

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Doktorský studijní program: Pediatrie

Pracoviště: Ústav molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty
Univerzity Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc

Modely senescence a jejich využití při identifikaci senolytik

Mgr. Natálie Kudlová

Vedoucí práce: doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.

Olomouc, 21. 8. 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně a uvedla jsem veškerou literaturu, ze které jsem čerpala. Práce byla realizována pod odborným dohledem mého školitele doc. MUDr. Mariána Hajdúcha, Ph.D. na Ústavu molekulární a translační medicíny (ÚMTM). Projekt byl finančně podporován Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (EATRIS-CZ - LM2018133), Evropským fondem pro regionální rozvoj - Projekt ENOCH (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000868), Technologickou agenturou České republiky (TE02000058) a IGA_LF_2019_003 (Univerzita Palackého Olomouc). Přehledový článek (Příloha 1) byl využit k sepsání teoretické části této práce, původní prvoautorský článek (Příloha 2) je součástí experimentálních částí - Cíl 2 a 3 a původní spoluautorský článek (Příloha 3) je zmíněn v experimentální části - Cíl 1. Ostatní data v experimentální části publikována prozatím nebyla.

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli a řediteli Ústavu molekulární a translační medicíny doc. MUDr. Mariánu Hajdúchovi, Ph.D. za vedení během studia a zaštitění mé práce. Dále děkuji Mgr. Martinu Mistríkovi, Ph.D. za pomoc, rady a čas, který mi věnoval. Poděkování také patří všem pracovníkům ÚMTM za poskytnutou ochotu, kdykoli jsem potřebovala. Speciální dík z celého srdce pak patří Mgr. Hanuši Slavíkovi, Ph.D., Mgr. Jarce Stankové, Mgr. Janě Kotulové, Ph.D., Mgr. Agátě Kubičkové, Mgr. Martinu Ondrovi a Mgr. Petru Vojtovi, Ph.D., jejichž přátelství mi bylo oporou po celou dobu studia. Samozřejmě jsem vděčná všem spoluautorům za příležitost s nimi pracovat. A závěrem bych ráda vyjádřila největší poděkování za povzbuzení a pochopení svému manželovi Martinovi a synovi Arturovi♥, svým rodičům, sestřám Julii a Valerii a celé milující a podporující rodině, bez které by tato práce nemohla vzniknout.

Olomouc, 21. 8. 2022

Mgr. Natálie Kudlová

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Natálie Kudlová

Název práce: Modely senescence a jejich využití při identifikaci senolytik

Typ práce: disertační

Pracoviště: Ústav molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty
Univerzity Palackého v Olomouci

Vedoucí práce: doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2022

Klíčová slova: senescence, senolytika, stárnutí, myší modely, SA- β -gal, p16, p21

Počet stran: 216

Jazyk: český

Bibliographic identification

Author's name and surname: Natálie Kudlová

Title: Models of senescence and their use in identification of senolytic compounds

Type of thesis: dissertation

Department: Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc

Supervisor: doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.

The year of defence: 2022

Keywords: senescence, senolytics, aging, murine models, SA- β -gal, p16, p21

Number of pages: 216

Language: Czech

Abstrakt:

Buněčná senescence je definována jako ireverzibilní zástava buněčného cyklu způsobená různými faktory a procesy, které činí životaschopné a fungující buňky nefunkčními, což brání normální homeostáze tkání. Stav senescence může být navozen mnoha endogenními a exogenními induktory a je úzce spojen s věkem, patologiemi souvisejícími s věkem, poškozením DNA, degenerativními poruchami, supresí a aktivací nádorů, hojením ran a opravou tkání. Existují však protichůdná zjištění týkající se spouštěcích mechanismů, specifických biomarkerů a postupů detekce senescentních buněk. To může být částečně způsobeno existencí široké škály *in vivo* zvířecích nebo lidských modelů akcelerovaného stárnutí, které byly použity ke studiu senescence a také k identifikaci a testování senolytik.

Tato práce je zaměřena na optimalizaci a validaci postupu testování potenciálně senolytických látek na *in vitro* i *in vivo* modelech senescence, konkrétně replikativní senescence (model přirozeného stárnutí) a radiací indukované senescence (akcelerovaný model stárnutí). V *in vitro* části experimentu byly otestovány biomarkery senescence na lidských buněčných liniích, 3 linie byly nakonec použity i pro následné testování látek. Potenciálně senolytické látky byly identifikovány pomocí optimalizované SER (Saddle-Edges-Ridges) spot analýzy obrazu založené na SA- β -galaktosidázové aktivitě za použití vysokokapacitního skrínungu. Při *in vivo* experimentech na myších modelech byly jako biologický materiál využity nestandardně buňky chlupových folikulů, jejichž možnosti využití a potenciál byl taktéž zahrnut do této práce. Neinvazivní odběr a následná práce s chlupovými folikuly dbá na velmi aktuální tematiku pravidel 3R (z angl. replace, reduce and refine) a vede k dodržování co nejhumánnějších podmínek při práci s laboratorními zvířaty. Mimo to byly identifikovány 3 senolytický působící látky (S1, S2 a S3), které mají velký potenciál sehrát svou roli na poli senoterapie.

Všechny uvedené výsledky by mohly v blízké budoucnosti pomoci při identifikaci senolytický aktivních sloučenin a přispět k posunu v oblasti výzkumu stárnutí, která je velmi živým a pulzujícím biomedicínským tématem a má potenciál nabídnout personalizovaná řešení pro zvýšení lidské dlouhověkosti i kvality života.

Abstract:

Cellular senescence is described as irreversible cell cycle arrest caused by diverse factors and processes that turn viable and functioning cells dysfunctional and prevent normal homeostasis. Senescence is induced by many endogenous and/or exogenous factors and is closely connected with age, age-related pathologies, DNA damage, degenerative disorders, tumor suppression and activation, wound healing, and tissue repair. Although, there are inconsistent opinions regarding trigger mechanisms, specific biomarkers, and senescent cell detection methods. This may be caused, at least in part, by the existence of a wide variety of *in vivo* models of accelerated aging that have been used to study senescence as well as to identify and examine senolytics.

This work focuses on the optimization and validation of the potentially senolytic compounds' testing procedure using *in vitro* and *in vivo* senescence models, specifically replicative senescence (model of natural aging) and radiation-induced senescence (accelerated model of aging). In the *in vitro* part of the experiments, various biomarkers and methods were tested on human cell lines, of which three were, in the end, also used for high throughput screening of senolytic compounds. Possible senolytic agents were identified by the optimized SER (Saddle-Edges-Ridges) spot image analysis based on SA- β -galactosidase activity using high throughput screening. In *in vivo* experiments on mouse models, a non-standard biological material - mouse hair follicle cells - was used, and the possibilities of their use and potential were also included in this work. Non-invasive sampling and subsequent work with hair follicles pay attention to the very current topic of the 3R rules (replace, reduce and refine) and lead to compliance with the most humane conditions when working with laboratory animals. In addition, 3 senolytic agents (S1, S2 and S3) were identified as having a great potential to play their role in the field of senotherapy.

All presented results given in this thesis could help to identify senolytically active compounds and contribute to a shift in aging research that is a very lively and vibrant biomedical topic and has the possible capability to ultimately offer personalized solutions to increase both human longevity and quality of life.

Obsah

1.	Teoretický úvod.....	9
1.1	Senescence.....	9
1.2	Biomarkery senescence a jejich detekce	15
1.2.1	Markery odvozené od morfologických a strukturních změn	15
1.2.2	Markery odvozené od zástavy buněčného cyklu	20
1.2.3	Markery odvozené ze sekrečního fenotypu (SASP)	21
1.2.4	Další markery	24
1.2.5	Próby detekující senescentní buňky	25
1.3	Buněčné modely senescence	26
1.4	Zvířecí <i>in vivo</i> modely senescence	28
1.5	Senolytické a senotoxické látky v terapii předčasného stárnutí	32
1.5.1	Senolytické a/nebo senotoxické malé molekuly.....	33
1.5.1.1	Cílení anti-apoptických drah	36
1.5.1.2	Inhibice PI3K a dalších kináz.....	37
1.5.1.3	Cílení na osu p53/p16 a DDR dráhu	37
1.5.1.4	Inhibice NF- κ B a C/EBP β	38
1.5.2	Další přístupy eliminace stárnoucích buněk.....	39
1.5.3	Senolytika v protinádorové terapii.....	41
1.5.4	Nanočástice dopravující aktivní látky do senescentních buněk	42
1.6	Klinické testy.....	44
2.	Specifické cíle práce	46
3.	Materiál a metody	47
3.1.	Cíl 1.....	47
3.1.1.	Buněčné linie a kultivace	47
3.1.2.	Ozáření buněk (IR)	49
3.1.3.	Mikroskopie.....	50
3.1.4.	Manuální zhodnocení indukce senescence.....	50
3.1.5.	Potvrzení indukce senescence - lipofuscin.....	50
3.1.6.	Potvrzení indukce senescence - SA- β -gal aktivita	51
3.1.7.	MTS	52
3.1.8.	Potenciálně senolytické látky testované pomocí MTS	53
3.1.9.	SA- β -gal kit a SER spot analýza obrazu	53
3.1.10.	Testování látek pomocí SER spot analýzy.....	55

3.1.11.	<i>In vitro</i> replikativní model senescence	57
3.2.	Cíl 2.....	57
3.2.1.	Etické prohlášení	57
3.2.2.	Neinvazivní odběr myších chlupů	58
3.2.3.	Izolace DNA a RNA	60
3.2.4.	Genotypizace - PCR a elektroforetická separace	61
3.2.5.	Imunofluorescence.....	62
3.2.6.	Giemsovo barvení.....	63
3.2.7.	Topické aplikace chemických klastogenů.....	63
3.3.	Cíl 3.....	64
3.3.1.	<i>In vivo</i> model replikativní senescence	64
3.3.2.	Reverzní transkripce, qPCR a analýza dat	64
3.3.3.	Aplikace látek v <i>in vivo</i> modelu replikativní senescence	65
3.3.4.	Indukce senescence pomocí IR v <i>in vivo</i> modelu.....	66
3.3.5.	Aplikace látek v <i>in vivo</i> IR modelu senescence	66
4.	Výsledky	68
4.1.	Cíl 1.....	68
4.1.1.	Morfologická odezva buněčných linií na radiaci	68
4.1.2.	Vizualizace lipofuscinu v senescentních buňkách.....	71
4.1.3.	SA-β-galaktosidázová aktivita v senescentních buňkách	73
4.1.4.	Testování senolytické aktivity chemických sloučenin <i>in vitro</i>	74
4.1.5.	SER spot analýza SA-β-galaktosidázové aktivity	75
4.1.6.	Určení senolytické aktivity látek ze SER spot analýzy	80
4.1.7.	Potvrzení senolytického účinku na modelu replikativní senescence	85
4.2.	Cíl 2.....	87
4.2.1.	Úspěšnost odběru myších chlupů	87
4.2.2.	Výtěžnost izolace DNA a RNA z myších chlupů.....	87
4.2.3.	Genotypizace pokusných zvířat.....	90
4.2.4.	Barvení jaderných a cytoplazmatických proteinů ve folikulech	91
4.2.5.	Vliv topicky aplikovaných klastogenů na marker poškození DNA	93
4.3.	Cíl 3.....	95
4.3.1.	Změny senescentních markerů v <i>in vivo</i> replikativním modelu	95
4.3.2.	Změny senescentních markerů po aplikaci látek v replikativním modelu.....	97
4.3.3.	Změny senescentních markerů v <i>in vivo</i> IR modelu.....	99
4.3.4.	Změny senescentních markerů po aplikaci senolytických látek v IR modelu	100

5.	Diskuze.....	104
6.	Závěr	112
7.	Seznam zkratek.....	113
8.	Bibliografie.....	119
9.	Reference.....	121
10.	Přílohy	147
11.	Suplement.....	208

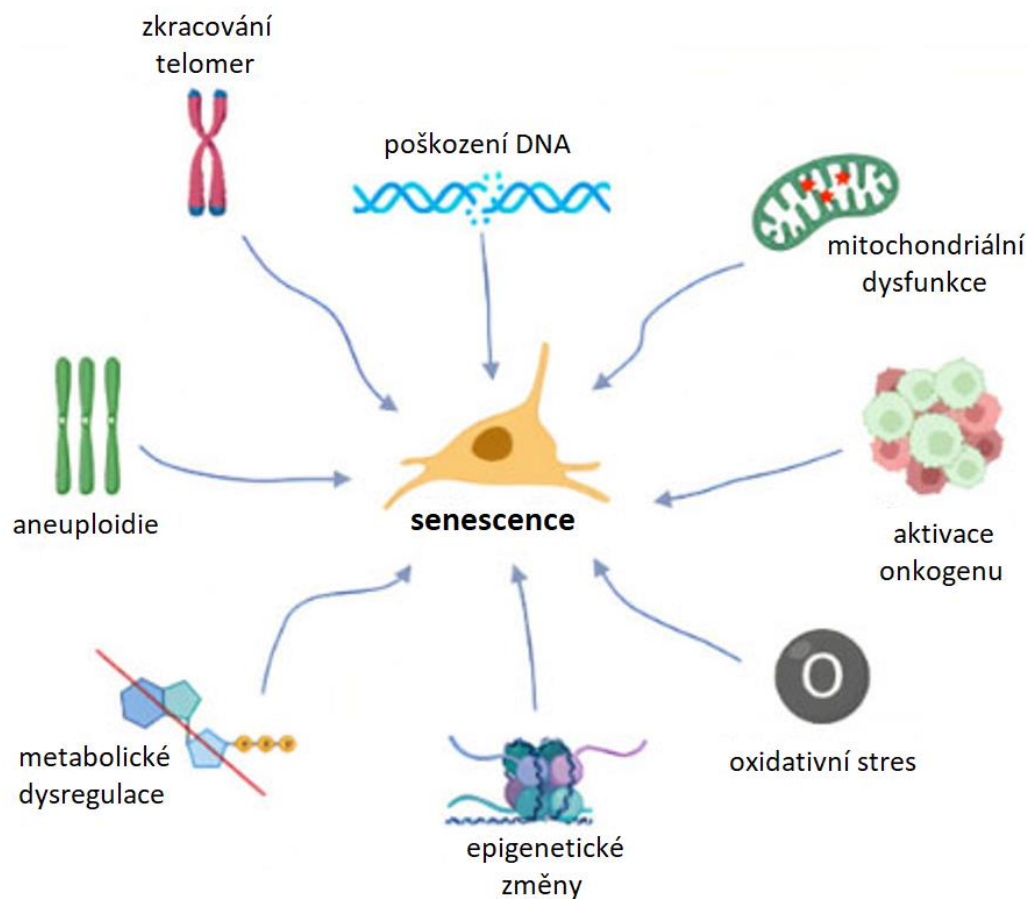
1. Teoretický úvod

1.1 Senescence

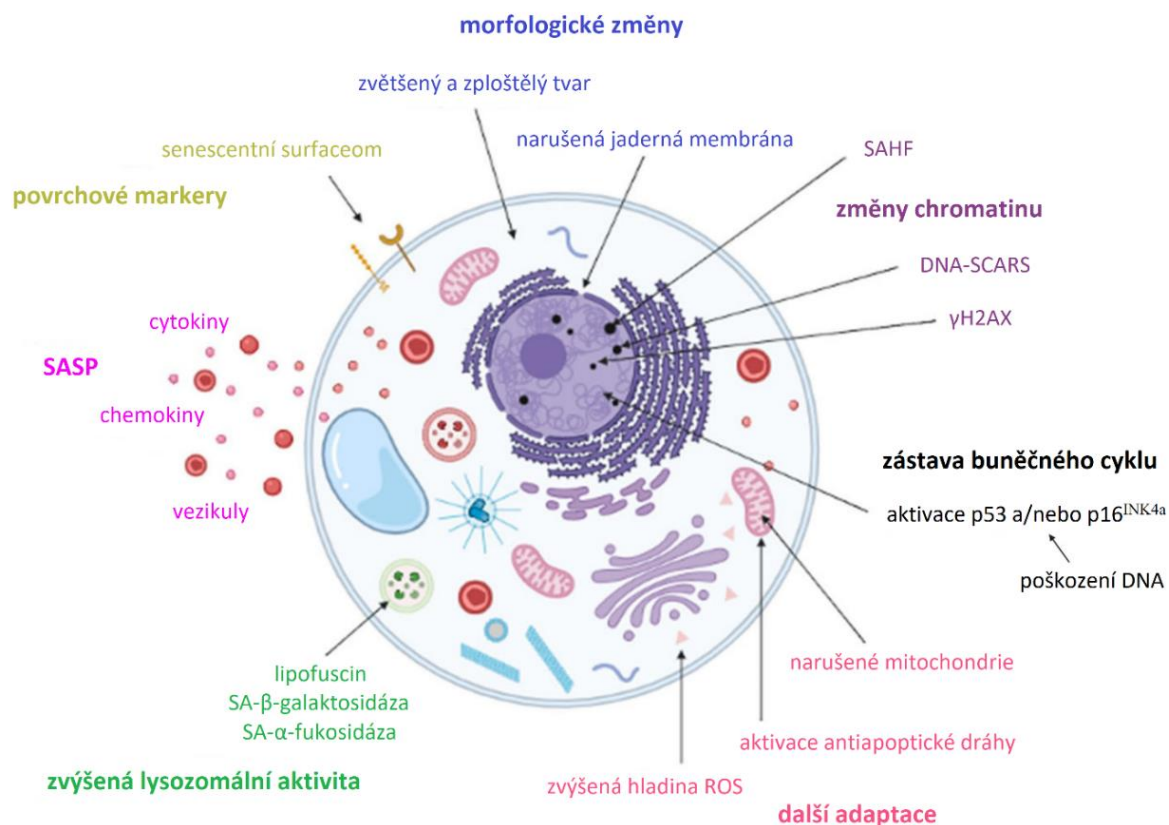
Senescence a stárnutí jsou velmi úzce spřažené děje, ne však ekvivalentní. Stárnutí je předvídatelná přirozená postupná reakce v organismu a dochází k němu v důsledku procesů podporujících stárnutí jako je poškození DNA, peroxidace a/nebo chybné skládání proteinů, což vede k buněčné smrti nebo k senescenci. Naopak senescence je popisována jako stabilní ireverzibilní proces zástavy buněčného růstu, který přispívá ke stárnutí a progresi onemocnění souvisejících se zvyšujícím se věkem, ale na druhou stranu také fyziologicky chrání mnohobuněčné organizmy před neoplázií [1]. Permanentní zástavu proliferace na buněčné úrovni poprvé pozorovali a studovali Hayflick a Moorehead v roce 1961 a prokázali, že životnost primárních lidských buněk je omezena přibližně na 60 dělení [2]. Od této chvíle se senescence stala diskutovaným tématem na poli biomedicínského výzkumu. Obecné vlastnosti senescentních buněk byly detailně popsány již dříve, v dnešní době se pozornost ubírá především směrem k lepšímu porozumění molekulárních mechanismů vedoucích k indukci senescence, dráhám spojeným se senescencí a samozřejmě k identifikaci potenciálních molekulárních cílů terapie [3–5]. Nedávno byly publikovány studie zabývající se možností selektivní eliminace senescentních buněk z tkání vedoucí ke zmírnění příznaků onemocnění a dokonce k regeneraci [6–8]. V důsledku těchto zjištění se definice senescence z původní charakteristiky dle Hayflicka [2] a některých dalších autorů [9,10] vyvinula a změnila. V současnosti je senescence popisována spíše jako buněčný stav, který odpovídá na různé vnitřní i vnější podněty (Obrázek 1). Tyto podněty směřují a mění vnitřní fungování buňky a mohou tím navodit senescenci. Příkladem takových podnětů je např. aktivace onkogenu, působení oxidativního stresu, dysfunkce mitochondriálního aparátu, ozáření a expozice nejrozličnějším chemoterapeutickým látkám [5]. V několika předchozích letech byla také čteně diskutována teorie oxidačního stresu, která je založená na hypotéze, že během stárnutí buňky ztrácí svou funkci v důsledku poškození vyvolaného volnými radikály (z angl. reactive oxygen species, ROS) [11]. Nástup senescence není spojen pouze se zástavou buněčného cyklu, ale i s morfoloickými a fenotypovými změnami, k nimž dochází v průběhu úvodní fáze. Buňky získávají nový pozměněný tvar, jsou zploštělé a zvětšené. Změna morfologie je doprovázena typickými projevy jako remodelace jaderného chromatinu, jež vede ke změnám transkripčního profilu buňky, také ztráta laminu B1, což vysoce ovlivňuje strukturu jaderné membrány, spuštění oxidativního metabolismu v mitochondriích, a hlavně aktivace drah vedoucích

k rezistenci buňky na apoptózu (z angl. Senescent Cells Anti-apoptotic Pathway, SCAP). Buněčná senescence s sebou také přináší zvýšení lysozomálního obsahu, což může být reakce buňky na nahromadění poškozeného organického materiálu nebo jednoduše následek zástavy buněčného dělení. Nejtypičtějším představitelem z řad lysozomálních enzymů v kontextu senescence je β -galaktosidáza, jejíž aktivita je často měřena a považována za marker senescence (z angl. Senescence-Associated β -galactosidase activity, SA- β -gal). V posledních letech se také často hovoří o sekrečním fenotypu senescentních buněk (z angl. Senescence-Associated Secretary Phenotype, SASP). Typické znaky senescentních buněk jsou ilustrovány na Obrázku 2. Navíc můžeme zmínit autofágii, která je zatím ne přesně známým způsobem spojena se senescencí [9]. Autofágie je proces degradace poškozených makromolekul a organel probíhající v buněčných lysozomech, a to jako následek působení stresových podnětů, celý proces přispívá k homeostáze organismu. Může být spojována jak s apoptózou, tak se senescencí [12]. Je zajímavé, že zvýšená úroveň autofágie vede k buněčné smrti, zatímco inhibice autofágie může vyvolat senescenci [13,14]. Například proces autofágie probíhající v nádorových buňkách může interferovat s apoptózou [15], ale v některých případech může skutečně navodit buněčnou smrt [16]. Podobné protichůdné důkazy existují i pro senescenci. V některých případech působí autofágie jako senescenci podporující induktor [17], zatímco v jiných situacích u určitých typů buněk může narušení autofágie také vést k progresi senescence [18]. Většina recentní literatury naznačuje, že výsledek vzájemného působení autofágie a senescence závisí na typu buňky, mikroprostředí a nejspíš i na dalších okolnostech.

Význam a role senescence v organismech je kontroverzní: senescence může být považována za velmi užitečný typ obrany buněk, jelikož patří mezi důležité a účinné protinádorové mechanismy, také hraje roli při embryonálním vývoji a při hojení ran. Nicméně může být brána také jako škodlivý buněčný stav vzhledem k tomu, že při akumulaci senescentních buněk dochází ke snížení funkční a regenerativní kapacity tkání, což vede ke stárnutí, degeneraci tkání a rakovině [10]. Oba tyto pohledy na senescenci jsou zřejmě správné, ale vždy záleží na okolnostech, kontextu, věku a zdravotním stavu jedince.



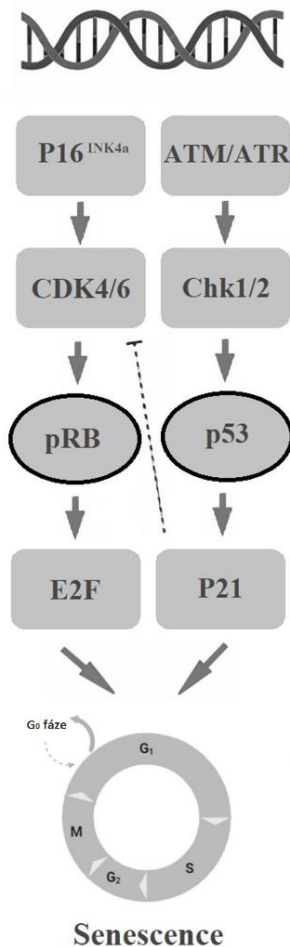
Obrázek 1: Buněčná senescence může být indukována několika podněty. Jako první bylo identifikováno zkracování telomer, které úzce souvisí s tzv. replikativní senescencí. Také genomické změny včetně poškození DNA, aktivece onkogenu, aneuploidie a epigenetické alterace mohou vést k senescenci. Mezi další faktory, které mohou přispět k nevratné zástavě buněčného cyklu, patří mitochondriální dysfunkce, rozsáhlá tvorba ROS a metabolická dysregulace (adaptace obrázku z Přílohy 1).



Obrázek 2: Hlavní znaky buněčné senescence. Mezi biomarkery silně svázané se senescencí a pozorované u většiny senescentních buněk patří změny velikosti a tvaru. Ostatní rysy uvedené na tomto obrázku nejsou pro senescenci výlučné, ale jsou hromadně považovány za charakteristické znaky. Senescentní buňky běžně vykazují aktivaci drah p53 a/nebo p16 vedoucích k ireverzibilní zástavě buněčného cyklu, změny chromatinu a narušení jaderného obalu. Velmi často bývá pozorována i zvýšená činnost a počet lyzozomů ústící v nárůst aktivity SA-β-galaktosidázy, která je zřejmě nejčastěji používaným markerem senescence. Senescentní buňky mohou také vykazovat silnou parakrinní sekreci (SASP), závažné mitochondriální poruchy spojené s aktivací antiapoptických drah a různé další vlastnosti (adaptace obrázku z Přílohy 1).

Indukce a průběh senescence je ovládán dvěma hlavními signálními dráhami, které mohou být aktivovány různými vnitřními a vnějšími stimuly. Jedná se o aktivaci drah p53 a/nebo p16^{INK4a}. Protein p53 a jeho efektor p21 je zcela esenciální pro spuštění první úvodní fáze senescence, během níž dochází k zástavě buněčného dělení, avšak buňky zůstávají metabolicky aktivní. Role p53 se během této fáze odvíjí od své koncentrace, post-translačních modifikací a působení mikroprostředí. Během iniciace senescence prudce roste exprese p21, která na druhou stranu velmi rychle klesá s postupující propagací senescence do další fáze. P21 významně přispívá k zastavení buněčného cyklu v G1/S a G2/M fázi buněčného cyklu specifickou modulací aktivity některých molekulárních cílů proteinu p53 jako jsou CDC25B (Cell Division Cycle 25B), CDC25C (Cell Division Cycle 25C) a survivin [19–21]. V tuto chvíli je senescence stále reverzibilní. Jakmile buňka projde kritickým bodem a vstoupí do druhé udržovací fáze, senescence se stává ireverzibilní. Druhá fáze je řízena dráhou p16^{INK4a}/pRb [22,23] (Obrázek 3), koncentrace p16 dramaticky stoupá, tudíž hraje v této fázi hlavní roli. Proteiny p16 a p21 inhibují aktivitu cyklin-CDK (cyklin dependentní kináza) komplexů, čímž regulují fosforylaci proteinů z Rb rodiny a expresi jejich cílového genu E2F [24]. Se senescencí jsou spojovány tři proteiny z Rb rodiny - Rb/p105, p107, a Rb12/p130. Postupný rozvoj senescence záleží obzvlášť na funkci Rb12/p130 tvořící komplex s E2F-4, jenž reguluje cílové geny proteinu E2F. Pokud buňka dostane podnět k progresi buněčného cyklu, komplex Rb12/p130/E2F-4 je inaktivován působením CDKs. Nicméně pokud jsou CDKs inhibovány, Rb proteiny zůstávají aktivní a potlačují progresi buněčného cyklu [25–28]. A proto proteiny z Rb rodiny, především Rb12/p130, hrají významnou roli v regulaci buněčného cyklu a senescence. Z recentních studií vyplývá, že celá Rb rodina je zapojena do řízení senescence, avšak přesná funkce většiny jejich členů teprve čeká na objasnění [29,30].

Vnitřní podněty:
poškození DNA
činnost onkogenu
zkracování telomer



Vnější podněty:
redoxní rovnováha
výživa
zánět

Obrázek 3: Aktivace senescence prostřednictvím drah p53 a p16^{INK4a}. Mnoho vnitřních i vnějších faktorů může vyvolat senescenci skrz tyto dráhy. Za specifických podmínek p16 aktivuje CDK4/6, což vede k akumulaci pRb a regulaci transkripčních faktorů E2F a následně k indukci senescence. Poškození DNA a DDR (angl. DNA-damage response) může také vést k regulaci ATM-Chk2 (z angl. ataxia-telangiectasia mutated - Checkpoint Kinase 2) nebo ATR-Chk1 (z angl. ATM and Rad3-related - Checkpoint Kinase 1) a tím k aktivaci p53 a p21 [10] (adaptace obrázku z Přílohy 1).

Buněčná senescence spuštěná výše popsaným způsobem se nazývá senescencí primární a můžeme ji odlišit od senescence sekundární. Buňky v primární senescenci jsou totiž schopné indukovat sekundární senescenci v dalších doposud proliferujících buňkách. K tomuto fenoménu dochází dvěma způsoby: (1) šíření senescence je možné skrze sekreci SASP faktorů do okolí senescentních buněk (parakrinní senescence), (2) nebo kontaktem mezi buňkami různého typu (juxtakrinní senescence). Sekundární senescence tak umožňuje zprvu menšímu počtu senescentních buněk s replikační neschopností zvýšit svůj počet, šířit se do vzdálenějších míst v organismu, a tím i dále přispívat k projevu patologií souvisejících s věkem [31].

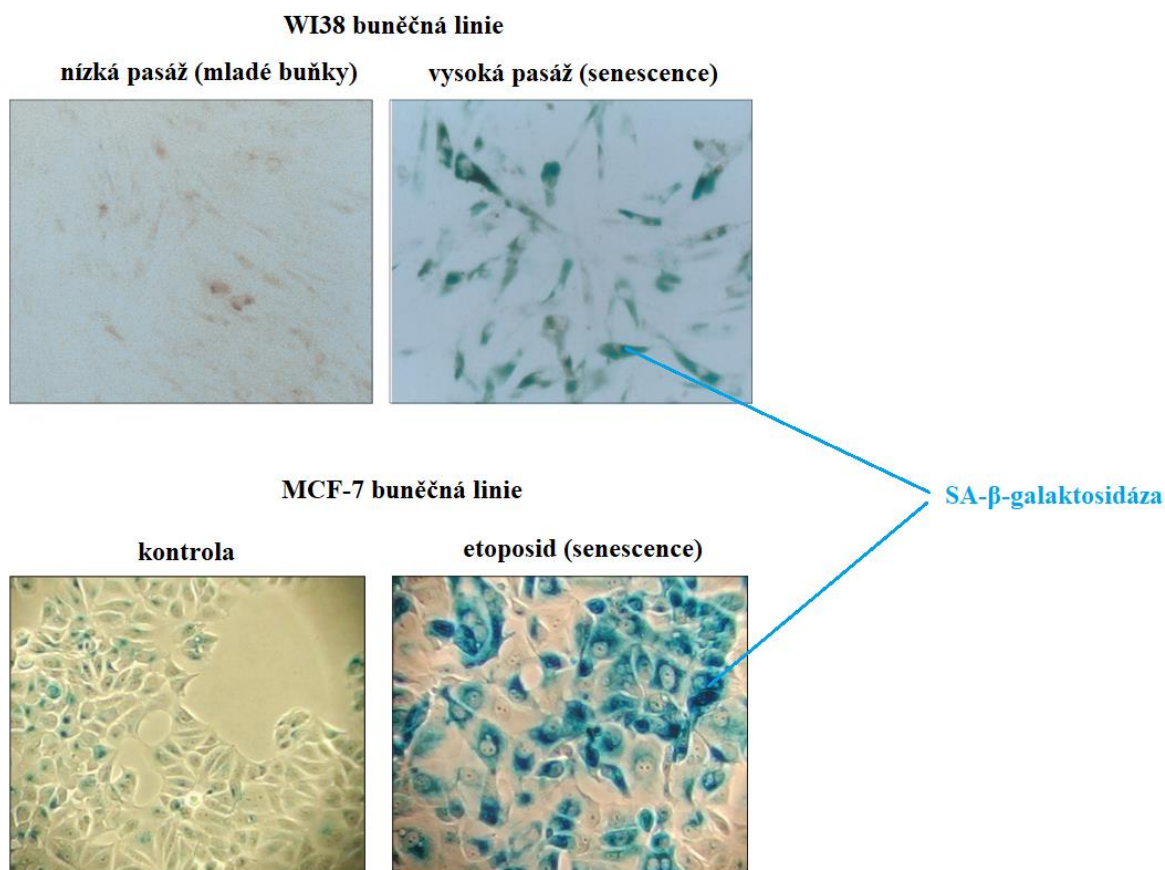
1.2 Biomarkery senescence a jejich detekce

Senescentní buňky vykazují řadu morfologických a biochemických charakteristických rysů, které je možné využít k jejich detekci *in vitro* a/nebo *in vivo* [32,33]. Jelikož žádný jednotlivý marker není dostatečně specifický, ke zvýšení specifity a jednoznačné identifikaci senescentních buněk se používá kombinace markerů i analytických technik. Některé známé markery z různých skupin jsou uvedeny v přehledu v Tabulce 1 na konci kapitoly. Jak již bylo zmíněno, senescentní buňky jsou obvykle velké a zploštělé, což lze jednoduše pozorovat pomocí světelného mikroskopu nebo průtokové cytometrie (z angl. flow cytometry, FCy) [34,35]. Mezi další běžně užívané způsoby detekce senescentních buněk patří imunofluorescence (IF), imunohistochemie (IHC), westernblot analýza (WB), reportérové analýzy, inkorporace barviv, enzymatické značení, polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction, PCR), fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) a ELISA (z angl. enzyme-linked immunosorbent assay). Nejvhodnější způsob detekce se vždy odvíjí od konkrétních cílů experimentu a zvoleného modelu senescence.

1.2.1 Markery odvozené od morfologických a strukturních změn

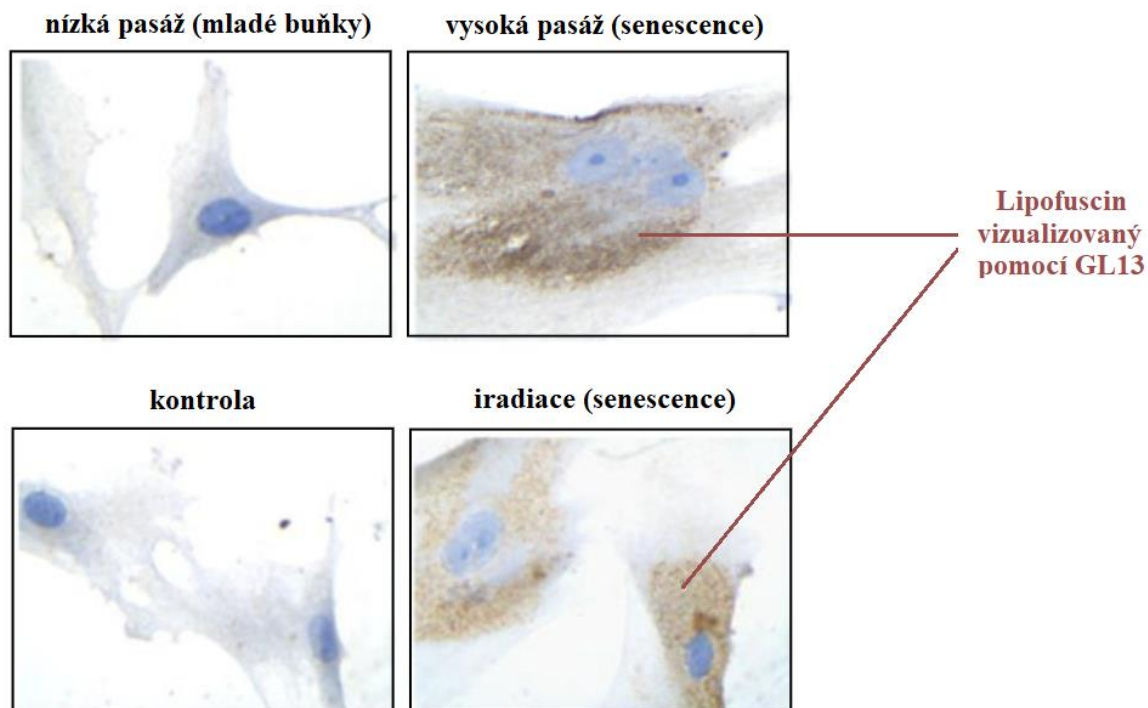
První hlavní skupina zahrnuje markery senescence asociované se strukturními a morfologickými změnami ve stárnoucích buňkách. Kromě již zmíněných změn ve velikosti a tvaru senescentních buněk, je tento stav velmi často doprovázen zvýšenou lysozomální aktivitou, kterou je možné detekovat pomocí enzymatického barvení [33]. Zvláště významná je aktivita SA- β -galaktosidázy - lysozomálního enzymu spjatého se senescencí, jehož optimální pH je 6,0 a lze jej detekovat barvením [36–38] (Obrázek 4). Již velmi dlouhou dobu je SA- β -gal zlatým standardem detekce senescentních buněk, ale některé recentní studie zpochybňují její specifitu. Např. SA- β -gal je aktivní v neuronech [39] a je exprimována ve vyvíjejících se embryích [40], ale ani v jednom ze zmíněných případů se nejedná o aktivitu enzymu plynoucí ze stárnutí. Jako marker tedy není dokonalá, ale i přes drobné pochyby ohledně specifity zůstává celosvětově vedoucím markerem senescence. Pro zvýšení přesnosti se často využívá kombinace více markerů. Dále je možné barvením detekovat zvýšenou aktivitu enzymu SA- α -fukosidáza, která je součástí výbavy lysozomů společně s SA- β -gal. Důležité je ale zmínit, že i přes popularitu SA- β -gal, zvýšená regulace SA- α -fukosidáza v senescentních buňkách je mnohem více specifická [41]. Velmi užitečným markerem může být i lipofuscin - žlutohnědý pigment hromadící se v lysozomech, obsahující zbytky degradovaných nebo metabolizovaných lipidů, oxidovaných proteinů či kovů - jenž se akumuluje v těle se

zvyšujícím se věkem. K jeho detekci postačí světelný mikroskop, lze využít jeho autofluorescenci nebo použít barvení Súdánskou černí B (z angl. Sudan Black B, SBB) [42,43]. Pro vysoce citlivou detekci lipofuscinu byla dokonce navržena a připravena nová molekula obsahující biotin s navázaným analogem SBB. Nazývá se GL13 a je možné ji po navázání na lipofuscin v buňkách vizualizovat pomocí specifické protilátky namířené proti biotinu [44] (Obrázek 5).



Obrázek 4: Enzymatické barvení SA-β-galaktosidázy pomocí kitu od Cell Signaling Technology (#9860). Názorný příklad barvení buněk v replikativní senescenci a senescenci indukované etoposidem. Obrázek upraven z návodu výrobce (<https://www.cellsignal.com/products/cellular-assay-kits/senescence-b-galactosidase-staining-kit/9860>).

Lidské diploidní plicní fibroblasty



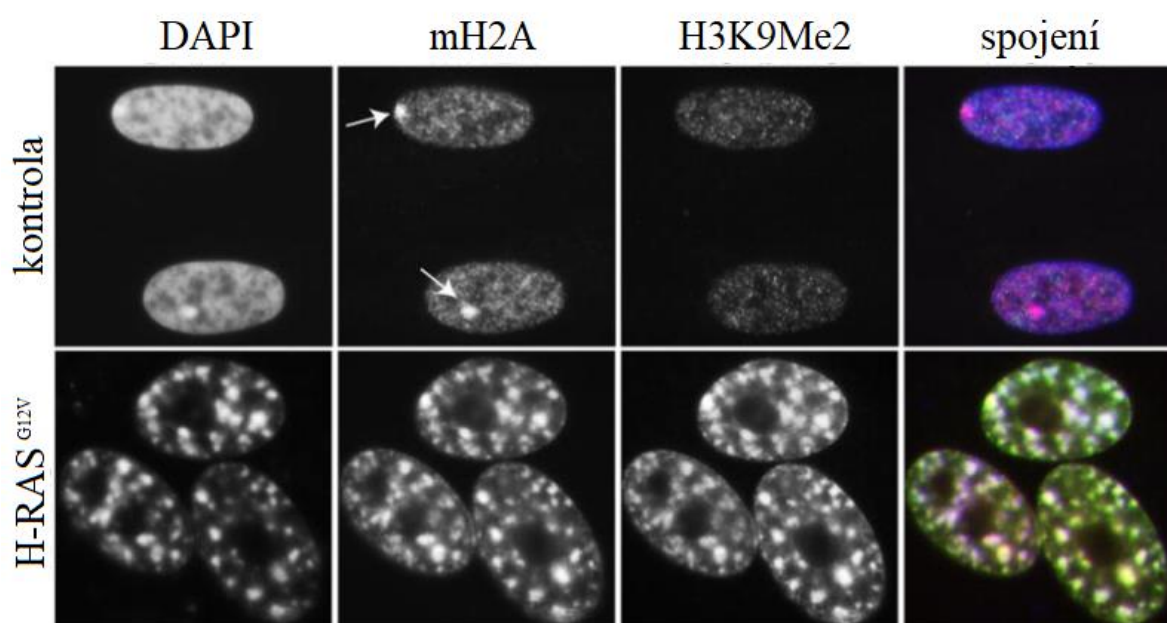
Obrázek 5: Barvení lipofuscinu pomocí analogu SBB - GL13. Názorný příklad barvení buněk v replikativní senescenci a senescenci indukované radiací. Obrázek upraven z [45].

Následující třída indikátorů senescence zahrnuje molekuly odpovídající na poškození DNA (DDR), jejich exprese je obvykle vizualizována imunofluorescenční technikou [33]. V tomto kontextu nejčastěji využívanou a velmi dobře známou molekulou z řad DDR proteinů je bezpochyby γ H2AX. Histon H2AX v tomto případě nese serin fosforylovaný na pozici 139 (Ser-139) a v této formě se akumuluje v místech dvouvláknových zlomů (z angl. double strand break, DSB) [46], čímž prakticky rekrutuje další členy DDR kaskády a následně i umožňuje detekci ostatních proteinů účastnících se oprav DSBs. V místě vzniku dvouvláknového zlomu DNA dochází k vazbě MRN komplexu, který je tvořen třemi proteiny (Mre11/Rad50/NSB1), hraje klíčovou roli při vyhledávání DSBs [47], váže a aktivuje proteinkinázy ATM a ATR [48]. Všechny zmíněné proteiny tedy mohou být využity jako indikátory buněčného stárnutí. Dalšími významnými markery v rámci této skupiny jsou určitě 53BP1 (z angl. tumor protein p53 binding protein), který kolokalizuje s γ H2AX [49]; MDC1 usnadňující zapojení ATM kinázy a tím i další fosforylaci H2AX [50]; Rad17, který odpovídá na lokální replikační stres [51] a TIFs (z angl. telomere dysfunction induced foci) tedy části DNA, kde telomery neplní svou funkci, tato místa jsou odhalena a tím pádem rozpoznána jako DSBs [52]. Zkracování zmíněných

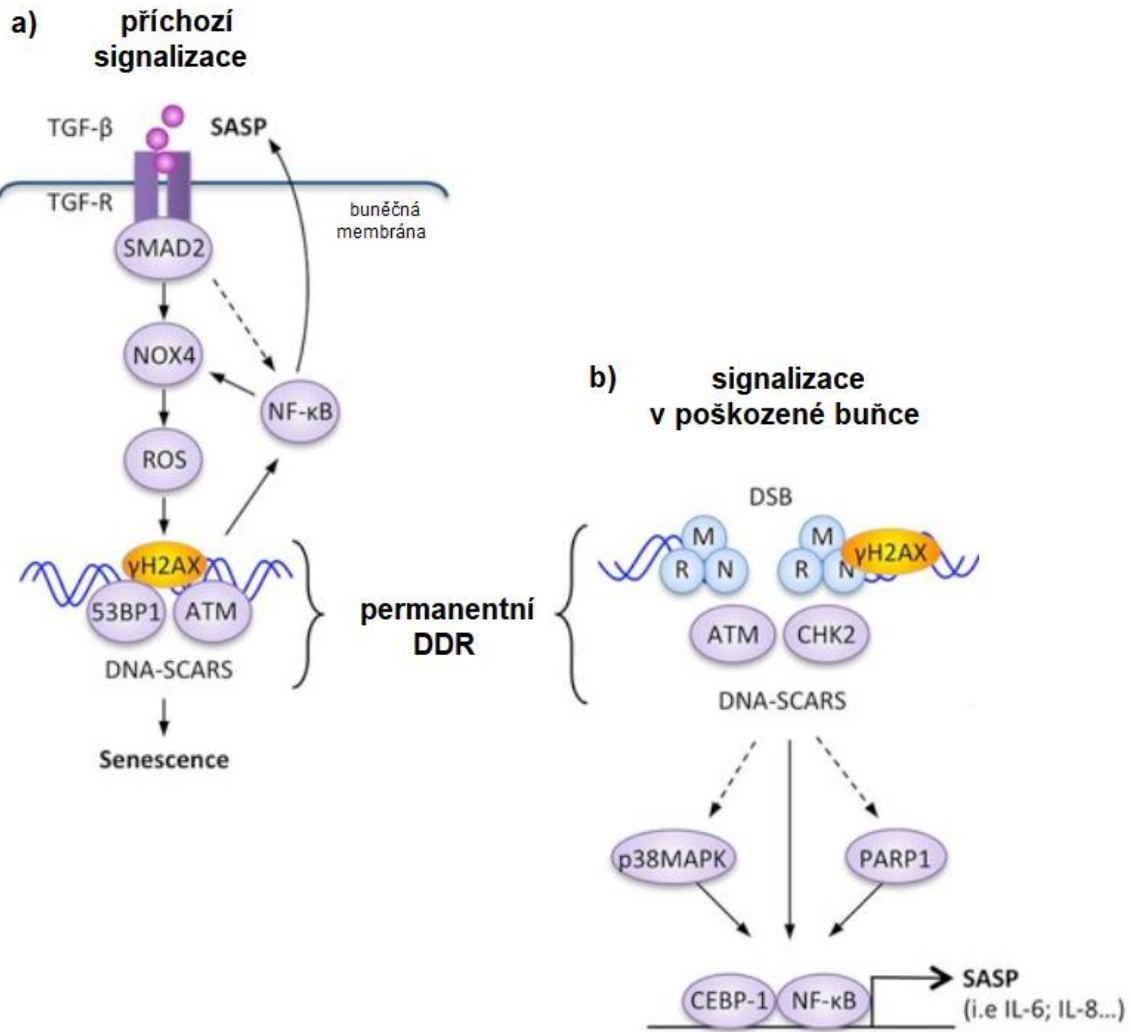
telomer a/nebo snížená exprese telomerázy může rovněž sloužit jako jeden z užitečných markerů replikativního stárnutí buněk a navíc jsou tyto změny jednoduše měřitelné pomocí qPCR (kvantitativní PCR, z angl. quantitative PCR) nebo FISH metodou [53].

Předčasná senescence může být navíc indukována v lidských i myších buňkách, a to působením oxidativního stresu, konkrétně například vystavení reaktivním formám kyslíku nebo peroxidům. Tyto a další stresové faktory podněcují produkci volných kyslíkových radikálů v buňkách, čímž je narušena rovnováha mezi antioxidační kapacitou buňky a množstvím ROS. Tato dysbalance vede k poškození DNA, následně k DDR, což může navodit senescenci [54]. A proto není překvapením, že někteří autoři spojují indukci senescence i s mitochondriální dysfunkcí. Mitochondrie jsou totiž hlavním producentem ROS. Nicméně je nutné podotknout, že vyvolání senescence působením oxidativního stresu zahrnuje složité a zatím ne dokonale popsané procesy. Každopádně nedávno byly mitochondriální ROS označeny jako esenciální induktor senescence skrze oxidativní stres. Senescentní model s uměle navozenou mitochondriální deplecí prokázal zástavu buněčného cyklu, avšak bez projevu hlavních klíčových znaků buněčného stárnutí: nedošlo ke zvýšení SA- β -gal aktivity, mnoho faktorů SASP absentovalo a navíc vůbec nebyla prokázána zvýšená exprese p16 a p21 [55]. Vzhledem k tomu, že oxidativní stres může vyvolat senescenci i bez projevu klasických markerů, stávají se ROS a zejména mitochondriální ROS potenciálním kandidátem na specifický marker senescence vyvolaný oxidativním stresem. Takovéto biomarkery by bylo možné detekovat fluorescenčně nebo pomocí průtokové cytometrie [56]. V lidských buňkách můžeme sledovat i další slibné markery senescence - epigenetické změny, tedy změny genové exprese bez alterace nukleotidové sekvence DNA [57]. Opravdu významným příkladem může být formování tzv. SAHF (z angl. Senescence-Associated Heterochromatin foci). SAHF lze popsat jako heterochromatinové domény, ve kterých díky epigenetickým změnám dochází k umlčení genů, jejichž produkty jsou za normální situace proteiny podporující proliferaci [58]. SAHFs jsou velmi jednoduše detekovatelné pomocí barvení DAPI nebo Hoechst 33342 s následnou vizualizací konfokálním mikroskopem [33]. V takovýchto nahuštěných strukturách je vázáno velké množství proteinů včetně heterochromatin proteinu 1 (HP1) a metylované formy histonu H3K9 [59], jež mohou být stanoveny pomocí IF a tím pádem sloužit jako marker senescence (Obrázek 6). Další zajímavou strukturní formací v rámci epigenetických změn senescentních buněk jsou bezesporu DNA-SCARS (z angl. DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence). Jsou to části chromatinu s trvalým poškozením DNA, kde jsou navázány DDR proteiny a PML tělíska (z angl. promyelocytic leukaemia protein). Propojení

DNA-SCARS a DDR signalizace je ilustrováno na Obrázku 7. DNA-SCARS mohou být řazeny mezi téměř univerzální markery senescence, jelikož jsou přítomny u většiny subtypů senescence [60]. Také struktura jaderného obalu může v průběhu senescence podléhat změnám, což samozřejmě ovlivňuje jak jadernou morfologii, tak genovou expresi. S tím souvisí ztráta laminu B1, která byla pozorována v lidských i myších buňkách podléhajících senescenci vyvolané poškozením, replikačním stresem nebo aktivací onkogenu. Navíc v myších tkáních můžeme sledovat sníženou hladinu mRNA i proteinu laminu B1 po ozáření a následném nástupu senescence, což dělá z laminu B1 další velmi cenný biomarker. Množství laminu B1 v jaderné membráně buněk může být detekována pomocí qPCR, IF nebo WB [61].



Obrázek 6: Vizualizace SAHF pomocí DAPI. Názorný příklad kolokalizace SAHF s vybranými histonovými variantami v buňkách vykazujících senescenci indukovanou aktivací onkogenu H-RAS .
Obrázek adaptován z [58].

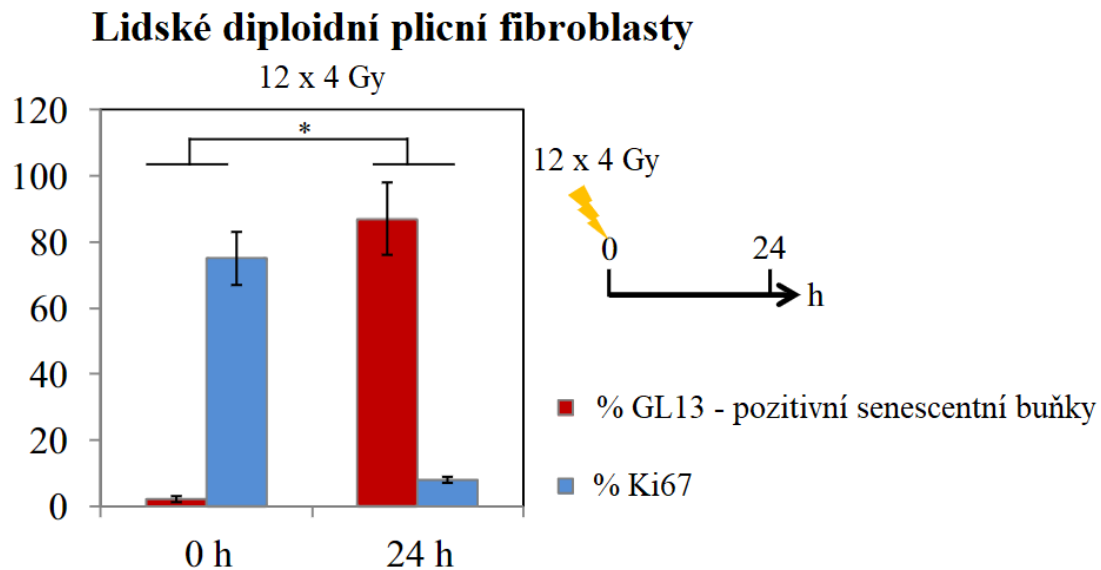


Obrázek 7: DDR signální dráhy mezi buňkami s trvalým poškozením DNA a jejich mikroprostředím. A) Extracelulární signalizace například přes TGF- β dráhu (z angl. transforming growth factor β) může posílit DDR a spustit tvorbu DNA-SCARS, které následně vedou k projevu senescentního fenotypu včetně sekrece SASP. SASP faktory působí pozitivní zpětnovazebnou smyčkou a posilují projevy senescence. B) DDR kaskáda reaguje na přetrvávající přítomnost DNA-SCARS v buňce aktivací vybraných transkripčních faktorů a tím dochází k zvýšené transkripci SASP faktorů. Obrázek upraven z přehledového článku [62].

1.2.2 Markery odvozené od zástavy buněčného cyklu

Existuje několik důležitých markerů exprimovaných při buněčném dělení/buněčném cyklu. Takovýto typ markeru by měl v senescentních buňkách absentovat, jelikož mají zastavený cyklus a dále se nedělí. Zejména zmiňme testy založené na inkorporaci bromodeoxyuridinu (BrdU) [63] a/nebo 5-ethynyl-2'-deoxyuridinu (EdU) [64], jež by měly prokázat sníženou nebo žádnou úroveň syntézy DNA. Senescentní buňky by také neměly vykazovat expresi Ki67 -

proteinu, který je exprimován výlučně v proliferujících buňkách napříč všemi fázemi buněčného cyklu (kromě G0) [65], Obrázek 8.



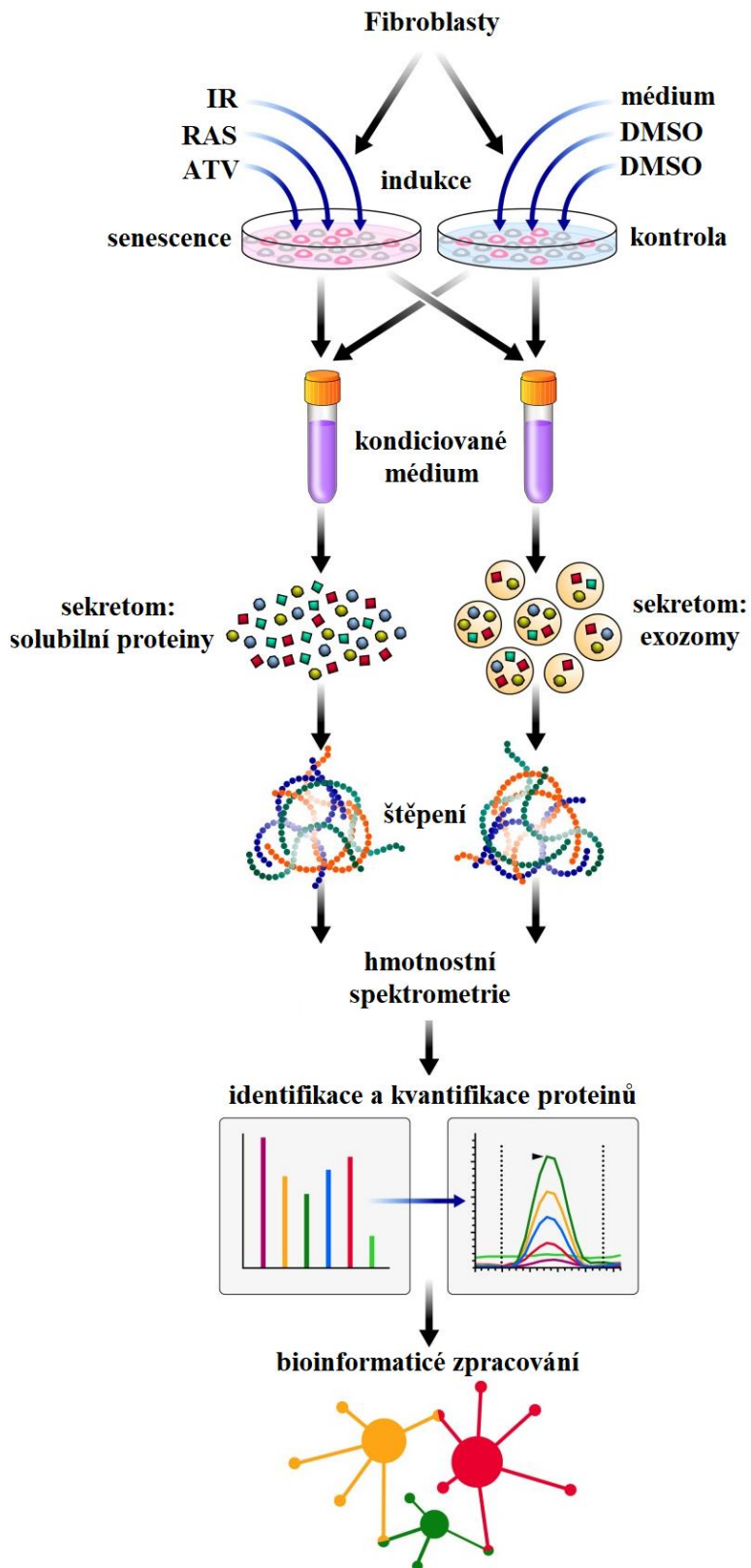
Obrázek 8: Převrácený vztah mezi GL13 barvením senescencí buněk a inkorporací proliferačního markeru Ki67 na příkladu buněčné senescence indukované frakcionovaným zářením. Adaptace z [45].

Jak by se dalo očekávat, také proteiny náležící do drah spouštějících zástavu buněčného cyklu a senescenci, a to především dráhy p16/RB a p53/p21, jsou velmi často používanými markery. Především se jedná o p16^{INK4a}, pRB, fosfo-pRB nebo p21, p53 a fosfo-p53, jejichž nadměrná exprese v senescentních buňkách bývá detekována pomocí IF, IHC a/nebo WB [66]. Méně známými proteinovými markery z těchto drah jsou například DEC1 a PPP1A. DEC1 je transkripční faktor se základním strukturním motivem helix-smyčka-helix (z angl. helix-loop-helix) a zprostředkovává nástup předčasné senescence v závislosti na expresi p53 [67]. PPP1A je katalytická podjednotka PP1 α , která je aktivní součástí p53 dráhy v průběhu senescence vyvolané aktivací onkogenu (z angl. oncogene-induced senescence, OIS) [68].

