

GRAŻYNA MOSIENIAK^{1,A}, AGATA GŁUCHOWSKA^B, ALICJA TARGOŃSKA^C

^A [HTTPS://ORCID.ORG/0000-0001-7957-1241](https://orcid.org/0000-0001-7957-1241)
e-mail: g.mosieniak@nencki.edu.pl

^B [HTTPS://ORCID.ORG/0000-0001-8912-1711](https://orcid.org/0000-0001-8912-1711)

^C [HTTPS://ORCID.ORG/0000-0002-8939-1743](https://orcid.org/0000-0002-8939-1743)

1

Pracownia Molekularnych Podstaw Starzenia, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego
Laboratory of Molecular Bases of Aging, Nencki Institute of Experimental Biology PAS,
Pasteura 3 St., Warsaw

Starzenie komórkowe – 60 lat od odkrycia Hayflicka

Cellular senescence – 60 years since Hayflick’s discovery

https://doi.org/10.36921/kos.2023_2982

Abstrakt

Starzenie organizmu jest procesem, który zależy od wielu czynników. Jednym z nich jest bez wątpienia starzenie się komórek, które jako pierwszy opisał w latach 60. Leonard Hayflick, analizując fibroblasty hodowane *in vitro*. Dalsze badania dowiodły, że komórki ulegają również starzeniu w organizmie i wraz z wiekiem gromadzą się w tkankach. Komórki stare charakteryzują się znacząco zmienioną morfologią, dysfunkcją różnych organelli oraz zmienionym metabolizmem. Z tego też powodu komórki nabywają nowych cech, które definiują ich rolę w procesie starzenia narządów. Jedną z istotniejszych cech komórek starych jest zdolność do wydzielania różnego typu czynników aktywnych biologicznie, przyczyniających się do podtrzymania przewlekłego stanu zapalnego oraz powodujących dysfunkcję tkanek i organów. Badania ostatnich lat dowiodły, że dzięki interwencji farmakologicznej możliwe jest usuwanie komórek starych z organizmu, co daje szansę na opracowanie nowych strategii terapeutycznych, ukierunkowanych na leczenie chorób wieku podeszłego prowadzących do wydłużenia życia w zdrowiu osób starszych.

Słowa kluczowe: starzenie komórkowe, markery, przewlekły stan zapalny, sekretom, senolityki

Abstract

Aging of the organism depends on many factors. One of them is cell senescence, which was first described in the 1960s by Leonard Hayflick who analyzed fibroblasts cultured *in vitro*. Further research has shown that cells undergo senescence in the body and, as we age, accumulate in tissues. Senescent cells are characterized by significantly changed morphology, dysfunction of various organelles, and altered metabolism. Accordingly, senescent cells acquire new features that define their role in aging. One of the most important features of senescent cells is the ability to secrete various types of biologically active factors that contribute to chronic inflammation, and cause tissue and organ dysfunction. Research in recent years has proven that, thanks to pharmacological intervention, it is possible to remove

senescent cells from the tissue. This intervention enables to develop new therapeutic strategies aimed at treating age-related diseases and to extend the healthspan of older people

Keywords: cellular senescence, markers, chronic inflammation, secretom, senolitics.

WPROWADZENIE

Dlaczego się starzejemy? To pytanie od wieków zadawali sobie ludzie mając nadzieję, że odpowiedź na nie przyniesie możliwość przeciwdziałania starzeniu. Wierzone, że zatrzymanie procesu starzenia przyczyni się do wydłużenia życia a przede wszystkim może stać się źródłem wiecznej młodości. Rozwój cywilizacji a wraz z nim znaczące polepszenie warunków życia oraz niebywały postęp w medycynie paradoksalnie sprawiły, że pytanie o przyczynę starzenia jest we współczesnym świecie jeszcze bardziej aktualne niż było to wiele lat temu. Żyjemy coraz dłużej i potrafimy skutecznie walczyć z wieloma chorobami, które do niedawna były nieuleczalne lub wręcz śmiertelne. Z drugiej strony wydłużył się czas, w którym ludzie zmagają się z długotrwałym i postępującym osłabieniem wszystkich funkcji organizmu, co nierozdzielnie wiąże się ze starzeniem. Niestety, jest to także okres zwiększonej zapadalności na szereg chorób związanych z wiekiem, które dramatycznie pogarszają komfort życia. Równocześnie, dzięki niezwykłemu rozwojowi nauki i kolejnym odkryciom w dziedzinie biogerontologii wydaje się, że jesteśmy już bardzo blisko skutecznego opóźniania, a nawet cofania procesu starzenia.

Fundamentem prowadzonych aktualnie badań stało się określenie tzw. filarów starzenia, czyli zdefiniowanie najważniejszych procesów biologicznych wpływających na starzenie. Należą do nich: niestabilność genomowa, wyczerpanie/dysfunkcja komórek progenitorowych, skracanie telomerów, zmiany epigenetyczne, utrata proteostazy, rozregulowanie ścieżek sygnałowych związanych z odżywianiem, dysfunkcja mitochondriów, zaburzona komunikacja międzykomórkowa, chroniczny stan zapalny, zwłóknienie, rozregulowanie mikrobiomu i starzenie się komórek. Uznano, że starzenie jest wypadkową wymienionych procesów. Procesy te pozostają ze sobą w ścisłej zależności tworząc swojego rodzaju sieć powiązań funkcjonalnych. Uważa się, że dzięki istnieniu tej zależności, wpływając na jeden z nich można będzie modyfikować w pewnym stopniu starzenie całego organizmu. Obecnie wiadomo już, że starzenie komórkowe jest jednym z tych kluczowych procesów biologicznych, które odgrywają istotną rolę w starzeniu organizmu. Stąd też poznanie mechanizmów molekularnych leżących

u podstaw starzenia komórkowego oraz praktyczne ich wykorzystanie w celu jego ograniczenia stało się podstawą badań zmierzających do opóźniania starzenia i chorób wieku podeszłego.

STARZENIE KOMÓRKOWE – POCZĄTKI

Starzenie komórkowe zostało zaobserwowane i opisane po raz pierwszy w latach 60. XX wieku przez Leonarda Hayflicka, który prowadził badania na fibroblastach wyizolowanych z tkanki człowieka i hodowanych *in vitro* (Hayflick i Moorhead 1961). Hayflick zaobserwował, że komórki prawidłowe jakimi są fibroblasty, mogą podzielić się tylko określoną liczbą razy, po czym przestają się dzielić. W toku przeprowadzonych doświadczeń wykazał, że fibroblasty wyizolowane z płodu proliferowały w hodowli dłużej niż pochodzące od osoby dorosłej. Te na pozór proste obserwacje doprowadziły Hayflicka do bardzo znamienych w skutkach dla nauki wniosków. Hayflick sformułował hipotezę, że proces jakiego podlegają komórki w hodowli zachodzi również w organizmie człowieka i wpływa na proces jego starzenia (Hayflick 1965). Zaobserwowany fenomen nazwał starzeniem komórkowym. Termin "starzenie", którym zwykle posługujemy się w pracach naukowych pisanych w języku polskim kojarzy się z czymś negatywnym, wynikającym z postępującej, chaotycznej destrukcji – zużycia. Warto jednak mieć świadomość, że w przypadku komórek to wrażenie jest mylne. Komórka stara to komórka, która uległa złożonym przemianom, nadającym jej nową rolę w tkance. Właśnie ze względu na ten, niestety, negatywny przekaz jaki niesie ze sobą termin "starzenie komórkowe" coraz częściej używa się określenia senescencja (ang. senescence).

Hipoteza Hayflicka głosząca, że starzenie komórkowe zachodzi w tkankach organizmu została potwierdzona przeszło 30 lat później. Było to możliwe dzięki wykorzystaniu pewnej wyjątkowej cechy jaką charakteryzują się komórki stare, a mianowicie podwyższonej aktywności enzymu lizosomalnego β -galaktozydazy, która, w przeciwieństwie do większości enzymów lizosomalnych, jest również wykrywalna w nieoptymalnym pH 6,0. Wykazano wtedy, że liczba fibroblastów i keratynocytów w skórze człowieka charakteryzujących się podwyższoną aktywnością tzw. związanej ze starzeniem β -galak-

tozydazy (ang. Senescence Associated β -galactosidase – SA- β -gal), koreluje z wiekiem dawcy (Dimri i współaut. 1995). Choć dalsze badania dowiodły, że podwyższona aktywność SA- β -gal nie może być powiązana z żadnym mechanizmem starzenia komórkowego, to jednak do tej pory pozostaje podstawowym i powszechnie wykorzystywanym markerem starych komórek. Nie jest to jednak jedyna cecha, która pozwala na zidentyfikowanie komórki starej w tkance lub hodowli. Wykorzystanie jej ma też swoje ograniczenia, dlatego też zwykle do tego, by nazwać komórkę starą konieczne jest zbadanie kilku markerów, najważniejsze zostały opisane w dalszej części artykułu.

DLACZEGO KOMÓRKI SIĘ STARZEJĄ?

Naturalną konsekwencją dokonania jakiejś obserwacji w badaniach biologicznych jest próba odpowiedzi na pytanie – dlaczego tak się dzieje? Do tego zmierzały rozpoczęte przez Hayflicka, a kontynuowane przez innych naukowców, badania. Doprowadziły one do wskazania telomerów jako wrażliwych zakończeń chromosomów, które “odliczają” czas, jaki komórka ma do momentu indukcji procesu starzenia. To komórkowe odliczanie wiąże się z systematycznym skracaniem zakończeń chromosomów, zwanych telomerami, które następuje po każdej rundzie replikacji DNA. Skracanie telomerów wynika z tzw. problemu końca replikacji. W efekcie każdemu podziałowi komórkowemu towarzyszy ubytek telomerowego DNA, który postępuje do momentu osiągnięcia przez te fragmenty pewnej minimalnej długości, co sprawia, że telomerowe zakończenia chromosomów nie mogą już pełnić swojej roli, czyli nie chronią integralności chromosomu. Jest to sygnał dla komórki, żeby ostatecznie zakończyć podziały. Co istotne, pewna pula komórek tj. komórki macierzyste, nowotworowe i do pewnego stopnia również progenitorowe, mają zdolność odbudowy skróconych telomerów dzięki obecności aktywnego enzymu odpowiedzialnego za ten proces – telomerazy. Telomeraza zapewnia więc komórkom pewną “nieśmiertelność”, przynajmniej w kontekście podziałów komórkowych, co jak wiadomo w przypadku komórek nowotworowych jest jedną z przyczyn dramatycznych konsekwencji jakie niesie ze sobą choroba nowotworowa (Saretzki 2018).

