agresivity GBM jsou glioblastomové kmenové buňky (GSCs – z angl. *glioblastoma stem cells*), které jsou samy o sobě schopné v myších vytvořit nádor a jsou vysoce rezistentní vůči radioterapii a chemoterapii používané v léčbě GBM. Nekmenové buňky nádoru (NGSCs – z angl. *non-stem glioma cells*) odvozené od GSCs sice nemají tumorigenní potenciál, nicméně u některých nádorů byla doložena jejich schopnost podstoupit epiteliálně mesenchymální přechod¹⁰⁷. Při kultivaci v séru podstupují NGSCs morfologické změny a po určité době přecházejí do senescence s charakteristickou přítomností SA β -gal a zvýšenou expresí p53 a p21^{waf1/cip1}. Gen pro p16^{INK4A} bývá u GBM často mutován, což vysvětluje, proč nejsou jeho hladiny detekovatelné a senescentní fenotyp je spuštěn signální drahou p53/p21. Akumulace senescentních NGSCs byla potvrzena i u většiny GBM *in vivo*, včetně zvýšené sekrece IL-6 a VEGF, což naznačuje úlohu senescentních NGSCs také v angiogenezi a vaskularizaci nádoru¹⁰⁸.

Vliv senescence na růst GBM byl rovněž prokázán. Zatímco implantace GBM146 linie GSCs samotných či v kombinaci s diferenciovanými NGSCs do myšího mozku vznik nádoru nezpůsobila, implantace GSCs spolu se senescentními NGSCs v polovině případů ano. V případě jiné linie GSCs (GBM157) implantace jich samotných či s diferenciovanými NGSCs ke vzniku tumoru sice stačila, nicméně v přítomnosti senescentních NGSCs docházelo k mnohonásobnému urychlení růstu nádoru¹⁰⁸.

Tkáň GBM obsahuje také zvýšenou expresi TGF- β 1 a hladinu adhezni molekuly L1CAM¹⁰⁹. L1CAM je transmembránový glykoprotein hrající zásadní roli v adhezi a migraci neurálních buněk v průběhu vývoje nervové soustavy, který může interagovat s vazebnými partnery téže membrány či membrány sousední buňky. Váže se buď homotypicky sám na sebe, nebo heterotypicky na jiné adhezni molekuly¹¹⁰. Jeho exprese bývá výrazně zvýšena i u mnoha jiných lidských nádorových onemocnění, kdy jeho přítomnost je spojena se špatnou prognózou a vysokou agresivitou nádoru. L1CAM může být proteolyticky štěpen gama-sekretázou či některými metalloproteinázami v oblasti plazmatické membrány a uvolňovat tak signální části své molekuly jak extracelulárně tak intracelulárně. Odštěpení ektodomény má za následek zvýšenou migraci buněk skrze autokrinní vazbu na integriny¹¹¹ a narušení vazeb E-kadherinů, čímž výrazně přispívá ke zvýšení buněčné mobility a rizika EMT¹¹². Odštěpení ektodomény je následováno také štěpením intracelulární části molekuly L1CAM a její translokací do jádra, kde spouští aktivaci NF- κ B¹¹³. Kontrola exprese L1CAM je komplexní a zahrnuje více signálních drah včetně TGF- β 1¹¹⁴. Některá chemoterapeutika indukují nejen buněčnou smrt buněk, ale také přechod buněk do senescence. Senescentní buňky ve tkáni pak sekrecí TGF- β 1 mohou přispívat ke zvýšené expresi L1CAM a zvýšenému riziku vzniku metastáz prostřednictvím indukce epiteliálně-mesenchymálního přechodu¹¹².

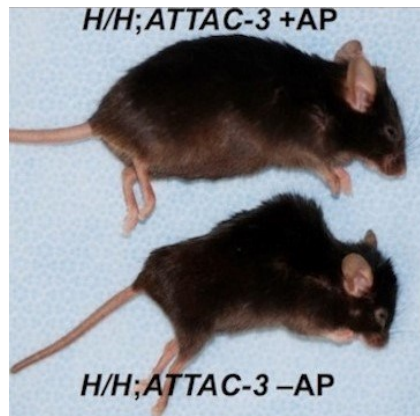
3 Senolytika

Hromadění senescentních buněk v různých tkáních s postupujícím věkem je již poměrně dlouho známou skutečností, nicméně s postupem času vystala také otázka jejich vlivu na stárnutí.

