

Received: 2015.04.27
Accepted: 2015.11.30
Published: 2016.03.17

Molekularne podstawy komórkowego starzenia: fenomen Hayflicka 50 lat później*

Molecular bases of cellular senescence: Hayflick phenomenon 50 years later

Patrycja Sosińska, Justyna Mięka-Pietrasik, Krzysztof Książek

Katedra i Zakład Patofizjologii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie

Prawidłowe ludzkie komórki somatyczne mają bardzo ograniczone możliwości podziałowe, po wyczerpaniu których wchodzą w fazę starzenia. Uważa się, że proces starzenia się komórek jest odpowiedzią na rozległe i nieodwracalne uszkodzenia DNA, umiejscowione w obrębie telomerowych i/lub nietelomerowych sekwencji genomu. Gromadzenie się tego typu uszkodzeń jest spowodowane przede wszystkim przez stres oksydacyjny, narastający w związku z upośledzeniem funkcji mitochondriów. Komórki stare gromadzą się w tkankach w miarę starzenia organizmu, co jest związane przyczynowo z rozwojem wielu chorób wieku podeszłego, w tym choroby nowotworowej. Celem pracy, przygotowanej dokładnie 50 lat po odkryciu przez Leonarda Hayflicka związków między starzeniem się komórek a starzeniem organizmu jako całości, jest przedstawienie stanu wiedzy na temat molekularnych uwarunkowań starzenia na poziomie komórkowym, ze szczególnym uwzględnieniem roli stresu oksydacyjnego, efektorów starzenia w cyklu komórkowym, markerów tego procesu oraz wpływu komórek starych na rozwój określonych patologii związanych z wiekiem.

Słowa kluczowe:

onkogeneza • starzenie komórkowe • telomery • uszkodzenia DNA

Summary

Normal human somatic cells have strictly limited proliferative capacity and reach a state of senescence when it becomes exhausted. It is believed that senescence is a response to extensive and irreparable DNA injury, localized in telomeric and/or non-telomeric regions of the genome. Main cause of this damage is oxidative stress, increasing due to deteriorated function of mitochondria. Senescent cells accumulate in tissues during aging, which is causatively linked with the development of various pathologies in elderly individuals, including cancer. This paper, prepared exactly 50 years after Leonard Hayflick's discovery of the relationship between cellular senescence and organismal aging is aimed at presenting the current knowledge about molecular determinants of senescence, with particular emphasis paid to the role of oxidative stress, effectors of senescence at the level of cell cycle, markers of this phenomenon, and the effect of senescent cells on the development of certain age-related diseases.

Key words:

cellular senescence • DNA damage • oncogenesis • telomeres

* Badania prowadzone przez autorów pracy są finansowane ze środków przyznanych na naukę przez Narodowe Centrum Nauki (#2014/15/B/NZ3/00421).

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?CID=1197485>

Word count: 4198
Tables: 1
Figures: 3
References: 120

Adres autora: prof. dr hab. n. med. Krzysztof Książek, Katedra i Zakład Patofizjologii, ul. Rokietnicka 8, 60-806 Poznań, tel. 61 8547-624; e-mail: kksiazek@ump.edu.pl

WPROWADZENIE

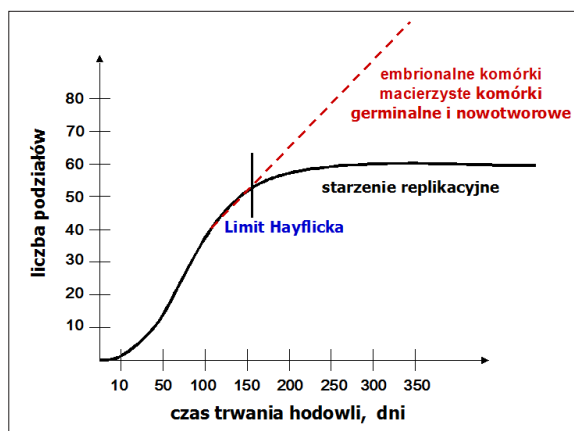
Współczesna nauka oferuje wiele definicji procesu starzenia, a dobór odpowiedniej jest zwykle podyktowany konkretnym aspektem życia organizmu, którego ten proces dotyczy. Pod względem biologicznym, zjawisko to można określić jako zespół dynamicznych zmian, zależnych od upływu czasu oraz czynników środowiskowych, działających na poziomie strukturalnym i czynnościowym ustroju [67]. Tak wyrażona definicja podkreśla uniwersalizm oraz fizjologiczną rolę tego procesu. W aspekcie medycznym, starzenie oceniane jest raczej pejoratywnie, co wynika z towarzyszącego mu wzrostu częstości występowania wielu chorób związanych z wiekiem (age-related diseases), znacząco pogarszających jakość i limitujących długość życia osób starszych [77]. Aby zrozumieć naturę zmian zachodzących w przebiegu starzenia, najczęściej sięga się do modeli komórkowych, które stanowią swoisty „mikroświat”, odzwierciedlający prawidłowości rządzące całymi organizmami. Pamiętając, że w ubiegłym roku minęło 50 lat, odkąd po raz pierwszy powiązано wyczerpanie potencjału podziałowego komórek z procesem starzenia się organizmu człowieka jako całości [42], wartym wydaje się przedstawienie aktualnego stanu wiedzy na temat molekularnych mechanizmów rządzących starzeniem komórkowym, jak również związków między tym zjawiskiem a rozwojem wielu chorób związanych z wiekiem, w tym choroby nowotworowej.

KOMÓRKOWY MODEL STARZENIA

Starzenie należy do procesów złożonych i jest wypadkową zjawisk biochemicznych i fizjologicznych, przebiegających na różnych poziomach organizacji ustroju, od pojedynczej komórki, do tkanek i narządów włącznie. W zgodnej opinii, proces starzenia, przebiegający na poziomie komórkowym, jest jednym z najlepszych modeli badań tego zjawiska, co wynika z możliwości dogłębnego wnikięcia w zdarzenia molekularne, zachodzące na poziomie makrocząsteczek, jak również poddawania komórek odpowiednim manipulacjom (np. wpływowi czynników środowiskowych, interwencjiom genetycznym), pozwalającym na identyfikację w metabolizmie komórek tych zmian, które mogą być bezpośrednią przyczyną lub skutkiem procesu starzenia.

Jednym z pionierów badań nad starzeniem się komórek *in vitro* był francuski chirurg, Alexis Carrel [18], którego

prace wniosły do ówczesnej wiedzy o starzeniu nie tyle treści merytoryczne (patrz: słynny „błąd Carrel’a” [114]), co raczej powszechne zainteresowanie tym zjawiskiem. Właściwie podwaliny współczesnej biogerontologii stworzyli dopiero jednak w latach sześćdziesiątych XX w. Leonard Hayflick i Paul Moorhead, którzy jako pierwsi dowiedli, że prawidłowe ludzkie komórki somatyczne mają ograniczone możliwości podziałowe *in vitro*, których kulminacją jest ich wejście w fazę replikacyjnego starzenia (replicative senescence) (ryc. 1) [42,43].



Ryc. 1. Schemat ilustrujący ograniczony potencjał podziałowy prawidłowych komórek somatycznych

MECHANIZMY STARZENIA SIĘ KOMÓREK SOMATYCZNYCH

Starzenie replikacyjne zależne od zmian długości i budowy telomerów

Unikatową cechą komórek eukariotycznych jest obecność tandemowych, swoistych gatunkowo powtórzeń na końcach chromosomów, zwanych telomerami. Struktury te nie zawierają sekwencji kodujących, a ich funkcja polega na stabilizacji i ochronie dystalnych odcinków chromosomów przed spontanicznym łączeniem się i degradacją wskutek działania nukleaz [11]. Rolę tę telomery pełnią dzięki zdolności do przyjmowania zdefiniowanej przestrzennie struktury dwuniciowej pętli t (t-loop), stabilizowanej białkami POT (protection of telomeres), TRF1/2 (telomeric repeat binding factor 1/2) i TIN2 (TRF1-interacting protein 2), wchodzącymi w skład tzw. kompleksu



szeltery, którego zadaniem jest osłanianie niesparowanego końca 3' chromosomu (3' overhang) [70].