Skracanie telomerów nie jest jednak jedyną przyczyną starzenia komórek. W gruncie rzeczy starzenie może zostać wywołane różnego rodzaju czynnikami zarówno fizycznymi jak i chemicznymi, które pochodzą ze środowiska lub są wytwarzane przez samą komórkę (Toussaint i współaut. 2000). Przykładem takiego czynnika są reaktywne formy

tlenu. Do czynników zewnętrznych prowadzących do starzenia komórek zaliczamy promieniowanie ultrafioletowe, promieniowanie gamma, chemioterapeutyki i szereg innych. Wspólną cechą większości induktorów starzenia komórkowego jest zdolność do generowania w komórce pęknięć w dwóch niciach DNA, które są impulsem dla komórki do rozpoczęcia przesyłania kaskady sygnału, zmierzającej do natychmiastowego zatrzymania proliferacji. Jeżeli doznane uszkodzenia DNA nie zostaną szybko naprawione, komórka trwale traci zdolność podziałów komórkowych i ulega starzeniu, lub gdy uszkodzenia są zbyt rozległe – śmierci. Należy jednak pamiętać, że obydwa te procesy – starzenie i śmierć komórki – to zupełnie różne zdarzenia, biorąc pod uwagę nie tylko los komórki, ale również towarzyszące im podłoże molekularne.

Starzenie komórkowe wywoływane czynnikami stresowymi, w przeciwieństwie do starzenia związanego ze stopniowym skracaniem telomerów prowadzącym do zmniejszaniem liczby podziałów, zachodzi w hodowli szybko, w ciągu kilku dni. Stąd też w odróżnieniu od starzenia replikacyjnego pierwotnie zaobserwowanego przez Hayflicka określa się je mianem starzenia przedwczesnego indukowanego stresem (ang. stress induced premature senescence, SPIS). Z tego powodu starzenie komórkowe uznaje się jako jedną z możliwych odpowiedzi komórki na różnorodne stresy, co czyni ten proces jedną z podstawowych reakcji komórki, która jest związana nie tylko ze starzeniem organizmu ale zachodzi na każdym etapie życia i we wszystkich tkankach.

Doskonałym przykładem tego, jak istotne jest starzenie komórkowe dla prawidłowego funkcjonowania organizmu, jest starzenie wywoływane onkogenem (ang. oncogene-induced senescence) (Serrano i współaut. 1997). Aktywacja onkogenu w prawidłowej komórce jest jednym z elementów mogących doprowadzić do transformacji nowotworowej danej komórki, a w konsekwencji do rozwoju nowotworu. Wykazano, że podwyższona aktywność onkogenów może wiązać się ze wzmożoną replikacją DNA, która nie podlega prawidłowej kontroli. W efekcie w komórce dochodzi do nagromadzenia uszkodzeń DNA, które prowadzą do starzenia a w konsekwencji skutecznie eliminują ją z puli komórek zdolnych do proliferacji (Di Micco i współaut. 2006). Z tego powodu starzenie komórkowe zostało uznane za naturalną barierę ograniczającą rozwój nowotworu. Ponadto wykazano, że tylko przełamanie tej bariery np. poprzez nabycie mutacji w genach krytycznych dla starzenia komórkowego, umożliwia komórce nabycie cech komórki nowotworowej, zdolnej do nieograniczonej proliferacji.

Stosunkowo niedawno opublikowane badania dowiodły, że starzenie komórkowe towarzyszy organizmowi praktycznie od samego początku jego istnienia (Munoz-Espin i współaut. 2013). Wykazano bowiem, że starzenie komórkowe zachodzi w trakcie rozwoju embrionalnego ssaków i jest niezbędne do prawidłowego formowania takich struktur jak śródnercze i worek endolimfatyczny. Uważa się, że starzenie związane z embriogenezą jest niezależne od uszkodzeń DNA i programowane, w przeciwieństwie do starzenia, zachodzącego w dorosłym organizmie, i jak wcześniej wspomniano jest odpowiedzialne na stres.

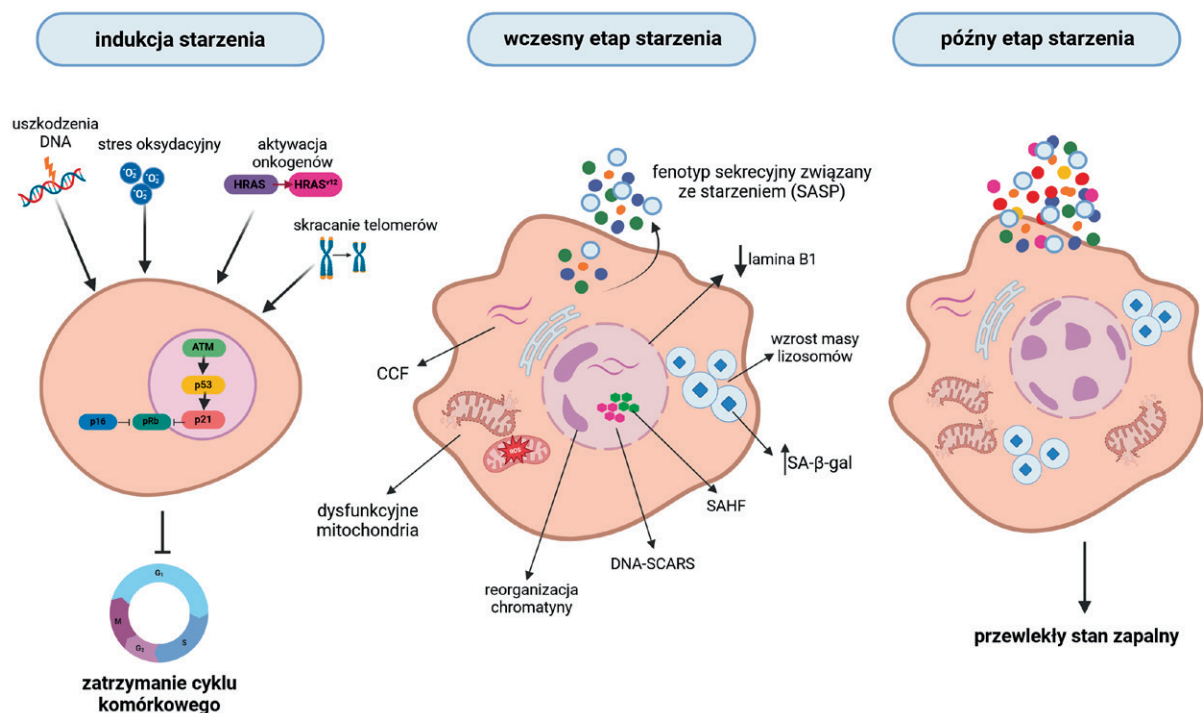
Tak więc pomimo, iż od początku odkrycia starzenia komórkowego próbowano powiązać ten proces ze starzeniem organizmu i w dalszym ciągu prowadzi się liczne badania, warto pamiętać, że starzenie odgrywa również pozytywną rolę w życiu osobniczym, pod warunkiem, że proces ten jest do pewnego stopnia ograniczony i zachodzi w określonym kontekście tkankowym.

STARZENIE JAKO DYNAMICZNY PROCES ZACHODZĄCY W KOMÓRCIE

Odwołując się ponownie do pionierskich obserwacji dokonanych przez Hayflicka, należy zauważyć, że podstawową cechą komórki starej jest trwałe zahamowanie podziałów komórkowych. W odróż-

nieniu od komórek spoczynkowych, komórka stara nie wznowi podziałów nawet gdy będzie poddana działaniu miogenów. Tak jak od każdej reguły, również w tym przypadku zdarzają się odstępstwa i pojawiają się prace dowodzące, że zatrzymanie podziałów w wyniku starzenia może być odwracalne, ale w dalszym ciągu uważa się brak aktywności proliferacyjnej jako najbardziej powszechną cechę komórek starych. Co ciekawe, związek pomiędzy starzeniem a brakiem proliferacji jest zupełnie inny gdy analizujemy starzenie komórek postmitotycznych, takich jak neurony czy kardiomiocyty. W tym wypadku trwałe zatrzymanie komórek w cyklu nie jest cechą wyróżniającą komórki stare. Dowodzi to jednocześnie, że zahamowanie cyklu komórkowego nie jest niezbędne do zajścia procesu starzenia.

Zahamowanie proliferacji to pierwsza reakcja na niekorzystne bodźce docierające do komórki i zwykle dochodzi do niej w odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Najistotniejszą rolę w tym procesie odgrywają inhibitory cyklu komórkowego, takie jak białko p21Cip/Waf1 (p21) oraz białko p16INK4A (p16). Oba białka działają jako inhibitory cyklinozależnych kinaz – p21 hamuje kinazę CDK2 zaś p16 kinazy CDK4 i 6. Indukcja białka p21 wiąże się z aktywacją szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA (ang. DNA damage response, DDR) (Herranz i Gil 2018). Długotrwała aktywacja tej ścieżki związana z obecnością w jądrach komórek starych nienaprawionych



Ryc. 1. Cechy komórki ulegającej starzeniu pojawiające się na różnych etapach tego procesu. Opracowano za pomocą BioRender.com, na podstawie (Herranz i Gil, 2018).

uszkodzeń dwuniciowego DNA (ang. double strand breaks, DSB) towarzyszy większości komórek starych, zaś poszczególne białka zaangażowane w tę kluczową dla procesu starzenia ścieżkę przesyłania sygnału są często wykorzystywane jako markery starzenia komórkowego (d'Adda di Fagagna 2008; Korwek i Alster 2014). I tak komórki, w których jądrach stwierdza się skupiska ufosforylowanego histonu H2AX (γ H2AX) lub białka 53BP1 pojawiające się w bezpośrednim sąsiedztwie uszkodzonego DNA, są często rozpoznawane jako komórki, które uległy starzeniu. W ścieżkę odpowiedzi na uszkodzenia DNA zaangażowane są również kinazy ATM i ATR oraz aktywowane przez nie kinazy Chk1 i Chk2, które prowadzą do podwyższenia poziomu białka p53, a ono z kolei, działając jako czynnik transkrypcyjny, reguluje ekspresję genu CDKN2, kodującego białko p21. W przeciwieństwie do inhibitora cyklinozależnych kinaz – p21, poziom białka p16 rośnie stopniowo osiągając wysokie wartości dopiero po pewnym czasie od zainicjowania procesu starzenia. To właśnie temu białku przypisuje się rolę długotrwałego zatrzymywania komórki starej w cyklu komórkowym. Białko p16 jest też powszechnie wykorzystywane do identyfikacji komórek starych w tkankach organizmu. Ekspresja p16 jest prawie niewykrywalna w tkankach młodego organizmu, podczas gdy jego poziom rośnie wraz z wiekiem (Krishnamurthy i współaut. 2004). Co więcej, to właśnie dzięki wykorzystaniu genetycznie modyfikowanych myszy, w których uzyskano wydłużenie życia dzięki eliminacji komórek o podwyższonej ekspresji p16, możliwe stało się wykazanie związku przyczynowo-skutkowego pomiędzy starzeniem komórkowym a starzeniem organizmu. Pomimo tak jednoznacznych dowodów na udział inhibitora cyklu p16 ze starzeniem komórkowym, w dalszym ciągu nie jest on uznawany jako jednoznaczny marker tego procesu, zwłaszcza w badaniach *in vivo*. Jedną z przyczyn jest występowanie tego białka w komórkach takich jak makrofagi czy limfocyty, które wyczerpały potencjał proliferacyjny ale nie są komórkami starymi (Ryc.1).