Přesvědčivé výsledky o příspěvku senescentních buněk k mechanismům stárnutí přinesla studie myšího transgenního modelu INK-ATTAC. U tohoto modelu mohou být senescentní buňky eliminovány pomocí látky AP20187, která způsobí apoptózu pouze buněk aktivujících gen $p16^{INK4A}$. V tukové tkáni, kosterním svalstvu či oční čočce vedlo odstranění senescentních buněk k opožděnému nástupu změn spojených s (u tohoto modelu s předčasným) stárnutím. Dokonce i léčba zahájená v pozdějším věku vedla ke zmírnění již nastalých symptomů. Přestože tato genetická metoda má dvě nevýhody, a to sice, že ne všechny buňky exprimující $p16^{INK4a}$ musí být senescentní, stejně jako ne všechny senescentní buňky musí exprimovat $p16^{INK4a}$, výsledky této studie naznačily úlohu senescentních buněk ve stárnutí organismu⁶¹. Podobné výsledky přinesla o pět let později také studie téže skupiny na přirozeném modelu stárnutí¹¹⁵. Odstranění senescentních buněk zmírnilo také postup patologie v mozku myšího modelu PD⁹³, přičemž podobných výsledků dosáhla i studie na myším modelu AD^{116,117}.

Zjištění, že eliminace senescentních buněk spolu s jejich sekrečním fenotypem přináší mnohé benefity v modulaci některých patologií spojených se stárnutím, vyvolalo hluboký zájem o vývoj látek s potenciálem eliminovat senescentní buňky, takzvaná senolytika. Jde o třídu malých molekul, peptidů či protilátek, které více či méně selektivně indukují smrt senescentních buněk. Ačkoli první práce představující některé z těchto látek vyšla teprve v březnu 2015, byla od té doby nalezena celá řada dalších senolytik.

Podstatou účinku prvních senolytik je restaurace apoptózy u senescentních buněk. Senescentní buňky jsou rezistentnější vůči apoptóze a to i přes aktivovanou odpověď na poškození DNA. Rezistence vůči apoptóze u senescentních buněk je způsobena zvýšenými hladinami některým antiapoptotických proteinů v důsledku aktivace několika antiapoptotických drah (SCAPs – z angl. *senescent-cell anti-apoptotic pathways*) zajišťujících přežití senescentních buněk. Senolytika tohoto typu se proto zaměřují na inhibici antiapoptotických proteinů nebo klíčových regulátorů těchto drah, jejímž výsledkem je indukce smrti buněk se senescentním, nikoli normálním fenotypem. Mezi tyto látky řadíme například inhibitor proteinu Bcl-XL, patřícího do Bcl-2 rodiny, Navitoclax (ABT-263) či fisetin, quercetin, či geldanamycin.



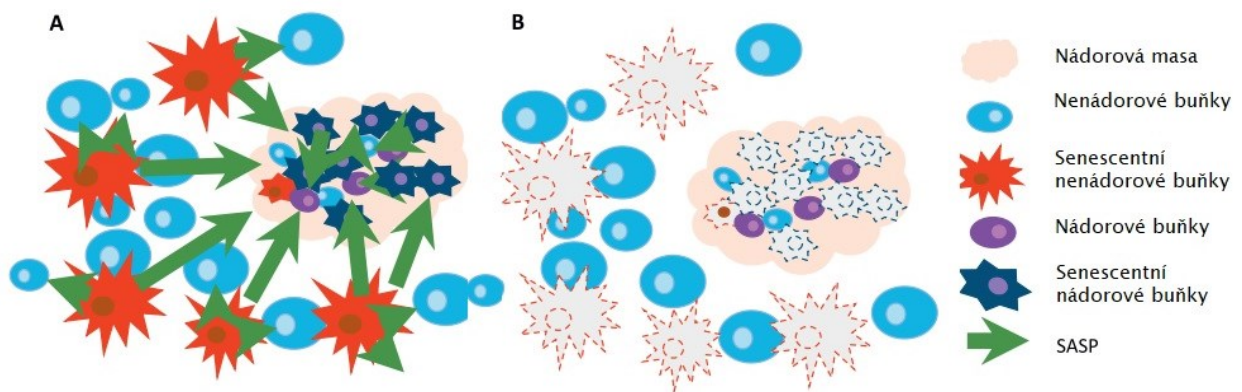
Obrázek č. 9: Dole transgenní myš před aplikací léčiva eliminujícího všechny $p16^{INK4a}$ pozitivní buňky, nahoře po něm. Na první pohled je zřetelné, že odstranění senescentních buněk vedlo k „omlazení myši“
61.