Próby określenia biologicznego znaczenia telomerów zostały zapoczątkowane w latach trzydziestych ub.w. przez Hansa Mullera. Po trwających ponad pięćdziesiąt lat badaniach, w 1988 r. ustalono sekwencję, charakterystyczną dla odcinków telomerowych człowieka (5'-TTAGGG-3') [74]. Niespełna dwa lata później, Calvin Harley, Bruce Futcher oraz Carol Greider wykazali, że oprócz funkcji ochronnej, telomery można uznać za swoisty dla komórki „licznik podziałów”. Tezę tę oparto na obserwacjach podziałów mitotycznych fibroblastów, którym towarzyszyło sukcesywne skracanie telomerowego DNA, oszacowane na około 50-200 par zasad (bp) na podział [41]. Uzyskane wyniki badań były bezpośrednim potwierdzeniem zasugerowanego już w latach 70 ub.w., niezależnie od siebie, przez Aleksieja Olovnikova [83] i Jamesa Watsona [113] tzw. problemu końca replikacji, którego istotą jest niezdolność polimerazy DNA do całkowitej replikacji dystalnych odcinków chromosomów. W jego wyniku, po osiągnięciu pewnej krytycznej długości telomeru [2], niezapewniającej już dalszej ochrony kodujących sekwencji DNA, komórka nieodwracalnie opuszcza cykl podziałowy i wchodzi w fazę starzenia [37,84].

W niektórych typach komórek, postępującej erozji telomerów przeciwdziała aktywność enzymu z rodziny odwrotnych transkryptaz, telomerazy [38]. Enzym ten występuje w postaci kompleksu rybonukleoproteinowego, który katalizuje przyłączanie powtórzeń TTAGGG w obrębie końcowych fragmentów liniowych chromosomów [33]. Aktywna postać enzymu składa się z kompleksu podjednostki hTR (hTERC), złożonej z cząsteczki RNA, komplementarnej do telomerowej sekwencji genomu oraz z podjednostki katalitycznej hTERT [36]. W większości ludzkich komórek somatycznych ekspresja genu kodującego hTERT jest zahamowana, co uniemożliwia tworzenie aktywnego kompleksu z hTR/hTERC i jest przyczyną osiągnięcia przez komórkę fazy replikacyjnego starzenia. Wyjątek stanowią komórki germinalne i embrionalne komórki macierzyste [20]. Niewielką aktywnością tego enzymu cechują się też keratynocyty [53], komórki mezotelium otrzewnowego [58] oraz komórki nabłonka stercza [9].

Szczególną grupą komórek, cechujących się dużą aktywnością telomerazy są komórki nowotworowe, w których odbudowa telomerów i związane z tym unikanie procesu starzenia jest jednym z najważniejszych czynników warunkujących ich niekontrolowaną ekspansję [100]. Wykazano, że mechanizm zależnej od telomerazy rekonstrukcji telomerów dotyczy około 90% nowotworów [75]. Pozostała część komórek złośliwych, w tym nowotwory pochodzenia mezenchymalnego, podlegają alternatywnemu procesowi wydłużania telomerów (alternative lengthening of telomeres; ALT), w którym odbudowa końcowych odcinków chromosomów zachodzi na skutek rekombinacji homologicznej [30].

Niedawne badania wskazują, że elementem decydującym o wejściu komórki w stadium starzenia, poza sukcesywną

utrata telomerowego DNA, mogą być zmiany strukturalne w obrębie pętli telomeru, na jego końcu 3'. Mechanizm tych zmian obejmuje stopniową utratę stabilności pętli, która prowadzi do niekontrolowanej ekspozycji bogatego w reszty guaniny końca telomeru na składniki nukleoplazmy, czego skutkiem jest zainicjowanie starzenia się komórek niewykazujących ekspresji aktywnej postaci telomerazy [63]. Istotną rolę dystalnych odcinków telomerów w indukcji starzenia potwierdzają obserwacje wskazujące na indukcyjną rolę jednoniciowego fragmentu guanozynowego w aktywacji ścieżki sygnalizacyjnej starzenia, zależnej od białka p53 [97]. Dodatkowego potwierdzenia roli zaburzenia struktury końca 3' telomeru w indukcji starzenia dostarczyły badania z wykorzystaniem wektora adenowirusowego, zawierającego sekwencję TRF2^{AD}, której ekspresja wywołała dekompozycję struktury przestrzennej fragmentu 3', prowadzącą do trwałej blokady cyklu komórkowego, związanej z nadekspresją białka p16^{ink4A} oraz hipofosforylacją białka retinoblastoma (pRb) [63].

Stres oksydacyjny a starzenie zależne od zmian długości telomerów

Liczne obserwacje wskazują, że poza problemem końca replikacji, postępująca destrukcja telomerowego DNA może również zachodzić z powodu długotrwałej ekspozycji komórek na czynniki stresogenne, szczególnie na stres oksydacyjny [6]. Jednym z bezpośrednich następstw ekspozycji DNA na reaktywne formy tlenu (RFT) są uszkodzenia w obrębie, szczególnie wrażliwej na utlenianie, sekwencji bogatej w guaniny na końcach 3' telomerów [108]. Dochodzi do akumulacji jedno- oraz dwuniciowych pęknięć DNA w regionach telomerowych, stanowiących bezpośrednią przeszkodę w kontynuacji syntezy nici potomnej i przesłankę do natychmiastowego przerwania replikacji [109]. Potwierdzenia wpływu stresu oksydacyjnego na skracanie się telomerów dostarczyły eksperymenty wykonane na fibroblastach, hodowanych w warunkach hiperoksji (40% tlenu), w przebiegu których stwierdzono znamieny wzrost tempa fazy replikacyjnego starzenia przez komórki, które następowało zwykle po zaledwie kilku rundach replikacji. Na poziomie molekularnym, wymiernym skutkiem zastosowanych warunków hodowlanych było nasilenie tempa skracania się telomerów, które osiągały długość krytyczną, porównywalną z komórkami utrzymywanymi w warunkach prawidłowego ciśnienia parcjalnego tlenu, przy znacząco niższej liczbie przeżytych podziałów [110].

Efektory starzenia zależnego od zmian długości telomerów

Głównym mediatorem, odpowiedzialnym za reakcję komórki na rozległe uszkodzenia telomerowego DNA (rozpoznanego jako pęknięcia dwuniciowe) jest białko p53. Białko to należy do głównych supresorów kancerogenezy i jest jednym z najbardziej znanych czynników mediujących replikacyjne starzenie się komórki [47]. Proces aktywacji białka p53 może przebiegać za pośrednictwem przyłączenia reszt acetylowych do jego końca karboksylowego, modulowanego przez czynnik związany z białkiem

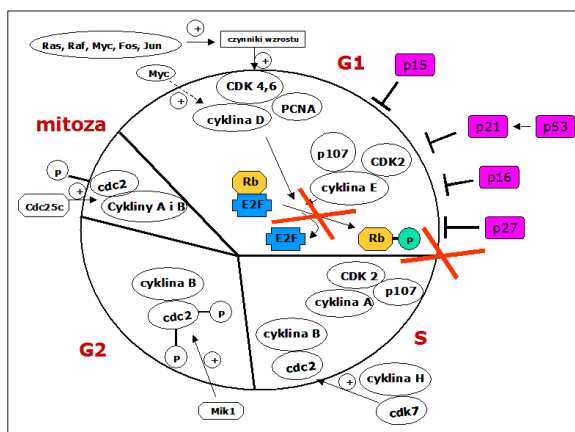
p300/CBP oraz w wyniku fosforylacji N-końca cząsteczki, w której główną rolę odgrywają kinazy ATM i DNA-PK [63]. W ostatnim z mechanizmów indukcji p53, istotną funkcję pełni białko onkogenne Mdm2 (murine double minute 2), które jest zdolne do wiązania się z jego domeną transaktywacyjną i blokowania jego zdolności do hamowania cyklu komórkowego oraz indukcji apoptozy [73]. Dzięki aktywności ligazy ubikwitynylowej, białko Mdm2 bierze udział w modyfikacji p53 i pośredniczy w kierowaniu go na drogę degradacji w proteosomach [102]. Białko p53 może pośredniczyć w aktywacji białka Mdm2 na poziomie transkrypcji, co sugeruje występowanie ujemnego sprzężenia zwrotnego, kontrolującego utrzymywanie obu białek na niskim poziomie, a to jest szczególnie istotne w warunkach braku obecności stresów komórkowych [73].

W komórkach starych aktywacja białka p53 indukuje powstanie w telomerach ognisk uszkodzeń DNA związanych ze starzeniem (senescence-associated DNA damage foci; SDF), których objawem jest obecność ufosforylowanej postaci histonu H2A.X (γ -H2A.X), białek 53BP1 oraz MRE11 [4]. Powstanie licznych SDF wywołuje rekrutację oraz aktywację kinaz ATM, które bezpośrednio lub z udziałem kinaz Chk2, katalizują przyłączenie reszty fosforanowej do białka p53, doprowadzając do rozpadu kompleksu p53-Mdm2 i aktywacji p53 [111].