Pod wpływem działania różnych czynników – fizycznych, chemicznych i genetycznych – w komórce dochodzi do uszkodzenia DNA i aktywacji szlaków p53/p21 oraz p16/pRb a także do trwałego zatrzymania cyklu komórkowego. Na wczesnym etapie procesu starzenia, w wyniku aktywacji szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA, w miejscu uszkodzeń tworzą się skupiska białek będących elementami tego szlaku (ang. DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence, DNA-SCARS). W jądrach komórek starych dochodzi do spadku laminy B1, prowadzącego do zaburzeń struktury

otoczki jądrowej. Reorganizacji ulega także chromatyna, dochodzi do formowania się skupisk tzw. heterochromatyny związanej ze starzeniem (ang. Senescence Associated Heterochromatin Foci, SAHF). W wyniku zaburzenia struktury otoczki jądrowej uwalniane są do cytoplazmy małe fragmenty chromatyny (ang. Cytoplasmic Chromatin Fragments, CCF). Ponadto komórka stara staje się powiększona i spłaszczona. Obserwowany jest wzrost masy lizosomów i zwiększona aktywność jednego z enzymów lizosomalnych – tzw. β -galaktozydazy związanej ze starzeniem (SA- β -gal, Senescence Associated- β -galactosidase). Gromadzą się dysfunkcyjne mitochondria, które produkują zwiększoną ilość reaktywnych form tlenu. Jedną z istotnych cech charakterystycznych dla komórek ulegających starzeniu jest występowanie fenotypu wydzielniczego związanego ze starzeniem (ang. Senescence Associated Secretory Phenotype, SASP). W wyniku dalszych zmian epigenetycznych komórki przechodzą w tzw. późny etap starzenia charakteryzujący się m.in. zwiększonym i zróżnicowanym fenotypem sekrecyjnym, który przyczynia się do przewlekłego stanu zapalnego.

Zatrzymanie cyklu komórkowego to pierwsza zmiana zapoczątkowująca wieloetapową przebudowę wewnątrzkomórkową, prowadzącą do osiągnięcia pełnego fenotypu charakterystycznego dla komórki starej. Kolejne zmiany dotyczą organizacji chromatyny i całego jądra komórkowego, które wiążą się ze zmianami strukturalnymi otoczki jądrowej oraz zmianami epigenetycznymi (Herranz i Gil 2018). Jedną z cech komórek starych jest degradacja laminy B1. Niesie to ze sobą dalsze konsekwencje. Dochodzi do odłączenia fragmentów chromatyny związanej z otoczką jądrową (ang. Lamin Associated Domain, LAD) i przemieszczanie się ich do centralnych obszarów jądra. Ponadto zaburzona struktura otoczki jądrowej umożliwia uwalnianie do cytoplazmy małych fragmentów chromatyny (ang. Cytoplasmic Chromatin Fragments, CCF), które rozpoznawane przez wewnątrzkomórkowy mechanizm angażujący białka cGAS i STING prowadzą do indukcji genów kodujących czynniki prozapalne uwalniane przez komórki stare (Gluck i współaut. 2017). Najbardziej spektakularnym przykładem zmian zachodzących w jądrze, które są typowe dla starzenia, są skupiska heterochromatyny (ang. Senescence Associated Heterochromatin Foci, SAHF), wzbogacone o metylowany na lizynie 9 histon H3 (meH3K9), białko HP1, białko HMGA oraz pozbawione histonu H4 występującego w odcinkach DNA pomiędzy nukleosomami. Biorąc pod uwagę powyższe zmiany uważa się, że formowanie SAHF jest związane z tworzeniem regionów

“wyciszonej” transkrypcyjnie chromatyny (Narita i współaut. 2003). Pomimo tak specyficznej dla starzenia reorganizacji chromatyny jakim jest tworzenie SAHF, ich występowanie najczęściej obserwuje się w komórkach ulegających starzeniu indukowanemu onkogenami, w innych typach starzenia ich obecność nie zawsze udaje się stwierdzić. Niezależnie od tego, czy są formowane SAHF czy nie, w trakcie starzenia komórkowego dochodzi do znaczących zmian w metylacji DNA. W pewnych obszarach stwierdza się lokalną hipermetylację podczas gdy w innych dochodzi do zmniejszenia liczby grup metylowych (hipometylacja). Efektem tych zmian w metylacji DNA, łącznie ze zmianami w strukturze otoczki jądrowej, organizacji chromatyny oraz przemieszczaniem się terytoriów chromosomowych, jest generalne przemodelowanie transkryptomu a w konsekwencji, zmiany funkcjonalne w komórkach starych.

Nie tylko jądro komórkowe ulega przemianom podczas starzenia komórki. Dotyczy to właściwie wszystkich organelli, z których najwięcej uwagi poświęcono mitochondriom. Ma to oczywiście swoje głębokie uzasadnienie. Mitochondria, jako miejsce wytwarzania niezbędnej do życia energii, pełnią szczególnie ważną rolę w funkcjonowaniu komórki. Wykazano, że w starych komórkach dochodzi do znaczącej reorganizacji sieci mitochondrialnej – bardzo dynamicznej struktury tworzonej przez łączące się ze sobą lub rozdzielające mitochondria. Mitochondria w komórce starej są bardzo wydłużone, powiększone i łączą się ze sobą dużo częściej niż w komórce młodej. Ponadto obserwuje się wzrost masy mitochondrialnej (sumaryczna ilość mitochondriów w komórce) oraz zaburzenia mitofagii – procesu odpowiedzialnego za specyficzne usuwanie uszkodzonych mitochondriów (Martini i Passos 2023). Wszystkie te zmiany skutkują podwyższonym poziomem reaktywnych form tlenu. Te niezwykle aktywne cząsteczki uszkadzają zarówno wewnątrzkomórkowe struktury jak i, wydzielane na zewnątrz, działają na sąsiadujące komórki. Reaktywne formy tlenu indukują przyspieszone starzenie, między innymi poprzez uszkodzenia DNA komórkowego. Pełnią one w komórce starej również rolę w podtrzymywaniu fenotypu starzenia, uczestnicząc w tak zwanym pozytywnym sprzężeniu zwrotnym w wyniku którego, poprzez indukcję uszkodzeń DNA, podtrzymywana jest aktywacja ścieżki sygnałowej niezbędnej do starzenia. Wykazano również udział reaktywnych form tlenu w aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF κ B, który jest głównym regulatorem genów kodujących m.in. cytokiny prozapalne, wydzielane na podwyższonym poziomie przez komórki stare.

Reaktywne formy tlenu to nie jedyne cząsteczki produkowane przez mitochondria, które przyciągają zainteresowanie badaczy. Z mitochondriów komórki starej uwalniane są białka, peptydy, mtDNA oraz metabolity, które stanowią grupę cząsteczek zwanych mitochondrialnymi wzorcami molekularnymi związanymi z uszkodzeniem (ang. mitochondrial Damage-Associated Molecular Pattern molecules, mtDAMPs). DAMPs, pochodzące między innymi z mitochondriów, są rozpoznawane przez tzw. inflamasom czyli kompleks białek, których współdziałanie odpowiada za wywołanie reakcji zapalnej (Gong i współaut. 2020). Choć rola mtDAMPs nie jest w pełni poznana, dotychczasowe badania dostarczają pośrednich dowodów wskazujących na istotną, funkcjonalną ich rolę w starzeniu *in vitro* i *in vivo*.

Zaburzeniom mitochondriów w komórce starej towarzyszą zmiany w metabolizmie. Wykazano, że komórki stare są mniej efektywne w produkcji ATP, co jest związane z mniej wydajną fosforylacją oksydacyjną, wynikającą z obniżonego potencjału błony mitochondrialnej. Ponadto, pomimo bardziej intensywnego oddychania – większe zużycie tlenu związanego z większą masą mitochondriów – w komórkach starych często obserwuje się zwiększoną glikolizę, choć nie jest to zmiana zawsze towarzysząca starzeniu komórkowemu. Wydaje się zatem oczywiste, że w trakcie starzenia komórkowego dochodzi do znaczących zmian w metabolizmie, ale zmiany te mogą być różne w zależności od typu starzenia i ulegającej mu komórki (Martini i Passos 2023).

Z mitochondriami komórki starej może wiązać się jeszcze jedna istotna cecha kojarzona ze starzeniem – oporność na apoptozę. Uważa się, że zwiększona oporność na apoptozę wynika z podwyższonego poziomu białek z rodziny BCL (Wang 1995; Sasaki i współaut. 2001). Białka te hamują tworzenie przez białka BAX i BAK kanałów w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, przez które uwalniany jest z mitochondriów cytochrom c. Po przemieszczeniu do cytoplazmy, cytochrom c zapoczątkowuje proces aktywacji kaspaz, enzymów aktywnych w procesie apoptozy.