3.1 Terapeutické možnosti senolytik u nádorových chorob včetně nádorů v CNS

Rakovina je v současné době druhou nejčastější příčinou úmrtí člověka, a proto je nádorové biologii věnována velká pozornost už po několik desetiletí. Nejpoužívanějšími postupy v léčbě onkologických onemocnění je v současné době radioterapie a chemoterapie, které by skrze indukci poškození DNA měly preferenčně působit smrt nádorových buněk či alespoň jejich přechod buněk do senescence, která zastaví jejich další proliferaci. Bylo rovněž zjištěno, že velmi zřídka může buňka (týká se to zhruba jedné buňky z milionu) po ukončení terapie senescenci uniknout a založit tak novou populaci buněk nádoru. Bylo například prokázáno, že po vystavení letální dávce záření unikne malé procento buněk glioblastomu buněčné smrti a přejde do senescence, kterou jsou ovšem tyto buňky schopny překonat, pokračovat v růstu a vytvořit ještě agresivnější formu nádoru¹¹⁸. Léčba poškozující DNA a indukující senescenci může navodit senescenci také u somatických buněk obklopujících nádor, které svým SASP vytvářejí chronický zánět a vytváří tak prostředí vhodné pro epiteliálně mesenchymální přechod a zvýšenou proliferaci prekancerózních buněk¹¹⁹. Tyto léčebné postupy tedy růst nádoru inhibují, zvyšují však také riziko recidivy a následné zvýšené agresivity nádoru. Problém nastává u některých nádorů včetně těch v CNS, které jsou kvůli anatomickým omezením chirurgicky těžko odstranitelné a chemoterapie či radioterapie proto často bývají jedinou možností. Řešením by tudíž mohlo být bezprostřední odstranění senescentních buněk senolytiky, které by zabránilo úniku nádorových buněk ze senescence i škodlivým účinkům SASPu. Eliminace senescentních buněk vzhledem k jejich negativnímu působení na nádorové buňky se nabízí jako další podpůrná léčba genotoxických terapií.

Tento předpoklad potvrdila například studie na myším modelu nádoru léčeným některými z chemoterapeutických látek, které v nenádorových buňkách indukovaly senescenci a prokazatelně podporovaly vznik metastáz a růst aplikovaných nádorových buněk. Následná eliminace senescentních buněk senolytikem ABT263 snížila riziko recidivy, vzniku metastáz i některých nežádoucích účinků

spojených s účinky chemoterapie ¹²⁰. K léčbě glioblastomů se nejčastěji využívá chirurgická resekce nádoru následovaná frakcionovanou radioterapií kombinovanou s chemoterapií alkylační látkou temolozomidem, který však, jak bylo zjištěno, u nádorových buněk glioblastomu vyvolává přednostně senescenci namísto buněčné smrti ¹²¹. Vysoká frekvence senescentních buněk by tak mohla být vysvětlením závažné prognózy těchto pacientů. Pokud navíc i buňky glioblastomu umí po odstranění stimulu poškozujícího DNA ze senescence uniknout, akumulované změny v genomu mohou způsobit recidivu nádoru. Zda by tento přístup mohl přinést pozitivní výsledky v léčbě glioblastomů či dalších nádorových onemocnění, není prozatím jasné a je zde nutně zapotřebí dalšího studia.



Obrázek č. 10: Léčba radioterapií či chemoterapií indukuje vznik senescentních nádorových i nenádorových buněk, které sekrecí SASPu podporují růst nádoru a vznik metastáz (A), následná aplikace senolytik odstraňuje zdroje podpory růstu nádoru a potencionální recidivy (B) (upraveno ¹²²).

Závěr

Senescence se zdá být klíčovým mechanismem pro pochopení stárnutí či rozvoje některých patologických stavů, které se stářím úzce souvisejí. Předpokládá se, že díky snížené funkci stárnoucího imunitního systému dochází ve tkáních starého organismu k akumulaci senescentních buněk, které svým sekrečním fenotypem vytvářejí zánětlivé prostředí, které může výrazně přispět k rozvoji mnoha onemocnění.