Efektorem działania białka p53 jest regulator cyklu komórkowego p21^{Cip1}, który przez wiązanie z cyklozależnymi kinazami CDK4 i CDK6 oraz kompleksem CDK2-cykliną E, powoduje ich dezaktywację, czego następstwem jest zahamowanie fosforylacji białka pRb [44]. Hipofosforylowana postać białka pRb bierze udział w wiązaniu czynnika Mdm2, uniemożliwiając mu połączenie się z białkiem p53 i jego degradację. Dodatkowym elementem promującym zatrzymanie podziałów komórkowych jest bezpośrednie oddziaływanie białka p21^{Cip1} z jądrowym antygenem komórek proliferujących (Proliferating Cell Nuclear Antigen; PCNA) oraz innymi regulatorami, takimi jak kinazy MEKK5 (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 5), SAPK (Stress-Activated Protein Kinase) i kalmodulina [96]. Główna rola białka p21^{Cip1} w indukcji starzenia została potwierdzona w badaniach przeprowadzonych na fibroblastach, w których komórki z zablokowaną ekspresją genu p21^{Cip1} nie były zdolne do zaprzestania podziałów. Wykazano także, że w efektywnej odpowiedzi komórki na uszkodzenia genomu, niezbędny jest udział obydwu białek (p53 i p21^{Cip1}), gdyż w warunkach braku aktywnej postaci białka p53, aktywacja p21^{Cip1} może nie nastąpić [45].

Badania poświęcone roli białka p21^{Cip1} w komórce wykazały, że poza ważną rolą efektorową w procesie generowania przez białko p53 swoistej odpowiedzi komórkowej, wywoływanej uszkodzeniem telomerowego DNA, istnieje mechanizm alternatywnej aktywacji p21^{Cip1} w szlaku niezależnym od p53. Występowanie tego zjawiska stwierdzono w warunkach ekspozycji komórek na działanie mionozyny oraz transformującego czynnika wzrostu β 1 [3,25]. Wskazuje się, że występująca w tym przypadku regulacja syntezy białka p21^{Cip1} zachodzi w wyniku bezpośredniego

oddziaływania aktywatorów transkrypcyjnych na jego region promotorowy lub przez modulację stabilności zarówno na poziomie mRNA jak i białka [35]. Warto dodać, że następujący w odpowiedzi na różnorodny czynnik stresowy wzrost ekspresji p21^{Cip1}, niezwiązany z białkiem p53, ma charakter przejściowy, a ostateczne osiągnięcie przez komórkę fazy starzenia wymaga postępującej po sobie aktywacji białek p53 i p21^{Cip1} [96]. Obecnie uważa się, że wzrost ekspresji p21^{Cip1} w mechanizmie p53-niezależnym jest swoisty dla określonych warunków fizjologicznych i pełni istotną funkcję w tymczasowym hamowaniu cyklu komórkowego, poprzedzającym proces różnicowania się komórek [69] (ryc. 2).



Ryc. 2. Regulacja replikacyjnego starzenia, związanego ze skracaniem się telomerów na poziomie cyklu komórkowego. Kolorem oznaczono zjawiska o kluczowym znaczeniu dla zatrzymania progresji cyklu na etapie fazy G1, w tym zahamowanie fosforylacji białka pRb oraz aktywność białkowych inhibitorów cyklu

Starzenie replikacyjne niezależne od zmian długości telomerów

Na podstawie badań *in vitro* wykazano, że w niektórych typach komórek proces starzenia zachodzi bez wykrywalnych zmian w budowie i długości telomerowego DNA [53] (ryc. 3). Obserwację potwierdzono w komórkach nabłonkowych gruczołu piersiowego, stercza oraz keratynocytów, w których ektopowa ekspresja podjednostki katalitycznej hTERT okazała się niewystarczająca – w przeciwieństwie do komórek starzejących się w sposób telomerozależny – do ich uniesmiertelnienia. Osiągnięto to dopiero wówczas, gdy ekspresję hTERT połączono z zahamowaniem aktywności białka p16^{Ink4A} [54]. Cytowane badania stały się przyczynkiem do stwierdzenia, że starzenie się komórek pochodzenia nabłonkowego przebiega zupełnie innym szlakiem niż inicjowany destrukcją telomerowego DNA oraz działaniem układu białek p53-p21^{Cip1}.

Poza obecnością niezależnego od zmian długości telomerów mechanizmu kontrolującego inicjację procesu replikacyjnego starzenia, cechą charakterystyczną komórek nabłonkowych jest posiadanie znacząco niższego potencjału proliferacyjnego w porównaniu z komórkami, któ-



rych replikacja zależy od zmian długości i budowy końcowych odcinków chromosomów. Możliwości podziałowe komórek nabłonkowych zazwyczaj wynoszą około 10-20 podwojeń populacji, podczas gdy średni limit Hayflicka osiągnięty przez starzejące się w sposób telomerodependentny fibroblasty, mieści się w granicach 40-90 podziałów [54,89].

Rola białka p16^{Ink4A} w starzeniu telomeroniezależnym

Badania przeprowadzone na komórkach, w których proces starzenia przebiegał bez zmian długości telomerów wykazały, że rolę głównego efektorów ich starzenia na poziomie cyklu komórkowego może pełnić białko p16^{Ink4A} [54,89]. Mechanizm indukcji starzenia z udziałem białka p16^{Ink4A} zachodzi przez jego przyłączenie do kinaz zależnych od cyklin i blokowanie tworzenia kompleksów CDK4 i CDK6 z cykliną D, powodując hamowanie fosforylacji białka pRb i zatrzymanie cyklu komórkowego na etapie fazy G1 [68]. Do najważniejszych czynników, mających zdolność indukcji białka p16^{Ink4A} należą: kinazy białkowe aktywowane mitogenami (Mitogen-Activated Protein Kinase; MAPK) [64], ekspresja onkogenu Ras [98], uszkodzenia DNA wywołane działaniem leków (bleomycyny i aktynomycyny D) [92], nieoptymalne warunki hodowlane [89] oraz zmiany strukturalne w obrębie pętli telomeru [104].

W czasie procesu starzenia, indukcja białka p16^{Ink4A} następuje później niż aktywacja białek p53 i p21^{Cip1} [48,105]. Jest to zgodne z wynikami doświadczeń wykorzystujących hybrydyzację fluorescencyjną *in situ* (FISH), które wykazały, że ekspresja tego białka narasta w sposób gwałtowny dopiero w komórkach z późnych pasażu [76]. Dużą w tym rolę odgrywa czynnik transkrypcyjny Ets1, którego ekspresja także wzrasta w komórkach starych, prowadząc do zahamowania aktywności białka Id1, będącego represorem p16^{Ink4A} [82]. Rolę inhibitora białka p16^{Ink4A} pełni również białko Bmi-1, którego udział w hamowaniu ekspresji p16^{Ink4A} wykazały badania Jacobsa i wsp., w których opisano indukcję przedwczesnego starzenia się komórek z wyciszoną ekspresją Bmi-1 [49]. Guney i wsp. wykazali natomiast, że zablokowanie aktywności białka p16^{Ink4A} zależne od czynnika Bmi-1 wymaga aktywacji ścieżki sygnalizacyjnej onkoproteiny c-Myc [39].

Interesujących informacji, rzucających nowe światło na znaczenie białka p16^{Ink4A} w komórkowym starzeniu, dostarczyły także badania Beausejoura i wsp., którzy wykorzystując technikę transfekcji lentiwirusowej do regulacji poziomu ekspresji mediatorów starzenia p53 i p16^{Ink4} dowiedli, że komórki stare, cechujące się dużym stężeniem białka p16^{Ink4} pozostają niezdolne do proliferacji, mimo inaktywacji w nich białka p53. W przeciwieństwie do nich, komórki o niskiej ekspresji p16^{Ink4}, w których inaktywowano białko p53 podejmowały zaprzestaną wcześniej aktywność mitotyczną, co sugeruje, że rolą p16^{Ink4} w komórkach starych jest nie tylko blokowanie podziałów komórkowych, lecz także, a może nawet przede wszystkim, zapewnianie permanentności tego stanu [8]. Spo-

strzeżenie to jest szczególnie ważne ze względu na to, iż wzrost ekspresji białka p16^{Ink4} następuje nie tylko w komórkach starzejących się w sposób niezależny od telomerów, lecz zachodzi także np. w fibroblastach [82], w których krótko po wejściu w fazę starzenia, ekspresja białka p21^{Cip1}, współdziałającego z p53 w blokadzie cyklu, ulega stopniowemu obniżeniu [105].