FENOTYP SEKRECYJNY KOMÓREK STARYCH

Jedną z cech komórek starych, która bez wątplenia w największym stopniu definiuje rolę jaką komórki stare odgrywają w organizmie, jest ich zdolność do zwiększonego wydzielania różnorodnych czynników (np. białek, metabolitów, pęcherzyków). Cecha ta w literaturze anglojęzycznej określana jest terminem Senescence Associated Secretory Phenotype,

w skrócie SASP. Choć zdolność do zwiększonej sekrecji jest jednym z podstawowych markerów starzenia komórkowego, to już skład SASP może się bardzo różnić w zależności od typu komórki, rodzaju bodźca wywołującego starzenie, jak również czasu od momentu indukcji tego procesu.

Przyczyną, dla której tak wiele uwagi poświęca się właśnie tej cesze komórek starych jest fakt, że to właśnie SASP jest odpowiedzialny w dużym stopniu za rolę jaką odgrywają komórki stare w organizmie (Birch i Gil 2020). Choć zwykle działaniu SASP przypisywane są niekorzystne efekty, należy jednak zdawać sobie sprawę, że czynniki SASP mogą odgrywać również pozytywną rolę. Dzieje się to w sytuacji, kiedy starzenie komórkowe pojawia się jako zaprogramowany element procesu biologicznego. Wykazano na przykład, że podczas gojenia ran wydzielane przez ulegające starzeniu fibroblasty białka CCN1 (białko sygnałowe związane z macierzą zewnątrzkomórkową) oraz PDGF-AA (płytkowy czynnik wzrostu) przyspieszają zamykanie rany (Demaria i współaut. 2014; Jun i Lau 2010). Z kolei metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej, uwalniane przez ulegające starzeniu komórki gwiaździste wątroby, ograniczają powstawanie zwłóknień, które tworzą się podczas naprawy uszkodzonego narządu (Krizhanovsky i współaut. 2008). Czynniki SASP służą również w komunikowaniu się z innymi typami komórek. Dobrym przykładem takiej pozytywnej komunikacji jest rekrutacja komórek układu odpornościowego (limfocytów Th1, komórek NK i makrofagów) lokalnie, w wątrobie, na wczesnych etapach powstawania zmian nowotworowych, kiedy dochodzi do indukcji starzenia. W efekcie komórki będące na wczesnym etapie kancerogenezy zostają usunięte przez komórki układu odpornościowego, co, jak pokazały wyniki eksperymentu, zahamowało rozwój nowotworu (Xue i współaut. 2007). We wszystkich wymienionych powyżej przykładach działanie czynników SASP jest ograniczone w czasie i miejscu. Zupełnie inaczej dzieje się gdy stare komórki akumulują się w tkance przez dłuższy czas, tak jak to ma miejsce w starzejącym się organizmie. Wówczas przeważają niekorzystne efekty działania SASP. Pierwszych dowodów takiego właśnie wpływu komórek starych poprzez wydzielane czynniki dostarczyła praca zespołu Judith Campisi, która dowiodła, że stare komórki, poprzez wydzielane czynniki, promują proliferację i metastazę komórek nowotworowych o niskim stopniu złośliwości (Krtolica i współaut. 2001). Rozwój nowotworu jest również wspierany poprzez stymulowanie czynnikami SASP angiogenezy w guzie. Czynniki SASP mogą również działać immunosupresyjnie. Wykazano, że to właśnie

białka wydzielane przez stare hepatocyty hamują dojrzewanie komórek mieloidalnych, tworząc korzystną niszę umożliwiającą proliferację komórek nowotworowych w wątrobie (Eggert i współaut. 2016). Czynnikiem SASP przypisuje się również negatywne skutki towarzyszące chemioterapii. Podanie leków przeciwnowotworowych działa bowiem nie tylko na nowotwór, ale przyczynia się również do indukcji starzenia w zdrowych tkankach. Usunięcie komórek starych z myszy poddanych działaniu chemioterapeutyków, nie tylko ograniczało skutki uboczne terapii, ale co ważniejsze – zmniejszało przypadki wznowy (Demaria i współaut. 2017).

Jedną z istotnych funkcji SASP jest “wzmocnienie” starzenia (Sikora i współaut. 2021). Dowiedziono, że taką rolę odgrywają wydzielane przez komórki stare interleukiny 6 i 8 (IL-6, IL-8) oraz białko wiążące insulino-podobny czynnik wzrostu 7 (IGFBP-7). Usunięcie z komórki zaindukowanej do starzenia receptorów dla powyższych cytokin lub samego białka IGFBP-7 zapobiegało starzeniu. To pozytywne sprzężenie zwrotne, w którym uczestniczą czynniki SASP, może odgrywać pozytywną rolę w ograniczaniu kancerogenezy, wtedy gdy stare komórki pojawiają się na jego wczesnych etapach. Jednakże komórki stare wydzielają również czynniki, które mogą indukować starzenie w sąsiadujących komórkach przyczyniając się do “rozsiewania” tego procesu w komórkach nieuszkodzonych. Znaczenie takiego działania SASP jest zależne od kontekstu. Jeżeli propagowanie starzenia zachodzi w tkance nowotworowej, będzie się to przyczyniało do ograniczenia wzrostu guza. Zupełnie innych efektów możemy się spodziewać gdy proces ten zachodzi w starzejącej lub podlegającej patologicznym zmianom tkance, kiedy to akumulacja komórek starych przyspiesza rozwój choroby i w efekcie dysfunkcji całego narządu.

Uważa się również, że czynniki SASP przyczyniają się do podtrzymania w starzejącym się organizmie tzw. przewlekłego stanu zapalnego, inaczej nazywanym jałowym lub sterylnym, nie związanym z infekcją zapaleniem, tzw. inflammaging. Przewlekły stan zapalny, którego główną przyczyną są zmiany zachodzące wraz z wiekiem w układzie odpornościowym, odgrywa ważną rolę we wszystkich chorobach związanych z wiekiem (Salvioli i współaut. 2013). Liczne prace eksperymentalne prowadzone przede wszystkim na zwierzęcych modelach chorób związanych z wiekiem dowodzą, że usunięcie komórek starych koreluje z obniżeniem poziomu w surowicy prozapalnych czynników takich jak IL-6, IL-1 α , TNF- α .

Powyższe efekty działania czynników SASP bez wątplenia nie wyczerpują wszystkich możliwości.

Coraz liczniejsze badania proteomiczne dowiodły, że w skład SASP może wchodzić kilkaset białek, ale również niebiałkowe cząsteczki sygnałowe, np. ceramidy, bradykininy, czynniki hemostatyczne, elementy macierzy zewnątrzkomórkowej czy też wspomniane już wcześniej reaktywne formy tlenu. Różnorodność elementów SASP jest ogromna a ich zestaw, biorąc pod uwagę zmiany ilościowe i jakościowe, może być odmienny niemalże dla każdej starej komórki.

Tak duże zróżnicowanie fenotypu sekrecyjnego wynika między innymi z różnych ścieżek sygnałowych prowadzących do zwiększonej produkcji wydzielanych czynników. Jedną z nich jest ścieżka indukowana uszkodzeniami DNA, która odgrywa wiodącą rolę również w indukcji procesu starzenia. Nie tylko uszkodzenia w obrębie jądrowego DNA indukują SASP. Jak wspomniano już wcześniej również obecność DNA w cytoplazmie komórek starych w formie małych fragmentów chromatyny (CCF), fragmentów mitochondrialnego DNA lub retrotranspozonów LINE-1 prowadzi do zwiększonej ekspresji cytokin prozapalnych. W indukcji SASP odgrywają również rolę zmiany na poziomie metabolizmu, takie jak zaburzenie w stosunku NAD⁺/NADH czy zwiększona aktywność fosforybozylotransferazy nikotynamidowej (NAMPT) prowadząca do wzrostu poziomu NAD⁺.

Głównymi czynnikami transkrypcyjnymi odpowiedzialnymi za regulację ekspresji przynajmniej części czynników SASP jest czynnik transkrypcyjny NfκB oraz CEBPβ. Wykazano również udział w tym procesie innych białek, takich jak czynnik transkrypcyjny GATA4, ścieżka JAK-STAT i kinaza p38. Regulacja SASP odbywa się zarówno na poziomie epigenetycznym jak też potranslacyjnym. A zatem złożoność fenotypu sekrecyjnego komórek starych jest po części odzwierciedleniem bardzo zróżnicowanego procesu indukcji i produkcji czynników SASP (Sikora i współaut. 2021).

PEŁCZERZYKI ZEWNĄTRZKOMÓRKOWE – NOWI GRACZE W SEKRETOMIE KOMÓREK STARYCH

W ostatnich latach uwagę badaczy coraz częściej przykuwają pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (ang. extracellular vesicles, EVs), które odgrywają istotną rolę w komunikacji międzykomórkowej. Nic też dziwnego, że lawinowo zaczęły pojawiać się publikacje naukowe dostarczające dowodów, że również stare komórki wydzielają pęcherzyki unikatowe i charakterystyczne dla danego typu komórki. Zain-