Ačkoliv dnes existuje poměrně velký počet studií zabývajících se významem senescentních buněk ve stáří či v periferních tkáních, jejich funkce v neurodegenerativních onemocněních a stárnoucí CNS je nedostatečně prozkoumána. U jednotlivých buněčných typů CNS stárnoucí mozkové tkáně, či v mozkové tkáni postižené neuropatologií byla nalezena zvýšená akumulace některých senescentních markerů. U některých buněčných typů, jako například mikroglíí nebo astrocytů, byl senescentní fenotyp prokázán. Senescence těchto buněk výrazně moduluje jejich funkci, což má za následek také pokles mnoha mozkových funkcí, jejichž ztráta je typická i pro neurodegenerativní onemocnění. Zda jsou za tyto patologie senescentní buňky opravdu zodpovědné nebo pouze přispívají ke zhoršené prognóze, vyžaduje nutně další výzkum.

Buněčná senescence je považována za primární protinádorovou bariéru, bylo však prokázáno, že senescentní buňky sekrecí mnoha látek mohou také podporovat růst nádorů či vznik metastáz. Některá chemoterapeutika používaná k léčbě nádorů indukují nejen buněčnou smrt ale i senescenci jak v nádorových, tak v nenádorových buňkách. Terapií indukované senescentní buňky mohou následně prostřednictvím SASP podporovat růst nádoru nebo jeho invazivitu podporou epiteliálně-mesenchymální přechodu.

Nadějí nejen pro nádorová, ale i neurodegenerativní či další s věkem spojená onemocnění by pak mohla být léčba senolytickými látkami, které by eliminovaly senescentní buňky z tkání a snížily tak jejich příspěvek v patogeneze těchto závažných onemocnění.

Reference

1. Flatt, T. A New Definition of Aging? *Front. Genet.* **3**, 1–2 (2012).
2. Rodgers, J. T. & Thomas A Rando. Sprouting a new take on stem cell aging. *EMBO J.* **31**, 4103–4105 (2012).
3. Demidenko, Z. N. & Blagosklonny, M. V. Growth stimulation leads to cellular senescence when the cell cycle is blocked. *Cell Cycle* **7**, 3355–3361 (2008).
4. Campisi, J. The biology of replicative senescence. *Eur. J. Cancer Part A* **33**, 703–709 (1997).
5. Dimri, G. P., Hara, E. & Campisi, J. Regulation of two E2F-related genes in presenescent and senescent human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **269**, 16180–16186 (1994).
6. Hayflick, L. & Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **25**, 585–621 (1961).
7. Storer, M. *et al.* Senescence Is a Developmental Mechanism that Contributes to Embryonic Growth and Patterning. *Cell* **155**, 1119–1130 (2013).
8. Baker, D. J. & Petersen, R. C. Cellular senescence in brain aging and neurodegenerative diseases: Evidence and perspectives. *J. Clin. Invest.* **128**, 1208–1216 (2018).
9. Wagner, M. *et al.* Replicative senescence of human endothelial cells in vitro involves G1 arrest, polyploidization and senescence-associated apoptosis. *Exp. Gerontol.* **36**, 1327–1347 (2001).
10. Denoyelle, C. *et al.* Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nat. Cell Biol.* **8**, 1053–1063 (2006).
11. Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y. & Erusalimsky, J. D. Senescence-associated β -galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J. Cell Sci.* **113**, 3613–3622 (2000).
12. Adams, P. D. *et al.* Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence. *J. Cell Biol.* **202**, 129–143 (2013).
13. Brunk, U. T. & Terman, A. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: Accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur. J. Biochem.* **269**, 1996–2002 (2002).
14. Janderová-Rossmeislová, L. *et al.* PML protein association with specific nucleolar structures differs in normal, tumor and senescent human cells. *J. Struct. Biol.* **159**, 56–70 (2007).
15. Lallemand-Breitenbach, V. & Thé, H. De. PML Nuclear Bodies. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* (2010). doi:10.1101/cshperspect.a000661
16. Reaper, P. M. *et al.* A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. **426**, (2003).
17. Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y. & Mun, D. P. Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. **6**,