Starzenie przedwczesne indukowane stresem

Istnieje wiele dowodów na to, że w określonych sytuacjach proces starzenia może zostać wywołany na długo przed osiągnięciem przez komórki typowej dla nich maksymalnej liczby podziałów. Zjawisko określa się mianem starzenia przedwczesnego indukowanego stresem (stress-induced premature senescence; SIPS) występuje najczęściej w rezultacie ekspozycji komórek na niesprzyjające warunki hodowli *in vitro* (tzw. szok hodowlany), jak również może być wynikiem zadziałania na komórki różnego rodzaju stresorów [81,107].

Jako szok hodowlany rozumie się wiele bodźców, którym komórki podlegają po izolacji z organizmu i przeniesieniu do środowiska hodowlanego *in vitro*. Do najważniejszych z nich można zaliczyć: wzrost na powierzchniach plastikowych, brak heterogennych oddziaływań międzykomórkowych, nieoptymalny skład pożywki, jak również utrzymywanie hodowli w warunkach hiperoksji [101]. Badania wykonane na ludzkich komórkach nabłonkowych, wzrastających na warstwie odżywczej, utworzonej z fibroblastów traktowanych mitomycyną C wykazały, że optymalizacja podłoża wzrostowego powoduje dwukrotny wzrost potencjału replikacyjnego komórek, czemu towarzyszyło obniżenie poziomu ekspresji białka p16^{Ink4A} [89].

Odrębną grupą czynników, odpowiedzialnych za rozwój SIPS są mutacje, prowadzące do aktywacji wielu proto-onkogenów, np. Ras, Raf, Mos, PTEN, NF1 [24]. Szczególnie interesującym induktorem SIPS jest onkogen Ras, odpowiedzialny za przekazywanie mitogennych sygnałów z receptora tyrozynowego przez wiązanie cząsteczki GTP [12]. Badania potwierdziły, że ekspresja Ras w komórkach powoduje rozwój przedwczesnego starzenia, którego bezpośrednim następstwem jest zwiększenie aktywności białek p16^{Ink4A} i p53 oraz trwałe zatrzymanie podziałów, w typowej dla replikacyjnego starzenia fazie G1 [98].

Wiele obserwacji wskazuje, że jednym z czynników bezpośrednio zaangażowanych w rozwój procesu SIPS jest akumulacja RFT w komórce. Potwierdzają to m.in. badania na fibroblastach, których hodowla w warunkach małej prężności tlenu umożliwiła komórkom skuteczne ominięcie fazy starzenia, wywoływanej działaniem onkogenu Ras [62]. Natomiast inaktywacja genu *seladyny-1*, pełniącej rolę sensora poziomu stresu oksydacyjnego, efektywnie zahamowała starzenie komórek zależne od aktywności Ras, doprowadzając do transformacji [116]. Na podstawie tych obserwacji wysunięto tezę, że indukcja SIPS jest dynamiczną odpowiedzią komórki na

działanie czynników, mogących wywołać rozwój zmian neoplastycznych [98]. Z tego też powodu, zarówno wywołane podziałami mitotycznymi replikacyjne starzenie się komórek somatycznych, jak również indukowane działaniem różnego typu stresorów SIPS, uznawane są za utrwalony ewolucyjnie mechanizm supresji nowotworów [14].

FENOTYP KOMÓREK STARYCH

Komórki, które osiągnęły fazę starzenia, czy to na skutek przebycia krytycznej liczby podziałów, czy też pod wpływem określonych stresorów, w sposób zasadniczo różnią się od komórek proliferujących wieloma cechami morfologicznymi i czynnościowymi, określanymi wspólnym mianem fenotypu komórek starych [93]. Do najbardziej klasycznych cech komórek starych należą: zwiększenie rozmiarów (hipertrofia), spłaszczenie, utrata jednolitego kształtu, wielojądrzastość i wakuolizacja [10,43,51]. Oprócz tego, może dochodzić do agregacji białek w retikulum endoplazmatycznym, przy jednoczesnym zmniejszeniu ekspresji białek opiekuńczych BiP, biorących udział w ich fałdowaniu [80]. Wzrastający poziom RFT zaburza pracę i strukturę mitochondriów, w tym zaburza ciągłość grzebieni mitochondrialnych oraz błony wewnętrznej [106]. Dysfunkcja dotyczy także lizosomów, a jej głównym przejawem jest gromadzenie się fluoryzującego pigmentu, lipofuscyny [103]. Prawdopodobnym skutkiem niewydolności tych organeli jest także pojawienie się w cytoplazmie aktywności β -galaktozydazy, która w przeciwieństwie do tzw. całkowitej odmiany tego enzymu, wykrywanej przy pH 4,0, wykrywana jest przy pH 6,0, zyskując miano „związanej ze starzeniem” (senescence-associated β -galactosidase; SA- β -Gal) [28]. Obecnie, mimo pewnych głosów krytyki [99], SA- β -Gal jest najczęściej wykorzystywanym markerem komórek starych w badaniach *in vitro* i *in vivo*. Innymi uznawanymi markerami komórek starych są: ufosforylowana postać histonu H2A.X (γ -H2A.X) [31], wyspecjalizowane domeny fakultatywnej heterochromatyny (senescence-associated heterochromatic foci; SAHF) [119], domeny DNA-SCARS (DNA segments with heterochromatin alterations reinforcing senescence) [95] oraz produkt oksydacyjnych uszkodzeń DNA, 8-hydrokso-2'-deoksyguanozyna (8-OH-dG) [115].

Inną, ważną cechą komórek starych jest zmiana ekspresji wielu genów, kontrolujących podstawowe aspekty metabolizmu komórki (tabela 1) [87,118]. Należy jednocześnie podkreślić, że mimo morfologicznej degeneracji, trwałe niezdolności do podziałów i rozległych, nienaprawialnych uszkodzeń makrocząsteczek, szczególnie DNA, komórki stare przez długi czas pozostają żywe i aktywne metabolicznie [17], w czym dużą rolę odgrywa ich oporność na docierające sygnały proapoptotyczne [40].

FENOTYP SEKRECYJNY ZWIĄZANY ZE STARZENIEM

Pochodną zmiany ekspresji genów w komórkach starych, a zarazem cechą szczególnie ważną w związku z ich rolą

w procesie starzenia się organizmu jako całości oraz rozwoju chorób związanych z wiekiem jest nabywanie tzw. fenotypu sekrecyjnego (senescence-associated secretory phenotype; SASP). Istotą tego zjawiska jest wzmożone wydzielanie do środowiska wielu czynników o zróżnicowanych funkcjach, które można zaliczyć do kilku kategorii. Są wśród nich cytokiny (IL-1, -6, -7, -13, -15) i chemokiny prozapalne (CCL2/MCP-1, CCL8/MCP-2, CCL26, CXCL8/IL-8, CXCL12/SDF-1), czynniki wzrostu (amfifregulina, EGF, hFGF, HGF, heregulina, KGF, NGF, VEGF), proteazy i ich modulatory (MMP-1, -3, -10, -12, -13, -14, TIMP-2, PAI-1, PAI-2, t-PA, u-PA, katepsyna B), rozpuszczalne lub zrzucone z powierzchni receptory i ligandy (ICAM-1, ICAM-3, OPG, sTNFR1, Fas, SGP130, EGF-R) oraz składniki ECM (fibronektyna) [21,23].

Uważa się, że główny udział w powstawaniu SASP mają gromadzące się w komórkach starych uszkodzenia DNA, których następstwem jest mobilizacja kinaz ATM i CHK2 oraz białka adaptorowego NBS1, koniecznych do zwiększonego wydzielania czynników prozapalnych [94]. Istotne dla rozwoju tej cechy są także zmiany zachodzące w architekturze chromatyny jądrowej [88]. Elementem tych zmian jest m.in. gromadzenie się podjednostki p65 czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, który może pełnić funkcję nadrzędnego regulatora rozwoju omawianej cechy [19]. Potwierdzeniem tej tezy były obserwacje, w których zablokowanie podjednostki p65/NF- κ B spowodowało znaczne ograniczenie zdolności wydzielniczych komórek starych [34]. W związku z tym na szczególną uwagę zasługuje pobudzenie aktywności transkrypcyjnej NF- κ B pod wpływem działania kinazy p38 MAPK, która prawdopodobnie może wzbudzać właściwości sekrecyjne komórek w sposób niezależny od aktywacji szlaków odpowiedzi na uszkodzone DNA [34].

Integralnym elementem rozwoju SASP mogą być także kompleksy receptorów i białek efektorowych, kontrolujących przebieg reakcji zapalnej, zwane inflammasomami [60], a szczególnie związana z ich aktywnością ścieżka sygnałowa IL-1 [1]. Jeden z receptorów wchodzących w skład inflammasomów, RIG-1 (retinoic acid inducible gene-1), zaangażowany w indukcję czynników prozapalnych, w tym IL-6 i CXCL8/IL-8, jest także silnym aktywatorem NF- κ B [66].