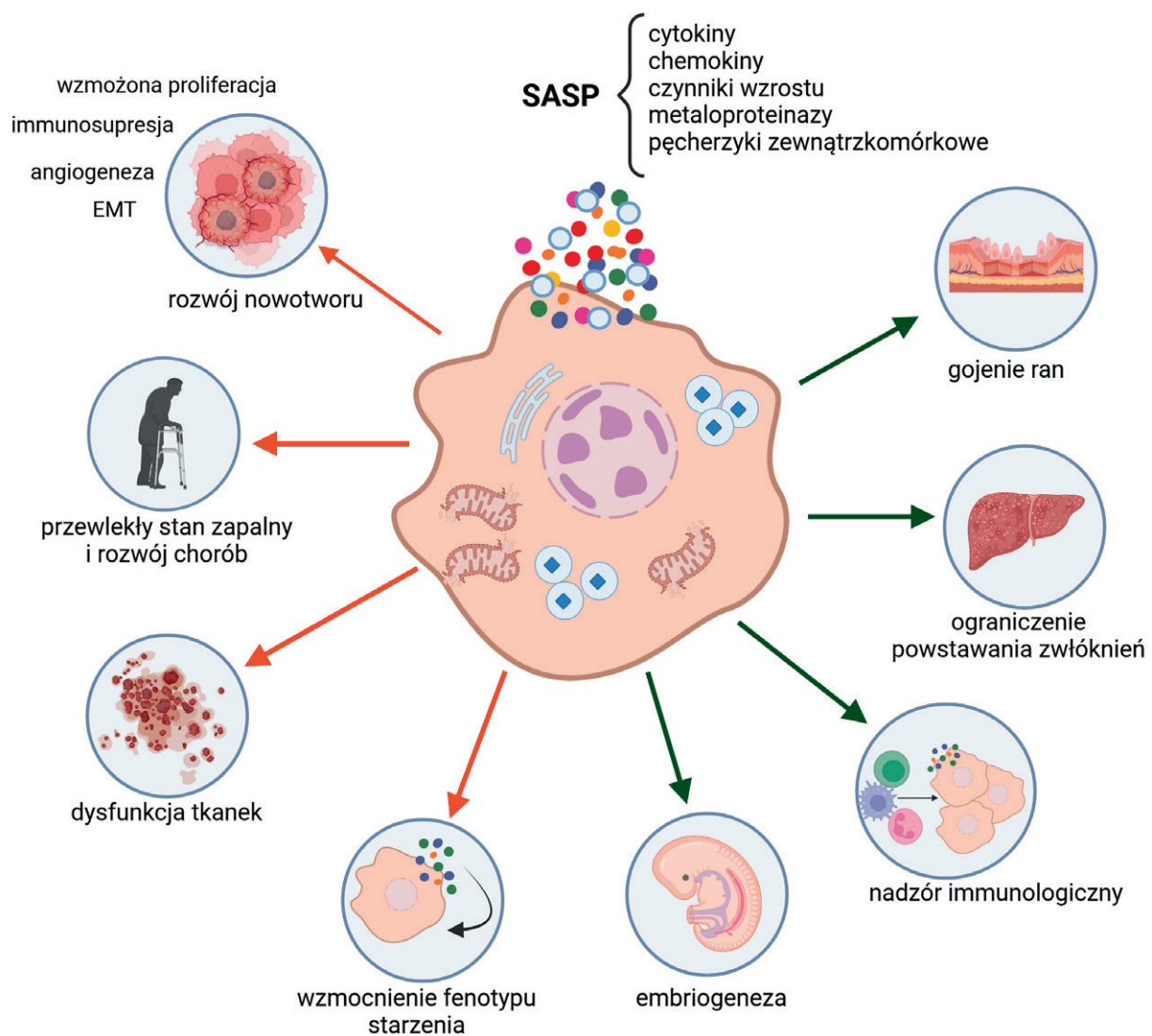
teresowanie tymi małymi (od 30 do ponad 200 nm), otoczonymi dwuwarstwą lipidową strukturami ma swoje głębokie uzasadnienie. Są one bowiem nośnikami różnych białek, kwasów nukleinowych, również tych o funkcji regulatorów ekspresji genów, lipidów oraz metabolitów. Pęcherzyki stanowią bardzo heterogenną grupę, różniącą się m.in. sposobem powstawania. Niektóre są tworzone z “pączkującej” na zewnątrz błony cytoplazmatycznej (tzw. mikropęcherzyki), a inne, nazywane egzosomami, tworzone są na drodze endosomalnej. Już sam fakt różnego pochodzenia pęcherzyków zewnątrzkomórkowych sprawia, że ich ładunek będzie zróżnicowany. Co więcej, pęcherzyki, dzięki swojej budowie, mogą bezpiecznie przemieszczać się na duże odległości nie będąc narażone na szybką degradację. Ponadto, poprzez białka znajdujące się na ich powierzchni, mogą oddziaływać na wybrane komórki docelowe. To, co dodatkowo podnosi ich znaczenie zwłaszcza w kontekście potencjalnych zastosowań terapeutycznych, to fakt, że istnieje stosunkowo bogaty arsenał związków chemicznych, które działają jako inhibitory sekrecji tych struktur. Podobny efekt można osiągnąć stosując metody inżynierii genetycznej np. wyciszenie genu kodującego białko Rab27a lub Alix, co znajduje zastosowanie w badaniach prowadzonych na modelach zwierzęcych i służy lepszemu poznaniu roli pęcherzyków w określonym kontekście biologicznym (Kalluri i LeBleu 2020).

Tak więc badania roli pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez komórki stare to bez wątpienia nowy rozdział w biogerontologii (Estevez-Souto i współaut. 2023). Wciąż pozostaje więcej pytań niż odpowiedzi. Na tym etapie badań nie budzący wątpliwości jest fakt, że komórki stare wydzielają kilka- do kilkunastukrotnie więcej EVsów niż komórki młode, oraz że skład tych pęcherzyków różni się w znacznym stopniu w zależności od typu komórki i induktora starzenia. Dowodzą tego również nasze badanie, w których porównywaliśmy między innymi proteom pęcherzyków wydzielanych przez komórki mięśni gładkich aorty indukowane do starzenia nadtlakiem wodoru oraz ulegające starzeniu replikacyjnemu (Głuchowska i współaut. 2022). Dotychczasowe badania pozwoliły wykazać, że pęcherzyki wydzielane przez komórki stare pośredniczą w indukcji starzenia komórkowego w komórkach biorcy. Co więcej, udało się zidentyfikować określone miRNA (miRNA 433, miR-21-5p, miR-217) oraz białko transbłonowe 3 indukowane interferonem (IFITM3) obecne w pęcherzykach wydzielanych przez komórki stare biorące udział w tym procesie. Dowiedziono również, że pęcherzyki wydzielane przez komórki stare mogą wspierać proliferację komórek nowotworowych, między in-

nymi poprzez przekazywanie komórkom nowotworowym receptora 2 dla efryny typu A (EPHA2) lub naskórkowego czynnika wzrostu (EGF) (Estevez-Souto i współaut. 2023). Jedna z najnowszych publikacji dowiodła również, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe wydzielane przez stare komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych są kluczowym elementem zmian zachodzących wraz z wiekiem w naczyniach krwionośnych, istotnie przyczyniając się do powstawania złogów białka medyny prowadzących do amyloidozy naczyń (Whitehead i współaut. 2023). Prowadzone przez nas badania pozwoliły na wykazanie, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe wydzielane przez ten sam typ starych komórek (komórki mięśni gładkich aorty) wpływa na wydzielanie przez limfocyty T i monocyty zwiększonej ilości

cytokin prozapalnych, co może mieć szczególne znaczenie w rozwoju zmian miażdżycowych w obrębie naczyń (Głuchowska i współaut. 2022).

Oprócz powyżej opisanych funkcji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych związanych z przekazywaniem sygnałów pomiędzy komórkami, pęcherzyki pełnią również funkcje homeostatyczne. Wykazano, że za ich pośrednictwem z komórki poddanej działaniu czynnika genotoksycznego usuwane są fragmenty uszkodzonego DNA, które wcześniej znalazły się w cytoplazmie. Zahamowanie sekrecji pęcherzyków prowadziło do akumulacji uszkodzonego DNA w cytoplazmie oraz aktywacji ścieżki sygnałowej cGAS/STING odpowiedzialnej za indukcję ekspresji cytokin prozapalnych (Takahashi i współaut. 2017).



Ryc. 2. Wpływ komórek starych na procesy zachodzące w organizmie. Opracowano za pomocą BioRender.com, na podstawie (Khalil i współaut. 2023).

Równie duże zainteresowanie, jak badania dotyczące roli pęcherzyków wydzielanych przez komórki stare, budzą doświadczenia dotyczące odmładzania tkanek, narządów czy wręcz całego organizmu z wykorzystaniem pęcherzyków wydzielanych przez komórki macierzyste. Są już pierwsze, obiecujące wyniki wskazujące, że podanie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez mezenchymalne komórki macierzyste myszom osłabiają starzenie tkanek i poprawiają parametry fizjologiczne w starzejącym się organizmie (Dorronsoro i współaut. 2021).

Wydaje się zatem, że to właśnie pęcherzyki zewnątrzkomórkowe mogą okazać się niezwykle cennym narzędziem pozwalającym w przyszłości na modyfikowanie starzenia komórkowego, a w konsekwencji również starzenia organizmu.

STARE KOMÓRKI JAKO CEL TERAPII PRZECIWSZARZENIOWYCH

Przełom w badaniach nad rolą starzenia komórkowego przyniósł rok 2011, kiedy to wykazano, że usunięcie komórek starych (komórki o podwyższonej ekspresji białka p16) opóźnia proces starzenia u myszy (Baker i współaut. 2011). Takiej selektywnej eliminacji komórek starych dokonano w organizmie myszy, która, w wyniku modyfikacji genetycznej, podlegała starzeniu przyspieszonemu. U takich myszy obserwowano szereg szybko rozwijających się zmian patologicznych, m.in. kataraktę, sarkopenię i lipodystrofię oraz znacząco skróconą długość życia. Wszystkie te parametry uległy znaczącej poprawie, gdy z organizmu usunięto komórki stare. Tak wybiórcze usunięcie komórek starych było możliwe dzięki wprowadzeniu do wszystkich komórek organizmu myszy konstruktów, który kodował białko zaangażowane w egzekucję procesu apoptozy – kaspazę. Ekspresja wprowadzonego genu zachodziła wyłącznie w komórkach, w których wzrastał poziom ekspresji p16 – marker komórek starych. W efekcie komórki stare o podwyższonym poziomie p16 ulegały samobójczej śmierci. W ślad za tymi badaniami pojawiły się kolejne, które wykazały, że usuwanie komórek starych z organizmu myszy, ulegającej naturalnemu a nie przyspieszonemu procesowi starzenia, przynosi podobne, bardzo pozytywne efekty (Baker i współaut. 2016). U takich myszy stwierdzono poprawę parametrów fizjologicznych, zmniejszoną zapadalność na nowotwory oraz zwiększenie średniej długości życia. Doświadczenia te dostarczyły po raz pierwszy bezpośrednich dowodów na to, że komórki stare mają faktycznie wpływ na starzenie organizmu, ale również, a może nawet przede wszystkim, wykazały, że

eliminacja komórek starych może być formą terapii przeciwstarzeniowej. Rolę jaką pełnią komórki stare w organizmie ilustruje rycina 2.