- (2008).
18. Acosta, J. C. *et al.* A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. **15**, (2013).
 19. Coppe, J. P., Kauser, K., Campisi, J. & Beauséjour, C. M. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J. Biol. Chem.* **281**, 29568–29574 (2006).
 20. Ansieau, S. *et al.* Induction of EMT by Twist Proteins as a Collateral Effect of Tumor-Promoting Inactivation of Premature Senescence. *Cancer Cell* **14**, 79–89 (2008).
 21. Freund, A., Patil, C. K. & Campisi, J. P38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J.* **30**, 1536–1548 (2011).
 22. Herranz, N. *et al.* mTOR regulates MAPKAPK2 translation to control the senescence-associated secretory phenotype. *Nat. Cell Biol.* **17**, 1205–1217 (2015).
 23. Rodier, F. *et al.* Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat. Publ. Gr.* **11**, 973–979 (2009).
 24. Yang, H., Wang, H., Ren, J., Chen, Q. & Chen, Z. J. cGAS is essential for cellular senescence. (2017). doi:10.1073/pnas.1705499114
 25. Chien, Y. *et al.* Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- κ B promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev.* **25**, 2125–2136 (2011).
 26. Kuilman, T. *et al.* Oncogene-Induced Senescence Relayed by an Interleukin-Dependent Inflammatory Network. *Cell* **133**, 1019–1031 (2008).
 27. Scott, G. K. *et al.* MicroRNAs miR - 146a / b negatively modulate the senescence - associated inflammatory mediators IL - 6 and IL - 8. **1**, 402–411 (2009).
 28. Kang, C. *et al.* The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. **349**, 1–26 (2016).
 29. Campisi, J. *et al.* Tumor Suppressor and Aging Biomarker p16 INK4a Induces Cellular Senescence without the Associated Inflammatory Secretory Phenotype . *J. Biol. Chem.* **286**, 36396–36403 (2011).
 30. Lujambio, A. To clear , or not to clear (senescent cells)? That is the question. (2016). doi:10.1002/icl3.1046
 31. Ahmad, T. *et al.* Shelterin Telomere Protection Protein 1 Reduction Causes Telomere Attrition and Cellular Senescence via Sirtuin 1 Deacetylase in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **56**, 38–49 (2017).
 32. Richter, T. & Zglinicki, T. Von. A continuous correlation between oxidative stress and telomere shortening in fibroblasts. *Exp. Gerontol.* **42**, 1039–1042 (2007).
 33. Serrano, M., Lin, A. W., Mccurrach, M. E. & Beach, D. Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**, 593–602 (1997).
 34. Serrano, M. *et al.* Role of the INK4a Locus in Tumor Suppression and Cell Mortality. *Cell* **85**,

- 27–37 (1996).
35. Kilbey, A., Terry, A., Cameron, E. R. & Neil, J. C. Oncogene-induced senescence: an essential role for Runx. *Cell Cycle* **7**, 2333–2340 (2008).
 36. Duan, J., Duan, J., Zhang, Z. & Tong, T. Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H₂O₂ involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 1407–1420 (2005).
 37. Schwarze, S. R., Fu, V. X., Desotelle, J. A., Kenowski, M. L. & Jarrard, D. F. The Identification of Senescence-Specific Genes during the Induction of Senescence in Prostate Cancer Cells. *Neoplasia* **7**, 816–823 (2005).
 38. Gewirtz, D. A., Holt, S. E. & Elmore, L. W. Accelerated senescence : An emerging role in tumor cell response to chemotherapy and radiation. *Biochem. Pharmacol.* **76**, 947–957 (2008).
 39. Wang, X. *et al.* Evidence of Cisplatin-induced Senescent-like Growth Arrest in Nasopharyngeal Carcinoma Cells. *Cancer Res.* **58**, 5019–5022 (1998).
 40. Blazkova, H., Krejcikova, K., Moudry, P., Frisan, T. & Hodny, Z. Bacterial intoxication evokes cellular senescence with persistent DNA damage and cytokine signalling. *J. Cell. Mol. Med.* **14**, 357–367 (2010).
 41. Novakova, Z. *et al.* Cytokine expression and signaling in drug-induced cellular senescence. *Oncogene* **6**, 1–12 (2009).
 42. Collado, M. & Serrano, M. The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 472–477 (2006).
 43. Resnitzky, D. & Reed, S. I. Different roles for cyclins D1 and E in regulation of the G1-to-S transition. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 3463–3469 (2015).
 44. Hatina, J. & Reischig, J. Molekulární biologie buněčné imortalizace a její vztah ke karcinogenezi. *Klinická onkologie* **9** (2001).
 45. Cerqueira, A., Cuadrado, M. & Barbacid, M. Overall Cdk activity modulates the DNA damage response in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **187**, (2009).
 46. Herranz, N. & Gil, J. Mechanisms and functions of cellular senescence. *J. Clin. Invest.* **128**, (2018).
 47. El-deiry, W. S. *et al.* WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**, 817–825 (1993).
 48. Phelps, D. *et al.* Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 13742–13747 (2002).
 49. Beauséjour, C. M. *et al.* Reversal of human cellular senescence: Roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.* **22**, 4212–4222 (2003).
 50. Arrett, J. C. A. R. L. B. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 13742–13747 (1996).