1.2.3 Markery odvozené ze sekrečního fenotypu (SASP)

Sekreční fenotyp senescentních buněk lze charakterizovat jako extenzivní produkci prozánětlivých látek to okolí, jejichž nedílnou součástí jsou především cytokiny [69]. Sekrece SASP faktorů do mikroprostředí ve tkáních se spouští během senescence vyvolané poškozením nebo onkogenem a je detekována pomocí WB, ELISA nebo specifickými SASP testy. Velmi diskutovaným tématem je detekce dalších látek a struktur, které jsou svým způsobem asociovány se SASP faktory. Avšak potvrdit buněčnou senescenci na základě těchto

přidružených markerů je velmi komplikované a výsledky mohou být zavádějící, jelikož za určitých podmínek mohou být takové látky produkovány i buňkami nesenescentními. Nedávno byla zveřejněna databáze shrnující tyto poznatky pod názvem The SASP Atlas protein database, nalezneme zde údaje jak o solubilních faktorech, tak o exozomech [70], schématicky znázorněný proces jejich identifikace je na Obrázku 9. V této databázi je možné hledat podle různých kritérií: a) podle buněčného typu - jsou k dispozici informace získané z fibroblastů a epiteliálních buněk, b) podle typu indukce senescence - radiace, aktivace onkogenu, ošetření atazanivirem nebo c) můžeme získat informace o exozomech produkováných senescentními buňkami po ozáření či aktivaci onkogenu (<http://www.saspatlas.com/>). Mezi nejznámější SASP faktory sekretované senescentními buňkami patří signální molekuly jako interleukiny (př. IL-6 a IL-8), chemokiny, membránové adhezní molekuly [71] a další růstové faktory [72].



Obrázek 9: Názorné schéma procesu identifikace SASP faktorů, které bylo použito při tvorbě The SASP Atlas Protein Database. Upraveno podle [70].

1.2.4 Další markery

Nakonec můžeme zmínit skupinu proteinových markerů, které plní svou funkci v nebo na membráně, příkladem jsou během senescence silně exprimované proteiny ICAM-1 nebo DEP1 [73]. Navíc senescentní buňky vykazují zvýšenou hladinu anti-apoptických a přežití podporujících proteinů jako Bcl-2 nebo Bcl-X. Blok apoptózy lze potvrdit měřením annexinu V, který absentuje v senescentních buňkách, nebo detekcí štěpením aktivovaných forem určitých kaspáz [6,74].

V dnešní době panuje neustávající úsilí identifikovat nové a více specifické markery senescence, takže by bylo velmi obtížné sestavit kompletní seznam všech markerů a potenciálních markerů. Avšak tato kapitola v kombinaci s níže uvedenou tabulkou by mohly pokrýt hlavní skupiny biomarkerů senescence i s příloženými četnými příklady.

Tabulka 1: Významné biomarkery senescence a metody používané pro jejich detekci.

znak senescence	biomarker	změna hladiny markeru	typ senescence	detekční metoda
morfologické změny	morfologie, velikost	široké, zploštělé	obecná	světelná mikroskopie, FCy
lyzozomální aktivita	SA- β -galaktosidáza	zvýšení	obecná	enzymatické barvení
	SA- α -fukosidáza	zvýšení	obecná	enzymatické barvení
	lipofuscin	zvýšení	obecná	SBB, GL13
poškození DNA, DDR	γ H2AX	zvýšení	obecná/vyvolaná poškozením	IF
	Mre11	zvýšení	obecná/vyvolaná poškozením	IF
	Rad50	zvýšení	obecná/vyvolaná poškozením	IF
	NSB1	zvýšení	obecná/vyvolaná poškozením	IF
	ATM	zvýšení	obecná/vyvolaná poškozením	IF
	ATR	zvýšení	obecná/vyvolaná poškozením	IF
	53BP1	zvýšení	obecná/vyvolaná poškozením	IF
	MDC1	zvýšení	obecná/vyvolaná poškozením	IF
	Rad17	zvýšení	obecná/vyvolaná poškozením	IF
TIF	zvýšení	obecná/vyvolaná poškozením	IF	
syntéza DNA	BrdU	snížení	obecná	inkorporace barvy, IF
	EdU	snížení	obecná	inkorporace barvy, IF
proliferace	Ki67	snížení	obecná	IHC, IF
dráha p16/pRB	p16INK4a	zvýšení	obecná	WB, IHC, IF
	pRB	zvýšení	obecná	WB, IHC, IF
	fosfo-pRB	zvýšení	obecná	WB, IHC, IF
dráha p53/p21	p53	zvýšení	obecná/vyvolaná poškozením	WB, IHC, IF
	p21	zvýšení	obecná/vyvolaná poškozením	WB, IHC, IF
	fosfo-p21	zvýšení	obecná/vyvolaná poškozením	WB, IHC, IF
	DEC1	zvýšení	obecná/vyvolaná poškozením	IHC, IF, speciální test
	PPP1A	zvýšení	obecná/vyvolaná poškozením	IHC, speciální test

Tabulka 1: Významné biomarkery senescence a metody používané pro jejich detekci (pokračování).

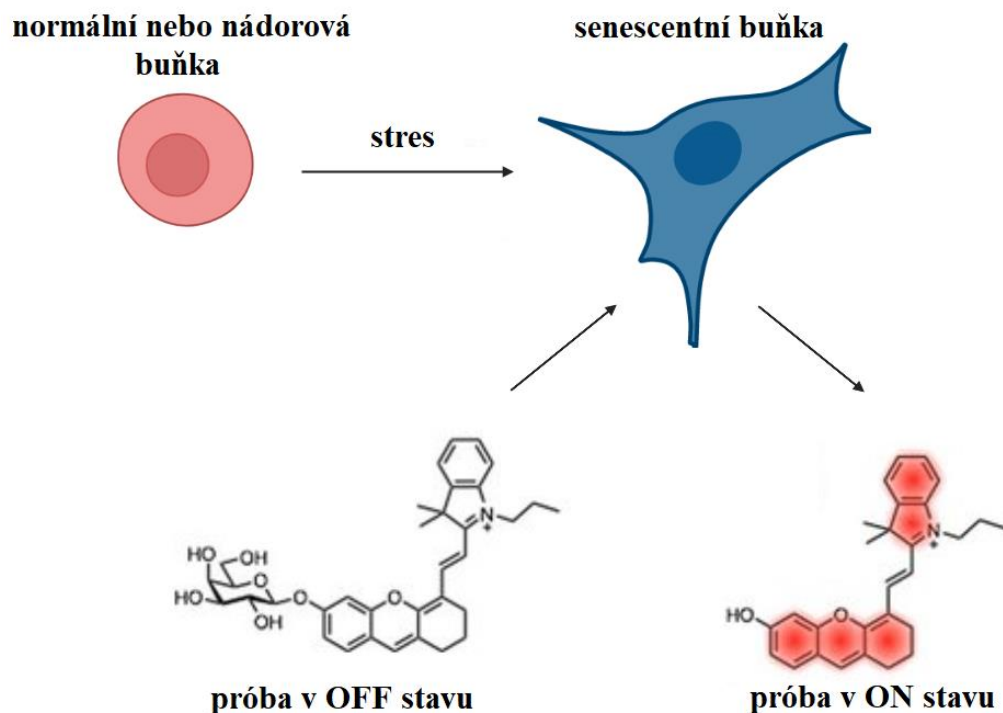
znak senescence	biomarker	změna hladiny markeru	typ senescence	detekční metoda
ROS	ROS	zvýšení	obecná/vyvolaná oxidativním stresem	fluorometrie, FCy
zkracování telomer	telomery	snížení	vyvolaná replikačním stresem	qPCR, FISH
SAHF	formace SAHF	zvýšení	obecná/vyvolaná poškozením	DAPI/Hoechst, konfokální mikroskopie
	HP1-gama	zvýšení	obecná/vyvolaná poškozením	IF, IHC
	H3K9-metylace	zvýšení	obecná/vyvolaná poškozením	IF
	PML tělíska	zvýšení	obecná/vyvolaná poškozením	IF
jaderná membrána	lamin B1	snížení	obecná	WB, IF, qPCR
sekrece cytokinů	SASP	zvýšení	vyvolaná poškozením/onkogenem	WB, ELISA, SASP-testy
proteiny plazmatické membrány	ICAM-1, DEPI	zvýšení	obecná/vyvolaná replikačním stresem/onkogenem	IF, WB, IHC, FCy
vyloučení apoptózy	annexin V, štípané kaspázy	absence	obecná	IF, IHC

1.2.5 Próby detekující senescentní buňky

V nedávné době bylo popsáno mnoho nově navržených fluorescenčních prób sloužících k monitorování SA- β -gal aktivity *in vitro*. Ale nejprve byly próby validovány pouze na lidských buňkách transfekovaných plazmidem, který nesl gen *lacZ* z *Escherichia coli*, což vedlo k nadměrné expresi bakteriální β -gal v cytoplazmě buněk. Tento model tedy neodrážel opravdovou endogenní aktivitu enzymu β -gal způsobenou senescencí. Úplně první fluorescenční próba na vyhledávání senescentních buněk *in vitro* byla testována na lidských diploidních fibroblastech, které podléhaly replikativní senescenci. Tato fotostabilní próba emituje světlo ve spektru od modré po žlutou v závislosti na aktivitě β -gal a navíc vykazuje velmi nízkou toxicitu [75]. Dále byla představena sonda Gal-Pro emitující v téměř infračerveném spektru s vysokou fotostabilitou, která rychle a přesně odpovídá aktivitě β -gal v živých buňkách podstupujících senescenci vyvolanou oxidativním stresem [76]. Obě próby se liší v chemické struktuře, ale podobají se v principu zapínání. Zprvu jsou v buňkách nefluorescenční (OFF režim), ale aktivitou β -gal mohou být konvertovány na fluorescenční formu (ON režim). Přepnutí na ON režim vede k emisi detekovatelného spektra světla.

Několik prací také popisuje možnosti *in vivo* detekce senescentních buněk v myších tkáních právě pomocí prób. Například próba AHGa je OFF/ON fluorescenční sonda obsahující ve své struktuře vazbu, již je možné hydrolyzovat enzymem β -gal. Tímto systémem byla prokázána přítomnost senescentních buněk v myších tkáních po podání chemoterapeutik [77]. Dále můžeme zmínit nedávno představenou sondu NIR-BG (z angl. near-infrared + β -galactosidase) detekující senescentní buňky jak v buněčných kulturách, tak v myších modelech senescence.

NIR-BG velmi dobře reaguje v modelech senescence po indukci některými látkami, radiací i chemoterapeutiky, Obrázek 10 [78]. Nicméně momentálně je klinická aplikace těchto prób velmi limitována kvůli jejich nízké schopnosti penetrace, což znemožňuje detekci senescentních buněk pomocí MRI nebo PET.



Obrázek 10: Aktivace NIR-BG próby v senescentních buňkách. Próba je aktivována uvnitř buněk SA-β-galaktosidázou. Detekce fluorescence: excitační $\lambda = 660$ nm, emisní $\lambda = 708$ nm. Obrázek podle [78].

1.3 Buněčné modely senescence

In vitro experimenty jsou používány ke studiu biologických jevů v kontrolovaném a předem specifikovaném prostředí, což potenciálně umožňuje detailní analýzu více jevů najednou. Nicméně kultivační láhve s buňkami a/nebo tkáněmi nedokážou dokonale napodobit prostředí, podmínky a vliv mnoha očekávaných i neočekávaných faktorů, kterým čelí buňky ve tkáních intaktního organismu. V podstatě existují dva přístupy studia senescence: (1) vyvolání senescence v určité buněčné linii pomocí exogenního faktoru anebo (2) použití modelové buněčné linie, která byla navržena a připravena právě pro účely studia stárnutí apod.

Replikativní/replikační senescence (neboli senescence vyvolaná replikativním/replikačním stresem) může být indukována jednoduše pasáží buněk v kultuře. Díky konstantnímu zkracování telomer získáme během několika dnů nebo týdnů (v závislosti na buněčném typu a konkrétní pasáži) senescentní buňky. Typický protokol na indukci replikativní senescence

v lidských diploidních fibroblastech (např. WI-38 nebo IMR-90) zahrnuje popis kultivačního postupu, dobu dělení buněk a doporučení ohledně konfluence. Každopádně všechny podmínky a parametry je nutné individuálně optimalizovat pro konkrétní buněčný typ [33].

Mnoho faktorů může vést k iniciaci předčasné nebo stresem vyvolané senescenci [5]. Nejčastěji používaným indukčním faktorem *in vitro* a *in vivo* je v tomto případě záření, jehož působení vede k akceleraci senescence v nádorových i normálních nenádorových buňkách [79,80]. Klíčovým parametrem indukce senescence pomocí záření je bezpochyby použitá dávka: všeobecně platí, že nižší až střední dávky (0,5 - 10 Gy) způsobují senescenci, ale vyšší dávky (> 10 Gy) mohou vést až k apoptóze. Konkrétní reakce a výsledný stav buňky závisí na míře poškození DNA vyvolané zářením a také aktivitě DDR dráhy [81]. Navíc můžeme sledovat rozdílný efekt záření při použití frakcionované dávky a dávky podané najednou, přestože celková dávka by byla v obou případech stejná. Například frakcionované ozáření nízkou dávkou aktivuje p53/p21 dráhu, což vede k projevu silnějšího a výraznějšího senescentního fenotypu než v případě jednorázového podání vysoké dávky o stejné celkové hodnotě [82]. Tudíž senescence indukovaná zářením závisí na čtyřech rozhodujících faktorech: (1) velikost dávky, jež ovlivňuje typ a míru poškození DNA i následnou reparační dráhu; (2) stav cílových buněk - př. nádorové a nenádorové buňky nebo odlišně diferencované buňky mohou reagovat jiným způsobem; (3) typ buněk/buněčné linie a (4) rychlost buněčného růstu - progresse senescence se může lišit i mezi buňkami v témže orgánu [83]. Klasický postup indukce senescence radiací ve většině případů doporučuje aplikaci dávky o velikosti 10 Gy. Následně je potřeba buňky monitorovat pomocí světelné mikroskopie a čekat na první fenotypový projev - morfologické změny. Poté je možné analyzovat markery senescence, což nastává nejdříve cca 7 - 10 dní po ozáření [33].

ROS molekuly jako například peroxid vodíku, superoxidové anionty nebo hydroxylové radikály patří taktéž k důležitým indukčním faktorům. Oxidativní stres vycházející z působení ROS vyvolává poškození buněk [84], což může navodit senescenci jak v lidských, tak v myších buňkách [54,85]. Produkce ROS bývá spuštěna působením exogenních nebo endogenních faktorů. Nejvýznamnějším zdrojem ROS jsou mitochondrie, jejichž dysfunkce byla již mnohokrát spojena se stárnutím a senescencí [86]. Peroxid vodíku je zřejmě nejčastěji užívaným induktorem senescence z řad ROS pro aplikaci *in vitro*. Aby aplikace H₂O₂ na buňky nevedla k buněčné smrti, je potřeba optimalizovat koncentraci H₂O₂ a to pro každou linii zvlášť. Toto lze provést pomocí dávkově závislého (angl. dose-response) experimentu, ve kterém jednoduše sledujeme buněčnou odpověď na různé koncentrace testované látky a vybíráme tu

s kýženým účinkem. Vysoké koncentrace ROS navozují apoptózu, zatímco nízké dávky aktivují dráhu p53/p21 [87]. Senescenci lze navodit inkubací buněk v růstovém médiu, které obsahuje příslušnou koncentraci H₂O₂ (typicky v rozmezí 50 - 800 μM) po dobu čtyř dnů. Tento způsob kultivace buněk se opakuje dokola a přitom se kontroluje tvar buněk; nástup předčasné senescence je indikován detekcí morfologických změn, které jsou velmi podobné těm v případě replikativní senescence [88].

Senescence patří k jednomu z anti-neoplastických mechanismů obrany buněk; namísto nádorové transformace mohou buňky vstoupit do jakéhosi mezistádia a stát se senescentními. I tento proces lze napodobit v laboratorních podmínkách, což umožňuje uměle indukci buněčného stavu podobného senescenci aktivací onkogenu v kombinaci s nahromaděním nádorových supresorů jako p53 a p16. Pro tento účel se většinou užívá onkogen Ras [89]; tento protokol popisuje transdukcii retrovirálního vektoru HRASv12 s následnou puromycinovou selekcí buněk. Postup je navržen tak, abychom získali buňky obsahující retrovirus během 6 dní, kdy je možné detekovat typické markery senescence [90]. Dále existuje tzv. BJ-Ras systém, ve kterém jsou BJ buňky ošetřeny doxycyklinem, což vede k expresi mutantní formy RASv12 v doxycyklinem indukovatelném konstruktu a k navození senescence (OIS) [91]. Bohužel ale manipulace s retroviry vyžaduje vyšší úroveň ochrany a k tomu příslušné vybavení (z angl. biosafety level 2, BSL-2), takže implementace takového postupu může být pro některé laboratoře komplikací.

V dnešní době je dokonce možné hledat v existujících seznamech uměle připravených senescentních buněk, které jsou určeny k okamžitému použití v laboratoři [92].

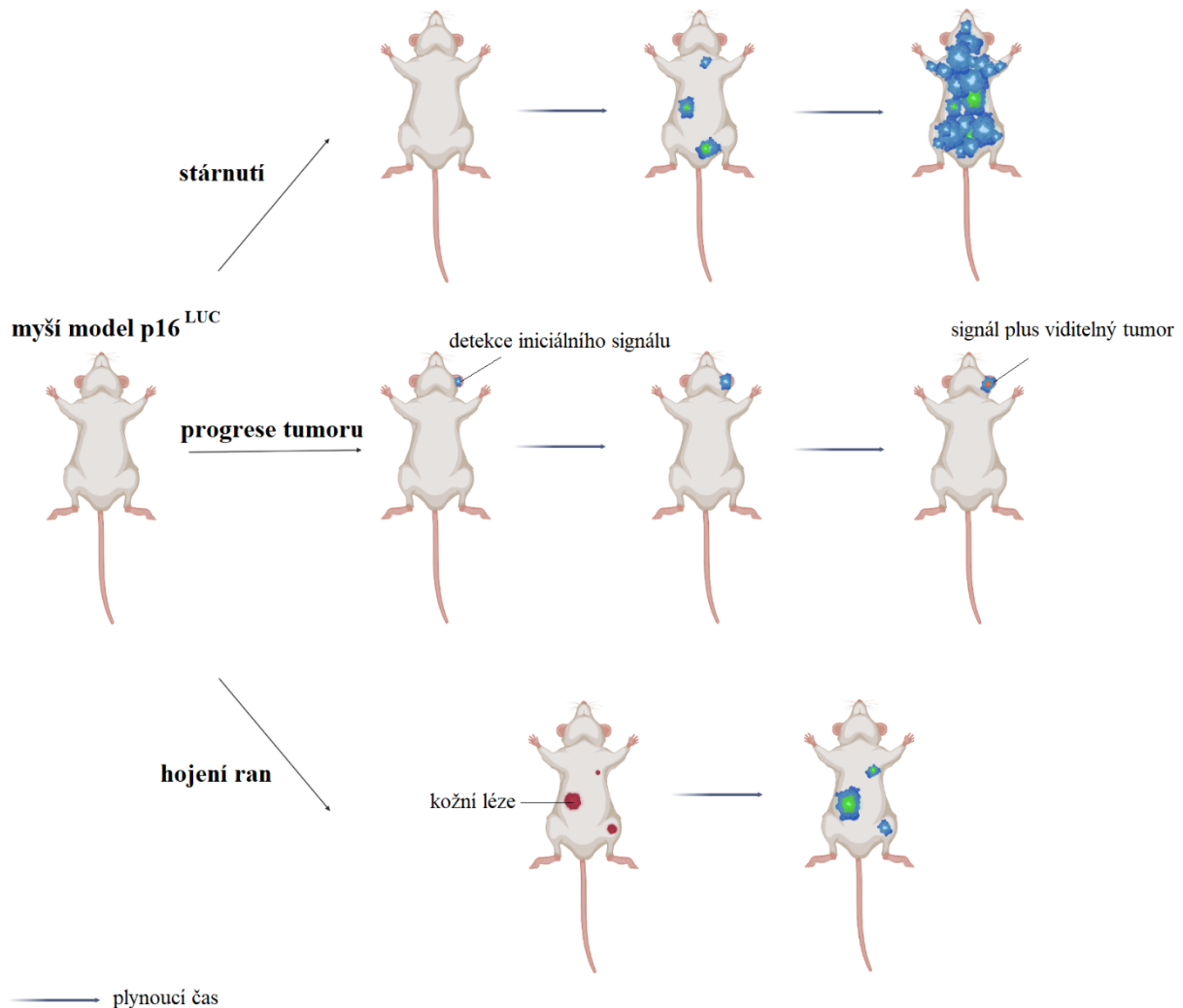
1.4 Zvířecí *in vivo* modely senescence

In vivo studie slouží k potvrzení výsledků získaných během experimentů *in vitro* a reprezentují tedy velmi důležitý mezičlánek propojující pokusy na buňkách a klinické testování. Zvířecí modely, zvláště pak modely myší a modely dalších hlodavců, jsou často používány jako pokračování a ověření závěrů *in vitro* testování. Navíc výsledky *in vivo* experimentů mohou poskytovat jinak nedostupný pohled na mechanismus indukce senescence a usnadnit tím identifikaci možných terapeutických cílů. Nejdůležitější je, že *in vivo* modely umožňují provádět experimenty na intaktních organizmech jako na celku, a tím zahrnují působení všech možných faktorů, kterými jednotlivé tkáně a molekulární dráhy působí na sebe navzájem. Obecně lze říci, že uměle působící indukční faktory nebo systémy k vyvolání senescence a/nebo stárnutí v myších modelech jsou dost podobné až identické s těmi používanými u modelů

buněčných. Jelikož myší modely a metody indukce senescence se liší ve vlastnostech i efektu, je potřeba pečlivě zvážit, zda vybraný model vyhovuje plánovaným experimentům a cílům práce.

Jako první zvířecí model senescence zmiňme často používané přirozeně zestárlé myši (většinou ≥ 2 roky staré) [8], ale tento přístup je extrémně časově náročný. Proto byly navrženy a vytvořeny akcelerované myší modely senescence a stárnutí. Tyto modely disponují genetickými vlastnostmi podobnými těm, které můžeme sledovat u lidských progeroidních syndromů jako Hutchinsonův-Gilfordův syndrom (z angl. Hutchinson-Gilford progeria syndrome, HGPS), Wernerův syndrom nebo Trichothiodystrofie [93], čímž zvířata předčasně zestárnou a jejich stav se podobá přirozenému stáří. Takto geneticky modifikovaná zvířata vykazují abnormální expresi genů kódujících komponenty kontrolních bodů buněčného cyklu (Cdkn2a, p53, Bub1b atd.), proteiny účastníci se oprav a údržby DNA (Ercc geny, Polg, Terc atd.), proteiny ovlivňující mechanické vlastnosti jádra buněk (Lmna), enzymy zpracovávající ROS (Sod2) a komponenty signálních drah (Gsk3a) [94]. V případě mnoha takových modelů je možné detekovat senescentní buňky pouze v tzv. konečné (angl. end-point) analýze, ve které jako biologický materiál slouží tkáň utracených zvířat. Metody měření senescentních markerů v tomto případě zahrnují například RT-PCR (z angl. reverse transcription PCR), analýzu proteinů p16 nebo p21 v hluboce zmrazených tkáních, měření aktivity SA- β -gal ve vzorku čerstvé tkáně nebo průkaz p16 pomocí IHC ve fixovaných vzorcích. Také lze použít imunoblotovací metody na sledování dalších markerů jako ATM, ATR, H2AX, p53, již zmíněné p21 a/nebo SASP faktorů. Jako alternativní biologický zdroj informací může sloužit myší krev. Například lze určit míru exprese p16 z lymfocytů v periferní krvi. Modifikace sekrečního profilu senescentních buněk se projevují jako změny SASP faktorů (chemokiny, cytokiny a metaloproteiny z matrix) a je možné je sledovat pomocí metody ELISA, popř. jí podobnými a to z krevní plazmy nebo séra [95]. Dlouhodobého sledování senescentních markerů, jako je p16, u živých zvířat je možné dosáhnout pomocí zobrazovacích metod. Nejznámějším modelem užívaným k těmto účelům je tzv. p16^{LUC} myš. V buňkách těchto myší je artifiálně vložený gen kódující enzym luciferázu pod promotorem p16^{INK4a}. Luciferáza je tedy exprimována po aktivaci promotoru p16 během indukce senescence. Luciferázu je možné detekovat po injekci příslušného substrátu (luciferin) myším, ten je následně zpracován luciferázou, přičemž dochází k vyzáření měřitelné luminiscence. Na rozdíl od jiných metod, u takového modelu se eutanázie zvířat provádí až po detekci cílového senescentního markeru (v tomto případě p16) a tím se i potvrdí navození senescence [96].

Nevýhodou tohoto modelu je především fakt, že p16 nehraje roli výlučně v senescenci, ale také například v tumorigenezi a při hojení ran (Obrázek 11). Luminiscenční signál tudíž může být detekován i v jiných případech a použitá zvířata by neměla mít zranění na kůži, ani procházet ranou či pozdní fází vzniku nádoru [97].



Obrázek 11: Využití detekce luminiscenčního signálu v myším modelu p16^{LUC}. Během přirozeného stárnutí se postupně akumulují senescentní buňky, signál se v průběhu času objevuje rovnoměrně po celém těle. Také je možná detekce vznikajícího tumoru, p16 je exprimována jak v nádorových buňkách, tak buňkách stromatu. V místech kožních lézí lze potenciálně pozorovat pozitivní signál, který odezní s postupným vyhojením rány. Vytvořeno a doplněno podle [97].

Obecně platí, že existuje spojitost mezi zářením a stárnutím. U myší stejně jako u buněčných kultur můžeme pomocí ionizačního záření dosáhnout indukce předčasné senescence. Nejčastěji se zvířatům aplikuje dávka 5 - 10 Gy najednou nebo frakcionovaně, ale vždy záleží na konkrétním myším kmenu; kmeny se mohou odlišovat v citlivosti a odpovědi na určitou

dávku záření. Rovněž záleží na účelu experimentu, ale je možné ozářovat celá zvířata nebo pouze část jejich těla, což je všeobecně mírnější přístup. K ozáření jsou vhodné myši ve věku 2 - 6 měsíců, neozařené myši jsou oproti nim použity jako kontroly. Alternativně je možné použít dvě skupiny různého věku, např. 2 měsíce stará zvířata (skupina mladých) a 2 roky stará zvířata (skupina starých jako kontrola). Nejčastěji odebírané a dále vyšetřované orgány jsou plic, játra, ledviny, ačkoli mozek může někdy být také cenným zdrojem informací. Ke studiu změn genové exprese se využívá izolace nukleových kyselin s následnou PCR analýzou. Pokud chceme sledovat a objasnit změny na proteinové úrovni, můžeme navíc použít WB analýzu nebo IF. V některých případech může pomoci klasický test SA- β -gal aktivity nebo analýza inkorporace BrdU [98–101].

I na našem pracovišti jsme nedávno vyvinuli k získávání myších a lidských chlupových a/nebo vlasových folikulárních buněk pro účely genotypizace, kvantitativní PCR a kvantitativní IF. Folikulární buňky byly odebrány jednoduše a neinvazivně a dále použity pro rutinní genotypizaci zvířat a sledování buněčné senescence v přirozeném i experimentálně (radiací) indukovaném modelu stárnutí [102] (viz Příloha 2).

Další způsoby indukce senescence *in vivo* nejsou zdaleka tak běžné. Oxidativní stres bývá používán jen zřídka, s výjimkou modelu s D-galaktózou. D-galaktóza může v myším modelu sloužit jako uměle vytvořený induktor senescence. Zvýšená D-galaktóza vyvolává produkci ROS a zároveň snižuje kapacitu antioxidantních enzymů. Toto postihuje zejména mozek, což vede ke ztrátě paměti, poruchám učení, kognitivním dysfunkcím, akumulaci senescentních buněk v mozkové tkáni, zkrácení délky života a celkové slabosti, což dohromady připomíná fenotypové projevy stárnutí [103–105]. Kromě použití vysoké dávky D-galaktózy k indukci akcelerovaného modelu stárnutí a/nebo modelu akutního stárnutí bylo poměrně nedávno prokázáno, že zvýšená akumulace konečných produktů pokročilé glykace a ROS může vyvolat stárnutí v mnoha tkáních i buňkách, například v erytrocytech [106]. Obvykle se pro tyto účely používají myši staré 2 - 3 měsíce, denně jim je podávána D-galaktóza v dávkovém rozmezí 100 - 500 mg/kg/den a to subkutánně po dobu 7 - 12 týdnů. Tento zvířecí model se nejčastěji užívá k funkčnímu testování paměti, která je ovlivněna akumulací senescentních buněk, a také ke sledování případné eliminace senescentních buněk pomocí senolytik [107–110]. Důležité je, že tento model byl také validován *in vitro* [111], kde byly detekovány relevantní biomarkery senescence jako p16, p21, p53 a/nebo SA- β -gal [112].

Řízená aktivace onkogenu jako induktoru senescence u zvířat s sebou nese několik problémů; vždy záleží na konkrétním nastavení a podmínkách, ale obecně platí, že mutace aktivující Ras

mohou vést jak k proliferaci buněk, tak k navození senescence. Právě toto bylo demonstrováno ve studii využívající transgenní myši s inducibilním Ras genem (indukce doxycyklinem). Výsledky této práce poukazují na silnou závislost výsledného stavu buňky na úrovni aktivace onkogenu Ras; zatímco nízká úroveň aktivace podpořila proliferaci, vysoká úroveň aktivace spustila senescenci. Ras může tedy sloužit k umělému vyvolání senescence *in vivo*, ale jeho aktivaci je nutné velmi citlivě optimalizovat [113]. Kromě modelu vázaného na podání doxycyklinu v transgenním modelu, je možné využít Ras gen pro výzkum rakoviny plic, kde je onkogen aktivován intranazální aplikací virových částic [114].

Zhruba před 10 lety byly do klinické praxe pro léčbu solidních tumorů zavedeny inhibitory CDK4/6 (abemaciclib, palbociclib, ribociclib), které vyvolávají zástavu buněčného cyklu v G1 fázi [115–118]. Jejich účinek na buňky ovšem závisí na různých faktorech, ale obecně lze říci, že indukují quiescenci nebo senescenci. Quiescentní buňky si zachovávají schopnost vymanit se ze zástavy buněčného cyklu, zatímco senescentní buňky vykazují vysoce stabilní nebo trvalý fenotyp. Schopnost indukovat quiescenci nebo senescenci těmito inhibitory byla prokázána již v mnoha studiích *in vitro* i *in vivo* [119–128]. Obecně známý a používaný protokol na indukci senescence pomocí inhibitorů CDK4/6 zahrnuje podávání těchto látek myším ve věku 14 týdnů. Abemaciclib se podává intraperitoneálně [129], palbociclib [119] nebo ribociclib orální gaváží [130]. Ačkoli tyto buněčné i zvířecí modely naznačují specifickou roli senescence jak v účinnosti, tak v toxicitě inhibitorů CDK4/6, jejich význam v klinických podmínkách je ještě nutné objasnit.

1.5 Senolytické a senotoxické látky v terapii předčasného stárnutí

Stárnutí je velmi úzce spjato se (1) zvýšeným rizikem mnoha chronických onemocnění (selhání srdce, infarkt myokardu, demence, mrtvice, mnoho typů nádorových onemocnění, metabolické dysfunkce, plicní onemocnění, poruchy kostí a slepota), (2) geriatrickými syndromy (všeobecná křehkost, sarkopénie, časté pády, inkontinence a kognitivní poruchy), (3) celkovým zhoršením fyzické kondice (vedoucí k dlouhé rekonvalescenci po zranění a zvýšený výskyt infekcí v těle) a samozřejmě (4) úmrtím [131]. Protože proces stárnutí velmi intenzivně přispívá k projevu mnoha patologií [132], máme velký zájem na oddálení nebo alespoň zmírnění jeho projevů. Tento fakt vedl v posledních deseti letech ke vzniku nové vědecké disciplíny nazývané senoterapie, která se zaměřuje na studium buněčného stárnutí, prodloužení života a také kvalitu života během stárnutí [133]. Hlavním cílem senoterapie je prodloužení lidského života a obnovení (omlazení) funkce některých tkání. K tomuto účelu slouží senolytické

látky/senolytika, která dokážou selektivně eliminovat senescentní buňky z buněčných kultur, tkání a dokonce z celého organismu [134]. V současné době se senoterapie zabývá především (1) hledáním nových potenciálních senolytik, (2) stanovením účinnosti, selektivity, vedlejších účinků a dalších vlastností senolytických látek *in vitro*, *in vivo* a nověji i u lidí, (3) navrhováním účinných strategií doručení senolytik na místo určení, (4) optimalizací dávkování a schématy podávání léků a (5) identifikací optimálních markerů senescence zejména kvůli monitorování terapeutické účinnosti. Zájem odborníků o tuto oblast rychle roste, jelikož se objevilo pár potenciálních klinických aplikací a mnoho začínajících biotechnologických společností investovalo a stále investuje své zdroje, čas a peníze právě do výzkumu senolytických látek [135]. Toto odvětví se extrémně rychle rozvíjí a každý den jsou reportována nová zjištění, takže se objevila i nová terminologie - glosář užívaných pojmů souvisejících se senescencí a stárnutím je uveden v Tabulce 2.

Tabulka 2: Základní slovník nových pojmů spojených se senescencí a senoterapií.

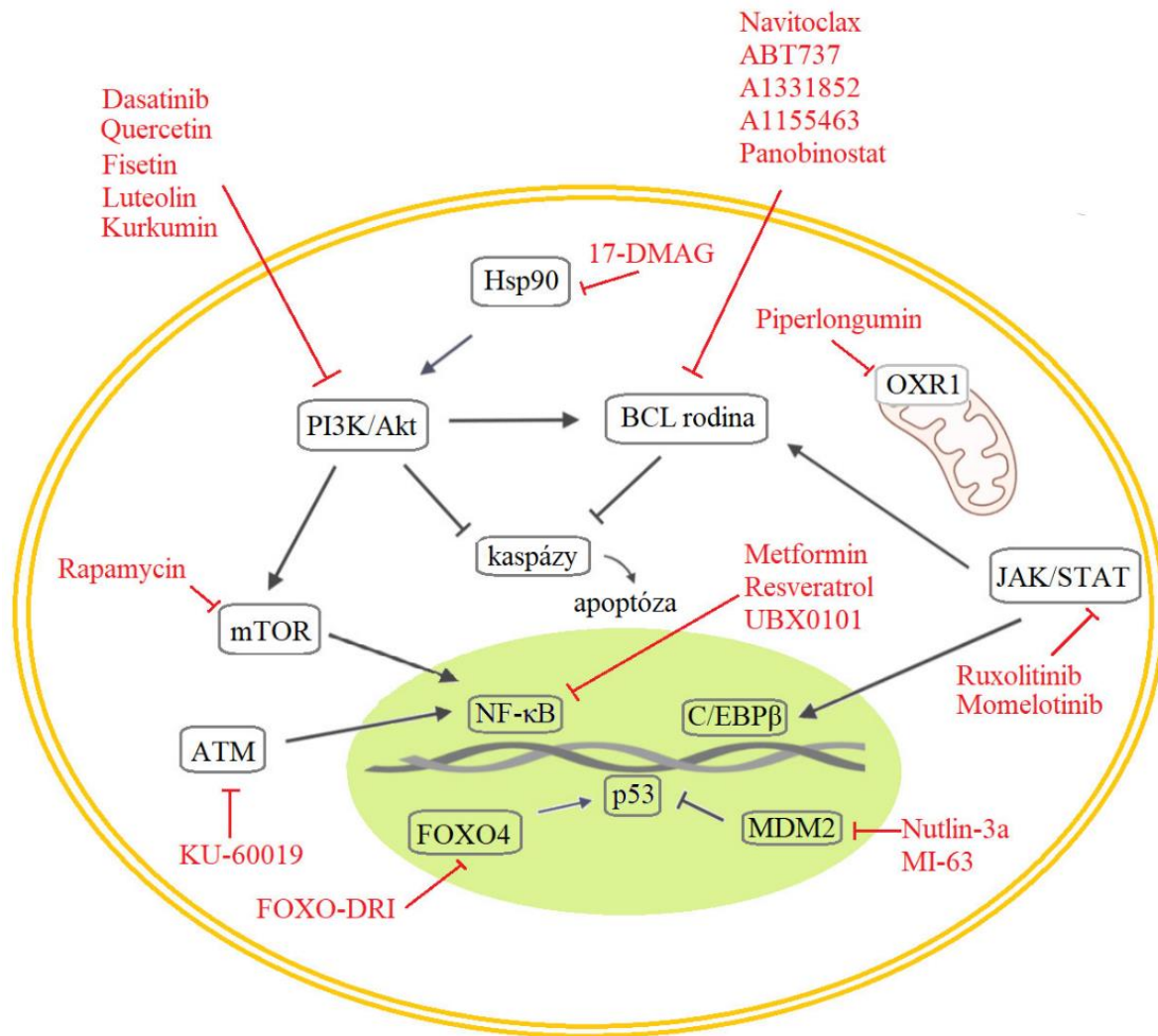
pojem	popis
senescence	Biologické stárnutí. Proces akumulace senescentních buněk (SB), které nefungují, ale jsou metabolicky aktivní a zůstávají ve tkáních. SB jsou úzce spojeny s poruchami souvisejícími s věkem.
senoterapie / senolýza	Odstranění senescentních buněk.
senolytická látka / senolytikum	Látky specificky indukující smrt SB.
senoblokátory	Látky ovlivňující epigenetické regulátory k reaktivaci programů regenerace a omlazení.
senomorfika	Látky potlačující projevy senescence včetně SASP.
senostatika	Látky narušující vstup buněk do senescence.
senomodulátory	Látky zneškodňující SB potlačením jejich aberantního SASP.
senosupresiva	Látky zpomalující rychlost akumulace SB.

1.5.1 Senolytické a/nebo senotoxické malé molekuly

Pokud se zamyslíme nad výzkumem senolytických látek, může nás napadnout hned několik hlavních terapeutických přístupů a možných cílů. První přístup logicky zahrnuje cílení senescentních buněk jako takových, přesněji jejich typickou vlastnost - rezistenci k apoptóze [136] nebo další dráhy zapojené do senescence. Velké úsilí ovšem bylo vynaloženo i na studium a cílení SASP, který je klíčovým znakem senescentních buněk a je regulován nezávisle na zástavě buněčného cyklu [137]. Kromě toho lze přimět imunitní systém, aby se zaměřil na senescentní buňky [138]; a také je možné zvrátit ireverzibilní osud senescentních buněk [139].

Až donedávna byla zástava buněčného cyklu senescentních buněk považována za nevratný děj, ale nové studie prokázaly, že senescentní buňky mohou znovu spustit buněčný cyklus, a to například u nádorových buněk [140] nebo mohou být přeprogramovány na pluripotentní kmenové buňky [141]. Jak bylo již uvedeno výše, buňky reagují také na aktivaci onkogenu, a to navozením buněčné senescence, která ale nemusí být vždy trvalá. Buňky mohou po určité době strávené v senescenci znovu nastartovat buněčný cyklus, a to zejména pokud získají epigenetické změny, které vedou k derepresi exprese anti-senescentních genů, například hTERT [142]. Senescentní stav navozený v nádorových buňkách je také jednou z jejich strategií, jak se vyhnout cytotoxickým účinkům protinádorové terapie, což nádorovým buňkám umožňuje přežití v dormanci. Bohužel, tato strategie může vyústit v nahromadění zásoby nádorových buněk pro budoucí recidivu onemocnění [143]. S ohledem na možnou protinádorovou terapii založenou právě na senescenci, můžeme zmínit klíčové signální molekuly senescentních buněk p16, p21 a p53, které také fungují jako regulátory kmenovosti, jelikož zisk kmenovosti v případě nádorových buněk může ovlivnit agresivitu nádorů, a tím i klinický výsledek. Ukázalo se, že kmenovost spojená se stárnutím je vlastně škodlivou vlastností, která napomáhá buňkám vymanit se ze zástavy buněčného cyklu a způsobit tak recidivu nádoru [140,144]. Proto potenciální použití senolytických látek v budoucnosti zahrnuje i protinádorovou terapii [145,146]. Nejdůležitější doposud známé cíle senolytik jsou schematicky znázorněny na Obrázku 12. V níže uvedených podkapitolách jsou podrobně popsány skupiny známých senolyticky působících látek. Pro lepší přehlednost a orientaci jsou tyto látky nejprve shrnuty v Tabulce 3.

Jedna z hlavních charakteristik senescentních buněk je aktivace anti-apoptických drah, které mimo jiné zahrnují i Bcl-2 proteinovou rodinu, p53 a PI3K/Akt osu. A právě kvůli zapojení těchto proteinů do procesu inhibice apoptózy senescentních buněk jsou cílem některých aktuálních senolytik.



Obrázek 12: Molekulární cíle senolytických látek (upraveno z Přílohy 1).

Tabulka 3: Základní přehled senolytických látek.

cílová skupina	senolytická látka	konkrétní cíl senolytické látky	poznámka
antiapoptická dráha	navitoclax	BCL-2, Bcl-XL, a Bcl-W	ABT263
	ABT-737	BCL-2, Bcl-XL, a Bcl-W	paralog a prekurzor ABT263
	A1331852	Bcl-XL	2. generace inhibitorů BCL-2 rodiny
	A1155463	Bcl-XL	2. generace inhibitorů BCL-2 rodiny
	piperlongumin	apoptóza	alkaloid, přírodní produkt ze stromů rodu <i>Piper</i>
	geldanamycin	?	analog piperlonguminu
	tanespimycin	?	analog piperlonguminu
	alvespimycin	?	analog piperlonguminu
	panobinostat	Bcl-XL	zvýšení aktivity kaspázy 3/7
PI3K a jiné kinázy	dasatinib	dráha PI3K/Akt	malá molekula inhibující různé tyrosinkinázy
	quercetin	dráha PI3K/Akt a mTOR	flavonoid
	fisetin	PI3K/Akt	přírodní flavonoid
	luteolin	PI3K/Akt	flavon
	kurkumin	PI3K/Akt	flavon
dráhy p53 a p16, DDR	FOXO4-DRI	interakce FOXO4 a p53	zvýšení mitochondriální aktivity
	17-DMAG	HSP90/Akt	supresor SASP
	KU-60019	ATM	inhibitor NF-κB
regulace NF-κB nebo C/EBPβ	rapamycin	mTORC1 komplex	inhibitor Mdm2 nové generace
	nutlin-3a	Mdm2	stabilizace p53 a redukce SASP
	MI-63	Mdm2	stabilizace p53 a redukce SASP
	UBX0101	Mdm2	odvozen od nutlinu
	metformin	SASP	inhibice NF-κB
	resveratrol	SASP	inhibice NF-κB
	ruxolitinib	JAK	INCB18424, represe C/EBPβ
	momelotinib	JAK	CYT387, represe C/EBPβ
další	MCOPPB	NOP	anxiolytický opioid

1.5.1.1 Cílení anti-apoptických drah

Inhibicí proteinů z Bcl-2 rodiny lze v senescentních buňkách nastartovat apoptózu. Navitoclax (ABT263) a jeho paralog ABT-737 patří do první generace senolytických látek, které inhibují Bcl-2, Bcl-XL a Bcl-W, a tím indukují apoptózu v různých typech buněk [6,147,148]. U obou látek byl potvrzen senolytický efekt *in vivo*, a to na myším modelu senescence po indukci subletální dávkou radiace a/nebo na modelu přirozeného stárnutí [6,149]. Navitoclax navíc suprimuje uvolňování SASP faktorů do okolí senescentních buněk u přirozeně zestárlých zvířat [149]. Velkou nevýhodou u těchto dvou látek ovšem zůstává jejich toxický efekt na neutrofilů a krevních destiček, což velmi omezuje jejich potenciál pro klinický vývoj [150]. Tento problém podnítil vývoj druhé generace inhibitorů Bcl-2 rodiny, mezi něž patří např. A1331852 a A1155463. Tyto sloučeniny mají schopnost spustit apoptickou dráhu v některých typech lidských buněk [151]. Dalším významným cílem senolytik je BH4 doména, která je funkční

složkou všech proteinových členů anti-apoptické rodiny [152]. Tato doména je jedním z užitečných výchozích bodů pro identifikaci a vývoj nových potenciálních senolytických činidel. Právě na tuto doménu cílí nedávno objevený alkaloid piperlongumin (PL) [153] a jeho analogy geldanamycin, tanespimycin a alvespimycin [154]. PL je přírodní látka izolovaná ze stromů rodu *Piper* a preferenčně dokáže odstranit senescentní buňky, a to na modelech senescence vyvolané aktivací onkogenu, radiací nebo replikačním stresem. Senolytický účinek PL byl nejprve připisován schopnosti spustit apoptózu [155], ale nové výsledky označují jako cílovou molekulu piperlonguminu protein OXR1 (z angl. oxidation resistance 1). OXR1 vykazuje zvýšenou expresi v některých lidských senescentních buňkách a reguluje produkci mnoha antioxidantních enzymů. PL se přímo váže na OXR1 a tím přivodí jeho degradaci [156]. Posledním zajímavým anti-apoptickým senolytikem je panobinostat, který suprimuje expresi Bcl-XL proteinů v chemoterapii indukovaných senescentních buňkách [157].

1.5.1.2 Inhibice PI3K a dalších kináz

První generace senolytik také zahrnuje některé dobře známé látky, jako jsou například malé molekuly dasatinib (D) a flavonoid quercetin (Q), které cílí různé tyrozinkinázy a také PI3K. Dasatinib byl původně užíván pacienty pro svůj protinádorový účinek, ale ukázalo se, že především v lidských senescentních progenitorech adipocytů má senolytický efekt. Quercetin je přírodní látka, jejíž senolytický účinek byl mimo jiné prokázán na endoteliálních buňkách pupečnickové žíly. Senolytický efekt po aplikaci látek D a Q individuálně i v kombinaci byl potvrzen jak *in vitro*, tak *in vivo* [158]. Fisetin - další člen této skupiny látek - je přirozeně se vyskytující flavon, který inhibuje PI3K/Akt dráhu a má mnohem silnější senolytický efekt *in vitro* než Q, a navíc vykazuje nižší toxicitu a mnohem vyšší schopnost selektivní inhibice Bcl-XL než navitoclax. Nakonec ještě zmiňme flavony luteolin a kurkumin, které fungovaly dobře především v kombinaci s fisetinem [151,159]. Avšak kombinace D+Q dosáhla všeobecně neefektivnějších výsledků, a to ve všech směrech.

1.5.1.3 Cílení na osu p53/p16 a DDR dráhu

Jak již bylo zmíněno v předchozích kapitolách, dráha p53 hraje klíčovou roli v regulaci apoptózy a senescence, tím pádem se stává velmi atraktivním cílem senoterapie. Transkripční faktory FOXO (z angl. Fork head box O) se podílejí na řízení mnoha buněčných funkcí včetně zástavy buněčného cyklu a indukce senescence skrze interakci s p53 [160]. Nedávno publikovaná data ukázala, že (DRI)-izoforma faktoru FOXO (z angl. D-retro inverso isoform)

dokáže narušit interakci mezi FOXO a p53, tím způsobit vyloučení p53 z jádra buněk a následně i indukci apoptózy. Tento účinek byl pozorován jak v senescentních buňkách *in vitro*, tak u starých myši [153,161]. Jako potenciálně velmi efektivní senolytika byly nejprve *in vitro* identifikovány inhibitory HSP90. Takováto informace vzešla z výsledků vysokokapacitního skríningu menší knihovny látek na myších embryonálních fibroblastech (MEF), které byly pro tento účel uměle upraveny (*Ercc1*^{-/-}, deficit reparační mezireťezcových cross-linků DNA) a sloužily tak jako buněčný model vykazující sníženou schopnost oprav DNA. Zmíňme inhibitor HSP90 17-DMAG, který dokáže redukovat expresi p16 jak v MEF buňkách, tak v *Ercc1*^{-Δ} (redukována exprese DNA reparační endonukleázy) myším modelem lidského progeroidního syndromu [162]. Dále byl identifikován nový inhibitor ATM kinázy KU-60019, a to jako látka zmírňující projevy senescence. ATM reguluje acidifikaci lysosomů a ošetření buněk KU-60019 snižuje aktivitu SA-β-gal, eliminuje nefungující mitochondrie a v lidských fibroblastech vede k metabolickému reprogramování. Navíc léčba touto sloučeninou zjevně usnadňuje hojení ran u starších myši [163].

1.5.1.4 Inhibice NF-κB a C/EBPβ

Dalším možným přístupem objevování nových senolytik zahrnuje zacílení na jinou specifickou vlastnost senescentních buněk, a to konkrétně na SASP, tzn. na sekreci růstových faktorů, chemokinů a cytokinů. Za určitých podmínek může být potlačení škodlivého parakrinního a autokrinního efektu SASP prospěšnější a účinnější než snaha o ovlivnění zástavy buněčného cyklu [137]. Mnoho známých signálních drah je zapojeno do regulace SASP (mTOR, MAPK, PI3K a GATA4/p62) a prolínají se v místě transkripčního faktoru NF-κB (z angl. nuclear factor-kappa B) a na dráze C/EBPβ (z angl. CCAAT/enhancer binding protein beta); NF-κB a C/EBPβ spolupracují a tím aktivují SASP geny. Již před lety byla prokázána spojitost mezi aktivací dráhy NF-κB a progresí senescence. Takže přímým narušením této dráhy lze dosáhnout zvrácení procesu zástavy buněčného cyklu. Například v OIS modelech dochází k zástavě senescence při vypnutí C/EBPβ. Všechna tato zjištění nabízí širokou škálu senoterapeutických cílů [69]. NF-κB je hlavní signální dráhou regulující SASP aktivaci [164]. Senolytické látky tedy mohou být zacíleny také na NF-κB, C/EBPβ nebo regulátory NF-κB. Například serin/threonin kináza mTOR ovlivňuje expresi IL-1α a aktivuje NF-κB skrze interakci s dráhou MAPK. V souladu s tímto bylo nedávno zjištěno, že mTOR inhibitor rapamycin částečně suprimuje nebo degraduje komponenty SASP [165,166]. Pro svůj možný senolytický efekt byly otestovány i MAPK inhibitory (převážně inhibitory p38MAPK), ale alespoň nějaký senolytický efekt byl pozorován pouze v některých typech buněk [166,167].

Aktivita NF- κ B však může být potlačena nutlinem-3a, a to v závislosti na p53. Nutlin-3a totiž inhibuje Mdm2 protein, který je přímým regulátorem koncentrace p53 v buňce, ubiquitinyluje molekulu p53 a tím ji předurčuje k degradaci v proteozomu. Kromě nutlinu-3a byl podobný efekt pozorován u dalších dvou inhibitorů Mdm2 - UBX0101 a MI-63 [127,168,169]. Dále například metformin a resveratrol snižují translokaci NF- κ B do jádra, což vede k inhibici některých komponent SASP, proto byly i tyto látky testovány pro jejich možný senolytický efekt [170,171]. Dalším již zmíněným transkripčním faktorem ovlivňujícím expresi SASP je C/EBP β , který je regulovaný aktivací dráhy JAK/STAT [172]. JAK/STAT dráhu ovlivňují látky jako ruxolitinib (INCB18424) a momelotinib (CYT387), čímž značně redukuje sekreci SASP. Vliv obou látek byl pozorován v buněčném modelu lidských preadipocytů po indukci senescence radiací, navíc ruxolitinib se stejným způsobem projevil i na přirozeně zestárlých dvouletých myších [173]. Ještě existuje možnost orientovat se na specifickou složku SASP (př. určitý interleukin nebo jeho receptor) pomocí cíleně zaměřené monoklonální protilátky. Takovýto typ protilátek s tímto záměrem již byl vyvinut [174].

1.5.2 Další přístupy eliminace stárnoucích buněk

Další nové potenciální senolytikum bylo identifikováno v nedávno provedeném vysokokapacitním skríningu komerční knihovny LOPAC®Pfizer na lidských senescentních fibroblastech indukovaných afdikolinem. Selektivní ligand opioidního receptoru (z angl. Nociceptin/orphanin FQ opioid receptor, NOP) - MCOPPB (1-[1-(1-methylcykloocthyl)-4-piperidiny]-2-[(3R)-3-piperidiny]-1H-benzimidazol), dříve studovaný jako potenciální anxiolytikum, dosáhl nejlepšího výsledku. *In vitro* schopnost MCOPPB selektivně eliminovat senescentní buňky byla dále testována na myším modelu i na *Caenorhabditis elegans*. Ukázalo se, že MCOPPB dokáže snížit počet senescentních buněk v periferních tkáních, což se ale neprokázalo v centrálním nervovém systému. Léčba MCOPPB v buňkách mechanicky aktivuje transkripční síť zapojenou do imunitní odpovědi na vnější stresové podněty, což zahrnuje Toll-like receptory [175].

Jelikož oxidativní stres je spojován s mnoha patologiemi souvisejícími se zvyšujícím se věkem a se senescencí samotnou, některé experimenty se věnovaly studiu možného terapeutického účinku antioxidantů. Příkladem mohou být vitamíny A, C a E [176,177], které byly intenzivně zkoumány kvůli potenciálnímu účinku proti stárnutí. Tyto studie ale neprokázaly žádné stabilní a přesvědčivé výsledky, které by potvrdily pozitivní účinek preventivního užívání vitamínů na snížení mortality [178]. Problém může být v cílení antioxidantů na konkrétní tkáň a také

ve výběru vhodného antioxidantu proti konkrétním škodlivým částicím. Další antioxidační sloučenina, koenzym Q10, hraje významnou roli v mitochondriálním dýchacím řetězci [179] a jeho deficit byl již dříve spojován s mnoha patologickými procesy. Koenzym Q10 je bezpečná, dobře vstřebatelná i distribuovatelná látka. Proto se často používá v terapii jako antioxidant s určitými symptomatickými benefity [180]. I selenoproteiny jsou řazeny mezi antioxidační enzymy, které je možné přijímat s ostatními nutrienty v potravě [181]. Navíc několik klinických studií ukázalo, že suplementace selenem může předcházet progresi mnoha onemocnění. Nicméně existují i důkazy o neurotoxicitě selenu [182]. Proto je nezbytné optimalizovat podávanou dávku selenu, aby se maximalizoval zdravotní přínos a zároveň minimalizovaly možné toxické účinky [183]. Mezi senolytika s antioxidačními vlastnostmi patří také polyfenoly rostlinného původu (řadí se sem již zmíněný quercetin a resveratrol) [184]. Kromě antioxidačních látek i fyzická aktivita nebo trénink balancuje oxidativní stres a mobilizuje antioxidační enzymy. Pravidelné cvičení střední intenzity je jedním z hlavních předpokladů udržování pevného zdraví, snižování oxidativního stresu a zamezení progresu chronických onemocnění [185,186].

Také imunitní systém hraje velmi významnou roli při eliminaci senescentních buněk. Stárnutí ale zhoršuje funkčnost imunitního systému, čímž se proces odstraňování senescentních buněk z organismu stává nepřesným. Senescentní buňky a/nebo buňky imunitního systému uvolňující SASP faktory s dopadem na progresi rakoviny jsou CD4+ T-lymfocyty, CD8+ T-lymfocyty, B-lymfocyty, NK buňky (z angl. natural killer) a makrofágy [187]. Eliminace senescentních buněk je zprostředkována CD4+ lymfocyty a NK buňkami jako součást kontroly buněk během stárnutí [138,188]. V průběhu tohoto procesu se na receptor NK buněk (NKG2D) vážou ligandy nacházející se na povrchu senescentních, poškozených a stresovaných buněk [189]. Proto se NKG2D a další součásti imunitního systému staly důležitým a zajímavým cílem pro senoterapeutické strategie. Obecně řečeno, senescentní buňky přitahují složky vrozeného imunitního systému sekrecí zánětlivých faktorů (součást SASP), což vede k aktivaci nebo naopak potlačení aktivity určitého typu makrofágů. Signalizace pomocí těchto zánětlivých faktorů dále rekrutuje NK buňky, které nesou receptory na vazbu ligandů senescentních buněk a celý proces je zakončen smrtí senescentní buňky [190]. Interakce mezi senescentními buňkami a makrofágy byly v posledních několika letech sice pozorovány, avšak s různými výsledky a vysvětlením. Jejich přesná interakce závisí na konkrétní exkreci SASP, ligandech prezentovaných na senescentních buňkách, buněčném typu a faktoru, který senescenci indukoval [70]. Eliminace senescentních buněk vylučujících SASP pomocí NK buněk byla

prokázána i v myším modelu [191]. Současná potenciální terapie na odstranění senescentních buněk imunitním systémem vychází především z několika málo buněčných terapií nádorových onemocnění, které lze zvážit jako terapii senolytickou [192]. Pokud jde o senescentní nádorové buňky, *in vivo* experimenty prokázaly indukci senescence v nádorových buňkách. Akumulace senescentních buněk zbrzdila růst nádoru a také aktivovala imunitní systém exkrecí SASP, což může vést jak k odstranění senescentních nádorových buněk, tak přilehlých neoplastických buněk s velmi příznivým vlivem na regresi nádoru [193–195]. Avšak je velmi důležité zdůraznit dvojí funkci imunitního systému v případě rakoviny. Některé chemokiny totiž mohou atrahovat zánětlivé buňky, které podporují proliferaci nádoru, angiogenezi a invazivitu. Tudíž se názory na roli senescence u nádorových buněk liší a závisí na kontextu a okolních podmínkách [196].

Jak už předchozí text naznačuje, doposud byla identifikována celá řada slibných senolytických sloučenin. Otázkou ale stále zůstává, zda je rozumné a žádoucí snažit se obcházet nebo dokonce zvrátit buněčnou senescenci. Dnes už víme, že to možné je; proliferace senescentních buněk může být reaktivována vynucenou telomerázovou aktivitou [139]. Navíc např. OIS lze obejít vyčerpáním specifických interleukinů nebo inhibicí určitých chemokinových receptorů [197,198]. Avšak je nutné podotknout, že zvrácení senescence může být velmi nebezpečné pro celý organismus; nedávná studie dokazuje, že senescentní buňky, které znovu vstoupí do proliferační fáze, se často vyvinou v lymfom nebo leukemické buňky se zvýšenou kmenovostí, což může potenciálně vést ke vzniku vysoce agresivních nádorů [144].

Vzhledem k tomu, že senoterapie je poměrně novým terapeutickým oborem, budou zapotřebí nové strategie k převedení výsledků vyplývajících z laboratorních experimentů na lékové kandidáty, a to ještě před začátkem klinických studií. Nicméně identifikace nových senolytik *in vitro* nebo *in vivo* je důležitý, leč náročný a složitý proces.