ZNACZENIE STARZENIA SIĘ KOMÓREK DLA STARZENIA SIĘ ORGANIZMU

Pierwszym, który zasugerował, że starzenie się komórek może odzwierciedlać określone aspekty starzenia się organizmu jako całości był Leonard Hayflick. Podstawą ku temu była obserwacja, że komórki pobrane od dojrzałych dawców cechują się mniejszymi możliwościami proliferacyjnymi niż te, pobrane od płodów [42]. Podobną korelację między wiekiem dawcy a osiąganą przez komórki liczbą podziałów odnotowano w komórkach mezotelium otrzewnowego [59], śródbłonna naczyńniowego [46] oraz keratynocytach [91]. Innym dowodem na istnienie współzależności między starzeniem się komórek *in vitro* a starzeniem się organizmu jako całości *in vivo* było stwierdzenie

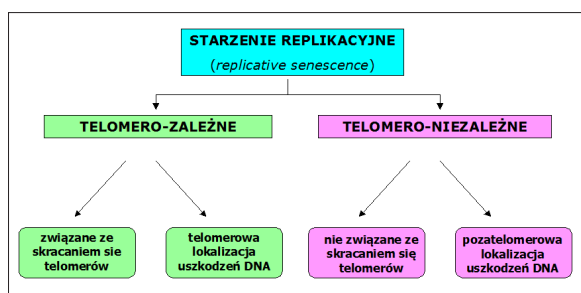


Tabela 1. Geny, których ekspresja uległa zmianie w starych fibroblastach (na podstawie [78,79])

FUNKCJA	NAZWA	ZMIANA
Regulacja cyklu komórkowego	cyklina A2	↓
	białkowy regulator cytokinezy-1 (PRC1)	↓
	białko związane z insulinopodobnym czynnikiem wzrostu-2	↓
	cyklina D1	↑
	onkogen związany ze wzrostem 1	↑
Odpowiedź immunologiczna	heksokinaza 2 (HK2)	↑
	czynnik specyficzny dla osteoblastów (OSF2)	↓
	neurotrymina (HNT)	↓
	nadrodzina C prokadheryn g (PCDH)	↓
	dermatopontyna (DMP)	↓
	kadheryna-2	↑
	antygen CD36	↑
Przewodnictwo sygnału	białko 6 indukowane czynnikiem martwicy nowotworów	↑
	receptor związany z białkiem G (RDC-1)	↓
	białko Rab3 aktywujące GTPazę (RAGP)	↓
	proenkefalina (ENK)	↑
	receptor 1 fosfolipazy A2 (PLA2R1)	↑
Reakcja zapalna	receptor A czynnika natriuretycznego	↑
	syntaza prostaglandyny-1	↓
	cyklooksygenaza 2 (COX2)	↑
	interleukina 1 (IL-1)	↑
	interleukina 6 (IL-6)	↑
	interleukina 15 (IL-15)	↑
	chemokina CXCL6	↑
Synteza i degradacja macierzy pozakomórkowej	białko chemotaktyczne monocytów-1 (CCL2/MCP-1)	↑
	cząsteczka adhezyjna ICAM-1	↑
	kolagen I i III	↓
	elastyna	↓
	laminina	↓
	kolagenaza	↓
	metaloproteaza 1 (MMP-1)	↓
	fibronektyna	↑
	inhibitor aktywatora plazminogenu-1 i -2 (PAI-1, PAI-2)	↑
	urokinazowy aktywator plazminogenu (u-PA)	↑
Przebudowa cytoszkieletu komórki	metaloproteaza 3 (MMP-3)	↑
	kompleks 2/3 białek zależnych od aktyny (podjednostka 2)	↓
	keratyna 14 (KRT14)	↑
	keratyna 19 (KRT19)	↑
Czynniki wzrostu	tymozyna beta 10	↑
	heregulina (HRG)	↑
	transformujący czynnik wzrostu $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)	↑

nie zwiększonego odsetka komórek starych w tkankach osób w wieku podeszłym [28,90].

Obecność komórek o fenotypowych cechach starzenia wykazano w jamie otrzewnej [59], w naczyniach krwionośnych, w obrębie blaszek miażdżycowych [71], w skórze [28], w rogówce [117] oraz w krążkach międzykręgowych [61]. Gromadzenie się w tkankach komórek starych, które przez swoisty profil wydzielniczy wpływają na kształtowanie miejscowego mikrośrodowiska, może być przyczyną powstawania tzw. fenotypu degeneracyjnego związanego z wiekiem (age-associated degenerative phenotype) [16], czego skutkiem jest wzrost podatności organizmu na rozwój określonych patologii, w tym chorób układu sercowo-naczyniowego, neurodegeneracyjnych oraz schorzeń układu ruchu. Jest to możliwe w obliczu danych statystycznych, które wykazują, że do uniwersalnych, lecz nie obligatoryjnych skutków starzenia należą m.in.: postępująca atrofia mięśni, spadek elastyczności skóry, wydłużenie średniego czasu gojenia się ran, postępujący zanik siatkówki oraz zmniejszenie przejrzystości soczewki oka [77].



Ryc. 3. Dwa podstawowe typy replikacyjnego starzenia się komórek somatycznych oraz kryteria tego podziału. W niektórych typach komórek obserwuje się tzw. starzenie mozaikowe, którego przejawem jest jednoczesna aktywacja obu mechanizmów starzenia

Jednym z bezpośrednich skutków wywołanych obecnością komórek starych *in vivo* jest zaburzenie prawidłowej struktury tkanek [56]. Dowodzą tego m.in. badania Parrinello i wsp., którzy analizując proces różnicowania się komórek nabłonka gruczołu piersiowego wykazali, że obecność starych fibroblastów działa destrukcyjnie (przez wzrost wydzielania metaloproteaz) na właściwe kształtowanie się rozgałęzionych struktur pęcherzykowych, zaangażowanych w wytwarzanie mleka [86]. Natomiast gromadzenie się starych komórek mięśni gładkich tętnicy płucnej u pacjentów z przewlekłą obturacyjną chorobą płuc okazało się dodatnio korelować z rozwojem hipertrofii ściany naczyń. Komórki te pobudzały proliferację i migrację swych młodych odpowiedników, co według autorów przywołanej pracy może leżeć u podstaw rozwoju nadciśnienia płucnego u tych chorych [79]. Komórki stare mogą się także przyczyniać do rozwoju lub zaostrzenia przebiegu miażdżycy. Podejrzuje się, że jednym ze skutków SASP, generowanego przez komórki stare w obrębie blaszki miażdżycowej może być nasilenie prozapalnego charakteru środowiska, tworzonych

pierwotnie przez makrofagi w przestrzeni podśródbłonkowej [112].

STARZENIE A ROZWÓJ CHOROBY NOWOTWOROWEJ

Najpoważniejszą jednak patologią, pozostającą w nierozdzielalnym związku z procesem starzenia jest choroba nowotworowa [32]. Dowody potwierdzające istnienie związku między tymi dwoma procesami pochodzą zarówno z doświadczeń na zwierzętach, jak również z obserwacji pacjentów onkologicznych. Już w latach 80 ub. w. Zimmerman i wsp., analizując wpływ wieku na rozwój nowotworów trzustki u myszy stwierdzili, że ekspozycja zwierząt na działanie kancerogennej pochodnej nitrozomocznika indukuje rozwój nowotworów wyłącznie u osobników starszych [120]. Badania na modelu szczurzym wykazały, że syngeniczny przeszczep transformowanych hepatocytów spowodował rozwój zmian nowotworowych przede wszystkim w wątrobie osobników starszych [72]. U ludzi częstość występowania nowotworów wzrasta wykładniczo z wiekiem i obejmuje ponad 60% osób po 65 roku życia [50]. Co ważne, szczególne przyspieszenie tempa rozwoju nowotworów obserwuje się dopiero w wieku dojrzałym (około połowy średniej długości życia człowieka) [5,27], co prawdopodobnie wynika z czasu, niezbędnego do nagromadzenia się w komórkach krytycznej liczby onkogennych mutacji [56]. Jednak aberracje genetyczne obecne w komórkach preneoplastycznych, a często także w przylegających do nich komórkach prawidłowych, nie zawsze przekładają się na rozwinięcie fenotypu nowotworowego *in vivo* [26,29,52]. Oznacza to, że w wielu typach nowotworów, nagromadzenie się dużej liczby mutacji nie jest warunkiem wystarczającym do zainicjowania procesu rozrostowego, co wskazuje, że zasadnicze znaczenie dla progresji nowotworu ma także odpowiednie mikrośrodowisko tkankowe, przyzwalające na przekształcanie się komórek preneoplastycznych w komórki o w pełni wyrażonych cechach złośliwości [55,85].