Czynniki SASP mogą w sposób autokryny wzmacniać starzenie komórkowe. Prowadzą także do patologicznych zmian w tkankach, przyczyniając się do rozwoju wielu chorób, jak również do utrzymującego się trwale na niskim poziomie przewlekłego stanu zapalnego. Przyczyniają się także do rozwoju nowotworów poprzez promowanie proliferacji komórek prenowotworowych i nowotworowych, działanie immunosupresyjne, stymulowanie angiogenezy oraz indukcję zmian nabłonkowo – mezenchymalnych (ang. epithelial-mesenchymal transition, EMT). Z drugiej strony czynniki SASP mogą wywierać pozytywny efekt na mikorodowisko np. ułatwiają gojenie ran, ograniczają powstawanie zwłóknień oraz biorą udział w embriogenezie. Wydzielane przez komórki stare czynniki SASP przyczyniają się także do rekrutacji komórek odpornościowych, zapewniając tym samym nadzór immunologiczny.

Starzenie organizmu to nie tylko postępujące, stopniowe osłabienie wydolności organizmu związane z dysfunkcją wszystkich narządów i tkanek. Wiąże się ono również ze zwiększoną zapadalnością na szereg przewlekłych i niestety często śmiertelnych chorób, które obecnie są główną przyczyną znaczącego pogorszenia się jakości życia osób w wieku podeszłym. Z tego też powodu naukowcy zajmujący się badaniem procesu starzenia na poziomie komórkowym szczególną uwagę poświęcali roli starzenia komórkowego w rozwoju chorób wieku podeszłego. Było to związane z głębokim przekonaniem, że stare komórki mogą być tym celem terapeutycznym, który pozwoli na leczenie patologii rozwijających się w różnych tkankach. Ważny też był aspekt metodyczny prowadzonych badań związany z możliwością wykorzystywania różnych zwierzęcych modeli eksperymentalnych chorób człowieka.

Liczne badania potwierdziły, że komórki stare gromadzą się w zwiększonej liczbie w obrębie tkanek podlegających zmianom patologicznym, co wykazano w przypadku takich chorób wieku podeszłego jak choroba Alzheimera i Parkinsona, choroby układu krążenia, zapalenie stawów, osteoporoza, cukrzyca, choroby nerek, marskość wątroby, idiopatyczne zwłóknienie płuc (Borghesan i współaut. 2020). Co więcej, wykazano, że przeszczepienie określonej, niewielkiej liczby komórek starych w okolice stawu skokowego zdrowym myszom prowadzi do rozwoju zmian chorobowych przypominających te obserwowane podczas zapalenia stawów (Xu i współaut. 2017). Stanowiło to bezpośredni dowód, że sama obecność komórek starych w liczbie,

która uniemożliwia sprawne zadziałanie mechanizmów kompensujących tkanki, prowadzi do jej dysfunkcji i rozwoju choroby. Badania prowadzone przez biogerontologów dostarczyły jednoznacznych dowodów, że wykorzystując różne mysie modele chorób człowieka umożliwiające usuwanie komórek starych, można opóźnić rozwój chorób związanych z wiekiem w tym: osteoporozy, miażdżycy, stłuszczenia wątroby, choroby zwyrodnieniowej stawów, idiopatycznego zwłóknienie płuc, stanów lękowych wywołanych otyłością, choroby neurodegeneracyjnych, cukrzycy typu 2 (Zhang i współaut. 2022).

Choć badania z wykorzystaniem genetycznie modyfikowanych organizmów okazały się bardzo użyteczne w ustaleniu roli starzenia komórkowego w organizmie, to jednak ich zastosowanie ograniczało się wyłącznie do prac prowadzonych w laboratoriach. Chcąc wykorzystać pozyskaną wiedzę w potencjalnych strategiach terapeutycznych rozpoczęto poszukiwania związków, które mogłyby selektywnie usuwać komórki stare. Jako istotną cechę komórek starych, która mogła by być celem działania poszukiwanych związków, wytypowano zwiększoną oporność na apoptozę tych komórek. Założono, że to dzięki aktywnym mechanizmom antyapoptotycznym oraz prożyciowym większość komórek starych pozostaje niewrażliwa na wydzielane przez nie czynniki SASP, które mogą indukować śmierć komórek podatnych na ich działanie. Poszukując takich związków przyjęto pewne kryteria, które miały na celu łatwiejsze wykorzystanie ich w badaniach klinicznych. Z tego też powodu do testów wybrano związki, które zostały już zaakceptowane do stosowania w terapii oraz mogą być podawane doustnie. W toku badań udało się wyselekcjonować trzy związki – dasatynib i kwercetynę oraz fizetynę. Dasatynib (D) to inhibitor kinaz tyrozynowych stosowany jako lek przeciwnowotworowy zaś fizetyna (F) i kwercetyna (Q) to flawonoidy występujące w roślinach (Chaib i współaut. 2022). Szczegółowe informacje dotyczące efektów stosowania tych związków zostały opisane w artykule tego wydania: „Związki pochodzenia naturalnego w przeciwdziałaniu starzenia”. Choć D+Q to najpowszechniej stosowane w badaniach związki eliminujące komórki stare czyli tzw. senolityki, nie są jedyne, które mają takie właściwości. Przebadano szereg związków, celujących w inne niż dasatynib i kwercetyna cele molekularne, prowadząc do tego samego efektu czyli śmierci komórki starej. Przykładem jest grupa związków chemicznych, które hamują działanie antyapoptotycznego białka Bcl-2, powodując uruchomienie programowanej śmierci komórki. Kolejny przykład to peptyd blokujący oddziaływanie czynnika transkrypcyjnego FOXO4 z białkiem p53, co

w efekcie prowadzi do przemieszczenia białka p53 z jądra do cytoplazmy i aktywacji apoptozy zależnej od p53. Senolityczne właściwości ma również inhibitor białka HSP90, który chroni przed proteasomalną degradacją prożyciowej kinazy AKT. Co istotne, pomimo bardzo obiecujących wyników wiadomo już, że nie wszystkie typy komórek starych są tak samo wrażliwe na określony senolityk. Stąd potrzeba poszukiwania nowych związków lub strategii mających na celu eliminację komórek starych.

Nowsze badania zmierzające do opracowania kolejnych związków o właściwościach senolitycznych wykorzystują takie cechy komórek starych, jak zwiększona masa lizosomów czy podwyższona aktywność SA- β -galaktozydazy. Próbuje się również wykorzystywać limfocyty T (limfocyty CAR T) wyposażone w zmodyfikowane receptory rozpoznające białka występujące na powierzchni komórek starych, dzięki czemu dochodzi do ukierunkowanej aktywacji komórek układu odpornościowego i eliminacji komórek docelowych (Chaib i współaut. 2022).

Aktualnie jest prowadzonych, lub niedawno zakończonych, przeszło 20 badań klinicznych testujących wykorzystanie wybranych senolityków w terapii chorób związanych z wiekiem. Testy dotyczą głównie takich chorób jak zapalenie stawów, przewlekła choroba nerek, zespół kruchości osób w wieku podeszłym, choroba Alzheimera, idiopatyczne zwłóknienie płuc oraz zmiany po przejściu COVID-19. Większość badań jest na etapie II fazy (Zhang i współaut. 2022).

Alternatywą do stosowania senolityków są związki, które hamują fenotyp sekrecyjny związany ze starzeniem, tzw. senomorfikami. Dzięki zidentyfikowaniu kluczowych ścieżek regulujących ekspresję przynajmniej części czynników SASP możliwe jest obniżenie ich poziomu. W tym celu, w warunkach eksperymentalnych, zastosowano z powodzeniem inhibitory czynnika transkrypcyjnego $\text{Nf}\kappa\text{B}$, kinazy mTOR, ścieżki JAK-STAT oraz elementów kompleksu 1 i 4 mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Wykazano, że użycie senomorfików obniża poziom prozapalnych cytokin zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Związkami o takim efekcie działania, które wydają się szczególnie obiecujące jest rapamycyna i jej analogi oraz metformina – lek przeciwcukrzycowy o szerokim spektrum działania (Chaib i współaut. 2022).

Stosowanie senomorfików, które z założenia nie prowadzi do usunięcia komórek starych ale osłabienia ich negatywnego wpływu, wiąże się z koniecznością długotrwałego ich podawania, co może wywoływać negatywne skutki uboczne takiej terapii. Wiadomo na przykład, że rapamycyna podawana

przez dłuższy czas może wywoływać nefrotoksyczność, zaburzenia metabolizmu oraz zwiększać podatność na infekcje. Takie działanie rapamycyny obserwowano co prawda przy zastosowaniu wyższych stężeń niż te, które wystarczają do hamowania SASP. Jednak wydaje się, że używanie senolityków, których pozytywny efekt można obserwować po kilkakrotnym zastosowaniu pojedynczej dawki może okazać się bezpieczniejsze.

STARZENIE KOMÓRKOWE

A NOWOTWÓR – DWIE

STRONY MEDALU

Udowodnienie tezy, że starzenie komórkowe leży u podstaw starzenia się organizmu, pomimo licznych, gromadzonych przez lata, lecz pośrednich dowodów wskazujących na istnienie takiej zależności zajęło naukowcom 50 lat. Dużo wcześniej udało się wykazać, że starzenie komórkowe jest procesem, które chroni komórki prawidłowe przed transformacją nowotworową, stanowiąc ważny mechanizm obrony przeciwnowotworowej organizmu. Pierwszych dowodów dostarczyły doświadczenia, w których wykazano, że ekspresja onkogenu HRASV12 w prawidłowych fibroblastach indukuje w nich proces starzenia, uniemożliwiając tym samym namnażanie komórek z genem promującym transformację nowotworową (Serrano i współaut. 1997). Dalsze badania dowiodły, że zaobserwowany proces starzenia komórkowego indukowanego onkogenem zachodzi również *in vivo* i ma istotny wpływ na ograniczanie rozwoju nowotworu. Wykazano na przykład, że w melanocytach występujących w znamionach dochodzi do starzenia indukowanego ekspresją zmutowanego onkogenu BRAF. W efekcie komórki te pozostają przez lata nieaktywne proliferacyjnie, co chroni przed progresją nowotworu i rozwojem czerniaka. Podobnie pozytywny efekt starzenia komórkowego obserwowano również w mysim modelu raka prostaty. W tym wypadku stwierdzono, że mutacja w genie kodującym białko Pten (supresor nowotworu) w komórkach nabłonka prostaty prowadzi do akumulacji komórek starych i chroni przed wzrostem guza związanym z rozwojem nowotworu złośliwego. Inaktywacja białka p53 kluczowego w procesie starzenia, powodowała znaczące przyspieszenie transformacji nowotworowej prowadzącej do śmierci zwierząt. Podobnie jak mutacje w genie Pten, również indukcja zmutowanego onkogenu K-ras wiązała się z powstawaniem łagodnych zmian przednowotworowych, w których zidentyfikowano liczne komórki stare. Rozwój bardziej złośliwego nowotworu – gruczolaka – możliwy był gdy w wyniku modyfikacji genetycznej usunię-

to locus genu Ink4/Arf, kodujący białko p16 (Braig i Schmitt 2006).