1.5.3 Senolytika v protinádorové terapii

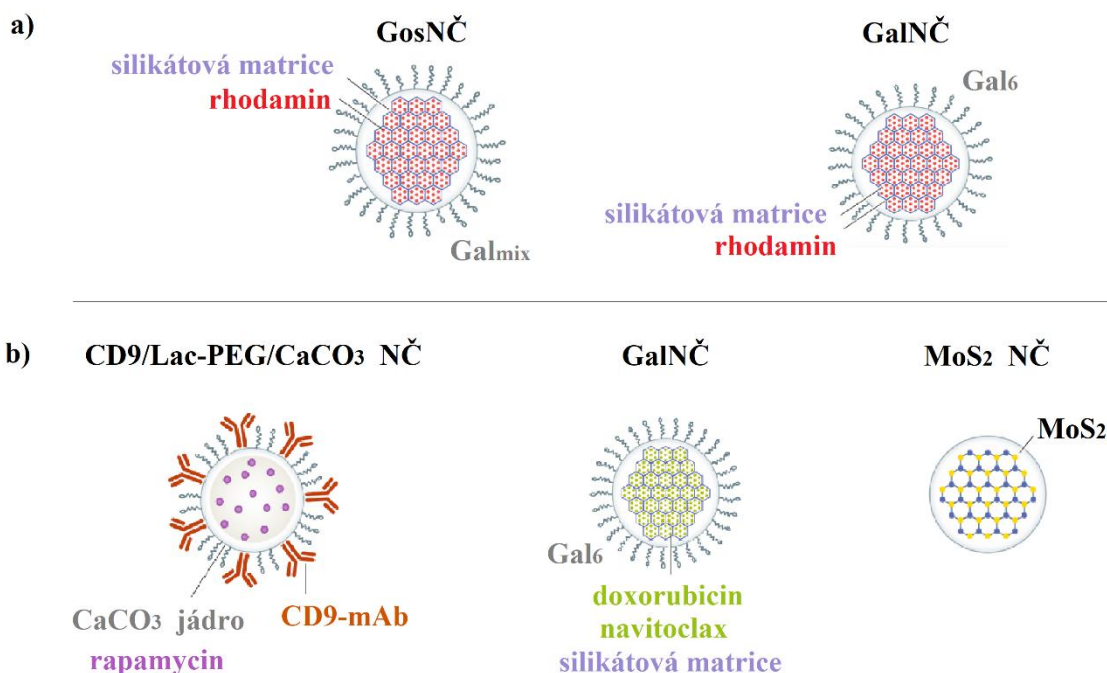
Možnost použití senolyticky působících látek v komplexní protinádorové terapii je v poslední době velkou výzvou. Zvláště zajímavá by byla kombinovaná léčba indukované senescence s následnou eliminací zbývajících na terapii rezistentních senescentních buněk pomocí senolytických látek [145,199,200]. Jednoduše řečeno, v této strategii je potřeba optimalizovat a provést 2 kroky: (1) indukci senescence v nádorových buňkách a následně (2) použít příslušné senolytikum na jejich eliminaci. Tento princip byl již demonstrován například u ABT263 (navitoclax), kterým byly ošetřeny chemoterapií indukované senescentní buňky [201]. ABT263 byl úspěšně otestován *in vitro* i ve zvířecích modelech indukovaných etoposidem

nebo doxorubicinem [158,201–203] a také v buněčných modelech rakoviny prsu a plic po indukci radiací [203]. Aplikace ABT263 ve zvířecím modelu prokazatelně vede ke snížení vývoje metastáz a recidivy [204]. Strukturně podobná látka ABT-737 také dokáže eliminovat senescentní nádorové buňky v radiací indukovaných modelech buněčných linií i xenotransplantátech [205], dále byla prokázána jeho účinnost v buněčných liniích rakoviny prsu po indukci chemoterapií, konkrétně etoposidem [206]. Další inhibitor BCL rodiny, Nav-Gal (z angl. galacto-conjugated navitoclax) byl velmi efektivní v modelech senescence indukovaných několika různými protinádorovými látkami (palbociclib, doxorubicin, cisplatina) a/nebo radiací [207]. Také digoxin a ouabain (inhibitory Na^+/K^+ pumpy) ovlivnily několik různých nádorových linií a xenotransplantátů právě po indukci senescence [208,209]. Do následující třídy protinádorových a senolytických látek používaných klinicky patří inhibitory mTOR dráhy, které prokazují svou účinnost v buněčných i myších nádorových modelech po indukci senescence určitou látkou [210,211]. V neposlední řadě zmiňme pokusy o zapojení imunologických strategií, jako například použití blokovacích protilátek nebo CAR T buněk (z angl. Chimeric Antigen Receptor T cells) k cílení senescence v nádorových buňkách a zvířecích modelech [120,212–215]. Stručně řečeno, výše zmíněné práce naznačují, že dvoustupňový přístup pro-senescentní protinádorové terapie, která pokračuje léčbou senolytiky, je proveditelná a možná strategie při léčbě lidských nádorových onemocnění [201]. K implementaci do běžné praxe však potřebujeme mnohem více údajů z klinických studií.

1.5.4 Nanočástice dopravující aktivní látky do senescentních buněk

Používání nanočástic (NČ) nabízí nové možnosti a otevírá otázku inovativního způsobu detekce a cílení senescentních buněk. NČ patří k moderní strategii, jak doručovat žádaný náklad/látku do senescentních buněk *in vitro* a *in vivo* s velkým diagnostickým a terapeutickým potenciálem. NČ slouží k zapouzdření malých molekul, jako jsou v tomto případě senolytické látky, a navíc jsou NČ obaleny molekulami usnadňujícími jejich prostup do specifických tkání nebo cílových buněk určitého typu. V dnešní době jsou dostupné některé velmi efektivní technologie založené právě na schopnosti nanočástic zabalit a transportovat náklad do cílového místa. Avšak v *in vivo* prostředí mohou nastat komplikace, a to hlavně kvůli neznámým a nečekaným interakcím NČ, jejich distribuci, možným vedlejším účinkům a také způsobu, jakým opustí organismus. Tyto molekulární nástroje tedy zůstávají velkou výzvou ke zdokonalení, aby mohly být bezpečně užity v praxi.

První strategie cílení senescentních buněk pomocí NČ byla založena na 100nm sférických nosičích, které obsahovaly rhodamin na křemičité matrici MCM-41, navíc byly obaleny galakto-oligosacharidy (Gos) o různých délkách. Buňky přijímají NČ endocytózou a následně je uvolňují exocytózou. Základem pro cílení senescentních buněk je preferenční fúzí GosNČ s lysozomálními váčky v senescentních buňkách. Obal nanočástic byl postupně upravován a inovován, konkrétně výměnou původních různě dlouhých Gos za homogenní hexamery galakto-oligosacharidů (Gal). Takto upravené NČ byly validovány na modelech senescence indukované poškozením a chemoterapeutiky [216,217]. Senolytická aktivita byla také prokázána u použití CaCO_3 nanočástic nesoucích rapamycin. Tyto NČ byly pokryty konjugátem laktózy a polyethylenglykolu (PEG) společně s monoklonální protilátkou mířenou proti CD9 (CD9 je receptor silně exprimovaný v senescentních buňkách), což výrazně zlepšilo přesnost cílení na senescentní buňky [218]. Jako poslední příklad uveďme model senescence, která byla indukována působením H_2O_2 . V tomto případě byly použity nanočástice ze sulfidu molybdeničitého (MoS_2 NČ), jež ovlivnily a utlumily funkci lysozomů a mitochondrií senescentních buněk [219]. Příklady popsaných NČ jsou ilustrovány na Obrázku 13.



Obrázek 13: Nové diagnostické a terapeutické přístupy cílení senescentních buněk - nanočástice. A) diagnostické nanočástice nesoucí fluorescenční částice (např. rhodamin). B) terapeutické nanočástice nesoucí léčivo/senolytikum (např. doxorubicin, navitoclax, rapamycin). NČ jsou používány pro různé klinické účely. Většina NČ používaných ke studiu senescence je pokryta nebo konjugována se sloučeninami odvozenými od galaktózy, nebo byly navrženy tak, aby se vázaly na specifický receptor. Obrázek adaptován z [220].

1.6 Klinické testy

Na základě slibných preklinických výsledků v myších modelech bylo několik látek vykazujících potenciální senolytický účinek (identifikovaných ze skupiny 46 sloučenin) zařazeno do klinických studií na lidech pro léčbu patologických stavů souvisejících se zvyšujícím se věkem. Není žádným překvapením, že sloučeniny s nejlepšími výsledky a největším potenciálem jsou přírodní látky a/nebo již dříve schválené a pro jiný účel užívané léky. Významně aktivní a/nebo velmi intenzivně testované látky z této skupiny jsou dasatinib a quercetin (samostatně nebo v kombinaci) společně s metforminem, fisetinem a UBX0101. Časné preklinické studie využívající modely stárnutí a nemocí poskytly velmi slibné výsledky [221,222].

D+Q spouští apoptózu v senescentních buňkách. Čtyři roky po identifikaci jejich senolytické aktivity bylo zjištěno, že aplikace kombinace obou látek snižuje celkový počet senescentních

buněk i v lidském těle, a to v rámci první fáze klinického hodnocení u pacientů trpících diabetickou nefropatií [223]. Tato studie byla první recenzovanou prací, která prokázala účinnost senolytika na lidských pacientech. Tomuto testování předcházela pouze pilotní studie na 14 pacientech s idiopatickou plicní fibrózou, ve které se senolytická léčba teprve zaváděla a byla hodnocena z hlediska proveditelnosti [224]. V budoucích klinických studiích zbývá určit, zda snížení zátěže senescentních buněk v lidském těle povede k pozitivním lékařským výsledkům u diabetických pacientů a/nebo dalších pacientů trpících s věkem souvisejícími nemocemi. Ve stejném roce byla publikována studie testující metformin (MILES), která hodnotila potenciál oddálit projevy onemocnění souvisejících s věkem [225], např. kardiometabolické poruchy, neurodegenerace, rakovina, chronické záněty a stařecká křehkost. Metformin je navíc kandidátem protinádorové adjuvantní terapie. Dlouhodobé podávání metforminu je spojeno pouze s minimálními nežádoucími účinky, ale i přes to je dále intenzivně studován v rámci klinických studií, jejichž výsledky by potenciálně mohly umožnit jeho užití jako geroprotektoru. Fisetin je také zapojen v několika klinických studiích, velká část je momentálně zaměřena na jeho potenciál v komplementární terapii [226]. První fází klinického testování prošel i UBX0101, ve které byl pozorován jeho potenciální účinek na osteoartrózu. Vývoj tohoto inhibitoru byl ale zastaven během druhé fáze klinického testování, jelikož nebylo dosaženo hlavního cíle - snížení bolesti kolen u pacientů s osteoartritidou [227]. Podle ClinicalTrial.gov je např. dasatinib momentálně zapojen do 11 klinických studií, z toho 8 zaměřených na senescenci, stárnutí a onemocnění starších pacientů. Zbylé 3 studie testují účinek dasatinibu na pacientech s ALL (akutní lymfoblastická leukémie) a CML (chronická myeloidní leukémie). Quercetin je podáván pacientům v rámci 7 klinických studií, z toho 5 je zaměřeno na stárnutí a patologie, které přináší, a další 2 fokusují na obezitu a ischemickou chorobu srdeční. Existuje 6 studií testujících fisetin, všechny zaměřené na senescenci. Dasatinib, quercetin a fisetin jsou často testovány v rámci jedné studie jako oddělené skupiny. D a Q se zároveň objevují ve 4 studiích, D s fisetinem ve 2 a Q s fisetinem v 1. Metformin je pak součástí 14 studií, z toho 13 zaměřených na stáří, poslední na diabetes melitus. Zmíněné studie jsou prováděny po celém světě, klinické testování je v různých fázích (většinou 1-3, minoritně 4) a jejich aktuální stav je různorodý - od návrhu, přes nabírání pacientů, probíhající status až po studie čerstvě ukončené, popř. s vydanými výsledky. K objasnění potenciálu zmíněných (i dalších) perspektivních senolytik však bude zapotřebí mnoho další práce.

2. Specifické cíle práce

Výsledky předkládané disertační práce jsou rozděleny do 3 částí, každá z nich postupně přispívá k identifikaci nových potenciálních senolytických látek. Testování látek bylo provedeno *in vitro* a následně i *in vivo* na modelech přirozeného stárnutí a také na akcelerovaném radiačním modelu. Odběr myšního biologického materiálu se řídil pravidly 3R a proběhl neinvazivně s pomocí specializovaného nástroje.

Cíl 1: Optimalizace buněčného akcelerovaného radiačního modelu senescence s následným testováním vybraných látek - potenciálních senolytik - za využití vysokokapacitního skrínungu. Ověření senolytického efektu i na replikativním modelu senescence.

Cíl 2: Optimalizace a validace neinvazivního odběru myších chlupů pomocí nově navrženého a zkonstruovaného zařízení. Ověření možnosti uplatnění myších chlupových folikulárních buněk jako zdroje nukleových kyselin a dalšího materiálu pro výzkum senescence.

Cíl 3: Testování vybraných potenciálních senolytik na přirozeném replikativním myším modelu senescence. Optimalizace myšního akcelerovaného modelu senescence s následným testováním vybraných látek.

3. Materiál a metody

3.1. Cíl 1

3.1.1. Buněčné linie a kultivace

Pro zhodnocení odezvy buněk na radiaci za účelem indukce senescence bylo použito 6 vybraných lidských buněčných linií (viz Tabulka 4). Tento výběr zahrnoval jak buňky nenádorové, tak i odvozené z nádorových tkání, fibroblasty i epiteliální buňky, navíc byla přidána i jedna reportérová linie.

Tabulka 4: Přehled použitých buněčných linií.

buněčná linie	organismus	morfologie/ buněčný typ	tkáň	onemocnění	poznámka
MRC5	<i>Homo sapiens</i>	fibroblast	plice	zdravý	
BJ	<i>Homo sapiens</i>	fibroblast	kůže	zdravý	
A549	<i>Homo sapiens</i>	epiteliální buňka	plice	karcinom	
U2OS	<i>Homo sapiens</i>	epiteliální buňka	kost	osteosarkom	
U2OS-53BP1	<i>Homo sapiens</i>	epiteliální buňka	kost	osteosarkom	reportérová linie, GFP-značený protein 53BP1
HCT116	<i>Homo sapiens</i>	epiteliální buňka	tlusté střevo	karcinom	

Buněčné linie byly zakoupeny z ATCC (Middlesex, UK): MRC5 (ATCC CCL-171™), BJ (ATCC CRL-2522™), A549 (ATCC CCL-185™), U2OS (ATCC HTB-96™) a HCT116 (ATCC CCL-247™). Pouze reportérovou linií U2OS-53BP1 laskavě poskytl Mgr. Martin Mistrík, Ph.D. (LIG). Linie MRC5 a BJ byly kultivovány v médiu EMEM (Gibco®, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), A549 v Ham's F-12 médiu (Gibco, Thermo Fisher Scientific), U2OS a HCT116 v McCoy's médiu (Gibco, Thermo Fisher Scientific). Všechna kultivační média byla doplněna o 10 % fetálního bovinního séra (FBS, Gibco, Thermo Fisher Scientific). Buněčné linie byly kultivovány a udržovány ve standardním inkubátoru s řízenou vlhkostí a 5% podílem CO₂ v atmosférickém vzduchu při 37°C. V případě delší kultivace (více než 1 týden) byla přidána kombinace antibiotik streptomycin a penicilin o koncentraci 1 % (Gibco, Thermo Fisher Scientific).

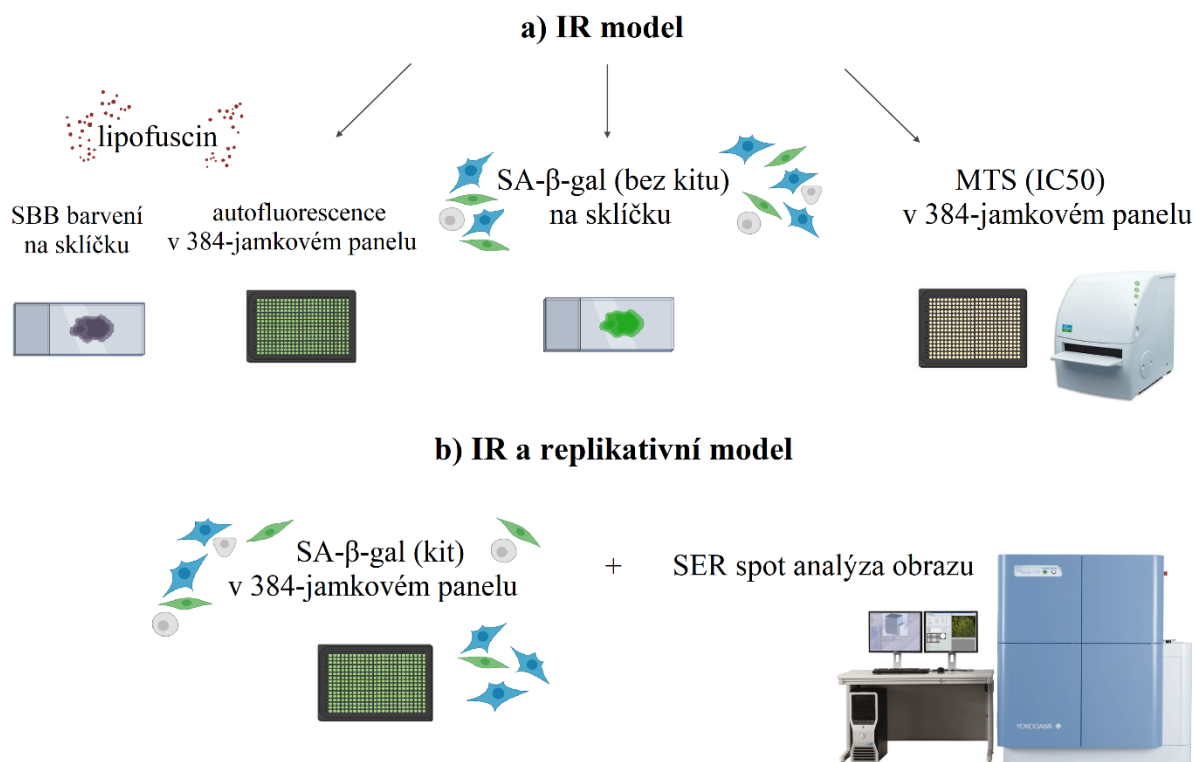
Všechny linie byly vysazovány do 96- a/nebo 384-jamkových panelů. Během optimalizace indukce senescence pomocí IR byla v případě 96-jamkového panelu každá linie vysazena v koncentracích: 5000, 10 000, 20 000, 30 000 buněk/jamku; každá linie o dané koncentraci do 4 jamek. U 384-jamkových desek byly použity koncentrace 1 000, 2 000, 3 000, 5 000, 8 000, 10 000 buněk/jamku; každá linie o dané koncentraci do 8 jamek. Vždy byla připravena deska kontrolní a paralelně s ní deska určená k ozáření. Různé linie, koncentrace i panely sloužily k získání co nejvíce možných kombinací a podrobných informací ohledně nejlepšího způsobu kultivace buněk před, během a po indukci senescence.

Pro účely chromogenního barvení lipofuscinu a vizualizace β -galaktosidázové aktivity (bez použití kitu) byly buňky MRC5 vysazeny na sklíčka o koncentraci 150 000 buněk/sklíčko a to v den 17 (D17) po ozáření (IR).

Pro závěrečné testování nových skupin látek byl systém naposledy upraven, aby došlo k co největšímu zjednodušení, miniaturizaci, urychlení a zvýšení efektivity. Namísto vysazování 384-jamkových panelů určených k indukci senescence pomocí IR a paralelně panelů kontrolních (neozářené buňky), byla optimalizována paralelní kultivace senescentních a proliferujících buněk. Vysazení proběhlo dle výše uvedeného popisu, následovalo ozáření (viz níže) a 24 hodin před ošetřením testovanými látkami byly do panelu přidány buňky parentální (MRC5 600 buněk/jamku, U2OS a HCT116 350 buněk/jamku) pro zajištění co nejpřirozenějších podmínek.

Na replikativním modelu senescence MRC5 buněk v paralelní kultivaci p. 46 (pasáž 46) a p. 16 (jako kontrolní proliferující buňky) bylo otestováno 5 látek vybraných z předešlých testování. Nejprve bylo vysazeno 2000 buněk/jamku MRC5 p. 46, po 48 hodinách byly přidány kontrolní buňky MRC5 p. 16 (600 buněk/jamku) a inkubovány 24 hodin.

Pro lepší přehlednost je na Obrázku 14 schématicky znázorněn pracovní postup v rámci Cíle 1. Finální metody pro testování potenciálních senolytických látek byly ustáleny díky získaným poznatkům ze všech experimentů.



Obrázek 14: Schéma metodického postupu Cíle 1. Po výběru vhodných buněčných linií a optimalizaci IR byl a) IR buněčný model použit v úvodních testech na barvení lipofuscinu a SA- β -gal, čímž byly získány reprezentativní obrázky odrážející senescentní stav buněk, a dále pak k otestování sady látek pomocí MTS testu. V další fázi byly použity b) IR a replikativní model k testování skupin látek pomocí optimalizované a zrychlené metody barvení SA- β -gal kitem s následnou SER spot analýzou obrazu.

3.1.2. Ozáření buněk (IR)

Po vysazení buněk do panelů následovala inkubace (6 hodin), aby došlo k přichycení buněk na dno jamek ještě před ozáření. Buňky byly ozářeny celkovou jednorázovou dávkou 10 Gy (2,3 Gy/minutu) pomocí RTG ozařovače (X-ray RS225, Xstrahl, Surrey, UK). Dávka 10 Gy byla použita pro optimalizaci IR modelu senescence, který byl základem pro testování výtípaných látek jak pomocí MTS, tak i SA- β -gal + SER spot analýzy.

Stejnou dávkou (10 Gy) byly ozařovány i kultivační láhve velikosti T150 (Thermo Fisher Scientific, #TPP™90151) s MRC5 buňkami pro následné vysazení na sklíčka. Při přesazení senescentních buněk z láhví na sklíčka je třeba inkubovat buňky alespoň 24 hodin, aby došlo k jejich opětovné adhezi, u senescentních buněk je tento proces mnohem pomalejší než u buněk proliferujících. Tento postup byl zvolen pro přípravu buněk na chromogenní barvení lipofuscinu a vizualizaci β -galaktosidázové aktivity (metoda bez kitu).

V průběhu práce byla pro účely otestování SER spot analýzy obrazu radiace k indukci senescence zvýšena na frakcionovanou dávku 3×10 Gy (ozáření v D1, D3, D5). Toto navýšení celkové dávky použité radiace posloužilo jen jednorázově k danému účelu.

3.1.3. Mikroskopie

Automatický mikroskop Cell Voyager CV7000S (Yokogawa, Tokyo, Japonsko) sloužil k získání průběžných i reprezentativních snímků během sledování změn morfologie vybraných buněčných linií po IR technikou fázového kontrastu (objektiv 40x). Všechny jamky byly naskenovány nejprve v D1 těsně před ozářením a následně v D10, D13, D17 a D20.

Filtr BF (z angl. bright field) v kombinaci s filtry fluorescenčního režimu na mikroskopu CV7000S byly použity při skenování autofluorescence lipofuscinu i pro hodnocení SA- β -galaktosidázové aktivity.

Reprezentativní obrázky buněk z experimentu provedeném na sklíčku - chromogenní barvení lipofuscinu a vizualizace β -galaktosidázové aktivity (metoda bez kitu) byly snímány pomocí světelného mikroskopu Zeiss Axio Observer D1 a softwareu Zen 2012 - blue edition (Zeiss, Oberkochen, Německo), zvětšení 40x a 100x.

3.1.4. Manuální zhodnocení indukce senescence

Všechny snímky pořízené během procesu indukce senescence pomocí IR byly manuálně vyhodnoceny podle morfologických alterací, které během 20 dnů nastaly. Jako průkaz indukce senescence byla akceptována typická viditelná markantní změna tvaru. Buněčné linie s rychlou a velmi dobře rozpoznatelnou odezvou - změnou morfologie byly využity dále v experimentech.

3.1.5. Potvrzení indukce senescence - lipofuscin

Potvrzení indukce senescentního stavu radiací bylo provedeno pomocí pravidelného skenování autofluorescence lipofuscinu ve vybraných liniích (fluorescenční mikroskop CV7000S, 40x) v 384-jamkových panelech (3000 buněk/jamku) a to průběžně po dobu 4 týdnů. Těsně před samotným pozorováním byla buněčná jádra podbarvena roztokem Hoechst 33342 (Molecular Probes[®], Eugene, OR, USA) inkubací 25 minut v 37°C (finální koncentrace roztoku Hoechst byla 10 μ g/ml 1xPBS). V Tabulce 5 jsou uvedeny kombinace testovaných excitačních a emisních vlnových délek použitých pro optimalizaci vizualizace lipofuscinu. Získané obrázky

byly importovány do programu na analýzu obrazu Columbus Image Data Storage an Analysis System (PerkinElmer, Waltham, MA, USA), buňky byly identifikovány podle nabarvených jader. Lipofuscinové granulky byly vyhledávány v oblasti cytoplazmy a následně byla kvantifikována jejich celková intenzita fluorescence. Takováto analýza byla nejprve optimalizována a ručně nastavena, následně tímto způsobem proběhla analýza všech získaných dat.

Tabulka 5: Přehled testovaných vlnových délek při pozorování autofluorescence lipofuscinu.

excitační vlnová délka (nm)	emisní vlnová délka (nm)	barva emisního spektra
405	445/45	modrá
405	595/40	žlutá-oranžová
488	460/80	modrá
488	540/40	zelená
488	620/70	žlutá-oranžová-červená

Lipofuscin je možné také sledovat ve světelném mikroskopu jako malé granulky v okolí jádra po barvení SBB: buňky vysazené na podložním sklíčku (MRC5, D17) byly 2x opatrně promyty 1xPBS, fixovány 4% formaldehydem/1xPBS po dobu 15 minut, permeabilizovány 15 minut v 0,25% TRITON X-100 (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Německo)/1xPBS v pokojové teplotě, následně 1x promyty v 1xPBS, ponořeny na 2 minuty do 70% ethanolu, nakonec byly buňky obarvené roztokem SBB (1% SBB/70% ethanolu, pozvolna otáčet přes noc v pokojové teplotě, pak filtrovat přes filtrační papír, stočit 5 minut na 4500 rpm, použít jen supernatant) a inkubovány 30 minut v 60°C, následně v 70% ethanolu 1 minutu, nakonec byl přidán 1xPBS. Obrázky byly pořízeny mikroskopem Zeiss (100x) a softwarem Zen 2012 (Zeiss, Německo).

3.1.6. Potvrzení indukce senescence - SA- β -gal aktivita

Vedle lipofuscinu bylo provedeno i potvrzení aktivity senescentního markeru β -galaktosidázy při pH 6. MRC5 v D17 po IR byly z lahví přesazeny na sklíčko, po adhezi buněk byly buňky 2x opatrně promyty 1xPBS, fixovány po dobu 15 minut v pokojové teplotě v 4% formaldehydu/1xPBS, opět 2x promyty 1xPBS, pak byl k buňkám přidán barvicí roztok, následovala inkubace 16 hodin v 37°C v inkubátoru bez CO₂, vše uzavřeno parafilmem, aby nedocházelo k odpařování tekutiny (finální koncentrace reagentů v barvicím roztoku: 40mM kyselina citronová/Na₂HPO₄·2H₂O, 5mM K₄[Fe(CN)₆]·3H₂O, 5mM K₃[Fe(CN)₆], 150mM NaCl, 2mM MgCl₂, 1 mg/ml X-gal/N-N-dimethylformamid, doplněno vodou). Po inkubaci

přes noc byla sklíčka 2x promyta 1xPBS, pak methanolem, nakonec sklíčka s barvenými buňkami oschla na vzduchu v pokojové teplotě a byly pořízeny reprezentativní obrázky pomocí světelného mikroskopu Zeiss (100x) a softwarem Zen 2012, Zeiss, Německo (zvětšení 40x, 100x).

3.1.7. MTS

Pro otestování látek, jejichž potenciální senolytický efekt byl pozorován v jiných akcelerovaných *in vitro* modelech senescence (BJ+DOX/Ras, MRC5+APH) mých kolegů, byl využit MTS test. MRC5, U2OS a HCT116 byly vysazeny do 384-jamkových panelů a ozářeny (10 Gy) dle popisu výše. Následovala 4-týdenní inkubace k indukci senescence, pak byly buňky ošetřeny vybranými látkami o koncentracích v zředovací řadě a inkubovány 3 dny. Finální koncentrace látek byly 50; 12,5; 3,125; 0,78125; 0,1953125; 0,048828125; 0,012207031 μ M. Paralelně byly vysazeny a ošetřeny panely s buňkami kontrolními (proliferujícími). Následoval MTS test.

Koncentrace látek inhibující buněčný růst z 50 % (IC₅₀) byly zjištěny pomocí kvantitativního metabolického barvení roztokem MTS (3-(4,5-dimethyliazol-2-yl)-5-(3-karboxymetoxifenyl)-2(4sulfonyl)-2H tetrazolium): 1 g MTS/500 ml 1xPBS, přefiltrovat, udržovat ve tmě v -20°C, těsně před použitím rozmrazit v pokojové teplotě, následně zahřát ve vodní lázni na 37°C a přidat 1 ml PMS (z angl. phenazine methosulfate, fenazin methosulfát; Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Německo) o koncentraci 5 mg/ml 1xPBS/100 ml roztoku MTS. Do každé jamky byly přidány 4 μ l MTS pomocí Multidrop Combi (Thermo Fisher Scientific, USA), následovala inkubace 2 - 4 hodiny. Absorbance byla změřena přístrojem EnVision Multimode Plate Reader (PerkinElmer, USA) při vlnové délce $\lambda = 490$ nm. Hodnoty absorbancí byly zpracovány do výsledných hodnot IC₅₀ v programu Dotmatics Ing. Soňou Gurskou, Ph.D. Jako pozitivní kontroly byla použita cytostatika aktinomycin D (1 mg/1 ml DMSO; APExBIO, Boston, MA, USA) a mitomycin C (10 mg/1 ml DMSO; APExBIO, USA) a jako negativní kontrola DMSO (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Německo). Testované látky o zásobních koncentracích 10mM, 1mM a 0,1mM byly rozpuštěny v DMSO a skladovány při -20°C.

3.1.8. Potenciálně senolytické látky testované pomocí MTS

Látky uvedené v Tabulce 6 byly připraveny ve 3 zásobních koncentracích do zdrojových destiček (384 LDV, Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA, #001-12782). Pomocí přístroje Echo 550 (Labcyte Inc., San Jose, CA, USA) a příslušného softwaru (CherryPick) byly všechny testované látky přeneseny do cílových jamek k buňkám, přenos kontrolních látek proběhl pomocí software Plate Reformat (Labcyte Inc., San Jose, CA, USA). Buňky byly s látkami inkubovány 72 hodin, následoval MTS test a vyhodnocení.

Tabulka 6: Potenciálně senolytické látky testované pomocí MTS.

látka	poznámka
quercetin	známé senolytikum
dasatinib	známé senolytikum
D+Q	známé senolytikum
MCOPPB	známé senolytikum
CP-31398	p53 stabilizující látka
CP-100356	antivirotikum
dequalinium chlorid hydrát	protizánětlivá a protiinfekční látka
daurisoline	přírodní látka, protinádorová léčba
decyltrimethylammonium bromid	kationtový detergent
9-aminoakridin hydrochlorid monohydrát	aktivátor p53, DNA interkalátor
valsopodar	derivát cyklosporinu D
BMH-21	inhibitor Pol I
1-hexyl-4-amino-2-methylquinolinium	dequalinový fragment
C1	potenciální léčivo v protinádorové terapii
loperamid hydrochlorid	meperidinový analog
C2	potenciální léčivo v protinádorové terapii
S1	nukleosidový analog
S3	nukleosidový analog
C3	cytostatický nukleosid
C4	cytostatický nukleosid
C5	derivát betulinu

Pozn. nově nasyntetizované látky a některé další látky jsou anonymizovány pod číselnými kódy.

3.1.9. SA- β -gal kit a SER spot analýza obrazu

Pro testování dalších skupin látek, jejichž senolytický efekt zatím zjištěn nebyl, bylo cílem optimalizovat barvení SA- β -gal aktivity pomocí komerčně prodáváného kitu, aby se celá procedura urychlila a také ji bylo jednoduše možné použít pro HTS (z angl. high throughput screening). Pro tento účel byl vybrán Senescence β -Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling

Technology, Danvers, MA, USA, #9860). Veškeré pipetování bylo provedeno pomocí Multidrop Combi (Thermo Fisher Scientific, USA), popř. Biotek EL406 Washer dispenser (BioTek Instruments, Santa Clara, CA, USA). Barvení bylo realizováno na akcelerovaném modelu senescence 3 buněčných linií (IR 10 Gy) v porovnání s kontrolními buňkami v 384-jamkových panelech podle návodu výrobce po 3-denní inkubaci s testovanými látkami. Těsně před skenováním panelů byla ještě podbarvena buněčná jádra a to přidáním roztoku Hoechst 33342 (finální koncentrace 10 µg/ml 1xPBS) přímo k buňkám, následovala inkubace 10 minut v pokojové teplotě a pak skenování automatickým mikroskopem CV7000S (zvětšení 20x, laser 405 nm pro Hoechst, světelné pole pro SA-β-gal), obrázky byly importovány do programu Columbus a zde také zanalyzovány. Senescentní buňky byly kvantifikovány pomocí analýzy založené na textuře jaderných a cytoplazmatických regionů (algoritmus Saddle-Edges-Ridges SER v systému analýzy obrazu Columbus) [228]. Zjednodušeně, buněčná jádra byla identifikována na základě Hoechst barvení, byla u nich spočítána plocha a kulatost (pravidelnost okraje) a na základě těchto dvou vlastností byla selektována populace buněk. Dále byla označena cytoplazma okolo každého jádra z vyselektované populace, v níž došlo ke kalkulaci texturních vlastností (v BF kanálu) na základě SER spot vlastností. Buňky s hodnotou SER spot vyšší než treshold byly označeny jako senescentní. Pro každou použitou linii byl ručně nastaven a optimalizován protokol pro automatickou analýzu.

Po nastavení protokolů analýzy na vzorových panelech bylo třeba otestovat analýzu v praxi. Proto byl proveden jednoduchý experiment, ve kterém byly připraveny 2 série panelů. Jedna sada obsahovala již zmíněné desky se senescentními buňkami po 10 Gy (IR v D1) plus desky kontrolní. Naproti tomu byly stejným způsobem připraveny panely pro senescentní buňky indukované frakcionovanou dávkou 3 x 10 Gy (IR v D1, D3, D5) plus desky kontrolní a to u všech 3 linií. Výsledky (po 1, resp. 3 týdnech) byly zpracovány pomocí výše popsané SER spot analýzy.

Optimalizovaná SER spot analýza byla použita i pro identifikaci a kvantifikaci senescentních buněk (Příloha 3) v akcelerovaném senescentním modelu BJ buněk (10 Gy) v 384-jamkových panelech. Účelem tohoto experimentu bylo posouzení vlivu normálních a senescentních buněk a jejich kondicovaného média na buněčnou odpověď kolorektálního karcinomu na DNA-demethylující epi-látky AZA (5-azacytidin) a DAC (5-aza-2'-deoxycytidin), které jsou základem epigenetické léčby nádorů.

3.1.10. Testování látek pomocí SER spot analýzy

Byly vytvořeny 3 skupiny látek: a) výběr látek ze skupiny testované pomocí MTS (11 sloučenin), b) opioidní látky (30 opioidů), c) opakovaně testované látky, které svůj senolytický účinek prokázaly již v dřívějších experimentech (5 molekul). Látky jsou uvedeny v Tabulce 7. Tyto látky byly otestovány na IR modelu senescence na všech 3 vybraných liniích.

V případě předchozího testování pomocí MTS bylo nutné držet oddělené kultury senescentních a proliferujících kontrolních buněk, ale u SER spot analýzy je možné tento krok zjednodušit a proliferující kontrolní buňky den před ošetřením látkami přidat do panelů s buňkami senescentními a tím i dosáhnout přirozenějšího prostředí podobného tomu ve tkáních, kde je část buněčné populace v senescenci a část zůstává funkční.

Celý postup byl totožný s výše popsáním protokolem. Z optimalizované SER spot analýzy obrazu po barvení β -gal aktivity kitem byla vygenerována data k výpočtu p hodnoty. Statistické rozdíly byly vyhodnoceny pomocí jednocestné ANOVA s následným post-hoc Dunnettovým testem na srovnání ošetřené vs. kontrolní skupiny ($p < 0,05$ bylo považováno za statisticky významné). Vždy byl srovnáván rozdíl v počtu senescentních buněk ošetřených vybranými látkami vs. senescentních buněk neošetřených. V případě průkazu senolytického efektu látky, tedy došlo-li ke statisticky signifikantní změně (eliminaci) počtu senescentních buněk po šetření danou látkou, pro kontrolu bylo nutné revidovat, zda nedošlo i ke změně v počtu buněk proliferujících (data neuvedena).

Tabulka 7: Přehled testovaných látek pro SER spot analýzu.

látka	poznámka
výběr látek z MTS	
quercetin	známé senolytikum
dasatinib	známé senolytikum
D+Q	známé senolytikum
decyltrimethylammonium bromid	kationtový detergent
9-aminoakridin hydrochlorid monohydrát	aktivátor p53, DNA interkalátor
valsopodar	derivát cyklosporinu D
BMH-21	inhibitor Pol I
1-hexyl-4-amino-2-methylquinolinium	dequalinový fragment
C1	potenciální léčivo v protinádorové terapii
loperamid hydrochlorid	meperidinový analog
C2	potenciální léčivo v protinádorové terapii

Pozn. nově nasyntetizované látky a některé další látky jsou anonymizovány pod číselnými kódy.

Tabulka 7: Přehled testovaných látek pro SER spot analýzu (pokračování).

látka	poznámka
opioidy	
DAMGO	agonista μ -opioidního receptoru
(±)-metadon hydrochlorid	léčba závislosti na opioidech a proti bolesti
levorfanol (+)-tartrátová sůl dihydrát	tartrátová sůl z levorfanolu, syntetický fenantren se silnou opioidní analgetickou aktivitou
oxykodon hydrochlorid	silný narkotický lék proti bolesti, semi-syntetický opioid
hydromorfon hydrochlorid	léčba středně silné až silné bolesti a určitých typů kašle, analgetikum, vyroben z morfinu
butorfanol (+)-tartrátová sůl	syntetický opioidní agonista-antagonista, analgetikum
[Leu5]-enkefalin	endogenní opioidní neurotransmitter/neuromodulátor lokalizovaný v mozkových paralelách a v δ receptorech
nalbufin	opioidní analgetikum proti bolesti
mabron	opiát proti bolesti
dipidolor	silně účinný a bolest tlumící opiát
remifentanyl	silné, krátkodobě působící syntetické opioidní analgetikum
kodein	opiát používaný pro analgetické, antitusivní a protiprůjmové účinky
sufentanyl	silný syntetický opioid k tlumení bolesti
fentanyl	syntetický opioid, superpotentní agonista μ -opioidních receptorů s krátkým biologickým poločasem
dolsin	silný opioid proti bolesti
morfin	alkaloid benzylisochinolinového, resp. morfinanového typu, obsažený v opiu, tzv. opiát, silné analgetikum
kokain	droga, rostlinný tropanový alkaloid z jihoamerického keře rudodřev koka, silné stimulantium a lokální anestetikum
U-50488	vysoce selektivní κ -opioidní agonista, ale bez μ -opioidních antagonistických účinků
GR 89696	vysoce selektivní κ -opioidní agonista
U-69593	κ -opioidní agonista
pentazocin	opioid k léčbě středně silné až silné bolesti, aktivuje κ -opioidní a μ -opioidní receptory
buprenorfin hydrochlorid	smíšený opioidní agonista-antagonista, léčba abstinenčních příznaků při vysazení jiných opioidů
SCH 221510	silný a selektivní agonista nociceptinového opioidního receptoru (NOP)
naloxon	zastavení účinků opioidů při předávkování
naltrexon	antagonista opiátových receptorů, léčba závislosti na alkoholu nebo opiátech
nalmefen	antagonista opiátových receptorů, léčba závislosti na alkoholu nebo opiátech
methylnaltrexon bromid	periferně působící antagonist μ -opioidního receptoru, léčba zácpy vyvolané opioidy u pacientů v paliativní péči
nor-binaltorfimin	silný a selektivní antagonist kappa-opioidního receptoru
guanidinonaltrindol	selektivní ligand κ - δ -opioidních receptorů používaný ve vědeckém výzkumu
BAN ORL 24	silný a selektivní antagonist NOP receptoru

Tabulka 7: Přehled testovaných látek pro SER spot analýzu (pokračování).

látka	poznámka
opakovaně testované látky	
S1	nukleosidový analog
S2	nukleosidový analog
S3	nukleosidový analog
S4	antipsychotikum
S5	antipsychotikum

Pozn. nově nasyntetizované látky a některé další látky jsou anonymizovány pod číselnými kódy.

3.1.11. *In vitro* replikativní model senescence

K potvrzení senolytického účinku některých látek z testování SER spot analýzou na IR modelu byl využit i jednoduchý buněčný model - replikativní model senescence. V první řadě bylo nutné potvrdit přítomnost senescentních buněk v MRC5 kultuře. Proto byly otestovány MRC5 buňky ve 3 různých pasážích (p. 16, p. 34 a p. 46) pomocí kitu na barvení β -gal aktivity a SER spot analýzy.

Dále bylo vybráno 5 látek (S1 - S5) z předešlého testování na IR modelu, které vykazovaly dobré výsledky, a byly otestovány i na replikativním modelu v paralelní kultivaci MRC5 buněk p. 16 a p. 46. Po vysazení buněk následovalo přidání látek, inkubace, barvení, snímání mikroskopického obrazu a jeho analýza (jako bylo popsáno výše).

3.2. Cíl 2

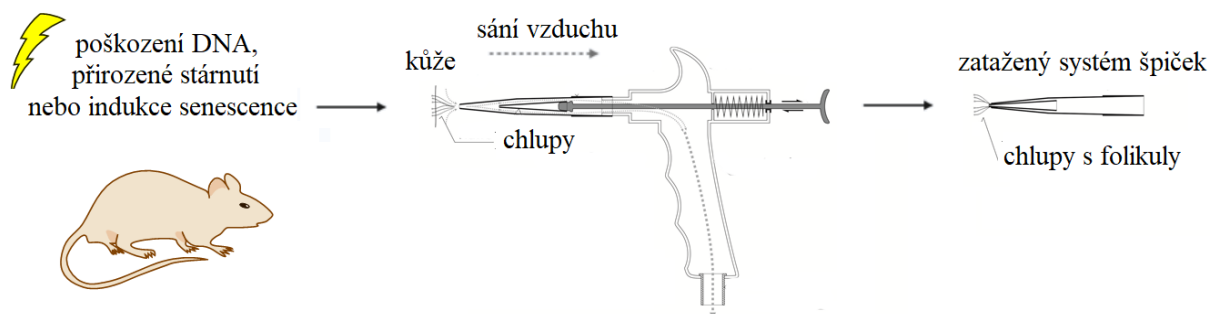
Náplní této části experimentálního zkoumání bylo optimalizovat a validovat neinvazivní způsob odběru myších chlupů pomocí patentovaného zařízení. Dále jsou zde přiloženy příklady možností užití myších chlupů jako velmi slibného biologického materiálu (genotypizace, imunofluorescenční a jiné barvení nebo využití k testování látek podaných zvířatům topicky). Myší chlupové folikuly byly následně užity pro senescentní experimenty *in vivo*.

3.2.1. Etické prohlášení

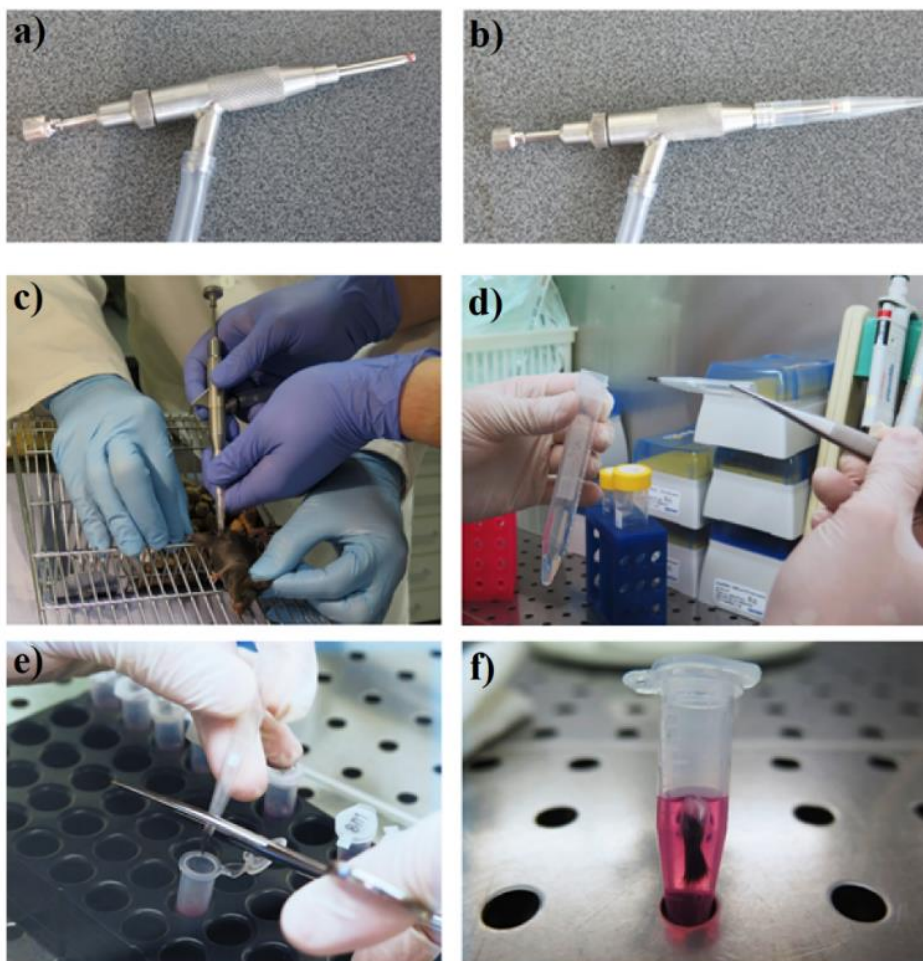
In vivo experimenty byly provedeny v souladu s etickými standardy uvedenými v Helsinské deklaraci a dalšími příslušnými národními i nadnárodními směrnicemi, vše se souhlasem institucionální etické komise.

3.2.2. Neinvazivní odběr myších chlupů

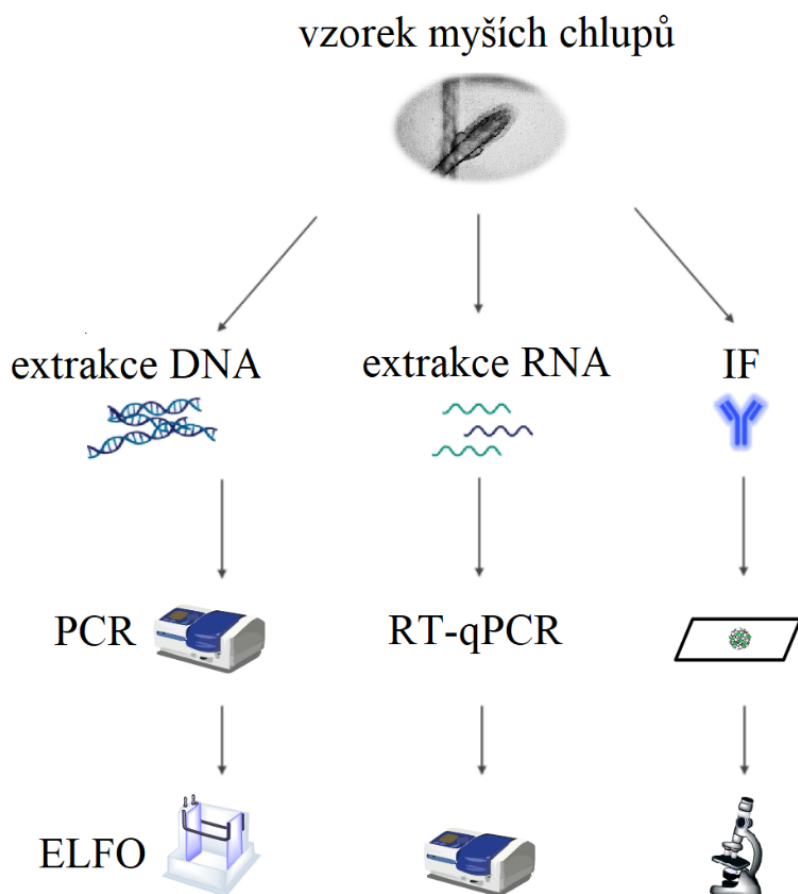
K neinvazivnímu odběru všech vzorků myších chlupů bylo použito patentované zařízení (detailně popsáno v EP2928382A1 a US 20150297253). Zjednodušeně, zařízení se skládá ze dvou plastových laboratorních špiček (menší vsunutá do větší, u ubou byla seříznuta špička), větší špička nasedá na pistolí podobnému zařízení. Zařízení navíc disponuje spouští a vnitřním nasávacím systémem. Pistol je napojena na vakuum, po jehož spuštění dochází k sání směrem dovnitř zařízení. Plastová špička napojená na pistolí se jemně přitiskne na kůži pokusného zvířete a zmáčkne se spoušť. Systém špiček je tímto odpojen od zbytku zařízení za mirného cvaknutí a zůstává viset na srsti zvířete s trsem chlupů uzamčeným mezi špičkami. Následně stačí špičku chytit a jemně zatáhnout, myší chlupy se z kůže vytrhávají jednoduše bez nutnosti vynaložení velké síly, vyrůstají totiž z mělké oblasti kůže. Schéma odběru myších chlupů je na Obrázku 15. Ilustrační fotografie z odběru jsou uvedeny na Obrázku 16. Jednoduchý pracovní postup - možnosti užití chlupových folikulů pro výzkum je na Obrázku 17.



Obrázek 15: Schéma odběru vzorků chlupových folikulů pomocí speciálně navrženého zařízení (upraveno z Přílohy 2).



Obrázek 16: Ilustrační fotografie z reálného odběru myších chlupových folikulů. A) zařízení k odběru chlupů podobné pistoli, b) zařízení s nasazeným systémem plastových špiček, c) samotný odběr z pokusného zvířete, d) uložení trsu chlupů zachyceného v systému plastových špiček do fixačního roztoku / do 5ml zkumavky, e) možnost sterilního ustřížení špiček / uložení do 1,5ml mikrozukavky, f) vzorek myších chlupů v QIAzolu.



Obrázek 17: Schéma experimentálního pracovního postupu při práci s myšími chlupovými folikuly jakožto se vstupním biologickým materiálem (upraveno z Přílohy 2).

3.2.3. Izolace DNA a RNA

Celková genomická DNA z buněk myších chlupových folikulů a z biopsií myších ocásků byla izolována pomocí kitu Cobas® DNA Sample Preparation Kit (Roche, Basilej, Švýcarsko) podle návodu výrobce. DNA byla izolována pro účely ověření kvality a množství izolované DNA a následně i jejího využití pro genotypizaci pokusných zvířat. Vzorky chlupů i ocásků byly odebrány celkově ze 152 mlád'at - potomků z křížení 5XFAD transgenických samců (B6Cg-TgTg(APPSwFILon, PSEN1*M146L*L286V)6799Vas/Mmjax) získaných z The Jackson Laboratory a C57Bl/6 JOIaHsd samic z Envigo (Huntingdon, Velká Británie) jako genetického pozadí.

RNA byla izolována ze vzorků myších chlupů, které byly ihned po extrakci z kůže vloženy do 700 µl QIAzol Lysis Reagent a okamžitě zpracovány dle návodu výrobce kitem miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Německo). Jedinou odchylkou v postupu bylo vynechání kroku odstranění vzorku chlupů před přenosem roztoku na kolony. Konečným krokem byla eluce

RNA do 30 μ l RNase-free vody. Ke zhodnocení kvality a množství izolované RNA bylo použito 100 vzorků.

Koncentrace a kvalita DNA i RNA byly zjištěny pomocí spektrofotometru Nanodrop ND 1000 (Thermo Fisher Scientific, USA). RIN (z angl. RNA integrity number) hodnoty pro další měření kvality/integrity izolované RNA byly získány z Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

3.2.4. Genotypizace - PCR a elektroforetická separace

Genotypizace pokusných zvířat byla založena na ověření přítomnosti 2 transgenů: *APP* (z angl. amyloid beta precursor protein) a *PST* (z angl. presenilin 1) v myších vzorcích DNA izolovaných z chlupových folikulů ve srovnání s biopsií tkáně z ocásku, navíc byla u každého vzorku amplifikována interní kontrola. Přítomnost *APP* i *PST* transgenů byla stanovena optimalizovanou PCR metodou. Reakční směs obsahovala 2 μ l templátové DNA, 2 μ l 10 μ M *APP* nebo *PST* směsi primerů, 2 μ l 10 μ M primerové směsi pro interní kontrolu, 5 μ l 5x GC buffer, 0,5 μ l 10mM deoxyribonukleotid trifosfátů (dNTP), 0,75 μ l DMSO, 0,25 μ l Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase and 12,5 μ l nuclease-free vody (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Sekvence použitých primerů jsou přehledně uvedeny v Tabulce 8. Amplifikace cílových genů proběhla v termocykleru následujícím programem: 98°C - 30 s, následovalo 30 amplifikačních cyklů 98°C - 10 s, 63°C - 30 s, 72°C - 10 s, pak 72°C - 5 min a finální chlazení vzorků. PCR produkty byly vizualizovány pomocí elektroforetické separace v 1% agarózovém gelu/TBE v Odyssey Fc electrophoresis system (LI-COR, Lincoln, NE, USA). Na základě přítomnosti či absence cílových transgenů byla zvířata (n=152) označena jako GMO-pozitivní (oba transgeny přítomny) nebo GMO-negativní (absence obou transgenů). Každý vzorek musel taktéž obsahovat primery pro interní kontrolu. Tímto způsobem bylo navíc potřeba potvrdit možnost nahradit bolestivou biopsii ocásků neinvazivním odběrem myších chlupů, tzn. výsledky musely být totožné pro oba použité biologické materiály.

Tabulka 8: Primerové sekvence pro genotypizaci.

gen	forward primer 5' - 3'	reverse primer 3' - 5'	délka amplikonu (bp)
APP	AGGACTGACCACTCGACCAG	CGGGGGTCTAGTTCTGCAT	377
PST	AATAGAGAACGGCAGGAGCA	GCCATGAGGGCACTAATCAT	608
interní kontrola	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC	324

3.2.5. Imunofluorescence

Myši chlupové folikuly určené k barvení IF byly odebrány ze zvířat outbredního kmene HsdWin:NMRI (Envigo, Velká Británie). Všechny vzorky byly nejprve fixovány v 10% formalínu (neutral buffered formalin, Sigma-Aldrich, Německo) po dobu 20 minut a následně permeabilizovány 20 minut v 0,5% TritonX-100 (Carl Roth GmbH + Co. KG, Německo)/1xPBS. Následovalo 20-minutové blokování v 1xPBS obsahujícím 1 % BSA (Sigma-Aldrich, Německo). Blokovací roztok byl využit také pro naředění protilátek. Vzorky byly přes noc inkubovány v roztoku primární protilátky (4°C). Další den byly vzorky promyty 1xPBS a inkubovány s roztokem sekundární protilátky po dobu 1 hodiny. Seznam primárních a sekundárních protilátek je uveden v Tabulce 9. Potom byly vzorky promyty 1xPBS a na podložním sklíčku zality montovacím médiem s obsahem DAPI (Vectashield antifade medium with DAPI, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) nebo obarveny roztokem Hoechst 33342, promyty 1xPBS a zality montovacím médiem. Snímky takto nabarvených myších folikulů byly získány mikroskopem Axio Observer.Z1/Cell Observer Spinning Disc microscopic system (Zeiss, Oberkochen, Germany), zvětšení 60x s použitím olejové imerze. Všechny obrázky byly procesovány pomocí ZEN Blue Image software. V části Cíl 2 byly tímto způsobem vizualizovány jaderné proteiny (p53 a MDM2) a ribozomální proteiny (RPS6, RPL5) lokalizované v cytoplazmě k demonstraci možností IF barvení v chlupových folikulech a navíc byl tímto způsobem pozorován i marker poškození DNA γ -H2AX po topické aplikaci látek.

Tabulka 9: Primární a sekundární protilátky použité pro imunofluorescenci.

primární protilátky				
antigen	druh	výrobce	katalogové číslo	ředění
p16	myš	Santa Cruz Biotechnology	sc-1661	1:100
p21	králík	Cell Signaling	#2947	1:100
H2AX	králík	Cell Signaling	#9718	1:400
MDM2	myš	Abcam	ab16895	1:200
p53	králík	Santa Cruz Biotechnology	Sc-6243	1:100
RPS6	králík	Cell Signaling	#2217	1:100
RPL5	králík	Cell Signaling	#14568	1:100

Tabulka 9: Primární a sekundární protilátky použité pro imunofluorescenci (pokračování).

sekundární protilátky					
hostitel	rozpznává	výrobce	katalogové číslo	ředění	fluorofór
koza	králíčí IgG	Thermo Fisher Scientific	A-1101	1:1000	Alexa Fluor 568
koza	králíčí IgG	Thermo Fisher Scientific	A-11034	1:1000	Alexa Fluor 488
koza	myší IgG	Abcam	ab150113	1:1000	Alexa Fluor 488

3.2.6. Giemsovo barvení

Ke zviditelnění obecné morfologie myších chlupů byly vzorky obarveny pomocí Giemsova barvení. Ihned po vytržení myších chlupů z kůže byly vzorky inkubovány ve 4% methanolu po dobu 15 minut, dále promyty 3x po 2 minutách v 1xPBS, pak ponořeny 30 s v May-Grunwald roztoku (Penta, Praha, Česká republika). Následovalo promytí v destilované vodě po dobu 2 minut, vzorky byly opatrně osušeny a nakonec inkubovány v 10x zředěném Giemsa-Romanowsky roztoku (Penta, Česká republika). Zbytky roztoku byly odstraněny 2-minutovým promytím vzorků v destilované vodě. Konce myších chlupů s folikuly byly ušříženy a umístěny mezi podložní a krycí sklíčka do kapky vody. Snímky (zvětšení 20 x a 100x) byly získány pomocí transmisního světelného mikroskopu (Primovert, Zeiss, Německo).

3.2.7. Topické aplikace chemických klastogenů

K otestování možnosti využití myších chlupů také k topickým aplikacím látek byly použity 3 myši/skupinu z kmene HsdWin:NMRI (Envigo, Huntingdon, Velká Británie). Dvě genotoxická protinádorová léčiva způsobující poškození DNA, bleomycin a cis-platina rozpuštěné v DMSO, byly vetřeny do kůže zvířat na označeném místě (na pravé pólce těla), levá část těla sloužila ke kontrolnímu odběru. Bylo aplikováno 16,6 μ l roztoku bleomycinu (koncentrace 5 μ g/ml) a 30 μ l roztoku cis-platiny (koncentrace 0,5 mg/ml). Zvířata ošetřená bleomycinem byla inkubována ve svých domovských klecích po dobu 1 hodiny, skupina zvířat ošetřená cis-platinou 5 hodin. Následně byly odebrány vzorky chlupů z místa topické aplikace klastogenů a z opačné (kontrolní) strany těla. Tyto vzorky podstoupily IF barvení (postup popsán výše) k detekci histonu γ -H2AX.