51. Acosta, J. C. *et al.* Chemokine Signaling via the CXCR2 Receptor Reinforces Senescence. *Cell* **133**, 1006–1018 (2008).
52. Cha, R. S., Thilly, W. G. & Zarbl, H. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 3749–3753 (1994).
53. Krizhanovsky, V. *et al.* Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis. 657–667 (2008). doi:10.1016/j.cell.2008.06.049
54. Demaria, M. *et al.* An Essential Role for Senescent Cells in Optimal Wound Healing through Secretion of PDGF-AA. *Dev. Cell* **31**, 722–733 (2014).
55. Can, M. *et al.* Programmed Cell Senescence during Mammalian Embryonic Development. (2011). doi:10.1016/j.cell.2013.10.019
56. Tort, F. *et al.* DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* **434**, 864–70 (2005).
57. Capparelli, C. *et al.* Autophagy and senescence in cancer-associated fibroblasts metabolically supports tumor growth and metastasis, via glycolysis and ketone production. *Cell Cycle* **11**, 2285–2302 (2012).
58. Parrinello, S., Coppe, J., Krtolica, A. & Campisi, J. Stromal-epithelial interactions in aging and cancer : senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. (2005). doi:10.1242/jcs.01635
59. Baker, D. J., Weaver, R. L. & Deursen, J. M. Van. p21 Both Attenuates and Drives Senescence and Aging in BubR1 Progeroid Mice. *Cell Rep.* **3**, 1164–1174 (2013).
60. Wagers, A. J. *et al.* Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* **433**, 760–764 (2005).
61. Baker, D. J. *et al.* Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* **479**, 232–236 (2011).
62. Baker, D. J. *et al.* Opposing roles for p16Ink4a and p19Arf in senescence and ageing caused by BubR1 insufficiency. *Nat. Cell Biol.* **10**, 825–836 (2008).
63. Tyner, S. D. *et al.* P53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* **415**, 45–53 (2002).
64. Deursen, J. M. Van. The role of senescent cells in ageing. *Nature* **509**, 439–446 (2014).
65. Franceschi, C. *et al.* Inflammaging and anti-inflammaging: A systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech. Ageing Dev.* **128**, 92–105 (2007).
66. Magistretti, P. J. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *Exp. Physiol.* **96**, 407–410 (2011).
67. Guan, J. Z. *et al.* Patients with multiple sclerosis show increased oxidative stress markers and somatic telomere length shortening. *Mol. Cell. Biochem.* **400**, 183–187 (2014).
68. Sedelnikova, O. A. *et al.* Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* **6**, 168–170 (2004).
69. Jurk, D. *et al.* Postmitotic neurons develop a p21-dependent senescence-like phenotype driven by

- a DNA damage response. *Aging Cell* **11**, 996–1004 (2012).
70. Geng, Y., Guan, J., Xu, X. & Fu, Y. Biochemical and Biophysical Research Communications Senescence-associated beta-galactosidase activity expression in aging hippocampal neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **396**, 866–869 (2010).
 71. Nalberczak, M. *et al.* Is senescence-associated beta-galactosidase a marker of neuronal senescence? *Oncotarget* **7**, 81099–81109 (2016).
 72. Schmetsdorf, S., Gärtner, U. & Arendt, T. Constitutive expression of functionally active cyclin-dependent kinases and their binding partners suggests noncanonical functions of cell cycle regulators in differentiated neurons. *Cereb. Cortex* **17**, 1821–1829 (2007).
 73. Panossian, L. *et al.* SIRT1 regulation of wakefulness and senescence-like phenotype in wake neurons. **31**, 4025–4036 (2011).
 74. Arendt, T., Holzer, M. & Gärtner, U. Neuronal expression of cyclin dependent kinase inhibitors of the INK4 family in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* **105**, 949–960 (1998).
 75. Fu, K. *et al.* Loss of MECP2 Leads to Activation of P53 and Neuronal Senescence. *Stem Cell Reports* **10**, 1453–1463 (2018).
 76. Luo, J., Daniels, S. B., Lenington, J. B., Notti, R. Q. & Conover, J. C. The aging neurogenic subventricular zone. *Aging Cell* **5**, 139–152 (2006).
 77. Molofsky, A. V *et al.* Increasing p16 INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. **443**, 1–5 (2006).
 78. Dong, C. M. *et al.* A stress-induced cellular aging model with postnatal neural stem cells. *Cell Death Dis.* **5**, 1–11 (2014).
 79. Mizumatsu, S. *et al.* Extreme sensitivity of adult neurogenesis to low doses of X-irradiation. *Cancer Res.* **63**, 4021–4027 (2003).
 80. Borodkina, A., Shatrova, A., Abushik, P., Nikolsky, N. & Burova, E. Interaction between ROS dependent DNA damage, mitochondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells. *Aging (Albany, NY)*. **6**, 481–495 (2014).
 81. Zhu, J. *et al.* Ginsenoside Rg1 prevents cognitive impairment and hippocampus senescence in a rat model of D-galactose-induced aging. *PLoS One* **9**, (2014).
 82. Chen, L. *et al.* Ginsenoside Rg1 Decreases Oxidative Stress and Down-Regulates Akt/mTOR Signalling to Attenuate Cognitive Impairment in Mice and Senescence of Neural Stem Cells Induced by d-Galactose. *Neurochem. Res.* **43**, 430–440 (2018).
 83. Alessio, N. *et al.* Neural stem cells from a mouse model of Rett syndrome are prone to senescence, show reduced capacity to cope with genotoxic stress, and are impaired in the differentiation process. *Exp. Mol. Med.* **50**, 1–9 (2018).
 84. Giacci, M. & Fitzgerald, M. Oligodendroglia Are Particularly Vulnerable to Oxidative Damage After Neurotrauma In Vivo. *J. Exp. Neurosci.* **12**, 6491–6504 (2018).
 85. Al-Mashhadi, S. *et al.* Oxidative glial cell damage associated with white matter lesions in the