Obecność komórek starych na wczesnych etapach zmian nowotworowych pełni istotną rolę w hamowaniu rozwoju choroby nie tylko dzięki ograniczeniu proliferacji zmutowanych komórek. Pozytywną rolę mogą odgrywać również czynniki SASP. Z jednej strony, poprzez indukcję starzenia w komórkach sąsiadujących, prowadzą do wzmocnienia efektu hamowania wzrostu nowotworu, z drugiej strony aktywują przeciwnowotworową odpowiedź układu odpornościowego. Dowiodły tego badania przeprowadzone przez Xue i współaut. (Xue i współaut. 2007), w których wykazano, że czynniki SASP aktywowały odpowiedź wrodzoną układu odpornościowego przyczyniając się do eliminacji komórek nowotworowych i regresji guza. Oczywiście trzeba mieć świadomość, że SASP, jako niezwykle zróżnicowana grupa czynników, może mieć też niekorzystny wpływ na rozwój choroby, zwłaszcza gdy jego działanie jest długotrwałe. Aktywność enzymów macierzy zewnątrzkomórkowej, wchodzących w skład SASP'u może ułatwiać migrację komórek nowotworowych. Enzymy te prowadzą również do uwalniania niektórych cytokin i czynników wzrostu (np. czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego, z ang. VEGF, vascular endothelial growth factor), co promuje angiogenezę. Czynniki SASP stymulują proces przejścia epitelialno-mezenchymalnego komórek nowotworowych, co czyni je bardziej agresywnymi i zdolnymi do przerzutowania. Przyczyniają się również do wzmocnienia lokalnego stanu zapalnego oraz mogą hamować przeciwnowotworową odpowiedź komórek układu odpornościowego. Wydaje się zatem, że starzenie komórkowe może odgrywać szczególnie pozytywną rolę na wczesnych etapach kancerogenezy, zaś jego długotrwały wpływ na rozwój choroby jest zależny od kontekstu tkankowego i niejednoznaczny.

Rozwój nowotworu wiąże się z koniecznością przełamania mechanizmów obronnych do jakich na pewno zaliczamy starzenie komórkowe. Dowodzi tego chociażby fakt, że w wielu typach nowotworów obserwuje się mutacje w genach lub inaktywacje białek kluczowych dla procesu starzenia. Zmiany te dotyczą przede wszystkim inhibitora cyklinozależnych kinaz p16 oraz białka p53. W komórkach nowotworowych aktywna jest również telomeraza, zdolna do odbudowy telomerów, co jest konieczne dla podtrzymania aktywności podziałowej komórek nowotworowych. Pewnym zaskoczeniem była zatem obserwacja, że w komórkach nowotworowych można wywołać proces starzenia. Badania zapoczątkowane pod koniec lat 90. przez grupę Igora Roninsona dowiodły, że zdecydowana więk-

szość chemioterapeutyków prowadzi do starzenia komórek nowotworowych, a główną przyczyną jest indukcja uszkodzeń DNA (Chang i współaut. 1999). Stąd też wyróżniono nowy rodzaj starzenia, tzw. starzenie indukowane terapią (ang. Therapy Induced Senescence, TIS). Badania prowadzone *in vivo* z wykorzystaniem mysich modeli choroby nowotworowej pozwoliły na wykazanie, że zastosowanie chemioterapii prowadzi do indukcji starzenia w komórkach nowotworowych i przyczynia się do zwiększonej przeżywalności zwierząt poddanych leczeniu (Ewald i współaut. 2010). Również analizy tkanki nowotworowej pobranej od pacjentów leczonych lekami przeciwnowotworowymi dowiodły indukcji procesu starzenia w guzach, choć jego wpływ na pozytywny efekt terapii jest trudny do stwierdzenia (Saleh i współaut. 2023).

Pomimo iż uzyskane początkowo wyniki napały optymizmem a starzenie komórek nowotworowych było postrzegane jako cel ukierunkowanej terapii nowotworu, z czasem wątpliwości zaczął budzić fakt na ile starzenie komórek nowotworowych jest procesem nieodwracalnym. Pomimo dużych podobieństw na poziomie molekularnym starzenia komórek prawidłowych i nowotworowych wydaje się, że te procesy nie są tożsame. Przypuszcza się, że zmiany w istotnych dla indukcji starzenia ścieżkach sygnałowych związanych z mutacjami umożliwiającymi pełną transformację nowotworową mogą sprawiać, że stare komórki nowotworowe tylko pozornie przypominają ulegające starzeniu komórki prawidłowe. Tych różnic na poziomie molekularnym jest zapewne więcej i mogą dotyczyć również zmian epigenetycznych różnych dla starzenia komórek nowotworowych i prawidłowych. W efekcie obserwowane trwałe zahamowanie proliferacji, które uważa się za podstawową cechę komórki starej, w przypadku komórek nowotworowych może być tylko przejściowe, prowadzące do nawrotu choroby nowotworowej. W tym kontekście niezwykle istotnym jest pytanie, jakie mechanizmy aktywowane w trakcie indukcji procesu starzenia komórek nowotworowych umożliwiają wznowienie podziałów. Jednym z takich procesów, który może odgrywać kluczową rolę jest poliploidyzacja towarzysząca starzeniu komórek nowotworowych (Sikora i współaut. 2022). Proces poliploidyzacji był już wcześniej opisywany jako zjawisko występujące na początkowych etapach rozwoju nowotworu. Pojawianie się komórek poliploidalnych w różnych typach nowotworów poprzedza etap wznowy. Ponadto wykazano, że komórki poliploidalne mogą podlegać nietypowym – niezwiązanym z klasyczną mitozą – podziałom umożliwiając powstanie aktywnych proliferacyjnie komórek. Dowiedziono, że ko-

mórki potomne mogą charakteryzować się odmiennymi od komórki macierzystej cechami czyniącymi je bardziej agresywnymi, a w związku z tym niebezpiecznymi dla chorego. Wciąż pozostaje otwartym pytanie, na ile współwystępowanie obydwu procesów – poliploidyzacji i starzenia w komórce nowotworowej – jest konieczne aby możliwe było odzyskanie zdolności proliferacyjnych i wyjście ze starzenia? Niezależnie od odpowiedzi na to pytanie obecnie coraz częściej postrzega się stare komórki nowotworowe jako komórki “uśpione”, mające pewne cechy komórek macierzystych, które mogą ulec aktywacji i wznawiać podziały.

Mając powyższe na uwadze zaczęto postrzegać indukcję starzenia komórek nowotworowych jako pierwszy etap w dwustopniowym schemacie terapii (ang. One-two punch approach). Zakłada on wykorzystanie senolityków, które działając selektywnie na stare komórki nowotworowe, eliminują je z tkanki nowotworowej poddanej wcześniej chemio lub radioterapii. Obecnie prowadzone są intensywne badania przedkliniczne zarówno w modelach komórkowych *in vitro* raka płuc, piersi, jajnika, wątroby, okrężnicy, trzustki oraz białaczki jak i z wykorzystaniem mysich ksenograftów. Jako związki o działaniu senolitycznym testowane są zarówno inhibitory białek antyapoptotycznych z rodziny BCL jak również inhibitory pompy sodowo-potasowej, inhibitory kinazy mTOR oraz przeciwciała skierowane przeciwko białku PD-1 i PDL-1 oraz limfocyty CAR T. Niektóre z tych badań weszły już do etapu badań klinicznych I lub II fazy (Wang i współaut. 2022).

PODSUMOWANIE

Starzenie komórkowe jest niezwykle istotnym procesem odpowiedzi komórkowej na stres. Odgrywa ono ważną rolę na każdym etapie życia organizmu. Komórki stare, dzięki zróżnicowaniu fenotypu głównie wyrażającemu się w bogatym spektrum wydzielanych czynników, mogą aktywnie wpływać na mikrośrodowisko tkanki i funkcjonujące w ich otoczeniu komórki. Ponadto, mogą oddziaływać na komórki układu odpornościowego modyfikując ich funkcje zależnie od kontekstu tkankowego. Starzenie stanowi istotną barierę chroniącą organizm przed niekontrolowanym namnażaniem komórek, które w wyniku mutacji mogą ulec transformacji nowotworowej. Warunkiem pozytywnego wpływu komórek starych na funkcjonowanie tkanki jest ich określona obecność w czasie i miejscu. Wraz z wiekiem, obserwuje się niekontrolowane gromadzenia komórek starych w tkankach organizmu, co jest związane z upośledzonymi zdolnościami do elimi-

nacji tych komórek przez komórki układu odpornościowego oraz zwiększoną podatnością na czynniki stresowe. Komórki stare, które przez długi czas pozostają obecne w tkance i zaburzają jej prawidłowe funkcjonowanie, przyczyniają się do obniżenia zdolności regeneracyjnych, zaburzenia prawidłowej architektury tkanki, upośledzenia funkcji komórek, które nie uległy starzeniu oraz aktywowanie komórek układu odpornościowego zmierzające do powstania stanu zapalnego. Te zmiany obserwowane na poziomie tkanek przekładają się na dysfunkcje narządów związane ze starzeniem organizmu. Ponadto starzenie komórkowe promuje rozwój chorób związanych z wiekiem, przyczyniając się do powstania przewlekłego stanu zapalnego w starzejącym się organizmie oraz uczestniczą bezpośrednio w tworzeniu patologicznych zmian w obrębie tkanek i organów.