3.3. Cíl 3

Účelem poslední části práce je ověření myšího modelu přirozeného stárnutí a jeho využití k otestování působení potenciálních senolytik. Dále byl optimalizován postup indukce senescence v akcelerovaném modelu stárnutí *in vivo* s následným testováním látek.

3.3.1. *In vivo* model replikativní senescence

Pro validaci myšího modelu přirozeného stárnutí byly použity myši kmene C57Bl/6 (ENVIGO, Nizozemsko), každou testovanou skupinu tvořilo 6 zvířat. Změny exprese senescentních markerů během stárnutí byly porovnány navzájem mezi 3 skupinami zvířat, které se lišily věkem: staré myši (2,5 - 3 roky), dospělé myši (10 měsíců) a mladé myši (6 měsíců). Ze všech zvířat byly odebrány vzorky chlupů, z nichž byla izolována RNA (metodicky dle uvedeného v Cíli 2), následovala reverzní transkripce a qPCR senescentních markerů p16 a p21. Pro demonstraci změn na proteinové úrovni během stárnutí byly reprezentativní vzorky obarveny IF (metodicky dle uvedeného v Cíli 2) a vizualizovány markery p16 a p21.

3.3.2. Reverzní transkripce, qPCR a analýza dat

Reverzní transkripce sloužila k přepisu izolované RNA (popis izolace v Cíli 2) do cDNA (z angl. complementary DNA). Do reakční směsi pro každý vzorek bylo nejprve smícháno 18,9 μ l RNA a 0,6 μ l (0,3 μ g) Random Primers (Promega, Madison, WI, USA), celkový objem směsi 19,5 μ l by inkubován při 70°C po dobu 5 minut. Pak byly vzorky zchlazeny (1 min) a následně byla ke každému vzorku přidána směs obsahující 6 μ l RevertAid 5x RT buffer (Fermentas, Vilnius, Litva), 3 μ l 10mM dNTP a 0,75 μ l 40 U/ μ l RNAsin ribonuclease inhibitor (Promega, USA). Takto připravené směsi byly inkubovány při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Jako poslední krok bylo přidáno 150 U (0,75 μ l) RevertAid Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase (Fermentas, Litva) ke každému vzorku. Všechny vzorky o finálním objemu 30 μ l byly následně inkubovány 10 min při pokojové teplotě, pak 42°C - 60 min a 70°C - 10 min. Vzorky cDNA byly skladovány v -20 °C.

Na analýzu změn exprese senescentních markerů *p16* a *p21* a kontrolu genů *GAPDH* a *ACTB* určených k normalizaci byly připraveny reakční směsi pro qPCR tímto způsobem: 2 μ l cDNA, 10 μ l LightCycler 480 Probes Master 2x conc. (Roche, Švýcarsko), 7 μ l LightCycler 480 Probes Master H₂O PCR grade (Roche, Švýcarsko) a 1 μ l FAM-MGB Taqman probe (Thermo Fisher Scientific, USA). Použité Taqman próby jsou uvedeny v Tabulce 10. Fluorescenční signál byl

zachycen během amplifikace v programu: 95 °C - 10 min, 50 amplifikačních cyklů 95°C - 15 s a 60°C - 60 s. Fold change hodnoty - změny v genové expresi *p16* a *p21* byly vypočítány z výsledků qPCR metodou $\Delta\Delta C_t$ (do analýzy byly vloženy průměrné hodnoty 3 technických replikátů), p hodnoty byly zjištěny pomocí t-testu v programu Microsoft Excel. V případě porovnávání věkových skupin myši každému t-testu předcházela f-test, jehož výsledek určil rozptyl dat a tím pádem konečnou formu t-testu. Pokud byl výsledek f-testu $\geq 0,05$, byl proveden t-test s rovností rozptylů. Pokud byl f-test $< 0,05$, byl proveden t-test s nerovností rozptylů. V případě porovnávání změn exprese v časových bodech byl použit párový t-test.

Tabulka 10: Myši fluorescenční próby pro qPCR (Thermo Fisher Scientific).

próba	popis
Mm00494449_m1	Cdkn2a, p16
Mm04205640_g1	Cdkn1a, p21
Mm99999915_g1	GAPDH
Mm00607939_s1	ACTB

3.3.3. Aplikace látek v *in vivo* modelu replikativní senescence

Pro otestování potenciálně senolytických látek, které byly vytipovány v Cíli 1, byl nejprve použit model přirozeného stárnutí - myši C57Bl/6 (ENVIGO, Nizozemsko) starší než 20 měsíců. Myši byly náhodně rozděleny po 6 zvířatech do 4 skupin. Skupiny byly pojmenované podle testované látky (kontrola, S1, S2 a S3).

Experimentální skupiny:

skupina 1	kontrola/K-	ekvivalentní objem roztoku 50% voda / 50% PEG400
skupina 2	S1	15 mg/kg; i.p.
skupina 3	S2	40 mg/kg; i.p.
skupina 4	S3	37,5 mg/kg; i.p.

Z každého zvířete byl pravidelně odebrán vzorek chlupových folikulů způsobem popsaným v Cíli 2. Odběry proběhly (vždy ještě před podáním látek) v D1, D8, D15 a D21 a vzorky byly ihned umístěny do QIAzol roztoku jako iniciální krok přípravy na izolaci RNA, následovala reverzní transkripce a qPCR amplifikace *p16* a *p21* (metodicky dle popsaného v Cíli 2). Látky byly zvířatům podány celkem 10x (1x/den): D1 - D5 a D8 - D12 intraperitoneálně (i.p.) preferenčně do spodního pravého kvadrantu (celkový objem podané látky byl v rozmezí

≤ 40 - 80 ml/kg). Použité dávkování odpovídalo přibližně polovině maximální tolerované dávce stanovené v předchozích experimentech.

3.3.4. Indukce senescence pomocí IR v *in vivo* modelu

K vytvoření zvířecího radiačního modelu senescence bylo ozářeno 10 myší z kmene Balb/cOlaHsd (Envigo, Nizozemsko). U každého zvířete byla vždy ozářena pouze pravá zadní končetina (zbytek těla byl kryt olověným brněním) frakcionovanou dávkou 3 x 8 Gy (D0, D2, D4). Před ozářením byla zvířata uspána pomocí anestézie izofluranem (FORANE inhalation solution, Aesica, Hemel Hempstead, Velká Británie). Zvířata byla ozářena v RS225M Research Cabinet (Xstrahl, Suwanee, GA, USA).

Ze všech zvířat byly odebrány vzorky chlupů, z nichž byla izolována RNA. Z každé myši byly odebrány vždy dva vzorky, jeden z ozářené končetiny a druhý z neozářené (kontrolní). Odběr byl proveden v D0 (před ozářením) a následně v D5, D9, D14, D21, D28 a D35. Následovala reverzní transkripce a qPCR markerů *p16* a *p21* a statistické zhodnocení změn jejich exprese (celý postup metodicky popsán již v Cíli 2).

3.3.5. Aplikace látek v *in vivo* IR modelu senescence

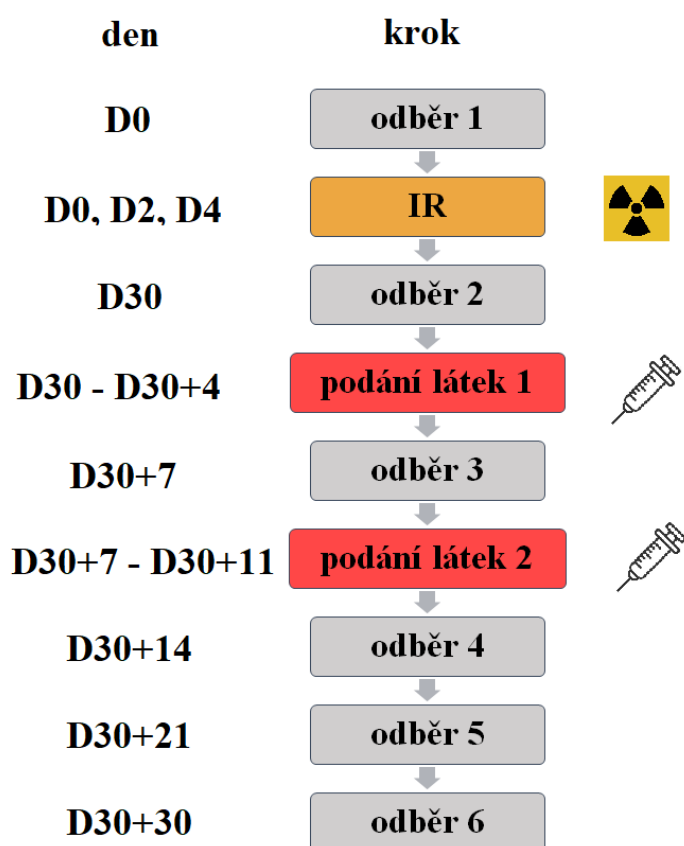
Následně byly otestovány cílové látky i v dalším *in vivo* modelu, a to v umělému IR modelu, jehož indukce byla optimalizována v předchozí podkapitole. K aplikaci látek v IR modelu akcelerovaného stárnutí bylo použito 10 myší/skupinu z kmene Balb/cOlaHsd (Envigo, Nizozemsko) ve věku 13 týdnů. Skupiny byly pojmenované podle testované látky (kontrola, S1, S2 a S3).

Experimentální skupiny:

skupina 1	kontrola/K-	ekvivalentní objem roztoku 50% voda / 50% PEG400
skupina 2	S1	15 mg/kg; i.p.
skupina 3	S2	40 mg/kg; i.p.
skupina 4	S3	37,5 mg/kg; i.p.

Z každého zvířete byl pravidelně odebírán vzorek chlupových folikulů způsobem popsáným v Cíli 2. V každý časový bod bylo celkově odebráno 4 x 10 vzorků chlupů z pravých (IR) končetin. První odběr proběhl ještě před ozářením zvířat (D0), ihned následovalo frakcionované ozářením pravých noh všech zvířat (3 x 8 Gy, metodicky dle předchozí podkapitoly), další odběr

proběhl v D30 (tedy v dobu, kdy byla na základě předchozích výsledků očekávána přítomnost senescentních markerů po IR indukci). Dalším krokem byla aplikace látek celkem 10x (2 x 5 dní, 1x/den) a to v dny: D30+1 až D30+4 a D30+7 až D30+11. Další odběry proběhly v D30+7 (po prvních 5 dávkách a těsně před začátkem druhého kola aplikace látek), D30+14 (po druhém kole aplikací), D30+21 a D30+30. Všechny kroky jsou pro lepší přehlednost shrnuty na Obrázku 18. Vzorčky byly ihned ukládány do QIAzol roztoku na izolaci RNA, následovala reverzní transkripce a qPCR markerů *p16* a *p21* (metodicky dle popsaného v Cíli 2). Látky byly zvířatům podány intraperitoneálně (i.p.) preferenčně do spodního pravého kvadrantu (celkový objem podané látky byl v rozmezí $\leq 40 - 80$ ml/kg). Použité dávkování odpovídalo přibližně polovině maximální tolerované dávce stanovené v předchozích experimentech.



Obrázek 18: Časování odběrů a podání látek v *in vivo* IR modelu. D = den, IR = ozáření.

4. Výsledky

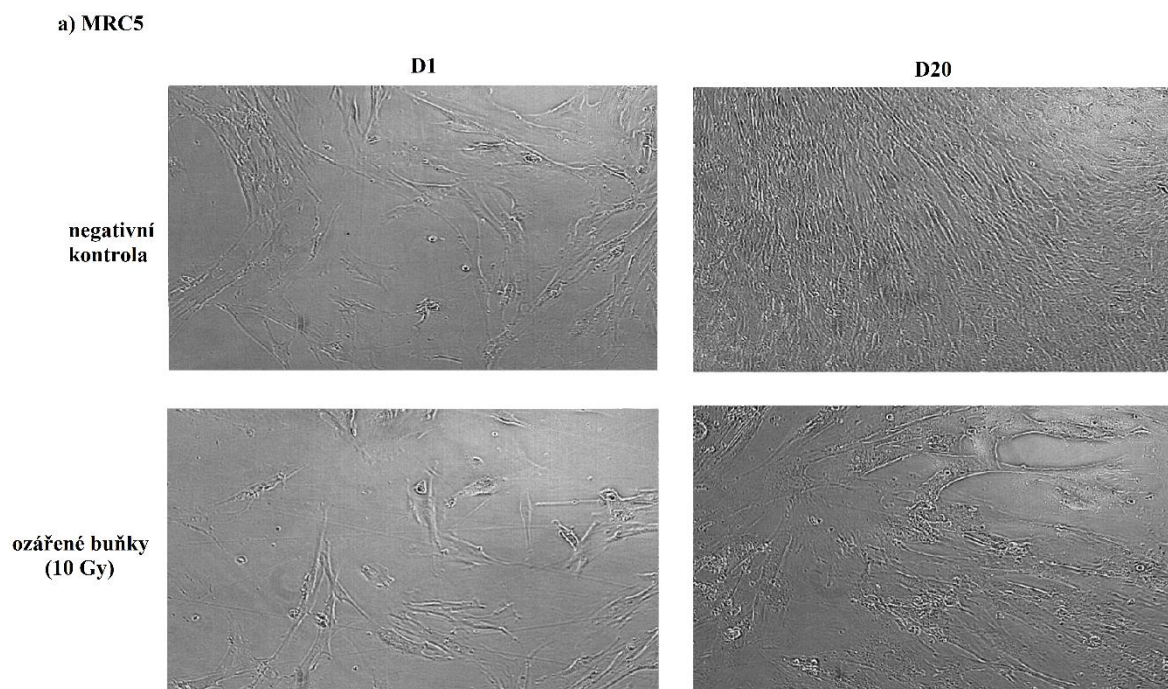
4.1. Cíl 1

Účelem této části předkládané práce byl výběr několika buněčných linií s vhodnou odezvou na indukci senescence pomocí radiace a tím i příprava umělého IR modelu. Celkem 6 linií bylo ozářeno a několik týdnů pravidelně pozorováno z hlediska změny morfologie, jakožto prvotního lehce sledovatelného znaku navození senescence. Na vybraných liniích byly následně otestovány určité markery senescence a především pak řada potenciálních senolytik. Účinek potenciálních senolytických látek byl zhodnocen klasicky pomocí cytotoxického MTS testu, nebo nejpoužívanějšího markeru - aktivity β -galaktosidázy, ale netradičním způsobem, který jsme shledali velmi účinným. K tomuto účelu byla použita konfokální skenovací jednotka s vysoko-obsahovým skrínigovým systémem v kombinaci s analýzou obrazu (SER spot). Zmíněný inovativní způsob testování potenciálních senolytik byl ověřen i na replikativním modelu senescence.

4.1.1. Morfologická odezva buněčných linií na radiaci

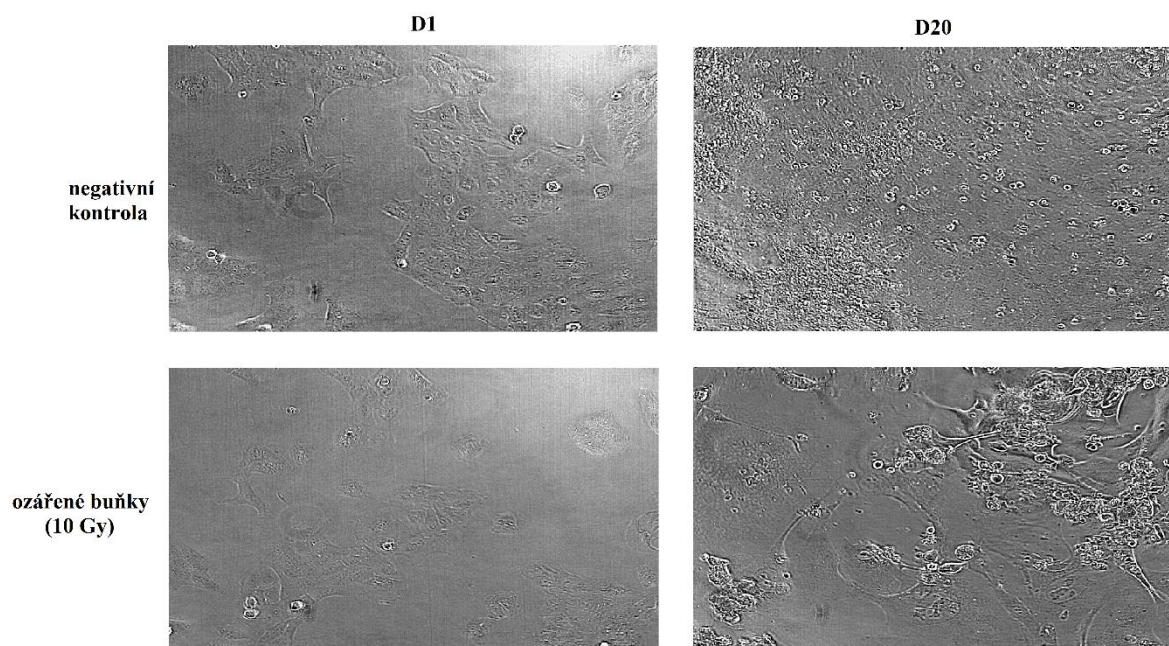
K otestování odezvy buněk na ozáření a navození předčasné senescence byly vybrány linie MRC5, BJ, A549, U2OS, U2OS-53BP1 a HCT116, které byly vysazeny ve více denzitách na jamku. Ideální počet buněk na vysazení u vybraných linií, aby po dobu kultivace nepřerůstaly a zároveň jich bylo dost v každé jamce na analýzu výsledků experimentu, byl u MRC5 3000 buněk/jamku, u U2OS a HCT116 2000 buněk/jamku. Následně byly buňky v panelech ozářeny, resp. negativní kontroly (K-) neozářeny, a sledovány v průběhu 20 dnů. Typická morfologická změna buněk byla nejlépe vyhodnocena v den (D) 20 u linií MRC5, U2OS a HCT116, viz Obrázek 19, na kterém jsou představeny reprezentativní snímky dané kultury. V případě kontrolních desek buněčná kolonie přerůstá, naopak u desek ozářených můžeme sledovat snížený počet buněk společně se změnou tvaru typickou pro senescenci. MRC5 linie po IR obsahovala odumřelé buňky od D13, dále pak projevila morfologické změny od D17, kontrolní buňky MRC5 v jamkách přerostly již během prvního týdne inkubace. U2OS linie na ozáření reagovala apoptózou některých buněk již od D10 v kombinaci s drobnými morfologickými změnami dalších buněk, od D13 již byl pozorován typický senescentní vzhled buněk. Kontrolní U2OS přerostly již v D4. Buňky HCT116 po IR změnilly morfologii v D13, kdy byly pozorovány jak buňky procházející buněčnou smrtí, tak buňky vstupující do senescence, od D17 bylo možné pozorovat již pouze typický fenotyp buněčného stárnutí.

Kontrolní HCT116 přerostly kulturu již v D4. Celkově tedy lze říci, že část populace buněk vybraných linií dosáhne pro senescenci typických morfologických změn od D17, resp. D13. Kontrolní linie bez pasážování přerůstají jamky již po 4 dnech od vysazení. Tento trend byl pozorován u buněčných linií vysazených jak v 96-, tak 384-jamkových panelech o různých koncentracích. Pro další experimenty bylo tedy možné využít 384-jamkových panelů, čímž se zvýšila propustnost testování.

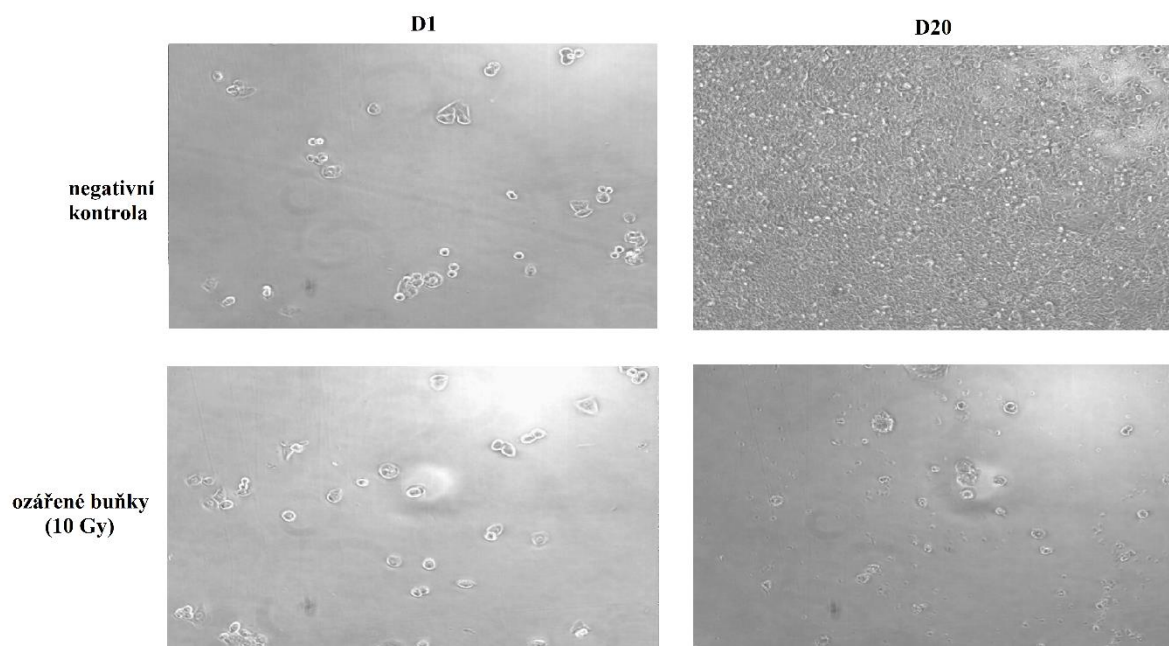


Obrázek 19: Indukce senescence radiací u vybraných linií - změna buněčné morfologie.

b) U2OS



c) HCT116

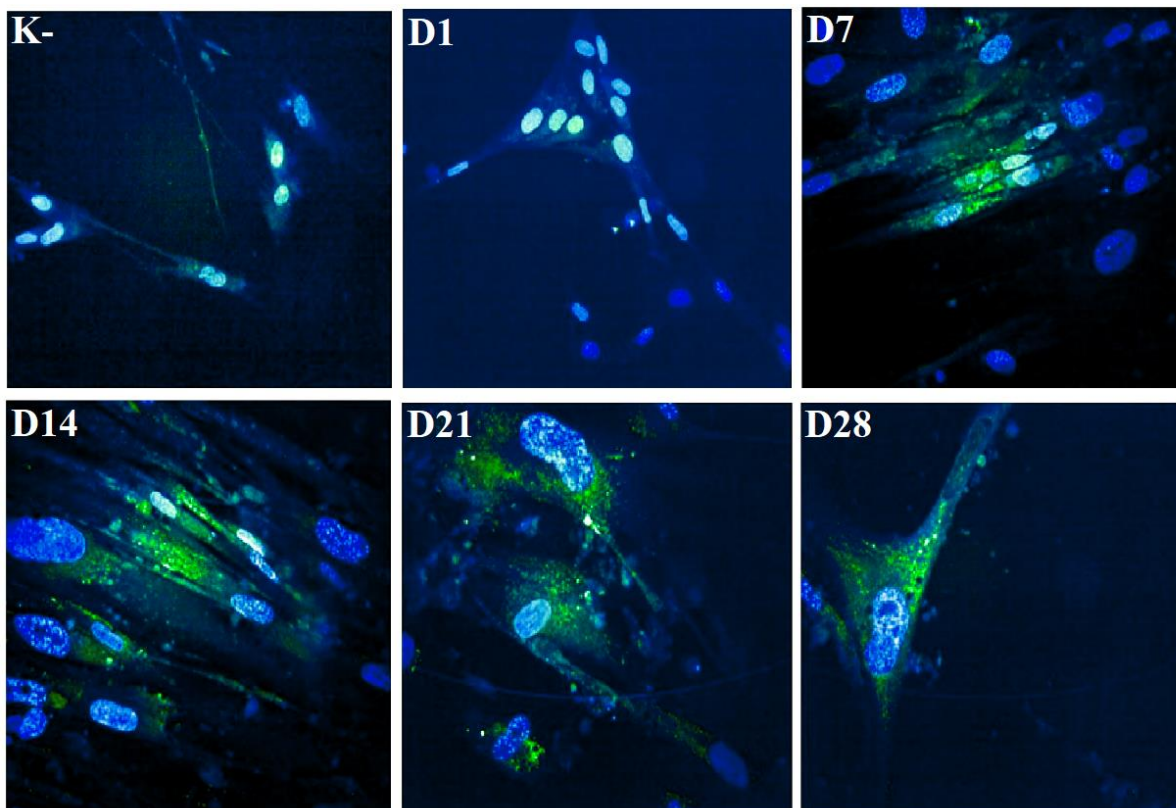


Obrázek 19: Indukce senescence radiací u vybraných linií - změna buněčné morfologie (pokračování).

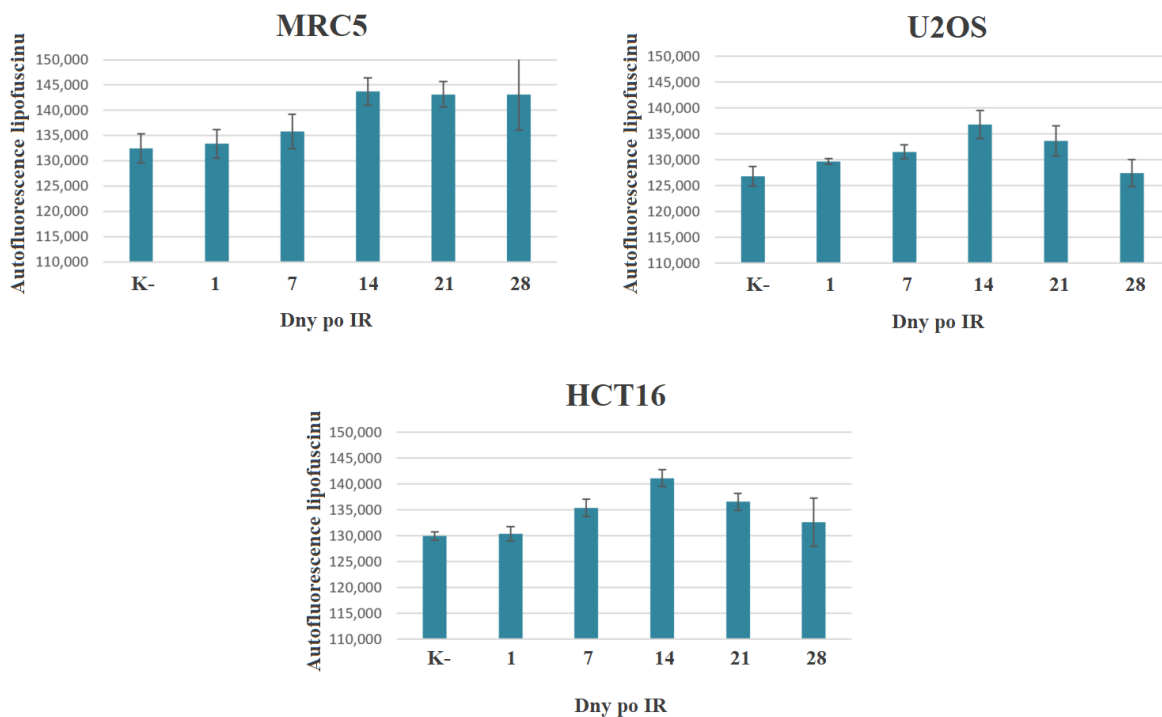
4.1.2. Vizualizace lipofuscinu v senescentních buňkách

Lipofuscin (resp. jeho autofluorescence) byl vizualizován v cytoplazmě senescentních a kontrolních MRC5 buněk (pozorování fluorescence bylo nejjednodušší u MRC5 díky jejich velikosti, U2OS a HCT116 mají mnohem menší plochu cytoplazmy). Použití kombinace excitace 405 nm + emise 445/45 nm, resp. emise 595/40 vedlo k získání nedostatečného signálu, který se nelišil u senescentních a kontrolních buněk, ani v průběhu experimentu. Užití kombinace excitace 488 nm + emise 460/80 nevedla k žádnému signálu. Nejlepší výsledky a rozdíly v intenzitě autofluorescence lipofuscinu v K- a IR buňkách byly sledovány při užití excitace 488 nm + emise 540/40 nm, resp. 620/70 nm, což koresponduje s dostupnou literaturou [229]. Na Obrázku 20 je reprezentativní ilustrace postupné akumulace lipofuscinu při pozorování jeho autofluorescence u IR buněk MRC5 linie. Grafy shrnující autofluorescenci lipofuscinu u MRC5, U2OS a HCT116 v průběhu 4 týdnů po ozáření naznačují lineárně se zvyšující míru signálu u MRC5 až do D21, u U2OS a HCT116 do D14 (Obrázek 21). Příklad vizualizace lipofuscinu po chromogenním barvení SBB je na Obrázku 22.

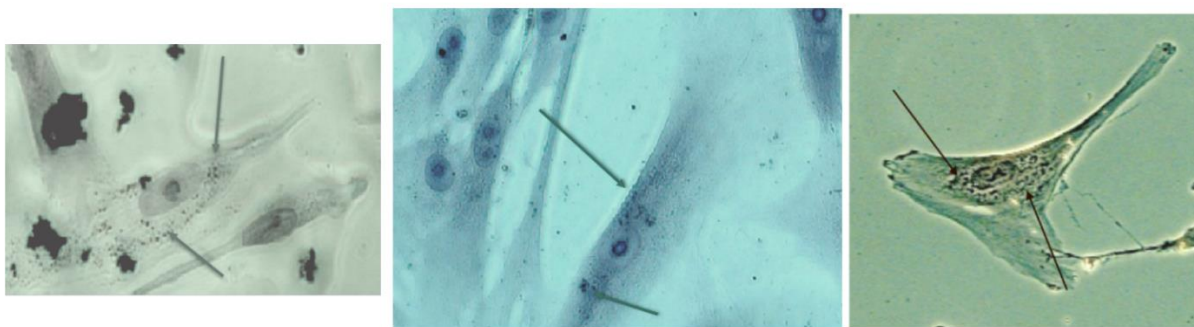
Rozdíly v autofluorescenci lipofuscinu v průběhu měření sice vidět jsou, ale nejsou statisticky významné a dokonce se zdá, že po určitém čase dochází opět k poklesu jejich intenzity, resp. zřejmě k znehodnocení tohoto typu analýzy. A to především vzhledem k nahromadění takového množství lipofuscinu, že během obrazové analýzy nedochází k preciznímu rozlišení granul a tím pádem není přesná i celková suma jejich fluorescence. Ještě by bylo možné nastavit analýzu tak, aby počítala celkovou fluorescenci v cytoplazmě buňky, to ale přináší současně jiný problém - vzhledem ke změnám morfologie buněk během přechodu do stádia senescence, tedy ke zvětšování plochy buňky, by nastala potíž s přepočtem celkové fluorescence na jednotku plochy cytoplazmy a opět by došlo k nežádoucímu ovlivnění analýzy. Navíc lipofuscin nemusí být jedinou strukturou v buňce, která bude v daný okamžik autofluoreskovat. Z těchto důvodů měření autofluorescence lipofuscinu (a lipofuscin jako marker) nebylo dále používáno k testování senolytického účinku látek, pouze zde slouží k doplnění celkového obrazu o průběhu experimentu.



Obrázek 20: Nástup senescence dle akumulace lipofuscinu u MRC5 po IR 10 Gy. 3000 buněk/jamku v 384-jamkovém panelu. Použita kombinace vlnových délek excitace 488 nm a emise 540/40 nm (40x, fluorescenční mikroskopie). Jádra jsou podbarvená barvivem Hoechst 33342.



Obrázek 21: Autofluorescence lipofuscinu v čase po ozáření buněk vyhodnocená pomocí obrazové analýzy Columbus. Excitace 488 nm a emise 540/40 nm (fluorescenční mikroskopie).

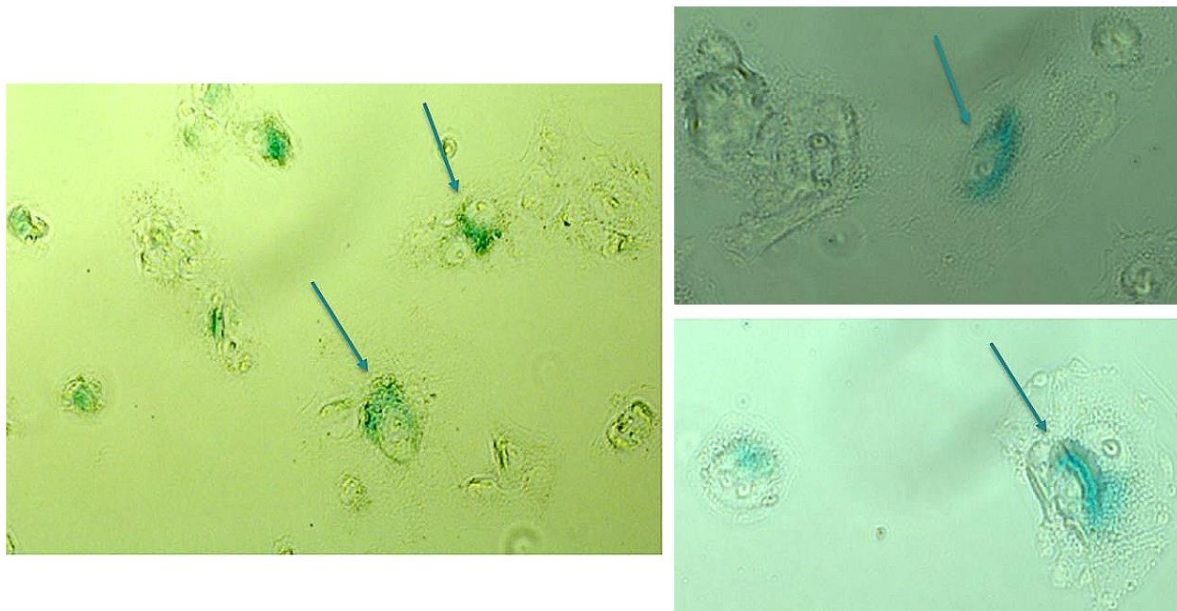


Obrázek 22: Lipofuscin obarvený SBB v senescentních MRC5 buňkách po IR 10 Gy. Šipky ukazují do míst akumulace obarveného lipofuscinu v senescentních MRC5 buňkách (100x, světelná mikroskopie).

4.1.3. SA- β -galaktosidázová aktivita v senescentních buňkách

Jako další ukazatel senescence v modelové buněčné linii byla vizualizovaná aktivita typického senescentního markeru β -galaktosidázy pomocí klasického protokolu za použití v laboratoři připravených roztoků reagentů. Příklad je na Obrázku 23. Vzhledem k tomu, že dnešní trh

nabízí širokou škálu kitů na barvení SA- β -gal, které jsou jednoduché a mnohem méně pracné, pro další testování látek ve velkém množství a pro zlepšení reprodukovatelnosti experimentů byl vybrán Senescence β -Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling Technology, USA)



Obrázek 23: Detekce SA- β -galaktosidázové aktivity v senescentních MRC5 buňkách. Šipky ukazují do míst detekované aktivity SA- β -gal v senescentních MRC5 buňkách (vlevo 40x, vpravo 100x, světelná mikroskopie).

4.1.4. Testování senolytické aktivity chemických sloučenin *in vitro*

Na akcelerovaném radiačním (10 Gy) modelu senescence byla otestována vybraná skupina sloučenin. Soubor těchto testovaných látek byl vybrán tak, aby obsahoval sloučeniny se známou senolytickou aktivitou, dále pak látky, které byly identifikovány s potenciální senolytickou aktivitou v našich předchozích experimentech, a také sloučeniny, které jsme na základě publikovaných prací z preferenční toxicitě vůči stárnoucím buňkám podezírali. IC₅₀ hodnoty vypočítané z absorbancí po cytotoxickém MTS testu jsou uvedeny v Tabulce 11 (pozn. nově nasyntetizované a dosud neznámé látky jsou anonymizovány pod číselnými kódy z důvodu plánované ochrany duševního vlastnictví). Quercetin, dasatinib, kombinace D+Q a MCOPPB byly již dříve identifikovány jako senolytika [158,175] a v tomto experimentu se tak také projeví, resp. Jistým způsobem posloužily jako pozitivní kontroly. Hodnoty IC₅₀ v případě buněčné linie MRC5 naznačují senolytický efekt u quercetinu a MCOPPB. V případě linií U2OS a HCT116 se takto projeví všechna 4 publikovaná senolytika. Z tohoto pohledu by se

dalo říci, že je možné tento systém využít k identifikaci senolyticky působících látek. Z 15 testovaných látek vyšly jako senolytické 5 u MRC5, 8 u U2OS a 5 u HCT116.

Tabulka 11: IC₅₀ hodnoty potenciálně senolytických látek v modelu radiačně indukované senescence (10 Gy), nebo na kontrolních neozářených buňkách (K-).

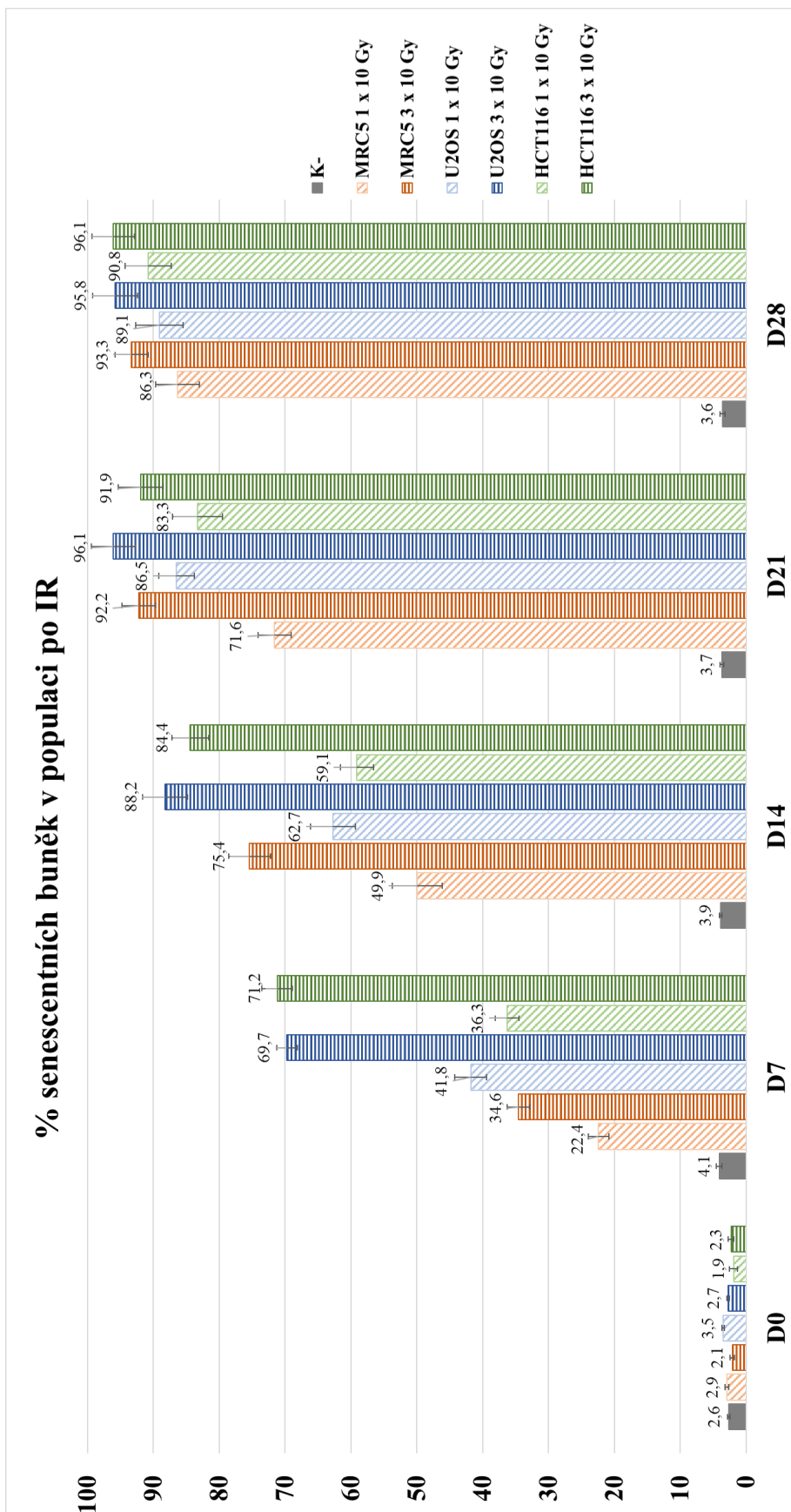
látka	hodnoty IC ₅₀ (μM)					
	MRC5		U2OS		HCT116	
	10 Gy	K-	10 Gy	K-	10 Gy	K-
quercetin	10,77	16,2	29,75	>50	21,63	>50
dasatinib	42,92	25,92	1,24	8,02	0,95	18,55
D+Q	44,42	19,53	1,3	5,15	1,78	20,51
MCOPPB	6,55	8,33	7,43	45,27	35,42	48,28
CP-31398	11,11	39,66	11,61	>50	>50	>50
CP-100356	>50	7,99	8,47	>50	46,91	28,87
dequalinium chlorid hydrát	1,88	1,37	11,82	0,01	3,57	0,13
daurisolone	6,98	10,82	>50	>50	6,61	21,49
decyltrimethylammonium bromid	10,42	2,58	27,77	>50	>50	>50
9-aminoakridin hydrochlorid monohydrát	14,18	6,25	11,47	1,91	10,6	1,75
valsopodar	8,4	7,55	10,4	>50	7,85	>50
BMH-21	>50	7,05	1,66	4,31	14,27	0,38
1-hexyl-4-amino-2-methylquinolinium	0,92	0,1	0,5	>50	3,55	>50
C1	22,54	11,78	>50	16,33	>50	15,43
loperamid hydrochlorid	>50	>50	19,2	27,07	18,83	24,28
C2	16,33	>50	15,83	>50	13,13	>50
S1	14,99	>50	9,07	0,08	6,56	0,09
S3	4,22	>50	5,79	0,6	8,27	0,13
C3	>50	>50	>50	>50	>50	>50
C4	>50	>50	>50	>50	>50	>50
C5	>50	>50	>50	>50	>50	>50

Výsledky MTS testu. 10 Gy = buňky s indukovanou senescencí pomocí IR, K- = kontrolní buňky/neozařené. Zeleně jsou vyznačeny IC₅₀ hodnoty nižší pro populaci senescentních buněk než pro populaci parentální, tzn. látka má potenciálně senolytický efekt.

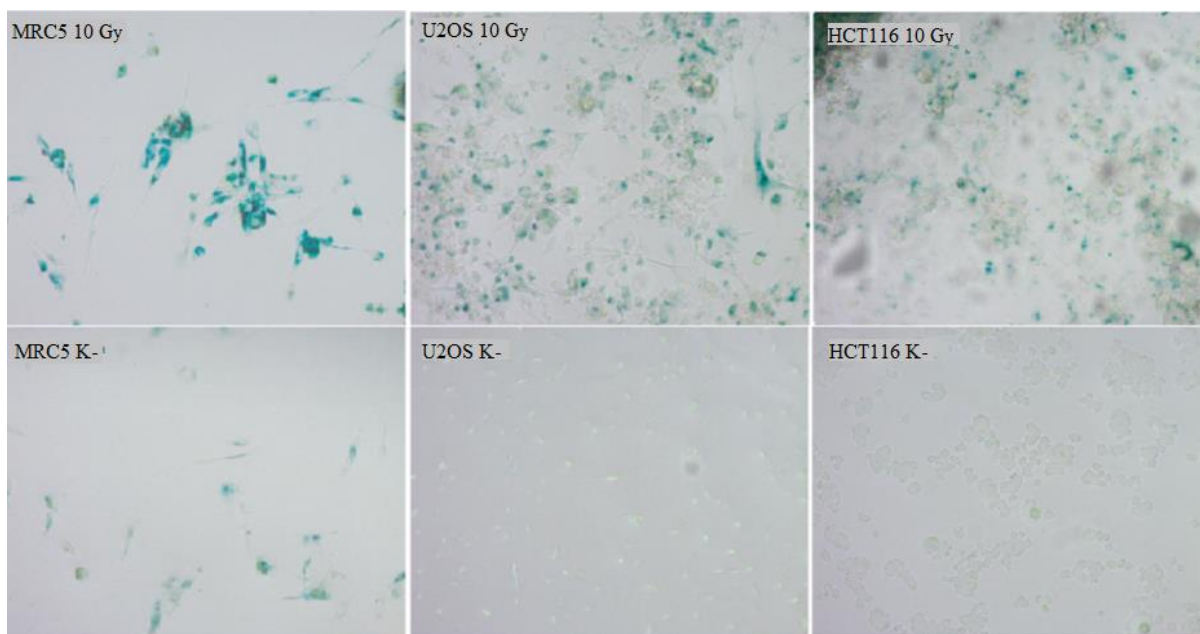
4.1.5. SER spot analýza SA-β-galaktosidázové aktivity

Pro zhodnocení potenciálního senolytického působení dalších testovaných látek byla úspěšně optimalizována SER spot analýza v systému analýzy obrazu Columbus. Možnost jejího využití pro vizualizaci senescentního markeru β-gal byla potvrzena srovnáním akcelerovaného modelu senescence po IR 10 Gy vs. 3 x 10 Gy a to u všech třech testovaných linií. Výsledky analýzy

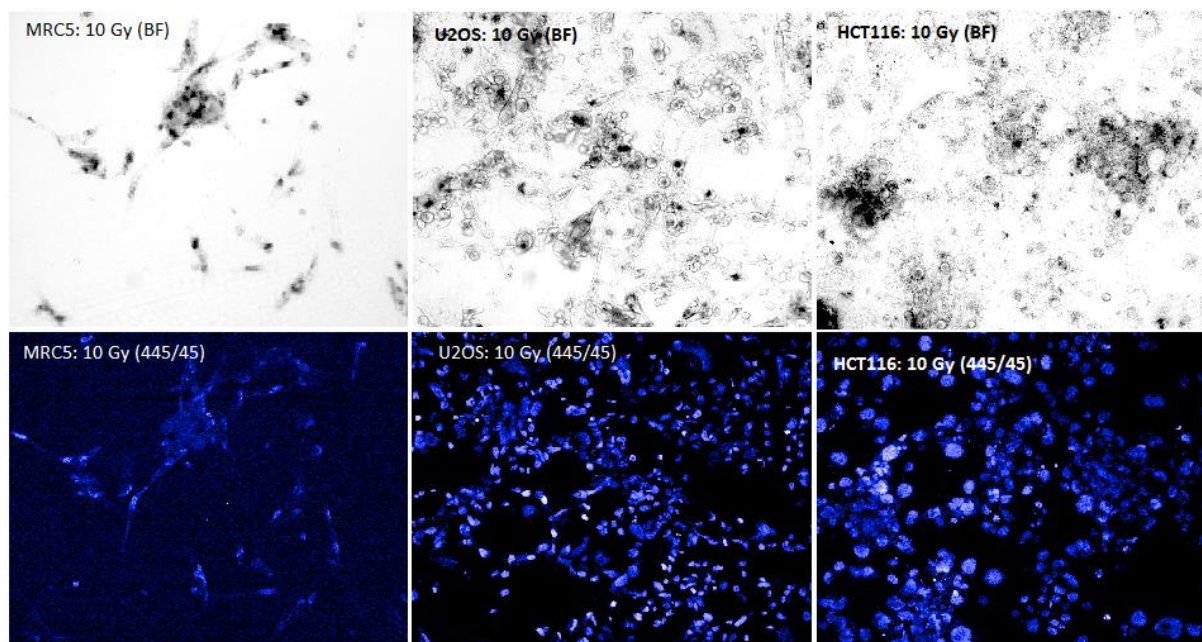
obrazu naznačují rychlejší a silnější fenotypový projev senescence u všech linií po ozáření frakcionovanou dávkou, pro lepší názornost jsou data zobrazena v grafu (Obrázek 24). Na Obrázku 25 je srovnání barvení SA- β -galaktosidázové aktivity pomocí kitu všech linií (IR vs. kontrolní), reprezentativní ukázka snímků pro SER spot analýzu je na Obrázku 26. Snímky byly pořízeny automatickým skenováním na CV7000S (BF + Hoechst 445/45, zvětšení 20x v režimu světelné mikroskopie).



Obrázek 24: Nástup senescence podle SA- β -gal markeru po IR 1 x 10 Gy vs. 3 x 10 Gy. D = dny po IR. Uvedené hodnoty vyjadřují průměrné procentuální zastoupení senescentních buněk \pm SD.



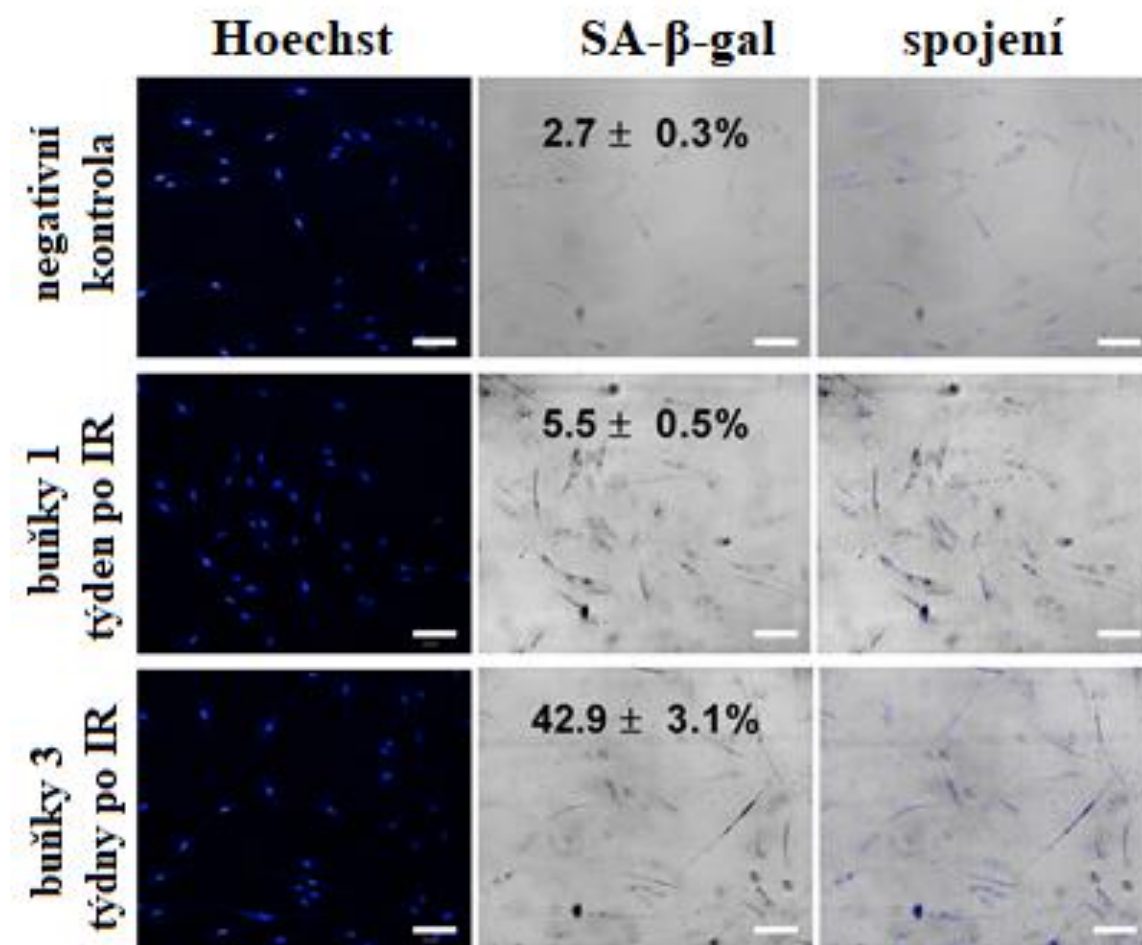
Obrázek 25: Ukázka barvení SA-β-galaktosidázové aktivity pomocí komerčního kitu (Senescence β-Galactosidase Staining Kit, Cell Signaling, #9860). Srovnání barvení SA-β-galaktosidázové aktivity vybraným kitem u IR a K- buněčné populace. BF, 20x.



Obrázek 26: Snímky pro SER spot analýzu po barvení SA-β-gal u senescentních buněk. Senescentní buňky akcelerovaného modelu po IR. BF a Hoechst 445/45 (20x, světelná a fluorescenční mikroskopie).

Takto optimalizovanou SER spot analýzu je možné uplatnit pro analýzu obrazu senescentních buněk po SA-β-gal barvení v různých experimentech. Analýza pomohla i k úspěšné

kvantifikaci senescentních BJ buněk v 2D kultuře (Obrázek 27, upraveno z Přílohy 3). Takto připravený model posloužil ke stanovení vlivu normálních a senescentních (s tlustým stářím neasociovaných) fibroblastů včetně jejich kondiciovaných médií na odpověď kolorektálního karcinomu na AZA a DAC terapii. Bylo potvrzeno, že fibroblasty akcelerují buněčnou proliferaci a různě ovlivňují expresi enzymů regulujících DNA metylaci, což zvyšuje demethylaci indukovanou DAC v buňkách kolorektálního karcinomu. Naopak kondiciované médium senescentních buněk, které zvyšuje aktivitu NF- κ B, změnilo hladinu deoxycytidin kinázy v neléčených buňkách kolorektálního karcinomu a zrušilo účinek DAC na degradaci DNA methyltransferázy 1 [57].



Obrázek 27: Indukce senescence v BJ buňkách pro SER spot analýzu. Reprezentativní obrázky postupné indukce senescence v kultuře BJ fibroblastů pomocí IR. Buněčná jádra podbarvena Hoechst 33342 roztokem a β -galaktosidázová aktivita zachycena u neozařených a ozářených (1, resp. 3 týdny po IR) buněk. Prostřední sloupec v panelu uvádí i procentuální zastoupení senescentních buněk v kultuře (průměr \pm SD). Zvětšení 20x, měřítko 100 μ m, kombinace světelné a fluorescenční mikroskopie. Pozměněno z Přílohy 3.

4.1.6. Určení senolytické aktivity látek ze SER spot analýzy

Pro všechny otestované látky byla vypočítána p hodnota (statisticky významný rozdíl vždy souvisel se snížením počtu senescentních buněk po ošetření určitou látkou oproti buňkám v kontrolních jamkách, kam látky přidány nebyly, nikdy ne naopak). Nově nasyntetizované a dosud neznámé látky jsou anonymizovány pod číselnými kódy z důvodu plánované ochrany duševního vlastnictví. U konzistentních a opakujících se výsledků bylo pro upřesnění vlivu látek spočítáno průměrné zastoupení senescentních buněk (% senescentních buněk z celkové populace) \pm SD a překontrolován statisticky významně neměnný počet proliferujících buněk (data neuvedena). V Tabulce 12 je uvedeno 5 látek (S1-S5), které dosáhly vysoké reprodukovatelnosti výsledků ve všech opakováních. Látky S1, S2 a S3 poskytly velmi konzistentní data a účinnost byla potvrzena i při velmi nízkých koncentracích u všech 3 testovaných linií. Tabulka 13 potom vyzdvihuje shody výsledků testovaných látek napříč 3 použitými buněčnými liniemi. Vzhledem k chování dnes známých senolytik je zřejmé, že senolyticky působící látky nemají stejný účinek na všechny buněčné linie vycházející z různých tkání [158,230].

P hodnota všech ostatních testovaných látek je uvedena v rozsáhlé Tabulce 1 v Suplementu, v tomto případě dále procentuální zastoupení senescentních buněk doplněno není. Tabulka 2 v Suplementu porovnává výsledky MTS a β -gal testů u několika málo látek, které byly otestovány v obou experimentech. Průměrná shoda obou testů je $58,9 \pm 11,7$ %. Vzhledem k rozsáhlé optimalizaci použití SER spot analýzy se nabízí přiložit větší váhu k výsledkům právě z tohoto typu testování, jehož validita byla nakonec potvrzena pomocí výsledků z *in vivo* experimentů.

Tabulka 12: Přehled velmi významných výsledků senolytické aktivity vybraných látek.

MRC5				
látka	koncentrace (uM)	p hodnota	průměrné % zastoupení senescentních buněk	SD (%)
S1	50	0,003856	45,593	6,232
	12,5	0,004490	41,498	5,943
	3,125	0,007144	59,486	4,121
	0,78125	0,023858	57,158	5,410
	0,1953125	0,025650	55,656	2,472
	0,048828125	0,014679	58,724	4,469
	0,012207031	0,190536	74,517	0,993
S2	50	0,005051	32,421	21,048
	12,5	0,003464	40,898	16,826
	3,125	0,003632	61,397	1,602
	0,78125	0,003367	65,098	5,142
	0,1953125	0,012596	62,706	4,803
	0,048828125	0,016286	63,588	9,228
	0,012207031	0,065474	77,658	16,694
S3	50	0,003180	52,526	0,117
	12,5	0,002672	66,169	6,704
	3,125	0,003676	68,135	7,261
	0,78125	0,004209	65,483	26,667
	0,1953125	0,011932	62,143	18,220
	0,048828125	0,009505	65,631	4,723
	0,012207031	0,010753	68,235	0,729
S4	50	0,001381	49,143	1,475
	12,5	0,033360	56,268	4,911
	3,125	0,034261	59,741	3,687
	0,78125	0,024364	64,175	9,176
	0,1953125	0,017066	65,487	3,945
	0,048828125	0,206807	70,148	1,487
	0,012207031	0,593696	72,641	3,843
S5	50	0,002556	38,172	6,385
	12,5	0,030273	60,191	12,175
	3,125	0,658165	68,347	4,168
	0,78125	0,057930	74,814	14,647
	0,1953125	0,111949	70,443	0,981
	0,048828125	0,213708	71,473	3,895
	0,012207031	0,327535	75,914	9,189
kontrola	0		72,595	5,205

Červeně jsou zvýrazněny p hodnoty značící statisticky signifikantní rozdíl mezi počtem senescentních buněk po ošetření konkrétní látkou a buňkami neošetřenými/kontrolními.

Tabulka 12: Přehled velmi významných výsledků senolytické aktivity vybraných látek (pokračování).