- aging human brain. *Brain Pathol.* **25**, 565–574 (2015).
86. Brickman, A. M. Contemplating Alzheimer's disease and the contribution of white matter hyperintensities. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **13**, (2013).
 87. Erten-Lyons, D. *et al.* Neuropathologic basis of white matter hyperintensity accumulation with advanced age. *Neurology* **81**, 977–983 (2013).
 88. Kujuro, Y., Suzuki, N. & Kondo, T. Esophageal cancer-related gene 4 is a secreted inducer of cell senescence expressed by aged CNS precursor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 8259–8264 (2010).
 89. Pertusa, M., García-Matas, S., Rodríguez-Farré, E., Sanfeliu, C. & Cristòfol, R. Astrocytes aged in vitro show a decreased neuroprotective capacity. *J. Neurochem.* **101**, 794–805 (2007).
 90. Nie, X. *et al.* 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces premature senescence of astrocytes via WNT/ β -catenin signaling and ROS production. *J. Appl. Toxicol.* **35**, 851–860 (2015).
 91. Bitto, A. *et al.* Stress-induced senescence in human and rodent astrocytes. *Exp. Cell Res.* **316**, 2961–2968 (2010).
 92. Görg, B., Karababa, A., Shafigullina, A., Bidmon, H. J. & Häussinger, D. Ammonia-induced senescence in cultured rat astrocytes and in human cerebral cortex in hepatic encephalopathy. *Glia* **63**, 37–50 (2015).
 93. Chinta, S. J. *et al.* Cellular Senescence Is Induced by the Environmental Neurotoxin Paraquat and Contributes to Neuropathology Linked to Parkinson's Disease. *Cell Rep.* **22**, 930–940 (2018).
 94. Crowe, E. P. *et al.* Changes in the transcriptome of human astrocytes accompanying oxidative stress-induced senescence. *Front. Aging Neurosci.* **8**, 1–13 (2016).
 95. Bhat, R. *et al.* Astrocyte Senescence as a Component of Alzheimer's Disease. *PLoS One* **7**, 1–10 (2012).
 96. Capilla-Gonzalez, V., Cebrian-Silla, A., Guerrero-Cazares, H., Garcia-Verdugo, J. M. & Quiñones-Hinojosa, A. Age-related changes in astrocytic and ependymal cells of the subventricular zone. *Glia* **62**, 790–803 (2014).
 97. Jessen, R. *et al.* Invariant Mantling of Growth Cones by Schwann Cell Precursors Characterize Growing Peripheral Nerve Fronts. *Glia* **438**, 424–438 (2006).
 98. Yu, H. M. *et al.* Repeated lipopolysaccharide stimulation induces cellular senescence in BV2 cells. *Neuroimmunomodulation* **19**, 131–136 (2012).
 99. Myung, N. H. *et al.* Evidence of DNA damage in Alzheimer disease: Phosphorylation of histone H2AX in astrocytes. *Age (Omaha)*. **30**, 209–215 (2008).
 100. Jordan-Sciutto, K., Dorsey, R., Chalovich, E. M., Hammond, R. R. & Achim, C. L. Expression Patterns of Retinoblastoma Protein in Parkinson Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **62**, 68–74 (2003).
 101. Zhou, P. *et al.* Histamine-4 receptor antagonist JNJ7777120 inhibits pro-inflammatory microglia and prevents the progression of Parkinson-like pathology and behaviour in a rat model. *Brain*.