Dzięki licznym, od lat prowadzonym badaniom zmierzającym do poznania wyjątkowych cech komórek starych, możliwe stało się ich eliminowanie. Jest to bez wątpienia niezwykle obiecujący kierunek opracowania nowych strategii terapeutycznych różnych chorób wieku podeszłego. Eliminacja komórek starych daje również nadzieję na opóźnienie procesu starzenia i wydłużenie życia w zdrowiu. Ta perspektywa, choć wymaga jeszcze wielu badań naukowych i klinicznych, sprawia, że po przeszło 60. latach od odkrycia dokonanego przez Hayflicka, możemy mieć nadzieję na świadome wykorzystanie procesu starzenia do poprawy jakości i długości życia człowieka.

LITERATURA

- Baker D.J., Childs B.G., Durik M., Wijers M.E., Sieben C.J. i współaut., 2016. *Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan*. Nature 530:184–9. doi: 10.1038/nature16932.
- Baker D.J., Wijshake T., Tchkonja T., LeBrasseur N.K., Childs B.G. i współaut., 2011. *Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders*. Nature 479:232–6. doi: 10.1038/nature10600.
- Birch J., Gil J., 2020. *Senescence and the SASP: many therapeutic avenues*. Genes Dev 34:1565–1576. doi: 10.1101/gad.343129.120.
- Borghesan M., Hoogaars W.M.H., Varela-Eirin M., Talma N., Demaria M., 2020. *A Senescence-Centric View of Aging: Implications for Longevity and Disease*. Trends Cell Biol 30:777–791. doi: 10.1016/j.tcb.2020.07.002.
- Braig M., Schmitt C.A., 2006. *Oncogene-induced senescence: putting the brakes on tumor development*. Cancer Res 66:2881–4. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4006.
- Chaib S., Tchkonja T., Kirkland J.L., 2022. *Cellular senescence and senolytics: the path to the clinic*. Nat Med 28:1556–1568. doi: 10.1038/s41591-022-01923-y.
- Chang B.D., Broude E.V., Dokmanovic M., Zhu H., Ruth A. i współaut., 1999. *A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents*. Cancer Res 59:3761–7.
- d’Adda di Fagagna F., 2008. *Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response*. Nat Rev Cancer 8:512–22. doi: 10.1038/nrc2440.
- Demaria M., O’Leary M.N., Chang J., Shao L., Liu S. i współaut., 2017. *Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse*. Cancer Discov 7:165–176. doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-0241.
- Demaria M., Ohtani N., Youssef S.A., Rodier F., Toussaint W. i współaut., 2014. *An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA*. Dev Cell 31:722–33. doi: 10.1016/j.devcel.2014.11.012.
- Di Micco R., Fumagalli M., Cicalese A., Piccinin S., Gasparini P. i współaut., 2006. *Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication*. Nature 444:638–42. doi: 10.1038/nature05327.
- Dimri G.P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E.E. i współaut., 1995. *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A 92:9363–7. doi: 10.1073/pnas.92.20.9363.
- Dorransoro A., Santiago F.E., Grassi D., Zhang T., Lai R.C. i współaut., 2021. *Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles reduce senescence and extend health span in mouse models of aging*. Aging Cell 20:e13337. doi: 10.1111/acel.13337.
- Eggert T., Wolter K., Ji J., Ma C., Yevsa T. i współaut., 2016. *Distinct Functions of Senescence-Associated Immune Responses in Liver Tumor Surveillance and Tumor Progression*. Cancer Cell 30:533–547. doi: 10.1016/j.ccell.2016.09.003.
- Estevez-Souto V., Da Silva-Alvarez S., Collado M., 2023. *The role of extracellular vesicles in cellular senescence*. FEBS J 290:1203–1211. doi: 10.1111/febs.16585.
- Ewald J.A., Desotelle J.A., Wilding G., Jarrard D.F., 2010. *Therapy-induced senescence in cancer*. J Natl Cancer Inst 102:1536–46. doi: 10.1093/jnci/djq364.
- Głuchowska A., Cysewski D., Baj-Krzyworzeka M., Szatanek R., Weglarczyk K. i współaut., 2022. *Un-*

- biased proteomic analysis of extracellular vesicles secreted by senescent human vascular smooth muscle cells reveals their ability to modulate immune cell functions.* *Geroscience* 44:2863–2884. doi: 10.1007/s11357-022-00625-0.
- Gluck S., Guey B., Gulen M.F., Wolter K., Kang T.W. i współaut., 2017. *Innate immune sensing of cytosolic chromatin fragments through cGAS promotes senescence.* *Nat Cell Biol* 19:1061–1070. doi: 10.1038/ncb3586.
- Gong T., Liu L., Jiang W., Zhou R., 2020. *DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases.* *Nat Rev Immunol* 20:95–112. doi: 10.1038/s41577-019-0215-7.
- Hayflick L., 1965. *The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains.* *Exp Cell Res* 37:614–36. doi: 10.1016/0014-4827(65)90211-9.
- Hayflick L., Moorhead P.S., 1961. *The serial cultivation of human diploid cell strains.* *Exp Cell Res* 25:585–621. doi: 10.1016/0014-4827(61)90192-6.
- Herranz N., Gil J., 2018. *Mechanisms and functions of cellular senescence.* *J Clin Invest* 128:1238–1246. doi: 10.1172/JCI95148.
- Jun J.I., Lau L.F., 2010. *The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing.* *Nat Cell Biol* 12:676–85. doi: 10.1038/ncb2070.
- Khalil R., Diab-Assaf M., Lemaitre J.M., 2023. *Emerging Therapeutic Approaches to Target the Dark Side of Senescent Cells: New Hopes to Treat Aging as a Disease and to Delay Age-Related Pathologies.* *Cells*. 12: 915. doi: 10.3390/cells12060915.
- Kalluri R., LeBleu V.S., 2020. *The biology, function, and biomedical applications of exosomes.* *Science* 367. doi: 10.1126/science.aau6977.
- Korwek Z., Alster O., 2014. *Rola ścieżki odpowiedzi na uszkodzenia DNA w apoptozie i starzeniu komórkowym.* *Postepy Biochem* 60:248–62.
- Krishnamurthy J., Torrice C., Ramsey M.R., Kovalev G.I., Al-Regaiey K., i współaut., 2004. *Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging.* *J Clin Invest* 114:1299–307. doi: 10.1172/JCI22475.
- Krizhanovsky V., Yon M., Dickins R.A., Hearn S., Simon J. i współaut., 2008. *Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis.* *Cell* 134:657–67. doi: 10.1016/j.cell.2008.06.049.
- Krtolica A., Parrinello S., Lockett S., Desprez P.Y., Campisi J., 2001. *Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging.* *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12072–7. doi: 10.1073/pnas.211053698.
- Martini H., Passos J.F., 2023. *Cellular senescence: all roads lead to mitochondria.* *FEBS J* 290:1186–1202. doi: 10.1111/febs.16361.
- Munoz-Espin D., Canamero M., Maraver A., Gomez-Lopez G., Contreras J. i współaut., 2013. *Programmed cell senescence during mammalian embryonic development.* *Cell* 155:1104–18. doi: 10.1016/j.cell.2013.10.019.
- Narita M., Nunez S., Heard E., Narita M., Lin A.W. i współaut., 2003. *Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence.* *Cell* 113:703–16. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00401-X.
- Saleh T., Bloukh S., Hasan M., Al Shboul S., 2023. *Therapy-induced senescence as a component of tumor biology: Evidence from clinical cancer.* *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1878:188994. doi: 10.1016/j.bbcan.2023.188994.
- Salvioli S., Monti D., Lanzarini C., Conte M., Piazzi C. i współaut., 2013. *Immune system, cell senescence, aging and longevity-inflamm-aging reappraised.* *Curr Pharm Des* 19:1675–9.
- Saretzki G., 2018. *Telomeres, Telomerase and Aging.* *Subcell Biochem* 90:221–308. doi: 10.1007/978-981-13-2835-0_9.
- Sasaki M., Kumazaki T., Takano H., Nishiyama M., Mitsui Y., 2001. *Senescent cells are resistant to death despite low Bcl-2 level.* *Mech Ageing Dev* 122:1695–706. doi: 10.1016/S0047-6374(01)00281-0.
- Serrano M., Lin A.W., McCurrach M.E., Beach D., Lowe S.W., 1997. *Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a.* *Cell* 88:593–602. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81902-9.
- Sikora E., Bielak-Zmijewska A., Mosieniak G., 2021. *A common signature of cellular senescence; does it exist?* *Ageing Res Rev* 71:101458. doi: 10.1016/j.arr.2021.101458.
- Sikora E., Czarnecka-Herok J., Bojko A., Sunderland P., 2022. *Therapy-induced polyploidization and senescence: Coincidence or interconnection?* *Semin Cancer Biol* 81:83–95. doi: 10.1016/j.semcancer.2020.11.015.
- Takahashi A., Okada R., Nagao K., Kawamata Y., Hanyu A. i współaut., 2017. *Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells.* *Nat Commun* 8:15287. doi: 10.1038/ncomms15287.
- Toussaint O., Dumont P., Dierick J.F., Pascal T., Fripiat C. i współaut., 2000. *Stress-induced premature senescence. Essence of life, evolution, stress, and aging.* *Ann N Y Acad Sci* 908:85–98. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06638.x.
- Wang E., 1995. *Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved.* *Cancer Res* 55:2284–92.
- Wang L., Lankhorst L., Bernards R., 2022. *Exploiting senescence for the treatment of cancer.* *Nat*

- Rev Cancer 22:340–355. doi: 10.1038/s41568-022-00450-9.
- Whitehead M., Yusoff S., Ahmad S., Schmidt L., Mayr M. i współaut., 2023. *Vascular smooth muscle cell senescence accelerates median aggregation via small extracellular vesicle secretion and extracellular matrix reorganization*. Aging Cell 22:e13746. doi: 10.1111/acer.13746.
- Xu M., Bradley E.W., Weivoda M.M., Hwang S.M., Pirtskhalava T. i współaut., 2017. *Transplanted Senescent Cells Induce an Osteoarthritis-Like Condition in Mice*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 72:780–785. doi: 10.1093/gerona/glw154.
- Xue W., Zender L., Miething C., Dickins R.A., Hernando E. i współaut., 2007. *Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas*. Nature 445:656–60. doi: 10.1038/nature05529.
- Zhang L., Pitcher L.E., Yousefzadeh M.J., Niedernhofer L.J., Robbins P.D. i współaut., 2022. *Cellular senescence: a key therapeutic target in aging and diseases*. J Clin Invest 132. doi: 10.1172/JCI158450.