U2OS				
látka	koncentrace (uM)	p hodnota	průměrné zastoupení senescentních buněk (%)	SD (%)
S1	50	0,003082	6,514	2,038
	12,5	0,005377	1,872	0,748
	3,125	0,005855	1,917	0,247
	0,78125	0,004730	1,190	0,087
	0,195313	0,016086	1,038	0,444
	0,048828	0,007452	2,148	0,364
	0,012207	0,008730	2,474	0,947
S2	50	0,001457	25,622	24,921
	12,5	0,001601	19,704	14,179
	3,125	0,002962	13,345	6,017
	0,78125	0,005468	2,986	1,171
	0,195313	0,827744	81,926	10,994
	0,048828	0,070743	74,033	13,162
	0,012207	0,537054	79,372	8,343
S3	50	0,000006	1,765	0,789
	12,5	0,000009	1,798	1,008
	3,125	0,000011	1,991	0,901
	0,78125	0,000086	2,647	1,027
	0,195313	0,006305	3,648	1,174
	0,048828	0,018850	9,745	5,546
	0,012207	0,310185	81,382	12,530
S4	50	0,003641	15,178	5,774
	12,5	0,999976	82,169	7,150
	3,125	0,893034	78,647	12,144
	0,78125	0,999981	80,749	10,255
	0,195313	0,987144	86,318	11,647
	0,048828	0,999959	81,566	3,565
	0,012207	0,999560	80,657	6,644
S5	50	0,107428	79,565	1,554
	12,5	0,999990	82,387	4,185
	3,125	0,429491	81,567	10,113
	0,78125	0,975231	83,675	7,576
	0,195313	0,674721	80,647	3,588
	0,048828	0,998879	78,659	3,565
	0,012207	0,987962	79,447	2,579
kontrola	0		79,091	4,897

Červeně jsou zvýrazněny p hodnoty značící statisticky signifikantní rozdíl mezi počtem senescentních buněk po ošetření konkrétní látkou a buňkami neošetřenými/kontrolními.

Tabulka 12: Přehled velmi významných výsledků senolytické aktivity vybraných látek (pokračování).

HCT116

látka	koncentrace (uM)	p hodnota	průměrné zastoupení senescentních buněk (%)	SD (%)
S1	50	0,000167	1,956	1,004
	12,5	0,000593	1,354	0,351
	3,125	0,001214	9,710	3,213
	0,78125	0,002175	6,332	4,644
	0,195313	0,999986	78,746	5,618
	0,048828	0,895252	77,325	12,258
	0,012207	0,989488	86,448	1,201
S2	50	0,012864	9,836	7,518
	12,5	0,012980	6,375	1,332
	3,125	0,013879	10,044	2,497
	0,78125	0,016453	5,819	0,450
	0,195313	0,171052	42,437	34,871
	0,048828	0,485049	79,598	6,083
	0,012207	0,999916	71,103	7,633
S3	50	0,000787	2,983	2,047
	12,5	0,009339	6,318	1,041
	3,125	0,026143	5,485	1,972
	0,78125	0,012883	6,624	0,553
	0,195313	0,851701	76,783	6,262
	0,048828	0,602493	78,259	6,835
	0,012207	0,974621	77,240	3,501
S4	50	0,005702	3,125	1,085
	12,5	0,913653	83,542	7,766
	3,125	0,686022	76,846	5,953
	0,78125	0,999594	72,240	9,118
	0,195313	0,996184	77,741	6,160
	0,048828	0,999964	72,325	13,115
	0,012207	0,951382	87,433	1,721
S5	50	0,005161	2,456480	0,917
	12,5	0,982069	75,741	6,597
	3,125	0,281655	80,539	7,065
	0,78125	0,983853	80,746	6,982
	0,195313	0,999998	77,123	11,115
	0,048828	0,996569	85,325	1,221
	0,012207	1,000000	86,250	1,129
kontrola	0		73,396	21,437

Červeně jsou zvýrazněny p hodnoty značící statisticky signifikantní rozdíl mezi počtem senescentních buněk po ošetření konkrétní látkou a buňkami neošetřenými/kontrolními.

Tabulka 13: Shody výsledků β -gal + SER spot testu u 3 buněčných linií.

látka	koncentrace (uM)	buněčná linie		
		MRC5	U2OS	HCT116
S1	50	+	+	+
	12,5	+	+	+
	3,125	+	+	+
	0,78125	+	+	+
	0,1953125	+	+	-
	0,048828125	+	+	-
	0,012207031	-	+	-
S2	50	+	+	+
	12,5	+	+	+
	3,125	+	+	+
	0,78125	+	+	+
	0,1953125	+	-	-
	0,048828125	+	-	-
	0,012207031	-	-	-
S3	50	+	+	+
	12,5	+	+	+
	3,125	+	+	+
	0,78125	+	+	+
	0,1953125	+	+	-
	0,048828125	+	+	-
	0,012207031	+	-	-
S4	50	+	+	+
	12,5	+	-	-
	3,125	+	-	-
	0,78125	+	-	-
	0,1953125	+	-	-
	0,048828125	-	-	-
	0,012207031	-	-	-
S5	50	+	-	+
	12,5	+	-	-
	3,125	-	-	-
	0,78125	-	-	-
	0,1953125	-	-	-
	0,048828125	-	-	-
	0,012207031	-	-	-

Zeleně jsou vyznačeny shody pozitivních výsledků u všech 3 linií, oranžově jsou vyznačeny shody negativních výsledků.

4.1.7. Potvrzení senolytického účinku na modelu replikativní senescence

I pro tento model senescence byla nejprve otestována funkčnost SER spot analýzy - bylo vypočítáno procentuální zastoupení buněk v senescenci v kultuře buněk MRC5 ve 3 různých pasážích (p.), získaná data korespondují s očekávaným výsledkem. Zastoupení senescentních buněk v kultuře MRC5 p. 16 = $4,12 \pm 0,94$ %, MRC5 p. 34 = $12,96 \pm 4,28$ % a MRC5 p. 46 = $86,35 \pm 1,61$ %.

K ověření senolytického efektu byly vybrány nejlépe hodnocené látky z předchozího kroku a to: S1-S5; následně otestovány v paralelní kultivaci MRC5 p. 46 versus p. 16. Získané velmi konzistentní výsledky jsou shrnuty pomocí p hodnoty a rozdílu v počtu senescentních buněk (%) s a bez ošetření určitou látkou (Tabulka 14).

Vzhledem ke všem uvedeným výsledkům SER spot analýz byly látky S1, S2 a S3 vybrány pro další testování a pokračování v experimentu *in vivo*.

Tabulka 14: Výsledky β -gal + SER spot analýzy na modelu replikativní senescence.

látka	koncentrace (μ M)	p hodnota	průměrné zastoupení senescentních buněk (%)	SD (%)
S1	50	0,000300	21,852	2,619
	12,5	0,019388	31,465	3,651
	3,125	0,011652	30,264	4,670
	0,78125	0,020808	41,634	14,403
	0,1953125	0,511681	60,727	6,600
	0,048828125	0,139393	66,490	3,257
	0,012207031	1,000000	78,503	7,673
S2	50	0,000223	21,020	1,443
	12,5	0,014638	20,721	2,970
	3,125	0,010814	30,007	8,177
	0,78125	0,010632	29,968	0,719
	0,1953125	0,026774	32,167	9,506
	0,048828125	0,039749	33,138	0,639
	0,012207031	0,321035	76,983	13,085
S3	50	0,000241	8,775	0,101
	12,5	0,004025	39,669	2,796
	3,125	0,001930	38,142	3,307
	0,78125	0,014202	42,326	0,017
	0,1953125	0,000728	36,112	0,427
	0,048828125	0,034521	44,264	8,738
	0,012207031	0,322767	79,889	8,681
S4	50	0,000641	43,315	0,648
	12,5	0,009590	47,221	5,094
	3,125	0,435196	5,564	6,214
	0,78125	0,976268	71,716	2,426
	0,1953125	0,292370	78,603	1,713
	0,048828125	0,055825	73,890	5,812
	0,012207031	0,143838	76,441	9,108
S5	50	0,001704	30,694	0,982
	12,5	0,029832	38,871	12,545
	3,125	0,199959	65,052	17,997
	0,78125	0,520644	67,753	9,877
	0,1953125	0,929009	63,492	8,702
	0,048828125	0,310684	76,749	8,993
	0,012207031	0,706761	80,802	8,415
kontrola	0		78,407	6,278

Červeně jsou zvýrazněny p hodnoty značící statisticky signifikantní rozdíl mezi počtem senescentních buněk po ošetření konkrétní látkou a buňkami neošetřenými/kontrolními.

4.2. Cíl 2

Obsahem této části práce byla demonstrace odběru myších chlupů a následně i uvedení možností jejich uplatnění ve výzkumu jako velmi slibného biologického materiálu mimo jiné i ve studiu senescence.

4.2.1. Úspěšnost odběru myších chlupů

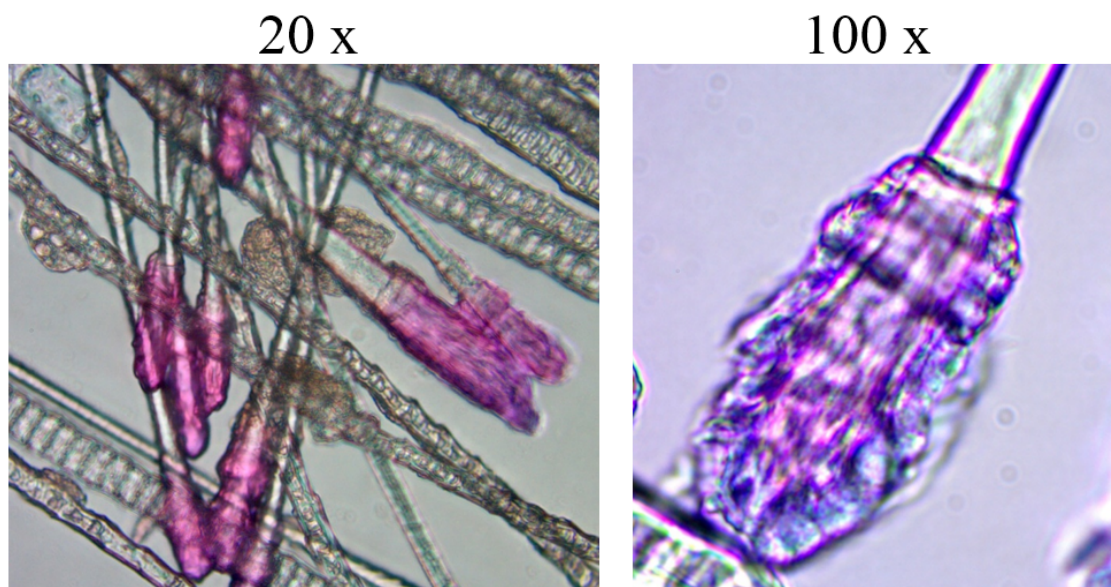
Po nasátí trsu myších chlupů mezi menší a větší špičku zařízení bylo možné stisknutím spouště získat chlupy uchycené mezi špičkami, lehkým trhnutím bylo jednoduše možné chlupy vytrhnout z kůže. Zhruba 200 myších chlupů lze získat jedním odběrem provedeným tímto způsobem. Každý myší chlup obsahuje cca 50 folikulárních buněk. Jednorázové kleště tvořené plastovými špičkami umožňují jednoduchou manipulaci a okamžité zpracování vzorků fixací nebo lýzou. Celý proces je jednoduchý a rychlý, svým provedením zamezuje kontaminaci vzorků mezi sebou nebo přenosem z rukou manipulátora. Velkou výhodou této metody odběru je její neinvazivnost, možnost mnoha opakovaných odběrů, odběrů z více míst na těle zvířete a především způsobení minimálního stresu experimentálním zvířatům. Metoda je použitelná i pro odběr vlasových/chlupových folikulů u jiných zvířat a také u lidí.

4.2.2. Výťažnost izolace DNA a RNA z myších chlupů

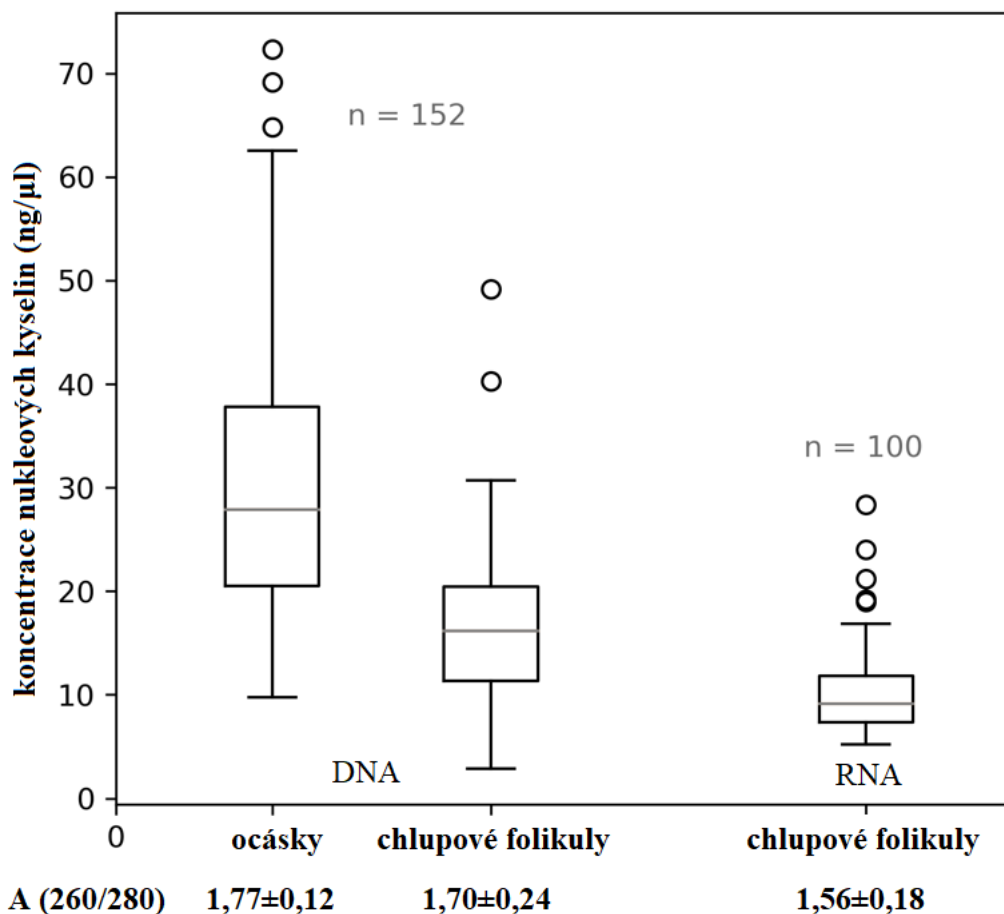
Chlupové folikuly jsou morfologicky intaktní a mohou být jednoduše rozpoznány a vyšetřovány pomocí mikroskopie (ilustrační Obrázek 28).

Odebrané vzorky chlupových folikulů je možné skladovat v suchém stavu nebo v příslušném médiu. Izolací RNA z trsů chlupových folikulů (n=100) bylo získáno průměrně 275 ng v 30 μ l roztoku, tzn. 9,16 ng/ μ l. Extrakce DNA z chlupů (n=152) byla také úspěšná, bylo izolováno průměrně 486 ng, tzn. 16,2 ng/ μ l, což je sice méně než poskytuje izolace z klasicky odebraného materiálu (biopsie ocásků, n= 152) 846 ng, tzn. 28,2 ng/ μ l, ale stále izolace RNA i DNA poskytla dostatečný výtěžek k dalšímu úspěšnému použití. Kvalita izolovaných nukleových kyselin byla zjištěna pomocí poměrů absorbance A260/280. Kvalita RNA byla navíc doplněna měřením integrity (RIN) na Agilent Bioanalyzer 2100, zjištěná RIN hodnota byla vždy nad 8, což indikuje přítomnost RNA o vysoké kvalitě bez známek degradace. Proto je možné hodnotit kvalitu i kvantitu izolovaných nukleových kyselin jako velmi úspěšnou, jak je uvedeno na Obrázku 29, a vhodnou pro další experimenty. Navíc není potřeba pro zpracování vzorků zařazovat žádné speciální kroky jako homogenizace materiálu pro účely izolace nebo krájení

řezů pro mikroskopickou analýzu. Materiál může být sbírán a zpracován opakovaně během krátkého časového intervalu a ve velkém množství.



Obrázek 28: Reprezentativní obrázky chlupů po barvení dle Giemsy (zvětšení uvedeno) ilustrující intaktní morfologii po odběru zařízením napojeným na vakuum (převzato a upraveno z Přílohy 2).

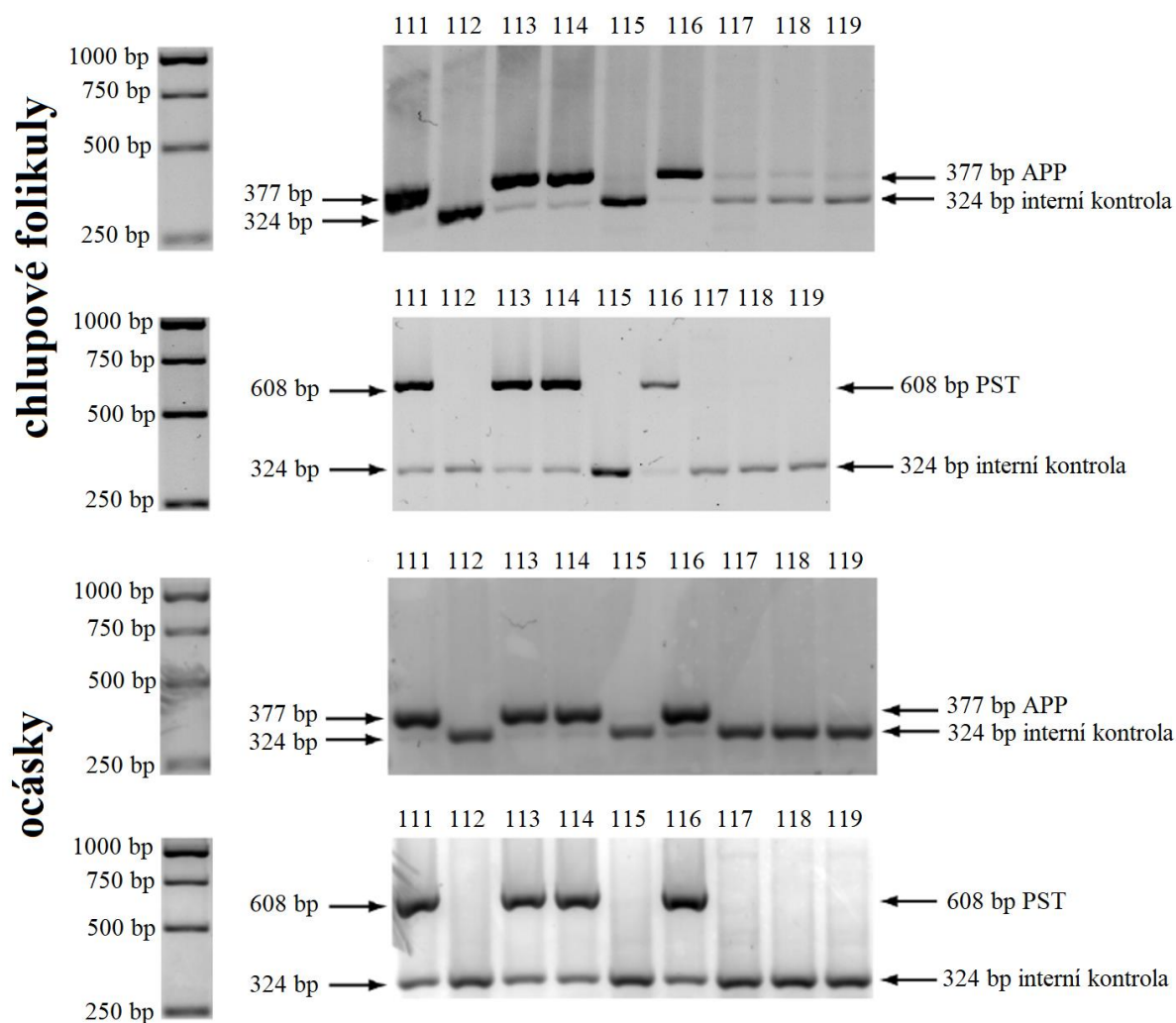


Obrázek 29: Porovnání úspěšnosti izolace DNA z biopsií ocásků a myších chlupů získaných neinvazivním odběrovým zařízením; a výtěžek z izolace RNA z myších chlupů. Množství a kvalita nukleových kyselin byla změřena na spektrofotometru ND 1000. Výsledná data jsou vizualizována formou boxplotů prezentujících medián naměřených hodnot, maximální a minimální hodnoty, jejich rozložení kvartilů a interkvartilový rozsah a hodnoty odlehlé (převzato a upraveno z Přílohy 2).

4.2.3. Genotypizace pokusných zvířat

Genotypizace pokusných GMO je jedním z běžných důvodů pro biopsii měkké tkáně zvířat ve výzkumu i komerční sféře. Většinou se pro účely izolace DNA zkoumaným zvířatům odebere špička ocásku nebo výřez z ucha. Aby se minimalizoval stres a bolest těchto zvířat, etické standardy mnoha zemí vyžadují před samotným odběrem anestézii zvířat, což celý proces prodlužuje a komplikuje, obzvláště v případě potřeby odběru velkého množství vzorků.

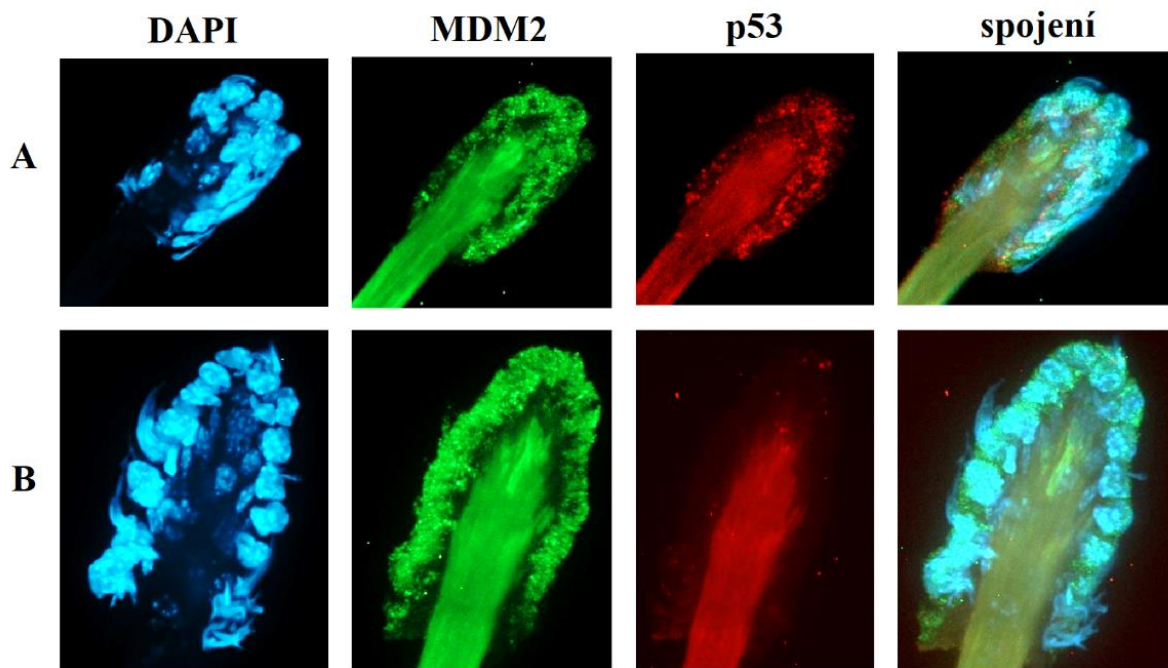
Z experimentů uvedených v této práci vyplývá, že myší chlupové folikuly odebrané výše popsaným způsobem mohou plně nahradit biopsie tkáně za účelem izolace DNA a např. následné genotypizace, nebo dalších pozorování. K demonstraci možnosti užití myších chlupů pro genotypizaci bylo vybráno 152 potomků z křížení samců myšího modelu 5XFAD a samic C57Bl/6. Takový model je užíván ke studiu Alzheimerovy choroby a nemocí spojených se senescencí [231,232]. DNA ze 152 vzorků ocásků a 152 vzorků chlupových folikulů z týchž zvířat podstoupilo PCR amplifikaci a následnou vizualizaci na gelu dvou transgenů: *APP* (APP695, kódující amyloid-beta [A4] myší/lidský chimérický prekursorový protein) a *PST* (PSEN1, kódující lidský presenilin 1). Výsledky amplifikace z chlupových folikulů byly naprosto konzistentní, shodovaly se s výsledky z ocásků ve všech 152 vzorcích (přítomnost obou transgenů nebo absence obou transgenů, žádný vzorek neukázal přítomnost pouze jednoho z transgenů). Z toho vyplývá, že chlupové folikuly by mohly plně nahradit biopsie měkkých tkání minimálně pro účely genotypizace a to bez ztráty přesnosti výsledků. Příklad výsledků elektroforetické separace demonstrující přítomnost nebo absenci cílových transgenů je na Obrázku 30.



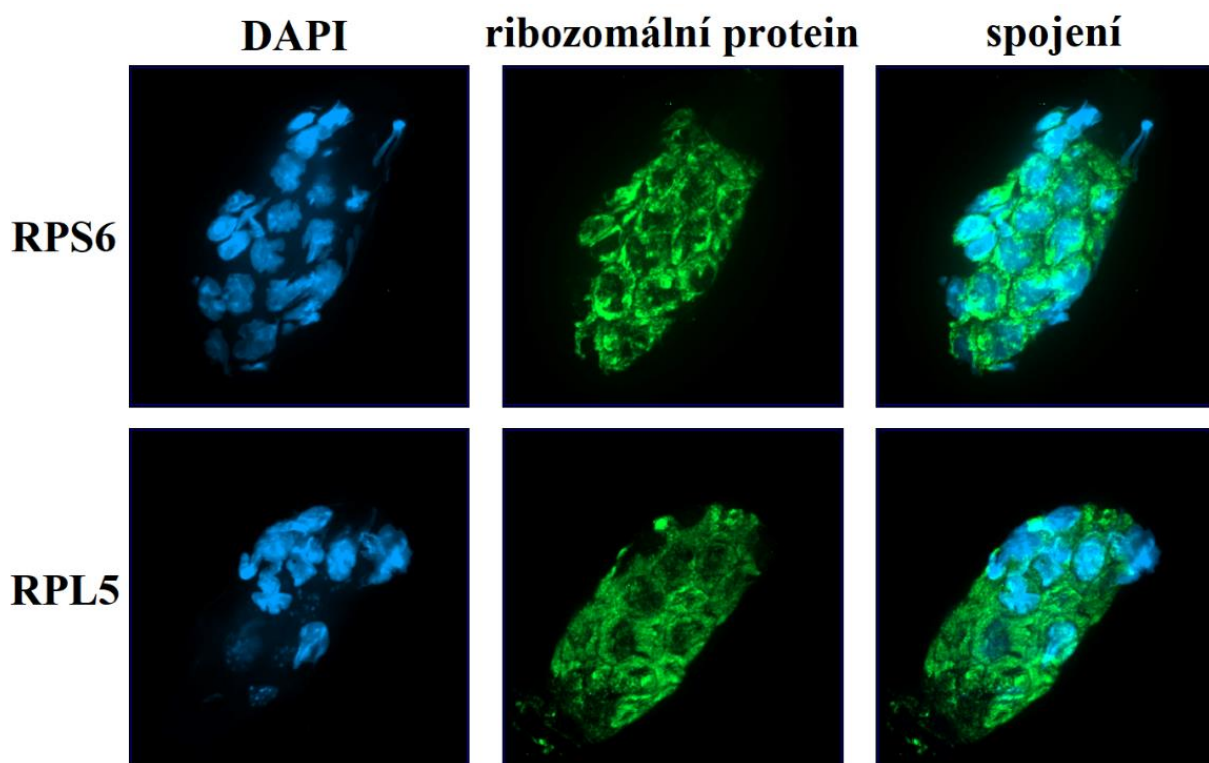
Obrázek 30: Demonstrace genotypizace využívající myší chlupové folikuly jako startovací biologický materiál. Výsledky elektroforetické separace PCR amplikonů vyjadřující přítomnost nebo absenci transgenů *APP* a *PST* (reprezentativní vzorky z myší č. 111 - 119) v obou testovaných biologických materiálech - chlupy i ocásky. Na levé straně je zobrazen i velikostní marker 1 kb GeneRuler DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, USA), převzato a upraveno z Přílohy 2.

4.2.4. Barvení jaderných a cytoplazmatických proteinů ve folikulech

Obrázky v této podkapitole obecně dokazují, že myší chlupové folikulární buňky je možné barvit pomocí IF a vizualizovat tak proteiny jaderné i cytoplazmatické, stejně jako by se jednalo o monovrstvu buněk na sklíčku nebo v panelu. Tento fakt velmi rozšiřuje možnost uplatnění tohoto biologického materiálu ve výzkumu. Na Obrázku 31 jsou uvedeny reprezentativní snímky chlupových folikulů po IF barvení jaderných proteinů. Obrázek 32 pak vizualizuje IF barvení proteinů lokalizovaných v cytoplazmě.



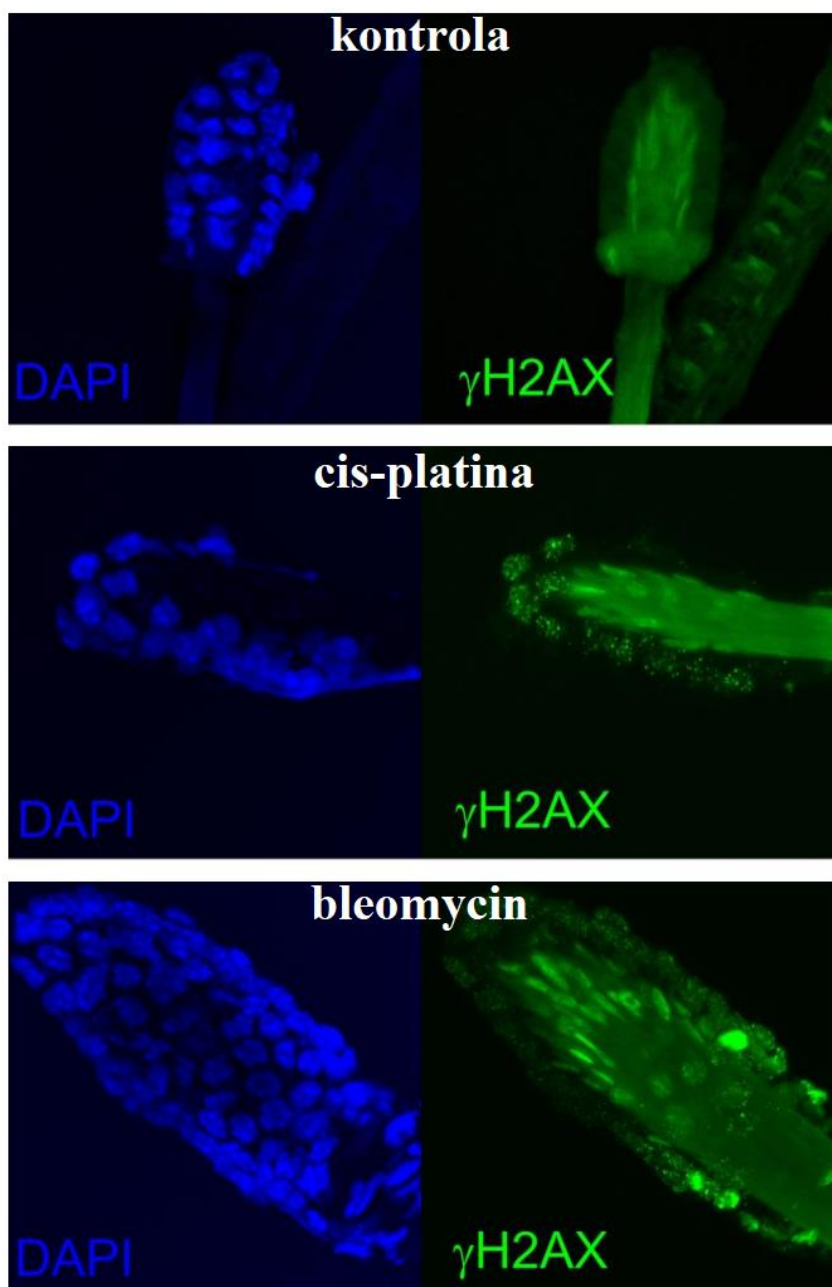
Obrázek 31: Imunofluorescenční detekce MDM2 a p53 jaderných proteinů v myších chlupových folikulech. Autofluorescence chlupu je viditelná v zeleném i červeném kanálu. Jádra jsou podbarvená DAPI. A) jaderný protein MDM2 je vizualizován zeleným kanálem a p53 červeným, B) zde nebyla použita žádná primární protilátka proti p53 k prokázání rozdílu mezi autofluorescencí chlupu a skutečným signálem z červeném kanálu ve folikulárních buňkách. Snímky pocházejí z konfokálního mikroskopu s rotujícím (z angl. spinning) diskem (Zeiss Cell Observer SD, Zeiss, Německo) a jsou zobrazeny s projekcí maximální intenzity po propojení více obrázků snímaných v jiných ohniskových vzdálenostech (z angl. z-stack scanning). Zvětšení 60x s olejovou imerzí (převzato a upraveno z Přílohy 2).



Obrázek 32: Příklad imunofluorescenční detekce cytoplazmatických proteinů - ribozomálních proteinů RPS6 a RPL5 v myších chlupových folikulech. Jádra jsou obarvena Hoechst 33342 a prezentována v modrém kanálu, ribozomální proteiny v zeleném. Reprezentativní snímky byly pořízeny složením více obrázků (z angl. z-stack) z konfokálního mikroskopu s rotujícím (z angl. spinning) diskem. Zvětšení 60x s olejovou imerzí (převzato a upraveno z Přílohy 2).

4.2.5. Vliv topicky aplikovaných klastogenů na marker poškození DNA

Dále byla otestována možnost získat relevantní informace z myších chlupových folikulů po topickém podání látek způsobujících DDR. Chemické klastogeny cis-platina a bleomycin rozpuštěné v DMSO byly aplikovány v malém množství přímo na kůži testovaných zvířat. Buňky myších chlupů odebraných z exponovaných oblastí skutečně vykazovaly zvýšenou detekci γ -H2AX po IF barvení v jádrech v porovnání s kontrolou (Obrázek 33). Tedy lokální aplikace různých chemických látek a následné zhodnocení jejich účinků na folikulární buňky *in vivo* je realizovatelné a tento fakt velmi obohacuje portfolio aplikací testovaného biologického materiálu.



Obrázek 33: Imunofluorescenční detekce γ -H2AX v myších chlupových folikulech po topické aplikaci klastogenů bleomycin a cis-platina (upraveno z Přílohy 2).

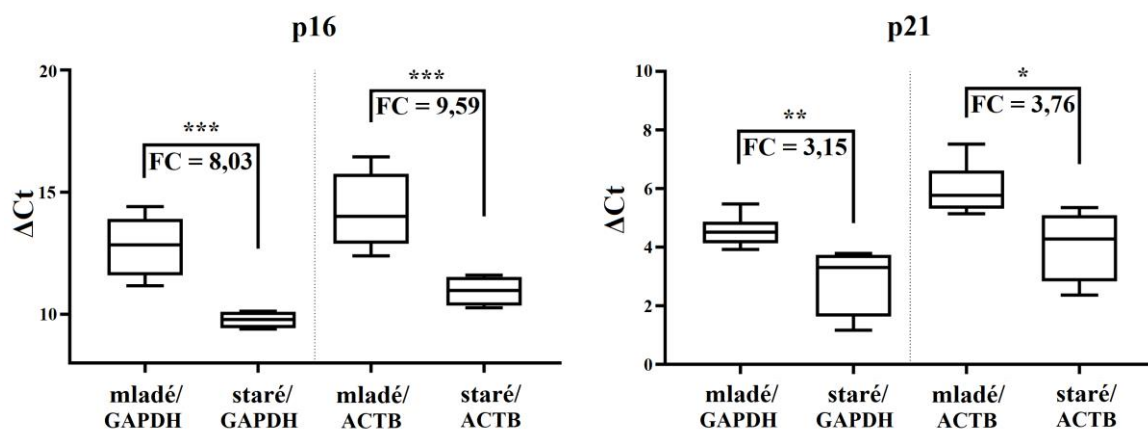
4.3. Cíl 3

Náplní této části předkládané práce bylo otestování potenciálně senolytických látek vybraných v rámci Cíle 1 *in vivo*. Jako model byl uplatněn myší model replikativní senescence, který je založený na použití přirozeně zestárých myší. Jako biologický materiál posloužily myší chlupové folikuly, které lze opakovaně odebírat bezbolestně a neinvazivně, jak bylo potvrzeno v Cíli 2. Pomocí markerů p16 a p21 byly demonstrovány změny senescentního stavu buněk. Následně byl optimalizován a validován postup indukce akcelerovaného modelu *in vivo* pomocí radiace. I v tomto modelu byly otestovány vybrané látky.

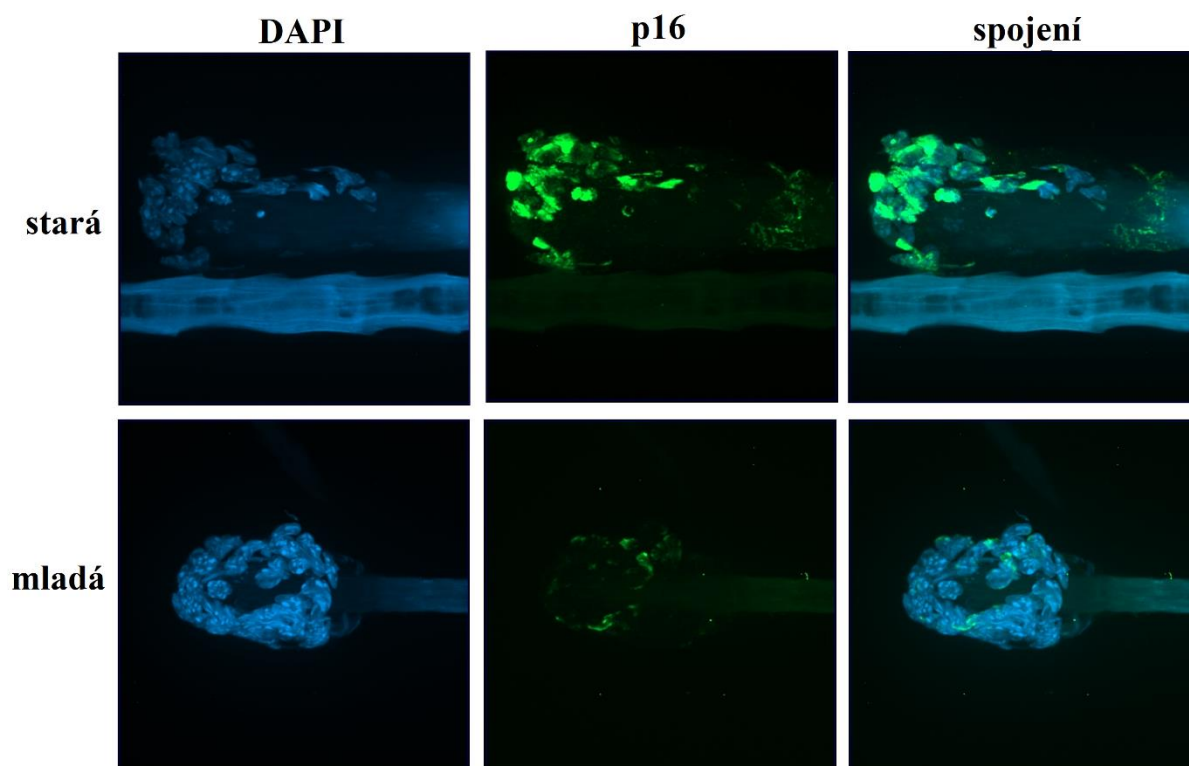
4.3.1. Změny senescentních markerů v *in vivo* replikativním modelu

Alterace v expresi vybraných senescentních markerů (p16 a p21) reflektují biologický věk testovaných zvířat a to dokonce i v myších chlupových folikulech. Senescentní buňky jsou většinou identifikovány zvýšenou aktivitou SA- β -gal [233–235], ale jak již bylo zmíněno, i tento oblíbený marker má své limity [45]. Naproti tomu u markerů p16 a p21 jsou známé funkce, které jsou spojené se senescencí [236–238] a jejich exprese je podstatně zvýšená v široké škále lidských i myších senescentních buněk [239–241].

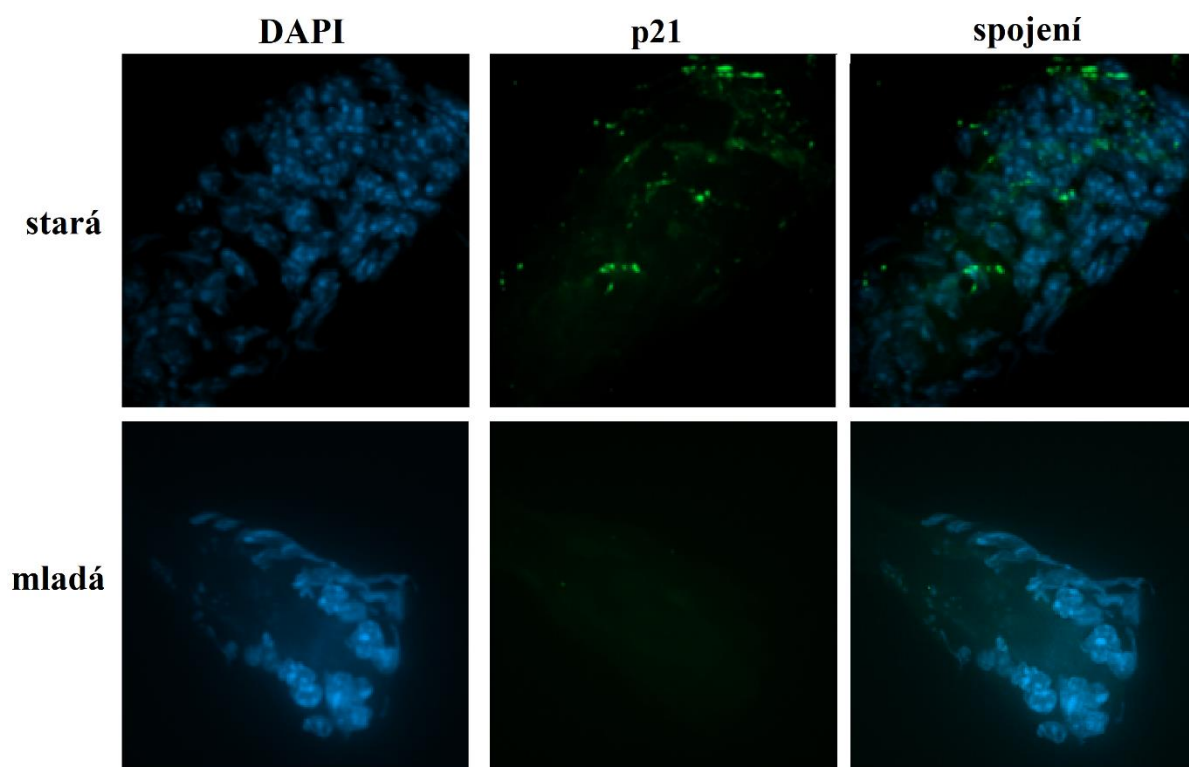
Analýza exprese *p16* a *p21* pomocí qPCR prokázala signifikantní změny exprese obou sledovaných markerů v myším modelu replikativní senescence. Logicky nejmarkantnější rozdíly byly potvrzeny mezi skupinou mladých (6 měsíců) a starých (2,5 - 3 roky) myší ($p < 0,05$, $p < 0,01$ nebo $p < 0,001$ v závislosti na genu použitém k normalizaci dat a na samotném cílovém genu). Na Obrázku 34 jsou v boxplot grafickém vyjádření uvedeny ΔC_t hodnoty obou sledovaných skupin, rozdíly v mRNA expresi daného markeru mezi skupinami je vyjádřen FC hodnotou, při jejímž výpočtu sloužila jako kontrola skupina mladých zvířat oproti experimentální skupině starých. Pro marker *p16* byly vypočítány FC hodnoty 8,03 a 9,59 ($p < 0,001$), pro *p21* 3,15 ($p < 0,01$) a 3,76 ($p < 0,05$). Rozdíly mezi expresí sledovaných markerů senescence nebyly prokázány mezi skupinou mladých a dospělých, jejichž věkový rozdíl byl pouze 4 měsíce (data neuvedena). K potvrzení výsledků z qPCR dat, byly vzorky chlupových folikulů staré (2,5 roku) a mladé (6 měsíců) myši porovnány z hlediska změny proteinové hladiny markeru p16 i p21 barvením IF (Obrázek 35). Buňky pocházející ze staršího zvířete vykazovaly vyšší hladinu proteinů p16 i p21.



Obrázek 34: Analýza exprese markerů senescence. Hladina mRNA *p16* a *p21* analyzovaná z myších chlupových folikulů pocházejících z mladé a staré myši je vyobrazena v boxplot grafech, ze kterých jsou patrné mediány, maximální a minimální hodnoty a hodnoty ΔCt (normalizovány geny *GAPDH* nebo *ACTB*). Výsledky t-testu jsou rovněž uvedeny (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Obrázek byl převzat a upraven z Přílohy 2.



Obrázek 35: Reprezentativní obrázky prokazující vyšší hladinu proteinů p16 a p21 v myších chlupových folikulech starého zvířete (stará) ve srovnání s mladým jedincem (mladá). Jádra podbarvená DAPI jsou zobrazena v modrém kanálu a signál p16, resp. P21 v zeleném. V samotném chlupu můžeme sledovat autofluorescenci. Obrázky byly pořízeny konfokálním mikroskopem s rotujícím (z angl. spinning) diskem (Zeiss, Německo) a poskládány z více snímku (z angl. z-stack). Zvětšení 60x s olejovou imerzí. Obrázek byl upraven z Přílohy 2 a částečně doplněn.

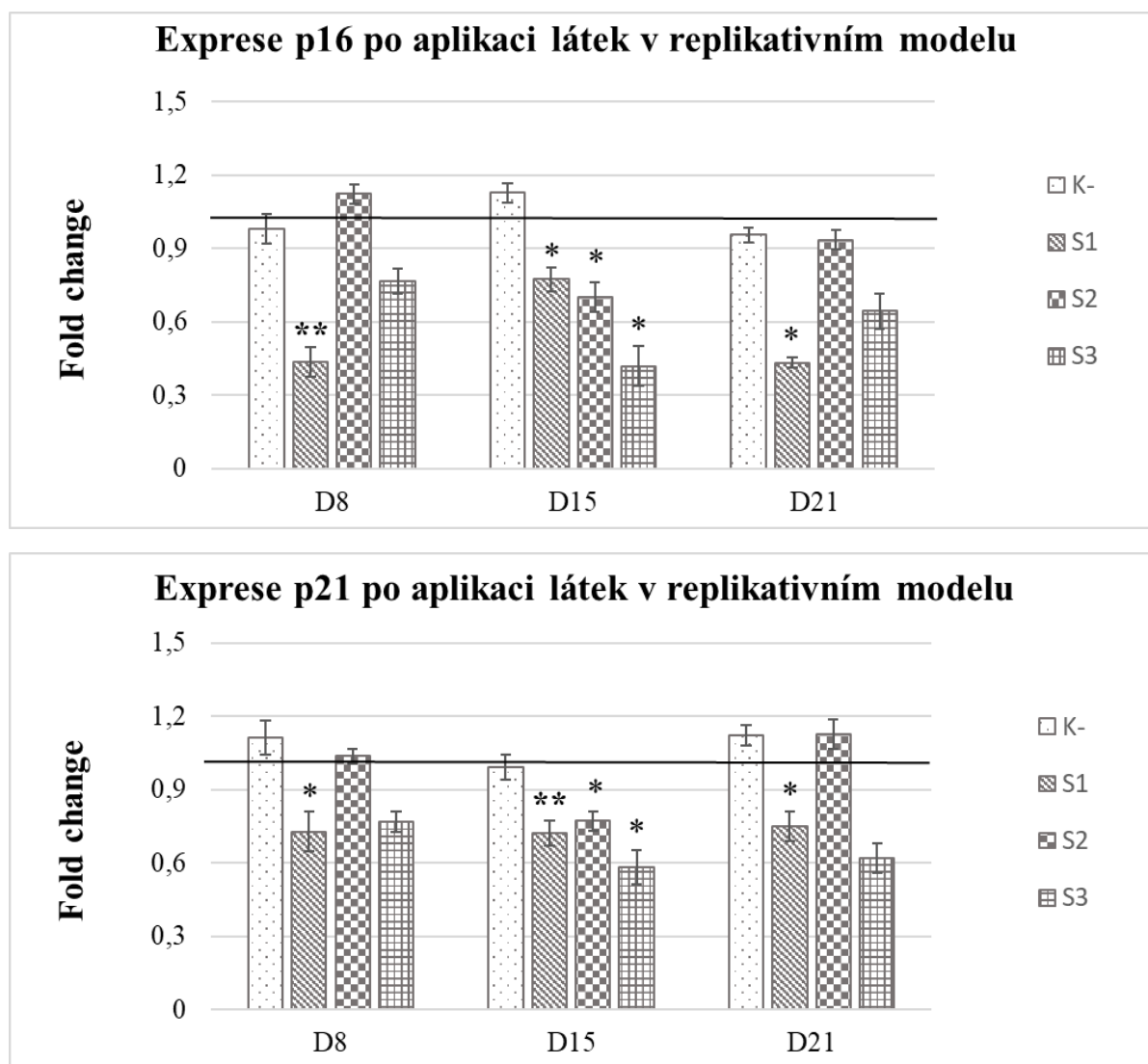


Obrázek 35 (pokračování): Reprezentativní obrázky prokazující vyšší hladinu proteinů p16 a p21 v myších chlupových folikulech starého zvířete (stará) ve srovnání s mladým jedincem (mladá). Jádra podbarvená DAPI jsou zobrazena v modrém kanálu a signál p16, resp. p21 v zeleném. V samotném chlupu můžeme sledovat autofluorescenci. Obrázky byly pořízeny konfokálním mikroskopem s rotujícím (z angl. spinning) diskem (Zeiss, Německo) a poskládány z více snímků (z angl. z-stack). Zvětšení 60x s olejovou imerzí. Obrázek byl upraven z Přílohy 2 a částečně doplněn.

4.3.2. Změny senescentních markerů po aplikaci látek v replikativním modelu

Systémová aplikace potenciálně senolytických látek (pozn. nově nasyntetizované anebo dosud neznámé látky jsou anonymizovány pod číselnými kódy z důvodu plánované ochrany duševního vlastnictví), které byly v tomto ohledu aktivní při experimentech *in vitro* na vybraných buněčných liniích (viz Cíl 1), vedla v myším modelu replikativní senescence k downregulaci sledovaných senescentních markerů *p16* a *p21*. Konzistentních výsledků bylo dosaženo především podáním látky S1, jejíž administrace vedla ke snížení exprese obou genů a to ve všech 3 sledovaných časových bodech v porovnání se vzorky odebranými před začátkem aplikace látky. Snížení exprese bylo stabilní a statisticky signifikantní ($p < 0,01$ nebo $p < 0,05$). FC hodnoty pro *p16* u skupiny S1 byly 0,43 v D8, 0,77 v D15 a 0,43 v D21. V případě marker *p21* byly vypočítány hodnoty 0,72 v D8, 0,72 v D15 a 0,74 v D21. Aplikace látky S2 i S3 vedla u obou cílových markerů k statisticky významnému snížení v D15, tedy 5 dní od ukončení léčby

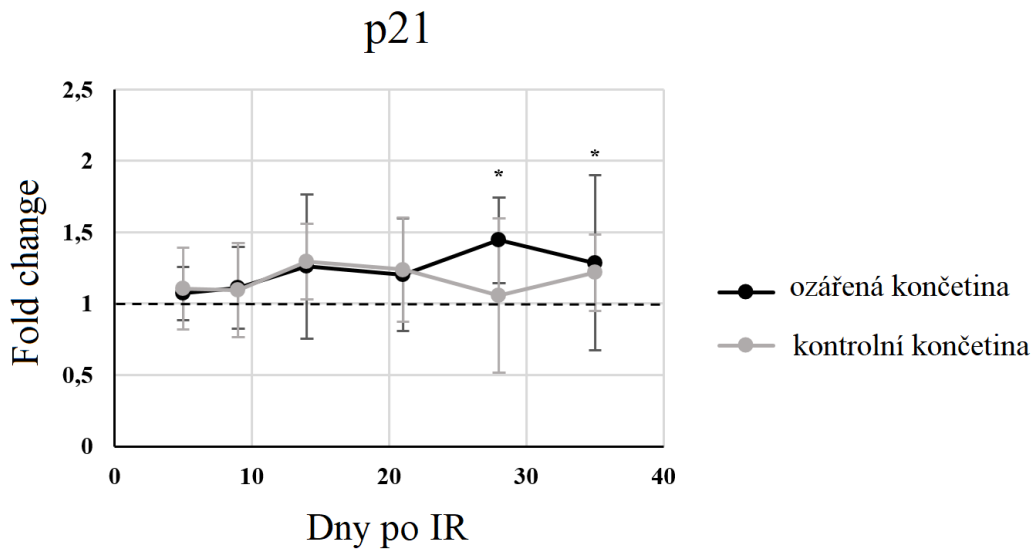
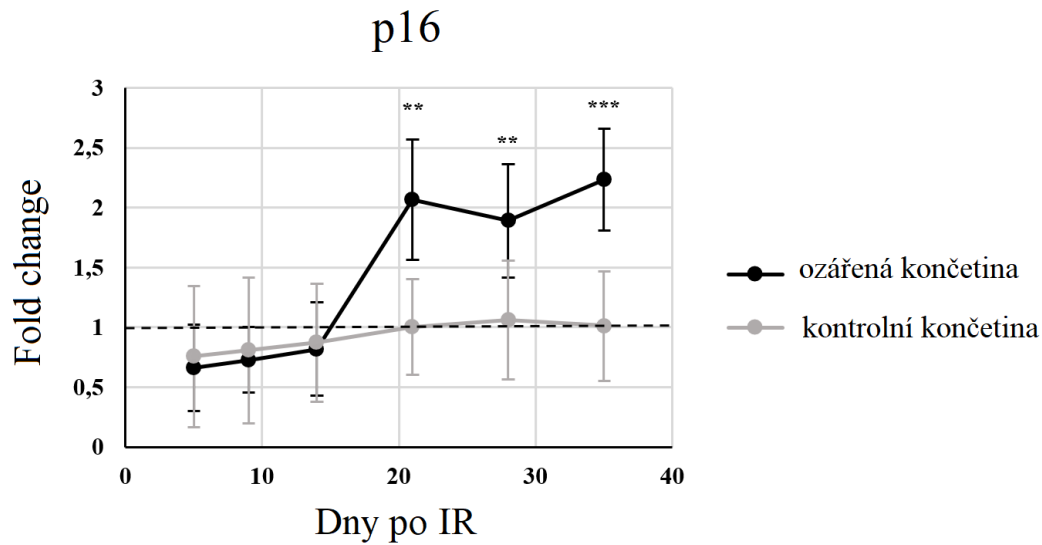
($p < 0,05$). Tento rozdíl ale nebyl statisticky významný před ukončením podávání látky (D8), ani delší dobu po ukončení podávání (D21). Hodnoty FC pro skupinu S2 v D15 byly u *p16* 0,70 a u *p21* 0,77. V případě testované látky S3 v D15 byly FC hodnoty pro *p16* 0,41 a pro *p21* 0,58. V kontrolní skupině (K-) ke změnám nedošlo. Data byla normalizována pomocí měření exprese genu *GAPDH*. Obrázek 36 graficky shrnuje tato pozorování.



Obrázek 36: Analýza exprese senescentních markerů po aplikaci vybraných látek *in vivo* v replikativním modelu (uvedeny hodnoty FC). Hladina mRNA *p16* a *p21* byla měřena ze vzorků myších chlupových folikulů zvířat ošetřených vybranými látkami a srovnáván byl každý časový odběr (D8, D15 a D21) se stavem před začátkem aplikace látek (D1). Naměřené hodnoty byly normalizovány expresí *GAPDH*. Výsledky t-testu jsou rovněž uvedeny (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

4.3.3. Změny senescentních markerů v *in vivo* IR modelu

Počet senescentních buněk ve tkáních může být kromě fyziologického procesu stárnutí také uměle zvýšen a to například expozicí nejrůznějším faktorům poškozujícím DNA. Záření gamma je známým induktorem senescence, dokonce i při podání nižších dávek - u experimentálních zvířat může dojít k demonstraci detekovatelných znaků senescence [242,243]. Navíc bylo dokázáno, že pacienti, kteří podstoupili protinádorovou terapii (chemo- a/nebo radio-) mají vyšší počet senescentních buněk než neléčení pacienti stejného věku [244,245]. Tímto experimentem je jasně prokázána možnost indukce senescence v závislosti na IR v myším modelu: měkké tkáně v ozářené pravé zadní končetině jasně vykazují znaky senescence (zvýšená exprese *p16* a *p21*) v porovnání s neozářenými kontrolními končetinami. Chlupové folikuly byly odebrány v 7 časových bodech (první ještě před IR) z obou studovaných končetin 10 myší. Signifikantní navýšení exprese vybraných senescentních markerů *p16* a *p21* v ozářených končetinách byla pozorována od 21., resp. 28. dne po IR v porovnání se vzorky odebranými ještě před ozářením. Oba markery zůstaly upregulované až do konce pozorování (D35), což jasně dokazuje indukci senescence v dané tkáni. Kvantitativní navýšení exprese markerů na úrovni mRNA nebylo příliš vysoké, nejvyšší průměrná FC hodnota byla 2,26 u *p16* 21 dní po IR. Druhý marker *p21* vykazoval slabší potenciál rozlišit senescentní od normálních buněk v myší tkáni a to s FC hodnotou na maximum 1,25 (D28). Nicméně změny byly velmi významné, v případě *p16* během posledních 3 pozorování ($p < 0,001$), u *p21* během posledních 2 pozorování ($p < 0,05$). Expresy obou markerů v kontrolních (neozářených) vzorcích zůstala během experimentu neměnná. Výsledek je graficky znázorněn na Obrázku 37. Tato zjištění samozřejmě nabádají k myšlence použít IR model akcelerovaného stárnutí v kombinaci s myšími chlupovými folikuly ke studiu senescentních markerů, stárnutí a k identifikaci senolytických látek *in vivo*.