Na podstawie wiadomości o gromadzeniu się z wiekiem komórek starych, powstała koncepcja, zgodnie z którą to właśnie komórki stare, zwłaszcza fibroblasty, mogą tworzyć pronowotworowe warunki środowiska tkankowego. Teoria ta zakłada pewien dualizm biologicznego znaczenia procesu starzenia komórkowego, które z jednej strony, szczególnie w organizmach młodych, może stanowić postać mechanizmu supresorowego nowotworów (komórki które się nie dzielą, nie mogą ulec transformacji nowotworowej), a z drugiej, w miarę ich gromadzenia się w tkankach z wiekiem, może promować różnorakie elementy progresji nowotworów, szczególnie w oparciu o SASP [13,15]. Bezpośrednich dowodów na potwierdzenie pronowotworowego działania komórek starych dostarczyły badania Krtoľicy i wsp., którzy dowiedli, że stare fibroblasty promują w znacznie większym stopniu niż komórki młode proliferację preneoplastycznych komórek nabłonkowych oraz bardzo agresywnych komórek raka piersi MDA-231 *in vitro*. Działanie występowało także *in vivo*, gdy rozwój guzów nowotworowych po wszczepieniu myszom mieszanin komórek raka piersi ze starymi fibroblastami był bardziej nasilony w porównaniu z osobnikami, którym komórki rakowe



implantowano w obecności fibroblastów młodych [57]. Jako główny mechanizm, leżący u podłoża pronowotworowego działania starych fibroblastów, autorzy cytowanej pracy zidentyfikowali bezpośrednie oddziaływania typu komórka prawidłowa-komórka nowotworowa. Liu i wsp. wykazali natomiast, że stare fibroblasty mogą stymulować progresję komórek raka piersi *in vitro* i *in vivo* także przez czynniki wydzielane do środowiska, w tym metaloproteazy oraz czynnik wzrostu hepatocytów (HGF) [65]. Połączony udział oddziaływań komórka-komórka oraz czynników wydzielanych do środowiska (szczególnie amfireduliny) wykazali natomiast Bavik i wsp., obserwując pobudzający wpływ starych fibroblastów na proliferację transformowanych komórek nabłonka stercza [7].

Komórki stare mogą wpływać na progresję nowotworów także w sposób pośredni, np. w wyniku pobudzania, podstawowego dla rozwoju guza, zjawiska angiogenezy [78]. Silnym źródłem czynników proangiogennych okazały się bowiem stare fibroblasty, które wydzielając zwiększone ilości VEGF efektywnie nasilały stopień inwazyjności komórek śródbłonka naczyniowego przez błony podstawne. Potwierdzeniem proangiogennego wpływu komórek starych były doświadczenia na zwierzętach, u których stwierdzono nasiloną waskularyzację zmian nowotworowych po wszczepieniu transformowanych komórek nabłonkowych wraz ze starymi fibroblastami [22].

PODSUMOWANIE

Mimo mnogości określeń oraz sposobu przedstawiania zjawiska starzenia, intensywny rozwój naukowo-technologiczny ostatnich lat sprawił, że liczba osób w wieku podeszłym znacząco wzrosła. Trend ten zaowocował stopniowym przeobrażaniem się aglomeracji społecznych w „społeczeństwa starzejące się”. Obecnie dużym wyzwaniem jest konieczność dostosowania możliwości ekonomicznych, socjalnych i medycznych do potrzeb wzrastającego odsetka osób w wieku podeszłym. Rosnące nakłady finansowe ponoszone na opiekę medyczną osób starszych oraz wysoki odsetek śmiertelności wśród tej grupy wiekowej przyczyniają się do poszukiwania nowych rozwiązań, umożliwiających zachowanie korelacji między trwającym wzrostem średniej długości życia przy zachowaniu wysokiego poziomu jego jakości. Panuje zgoda, że najskuteczniejszym sposobem osiągnięcia tego kompromisu jest zgłębienie i zrozumienie procesu starzenia u jego podstaw, tj. na poziomie molekularnym i komórkowym. Obserwując postęp wiedzy o starzeniu wydaje się, że chwila kompleksowego zrozumienia warunkowań procesu starzenia jest bliska, następnym krokiem będzie natomiast przełożenie zdobytej wiedzy na grunt medycyny praktycznej, być może w oparciu o zasady rozwijającej się medycyny spersonalizowanej lub nawet inżynierii genetycznej.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Acosta J.C., Banito A., Wuestefeld T., Georgilis A., Janich P., Morton J.P., Athineos D., Kang T.W., Lasitschka F., Andrulis M., Pascual G., Morris K.J., Khan S., Jin H., Dharmalingam G. i wsp.: A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat. Cell Biol.*, 2013; 15: 978-990
- [2] Allsopp R.C., Harley C.B.: Evidence for a critical telomere length in senescent human fibroblasts. *Exp. Cell Res.*, 1995; 219: 130-136
- [3] Alpan R.S., Pardee A.B.: p21^{WAF1/CIP1}/SDI1 is elevated through a p53-independent pathway by mimosine. *Cell Growth Differ.*, 1996; 7: 893-901
- [4] Artandi S.E., Attardi L.D.: Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, apoptosis, and cancer. *Biochem. Biophys. Res Commun.*, 2005; 331: 881-890
- [5] Balducci L., Lyman G.H.: Cancer in the elderly. *Epidemiologic and clinical implications. Clin. Geriatr. Med.*, 1997; 13: 1-14
- [6] Barascu A., Le Chalony C., Pennarun G., Genet D., Imam N., Lopez B., Bertrand P.: Oxidative stress induces an ATM-independent senescence pathway through p38 MAPK-mediated lamin B1 accumulation. *EMBO J.*, 2012; 31: 1080-1094
- [7] Bavik C., Coleman I., Dean J.P., Knudsen B., Plymate S., Nelson P.S.: The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms. *Cancer Res.*, 2006; 66: 794-802
- [8] Beausejour C.M., Krtolica A., Galimi F., Narita M., Lowe S.W., Yaswen P., Campisi J.: Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.*, 2003; 22: 4212-4222
- [9] Belair C.D., Yeager T.R., Lopez P.M., Reznikoff C.A.: Telomerase activity: a biomarker of cell proliferation, not malignant transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997; 94: 13677-13682
- [10] Brandes D., Murphy D.G., Anton E.B., Barnard S.: Ultrastructural and cytochemical changes in cultured human lung cells. *J. Ultrastruct. Res.*, 1972; 39: 465-483
- [11] Broccoli D.: Function, replication and structure of the mammalian telomere. *Cytotechnology*, 2004; 45: 3-12
- [12] Cahill M.A., Janknecht R., Nordheim A.: Signalling pathways: jack of all cascades. *Curr. Biol.*, 1996; 6: 16-19
- [13] Campisi J.: Cancer, aging and cellular senescence. *In Vivo*, 2000; 14: 183-188
- [14] Campisi J.: Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol.*, 2001; 11: S27-S31
- [15] Campisi J.: Cancer and ageing: rival demons? *Nat. Rev. Cancer*, 2003; 3: 339-349
- [16] Campisi J., Andersen J.K., Kapahi P., Melov S.: Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease? *Semin. Cancer Biol.*, 2011; 21: 354-359
- [17] Campisi J., d'Adda di Fagagna F.: Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2007; 8: 729-740
- [18] Carrel A., Ebeling A.H.: Age and multiplication of fibroblasts. *J. Exp. Med.*, 1921; 34: 599-623
- [19] Chien Y., Scuoppo C., Wang X., Fang X., Balgley B., Bolden J.E., Premrurit P., Luo W., Chicas A., Lee C.S., Kogan S.C., Lowe S.W.: Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- κ B promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev.*, 2011; 25: 2125-2136