- Behav. Immun.* **76**, 61–73 (2019).
102. Mogi, M. *et al.* Interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor- α levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* **211**, 13–16 (1996).
 103. Toczyłowska, B. *et al.* Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNF α , and INF γ concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism. *Neurosci. Lett.* **441**, 158–162 (2008).
 104. Cohen, J., D'Agostino, L., Wilson, J., Tuzer, F. & Torres, C. Astrocyte senescence and metabolic changes in response to HIV antiretroviral therapy drugs. *Front. Aging Neurosci.* **9**, 1–12 (2017).
 105. Kang, T. W. *et al.* Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* **479**, 547–551 (2011).
 106. Ovadya, Y. *et al.* Impaired immune surveillance accelerates accumulation of senescent cells and aging. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
 107. Long, H. *et al.* CD133⁺ ovarian cancer stem-like cells promote non-stem cancer cell metastasis via CCL5 induced epithelial-mesenchymal transition. *Oncotarget* **6**, 13–14 (2015).
 108. Ouchi, R., Okabe, S., Migita, T., Nakano, I. & Seimiya, H. Senescence from glioma stem cell differentiation promotes tumor growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **470**, 275–281 (2016).
 109. Izumoto, S. *et al.* Gene expression of neural cell adhesion molecule L1 in malignant gliomas and biological significance of L1 in glioma invasion. *Cancer Res.* **56**, 1440–1444 (1996).
 110. Brämmendorf, T., Kenwrick, S. & Rathjen, F. G. Neural cell recognition molecule L1: From cell biology to human hereditary brain malformations. *Curr. Opin. Neurobiol.* **8**, 87–97 (1998).
 111. Mechtersheimer, S. *et al.* Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J. Cell Biol.* **155**, 661–673 (2001).
 112. Shtutman, M., Levina, E., Ohouo, P., Baig, M. & Roninson, I. B. Cell adhesion molecule L1 disrupts E-cadherin-containing adherens junctions and increases scattering and motility of MCF7 breast carcinoma cells. *Cancer Res.* **66**, 11370–11380 (2006).
 113. Kiefel, H. *et al.* L1CAM-integrin interaction induces constitutive NF- κ B activation in pancreatic adenocarcinoma cells by enhancing IL-1B expression. *Oncogene* **29**, 4766–4778 (2010).
 114. Geismann, C. *et al.* Up-regulation of L1CAM in pancreatic duct cells is transforming growth factor β 1- and slug-dependent: Role in malignant transformation of pancreatic cancer. *Cancer Res.* **69**, 4517–4526 (2009).
 115. Baker, D. J. *et al.* Naturally occurring p16 Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* **530**, 184–189 (2016).
 116. Musi, N. *et al.* Tau protein aggregation is associated with cellular senescence in the brain. *Aging Cell* **17**, (2018).
 117. Bussian, T. J. *et al.* Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature* **562**, 578–582 (2018).

118. Kaur, E. *et al.* Radiation-induced homotypic cell fusions of innately resistant glioblastoma cells mediate their sustained survival and recurrence. *Carcinogenesis* **36**, 685–695 (2015).
119. Tato-Costa, J. *et al.* Therapy-induced cellular senescence induces epithelial-to-mesenchymal transition and increases invasiveness in rectal cancer. *Clin. Colorectal Cancer* **15**, 170–178.e3 (2016).
120. Demaria, M. *et al.* Cellular senescence promotes adverse effects of chemotherapy and cancer relapse. *Cancer Discov.* **7**, 165–176 (2017).
121. Aasland, D. *et al.* Temozolomide induces senescence and repression of DNA repair pathways in glioblastoma cells via activation of ATR–Chk1, p21, and NF-κB. *Cancer Res.* **79**, 99–113 (2019).
122. Short, S., Fielder, E., Miwa, S. & von Zglinicki, T. Senolytics and senostatics as adjuvant tumour therapy. *EBioMedicine* 1–10 (2019). doi:10.1016/j.ebiom.2019.01.056