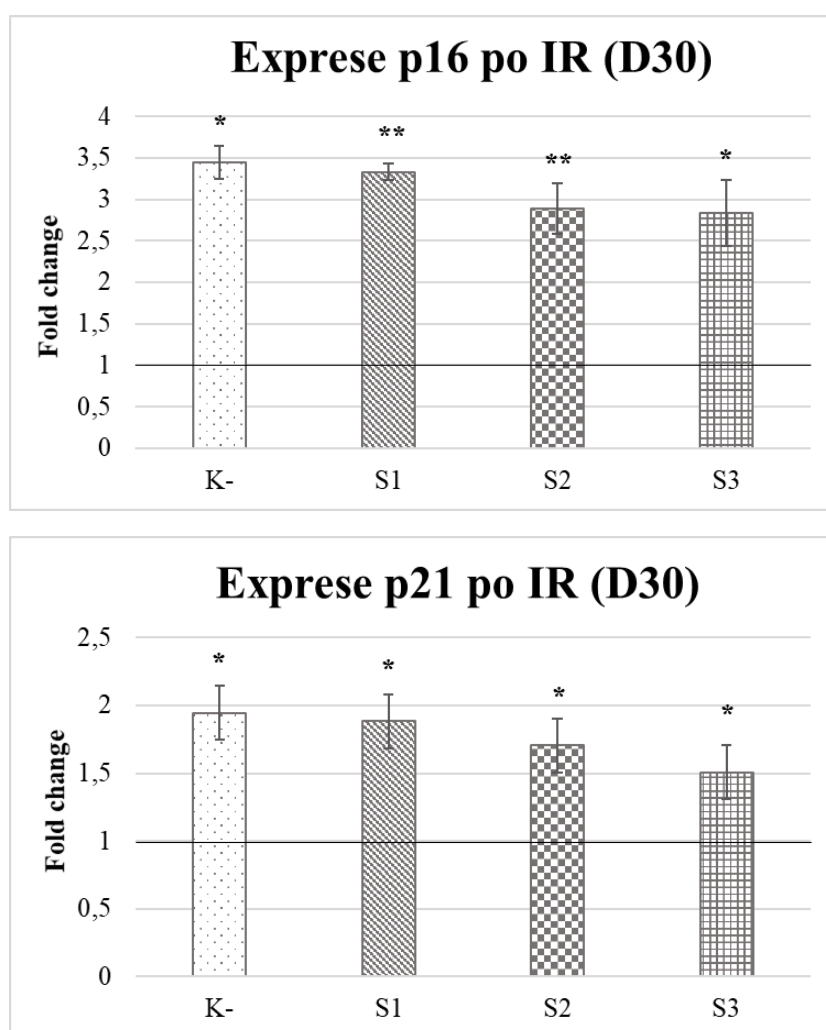


Obrázek 37: Změny v expresi genů *p16* a *p21* v čase v myších chlupových folikulech po aplikaci frakcionované dávky 3 x 8 Gy *in vivo* (pravá zadní končetina ozářena, levá zadní končetina sloužila jako kontrola). Data jsou vyjádřena jako hodnoty fold change, které byly vztaženy ke vzorkům z odběru D0 (krátce před prvním IR) a normalizovány pomocí hladin mRNA genu *GAPDH*. V grafu jsou zobrazeny průměry hodnot a směrodatné odchylky. ΔCt hodnoty z každého časového bodu byly porovnány pomocí párového testu a výsledné p hodnoty jsou vyznačeny na křivkách pomocí hvězdiček * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$ (převzato a upraveno z Přílohy 2).

4.3.4. Změny senescentních markerů po aplikaci senolytických látek v IR modelu

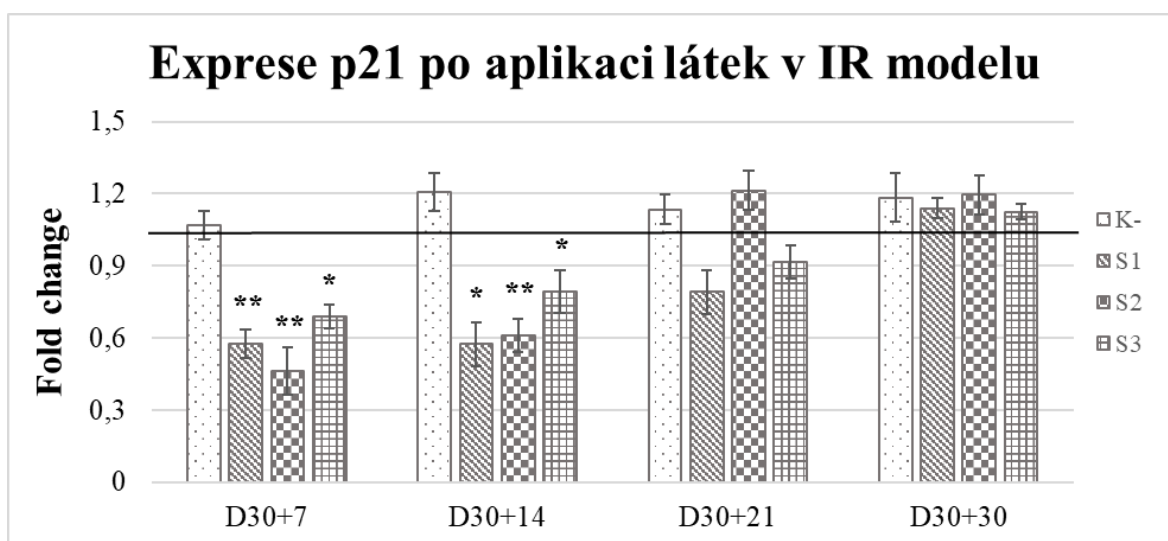
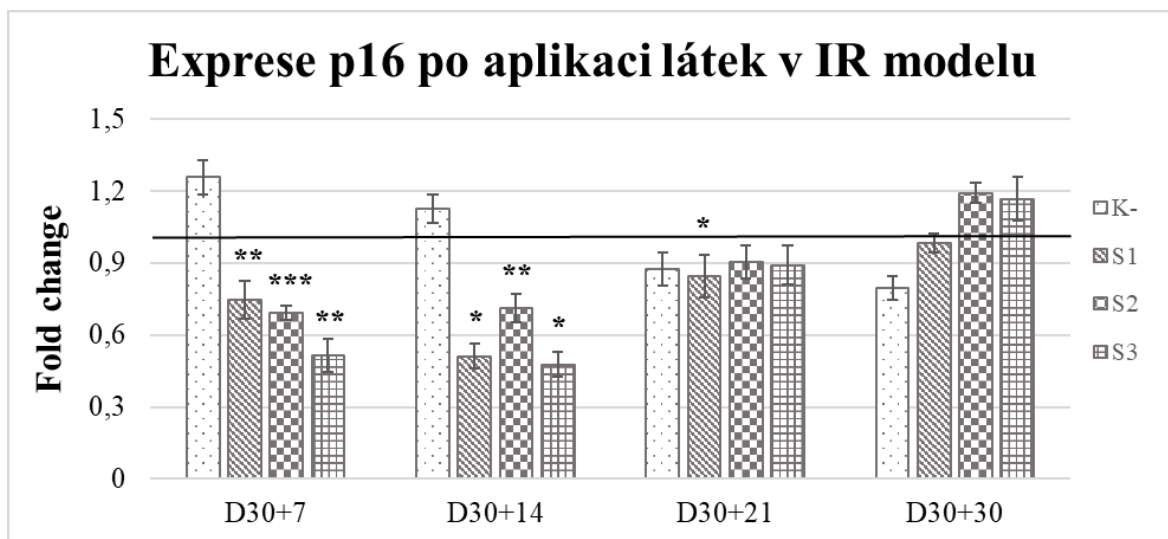
Všechny 4 skupiny (n =10) myši podstoupily ozáření pravé zadní končetiny frakcionovanou dávkou záření (IR), která dle předchozích výsledků měla vést k navýšení exprese senescentních

markerů *p16* a *p21*. Tyto výsledky byly potvrzeny (Obrázek 38), v den D30 došlo k indukci senescence ve všech 4 skupinách pokusných zvířat, resp. ve vzorcích chlupových folikulů odebíraných z ozářených částí těla. Marker *p16* všeobecně vykazoval vyšší FC hodnoty: K = 3,44, S1 = 3,32, S2 = 2,88 a S3 = 2,83. Navýšení exprese v případě markeru *p21* bylo nižší, ale i tak statisticky signifikantní: K- = 1,94, S1 = 1,88, S2 = 1,70 a S3 = 1,50. Statistická průkaznost rozdílů mezi sledovanými odběrovými body byla potvrzena u všech skupin pomocí p hodnoty (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$), která je také součástí grafů. Tímto způsobem byl tedy úspěšně připraven *in vivo* IR model akcelerovaného stárnutí, který následně posloužil k aplikaci testovaných látek.



Obrázek 38: Analýza exprese senescentních markerů 30 dní po začátku experimentu (tzn. 30 dní po začátku IR 3 x 8 Gy) *in vivo* na indukci senescence v akcelerovaném modelu stárnutí. Hladina mRNA *p16* a *p21* byla měřena ze vzorků myších chlupových folikulů zvířat před (D0) a po (D30) začátku ozáření. Hodnoty ΔCt byly normalizovány expresí *GAPDH* a použity k výpočtu FC. Výsledky t-testu jsou rovněž uvedeny (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Systémová aplikace potenciálně senolytických látek (pozn. názvy anonymizovány), které byly v tomto ohledu aktivní při experimentech *in vitro* na vybraných buněčných liniích (viz Cíl 1) a následně se ukázaly být senolytické i *in vivo* v myším modelu replikativní senescence (viz Cíl 3), demonstrovaly svůj efekt i v IR modelu akcelerované senescence. Hladiny markerů *p16* a *p21* byly i v tomto případě sledovány pomocí qPCR metody s následným statistickým vyhodnocením a jako biologický materiál byly použity odebrané myší chlupové folikuly. Kontrolní skupina zvířat, u nichž byla úspěšně indukována senescence v ozářené části těla, následně neprojevila změnu exprese ani v jednom z odběrových bodů celého experimentu. Expres markerů zůstala tedy statisticky srovnatelná se stavem po indukci senescence pomocí IR (v D30). Srovnání exprese markerů u všech testovaných skupin v dalším průběhu experimentu je graficky znázorněna na Obrázku 39, který demonstruje rozdíly v expresi mezi počátečním odběrem 2 (D30) s uměle navýšenou mRNA hladinou *p16* a *p21* po IR vs. odběry 3, 4, 5 a 6. Konzistentních výsledků po aplikaci látek bylo dosaženo především podáním látky S1, jejíž administrace vedla ke snížení exprese obou genů asociovaných se senescencí. Sledovaný marker *p16* byl aplikací S1 downregulován ve 3 (odběr 3,4 a 5) ze 4 odběrových bodů, vypočítané FC hodnoty byly 0,74 v D30+7, 0,51 v D30+14, 0,84 v D30+21, poslední odběrový den (D30+30, odběr 6) bohužel neprokázal stabilitu efektu podané látky. FC hodnoty pro měření druhého markeru *p21* vykazující statisticky signifikantní rozdíly byly naměřeny v D30+7 0,57 a D30+14 0,57. Látky S2 a S3 prokázaly podobný vzorec působení u obou sledovaných genů. Podání obou látek totiž vedlo ke snížení exprese při odběru v D30+7 a D30+14. FC hodnoty pro skupinu S2 při sledování *p16* byly 0,69 a 0,71, u *p21* byly 0,46 a 0,61. Systémové podání S3 vedlo ke snížení exprese cílových markerů, měřeno hodnotami FC: pro *p16* 0,51 a 0,47 a pro *p21* 0,68 a 0,79. Statistická hladina významnosti byla popsána p hodnotami jako u předešlých výpočtů * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Všechny tři sledované látky prokázaly svůj senolytický účinek i v akcelerovaném IR modelu senescence a to v D30+7 a D30+14 se silnou statistickou průkazností především v případě markeru *p16*. Oba odběry byly provedeny těsně po ukončení prvního, resp. druhého kola aplikace testovaných látek, z čehož vyplývá, že látky zřejmě nemají dlouhodobý senolytický účinek a pro udržení jejich efektu je nutné stabilně tyto látky podávat v adekvátním množství opakovaně.



Obrázek 39: Analýza exprese senescentních markerů po aplikaci vybraných látek *in vivo* v IR modelu. Hladina mRNA *p16* a *p21* byla měřena ze vzorků myších chlupových folikulů zvířat ošetřených vybranými látkami a srovnáván byl každý časový odběr (odběr 3, 4, 5, 6) se stavem před začátkem aplikace látek (odběr 2, D30). Hodnoty ΔCt byly normalizovány podle exprese *GAPDH*. Výsledky t- testu jsou rovněž uvedeny (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

5. Diskuze

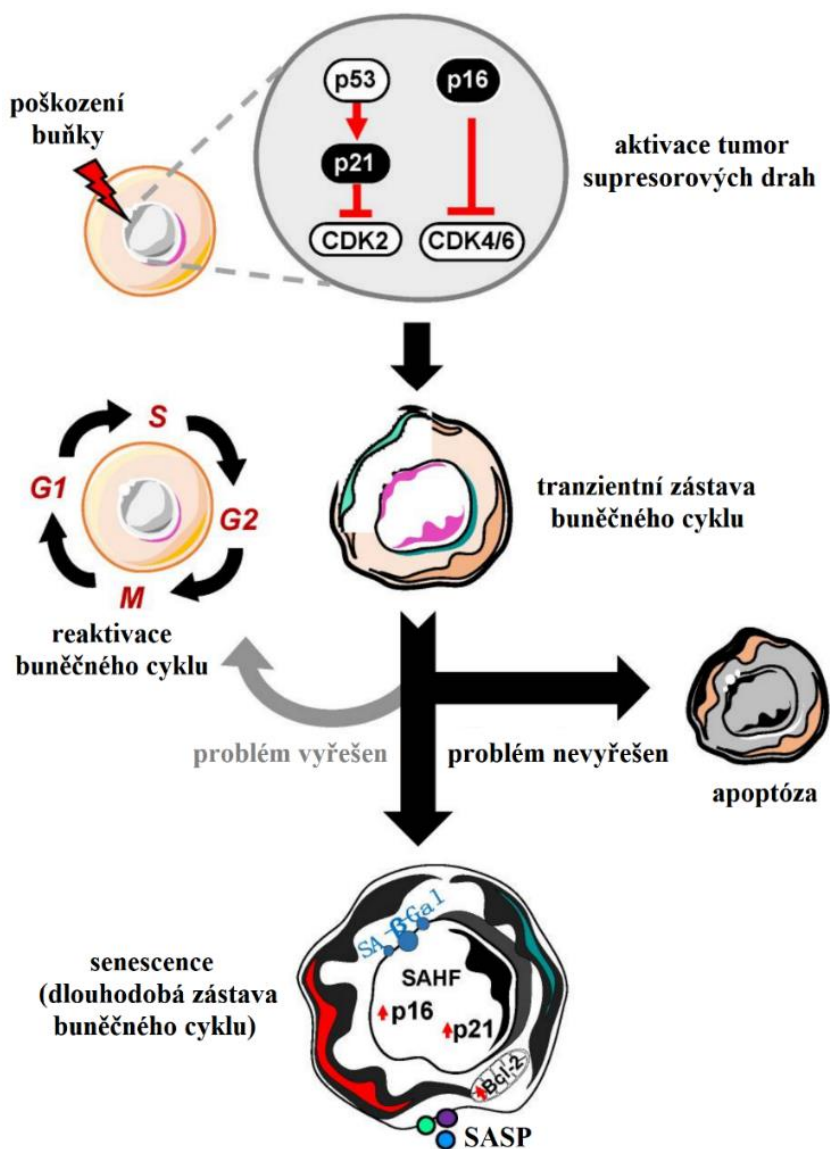
Senescence a stárnutí jsou v posledních několika letech velmi diskutovaným tématem na poli biologie i medicíny a každý den jsou publikovány další nové poznatky, které osvětlují tuto problematiku. I přes veškeré úsilí a velké objemy dat, které jsou nyní zveřejňovány, existuje spousta nezodpovězených otázek, nesrovnalostí a nejasností ohledně molekulární podstaty senescence, způsobu identifikace senescentních buněk, univerzálnosti jednotlivých biomarkerů, využitelnosti modelů senescence *in vitro* a/nebo *in vivo* a v neposlední řadě i identifikace a aplikace senolytických látek. Významnou překážkou na cestě k lepšímu pochopení buněčného stárnutí je zejména heterogenita jeho fenotypu [246]. Ať už se jedná o složení SASP, stabilitu a rychlost indukce stárnutí a tvorbu SAHF, to vše je dnes intenzivně diskutováno v literatuře, ale všeobecně lze říci, že tyto rozdíly můžeme připsat zejména zvolenému typu buněk a/nebo činidlu indukujícím senescenci. Z tohoto důvodu potom sledujeme rozdíly mezi primární a sekundární senescencí [31], dále rozdíly v rámci různých tkání nebo v kontextu konkrétního onemocnění [247], a v neposlední řadě rozdíly v odpovědi na senescentní terapii, ať už se jedná o pro-senescentní nebo anti-senescentní přístup [248,249]. Všechny zmíněné faktory významně komplikují rozpoznávání a hodnocení buněčné senescence, zejména pak v komplexních tkáních a živých organizmech.

V této práci byly použity dva modely senescence, jak v *in vitro*, tak v *in vivo* experimentech, a to replikativní model senescence vycházející z přirozeného stárnutí tkání, resp. organismu, a jako druhý model byl využit akcelerovaný model senescence založený na indukci senescentního stavu pomocí ionizujícího záření. U lidských primárních fibroblastových linií byla zjištěna konvergence mezi replikativní a radiací indukovanou senescencí a to na základě identifikace exprese konzervovaných genů a některých drah [250], proto byly v předkládané práci vybrány právě tyto dva zmíněné modely.

- (a) *in vitro* replikativní a radiční model senescence: výběr vhodných buněčných linií pro tento typ studie je velmi obtížný a ovlivněný velkým množstvím faktorů. V podstatě se nedá říct, že by některá linie byla vhodnější nebo lepší v obecném slova smyslu, resp. pokud se podíváme do literatury, najdeme obrovskou škálu linií, které byly užity jako buněčný model senescence. V případě replikativního modelu se může na první pohled zdát, že zkracování telomer v důsledku buněčného dělení, které indukuje právě replikativní senescenci, je jednoznačný a dobře popsán proces, ale i přesto může vést k určitému stupni heterogenity, pokud srovnáváme reakci různých buněčných linií.

Zatímco replikativní senescence je řízena hlavně délkou telomer a expresí telomerázy, heterogenita jejího indukce není stále dobře pochopena. Na základě výše zmíněných limitujících faktorů byla nejprve vybrána lidská buněčná linie MRC5, která velmi dobře reflektuje nástup senescence v závislosti na buněčné pasáži [251]. Následně byly do *in vitro* experimentů doplněny i další dvě linie, a to nádorové U2OS a HCT116, které reprezentují nádory mesenchymální i epiteliální tkáně, u kterých je radioterapie běžně užívaným způsobem léčby, s čímž souvisí i možnost indukce senescence terapeutickou dávkou IR [252]. Tyto tři linie byly vybrány na základě literatury a doplněny o další potenciálně vhodné buněčné linie. Při optimalizaci IR indukované senescence bylo otestováno více linií, avšak pro další experimenty byly využity právě tyto 3 zmíněné. Testování účinku potenciálních senolytik na buněčných liniích v obou modelech bylo založeno na sledování nejčastěji užívaného senescentního markeru - β -galaktosidázové aktivity. Jelikož většina buněk exprimuje endogenní enzymaticky aktivní β -gal při pH 4,0, SA- β -gal je testována barvením při neoptimálním pH 6,0, což zlepšuje schopnost rozlišit normální a senescentní buňky [253]. Testování SA- β -gal jako senescentního markeru je ale, i přes jeho rozsáhlé užívání, nutné optimalizovat pro každou buněčnou linii. Pro urychlení a zefektivnění testování SA- β -gal v obou modelech byla optimalizována SER spot analýza obrazu a kombinována s automatickým skríníngem a užitím 384-jamkových panelů. Toto nastavení je inovativní, pracuje s dlouhou dobu známým markerem, avšak zařazeným do nového pracovního postupu, díky čemuž poskytuje v krátkém čase velké objemy dat, která jsou generována automaticky. SER spot analýza obrazu pomocí softwaru Columbus prozatím nebyla k těmto účelům užitá, s výjimkou publikovaného spoluautorského článku (Příloha 3), kde postup analýzy obrazu při identifikaci senescentních buněk vycházel z nastavení optimalizovaného pro tuto práci. Všechny látky testované pro jejich potenciální senolytický účinek v rámci této práce byly již dříve zařazeny do širšího bloku testování jejich různých účinků a biologických vlastností. V této práci jsou zahrnuta pouze data týkající se senescence a senolytického efektu. Prozatím nebyla publikována data popisující látky S1, S2 ani S3 jako senolytika. Všechny tři látky jsou deriváty nukleosidů, prokázaly svůj senolytický účinek u všech 3 linií v IR modelu, což bylo následně potvrzeno v modelu replikativní senescence na přirozeně zestárlých MRC5 buňkách. Chemickou strukturu těchto kandidátních senolytik zatím nezveřejňujeme z důvodu přípravy patentové přihlášky.

(b) *in vivo* replikativní a radiačně indukovaný model stárnutí: pro udržení způsobu testování potenciálně senolytických látek na replikativním a IR modelu, byly modely optimalizovány také v *in vivo* nastavení. Akcelerovaná indukce senescence u laboratorních zvířat je celkem běžně užívaným postupem [100], avšak v této práci bylo z etických důvodů přistoupeno k cílené minimalizaci plochy těla určené k ozáření a každému zvířeti byla aplikována frakcionovaná dávka IR (3 x 8 Gy) pouze na jednu zadní končetinu, zbytek těla byl ukryt pod olověným štítem. Takové experimentální uspořádání pak umožnilo současnou párovou analýzu chlupů z ozářené (senescentní) a neozařené (kontrolní) části těla. Použití frakcionované dávky záření k indukci senescence byla zvolena na základě recentní literatury [100,254], klinických zkušeností a vlastních předchozích poznatků a optimalizací. Jednorázová vysoká dávka záření nebyla aplikována, jako tomu je v jiných studiích [255], aby se zabránilo vzniku postiradiačních kožních lézí, které se při podání frakcionované dávky vůbec neobjevily. V případě replikativního modelu se pracovalo se zvířaty ve věku 2 - 2,5 roku, což koresponduje s průměrnou délkou života laboratorní myši [256]. Pro otestování potenciálně senolyticky aktivních látek byly vybrány markery *p16* a *p21*, jejichž změny exprese na úrovni mRNA v obou *in vivo* modelech byly stěžejním výsledkem této práce. Všeobecně lze říci, že v reakci na poškození buňka aktivuje řadu molekulárních signalizačních drah včetně supresorových drah p16/pRb a p53/p21 (Obrázek 40), které vedou k tranzientní zástavě buněčného cyklu, aby buňka získala dostatek času na stresovou odpověď a opravy zářením poškozených makromolekul. Pokud se poškození podaří opravit, dojde k reaktivaci buněčného cyklu. Pokud si ovšem buňka s poškozením poradit nedokáže, nastávají dvě možnosti, buď dojde k apoptóze, nebo k senescenci, která je typická upregulací inhibitorů cyklin-dependentních kináz (p16, p21), dále SAHF, Bcl-2 proteiny, SA-β-gal, SASP atd. [257]. Změny exprese obou použitých markerů (p16 a p21) se lišily u různých vzorků, modelů a časových odběrů, jelikož jsou tyto indikátory senescence součástí různých signálních drah a nástup jejich exprese tedy může kolísat a to především po aplikaci testovaných látek. Náš přístup otevírá nové možnosti hledání nových senolytických látek a navíc monitorování hladin mRNA markerů *p16* a *p21* ve chlupových folikulech může nahradit jiné pracnější a méně přesné metody [258].

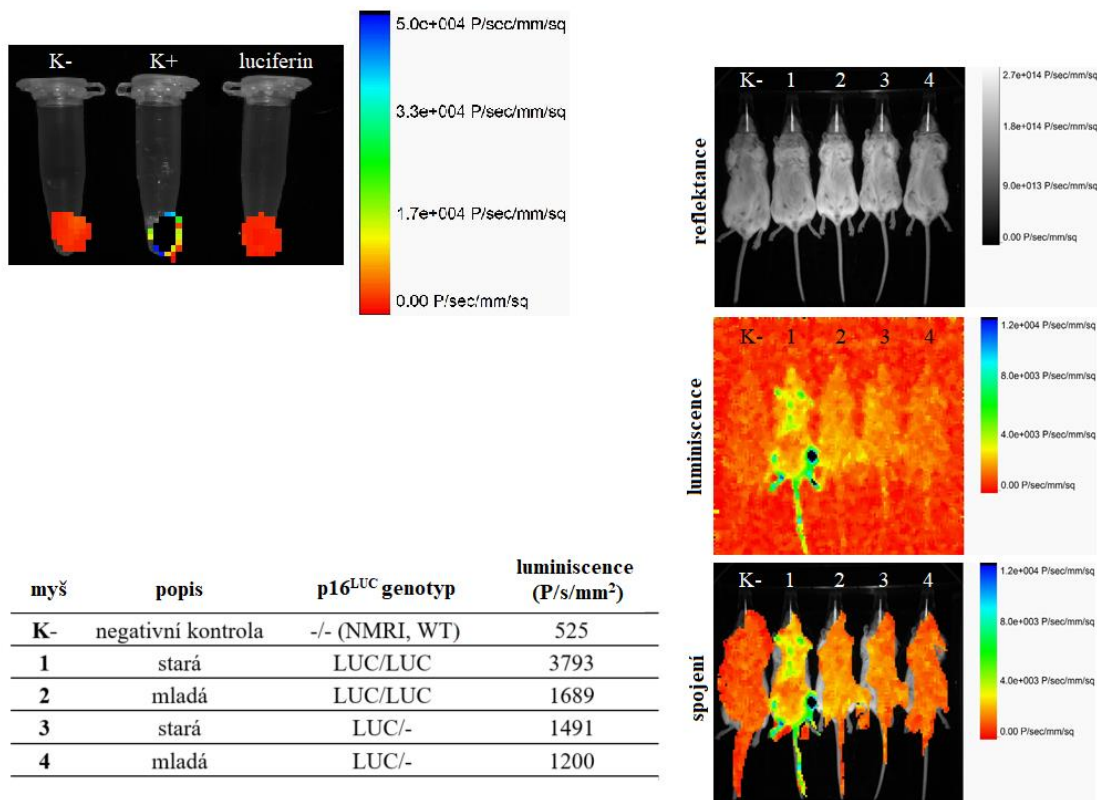


Obrázek 40: Proces indukce senescence v reakci na poškození buňky. Převzato a upraveno z [257].

Použití markeru p16 pro studium senescence je také podpořeno faktem, že p16^{INK4a} je velmi často užívaným indikátorem tumorigeneze a/nebo stárnutí *in vivo* v myším modelu p16^{LUC}. V reakci na vysoce dynamickou indukci p16 při stárnutí, byl vytvořen myší model s reportérovým systémem p16^{LUC} [97]. Pro naše účely byl sice postup užití tohoto modelu optimalizován (Obrázek 41), ale nakonec pro testování látek použit nebyl. Tento model s sebou přináší i nevýhody a komplikace, v našem případě především fakt, že pozitivní luminiscenční signál je pozorován v místech hojících se ran [97] (Obrázek 42) a/nebo zánětu [239]. Některá zvířata po ozáření trpěla post-iradiačním syndromem a ojediněle se objevily léze na kůži zvířat, tato místa pak vykazovala pozitivní signál a narušila by tak celkovou analýzu stavu senescence.

a)

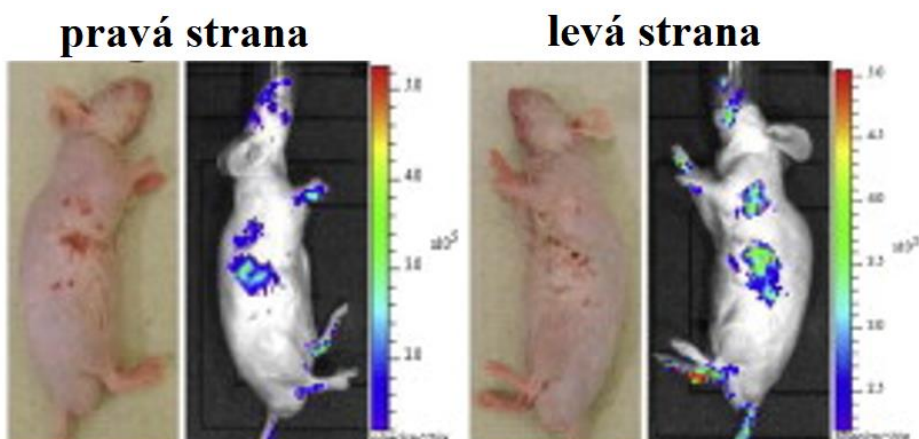
vzorek	popis	obsah vzorku	luminiscence (P/s/mm ²)
K-	negativní kontrola	buněčný lyzát bez luciferinu	2284
K+	pozitivní kontrola	buněčný lyzát s luciferinem	61085
luciferin	luciferin	roztok luciferinu	1858



b)

myš	popis	p16 ^{LUC} genotyp	luminiscence (P/s/mm ²)
K-	negativní kontrola	-/- (NMRI, WT)	525
1	stará	LUC/LUC	3793
2	mladá	LUC/LUC	1689
3	stará	LUC/-	1491
4	mladá	LUC/-	1200

Obrázek 41: Validace p16^{LUC} reportérového systému. A) reprezentativní obrázek spojení snímání reflektance a 5-minutové luminiscence roztoků buněčných lyzátů z p16^{LUC} homozygotní myši (biopsie špičky ocásku) s/bez přidavku luciferinu a roztoku luciferinu bez lyzátu. Nejvyšší luminiscenční signál byl naměřen v případě pozitivní kontroly. B) porovnání luminiscenčního signálu mezi starými a mladými zvířaty v kombinaci se sledováním sestavení alel p16^{LUC} (homozygot vs. heterozygot). Nejvyšší signál byl naměřen u starého homozygotního zvířete, podobný signál byl zjištěn u starého heterozygota a mladého homozygota a nejnižší signál byl naměřen u mladého heterozygota. Zvířatům v celkové anestézii (inhalace izofluranu) byl 8 minut před měřením injikován i.p. roztok luciferinu (15 mg/ml DPBS, v poměru 10 μl/1 g váhy zvířete). U všech měření byl počítán průměrný signál z ROI (z angl. region of interest).

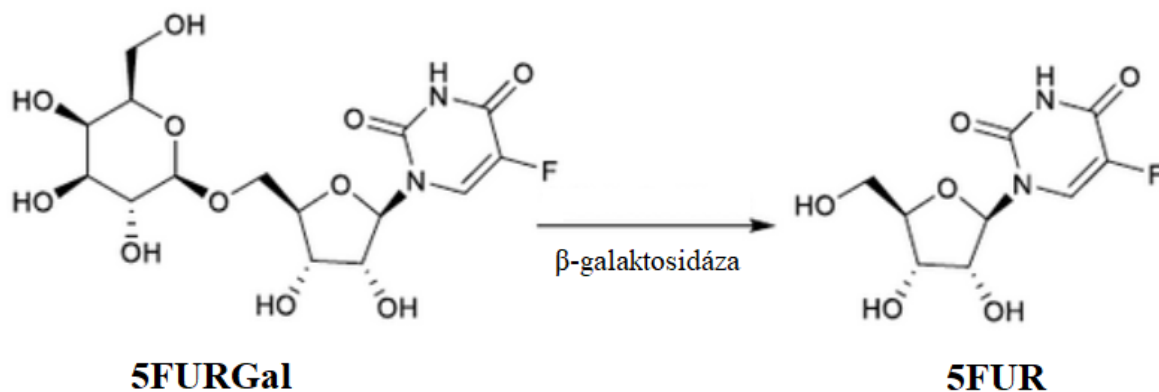


Obrázek 42: Reprezentativní fotografické a luminiscenční (2-minutový sběr signálu) obrázky $p16^{LUC}$ myši s hojícími se kožními defekty. Převzato a upraveno z [97].

Senolytický efekt 3 stěžejních látek byl pozorován *in vivo* v obou myších modelech. Replikativní model senescence prokázal efekt všech 3 testovaných látek na *p16* i *p21* expresi, ale až po provedení obou sérií aplikace látek (odběr v D15). Látky byly podávány ve dvou sériích v D1-D5 a D8-D12. V předcházejícím odběru (D8) došlo ke snížení exprese markerů *p16* a *p21* pouze po podání látky S1, tzn. po aplikaci první série. Při posledním odběru (D21) byl pozorován opět pouze efekt S1. Podle těchto výsledků se zdá, že nástup efektu S1 je rychlejší než v případě ostatních testovaných látek a její účinek navíc přetrvává nejdéle. Z čehož také vyplývá, že pro dlouhodobé působení S2 a S3 je zřejmě potřeba jejich opakovaného podávání. V IR modelu akcelerované senescence byl pozorován efekt všech 3 testovaných látek již po podání první série (D30+7) a také po podání druhé série (D30+14). Při následujícím odběru (D30+21) přetrval efekt pouze u *p16* markeru v S1 skupině, látky S2 a S3 svůj účinek neudržely stejně jako v předchozím modelu a v posledním odběru D30+30 již nebyl pozorován účinek žádné z látek. Všechny tři testované látky sdílejí nukleosidovou strukturu a patří k potenciálním protinádorovým léčivům. Jsou to modifikované nukleosidy, tzn. nukleobáze s cukernou jednotkou a nepřírodní modifikací.

Potenciálně senolytická látka s nukleosidovým základem v chemické struktuře se již v literatuře objevila. Jedná se o látku 5FURGal, která je 5'-O- β -D-galaktopyranosylovou modifikací toxického nukleosidu 5-fluoruridin (5FUR). V tomto případě bylo využito značně zvýšené exprese hydrolázy β -galaktosidáza v senescentních buňkách jako nástroje k enzymatické přeměně prekursoru látky na svou aktivní parentální formu (Obrázek 43). Tento prekursor byl testován pro své pancytotoxické účinky, byla pozorována redukce vedlejších účinků v případě

geriatrických myší a navíc se podařilo prokázat senolytickou aktivitu. Jak u mladých, starých i geriatrických myší bylo léčivo dobře snášeno a prokázalo senolytický účinek v mnoha tkáních a to bez zjevné toxicity [259].



Obrázek 43: Látka 5FURGal cílí senescenci, aniž by ovlivnila proliferující nebo quiescentní buňky *in vitro* i *in vivo*. Molekulární struktura prekurzoru a parentální látky. Převzato a upraveno z [259].

Samozřejmě nelze s jistotou říci, že všechny obdobně modifikované nukleosidy budou mít senolytický účinek, ale určitě tato zjištění stojí za další prozkoumání a otestování i dalších strukturně podobných molekul. Je tedy možné, že jisté formy některých nukleosidů mohou hrát významnou roli na poli senoterapie. Je však nutné dodat, že velká část známých senolytických aktivních látek patří mezi polyfenoly, které jsou od nukleosidů strukturně odlišné.

Použití myších chlupových folikulů jako biologického materiálu a inovativního zdroje informací je v oblasti práce s laboratorními zvířaty známo již delší dobu. Myší chlupy se využívají především ke genotypizaci GMO zvířat nebo zkrátka jako zdroj genomické DNA pro PCR. O možnostech využití chlupů jako iniciálního materiálu pro PCR se píše jak v publikacích [260], tak na konferencích (posterech) [261] a dokonce už i v návodech výrobců různých kitů sloužících k těmto účelům (př. Direct PCR on Hair: A New Animal-Friendly Genotyping Method, ThermoFisher Scientific). Ve všech publikacích je ale odběr prováděn pomocí pinzety, součástí této práce je neinvazivní rychlý a jednoduchý způsob odběru myších chlupů pomocí speciálního nástroje, který extrémně snižuje možnost kontaminace vzorků tím, že svazek chlupů pevně drží u sebe po celou dobu manipulace. Velmi důležitým faktorem při vývoji tohoto nástroje a jeho implementaci do plánovaných experimentů bylo dodržení pravidel 3R, humánnost při práci se zvířaty a co možná nejvyšší stupeň pohody experimentálních zvířat. Myší chlupy jsou tedy užívány ke genotypizaci, také na nich bylo provedeno i např. IF barvení nebo TUNEL metoda, ale všechny experimenty vždy souvisely s růstem chlupů, zkoumáním různých fází růstu chlupů, atd. [262]. Navíc je z předložených

výsledků patrné, že z myších chlupů je možné získat dostatečné množství nukleových kyselin v dobré kvalitě. Věříme, že tento způsob odběru chlupů inspiruje a motivuje další vědce k jeho širokému uplatnění v praxi. V této práci jsou myší chlupy použity i jako regulární biologický materiál sloužící ke studiu senescence (Cíl 3), což je navíc doloženo několika základními metodickými příklady (Cíl 2). Významnou výhodou tohoto mikroorgánu (chlupových folikulů) je přítomnost velkého počtu buněk na malé ploše (i různé typy), které lze snadno odlišit. Nejzajímavější a pro výzkum biomarkerů velmi vhodné jsou zejména buňky epiteliální, protože např. většina neoplázií má také epiteliální původ. Posouzení korelace markeru p16 a stárnutí (senescence) *in vivo* bylo také provedeno na vzorcích odebrané kůže [263] - tkáně ze které chlupy vyrůstají. Tento fakt úzce souvisí s metodickým postupem, který byl v práci použit. V neposlední řadě může být tato metoda jednoduše adaptována na odběry vzorků chlupů/srsti jiných laboratorních zvířat jako jsou potkani, králíci, psi nebo opice a dokonce je možné odebrat i chlupy lidské, což otevírá řadu možností pro budoucí biomedicínské aplikace.

6. Závěr

Senescence, neboli stárnutí na buněčné úrovni, je proces postihující prakticky všechny organismy. Senescence doprovází přirozený proces stárnutí a souvisí s řadou patologických procesů, které postihují organismus v průběhu přirozeného anebo nemocí či léčbou navozeného akcelerovaného stárnutí. S ohledem na rychle stárnoucí populaci vzniká naléhavá potřeba rychle, jednoduše a efektivně detekovat senescentní markery a následně identifikovat látky, které zlepší stav našeho zdraví i během stárnutí a umožní delší anebo kvalitnější život. V důsledku toho roste zájem o studium buněčné senescence a vývoj senolytických látek, které mohou eliminovat senescentní buňky anebo stárnutí pozastavit/zvrátit jinými mechanismy.

Tato práce poskytuje detailní informace o možnosti použití známého senescentního markeru SA- β -galaktosidázy v novém metodickém nastavení k detekci senescentních buněk v buněčné kultuře - kombinuje se zde totiž použití metody pro identifikaci aktivity SA- β -gal, vysoko-kapacitního skrínungu v 384-jamkových panelech pomocí automatického mikroskopu a optimalizované SER spot analýzy obrazu. Toto nastavení umožňuje rychlou a přesnou metodu kvantifikace senescentních buněk s možností optimalizace na konkrétní buněčnou linii během krátkého času. Předložené výsledky dokazují možnost "recyklace" již dlouho známého a používaného markeru a jeho využití v novém přístupu, který byl uplatněn ve dvou modelech senescence (replikativním a radiací indukovaném). Díky tomuto postupu byly *in vitro* identifikovány senolyticky působící látky a jejich úzký výběr byl následně zahrnut i do experimentů provedených na zvířatech *in vivo*.

Testování 3 vybraných látek - S1, S2 a S3 - v replikativním a artifičním IR modelu na myších potvrdil jejich preferenční cytotoxický efekt vůči stárnoucím buňkám, což je další úspěšný krok k identifikaci nového senolytika. Studium senescence a potenciálních senolytik v této práci bylo navíc doplněno o potvrzení možnosti užít nový typ biologického materiálu - myší chlupové folikuly - jako zdroj cenných informací. Folikuly nemusí sloužit jen k účelům PCR a navíc byl do rutinního pracovního postupu odběru vzorků zařazen specializovaný nástroj, odběrová pistole, umožňující rychlý a reprodukovatelný odběr folikulů bez rizika zkřížené kontaminace vzorků. Předkládaná práce je první, ve které se kombinuje neinvazivní odběr biologického materiálu a jeho následné užití s experimenty zaměřenými na studium senescence a identifikaci potenciálních senolytik, a věřím, že bude přínosem pro výzkum i klinické aplikace biomarkerů a léčiv v oblasti nemocí spojených se stářím.

7. Seznam zkratek

17DMAG	17-Dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin
3R	The 3Rs Rule - replace, reduce, refine
53BP1	Tumor Protein P53 Binding Protein 1
5FUR	5-fluoruridin
5FURGal	5'-O- β -D-galaktopyranosylová modifikace 5FUR
ACTB	aktin beta
AHGa	2-fotonová próba (naphthalimide-based two-photon probe)
Akt	AKT serin/threonin kináza
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
APH	afidikolin
APP	proteinový prekurzor amyloidu beta
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated, serin/threonin kináza
ATR	Ataxia Telangiectasia And Rad3 Related, serin/threonin kináza
AZA	5-azacytidin
BCL-2	B-Cell CLL/Lymphoma 2, regulátor apoptózy
Bcl-W	BCL2 Like 2, regulátor apoptózy
Bcl-X, Bcl-XL	BCL2 Like 1, regulátor apoptózy
BF	světelné pole (z angl. bright field)
BH4	Bcl-2 homology 4 domain
Bp	páry bází (z angl. base pair)
BrdU	bromodeoxyuridin
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumin)
BSL-2	biohazard úroveň 2 (z angl. biosafety level 2)
Bub1b	serin/threonin kináza B mitotického kontrolního bodu
CAR T	Chimeric Antigen Receptor T cells
CD9	člen proteinové transmembránové rodiny 4 (rodina tetraspaninů)
CDC25B	Cell Division Cycle 25B
CDC25C	Cell Division Cycle 25C
CDK4/6	cyklin dependentní kináza 4/6

CDK, CDKs	cyklin dependentní kináza/kinázy
Cdkn1a	p21, inhibitor 1A cyklin-dependentní kinázy
Cdkn2a	p16, inhibitor 2A cyklin-dependentní kinázy
cDNA	komplementární DNA (z angl. complementary DNA)
C/EBP β	CCAAT-enhancer-binding protein β
Chk1	Checkpoint Kinase 1
Chk2	Checkpoint Kinase 2
CML	chronická myeloidní leukémie
D17, D30,...	den 17, den 30,...
D	dasatinib
DAC	5-aza-2'-deoxycytidine
DDR	odpověď na poškození DNA (z angl. DNA-damage response)
DEC1	deleted in esophageal cancer 1 protein
DEP1	phosphatidylethanolamine Binding Protein 1
DMSO	dimethylsulfoxid
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát
DOX	doxycyklin
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
DRI-FOXO	D-retro inverso isoform of Fork head box O
DSB, DSBs	dvouvláknový zlom/zlomy
E2F	E2F transkripční faktor
E2F-4	E2F transkripční faktor 4
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridine
ELFO	elektroforetická separace
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
Erc	Excision Repair Endonuclease Non-Catalytic Subunit
EtOH	ethanol
FCy	průtoková cytometrie (z angl. flow cytometry)
FC	fold change
FISH	fluorescenční in situ hybridizace (z angl. fluorescence in situ hybridization)

FOXO	Fork head box O
Gal	galaktosidáza
Gal-Pro	próba na detekci aktivity (z angl. galaktosidázy galactosidase probe)
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
GATA4	GATA Binding Protein 4, transkripční faktor
GFP	zelený fluorescenční protein (z angl. green fluorescent protein)
GL13	analog SBB
GMO	geneticky modifikované organizmy
Gos, GosNČ	galakto-oligosacharidy, galakto-oligosacharidové nanočástice
Gsk3a	Glycogen Synthase Kinase 3 Alpha
H3K9, H3K9Me2	histon H3K9/methylovaný
H2AX	H2A histone family member X
HGPS	Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome
HP1	Heterochromatin protein 1
HRASv12	HRas proto-onkogen, GTPáza, na 12 pozici změna glycin→valin
HSP90	heat shock protein 90
hTERT	human telomerase reverse transcriptase,
HTS	High throughput screening
IC ₅₀	koncentrace látky inhibující buněčný růst z 50 % (z angl. The half-maximal inhibitory concentration)
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IF	imunofluorescence
IHC	imunohistochemie
IL-1 α , IL-6, IL-8	interleukin 1 α , 6, 8
IR	ozáření (z angl. irradiation)
JAK/STAT	Janus Kinase/ Signal Transducer And Activator Of Transcription
Ki67	proliferační marker
lacZ	gen pro β -galaktosidázu z Lac operonu u <i>Escherichia coli</i>
Lmna	lamin A/C
LOPAC	knihovna farmakologicky aktivních látek (z angl. Library of Pharmacologically Active Compounds)

MAPK	mitogeny aktivovaná protein kináza (z angl. Mitogen-Activated Protein Kinase)
MCM-41	Mobil Composition of Matter No. 41, mezoporézní materiál s hierarchickou strukturou z rodiny silikátových látek
MDC1	Mediator Of DNA Damage Checkpoint 1
Mdm2	proto-onkogen
MEF	myší embryonální fibroblasty (z angl. mouse embryonic fibroblast)
mH2A	histon makro H2A
MILES	The Metformin in Longevity Study
Mre11	MRE11 Homolog, reparační nukleáza dvouvláknových zlomů DNA
MRI	magnetická resonance (z angl. magnetic resonance imaging)
MRN	komplex z proteinů Mre11, Rad50 a Nbs1
mRNA	messengerová RNA
mTOR	Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase
MTS	kolorimetrická metoda na stanovení buněčné viability
Nav-Gal	galakto-konjugovaný navitoclax
NČ	nanočástice
NF-κB	nukleární faktor kappa B
NIR-BG	near infrared - β-galactosidase
NK buňky	přirozený zabiják (z angl. natural killers cells)
NKG2D	killer cell lektin like receptor K1
NOP	nociceptinový opioidní peptidový receptor
NSB1	Nijmegen breakage syndrome 1 protein
OIS	onkogenem aktivovaná senescence
OXR1	oxidation resistance 1
p16, p16 ^{INK4a}	inhibitor 2A cyklin-dependentní kinázy
p16 ^{LUC}	gen p16 pod luciferázovým promotorem
p21	inhibitor 1A cyklin-dependentní kinázy
p53	tumor protein P53
p.	pasáž
PBS	fosfátový pufr (z angl. Phosphate Buffered Saline)

PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
PEG	polyethylenglykol
PET	pozitronová emisní tomografie (z angl. Positron emission tomography)
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PL	piperlongumin
PML	promyelotická leukémie
PMS	fenazin methosulfát (z angl. Phenazine methosulfate)
Polg	katalytická podjednotka DNA polymerázy gamma
PPP1A, PP1 α	katalytická subjednotka α proteinové fosfatázy 1
pRb	protein spojený s retinoblastomem
PST	presenilin 1
Q	quercetin
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce (z angl. quantitative polymerase chain reaction)
Rad17	checkpoint clamp loader component Rad17
Rad50	reparační protein dvouvláknových zlomů Rad50
Ras	proto-onkogen Ras
RIN	RNA integrity number
ROI	cílová oblast (z angl. region of interest)
ROS	volné kyslíkové radikály (z angl. reactive oxygen species)
Rpm	otáčky za minutu (z angl. rotates per minute)
RPS6	ribosomální protein malé podjednotky 6
RPL5	ribosomální protein velké podjednotky 5
RT-PCR	reverzně transkriptázová PCR (z angl. reverse transcription PCR)
SAHF, SAHFs	heterochromatinová ohniska spojená se senescencí (z angl. senescence-associated heterochromatin foci)
SASP	sekreční fenotyp spojený se senescencí (z angl. senescence-associated secretory phenotype)
SA- β -gal	β -galaktosidáza spojená se senescencí (z angl. senescence-associated β -galactosidase)
SB	senescentní buňky
SBB	Súdánská čerň B (z angl. Sudan Black B)

SCAP/SCAPs	anti-apoptické dráhy spojené se senescencí (z angl. senescent cell anti-apoptotic pathway/s)
SCARS	segmenty DNA s chromatinovými změnami posilujícími senescenci (z angl. DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence)
SD	směrodatná odchylka (z angl. standard deviation)
SER	analýza obrazu Saddle-Edges-Ridges
Sod2	Superoxide dismutase 2
Terc	Telomerase RNA component
TGF- β	transforming growth factor β
TIF, TIFs	místa postižená dysfunkcí telomer (z angl. telomere dysfunction-induced focus)
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick-End Labeling
WB	western blot
β -gal	beta galaktosidáza
γ H2AX	fosforylovaný člen X z H2A histonové rodiny

8. Bibliografie

Publikace v časopisech s IF

Kudlova, N.; De Sanctis, J.B.; Hajduch, M. Cellular Senescence: Molecular Targets, Biomarkers, and Senolytic Drugs. *Int. J. Mol. Sci.*, **2022**, *23*, 4168. <https://doi.org/10.3390/ijms23084168>. IF: 5,92 (Příloha 1)

Kudlova, N.; Slavik, H.; Duskova, P.; Furst, T.; Srovnal, J.; Bartek, J.; Mistrik, M., Hajduch, M. An efficient, non-invasive approach for *in-vivo* sampling of hair follicles: design and applications in monitoring DNA damage and aging. *Aging*, **2021**, *13*(23), 25004–25024. <https://doi.org/10.18632/aging.203744>. IF: 5,68 (Příloha 2)

Veselovská, L.; **Kudlová, N.**; Gurská, S.; Lišková, B.; Medvedíková, M.; Hodek, O.; Tloušťová, E.; Milisavljevic, N.; Tichý, M.; Perlíková, P.; Mertlíková-Kaiserová, H.; Trylčová, J.; Pohl, R.; Klepetářová, B.; Džubák, P.; Hajdúch, M.; Hocek, M. Synthesis and Cytotoxic and Antiviral Activity Profiling of All-Four Isomeric Series of Pyrido-Fused 7-Deazapurine Ribonucleosides. *Chemistry*, **2020**, *26*(57), 13002–13015. <https://doi.org/10.1002/chem.202001124>. IF: 5,23

Tokarenko, A.; Lišková, B.; Smoleň, S.; **Táborská, N.**; Tichý, M.; Gurská, S.; Perlíková, P.; Frydrych, I.; Tloušť'ová, E.; Znojek, P.; Mertlíková-Kaiserová, H.; Poštová Slavětínská, L.; Pohl, R.; Klepetářová, B.; Khalid, N. U.; Wenren, Y.; Laposa, R. R.; Džubák, P.; Hajdúch, M.; Hocek, M. Synthesis and Cytotoxic and Antiviral Profiling of Pyrrolo- and Furo-Fused 7-Deazapurine Ribonucleosides. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2018**, *61*(20), 9347–9359. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01258>. IF: 7,44

Agrawal, K.; Das, V.; **Táborská, N.**; Gurský, J.; Džubák, P.; Hajdúch, M. Differential Regulation of Methylation-Regulating Enzymes by Senescent Stromal Cells Drives Colorectal Cancer Cell Response to DNA-Demethylating Epi-Drugs. *Stem Cells International*, **2018**, 6013728. <https://doi.org/10.1155/2018/6013728>. IF: 5,44 (Příloha 3)

Další publikační činnost

Agrawal, K.; Bouchal, J.; Das, V.; Drábek, J.; Džubák, P.; Hajdúch, M.; Koberna, K.; Ligasová, A.; Mistrík, M.; Sanctis, J.B.D.; Srovnal, J.; **Kudlová, N.** Kapitola Cell quantification v knize *Laboratory techniques in cellular and molecular medicine*, **2021**, 1st edition, Palacký University Olomouc, ISBN 978-80-244-6049-9.

Aktivní účast na konferencích s tištěným abstraktem

Kudlová, N., Slavík, H., Dušková, P., Hajdúch, M., Mistrík, M. Hair follicles as a promising biological material and their use in cellular senescence and epithelial biomarkers. *XV. Diagnostic, Predictive and Experimental Oncology Days*. Olomouc, Česká republika. 25.11. - 27.11.2019.

Kudlová, N., Slavík, H., Hajdúch, M., Mistrík, M., Hocek, M., Dušková, P. Fur is not just a coat: non-invasive sampling of mice. *EATRIS TMex*. Barcelona, Španělsko. 11.11. - 15.11.2019.

Kudlová, N., Hajdúch, M. Non-invasive approach of hair follicles sampling, their use and applications in the aging experiments. *Reactor*. Bystřice pod Pernštejnem, Česká republika. 16.9. - 18.9.2019.

Táborská, N., Rylová, G., Hajdúch, M. Fluoroquinolones and their new role in the alternative splicing. *Reactor*. Pastviny, Česká republika. 18.9. - 21.9.2018.

Táborská, N., Rylová, G., Hlaváč, J., Džubák, P., Hajdúch, M. Fluoroquinolones as perspective anti-cancer drugs. *XIII. Diagnostic, Predictive and Experimental Oncology Days*. Olomouc, Česká republika. 28.11. - 30.11.2017.

Táborská, N., Hajdúch, M. The Impact of Antibiotics on Diamond Blackfan Anemia Cell Models. *Reactor*. Pastviny, Česká republika. 14.7. - 16.7.2017.

Táborská, N., Gurská, S., Hajdúch, M., Džubák, P. X-irradiation-induced senescence model: detection of senolytic drugs in high-throughput system. *XII. Diagnostic, Predictive and Experimental Oncology Days*. Olomouc, Česká republika. 30.11. - 1.12.2016.