- [20] Collins K., Mitchell J.R.: Telomerase in the human organism. *Oncogene*, 2002; 21: 564-579
- [21] Coppe J.P., Desprez P.Y., Krtolica A., Campisi J.: The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu. Rev. Pathol.*, 2010; 5: 99-118
- [22] Coppe J.P., Kauser K., Campisi J., Beausejour C.M.: Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 29568-29574
- [23] Coppe J.P., Patil C.K., Rodier F., Sun Y., Munoz D.P., Goldstein J., Nelson P.S., Desprez P.Y., Campisi J.: Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.*, 2008; 6: 2853-2868
- [24] Courtois-Cox S., Jones S.L., Cichowski K.: Many roads lead to oncogene-induced senescence. *Oncogene*, 2008; 27: 2801-2809
- [25] Datto M.B., Li Y., Panus J.F., Howe D.J., Xiong Y., Wang X.F.: Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995; 92: 5545-5549
- [26] Deng G., Lu Y., Zlotnikov G., Thor A.D., Smith H.S.: Loss of heterozygosity in normal tissue adjacent to breast carcinomas. *Science*, 1996; 274: 2057-2059
- [27] DePinho R.A.: The age of cancer. *Nature*, 2000; 408: 248-254
- [28] Dimri G.P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E.E., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O., Peacocke M., Campisi J.: A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995; 92: 9363-9367
- [29] Dolle M.E., Snyder W.K., Gossen J.A., Lohman P.H., Vijg J.: Distinct spectra of somatic mutations accumulated with age in mouse heart and small intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 8403-8408
- [30] Draskovic I., Londono Vallejo A.: Telomere recombination and alternative telomere lengthening mechanisms. *Front Biosci.*, 2013; 18: 1-20
- [31] d'Adda di Fagnagna F., Reaper P.M., Clay-Farrace L., Fiegler H., Carr P., von Zglinicki T., Saretzki G., Carter N.P., Jackson S.P.: A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*, 2003; 426: 194-198
- [32] Finkel T., Serrano M., Blasco M.A.: The common biology of cancer and ageing. *Nature*, 2007; 448: 767-774
- [33] Forsyth N.R., Wright W.E., Shay J.W.: Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again. *Differentiation*, 2002; 69: 188-197
- [34] Freund A., Patil C.K., Campisi J.: p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J.*, 2011; 30: 1536-1548
- [35] Gartel A.L., Tyner A.L.: Transcriptional regulation of the p21^{WAF1/CIP1} gene. *Exp. Cell Res.*, 1999; 246: 280-289
- [36] Greider C.W.: Telomere length regulation. *Annu. Rev. Biochem.*, 1996; 65: 337-365
- [37] Greider C.W.: Telomeres and senescence: the history, the experiment, the future. *Curr. Biol.*, 1998; 8: R178-R181
- [38] Greider C.W., Blackburn E.H.: Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*, 1985; 43: 405-413
- [39] Guney I., Wu S., Sedivy J.M.: Reduced c-Myc signaling triggers telomere-independent senescence by regulating Bmi-1 and p16^{INK4a}. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 3645-3650
- [40] Hampel B., Wagner M., Teis D., Zwerschke W., Huber L.A., Jansen-Durr P.: Apoptosis resistance of senescent human fibroblasts is correlated with the absence of nuclear IGFBP-3. *Aging Cell*, 2005; 4: 325-330
- [41] Harley C.B., Futcher A.B., Greider C.W.: Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 1990; 345: 458-460
- [42] Hayflick L.: The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.*, 1965; 37: 614-636
- [43] Hayflick L., Moorhead P.S.: The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.*, 1961; 25: 585-621
- [44] Herbig U., Jobling W.A., Chen B.P., Chen D.J., Sedivy J.M.: Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21^{CIP1}, but not p16^{INK4a}. *Mol. Cell*, 2004; 14: 501-513
- [45] Herbig U., Sedivy J.M.: Regulation of growth arrest in senescence: telomere damage is not the end of the story. *Mech. Ageing Dev.*, 2006; 127: 16-24
- [46] Hoshi H., McKeegan W.L.: Isolation, growth requirements, cloning, prostacyclin production and life-span of human adult endothelial cells in low serum culture medium. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 1986; 22: 51-56
- [47] Itahana K., Dimri G., Campisi J.: Regulation of cellular senescence by p53. *Eur. J. Biochem.*, 2001; 268: 2784-2791
- [48] Jacobs J.J., de Lange T.: Significant role for p16^{INK4a} in p53-independent telomere-directed senescence. *Curr. Biol.*, 2004; 14: 2302-2308
- [49] Jacobs J.J., Kieboom K., Marino S., DePinho R.A., van Lohuizen M.: The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature*, 1999; 397: 164-168
- [50] Jemal A., Siegel R., Xu J., Ward E.: Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J. Clin.*, 2010; 60: 277-300
- [51] Johnson J.E.Jr.: Fine structure of IMR-90 cells in culture as examined by scanning and transmission electron microscopy. *Mech. Ageing Dev.*, 1979; 10: 405-443
- [52] Jonason A.S., Kunala S., Price G.J., Restifo R.J., Spinelli H.M., Persing J.A., Leffell D.J., Tarone R.E., Brash D.E.: Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 14025-14029
- [53] Kang M.K., Guo W., Park N.H.: Replicative senescence of normal human oral keratinocytes is associated with the loss of telomerase activity without shortening of telomeres. *Cell Growth Differ.*, 1998; 9: 85-95
- [54] Kiyono T., Foster S.A., Koop J.I., McDougall J.K., Galloway D.A., Klingelhut A.J.: Both Rb/p16^{INK4a} inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature*, 1998; 396: 84-88
- [55] Kleinerman D.I., Dinney C.P., Zhang W.W., Lin S.H., Van N.T., Hsieh J.T.: Suppression of human bladder cancer growth by increased expression of C-CAM1 gene in an orthotopic model. *Cancer Res.*, 1996; 56: 3431-3435
- [56] Krtolica A., Campisi J.: Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2002; 34: 1401-1414
- [57] Krtolica A., Parrinello S., Lockett S., Desprez P.Y., Campisi J.: Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 12072-12077
- [58] Książek K., Passos J.F., Olijslagers S., Saretzki G., Martin-Ruiz C., von Zglinicki T.: Premature senescence of mesothelial cells is associated with non-telomeric DNA damage. *Biochem. Biophys. Res Commun.*, 2007; 362: 707-711
- [59] Książek K., Winckiewicz M., Staniszewski R., Breborowicz A.,