9. Reference

1. McHugh, D.; Gil, J. Senescence and Aging: Causes, Consequences, and Therapeutic Avenues. *J. Cell Biol.* **2018**, *217*, 65–77, doi:10.1083/JCB.201708092.
2. Hayflick, L.; Moorhead, P.S. The Serial Cultivation of Human Diploid Cell Strains. *Exp. Cell Res.* **1961**, *25*, 585–621, doi:10.1016/0014-4827(61)90192-6.
3. 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.
4. Adams, P.D. Healing and Hurting: Molecular Mechanisms, Functions, and Pathologies of Cellular Senescence. *Mol. Cell* **2009**, *36*, 2–14.
5. Kuilman, T.; Michaloglou, C.; Mooi, W.J.; Peeper, D.S. The Essence of Senescence. *Genes Dev.* **2010**, *24*, 2463–2479.
6. Yosef, R.; Pilpel, N.; Tokarsky-Amiel, R.; Biran, A.; Ovadya, Y.; Cohen, S.; Vadai, E.; Dassa, L.; Shahar, E.; Condiotti, R.; et al. Directed Elimination of Senescent Cells by Inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, doi:10.1038/ncomms11190.
7. Hubackova, S.; Davidova, E.; Rohlenova, K.; Stursa, J.; Werner, L.; Andera, L.; Dong, L.F.; Terp, M.G.; Hodny, Z.; Ditzel, H.J.; et al. Selective Elimination of Senescent Cells by Mitochondrial Targeting Is Regulated by ANT2. *Cell Death Differ.* **2019**, *26*, 276–290, doi:10.1038/s41418-018-0118-3.
8. Cai, Y.; Zhou, H.; Zhu, Y.; Sun, Q.; Ji, Y.; Xue, A.; Wang, Y.; Chen, W.; Yu, X.; Wang, L.; et al. Elimination of Senescent Cells by β -Galactosidase-Targeted Prodrug Attenuates Inflammation and Restores Physical Function in Aged Mice. *Cell Res.* **2020**, *30*, 574–589, doi:10.1038/s41422-020-0314-9.
9. Herranz, N.; Gil, J. Mechanisms and Functions of Cellular Senescence. *J. Clin. Invest.* **2018**, *128*, 1238–1246.
10. Muñoz-Espín, D.; Serrano, M. Cellular Senescence: From Physiology to Pathology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 482–496.
11. Liguori, I.; Russo, G.; Curcio, F.; Bulli, G.; Aran, L.; Della-Morte, D.; Gargiulo, G.; Testa, G.; Cacciatore, F.; Bonaduce, D.; et al. Oxidative Stress, Aging, and Diseases. *Clin. Interv. Aging* **2018**, *13*, 757, doi:10.2147/CIA.S158513.
12. Rajendran, P.; Alzahrani, A.M.; Hanieh, H.N.; Kumar, S.A.; Ben Ammar, R.; Rengarajan, T.; Alhoot, M.A. Autophagy and Senescence: A New Insight in Selected Human Diseases. *J. Cell.*

- Physiol.* **2019**, *234*, 21485–21492, doi:10.1002/JCP.28895.
13. Wang, Y.; Wang, X.D.; Lapi, E.; Sullivan, A.; Jia, W.; He, Y.W.; Ratnayaka, I.; Zhong, S.; Goldin, R.D.; Goemans, C.G.; et al. Autophagic Activity Dictates the Cellular Response to Oncogenic RAS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 13325–13330, doi:10.1073/PNAS.1120193109/-/DCSUPPLEMENTAL.
 14. Kang, C.; Xu, Q.; Martin, T.D.; Li, M.Z.; Demaria, M.; Aron, L.; Lu, T.; Yankner, B.A.; Campisi, J.; Elledge, S.J. The DNA Damage Response Induces Inflammation and Senescence by Inhibiting Autophagy of GATA4. *Science* **2015**, *349*, doi:10.1126/SCIENCE.AAA5612.
 15. Fitzwalter, B.E.; Towers, C.G.; Sullivan, K.D.; Andrysik, Z.; Hoh, M.; Ludwig, M.; O’Prey, J.; Ryan, K.M.; Espinosa, J.M.; Morgan, M.J.; et al. Autophagy Inhibition Mediates Apoptosis Sensitization in Cancer Therapy by Relieving FOXO3a Turnover. *Dev. Cell* **2018**, *44*, 555-565.e3, doi:10.1016/J.DEVCEL.2018.02.014.
 16. Mariño, G.; Niso-Santano, M.; Baehrecke, E.H.; Kroemer, G. Self-Consumption: The Interplay of Autophagy and Apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 81–94, doi:10.1038/NRM3735.
 17. Pérez-Mancera, P.A.; Young, A.R.J.; Narita, M. Inside and out: The Activities of Senescence in Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2014**, *14*, 547–558, doi:10.1038/NRC3773.
 18. García-Prat, L.; Martínez-Vicente, M.; Perdiguero, E.; Ortet, L.; Rodríguez-Ubreva, J.; Rebollo, E.; Ruiz-Bonilla, V.; Gutarra, S.; Ballestar, E.; Serrano, A.L.; et al. Autophagy Maintains Stemness by Preventing Senescence. *Nature* **2016**, *529*, 37–42, doi:10.1038/NATURE16187.
 19. Rufini, A.; Tucci, P.; Celardo, I.; Melino, G. Senescence and Aging: The Critical Roles of P53. *Oncogene* **2013**, *32*, 5129–5143.
 20. Al Bitar, S.; Gali-Muhtasib, H. The Role of the Cyclin Dependent Kinase Inhibitor P21cip1/Waf1 in Targeting Cancer: Molecular Mechanisms and Novel Therapeutics. *Cancers (Basel)*. **2019**, *11*.
 21. Benson, E.K.; Mungamuri, S.K.; Attie, O.; Kracikova, M.; Sachidanandam, R.; Manfredi, J.J.; Aaronson, S.A. P53-Dependent Gene Repression through P21 Is Mediated by Recruitment of E2F4 Repression Complexes. *Oncogene* **2014**, *33*, 3959–3969, doi:10.1038/onc.2013.378.
 22. Sharpless, N.E.; Sherr, C.J. Forging a Signature of in Vivo Senescence. *Nat. Rev. Cancer* **2015**, *15*, 397–408.
 23. Chen, J.; Huang, X.; Halicka, D.; Brodsky, S.; Avram, A.; Eskander, J.; Bloomgarden, N.A.;

- Darzynkiewicz, Z.; Goligorsky, M.S. Contribution of P16INK4a and P21CIP1 Pathways to Induction of Premature Senescence of Human Endothelial Cells: Permissive Role of P53. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **2006**, *290*, doi:10.1152/ajpheart.00364.2005.
24. Fiorentino, F.P.; Symonds, C.E.; MacAluso, M.; Giordano, A. Senescence and P130/Rb12: A New Beginning to the End. *Cell Res.* **2009**, *19*, 1044–1051, doi:10.1038/cr.2009.96.
 25. Rayess, H.; Wang, M.B.; Srivatsan, E.S. Cellular Senescence and Tumor Suppressor Gene P16. *Int. J. Cancer* **2012**, *130*, 1715–1725, doi:10.1002/ijc.27316.
 26. Beauséjour, 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, doi:10.1093/emboj/cdg417.
 27. Helmbold, H.; Kömm, K.; Deppert, W.; Bohn, W. Rb2/P130 Is the Dominating Pocket Protein in the P53–P21 DNA Damage Response Pathway Leading to Senescence. *Oncogene* **2009**, *28*, 3456–3467, doi:10.1038/onc.2009.222.
 28. Indovina, P.; Marcelli, E.; Casini, N.; Rizzo, V.; Giordano, A. Emerging Roles of RB Family: New Defense Mechanisms against Tumor Progression. *J. Cell. Physiol.* **2013**, *228*, 525–535.
 29. Helmbold, H.; Deppert, W.; Bohn, W. Regulation of Cellular Senescence by Rb2/P130. *Oncogene* **2006**, *25*, 5257–5262, doi:10.1038/sj.onc.1209613.
 30. Rayman, J.B.; Takahashi, Y.; Indjeian, V.B.; Dannenberg, J.H.; Catchpole, S.; Watson, R.J.; Riele, H.; Dynlacht, B.D. E2F Mediates Cell Cycle-Dependent Transcriptional Repression in Vivo by Recruitment of an HDAC1/MSin3B Corepressor Complex. *Genes Dev.* **2002**, *16*, 933–947, doi:10.1101/GAD.969202.
 31. Admasu, T.D.; Rae, M.; Stolzing, A. Dissecting Primary and Secondary Senescence to Enable New Senotherapeutic Strategies. *Ageing Res. Rev.* **2021**, *70*, 101412, doi:10.1016/J.ARR.2021.101412.
 32. de Jesus, B.B.; Blasco, M.A. Assessing Cell and Organ Senescence Biomarkers. *Circ. Res.* **2012**, *111*, 97–109.
 33. Noren Hooten, N.; Evans, M.K. Techniques to Induce and Quantify Cellular Senescence. *J. Vis. Exp.* **2017**, *2017*, 55533, doi:10.3791/55533.
 34. Adewoye, A.B.; Tampakis, D.; Follenzi, A.; Stolzing, A. Multiparameter Flow Cytometric Detection and Quantification of Senescent Cells in Vitro. *Biogerontology* **2020**, *21*, 773–786, doi:10.1007/s10522-020-09893-9.
 35. Schmid, N.; Flenkenthaler, F.; Stöckl, J.B.; Dietrich, K.G.; Köhn, F.M.; Schwarzer, J.U.; Kunz,

- L.; Luckner, M.; Wanner, G.; Arnold, G.J.; et al. Insights into Replicative Senescence of Human Testicular Peritubular Cells. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–14, doi:10.1038/s41598-019-51380-w.
36. Dimri, G.P.; Lee, X.; Basile, G.; Acosta, M.; Scott, G.; Roskelley, C.; Medrano, E.E.; Linskens, M.; Rubelj, I.; Pereira-Smith, O.; et al. A Biomarker That Identifies Senescent Human Cells in Culture and in Aging Skin in Vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 9363–9367, doi:10.1073/pnas.92.20.9363.
37. Debacq-Chainiaux, F.; Erusalimsky, J.D.; Campisi, J.; Toussaint, O. Protocols to Detect Senescence-Associated Beta-Galactosidase (SA-Bgal) Activity, a Biomarker of Senescent Cells in Culture and in Vivo. *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 1798–1806, doi:10.1038/nprot.2009.191.
38. Itahana, K.; Itahana, Y.; Dimri, G.P. Colorimetric Detection of Senescence-Associated β Galactosidase. *Methods Mol. Biol.* **2013**, *965*, 143–156, doi:10.1007/978-1-62703-239-1_8.
39. Piechota, M.; Sunderland, P.; Wysocka, A.; Nalberczak, M.; Sliwinska, M.A.; Radwanska, K.; Sikora, E. Is Senescence-Associated β -Galactosidase a Marker of Neuronal Senescence? *Oncotarget* **2016**, *7*, 81099–81109, doi:10.18632/oncotarget.12752.
40. de Mera-Rodríguez, J.A.; Álvarez-Hernán, G.; Gañán, Y.; Martín-Partido, G.; Rodríguez-León, J.; Francisco-Morcillo, J. Is Senescence-Associated β -Galactosidase a Reliable in Vivo Marker of Cellular Senescence During Embryonic Development? *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 36.
41. Hildebrand, D.G.; Lehle, S.; Borst, A.; Haferkamp, S.; Essmann, F.; Schulze-Osthoff, K. α -Fucosidase as a Novel Convenient Biomarker for Cellular Senescence. *Cell Cycle* **2013**, *12*, 1922–1927, doi:10.4161/cc.24944.
42. Terman, A.; Brunk, U.T. Lipofuscin: Mechanisms of Formation and Increase with Age. *APMIS* **1998**, *106*, 265–276.
43. Terman, A.; Brunk, U.T. Lipofuscin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, *36*, 1400–1404.
44. Salmonowicz, H.; Passos, J.F. Detecting Senescence: A New Method for an Old Pigment. *Aging Cell* **2017**, *16*, 432–434.
45. Evangelou, K.; Lougiakis, N.; Rizou, S. V.; Kotsinas, A.; Kletsas, D.; Muñoz-Espín, D.; Kastrinakis, N.G.; Pouli, N.; Marakos, P.; Townsend, P.; et al. Robust, Universal Biomarker Assay to Detect Senescent Cells in Biological Specimens. *Aging Cell* **2017**, *16*, 192–197, doi:10.1111/ACEL.12545.
46. Mah, L.-J.; El-Osta, A.; Karagiannis, T.C. γ H2AX as a Molecular Marker of Aging and Disease. *Epigenetics* **2010**, *5*, 129–136, doi:10.4161/epi.5.2.11080.

47. De Jager, M.; Dronkert, M.L.G.; Modesti, M.; Beerens, C.E.M.T.; Kanaar, R.; Van Gent, D.C. DNA-Binding and Strand-Annealing Activities of Human Mre11: Implications for Its Roles in DNA Double-Strand Break Repair Pathways. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 1317–1325, doi:10.1093/nar/29.6.1317.
48. Sancar, A.; Lindsey-Boltz, L.A.; Ünsal-Kaçmaz, K.; Linn, S. Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* 2004, *73*, 39–85.
49. Wang, B.; Matsuoka, S.; Carpenter, P.B.; Elledge, S.J. 53BP1, a Mediator of the DNA Damage Checkpoint. *Science (80-.)*. **2002**, *298*, 1435–1438, doi:10.1126/science.1076182.
50. Stucki, M.; Jackson, S.P. γ H2AX and MDC1: Anchoring the DNA-Damage-Response Machinery to Broken Chromosomes. *DNA Repair (Amst)*. 2006, *5*, 534–543.
51. Takai, H.; Smogorzewska, A.; De Lange, T. DNA Damage Foci at Dysfunctional Telomeres. *Curr. Biol.* **2003**, *13*, 1549–1556, doi:10.1016/S0960-9822(03)00542-6.
52. Herbig, U.; Jobling, W.A.; Chen, B.P.C.; Chen, D.J.; Sedivy, J.M. Telomere Shortening Triggers Senescence of Human Cells through a Pathway Involving ATM, P53, and P21CIP1, but Not P16INK4a. *Mol. Cell* **2004**, *14*, 501–513, doi:10.1016/S1097-2765(04)00256-4.
53. Olovnikov, A.M. Telomeres, Telomerase, and Aging: Origin of the Theory. *Exp. Gerontol.* **1996**, *31*, 443–448, doi:10.1016/0531-5565(96)00005-8.
54. Parrinello, S.; Samper, E.; Krtolica, A.; Goldstein, J.; Melov, S.; Campisi, J. Oxygen Sensitivity Severely Limits the Replicative Lifespan of Murine Fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* **2003**, *5*, 741–747, doi:10.1038/ncb1024.
55. Correia-Melo, C.; Marques, F.D.; Anderson, R.; Hewitt, G.; Hewitt, R.; Cole, J.; Carroll, B.M.; Miwa, S.; Birch, J.; Merz, A.; et al. Mitochondria Are Required for Pro-Ageing Features of the Senescent Phenotype. *EMBO J.* **2016**, *35*, 724–742, doi:10.15252/EMBJ.201592862.
56. Pole, A.; Dimri, M.; P. Dimri, G. Oxidative Stress, Cellular Senescence and Ageing. *AIMS Mol. Sci.* **2016**, *3*, 300–324, doi:10.3934/molsci.2016.3.300.
57. Agrawal, K.; Das, V.; Táborská, N.; Gurský, J.; Džubák, P.; Hajdúch, M. Differential Regulation of Methylation-Regulating Enzymes by Senescent Stromal Cells Drives Colorectal Cancer Cell Response to DNA-Demethylating Epi-Drugs. *Stem Cells Int.* **2018**, *2018*, doi:10.1155/2018/6013728.
58. Aird, K.M.; Zhang, R. Detection of Senescence-Associated Heterochromatin Foci (SAHF). *Methods Mol. Biol.* **2013**, *965*, 185–196, doi:10.1007/978-1-62703-239-1_12.

59. Zhang, R.; Chen, W.; Adams, P.D. Molecular Dissection of Formation of Senescence-Associated Heterochromatin Foci. *Mol. Cell. Biol.* **2007**, *27*, 2343–2358, doi:10.1128/MCB.02019-06.
60. Rodier, F.; Muñoz, D.P.; Teachenor, R.; Chu, V.; Le, O.; Bhaumik, D.; Coppé, J.P.; Campeau, E.; Beauséjour, C.M.; Kim, S.H.; et al. DNA-SCARS: Distinct Nuclear Structures That Sustain Damage-Induced Senescence Growth Arrest and Inflammatory Cytokine Secretion. *J. Cell Sci.* **2011**, *124*, 68–81, doi:10.1242/JCS.071340.
61. Freund, A.; Laberge, R.-M.; Demaria, M.; Campisi, J. Lamin B1 Loss Is a Senescence-Associated Biomarker. *Mol. Biol. Cell* **2012**, *23*, 2066–2075, doi:10.1091/mbc.e11-10-0884.
62. Malaquin, N.; Carrier-Leclerc, A.; Dessureault, M.; Rodier, F. DDR-Mediated Crosstalk between DNA-Damaged Cells and Their Microenvironment. *Front. Genet.* **2015**, *5*, doi:10.3389/FGENE.2015.00094.
63. Gratzner, H.G. Monoclonal Antibody to 5-Bromo- and 5-Iododeoxyuridine: A New Reagent for Detection of DNA Replication. *Science (80-.)*. **1982**, *218*, 474–475, doi:10.1126/science.7123245.
64. Buck, S.B.; Bradford, J.; Gee, K.R.; Agnew, B.J.; Clarke, S.T.; Salic, A. Detection of S-Phase Cell Cycle Progression Using 5-Ethynyl-2'-Deoxyuridine Incorporation with Click Chemistry, an Alternative to Using 5-Bromo-2'-Deoxyuridine Antibodies. *Biotechniques* **2008**, *44*, 927–929, doi:10.2144/000112812.
65. Scholzen, T.; Gerdes, J. The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown. *J. Cell. Physiol.* **2000**, *182*, 311–322.
66. Zhang, H. Molecular Signaling and Genetic Pathways of Senescence: Its Role in Tumorigenesis and Aging. *J. Cell. Physiol.* **2007**, *210*, 567–574, doi:10.1002/jcp.20919.
67. Qian, Y.; Zhang, J.; Yan, B.; Chen, X. DEC1, a Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor and a Novel Target Gene of the P53 Family, Mediates P53-Dependent Premature Senescence. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 2896–2905, doi:10.1074/JBC.M708624200.
68. Ruiz, L.; Traskine, M.; Ferrer, I.; Castro, E.; Leal, J.F.M.; Kaufman, M.; Carnero, A. Characterization of the P53 Response to Oncogene-Induced Senescence. *PLoS One* **2008**, *3*, e3230, doi:10.1371/journal.pone.0003230.
69. Cuollo, L.; Antonangeli, F.; Santoni, A.; Soriani, A. The Senescence-Associated Secretory Phenotype (Sasp) in the Challenging Future of Cancer Therapy and Age-Related Diseases. *Biology (Basel)*. **2020**, *9*, 1–16.

70. Basisty, N.; Kale, A.; Jeon, O.H.; Kuehnemann, C.; Payne, T.; Rao, C.; Holtz, A.; Shah, S.; Sharma, V.; Ferrucci, L.; et al. A Proteomic Atlas of Senescence-Associated Secretomes for Aging Biomarker Development. *PLoS Biol.* **2020**, *18*, e3000599, doi:10.1371/JOURNAL.PBIO.3000599.
71. Mrazkova, B.; Dzajak, R.; Imrichova, T.; Kyjacova, L.; Barath, P.; Dzubak, P.; Holub, D.; Hajduch, M.; Nahacka, Z.; Andera, L.; et al. Induction, Regulation and Roles of Neural Adhesion Molecule L1CAM in Cellular Senescence. *Aging (Albany, NY)*. **2018**, *10*, 434–462, doi:10.18632/AGING.101404.
72. Coppé, 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, doi:10.1146/ANNUREV-PATHOL-121808-102144.
73. Althubiti, M.; Lezina, L.; Carrera, S.; Jukes-Jones, R.; Giblett, S.M.; Antonov, A.; Barlev, N.; Saldanha, G.S.; Pritchard, C.A.; Cain, K.; et al. Characterization of Novel Markers of Senescence and Their Prognostic Potential in Cancer. **2014**, doi:10.1038/cddis.2014.489.
74. Soto-Gamez, A.; Quax, W.J.; Demaria, M. Regulation of Survival Networks in Senescent Cells: From Mechanisms to Interventions. *J. Mol. Biol.* **2019**, *431*, 2629–2643, doi:10.1016/J.JMB.2019.05.036.
75. Lee, H.W.; Heo, C.H.; Sen, D.; Byun, H.O.; Kwak, I.H.; Yoon, G.; Kim, H.M. Ratiometric Two-Photon Fluorescent Probe for Quantitative Detection of β -Galactosidase Activity in Senescent Cells. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 10001–10005, doi:10.1021/AC5031013/SUPPL_FILE/AC5031013_SI_001.PDF.
76. Zhang, J.; Li, C.; Dutta, C.; Fang, M.; Zhang, S.; Tiwari, A.; Werner, T.; Luo, F.T.; Liu, H. A Novel Near-Infrared Fluorescent Probe for Sensitive Detection of β -Galactosidase in Living Cells. *Anal. Chim. Acta* **2017**, *968*, 97–104, doi:10.1016/J.ACA.2017.02.039.
77. Lozano-Torres, B.; Galiana, I.; Rovira, M.; Garrido, E.; Chaib, S.; Bernardos, A.; Muñoz-Espín, D.; Serrano, M.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F. An OFF-ON Two-Photon Fluorescent Probe for Tracking Cell Senescence in Vivo. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 8808–8811, doi:10.1021/JACS.7B04985/SUPPL_FILE/JA7B04985_SI_001.PDF.
78. Wang, Y.; Liu, J.; Ma, X.; Cui, C.; Deenik, P.R.; Henderson, P.K.P.; Sigler, A.L.; Cui, L. Real-Time Imaging of Senescence in Tumors with DNA Damage. *Sci. Reports 2019 91* **2019**, *9*, 1–11, doi:10.1038/s41598-019-38511-z.
79. Eriksson, D.; Stigbrand, T. Radiation-Induced Cell Death Mechanisms. *Tumor Biol.* **2010**, *31*, 363–372.

80. Wang, Y.; Wang, Y.; Liu, S.; Liu, Y.; Xu, H.; Liang, J.; Zhu, J.; Zhang, G.; Su, W.; Dong, W.; et al. Upregulation of EID3 Sensitizes Breast Cancer Cells to Ionizing Radiation-Induced Cellular Senescence. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *107*, 606–614, doi:10.1016/j.biopha.2018.08.022.
81. Wang, Y.; Boerma, M.; Zhou, D. Ionizing Radiation-Induced Endothelial Cell Senescence and Cardiovascular Diseases. In Proceedings of the Radiation Research; Radiation Research Society, August 1 2016; Vol. 186, pp. 153–161.
82. Dolan, D.W.P.; Zupanic, A.; Nelson, G.; Hall, P.; Miwa, S.; Kirkwood, T.B.L.; Shanley, D.P. Integrated Stochastic Model of DNA Damage Repair by Non-Homologous End Joining and P53/P21-Mediated Early Senescence Signalling. *PLoS Comput. Biol.* **2015**, *11*, doi:10.1371/journal.pcbi.1004246.
83. Day, R.M.; Snow, A.L.; Panganiban, R.A.M. Radiation-Induced Accelerated Senescence: A Fate Worse than Death? *Cell Cycle* 2014, *13*, 2011–2012.
84. Gladyshev, V.N. The Free Radical Theory of Aging Is Dead. Long Live the Damage Theory! *Antioxidants Redox Signal.* **2014**, *20*, 727–731, doi:10.1089/ars.2013.5228.
85. Chen, Q.; Fischer, A.; Reagan, J.D.; Yan, L.J.; Ames, B.N. Oxidative DNA Damage and Senescence of Human Diploid Fibroblast Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 4337–4341, doi:10.1073/pnas.92.10.4337.
86. López-Otín, C.; Blasco, M.A.; Partridge, L.; Serrano, M.; Kroemer, G. The Hallmarks of Aging. *Cell* 2013, *153*, 1194.
87. Chen, Q.M.; Bartholomew, J.C.; Campisi, J.; Acosta, M.; Reagan, J.D.; Ames, B.N. Molecular Analysis of H₂O₂-Induced Senescent-like Growth Arrest in Normal Human Fibroblasts: P53 and Rb Control G₁ Arrest but Not Cell Replication. *Biochem. J.* **1998**, *332*, 43–50, doi:10.1042/bj3320043.
88. Chen, J.-H.; Ozanne, S.E.; Hales, C.N. Methods of Cellular Senescence Induction Using Oxidative Stress. In: 2007; pp. 179–189.
89. 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, doi:10.1016/S0092-8674(00)81902-9.
90. Gupta, R.; Wajapeyee, N. Induction of Cellular Senescence by Oncogenic RAS. *Methods Mol. Biol.* **2013**, *1048*, 127–133, doi:10.1007/978-1-62703-556-9_10.
91. Zhang, F.; Zakaria, S.M.; Höggqvist Tabor, V.; Singh, M.; Tronnorsjö, S.; Goodwin, J.;

- Selivanova, G.; Bartek, J.; Castell, A.; Larsson, L.G. MYC and RAS Are Unable to Cooperate in Overcoming Cellular Senescence and Apoptosis in Normal Human Fibroblasts. *Cell Cycle* **2018**, *17*, 2697–2715, doi:10.1080/15384101.2018.1553339.
92. The NIA Aging Cell Repository: Facilitating Research with Aging Cells | National Institute on Aging Available online: <https://www.nia.nih.gov/research/blog/2018/05/nia-aging-cell-repository-facilitating-research-aging-cells> (accessed on 19 April 2021).
93. Kudlow, B.A.; Kennedy, B.K.; Monnat, R.J. Werner and Hutchinson-Gilford Progeria Syndromes: Mechanistic Basis of Human Progeroid Diseases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007, *8*, 394–404.
94. Harkema, L.; Youssef, S.A.; De Bruin, A. Pathology of Mouse Models of Accelerated Aging., doi:10.1177/0300985815625169.
95. Yousefzadeh, M.J.; Melos, K.I.; Angelini, L.; Burd, C.E.; Robbins, P.D.; Niedernhofer, L.J. Mouse Models of Accelerated Cellular Senescence. In *Methods in Molecular Biology*; Humana Press Inc., 2019; Vol. 1896, pp. 203–230.
96. Sorrentino, J.A.; Krishnamurthy, J.; Tilley, S.; Alb, J.G.; Burd, C.E.; Sharpless, N.E. P16INK4a Reporter Mice Reveal Age-Promoting Effects of Environmental Toxicants. *J. Clin. Invest.* **2014**, *124*, 169–173, doi:10.1172/JCI70960.
97. Burd, C.E.; Sorrentino, J.A.; Clark, K.S.; Darr, D.B.; Krishnamurthy, J.; Deal, A.M.; Bardeesy, N.; Castrillon, D.H.; Beach, D.H.; Sharpless, N.E. Monitoring Tumorigenesis and Senescence In Vivo with a P16INK4a-Luciferase Model. *Cell* **2013**, *152*, 340–351, doi:10.1016/J.CELL.2012.12.010.
98. Le, O.N.L.; Rodier, F.; Fontaine, F.; Coppe, J.P.; Campisi, J.; DeGregori, J.; Laverdière, C.; Kokta, V.; Haddad, E.; Beauséjour, C.M. Ionizing Radiation-Induced Long-Term Expression of Senescence Markers in Mice Is Independent of P53 and Immune Status. *Aging Cell* **2010**, *9*, 398–409, doi:10.1111/j.1474-9726.2010.00567.x.
99. Seol, M.-A.; Jung, U.; Eom, S.; Kim, S.-H.; Park, H.-R.; Jo, S.-K. *Chronic Induction of Senescence Marker in Gamma-Irradiation Mice*;
100. Seol, M.A.; Jung, U.; Eom, H.S.; Kim, S.H.; Park, H.R.; Jo, S.K. Prolonged Expression of Senescence Markers in Mice Exposed to Gamma-Irradiation. *J. Vet. Sci.* **2012**, *13*, 331–338, doi:10.4142/jvs.2012.13.4.331.
101. Tong, J.; Hei, T.K. Aging and Age-Related Health Effects of Ionizing Radiation. *Radiat. Med. Prot.* **2020**, *1*, 15–23, doi:10.1016/j.radmp.2020.01.005.

102. Kudlova, N.; Slavik, H.; Duskova, P.; Furst, T.; Srovnal, J.; Bartek, J.; Mistrik, M.; Hajduch, M. An Efficient, Non-Invasive Approach for in-Vivo Sampling of Hair Follicles: Design and Applications in Monitoring DNA Damage and Aging. *Aging (Albany, NY)*. **2021**, *13*, 25004–25024, doi:10.18632/AGING.203744.
103. Li, S.Y.; Du, M.; Dolence, E.K.; Fang, C.X.; Mayer, G.E.; Ceylan-Isik, A.F.; LaCour, K.H.; Yang, X.; Wilbert, C.J.; Sreejayan, N.; et al. Aging Induces Cardiac Diastolic Dysfunction, Oxidative Stress, Accumulation of Advanced Glycation Endproducts and Protein Modification. *Aging Cell* **2005**, *4*, 57–64, doi:10.1111/J.1474-9728.2005.00146.X.
104. Yoo, D.Y.; Kim, W.; Lee, C.H.; Shin, B.N.; Nam, S.M.; Choi, J.H.; Won, M.H.; Yoon, Y.S.; Hwang, I.K. Melatonin Improves D-Galactose-Induced Aging Effects on Behavior, Neurogenesis, and Lipid Peroxidation in the Mouse Dentate Gyrus via Increasing PCREB Expression. *J. Pineal Res.* **2012**, *52*, 21–28, doi:10.1111/J.1600-079X.2011.00912.X.
105. Salehpour, F.; Ahmadian, N.; Rasta, S.H.; Farhoudi, M.; Karimi, P.; Sadigh-Eteghad, S. Transcranial Low-Level Laser Therapy Improves Brain Mitochondrial Function and Cognitive Impairment in D-Galactose-Induced Aging Mice. *Neurobiol. Aging* **2017**, *58*, 140–150, doi:10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2017.06.025.
106. Remigante, A.; Spinelli, S.; Trichilo, V.; Loddo, S.; Sarikas, A.; Pusch, M.; Dossena, S.; Marino, A.; Morabito, R. D-Galactose Induced Early Aging in Human Erythrocytes: Role of Band 3 Protein. *J. Cell. Physiol.* **2022**, *237*, 1586–1596, doi:10.1002/JCP.30632.
107. Sun, K.; Yang, P.; Zhao, R.; Bai, Y.; Guo, Z. Matrine Attenuates D-Galactose-Induced Aging-Related Behavior in Mice via Inhibition of Cellular Senescence and Oxidative Stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, *2018*, doi:10.1155/2018/7108604.
108. Liu, Y.; Liu, Y.; Guo, Y.; Xu, L.; Wang, H. Phlorizin Exerts Potent Effects against Aging Induced by D-Galactose in Mice and PC12 Cells. *Food Funct.* **2021**, *12*, 2148–2160, doi:10.1039/D0FO02707C.
109. Li, J. han; Wei, T. ting; Guo, L.; Cao, J. hui; Feng, Y. kang; Guo, S. ning; Liu, G. hong; Ding, Y.; Chai, Y. rong Curcumin Protects Thymus against D-Galactose-Induced Senescence in Mice. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* **2021**, *394*, 411–420, doi:10.1007/S00210-020-01945-8.
110. Wang, S.H.; Liang, C.J.; Weng, Y.W.; Chen, Y.H.; Hsu, H.Y.; Chien, H.F.; Tsai, J.S.; Tseng, Y.C.; Li, C.Y.; Chen, Y.L. Ganoderma Lucidum Polysaccharides Prevent Platelet-Derived Growth Factor-Stimulated Smooth Muscle Cell Proliferation in Vitro and Neointimal Hyperplasia in the Endothelial-Denuded Artery in Vivo. *J. Cell. Physiol.* **2012**, *227*, 3063–

- 3071, doi:10.1002/JCP.23053.
111. Lee, J.; Kim, Y.S.; Kim, E.; Kim, Y.; Kim, Y. Curcumin and Hesperetin Attenuate D-Galactose-Induced Brain Senescence in Vitro and in Vivo. *Nutr. Res. Pract.* **2020**, *14*, 438, doi:10.4162/NRP.2020.14.5.438.
 112. Chen, X.; Li, Y.; Chen, W.; Nong, Z.; Huang, J.; Chen, C. Protective Effect of Hyperbaric Oxygen on Cognitive Impairment Induced by D-Galactose in Mice. *Neurochem. Res.* **2016**, *41*, 3032–3041, doi:10.1007/S11064-016-2022-X.
 113. Sarkisian, C.J.; Keister, B.A.; Stairs, D.B.; Boxer, R.B.; Moody, S.E.; Chodosh, L.A. Dose-Dependent Oncogene-Induced Senescence in Vivo and Its Evasion during Mammary Tumorigenesis. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 493–505, doi:10.1038/ncb1567.
 114. Baek, K.H.; Ryeom, S. Detection of Oncogene-Induced Senescence in Vivo. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1534*, 185–198, doi:10.1007/978-1-4939-6670-7_18.
 115. Toogood, P.L.; Harvey, P.J.; Repine, J.T.; Sheehan, D.J.; VanderWel, S.N.; Zhou, H.; Keller, P.R.; McNamara, D.J.; Sherry, D.; Zhu, T.; et al. Discovery of a Potent and Selective Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinase 4/6. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2388–2406, doi:10.1021/JM049354H.
 116. Fry, D.W.; Harvey, P.J.; Keller, P.R.; Elliott, W.L.; Meade, M.; Trachet, E.; Albassam, M.; Zheng, X.; Leopold, W.R.; Pryer, N.K.; et al. Specific Inhibition of Cyclin-Dependent Kinase 4/6 by PD 0332991 and Associated Antitumor Activity in Human Tumor Xenografts. *Mol. Cancer Ther.* **2004**, *3*, 1427–1438, doi:10.1158/1535-7163.1427.3.11.
 117. Gelbert, L.M.; Cai, S.; Lin, X.; Sanchez-Martinez, C.; Prado, M. Del; Lallena, M.J.; Torres, R.; Ajamie, R.T.; Wishart, G.N.; Flack, R.S.; et al. Preclinical Characterization of the CDK4/6 Inhibitor LY2835219: In-Vivo Cell Cycle-Dependent/Independent Anti-Tumor Activities Alone/in Combination with Gemcitabine. *Invest. New Drugs* **2014**, *32*, 825–837, doi:10.1007/S10637-014-0120-7.
 118. Kim, S.; Loo, A.; Chopra, R.; Caponigro, G.; Huang, A.; Vora, S.; Parasuraman, S.; Howard, S.; Keen, N.; Sellers, W.; et al. Abstract PR02: LEE011: An Orally Bioavailable, Selective Small Molecule Inhibitor of CDK4/6– Reactivating Rb in Cancer. *Mol. Cancer Ther.* **2013**, *12*, PR02–PR02, doi:10.1158/1535-7163.TARG-13-PR02.
 119. Vijayaraghavan, S.; Karakas, C.; Doostan, I.; Chen, X.; Bui, T.; Yi, M.; Raghavendra, A.S.; Zhao, Y.; Bashour, S.I.; Ibrahim, N.K.; et al. CDK4/6 and Autophagy Inhibitors Synergistically Induce Senescence in Rb Positive Cytoplasmic Cyclin E Negative Cancers. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, doi:10.1038/NCOMMS15916.

120. Goel, S.; Decristo, M.J.; Watt, A.C.; Brinjones, H.; Sceneay, J.; Li, B.B.; Khan, N.; Ubellacker, J.M.; Xie, S.; Metzger-Filho, O.; et al. CDK4/6 Inhibition Triggers Anti-Tumour Immunity. *Nature* **2017**, *548*, 471–475, doi:10.1038/NATURE23465.
121. Anders, L.; Ke, N.; Hydbring, P.; Choi, Y.J.; Widlund, H.R.; Chick, J.M.; Zhai, H.; Vidal, M.; Gygi, S.P.; Braun, P.; et al. A Systematic Screen for CDK4/6 Substrates Links FOXM1 Phosphorylation to Senescence Suppression in Cancer Cells. *Cancer Cell* **2011**, *20*, 620–634, doi:10.1016/J.CCR.2011.10.001.
122. Yoshida, A.; Lee, E.K.; Diehl, J.A. Induction of Therapeutic Senescence in Vemurafenib-Resistant Melanoma by Extended Inhibition of CDK4/6. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 2990–3002, doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2931.
123. Bollard, J.; Miguela, V.; Ruiz De Galarreta, M.; Venkatesh, A.; Bian, C.B.; Roberto, M.P.; Tovar, V.; Sia, D.; Molina-Sánchez, P.; Nguyen, C.B.; et al. Palbociclib (PD-0332991), a Selective CDK4/6 Inhibitor, Restricts Tumour Growth in Preclinical Models of Hepatocellular Carcinoma. *Gut* **2017**, *66*, 1286–1296, doi:10.1136/GUTJNL-2016-312268.
124. Rader, J.; Russell, M.R.; Hart, L.S.; Nakazawa, M.S.; Belcastro, L.T.; Martinez, D.; Li, Y.; Carpenter, E.L.; Attiyeh, E.F.; Diskin, S.J.; et al. Dual CDK4/CDK6 Inhibition Induces Cell-Cycle Arrest and Senescence in Neuroblastoma. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 6173–6182, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1675.
125. Valenzuela, C.A.; Vargas, L.; Martinez, V.; Bravo, S.; Brown, N.E. Palbociclib-Induced Autophagy and Senescence in Gastric Cancer Cells. *Exp. Cell Res.* **2017**, *360*, 390–396, doi:10.1016/J.YEXCR.2017.09.031.
126. Kovatcheva, M.; Liao, W.; Klein, M.E.; Robine, N.; Geiger, H.; Crago, A.M.; Dickson, M.A.; Tap, W.D.; Singer, S.; Koff, A. ATRX Is a Regulator of Therapy Induced Senescence in Human Cells. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, doi:10.1038/S41467-017-00540-5.
127. Zhuang, C.; Miao, Z.; Wu, Y.; Guo, Z.; Li, J.; Yao, J.; Xing, C.; Sheng, C.; Zhang, W. Double-Edged Swords as Cancer Therapeutics: Novel, Orally Active, Small Molecules Simultaneously Inhibit P53-MDM2 Interaction and the NF-KB Pathway. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 567–577, doi:10.1021/JM401800K.
128. Kovatcheva, M.; Liu, D.D.; Dickson, M.A.; Klein, M.E.; O'Connor, R.; Wilder, F.O.; Socci, N.D.; Tap, W.D.; Schwartz, G.K.; Singer, S.; et al. MDM2 Turnover and Expression of ATRX Determine the Choice between Quiescence and Senescence in Response to CDK4 Inhibition. *Oncotarget* **2015**, *6*, 8226–8243, doi:10.18632/ONCOTARGET.3364.
129. Wang, B.; Varela-Eirin, M.; Brandenburg, S.M.; Hernandez-Segura, A.; Vliet, T. van;

- Jongbloed, E.M.; Wilting, S.M.; Ohtani, N.; Jager, A.; Demaria, M. Pharmacological CDK4/6 Inhibition Reveals a P53-Dependent Senescent State with Restricted Toxicity. *EMBO J.* **2022**, *41*, e108946, doi:10.15252/EMBJ.2021108946.
130. Wong, C.H.; Ma, B.B.Y.; Hui, C.W.C.; Lo, K.W.; Hui, E.P.; Chan, A.T.C. Preclinical Evaluation of Ribociclib and Its Synergistic Effect in Combination with Alpelisib in Non-Keratinizing Nasopharyngeal Carcinoma. *Sci. Reports 2018 81* **2018**, *8*, 1–8, doi:10.1038/s41598-018-26201-1.
131. Kirkland, J.L.; Tchkonja, T. Senolytic Drugs: From Discovery to Translation. *J. Intern. Med.* **2020**, *288*, 518–536, doi:10.1111/JOIM.13141.
132. Van Deursen, J.M. The Role of Senescent Cells in Ageing. *Nat. 2014 5097501* **2014**, *509*, 439–446, doi:10.1038/nature13193.
133. Sikora, E.; Bielak-Zmijewska, A.; Mosieniak, G. Targeting Normal and Cancer Senescent Cells as a Strategy of Senotherapy. *Ageing Res. Rev.* **2019**, *55*, 100941.
134. Childs, B.G.; Durik, M.; Baker, D.J.; Van Deursen, J.M. Cellular Senescence in Aging and Age-Related Disease: From Mechanisms to Therapy HHS Public Access. *Nat Med* **2015**, *21*, 1424–1435, doi:10.1038/nm.4000.
135. Dolgin, E. Send in the Senolytics. *Nat. Biotechnol.* **2020**, *38*, 1371–1377, doi:10.1038/S41587-020-00750-1.
136. Childs, B.G.; Baker, D.J.; Kirkland, J.L.; Campisi, J.; Deursen, J.M. Senescence and Apoptosis: Dueling or Complementary Cell Fates? *EMBO Rep.* **2014**, *15*, 1139–1153, doi:10.15252/embr.201439245.
137. Coppé, J.P.; Rodier, F.; Patil, C.K.; Freund, A.; Desprez, P.Y.; Campisi, J. Tumor Suppressor and Aging Biomarker P16(INK4a) Induces Cellular Senescence without the Associated Inflammatory Secretory Phenotype. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 36396–36403, doi:10.1074/JBC.M111.257071.
138. Burton, D.G.A.; Stolzing, A. Cellular Senescence: Immunosurveillance and Future Immunotherapy. *Ageing Res. Rev.* **2018**, *43*, 17–25, doi:10.1016/J.ARR.2018.02.001.
139. Pellegrini, G.; Dellambra, E.; Paterna, P.; Golisano, O.; Traverso, C.E.; Rama, P.; Lacal, P.; De Luca, M. Telomerase Activity Is Sufficient to Bypass Replicative Senescence in Human Limbal and Conjunctival but Not Corneal Keratinocytes. *Eur. J. Cell Biol.* **2004**, *83*, 691–700, doi:10.1078/0171-9335-00424.
140. Galanos, P.; Vougas, K.; Walter, D.; Polyzos, A.; Maya-Mendoza, A.; Haagensen, E.J.;

- Kokkalis, A.; Roumelioti, F.M.; Gagos, S.; Tzetzis, M.; et al. Chronic P53-Independent P21 Expression Causes Genomic Instability by Deregulating Replication Licensing. *Nat. Cell Biol.* **2016**, *18*, 777–789, doi:10.1038/ncb3378.
141. Lapasset, L.; Milhavet, O.; Prieur, A.; Besnard, E.; Babled, A.; Ät-Hamou, N.; Leschik, J.; Pellestor, F.; Ramirez, J.M.; De Vos, J.; et al. Rejuvenating Senescent and Centenarian Human Cells by Reprogramming through the Pluripotent State. *Genes Dev.* **2011**, *25*, 2248–2253, doi:10.1101/GAD.173922.111.
142. Patel, P.L.; Suram, A.; Mirani, N.; Bischof, O.; Herbig, U. Derepression of HTERT Gene Expression Promotes Escape from Oncogene-Induced Cellular Senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113*, E5024–E5033, doi:10.1073/PNAS.1602379113.
143. Saleh, T.; Tyutyunyk-Massey, L.; Gewirtz, D.A. Tumor Cell Escape from Therapy-Induced Senescence as a Model of Disease Recurrence after Dormancy. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 1044–1046, doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-3437/661365/P/TUMOR-CELL-ESCAPE-FROM-THERAPY-INDUCED-SENESCENCE.
144. Milanovic, M.; Fan, D.N.Y.; Belenki, D.; Däbritz, J.H.M.; Zhao, Z.; Yu, Y.; Dörr, J.R.; Dimitrova, L.; Lenze, D.; Monteiro Barbosa, I.A.; et al. Senescence-Associated Reprogramming Promotes Cancer Stemness. *Nat.* **2018**, *553*, 96–100, doi:10.1038/nature25167.
145. Short, S.; Fielder, E.; Miwa, S.; von Zglinicki, T. Senolytics and Senostatics as Adjuvant Tumour Therapy. *EBioMedicine* **2019**, *41*, 683–692, doi:10.1016/J.EBIOM.2019.01.056.
146. Carpenter, V.J.; Saleh, T.; Gewirtz, D.A. Senolytics for Cancer Therapy: Is All That Glitters Really Gold? *Cancers (Basel)*. **2021**, *13*, 1–25, doi:10.3390/CANCERS13040723.
147. Zhu, Y.; Tchkonja, T.; Fuhrmann-Stroissnigg, H.; Dai, H.M.; Ling, Y.Y.; Stout, M.B.; Pirtskhalava, T.; Giorgadze, N.; Johnson, K.O.; Giles, C.B.; et al. Identification of a Novel Senolytic Agent, Navitoclax, Targeting the Bcl-2 Family of Anti-Apoptotic Factors. *Aging Cell* **2016**, *15*, 428–435, doi:10.1111/acel.12445.
148. Chang, J.; Wang, Y.; Shao, L.; Laberge, R.M.; Demaria, M.; Campisi, J.; Janakiraman, K.; Sharpless, N.E.; Ding, S.; Feng, W.; et al. Clearance of Senescent Cells by ABT263 Rejuvenates Aged Hematopoietic Stem Cells in Mice. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 78–83, doi:10.1038/nm.4010.
149. Kim, H.N.; Chang, J.; Shao, L.; Han, L.; Iyer, S.; Manolagas, S.C.; O'Brien, C.A.; Jilka, R.L.; Zhou, D.; Almeida, M. DNA Damage and Senescence in Osteoprogenitors Expressing Osx1 May Cause Their Decrease with Age. *Aging Cell* **2017**, *16*, 693–703,

doi:10.1111/ACEL.12597.

150. Cang, S.; Iragavarapu, C.; Savooji, J.; Song, Y.; Liu, D. ABT-199 (Venetoclax) and BCL-2 Inhibitors in Clinical Development. *J. Hematol. Oncol.* **2015**, *8*, doi:10.1186/S13045-015-0224-3.
151. Zhu, Y.; Doornebal, E.J.; Pirtskhalava, T.; Giorgadze, N.; Wentworth, M.; Fuhrmann-Stroissnigg, H.; Niedernhofer, L.J.; Robbins, P.D.; Tchkonja, T.; Kirkland, J.L. New Agents That Target Senescent Cells: The Flavone, Fisetin, and the BCL-XL Inhibitors, A1331852 and A1155463. *Aging (Albany, NY)*. **2017**, *9*, 1–9, doi:10.18632/aging.101202.
152. Liu, Z.; Wild, C.; Ding, Y.; Ye, N.; Chen, H.; Wold, E.A.; Zhou, J. BH4 Domain of Bcl-2 as a Novel Target for Cancer Therapy. *Drug Discov. Today* **2016**, *21*, 989–996, doi:10.1016/J.DRUDIS.2015.11.008.
153. Baar, M.P.; Brandt, R.M.C.; Putavet, D.A.; Klein, J.D.D.; Derks, K.W.J.; Bourgeois, B.R.M.; Stryeck, S.; Rijksen, Y.; van Willigenburg, H.; Feijtel, D.A.; et al. Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell* **2017**, *169*, 132-147.e16, doi:10.1016/j.cell.2017.02.031.
154. Liu, X.; Wang, Y.; Zhang, X.; Gao, Z.; Zhang, S.; Shi, P.; Zhang, X.; Song, L.; Hendrickson, H.; Zhou, D.; et al. Senolytic Activity of Piperlongumine Analogues: Synthesis and Biological Evaluation. *Bioorganic Med. Chem.* **2018**, *26*, 3925–3938, doi:10.1016/j.bmc.2018.06.013.
155. Wang, Y.; Chang, J.; Liu, X.; Zhang, X.; Zhang, S.; Zhang, X.; Zhou, D.; Zheng, G. Discovery of Piperlongumine as a Potential Novel Lead for the Development of Senolytic Agents. *Aging (Albany NY)* **2016**, *8*, 2915, doi:10.18632/AGING.101100.
156. Zhang, X.; Zhang, S.; Liu, X.; Wang, Y.; Chang, J.; Zhang, X.; Mackintosh, S.G.; Tackett, A.J.; He, Y.; Lv, D.; et al. Oxidation Resistance 1 Is a Novel Senolytic Target. *Aging Cell* **2018**, *17*, 12780, doi:10.1111/ACEL.12780.
157. Samaraweera, L.; Adomako, A.; Rodriguez-Gabin, A.; McDaid, H.M. A Novel Indication for Panobinostat as a Senolytic Drug in NSCLC and HNSCC. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, doi:10.1038/S41598-017-01964-1.
158. Zhu, Y.; Tchkonja, T.; Pirtskhalava, T.; Gower, A.C.; Ding, H.; Giorgadze, N.; Palmer, A.K.; Ikeno, Y.; Hubbard, G.B.; Lenburg, M.; et al. The Achilles' Heel of Senescent Cells: From Transcriptome to Senolytic Drugs. *Aging Cell* **2015**, *14*, 644–658, doi:10.1111/ACEL.12344.
159. Yousefzadeh, M.J.; Zhu, Y.; McGowan, S.J.; Angelini, L.; Fuhrmann-Stroissnigg, H.; Xu, M.; Ling, Y.Y.; Melos, K.I.; Pirtskhalava, T.; Inman, C.L.; et al. Fisetin Is a Senotherapeutic That Extends Health and Lifespan. *EBioMedicine* **2018**, *36*, 18–28,

doi:10.1016/j.ebiom.2018.09.015.

160. Tia, N.; Singh, A.K.; Pandey, P.; Azad, C.S.; Chaudhary, P.; Gambhir, I.S. Role of Forkhead Box O (FOXO) Transcription Factor in Aging and Diseases. *Gene* **2018**, *648*, 97–105, doi:10.1016/J.GENE.2018.01.051.
161. Triana-Martínez, F.; Picallos-Rabina, P.; Da Silva-Álvarez, S.; Pietrocola, F.; Llanos, S.; Rodilla, V.; Soprano, E.; Pedrosa, P.; Ferreirós, A.; Barradas, M.; et al. Identification and Characterization of Cardiac Glycosides as Senolytic Compounds. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, doi:10.1038/s41467-019-12888-x.
162. Fuhrmann-Stroissnigg, H.; Ling, Y.Y.; Zhao, J.; McGowan, S.J.; Zhu, Y.; Brooks, R.W.; Grassi, D.; Gregg, S.Q.; Stripay, J.L.; Dorronsoro, A.; et al. Identification of HSP90 Inhibitors as a Novel Class of Senolytics. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, doi:10.1038/s41467-017-00314-z.
163. Kang, H.T.; Park, J.T.; Choi, K.; Kim, Y.; Choi, H.J.C.; Jung, C.W.; Lee, Y.S.; Park, S.C. Chemical Screening Identifies ATM as a Target for Alleviating Senescence. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 616–623, doi:10.1038/nchembio.2342.
164. Salminen, A.; Kauppinen, A.; Kaarniranta, K. Emerging Role of NF- κ B Signaling in the Induction of Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP). *Cell. Signal.* **2012**, *24*, 835–845, doi:10.1016/J.CELLSIG.2011.12.006.
165. Herranz, N.; Gallage, S.; Mellone, M.; Wuestefeld, T.; Klotz, S.; Hanley, C.J.; Raguz, S.; Acosta, J.C.; Innes, A.J.; Banito, A.; et al. MTOR Regulates MAPKAPK2 Translation to Control the Senescence-Associated Secretory Phenotype. *Nat. Cell Biol.* **2015**, *17*, 1205–1217, doi:10.1038/ncb3225.
166. Laberge, R.M.; Sun, Y.; Orjalo, A. V.; Patil, C.K.; Freund, A.; Zhou, L.; Curran, S.C.; Davalos, A.R.; Wilson-Edell, K.A.; Liu, S.; et al. MTOR Regulates the Pro-Tumorigenic Senescence-Associated Secretory Phenotype by Promoting IL1A Translation. *Nat. Cell Biol.* **2015**, *17*, 1049–1061, doi:10.1038/ncb3195.
167. Alimbetov, D.; Davis, T.; Brook, A.J.C.; Cox, L.S.; Faragher, R.G.A.; Nurgozhin, T.; Zhumadilov, Z.; Kipling, D. Suppression of the Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) in Human Fibroblasts Using Small Molecule Inhibitors of P38 MAP Kinase and MK2. *Biogerontology* **2016**, *17*, 305, doi:10.1007/S10522-015-9610-Z.
168. Wiley, C.D.; Schaum, N.; Alimirah, F.; Lopez-Dominguez, J.A.; Orjalo, A. V.; Scott, G.; Desprez, P.Y.; Benz, C.; Davalos, A.R.; Campisi, J. Small-Molecule MDM2 Antagonists Attenuate the Senescence-Associated Secretory Phenotype. *Sci. Reports* **2018**, *8*, 1–9, doi:10.1038/s41598-018-20000-4.

169. Jeon, O.H.; Kim, C.; Laberge, R.M.; Demaria, M.; Rathod, S.; Vasserot, A.P.; Chung, J.W.; Kim, D.H.; Poon, Y.; David, N.; et al. Local Clearance of Senescent Cells Attenuates the Development of Post-Traumatic Osteoarthritis and Creates a pro-Regenerative Environment. *Nat. Med.* **2017**, *23*, 775–781, doi:10.1038/NM.4324.
170. Moiseeva, O.; Deschênes-Simard, X.; St-Germain, E.; Igelmann, S.; Huot, G.; Cadar, A.E.; Bourdeau, V.; Pollak, M.N.; Ferbeyre, G. Metformin Inhibits the Senescence-Associated Secretory Phenotype by Interfering with IKK/NF-KB Activation. *Aging Cell* **2013**, *12*, 489–498, doi:10.1111/ACEL.12075.
171. Pitozzi, V.; Mocali, A.; Laurenzana, A.; Giannoni, E.; Cifola, I.; Battaglia, C.; Chiarugi, P.; Dolara, P.; Giovannelli, L. Chronic Resveratrol Treatment Ameliorates Cell Adhesion and Mitigates the Inflammatory Phenotype in Senescent Human Fibroblasts. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **2013**, *68*, 371–381, doi:10.1093/GERONA/GLS183.
172. Faget, D. V.; Ren, Q.; Stewart, S.A. Unmasking Senescence: Context-Dependent Effects of SASP in Cancer. *Nat. Rev. Cancer 2019 198* **2019**, *19*, 439–453, doi:10.1038/s41568-019-0156-2.
173. Xu, M.; Tchkonina, T.; Ding, H.; Ogrodnik, M.; Lubbers, E.R.; Pirtskhalava, T.; White, T.A.; Johnson, K.O.; Stout, M.B.; Mezera, V.; et al. JAK Inhibition Alleviates the Cellular Senescence-Associated Secretory Phenotype and Frailty in Old Age. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112*, E6301–E6310, doi:10.1073/pnas.1515386112.
174. Van Rhee, F.; Wong, R.S.; Munshi, N.; Rossi, J.F.; Ke, X.Y.; Fosså, A.; Simpson, D.; Capra, M.; Liu, T.; Hsieh, R.K.; et al. Siltuximab for Multicentric Castlemann’s Disease: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Lancet. Oncol.* **2014**, *15*, 966–974, doi:10.1016/S1470-2045(14)70319-5.
175. Raffaele, M.; Kovacovicova, K.; Biagini, T.; Lo Re, O.; Frohlich, J.; Giallongo, S.; Nhan, J.D.; Giannone, A.G.; Cabibi, D.; Ivanov, M.; et al. Nociceptin/Orphanin FQ Opioid Receptor (NOP) Selective Ligand MCOPPB Links Anxiolytic and Senolytic Effects. *GeroScience* **2022**, *44*, 463–483, doi:10.1007/S11357-021-00487-Y.
176. Can Antioxidants Be Effective Therapeutics? - PubMed Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20336590/> (accessed on 20 March 2022).
177. Firuzi, O.; Miri, R.; Tavakkoli, M.; Saso, L. Antioxidant Therapy: Current Status and Future Prospects. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 3871–3888, doi:10.2174/092986711803414368.
178. Bjelakovic, G.; Nikolova, D.; Gluud, L.L.; Simonetti, R.G.; Gluud, C. Mortality in Randomized Trials of Antioxidant Supplements for Primary and Secondary Prevention:

- Systematic Review and Meta-Analysis. *JAMA* **2007**, *297*, 842–857, doi:10.1001/JAMA.297.8.842.
179. Dallner, G.; Sindelar, P.J. Regulation of Ubiquinone Metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, *29*, 285–294, doi:10.1016/S0891-5849(00)00307-5.
180. Garrido-Maraver, J.; Cordero, M.D.; Oropesa-Ávila, M.; Fernández Vega, A.; De La Mata, M.; Delgado Pavón, A.; De Miguel, M.; Pérez Calero, C.; Villanueva Paz, M.; Cotán, D.; et al. Coenzyme Q10 Therapy. *Mol. Syndromol.* **2014**, *5*, 187–197, doi:10.1159/000360101.
181. Reeves, M.A.; Hoffmann, P.R. The Human Selenoproteome: Recent Insights into Functions and Regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 2457–2478, doi:10.1007/S00018-009-0032-4.
182. Vinceti, M.; Bonvicini, F.; Bergomi, M.; Malagoli, C. Possible Involvement of Overexposure to Environmental Selenium in the Etiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Short Review. *Ann. Ist. Super. Sanita* **2010**, *46*, 279–283, doi:10.4415/ANN_10_03_09.
183. Sanmartin, C.; Plano, D.; Font, M.; Palop, J.A. Selenium and Clinical Trials: New Therapeutic Evidence for Multiple Diseases. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 4635–4650, doi:10.2174/092986711797379249.
184. Artero, A.; Artero, A.; Tarín, J.J.; Cano, A. The Impact of Moderate Wine Consumption on Health. *Maturitas* **2015**, *80*, 3–13, doi:10.1016/J.MATURITAS.2014.09.007.
185. Bouzid, M.A.; Filaire, E.; McCall, A.; Fabre, C. Radical Oxygen Species, Exercise and Aging: An Update. *Sports Med.* **2015**, *45*, 1245–1261, doi:10.1007/S40279-015-0348-1.
186. Radak, Z.; Zhao, Z.; Koltai, E.; Ohno, H.; Atalay, M. Oxygen Consumption and Usage during Physical Exercise: The Balance between Oxidative Stress and ROS-Dependent Adaptive Signaling. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *18*, 1208–1246, doi:10.1089/ARS.2011.4498.
187. Battram, A.M.; Bachiller, M.; Martín-Antonio, B. Senescence in the Development and Response to Cancer with Immunotherapy: A Double-Edged Sword. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1–31, doi:10.3390/IJMS21124346.
188. Krizhanovsky, V.; Yon, M.; Dickins, R.A.; Hearn, S.; Simon, J.; Miething, C.; Yee, H.; Zender, L.; Lowe, S.W. Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis. *Cell* **2008**, *134*, 657–667, doi:10.1016/J.CELL.2008.06.049.
189. Sagiv, A.; Burton, D.G.A.; Moshayev, Z.; Vadai, E.; Wensveen, F.; Ben-Dor, S.; Golani, O.; Polic, B.; Krizhanovsky, V. NKG2D Ligands Mediate Immunosurveillance of Senescent Cells. *Aging (Albany, NY)*. **2016**, *8*, 328–344, doi:10.18632/AGING.100897.
190. Kale, A.; Sharma, A.; Stolzing, A.; Stolzing, A.; Desprez, P.Y.; Desprez, P.Y.; Campisi, J.;

- Campisi, J. Role of Immune Cells in the Removal of Deleterious Senescent Cells. *Immun. Ageing* 2020 171 **2020**, 17, 1–9, doi:10.1186/S12979-020-00187-9.
191. Ovadya, Y.; Landsberger, T.; Leins, H.; Vadai, E.; Gal, H.; Biran, A.; Yosef, R.; Sagiv, A.; Agrawal, A.; Shapira, A.; et al. Impaired Immune Surveillance Accelerates Accumulation of Senescent Cells and Aging. *Nat. Commun.* **2018**, 9, doi:10.1038/S41467-018-07825-3.
192. Moutsatsou, P.; Ochs, J.; Schmitt, R.H.; Hewitt, C.J.; Hanga, M.P. Automation in Cell and Gene Therapy Manufacturing: From Past to Future. *Biotechnol. Lett.* **2019**, 41, 1245–1253, doi:10.1007/S10529-019-02732-Z.
193. Kang, T.W.; Yevsa, T.; Woller, N.; Hoenicke, L.; Wuestefeld, T.; Dauch, D.; Hohmeyer, A.; Gereke, M.; Rudalska, R.; Potapova, A.; et al. Senescence Surveillance of Pre-Malignant Hepatocytes Limits Liver Cancer Development. *Nature* **2011**, 479, 547–551, doi:10.1038/NATURE10599.
194. Iannello, A.; Thompson, T.W.; Ardolino, M.; Lowe, S.W.; Raulet, D.H. P53-Dependent Chemokine Production by Senescent Tumor Cells Supports NKG2D-Dependent Tumor Elimination by Natural Killer Cells. *J. Exp. Med.* **2013**, 210, 2057–2069, doi:10.1084/JEM.20130783.
195. Eggert, T.; Wolter, K.; Ji, J.; Ma, C.; Yevsa, T.; Klotz, S.; Medina-Echeverez, J.; Longerich, T.; Forgues, M.; Reisinger, F.; et al. Distinct Functions of Senescence-Associated Immune Responses in Liver Tumor Surveillance and Tumor Progression. *Cancer Cell* **2016**, 30, 533–547, doi:10.1016/J.CCELL.2016.09.003.
196. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* **2011**, 144, 646–674, doi:10.1016/J.CELL.2011.02.013.
197. Kuilman, T.; Michaloglou, C.; Vredeveld, L.C.W.; Douma, S.; van Doorn, R.; Desmet, C.J.; Aarden, L.A.; Mooi, W.J.; Peeper, D.S. Oncogene-Induced Senescence Relayed by an Interleukin-Dependent Inflammatory Network. *Cell* **2008**, 133, 1019–1031, doi:10.1016/J.CELL.2008.03.039.
198. Acosta, J.C.; O’Loughlen, A.; Banito, A.; Guijarro, M. V.; Augert, A.; Raguz, S.; Fumagalli, M.; Da Costa, M.; Brown, C.; Popov, N.; et al. Chemokine Signaling via the CXCR2 Receptor Reinforces Senescence. *Cell* **2008**, 133, 1006–1018, doi:10.1016/J.CELL.2008.03.038.
199. Birch, J.; Passos, J.F. Targeting the SASP to Combat Ageing: Mitochondria as Possible Intracellular Allies? *Bioessays* **2017**, 39, doi:10.1002/BIES.201600235.
200. Sieben, C.J.; Sturmlechner, I.; van de Sluis, B.; van Deursen, J.M. Two-Step Senescence-Focused Cancer Therapies. *Trends Cell Biol.* **2018**, 28, 723–737,

doi:10.1016/J.TCB.2018.04.006.