- Witowski J.: Correlation between the donor age and the proliferative lifespan of human peritoneal mesothelial cells in vitro: is TGF- β 1 a link? *Exp Gerontol.*, 2007; 42: 840-843
- [60] Lamkanfi M., Dixit V.M.: Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity. *Immunol. Rev.*, 2009; 227: 95-105
- [61] Le Maitre C.L., Freemont A.J., Hoyland J.A.: Accelerated cellular senescence in degenerate intervertebral discs: a possible role in the pathogenesis of intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res. Ther.*, 2007; 9: R45
- [62] Lee A.C., Fenster B.E., Ito H., Takeda K., Bae N.S., Hirai T., Yu Z.X., Ferrans V.J., Howard B.H., Finkel T.: Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 7936-7940
- [63] Li G.Z., Eller M.S., Firoozabadi R., Gilchrist B.A.: Evidence that exposure of the telomere 3' overhang sequence induces senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 527-531
- [64] Lin A.W., Barradas M., Stone J.C., van Aelst L., Serrano M., Lowe S.W.: Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev.*, 1998; 12: 3008-3019
- [65] Liu D., Hornsby P.J.: Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Res*, 2007; 67: 3117-3126
- [66] Liu F., Wu S., Ren H., Gu J.: Klotho suppresses RIG-I-mediated senescence-associated inflammation. *Nat. Cell Biol.*, 2011; 13: 254-262
- [67] Lopez-Otin C., Blasco M.A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G.: The hallmarks of aging. *Cell*, 2013; 153: 1194-1217
- [68] Lowe S.W., Sherr C.J.: Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2003; 13: 77-83
- [69] Macleod K.F., Sherry N., Hannon G., Beach D., Tokino T., Kinzler K., Vogelstein B., Jacks T.: p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev.*, 1995; 9: 935-944
- [70] Martinez P., Ferrara-Romeo I., Flores J.M., Blasco M.A.: Essential role for the TRF2 telomere protein in adult skin homeostasis. *Aging Cell*, 2014; 13: 656-668
- [71] Matthews C., Gorenne I., Scott S., Figg N., Kirkpatrick P., Ritchie A., Goddard M., Bennett M.: Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: effects of telomerase and oxidative stress. *Circ. Res*, 2006; 99: 156-164
- [72] McCullough K.D., Coleman W.B., Smith G.J., Grishan J.W.: Age-dependent regulation of the tumorigenic potential of neoplastically transformed rat liver epithelial cells by the liver microenvironment. *Cancer Res.*, 1994; 54: 3668-3671
- [73] Moll U.M., Petrenko O.: The MDM2-p53 interaction. *Mol. Cancer Res.*, 2003; 1: 1001-1008
- [74] Moyzis R.K., Buckingham J.M., Cram L.S., Dani M., Deaven L.L., Jones M.D., Meyne J., Ratliff R.L., Wu J.R.: A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG) n , present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988; 85: 6622-6626
- [75] Nabetani A., Ishikawa F.: Alternative lengthening of telomeres pathway: recombination-mediated telomere maintenance mechanism in human cells. *J. Biochem.*, 2011; 149: 5-14
- [76] Narita M., Nunez S., Heard E., Narita M., Lin A.W., Hearn S.A., Spector D.L., Hannon G.J., Lowe S.W.: Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*, 2003; 113: 703-716
- [77] Naylor R.M., Baker D.J., van Deursen J.M.: Senescent cells: a novel therapeutic target for aging and age-related diseases. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2013; 93: 105-116
- [78] Nishida N., Yano H., Nishida T., Kamura T., Kojiro M.: Angiogenesis in cancer. *Vasc. Health Risk Manag.*, 2006; 2: 213-219
- [79] Noureddine H., Gary-Bobo G., Alifano M., Marcos E., Saker M., Vienney N., Amsellem V., Maitre B., Chaouat A., Chouaid C., Dubois-Rande J.L., Damotte D., Adnot S.: Pulmonary artery smooth muscle cell senescence is a pathogenic mechanism for pulmonary hypertension in chronic lung disease. *Circ. Res.*, 2011; 109: 543-553
- [80] Nuss J.E., Choksi K.B., DeFord J.H., Papaconstantinou J.: Decreased enzyme activities of chaperones PDI and BiP in aged mouse livers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008; 365: 355-361
- [81] Ogryzko V.V., Hirai T.H., Russanova V.R., Barbie D.A., Howard B.H.: Human fibroblast commitment to a senescence-like state in response to histone deacetylase inhibitors is cell cycle dependent. *Mol. Cell Biol.*, 1996; 16: 5210-5218
- [82] Ohtani N., Zebede Z., Huot T.J., Stinson J.A., Sugimoto M., Ohashi Y., Sharrocks A.D., Peters G., Hara E.: Opposing effects of Ets and Id proteins on p16^{INK4a} expression during cellular senescence. *Nature*, 2001; 409: 1067-1070
- [83] Olovnikov A.M.: Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 1971; 201: 1496-1499
- [84] Olovnikov A.M.: Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory. *Exp. Gerontol.*, 1996; 31: 443-448
- [85] Park C.C., Bissell M.J., Barcellos-Hoff M.H.: The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. *Mol. Med. Today*, 2000; 6: 324-329
- [86] Parrinello S., Coppe J.P., Krtolica A., Campisi J.: Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J. Cell Sci.*, 2005; 118: 485-496
- [87] Pascal T., Debacq-Chainiaux F., Chretien A., Bastin C., Dabee A.F., Bertholet V., Remacle J., Toussaint O.: Comparison of replicative senescence and stress-induced premature senescence combining differential display and low-density DNA arrays. *FEBS Lett.*, 2005; 579: 3651-3659
- [88] Pazolli E., Alspach E., Milczarek A., Prior J., Piwnicka-Worms D., Stewart S.A.: Chromatin remodeling underlies the senescence-associated secretory phenotype of tumor stromal fibroblasts that supports cancer progression. *Cancer Res.*, 2012; 72: 2251-2261
- [89] Ramirez R.D., Morales C.P., Herbert B.S., Rohde J.M., Passons C., Shay J.W., Wright W.E.: Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes Dev*, 2001; 15: 398-403
- [90] Ressler S., Bartkova J., Niederegger H., Bartek J., Scharffetter-Kochanek K., Jansen-Durr P., Wlaschek M.: p16^{INK4A} is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell*, 2006; 5: 379-389
- [91] Rheinwald J.G., Green H.: Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*, 1975; 6: 331-343
- [92] Robles S.J., Adami G.R.: Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16^{INK4a} enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene*, 1998; 16: 1113-1123
- [93] Rodier F., Campisi J.: Four faces of cellular senescence. *J. Cell Biol.*, 2011; 192: 547-556
- [94] Rodier F., Coppe J.P., Patil C.K., Hoeijmakers W.A., Munoz D.P., Raza S.R., Freund A., Campeau E., Davalos A.R., Campisi J.: Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat. Cell Biol.*, 2009; 11: 973-979
- [95] Rodier F., Munoz D.P., Teachenor R., Chu V., Le O., Bhaumik D., Coppe J.P., Campeau E., Beausejour C.M., Kim S.H., Davalos A.R., Campisi J.: DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J. Cell Sci.*, 2011; 124: 68-81

- [96] Roninson IB.: Oncogenic functions of tumour suppressor p21^{Waf1/Cip1/Sdi1}: association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Lett.*, 2002; 179: 1-14
- [97] Saretzki G., Sitte N., Merkel U., Wurm R.E., von Zglinicki T.: Telomere shortening triggers a p53-dependent cell cycle arrest via accumulation of G-rich single stranded DNA fragments. *Oncogene*, 1999; 18: 5148-5158
- [98] Serrano M., Lin A.W., McCurrach M.E., Beach D., Lowe S.W.: Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16^{INK4a}. *Cell*, 1997; 88: 593-602
- [99] Severino J., Allen R.G., Balin S., Balin A., Cristofalo V.J.: Is beta-galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo? *Exp. Cell Res.*, 2000; 257: 162-171
- [100] Shay J.W., Bacchetti S.: A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer*, 1997; 33: 787-791
- [101] Sherr C.J., DePinho R.A.: Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell*, 2000; 102: 407-410
- [102] Shirangi T.R., Zaika A., Moll U.M.: Nuclear degradation of p53 occurs during down-regulation of the p53 response after DNA damage. *FASEB J.*, 2002; 16: 420-422
- [103] Sitte N., Merker K., Grune T., von Zglinicki T.: Lipofuscin accumulation in proliferating fibroblasts in vitro: an indicator of oxidative stress. *Exp. Gerontol.*, 2001; 36: 475-486
- [104] Smogorzewska A., de Lange T.: Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *EMBO J.*, 2002; 21: 4338-4348
- [105] Stein G.H., Drullinger L.F., Soulard A., Dulic V.: Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.*, 1999; 19: 2109-2117
- [106] Terman A., Gustafsson B., Brunk U.T.: Autophagy, organelles and ageing. *J. Pathol.*, 2007; 211: 134-143
- [107] Venable M.E., Lee J.Y., Smyth M.J., Bielawska A., Obeid L.M.: Role of ceramide in cellular senescence. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 30701-30708
- [108] von Zglinicki T.: Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem. Sci.*, 2002; 27: 339-344
- [109] von Zglinicki T., Pilger R., Sitte N.: Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000; 28: 64-74
- [110] von Zglinicki T., Saretzki G., Docke W., Lotze C.: Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp. Cell Res.*, 1995; 220: 186-193
- [111] von Zglinicki T., Saretzki G., Ladhoff J., d'Adda di Fagagna F., Jackson S.P.: Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech. Ageing Dev.*, 2005; 126: 111-117
- [112] Wang J.C., Bennett M.: Aging and atherosclerosis: mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence. *Circ. Res.*, 2012; 111: 245-259
- [113] Watson J.D.: Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat. New Biol.*, 1972; 239: 197-201
- [114] Witkowski J.A.: Dr. Carrel's immortal cells. *Med. Hist.*, 1980; 24: 129-142
- [115] Wolf F.I., Torsello A., Covacci V., Fasanella S., Montanari M., Boninsegna A., Cittadini A.: Oxidative DNA damage as a marker of aging in WI-38 human fibroblasts. *Exp. Gerontol.*, 2002; 37: 647-656
- [116] Wu C., Miloslavskaya I., Demontis S., Maestro R., Galaktionov K.: Regulation of cellular response to oncogenic and oxidative stress by Seladin-1. *Nature*, 2004; 432: 640-645
- [117] Xiao X., Wang Y., Gong H., Chen P., Xie L.: Molecular evidence of senescence in corneal endothelial cells of senescence-accelerated mice. *Mol. Vis.*, 2009; 15: 747-761
- [118] Yoon I.K., Kim H.K., Kim Y.K., Song I.H., Kim W., Kim S., Baek S.H., Kim J.H., Kim J.R.: Exploration of replicative senescence-associated genes in human dermal fibroblasts by cDNA microarray technology. *Exp. Gerontol.*, 2004; 39: 1369-1378
- [119] Zhang R., Poustovoitov M.V., Ye X., Santos H.A., Chen W., Daganzo S.M., Erzberger J.P., Serebriiskii I.G., Canutescu A.A., Dunbrack R.L., Pehrson J.R., Berger J.M., Kaufman P.D., Adams P.D.: Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev. Cell*, 2005; 8: 19-30
- [120] Zimmerman J.A., Trombetta L.D., Carter T.H., Weisbroth S.H.: Pancreatic carcinoma induced by N-methyl-N'-nitrosourea in aged mice. *Gerontology*, 1982; 28: 114-120

Autorzy deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.