201. Wang, L.; Leite de Oliveira, R.; Wang, C.; Fernandes Neto, J.M.; Mainardi, S.; Evers, B.; Liefink, C.; Morris, B.; Jochems, F.; Willemsen, L.; et al. High-Throughput Functional Genetic and Compound Screens Identify Targets for Senescence Induction in Cancer. *Cell Rep.* **2017**, *21*, 773–783, doi:10.1016/J.CELREP.2017.09.085.
202. Jochems, F.; Thijssen, B.; De Conti, G.; Jansen, R.; Pogacar, Z.; Groot, K.; Wang, L.; Schepers, A.; Wang, C.; Jin, H.; et al. The Cancer SENESCopedia: A Delineation of Cancer Cell Senescence. *Cell Rep.* **2021**, *36*, doi:10.1016/J.CELREP.2021.109441.
203. Saleh, T.; Carpenter, V.J.; Tyutyunyk-Massey, L.; Murray, G.; Levenson, J.D.; Souers, A.J.; Alotaibi, M.R.; Faber, A.C.; Reed, J.; Harada, H.; et al. Clearance of Therapy-Induced Senescent Tumor Cells by the Senolytic ABT-263 via Interference with BCL-X L -BAX Interaction. *Mol. Oncol.* **2020**, *14*, 2504–2519, doi:10.1002/1878-0261.12761.
204. Demaria, M.; O’Leary, M.N.; Chang, J.; Shao, L.; Liu, S.; Alimirah, F.; Koenig, K.; Le, C.; Mitin, N.; Deal, A.M.; et al. Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse. *Cancer Discov.* **2017**, *7*, 165–176, doi:10.1158/2159-8290.CD-16-0241.
205. Wu, H.; Schiff, D.S.; Lin, Y.; Neboori, H.J.R.; Goyal, S.; Feng, Z.; Haffty, B.G. Ionizing Radiation Sensitizes Breast Cancer Cells to Bcl-2 Inhibitor, ABT-737, through Regulating Mcl-1. *Radiat. Res.* **2014**, *182*, 618–625, doi:10.1667/RR13856.1.
206. Hann, C.L.; Daniel, V.C.; Sugar, E.A.; Dobromilskaya, I.; Murphy, S.C.; Cope, L.; Lin, X.; Hierman, J.S.; Wilburn, D.L.; Watkins, D.N.; et al. Therapeutic Efficacy of ABT-737, a Selective Inhibitor of BCL-2, in Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 2321–2328, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5031.
207. González-Gualda, E.; Pàez-Ribes, M.; Lozano-Torres, B.; Macias, D.; Wilson, J.R.; González-López, C.; Ou, H.L.; Mirón-Barroso, S.; Zhang, Z.; Lérida-Viso, A.; et al. Galacto-Conjugation of Navitoclax as an Efficient Strategy to Increase Senolytic Specificity and Reduce Platelet Toxicity. *Aging Cell* **2020**, *19*, doi:10.1111/ACEL.13142.
208. Guerrero, A.; Herranz, N.; Sun, B.; Wagner, V.; Gallage, S.; Guiho, R.; Wolter, K.; Pombo, J.; Irvine, E.E.; Innes, A.J.; et al. Cardiac Glycosides Are Broad-Spectrum Senolytics. *Nat. Metab.* **2019**, *1*, 1074–1088, doi:10.1038/S42255-019-0122-Z.
209. Triana-Martínez, F.; Picallos-Rabina, P.; Da Silva-Álvarez, S.; Pietrocola, F.; Llanos, S.; Rodilla, V.; Soprano, E.; Pedrosa, P.; Ferreirós, A.; Barradas, M.; et al. Identification and Characterization of Cardiac Glycosides as Senolytic Compounds. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1–12, doi:10.1038/s41467-019-12888-x.

210. Fung, A.S.; Wu, L.; Tannock, I.F. Concurrent and Sequential Administration of Chemotherapy and the Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor Temsirolimus in Human Cancer Cells and Xenografts. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 5389–5395, doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-3007.
211. Wang, C.; Vegna, S.; Jin, H.; Benedict, B.; Lieftink, C.; Ramirez, C.; de Oliveira, R.L.; Morris, B.; Gadiot, J.; Wang, W.; et al. Inducing and Exploiting Vulnerabilities for the Treatment of Liver Cancer. *Nat. 2019 5747777* **2019**, *574*, 268–272, doi:10.1038/s41586-019-1607-3.
212. Deng, J.; Wang, E.S.; Jenkins, R.W.; Li, S.; Dries, R.; Yates, K.; Chhabra, S.; Huang, W.; Liu, H.; Aref, A.R.; et al. CDK4/6 Inhibition Augments Antitumor Immunity by Enhancing T-Cell Activation. *Cancer Discov.* **2018**, *8*, 216–233, doi:10.1158/2159-8290.CD-17-0915.
213. Knudsen, E.S.; Kumarasamy, V.; Chung, S.; Ruiz, A.; Vail, P.; Tzetzso, S.; Wu, J.; Nambiar, R.; Sivinski, J.; Chauhan, S.S.; et al. Targeting Dual Signalling Pathways in Concert with Immune Checkpoints for the Treatment of Pancreatic Cancer. *Gut* **2021**, *70*, 127–138, doi:10.1136/GUTJNL-2020-321000.
214. Brenner, E.; Schörg, B.F.; Ahmetlić, F.; Wieder, T.; Hilke, F.J.; Simon, N.; Schroeder, C.; Demidov, G.; Riedel, T.; Fehrenbacher, B.; et al. Cancer Immune Control Needs Senescence Induction by Interferon-Dependent Cell Cycle Regulator Pathways in Tumours. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, doi:10.1038/S41467-020-14987-6.
215. Amor, C.; Feucht, J.; Leibold, J.; Ho, Y.J.; Zhu, C.; Alonso-Curbelo, D.; Mansilla-Soto, J.; Boyer, J.A.; Li, X.; Giavridis, T.; et al. Senolytic CAR T Cells Reverse Senescence-Associated Pathologies. *Nature* **2020**, *583*, 127–132, doi:10.1038/S41586-020-2403-9.
216. Agostini, A.; Mondragón, L.; Bernardos, A.; Martínez-Mañez, R.; Dolores Marcos, M.; Sancenón, F.; Soto, J.; Costero, A.; Manguan-García, C.; Perona, R.; et al. Targeted Cargo Delivery in Senescent Cells Using Capped Mesoporous Silica Nanoparticles. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2012**, *51*, 10556–10560, doi:10.1002/ANIE.201204663.
217. Muñoz-Espín, D.; Rovira, M.; Galiana, I.; Giménez, C.; Lozano-Torres, B.; Paez-Ribes, M.; Llanos, S.; Chaib, S.; Muñoz-Martín, M.; Ucerro, A.C.; et al. A Versatile Drug Delivery System Targeting Senescent Cells. *EMBO Mol. Med.* **2018**, *10*, doi:10.15252/EMMM.201809355.
218. Thapa, R.K.; Nguyen, H.T.; Jeong, J.H.; Kim, J.R.; Choi, H.G.; Yong, C.S.; Kim, J.O. Progressive Slowdown/Prevention of Cellular Senescence by CD9-Targeted Delivery of Rapamycin Using Lactose-Wrapped Calcium Carbonate Nanoparticles. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, doi:10.1038/SREP43299.
219. Ke, S.; Lai, Y.; Zhou, T.; Li, L.; Wang, Y.; Ren, L.; Ye, S. Molybdenum Disulfide Nanoparticles Resist Oxidative Stress-Mediated Impairment of Autophagic Flux and Mitigate

- Endothelial Cell Senescence and Angiogenic Dysfunctions. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2018**, *4*, 663–674,
doi:10.1021/ACSBIOMATERIALS.7B00714/SUPPL_FILE/AB7B00714_SI_001.PDF.
220. Paez-Ribes, M.; González-Gualda, E.; Doherty, G.J.; Muñoz-Espín, D. Targeting Senescent Cells in Translational Medicine. *EMBO Mol. Med.* **2019**, *11*,
doi:10.15252/EMMM.201810234.
221. Thoppil, H.; Riabowol, K. Senolytics: A Translational Bridge Between Cellular Senescence and Organismal Aging. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *7*, 367,
doi:10.3389/FCELL.2019.00367/BIBTEX.
222. Wissler Gerdes, E.O.; Misra, A.; Netto, J.M.E.; Tchkonina, T.; Kirkland, J.L. Strategies for Late Phase Preclinical and Early Clinical Trials of Senolytics. *Mech. Ageing Dev.* **2021**, *200*,
doi:10.1016/J.MAD.2021.111591.
223. Hickson, L.T.J.; Langhi Prata, L.G.P.; Bobart, S.A.; Evans, T.K.; Giorgadze, N.; Hashmi, S.K.; Herrmann, S.M.; Jensen, M.D.; Jia, Q.; Jordan, K.L.; et al. Senolytics Decrease Senescent Cells in Humans: Preliminary Report from a Clinical Trial of Dasatinib plus Quercetin in Individuals with Diabetic Kidney Disease. *EBioMedicine* **2019**, *47*, 446–456,
doi:10.1016/J.EBIOM.2019.08.069.
224. Justice, J.N.; Nambiar, A.M.; Tchkonina, T.; LeBrasseur, N.K.; Pascual, R.; Hashmi, S.K.; Prata, L.; Masternak, M.M.; Kritchevsky, S.B.; Musi, N.; et al. Senolytics in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Results from a First-in-Human, Open-Label, Pilot Study. *EBioMedicine* **2019**, *40*, 554–563, doi:10.1016/J.EBIOM.2018.12.052.
225. Piskovatska, V.; Stefanyshyn, N.; Storey, K.B.; Vaiserman, A.M.; Lushchak, O. Metformin as a Geroprotector: Experimental and Clinical Evidence. *Biogerontology* **2019**, *20*, 33–48,
doi:10.1007/S10522-018-9773-5.
226. Farsad-Naeimi, A.; Alizadeh, M.; Esfahani, A.; Darvish Aminabad, E. Effect of Fisetin Supplementation on Inflammatory Factors and Matrix Metalloproteinase Enzymes in Colorectal Cancer Patients. *Food Funct.* **2018**, *9*, 2025–2031, doi:10.1039/C7FO01898C.
227. UNITY Biotechnology Announces 12-Week Data from UBX0101 Phase 2 Clinical Study in Patients with Painful Osteoarthritis of the Knee | Unity Biotechnology Available online: <https://ir.unitybiotechnology.com/news-releases/news-release-details/unity-biotechnology-announces-12-week-data-ubx0101-phase-2> (accessed on 21 July 2022).
228. Pascual-Vargas, P.; Cooper, S.; Sero, J.; Bousgouni, V.; Arias-Garcia, M.; Bakal, C. RNAi Screens for Rho GTPase Regulators of Cell Shape and YAP/TAZ Localisation in Triple

- Negative Breast Cancer. *Sci. Data* 2017 41 **2017**, 4, 1–13, doi:10.1038/sdata.2017.18.
229. Sparrow, J.R.; Duncker, T. Fundus Autofluorescence and RPE Lipofuscin in Age-Related Macular Degeneration. *J. Clin. Med.* 2014, Vol. 3, Pages 1302-1321 **2014**, 3, 1302–1321, doi:10.3390/JCM3041302.
230. Kirkland, J.L.; Tchkonina, T.; Zhu, Y.; Niedernhofer, L.J.; Robbins, P.D. The Clinical Potential of Senolytic Drugs. *J. Am. Geriatr. Soc.* **2017**, 65, 2297, doi:10.1111/JGS.14969.
231. Griñán-Ferré, C.; Sarroca, S.; Ivanova, A.; Puigoriol-Illamola, D.; Aguado, F.; Camins, A.; Sanfeliu, C.; Pallàs, M. Epigenetic Mechanisms Underlying Cognitive Impairment and Alzheimer Disease Hallmarks in 5XFAD Mice. *Aging (Albany NY)* **2016**, 8, 664, doi:10.18632/AGING.100906.
232. Kritsilis, M.; Rizou, S. V.; Koutsoudaki, P.N.; Evangelou, K.; Gorgoulis, V.G.; Papadopoulos, D. Ageing, Cellular Senescence and Neurodegenerative Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, 19, doi:10.3390/IJMS19102937.
233. Gire, V.; Roux, P.; Wynford-Thomas, D.; Brondello, J.M.; Dulic, V. DNA Damage Checkpoint Kinase Chk2 Triggers Replicative Senescence. *EMBO J.* **2004**, 23, 2554–2563, doi:10.1038/SJ.EMBOJ.7600259.
234. Campisi, J. Cancer, Aging and Cellular Senescence. *In Vivo* **2000**, 14, 183–188.
235. Itahana, K.; Dimri, G.; Campisi, J. Regulation of Cellular Senescence by P53. *Eur. J. Biochem.* **2001**, 268, 2784–2791, doi:10.1046/J.1432-1327.2001.02228.X.
236. Collado, M.; Serrano, M. Senescence in Tumours: Evidence from Mice and Humans. *Nat. Rev. Cancer* 2010 101 **2010**, 10, 51–57, doi:10.1038/nrc2772.
237. Brown, J.P.; Wei, W.; Sedivy, J.M. Bypass of Senescence After Disruption of P21CIP1/WAF1 Gene in Normal Diploid Human Fibroblasts. *Science (80-.)*. **1997**, 277, 831–834, doi:10.1126/SCIENCE.277.5327.831.
238. Hall, B.M.; Balan, V.; Gleiberman, A.S.; Strom, E.; Krasnov, P.; Virtuoso, L.P.; Rydkina, E.; Vujcic, S.; Balan, K.; Gitlin, I.; et al. Aging of Mice Is Associated with P16(Ink4a)- and β -Galactosidase-Positive Macrophage Accumulation That Can Be Induced in Young Mice by Senescent Cells. *Aging (Albany. NY)*. **2016**, 8, 1294–1315, doi:10.18632/AGING.100991.
239. Liu, J.Y.; Souroullas, G.P.; Diekman, B.O.; Krishnamurthy, J.; Hall, B.M.; Sorrentino, J.A.; Parker, J.S.; Sessions, G.A.; Gudkov, A. V.; Sharpless, N.E. Cells Exhibiting Strong P16 INK4a Promoter Activation in Vivo Display Features of Senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2019**, 116, 2603–2611,

doi:10.1073/PNAS.1818313116/SUPPL_FILE/PNAS.1818313116.SAPP.PDF.

240. Sherr, C.J.; DePinho, R.A. Cellular Senescence: Minireview Mitotic Clock or Culture Shock? *Cell* **2000**, *102*, 407–410, doi:10.1016/S0092-8674(00)00046-5.
241. Wright, W.E.; Shay, J.W. Telomere Dynamics in Cancer Progression and Prevention: Fundamental Differences in Human and Mouse Telomere Biology. *Nat. Med.* **2000**, *6*, 849–851, doi:10.1038/78592.
242. Rodier, F.; Coppé, J.P.; Patil, C.K.; Hoeijmakers, W.A.M.; Muñoz, 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, doi:10.1038/ncb1909.
243. Tsai, K.K.C.; Stuart, J.; Chuang, Y.Y.E.; Little, J.B.; Yuan, Z.M. Low-Dose Radiation-Induced Senescent Stromal Fibroblasts Render Nearby Breast Cancer Cells Radioresistant. <https://doi.org/10.1667/RR1764.1> **2009**, *172*, 306–313, doi:10.1667/RR1764.1.
244. Guillon, J.; Petit, C.; Moreau, M.; Toutain, B.; Henry, C.; Roché, H.; Bonichon-Lamichhane, N.; Salmon, J.P.; Lemonnier, J.; Campone, M.; et al. Regulation of Senescence Escape by TSP1 and CD47 Following Chemotherapy Treatment. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 1–19, doi:10.1038/s41419-019-1406-7.
245. Li, M.; You, L.; Xue, J.; Lu, Y. Ionizing Radiation-Induced Cellular Senescence in Normal, Non-Transformed Cells and the Involved DNA Damage Response: A Mini Review. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*.
246. Kirschner, K.; Rattanavirotkul, N.; Quince, M.F.; Chandra, T. Functional Heterogeneity in Senescence. *Biochem. Soc. Trans.* **2020**, *48*, 765, doi:10.1042/BST20190109.
247. Tuttle, C.S.L.; Luesken, S.W.M.; Waaijer, M.E.C.; Maier, A.B. Senescence in Tissue Samples of Humans with Age-Related Diseases: A Systematic Review. *Ageing Res. Rev.* **2021**, *68*, 101334, doi:10.1016/J.ARR.2021.101334.
248. Roger, L.; Tomas, F.; Gire, V.; Galderisi, U.; Bernardo, G. Di Mechanisms and Regulation of Cellular Senescence. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, Page 13173 **2021**, *22*, 13173, doi:10.3390/IJMS222313173.
249. von Kobbe, C. Targeting Senescent Cells: Approaches, Opportunities, Challenges. *Aging (Albany NY)* **2019**, *11*, 12844, doi:10.18632/AGING.102557.
250. Marthandan, S.; Menzel, U.; Priebe, S.; Groth, M.; Guthke, R.; Platzer, M.; Hemmerich, P.; Kaether, C.; Diekmann, S. Conserved Genes and Pathways in Primary Human Fibroblast

- Strains Undergoing Replicative and Radiation Induced Senescence. *Biol. Res.* **2016**, *49*, 34, doi:10.1186/S40659-016-0095-2.
251. Bourgeron, T.; Xu, Z.; Doumic, M.; Teixeira, M.T. The Asymmetry of Telomere Replication Contributes to Replicative Senescence Heterogeneity. *Sci. Reports 2015 51* **2015**, *5*, 1–11, doi:10.1038/srep15326.
252. Chen, Z.; Cao, K.; Xia, Y.; Li, Y.; Hou, Y.; Wang, L.; Li, L.; Chang, L.; Li, W. Cellular Senescence in Ionizing Radiation (Review). *Oncol. Rep.* **2019**, *42*, 883–894, doi:10.3892/OR.2019.7209/HTML.
253. González-Gualda, E.; Baker, A.G.; Fruk, L.; Muñoz-Espín, D. A Guide to Assessing Cellular Senescence *in Vitro* and *in Vivo*. *FEBS J.* **2021**, *288*, 56–80, doi:10.1111/febs.15570.
254. Kim, B.C.; Yoo, H.J.; Lee, H.C.; Kang, K.A.; Jung, S.H.; Lee, H.J.; Lee, M.; Park, S.; Ji, Y.H.; Lee, Y.S.; et al. Evaluation of Premature Senescence and Senescence Biomarkers in Carcinoma Cells and Xenograft Mice Exposed to Single or Fractionated Irradiation. *Oncol. Rep.* **2014**, *31*, 2229–2235, doi:10.3892/OR.2014.3069/HTML.
255. Peng, X.; Wu, Y.; Brouwer, U.; van Vliet, T.; Wang, B.; Demaria, M.; Barazzuol, L.; Coppes, R.P. Cellular Senescence Contributes to Radiation-Induced Hyposalivation by Affecting the Stem/Progenitor Cell Niche. *Cell Death Dis. 2020 1110* **2020**, *11*, 1–11, doi:10.1038/s41419-020-03074-9.
256. 1-5 Years - UAB Nathan Shock Center | UAB Available online: <https://www.uab.edu/shockcenter/resources/methuselah-bestuary/1-5-years> (accessed on 7 June 2022).
257. Prieto, L.I.; Graves, S.I.; Baker, D.J. Insights from In Vivo Studies of Cellular Senescence. *Cells* **2020**, *9*, doi:10.3390/CELLS9040954.
258. Capparelli, C.; Chiavarina, B.; Whitaker-Menezes, D.; Pestell, T.G.; Pestell, R.G.; Hult, J.; Andò, S.; Howell, A.; Martinez-Outschoorn, U.E.; Sotgia, F.; et al. CDK Inhibitors (P16/P19/P21) Induce Senescence and Autophagy in Cancer-Associated Fibroblasts, “Fueling” Tumor Growth via Paracrine Interactions, without an Increase in Neo-Angiogenesis. <http://dx.doi.org/10.4161/cc.21884> **2012**, *11*, 3599–3610, doi:10.4161/CC.21884.
259. L, D.; P, P.; C, T.; B, P.; A, H.; I, J.; N, C.; A, V.; AD, M.; H, I.; et al. Targeted Senolytic Prodrug Is Well Tolerated and Results in Amelioration of Frailty, Muscle Regeneration and Cognitive Functions in Geriatric Mice. **2020**, doi:10.21203/RS.3.RS-92962/V1.
260. Otaño-Rivera, V.; Boakye, A.; Grobe, N.; Almutairi, M.M.; Kursan, S.; Mattis, L.K.; Castrop, H.; Gurley, S.B.; Elased, K.M.; Boivin, G.P.; et al. A Highly Efficient Strategy to Determine

Genotypes of Genetically-Engineered Mice Using Genomic DNA Purified from Hair Roots.
Lab. Anim. **2017**, *51*, 138–146, doi:10.1177/0023677216646088.

261. (10) Direct PCR on Hair Follicles: A Rapid and Non-Invasive Genotyping Technique for Large Mouse Colonies | Request PDF Available online:
https://www.researchgate.net/publication/327117478_Direct_PCR_on_hair_follicles_a_rapid_and_non-invasive_genotyping_technique_for_large_mouse_colonies (accessed on 8 June 2022).
262. Vesela, B.; Matalova, E. Detection of Bim and Puma in Mouse Hair Follicles Using Immunofluorescence and TUNEL Assay Double Staining. *Biotech. Histochem.* **2015**, *90*, 587–593, doi:10.3109/10520295.2015.1062916.
263. Ressler, S.; Bartkova, J.; Niederegger, H.; Bartek, J.; Scharffetter-Kochanek, K.; Jansen-Dürr, P.; Wlaschek, M. P16INK4A Is a Robust in Vivo Biomarker of Cellular Aging in Human Skin. *Aging Cell* **2006**, *5*, 379–389, doi:10.1111/J.1474-9726.2006.00231.X.

10. Přílohy

Celý text publikací souvisejících s disertační prací. Příloha 1 byla využita v teoretickém úvodu práce, přílohy 2 a 3 jsou zakomponovány v části experimentální.

Příloha 1

Kudlova, N.; De Sanctis, J.B.; Hajduch, M. Cellular Senescence: Molecular Targets, Biomarkers, and Senolytic Drugs. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 4168. <https://doi.org/10.3390/ijms23084168>

Příloha 2

Kudlova, N.; Slavik, H.; Duskova, P.; Furst, T.; Srovnal, J.; Bartek, J.; Mistrik, M., Hajduch, M. An efficient, non-invasive approach for *in-vivo* sampling of hair follicles: design and applications in monitoring DNA damage and aging. *Aging*, **2021**, *13*(23), 25004–25024. <https://doi.org/10.18632/aging.203744>

Příloha 3

Agrawal, K.; Das, V.; **Táborská, N.**; Gurský, J.; Džubák, P.; Hajdúch, M. Differential Regulation of Methylation-Regulating Enzymes by Senescent Stromal Cells Drives Colorectal Cancer Cell Response to DNA-Demethylating Epi-Drugs. *Stem cells international*, **2018**, 6013728. <https://doi.org/10.1155/2018/6013728>



Review

Cellular Senescence: Molecular Targets, Biomarkers, and Senolytic Drugs

Natalie Kudlova ¹, Juan Bautista De Sanctis ^{1,2} and Marian Hajduch ^{1,2,*}

¹ Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, 77147 Olomouc, Czech Republic; natalie.taborska@upol.cz (N.K.); juan.desanctis@upol.cz (J.B.D.S.)

² Institute of Molecular and Translational Medicine Czech Advanced Technologies and Research Institute, Palacky University, 77147 Olomouc, Czech Republic

* Correspondence: marian.hajduch@upol.cz; Tel.: +42-0-585632082

Abstract: Cellular senescence is defined as irreversible cell cycle arrest caused by various processes that render viable cells non-functional, hampering normal tissue homeostasis. It has many endogenous and exogenous inducers, and is closely connected with age, age-related pathologies, DNA damage, degenerative disorders, tumor suppression and activation, wound healing, and tissue repair. However, the literature is replete with contradictory findings concerning its triggering mechanisms, specific biomarkers, and detection protocols. This may be partly due to the wide range of cellular and in vivo animal or human models of accelerated aging that have been used to study senescence and test senolytic drugs. This review summarizes recent findings concerning senescence, presents some widely used cellular and animal senescence models, and briefly describes the best-known senolytic agents.

Keywords: senescence; aging; cellular model; mouse model; senolytics

Citation: Kudlova, N.; De Sanctis, J.; Hajduch, M. Cellular senescence: Molecular targets, biomarkers, and senolytic drugs. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 4168. <https://doi.org/10.3390/ijms23084168>

Academic Editors: Umberto Galderisi and Giovanni Di Bernardo

Received: 14 March 2022

Accepted: 5 April 2022

Published: 10 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Senescence and aging are closely connected but not synonymous processes. Aging is a predictable natural gradual process of the organism and occurs due to pro-aging mechanisms such as DNA damage, peroxidation, protein misfolding, resulting in cell death or senescence. Senescence is the process of the stable and irreversible growth arrest of cells. This process contributes to aging and age-related diseases, but also physiologically protects multicellular organisms from neoplasia [1].

The permanent arrest of proliferation at the cellular level was first studied by Hayflick and Moorehead in 1961, who showed that the lifespan of primary human cells was limited to approximately 60 divisions [2]. Since then, senescence has been a popular topic in biomedical research. Senescent cells have been described in detail along with the molecular mechanisms underlying senescence as well as associated pathways and/or possible targets [3–5]. More recently, there have been studies on the selective elimination of senescent cells and the subsequent tissue rejuvenation or alleviation of disease symptoms [6–8]. As a result of these efforts, the definition of senescence has evolved from that initially proposed by Hayflick [2] and others [9,10]. It is currently defined as a cellular condition responding to intrinsic or extrinsic factors (Figure 1), including oncogene activation, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, irradiation, and exposure to chemotherapeutics [5]. Recently, the oxidative stress theory of aging has been broadly discussed. It is based on the hypothesis that during aging cells lose their functions due to ROS-induced damage [11].

The early stage of senescence is initiated in response to one or more of these stimuli. During this stage, the senescent cells undergo characteristic morphological changes, becoming flat and enlarged. This process is accompanied by nuclear chromatin remodeling and loss of lamin B1, the induction of an oxidative metabolism in mitochondria, and the activation of the senescent cells' anti-apoptotic pathway (SCAP), making the cells resistant to death. Senescence-associated β -galactosidase activity (SA- β -gal) is also observed due to an increase in lysosomal activity, and the senescence-associated secretory phenotype (SASP) is induced. The hallmarks of senescence are illustrated in Figure 2. Autophagy is also closely connected with senescence, although its precise role is unknown [9]. Autophagy is a process of the degradation of damaged macromolecules or organelles by lysosomes in cells after stress stimuli contributing to homeostasis in organisms. It may be associated with both apoptosis and senescence [12]. Interestingly, an increased level of autophagy leads to cell death, whereas the inhibition of autophagy can trigger senescence [13,14]. For instance, autophagy in cancer cells can interfere with apoptosis [15], but in some cases it can actually cause cell death [16]. Similar contradictory evidence can be found for senescence. Autophagy is a pro-senescence inducer in some cases [17], while in other situations, impaired autophagy can also lead to senescence progression in certain cell types [18]. The majority of recent publications indicate that the outcome of autophagy and senescence interplay depends on the cell type, microenvironment, and perhaps other circumstances. The importance of senescence in organisms is controversial; it has been considered beneficial because it was suggested to be an important anti-cancer mechanism and to play key roles during embryonic development and wound healing. However, it has also been suggested that it is detrimental because it reduces the regenerative capacity of tissue, leading to aging, tissue degeneration, and cancer [10]. Both views are likely valid depending on circumstances, context, age, and health conditions.

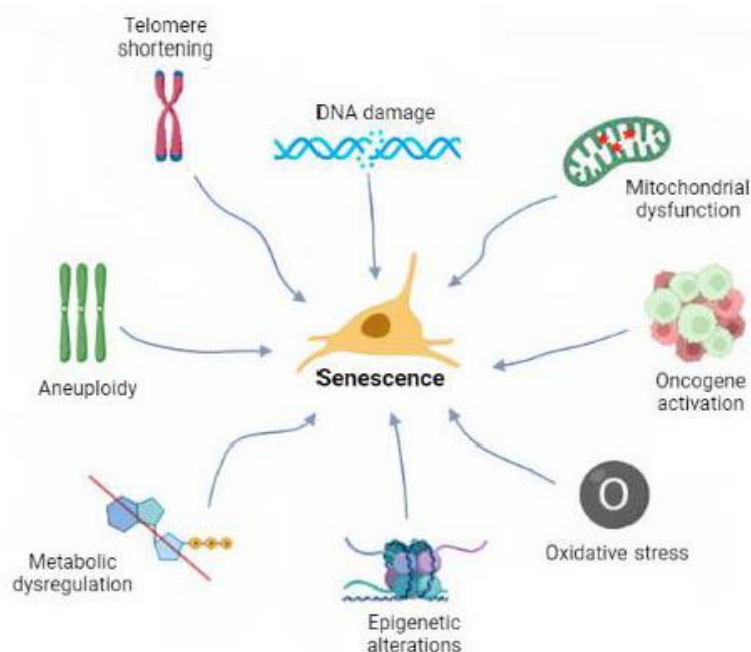


Figure 1. Cellular senescence can be induced by several stimuli. The first to be identified was telomere shortening, which is closely connected to so-called replicative senescence. Genomic changes, including DNA damage, oncogene activation, aneuploidy, and epigenetic changes, can also lead to

senescence. Other factors that may contribute to irreversible cell cycle arrest include mitochondrial dysfunction, large-scale ROS generation, and metabolic dysregulation.

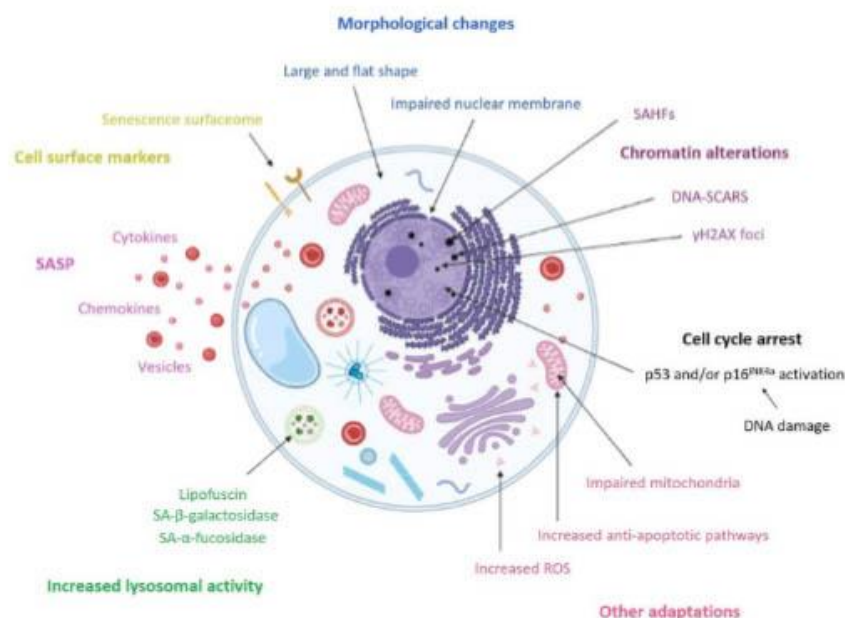


Figure 2. General hallmarks of cellular senescence. Markers strongly associated with senescence and seen in the majority of senescent cells include an enlarged size and flattened shape. The other features shown in this figure are not exclusive to senescence but are collectively considered hallmarks of the phenomenon. Senescent cells commonly exhibit the activation of the p53 and/or p16 pathways leading to irreversible cell cycle arrest, chromatin changes, and nuclear envelope disturbance. An increased lysosomal mass leading to enhanced SA-β-galactosidase activity is also often seen and, thus, SA-β-galactosidase activity is probably the most frequently used marker of senescence. Senescent cells may also exhibit strong paracrine secretion (SASP), severe mitochondrial disturbance associated with the activation of anti-apoptotic pathways, and other various characteristics.

Two major senescence-associated pathways have been highlighted in the recent literature. Both are triggered by various internal or external stimuli and the DNA damage response (DDR) and lead to the activation of the p53 and/or p16^{INK4a} pathways. The p53 and p21 proteins are essential for the initial phase of senescence, in which cells stop dividing but remain metabolically active. The role of p53 during this phase depends on its concentration and post-translational modification as well as the microenvironment. The expression of p21, which is the main p53 effector, increases dramatically during the initial phase but then decreases as senescence progresses. P21 contributes to G1/S and G2/M cell cycle arrest by specifically modulating the activity of the p53 targets CDC25B, CDC25C, and surviving [19–21]. At this stage, senescence is still reversible. Once the cells pass the critical point and senescence becomes irreversible, they enter the second phase—senescence maintenance. This phase is controlled by p16^{INK4a}/pRb [22,23] (Figure 3). During senescence maintenance, p16 expression increases dramatically; accordingly, recent findings have shown that it plays a major role in this phase. Specifically, p16 and p21 inhibit the activity of cyclin–CDK complexes and, thereby, regulate the phosphorylation of Rb family members and E2F target gene expression [24]. Three Rb family members involved in protein–protein interactions, Rb/p105, p107, and Rbl2/p130, are associated with senescence. In particular, senescence progression in human cells depends heavily on a complex of

Rb1/p130 and E2F-4, which regulates E2F target genes. This complex is inactivated by CDKs in response to cell cycle progression stimuli. However, if the CDKs are inhibited, the Rb proteins remain active and repress cell cycle progression [25–28]. Rb family members, and especially Rb1/p130, thus, play important roles in cell cycle arrest and senescence maintenance. However, while the entire Rb family appears to be involved in senescence, the functions of most of its members have yet to be fully elucidated [29,30].

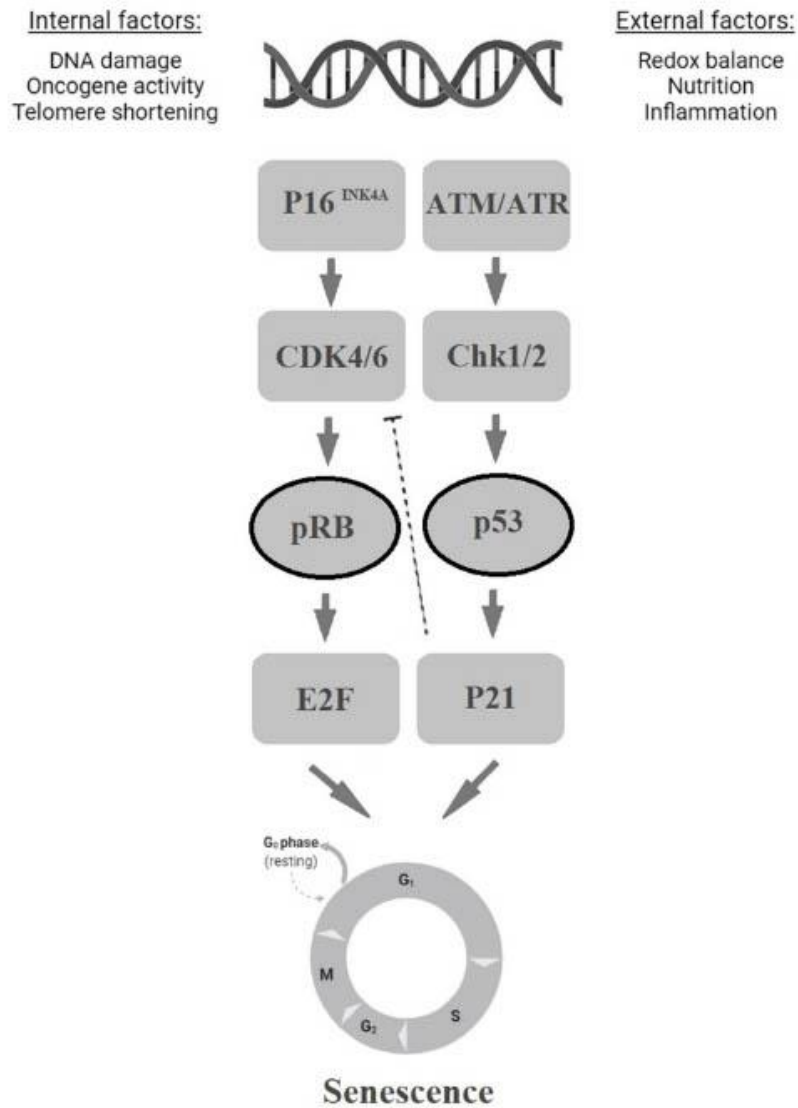


Figure 3. Senescence activation via the p53 and p16^{INK4A} pathways. Many stress factors can initiate senescence via the p16 and/or p53 pathways. Under specific circumstances, p16 inactivates CDK4/6, which leads to pRb accumulation and the regulation of the E2F transcription factors, resulting in

senescence. DNA damage and DDR can also lead to ATM-Chk2 or ATR-Chk1 regulation with subsequent p53 and p21 activation [10].

2. Senescence Biomarkers and Detection Methods

Senescent cells have several morphological and biochemical characteristics that are used for their detection *in vitro* and/or *in vivo* [31,32]. Because no single marker is sufficient to unequivocally identify a senescent cell, combinations of markers and analytical techniques are typically used to increase the specificity of detection. Some markers that are frequently used for this purpose are listed below in Table 1. As mentioned previously, senescent cells are usually large and flat, and these morphological characteristics can be observed using light microscopy or flow cytometry (FC) [33,34]. Other techniques commonly used to detect senescent cells include immunofluorescence (IF), immunohistochemistry (IHC), Western blotting (WB), reporter assays, dye incorporation, enzymatic staining, PCR (polymerase chain reaction), FISH (fluorescence *in situ* hybridization), and ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). The most suitable detection method will depend on the objectives of the study and the chosen senescence model. Below we briefly describe some of the most important markers of each type.

2.1. Structural Change-Based Markers

The first major group of senescence markers consists of markers associated with structural changes in aging cells. In addition to the previously mentioned changes in cellular size and shape, senescence is often accompanied by an increase in lysosomal activity that can be detected by enzymatic staining [32]. A particularly notable senescence-associated lysosomal enzyme is senescence-associated β -galactosidase (SA- β -galactosidase), which has a pH optimum of pH 6.0 [35–37]. For a long time, SA- β -gal was the gold standard for senescent cell detection, but recent studies have raised concerns about its specificity. For example, SA- β -gal is active in neurons [38] and expressed in developing embryos [39], but neither of these observations is thought to be associated with senescence. Consequently, SA- β -gal activity cannot be considered specific enough to identify senescent cells by itself, although it remains widely used because its activity is closely related to aging and cellular proliferation status. Another frequently exploited hallmark of senescence is SA- α -fucosidase activity, which increases with lysosomal activation during aging. Importantly, its upregulation may be more specific than that of SA- β -gal [40]. Additionally useful as a marker of senescence is lipofuscin—a yellowish-brown residue consisting of incompletely degraded or metabolized lipids in lysosomes—that accumulates in aging tissues. Its presence can be detected using light microscopy, by exploiting its autofluorescence, or by Sudan Black B (SBB) staining [41,42]. A new biotin-conjugated SBB was developed for sensitive lipofuscin detection (GL13) that can be visualized using a specific anti-biotin antibody was also recently reported [43].

Another class of sensitive senescence indicators consists of DDR gene products, whose expression is usually visualized by immunofluorescence [32]. The DDR protein most commonly used for this purpose is γ H2AX phosphorylated at Ser-139, which accumulates at double-stranded DNA break sites [44] and enables the detection of double-strand break (DSB) repair pathway proteins. The formation of a DSB leads to the binding of the MRN complex (Mre11/Rad50/NSB1), which plays a key role in detecting DSBs [45] and recruits and activates the ATM (ataxia-telangiectasia mutated) and ATR (ATM and Rad3-related) protein kinases, [46] which can also be used as markers of cellular aging. Other notable markers in this group include 53BP1, which co-localizes with γ H2AX [47]; MDC1, which facilitates the recruitment of ATM kinase and, thus, promotes further H2AX phosphorylation [48]; Rad17, which reacts to local replication stress [49] and telomere dysfunction-induced foci (TIF) [50]. The downregulation of telomerase and telomere shortening, which can be measured by qPCR or FISH, are also useful markers of replicative cellular aging [51].

Premature senescence can be induced in human and murine cells by oxidative stress resulting from exposure to oxygen and certain hydroperoxides. These and other stressors provoke ROS (reactive oxygen species) production and subsequent DDR, leading to senescence induction [52]. Unsurprisingly, several authors have also linked senescence to mitochondrial dysfunction because mitochondria are major ROS producers. However, the induction of senescence by oxidative stress seems to involve complex and poorly understood processes. A recent study identified mitochondrial ROS as essential senescence inducers on the basis that artificial mitochondrial depletion in models of senescence caused cell cycle arrest without triggering key hallmarks of senescence: there was no increase in SA- β -galactosidase activity, many SASP factors were absent, and there was no upregulation of p16 and p21 [53]. ROS, and mitochondrial ROS in particular, are thus, potential biomarkers of oxidative stress-induced senescence that can be detected by fluorimetry or flow cytometry [54].

Epigenetic changes are also promising markers of senescence in human cells [55]. A notable example is the formation of senescence-associated heterochromatin foci (SAHF), which are heterochromatin domains that contribute to the silencing of proliferation-promoting genes in senescent cells [56]. SAHFs are easily detectable by DAPI or Hoechst 33342 staining and subsequent confocal microscopy visualization [32]. These thick structures bind to several proteins including heterochromatin protein 1 (HP1) and the methylated form of histone H3K9 [57], which can be detected by IF and could thus also serve as senescence markers. Another interesting senescence-associated epigenetic change is the formation of DNA-SCARS (DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence). These chromatin structures may be near-universal senescence markers because they appear in a majority of senescence subtypes and bind to several proteins related to DDR and promyelocytic leukemia protein (PML) bodies [58].

The structure of the nuclear lamina changes during senescence, which can affect both nuclear morphology and gene expression. Accordingly, the loss of lamin B1 was observed during DNA damage-, replicative-, and oncogene-induced senescence in human and mouse cell lines. In addition, lamin B1 mRNA and protein levels in murine tissues fell during irradiation-induced senescence experiments, making this protein another valuable senescence marker. The content of lamin B1 in the nuclear membrane can be determined by qPCR, IF, or WB [59].

Cell Cycle Arrest-Based markers

There are some important negative markers associated with cell cycling that should be absent in senescent cells. In particular, assays based on the incorporation of bromodeoxyuridine (BrdU) [60] and/or 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) [61] should show low or absent DNA synthesis, and there should be no expression of Ki67, a protein that is exclusively expressed in proliferating cells and is present during all cell cycle phases except G0 [62].

As might be expected, proteins belonging to the p16/RB and p53/p21 senescence induction pathways are also common senescence markers. In particular, the overexpression of p16^{INK4a}, pRB, phospho-pRB, or p21, p53, and phospho-p53 can be determined by WB, IHC, and/or IF [63]. Less well-known molecules from these pathways, such as DEC1 and PPP1A, have also been identified as potential biomarkers. DEC1 is a basic helix-loop-helix transcription factor that mediates p53-dependent premature senescence [64], while PPP1A is a catalytic subunit of PP1 α that is active in the p53-mediated pathway during oncogene-induced senescence (OIS) [65].

2.2. SASP-Associated Markers

Some studies have tracked cytokine secretion associated with the SASP, which is characterized by the extensive secretion of pro-inflammatory compounds [66]. The secretion of SASP factors into the microenvironment of tissues is induced during damage- or oncogene-induced senescence and can be detected by WB, ELISA, or SASP-specific assays.

The detection of several SASP-associated compounds and structures has been discussed in recent publications, but confirming senescence based on these markers alone is very challenging and the results obtained can be misleading because these substances are also secreted by non-senescent cells under some conditions. The SASP Atlas protein database was recently made available to address this issue [67]. Common SASP factors secreted by senescent cells include signaling molecules such as interleukins (e.g., IL-6 and IL-8), membrane-shaded adhesion molecules [68], and other growth factors [69].

2.3. Other Markers

A final important group of senescence markers consists of plasma membrane-associated proteins such as ICAM-1 or DEPI, which are expressed strongly during senescence [70]. In addition, senescent cells exhibit elevated levels of pro-survival/anti-apoptotic proteins such as Bcl-2 and Bcl-X. The suspension of apoptosis can be confirmed by detecting an absence of Annexin V or the cleaved forms of certain caspases [6,71].

It is important to note that there are ongoing efforts to identify alternative and more specific senescence markers, so a comprehensive list of all reported markers would be very difficult to compile. However, the preceding discussion and the table below cover all of the main biomarker groups and name several important biomarkers from each group.

Table 1. Notable senescence markers and methods used for their detection.

Senescent Cell Feature	Biomarker	Marker Level Change	Senescence Type	Detection Method
morphological changes	morphology, size	wide and flattened	general	light microscopy, FC
lysosomal activity	SA- β -galactosidase	increased	general	enzymatic staining
	SA- α -fucosidase	increased	general	enzymatic staining
	Lipofuscin	increased	general	SBB, GL13
DNA damage, DDR	γ H2AX	increased	general/damage-induced	IF
	Mre11	increased	general/damage-induced	IF
	Rad50	increased	general/damage-induced	IF
	NSB1	increased	general/damage-induced	IF
	ATM	increased	general/damage-induced	IF
	ATR	increased	general/damage-induced	IF
	53BP1	increased	general/damage-induced	IF
	MDC1	increased	general/damage-induced	IF
	Rad17	increased	general/damage-induced	IF
TIF	increased	general/damage-induced	IF	

low/lack of DNA synthesis	BrdU	de-creased	general	staining incorporation, IF
	EdU	de-creased	general	staining incorporation, IF
lack of proliferation	Ki67	de-creased	general	IHC, IF
p16/pRB pathway	p16INK4a	in-creased	general	WB, IHC, IF
	pRB	in-creased	general	WB, IHC, IF
	phospho-pRB	in-creased	general	WB, IHC, IF
p53/p21 pathway	p53	in-creased	general/damage-induced	WB, IHC, IF
	p21	in-creased	general/damage-induced	WB, IHC, IF
	phospho-p21	in-creased	general/damage-induced	WB, IHC, IF
	DEC1	in-creased	general/damage-induced	IHC, IF, special assay
	PPP1A	in-creased	general/damage-induced	IHC, special assay
ROS	ROS	in-creased	general/oxidative stress-induced	fluorometry, FC
telomere length	telomere	de-creased	replicative-induced	qPCR, FISH
SAHFs	SAHFs	in-creased	general/damage-induced	DAPI/Hoechst, confocal microscopy
	HP1-gamma	in-creased	general/damage-induced	IF, IHC
	H3K9-methylation	in-creased	general/damage-induced	IF
	PML bodies	in-creased	general/damage-induced	IF
nuclear membrane	lamin B1	de-creased	general	WB, IF, qPCR
cytokine secretion	SASPs	in-creased	damage-/oncogene-induced	WB, ELISA, SASP-assay
others	plasma membrane proteins	in-creased	general/replicative-/oncogene-induced	IF, WB, IHC, FC
	apoptosis elimination	absent	general	IF, IHC

2.4. Probes for Tracing Senescent Cells

Many fluorescent probes have recently been designed to monitor β -gal activity in senescent cells in vitro. Initially, they were validated only on human cells transfected with plasmids bearing the *Escherichia coli lacZ* gene. However, such models cannot reproduce the endogenous cellular β -gal activity caused by senescence. The first fluorescent probe for tracking senescent cells in vitro was tested in human diploid fibroblasts in replicative senescence. This probe emits blue-to-yellow light in response to β -gal activity and exhibits

excellent photostability as well as low toxicity [72]. A few years later, Gal-Pro was introduced as a highly photostable fluorescent probe that responds rapidly and sensitively to β -gal activity in living cells undergoing oxidative stress-induced senescence [73]. These probes have different chemical structures but are similar in that they are initially non-fluorescent (OFF) in cells but are converted into fluorescent (ON) forms by the activity of β -gal, leading to the emission of detectable light. For *in vivo* imaging, one can use AHGa, which is an OFF/ON fluorescent probe containing a bond that is cleaved by β -gal in chemotherapy-induced senescent cells in mice [74]. Another recently developed probe for detecting senescent cells in cell culture and animal models is NIR-BG. This compound responded very well in drug-/radiation-/chemotherapy-induced senescent cells [75]. However, clinical applications of these probes are limited by their poor tissue penetration, which prevents detection by MRI or PET.

3. Cellular Models of Senescence

In vitro experiments are used to study biological phenomena in a controlled environment, potentially enabling the detailed analysis of multiple events simultaneously. However, cell and tissue culture flasks cannot perfectly replicate the external environments of cells in the tissues of an intact organism. There are two main ways of studying senescence *in vitro*: (1) by inducing senescence in the target cell line using exogenous factors, and (2) by using a cell line model designed for use in aging experiments or similar studies.

Replicative senescence *in vitro* is induced quite easily by simply passaging cells in culture. Due to constant telomere shortening [50,76], senescent cells are obtained in a few days or weeks, depending on the cell type and passage. Typical protocols for inducing replicative senescence in human diploid fibroblasts (e.g., WI-38 or IMR-90) include a culturing method, a splitting time, and confluence recommendations. However, all conditions and parameters must be optimized individually for specific cell types [32].

Multiple factors can initiate stress-induced or premature senescence [5]. The induction factor most commonly used *in vitro* and *in vivo* is radiation, which causes accelerated senescence in both cancer and normal non-malignant cells [77,78]. A key parameter in senescence induction by radiation is the dose: lower doses (0.5–10 Gy) cause senescence but higher doses (>10 Gy) can induce apoptosis. These responses depend on the severity of the radiation-induced DNA damage and DDR pathway activity [79]. Moreover, the effects of fractionated radiation can differ from that of the same quantity of radiation delivered in a single dose. For example, low-dose fractionated radiation induced the p53/p21 pathway, resulting in a more significant senescence phenotype than a single higher dose even though the same total dose administered was identical [80]. Therefore, radiation-induced senescence depends on four crucial factors: (1) the dose rate, which affects the type and rate of DNA damage and the subsequent DDR; (2) the transformation and/or differentiation status of the targeted cells, e.g., cancer versus normal somatic cells may respond differently; (3) the cell type; and (4) the growth rate. Thus, the induction of senescence may differ among various cells in the same organ [81]. A typical protocol for inducing senescence with radiation involves applying a 10 Gy dose followed by light microscopy monitoring of morphological changes. Senescence markers are subsequently analyzed, but no sooner than from 7 to 10 days after irradiation [32].

ROS, such as hydrogen peroxide, superoxide anions, and hydroxyl radicals, are also important senescence induction factors because the oxidative stress resulting from ROS exposure causes damage [82] that can provoke senescence in human and rodent cells [52,83]. ROS production is triggered by exogenous and endogenous sources. The most important source is mitochondria, whose dysfunction has repeatedly been linked to aging and senescence [84]. The ROS generator most used to induce senescence *in vitro* is hydrogen peroxide. However, when using H_2O_2 for this purpose, its concentration must be optimized for each cell type individually by performing dose-response experiments to avoid cell death; high ROS concentrations promote apoptosis whereas lower doses activate the

p53/p21 pathway [85]. Senescence is induced by incubating cells in a growth medium containing an appropriate H_2O_2 concentration (typically in the range from 50–800 μM) for four days. This treatment is then repeated and the shape of the cells is monitored; the onset of premature senescence is indicated by the detection of morphological changes resembling those associated with replicative senescence [86].

Senescence is one of several anti-neoplastic defense mechanisms in cells; instead of transformation, cells may enter a so-called intermediate state and become senescent. This process can be imitated in the laboratory, enabling the artificial induction of a senescence-like state through oncogene activation combined with the accumulation of tumor suppressors such as p53 and p16. The oncogene Ras can be used for this purpose [87]; a Ras-based protocol producing retrovirus-containing cells within six days has been developed involving transduction using the HRASv12 retroviral vector followed by puromycin selection and monitoring of typical senescence markers [88]. It was also reported that oncogene-induced senescence (OIS) can be triggered by using doxycycline-inducible expression of mutant RASV12 in a BJ-Ras system [89]. Unfortunately, retrovirus manipulation requires a biosafety level 2 (BSL-2) facility, making these protocols difficult to implement in some laboratories. It is also not always easy to obtain ready-to-use senescent cell lines, although an aging cell repository exists [90].

4. Animal in Vivo Senescence Models

In vivo studies can confirm in vitro findings and represent an important intermediate step between experiments on cell cultures and clinical trials. Animal models, particularly murine models, are usually used to follow up on and evaluate in vitro findings. In addition, the results of in vivo experiments can provide otherwise inaccessible insights into senescence induction mechanisms and facilitate the identification of possible therapeutic targets. Importantly, animal models are based on intact organisms and, thus, include all of the effects that individual tissues and molecular pathways have on each other. In general, the artificial induction factors or induction systems used in murine models of senescence and/or aging are very similar or identical to those used in cellular models. Because different murine models and methods of inducing senescence have different qualities and effects, care must be taken to ensure that the chosen model is well-suited to the planned experiments and their objectives.

Animal models of senescence often use naturally aged mice (mostly ≥ 2 years old) [8], but this approach is inevitably time-consuming. Consequently, artificial murine models exhibiting accelerated aging have been developed. These models have genetic characteristics similar to those seen in human progeroid syndromes, such as Hutchinson–Gilford progeria syndrome (HGPS), Werner syndrome, XFE progeria, or Trichothiodystrophy [91], and undergo premature aging that resembles natural aging. These genetically modified animals exhibit the abnormal expression of genes encoding cell cycle checkpoint components (Cdkn2a, p53, Bub1b, etc.), proteins involved in DNA repair and maintenance (Erc genes, Polg, Terc, etc.), proteins affecting nuclear mechanical properties (Lmna), ROS scavenging enzymes (Sod2), and signaling pathway components (Gsk3a) [92]. For many such models, senescent cells can only be detected during end-point analyses using euthanized animal tissues. Methods that have been used include qRT-PCR analysis of p16 or p21 in snap-frozen tissues, measurement of SA- β -galactosidase activity in fresh tissue samples, and ISH of p16 in fixed samples. Other markers such as ATM, ATR, H2AX, p53 or p21, and/or SASP factors are also sometimes examined by immunoblotting. Alternatively, murine blood can be collected to determine the expression of p16 in peripheral blood T lymphocytes, or plasma/serum can be sampled to evaluate senescence-associated changes in the secretion of SASP factors such as chemokines, cytokines, and matrix metalloproteinases using ELISA-based methods [93]. Long-term in vivo monitoring of senescence markers, such as p16, can also be achieved through imaging. The most famous model used for this purpose is known as the p16LUC mouse. These animals express the luciferase gene under the control of the p16INK4a promoter throughout their genome.

Luciferase is, therefore, expressed whenever the p16 promoter is activated during senescence induction and can be detected by injecting the mice with the substrate luciferin, whose processing by luciferase generates measurable luminescence. In this case, euthanasia is performed only after the target marker is detected and the induction of senescence has been confirmed, unlike in other methods [94].

Premature aging can also be induced in mice by treatment with ionizing radiation. It is generally accepted that there is a close relationship between radiation sensitivity and aging. A dose from 5–10 Gy is typically used, depending on the irradiation susceptibility of the mouse strain in question. A single or a fractionated dose serves as the senescence induction factor. Depending on the aims of the experiment, one may irradiate the whole animal or just a part of the body, which is gentler in general. Two to six-month-old mice are suitable for irradiation, and non-irradiated mice can be used as controls. Alternatively, one can use two animal groups of different ages, e.g., 2-month-old animals as a young group and 24-month-old animals as old controls. The organs most frequently collected for examination are the lungs, liver, and kidneys, although the brain is sometimes a useful source of information. The isolation of nucleic acids followed by PCR analysis may be performed to obtain information on changes in gene expression. In addition, Western blot analysis may be used to clarify changes in protein levels, IF can be used to perform immunological analysis, and classical SA- β gal assays or measurements of BrdU incorporation may be helpful in some cases [95–98].

Recently, we have developed the method to obtain mouse and human hair follicular cells for genotyping, quantitative PCR, and quantitative immunofluorescence. The follicular cells were conveniently and non-invasively used for routine genotyping and the monitoring of cellular senescence in natural and experimentally (radiation)-induced aging [99].

Other ways of inducing artificial senescence are less commonly used *in vivo*. Oxidative stress is rarely used as an induction factor in mice, except for the D-galactose model. D-galactose serves as an artificial senescence inducer in animal models. Increased D-galactose induces ROS production and decreases antioxidant enzyme capacity. This particularly affects the brain, leading to memory loss, learning impairment, cognitive dysfunction, senescent cell accumulation in the brain tissue, shorter lifespan, and weakness, all resembling the aging phenotype [100–102]. The mechanism of D-galactose-induced aging is not clear, but recent studies indicate the accumulation of advanced glycation end products and ROS in tissues and cells, for instance, erythrocytes [103]. Usually, 2- to 3-month-old mice are administered with a daily injection of D-galactose (100–500 mg/kg/day) subcutaneously for 7–12 weeks. The animal model is most frequently used for the functional testing of memory affected by senescent cell accumulation and their possible elimination with senolytics [104–107]. Importantly, the D-galactose senescence induction model was also validated *in vitro* [108], and relevant biomarkers such as p16, p21, p53, and/or SA- β gal were detected [109]. Controlled oncogene activation to induce senescence in animals presents several difficulties; depending on the overall conditions, Ras-activating mutations may cause either proliferation or senescence in mice. This was demonstrated in a study using doxycycline-inducible transgenic mice, in which the outcome was shown to depend strongly on the Ras activation level, low activation promoted proliferation, while high activation triggered cellular senescence. These results indicate that Ras can be used to induce artificial senescence *in vivo* but its activation must be titrated very carefully [110]. In addition to the doxycycline-based transgenic model, Ras activation is used in a model designed for lung cancer research where the oncogene is activated by the intranasal administration of viral precipitates [111].

A decade ago, the CDK4/6 inhibitors (abemaciclib, palbociclib, ribociclib) were introduced to the clinic for the treatment of solid tumors. Those compounds induce G1 cell cycle arrest in cells and tissues [112–115]. The effect on treated cells depends on various factors, but in general, the compounds induce quiescence or senescence. Quiescent cells retain the capacity to exit the cell cycle arrest, whereas senescent cells perform a highly

stable or permanent phenotype. CDK4/6 inhibitors were proven as quiescence and/or senescence inducers in vitro and in vivo in many studies [116–125]. A widely used protocol for senescence induction in mice consists of 14-week-old mice treated with abemaciclib administrated intraperitoneally [126] and palbociclib [116] or ribociclib applied by oral gavage [127]. Although cellular and animal models indicate the specific role of senescence in both the efficacy and toxicity of CDK4/6 inhibitors, the importance of senescence in clinical settings remains to be clarified.

5. Premature Aging Therapy

Aging is closely connected to an increased risk of many chronic diseases (including heart failure, myocardial infarction, dementia, strokes, many cancers, diabetes, blindness, or metabolic, renal, lung and bone dysfunctions), geriatric syndromes (frailty, sarcopenia, falls, incontinence, and cognitive impairment), the general deterioration of physical condition (leading to prolonged recovery from injury and increased incidence of infection), and mortality [128]. Because senescence contributes to many age-related pathologies [129], there is great interest in alleviating or eliminating the burden of senescence. This has led to the emergence in the last ten years of a new scientific discipline called senotherapy that focuses on aging, life extension, and quality of life while aging [130]. Key objectives in senotherapy are to increase the human lifespan and rejuvenate the function of certain tissues. The elimination of senescent cells from cell cultures, tissues, and even whole organisms may be possible with the assistance of senolytic drugs [131]. At present, major research areas within senotherapy include (i) searching for new senolytic drugs; (ii) determining the efficacy, selectivity, side effects, and other features of senolytic drugs in vitro, in vivo, and more recently, in humans; (iii) identifying effective drug delivery strategies; (iv) optimizing dosing and drug administration schedules; (v) identifying optimal markers of senescence to monitor therapeutic efficacy. Interest in this field has grown rapidly as potential clinical applications have emerged, and many start-ups and biotech companies have invested resources, time, and money into senolytic drug research [132]. Because this field is evolving rapidly, new findings are frequently reported, and new terminology has emerged. A glossary of commonly used terms relating to senescence is presented in Table 2.

Table 2. Basic glossary of new terms associated with senescence and senotherapy.

Term	Description
Senescence	Biological aging. Process of senescent cells (SCs) accumulation, SCs do not function, but they are metabolically active and remain in tissues. SCs are closely associated with age-related disorders.
Senotherapy (Senolysis)	Removal of senescent cells.
Senolytic drugs (Senolytics)	Class of drugs selectively eliminating SCs.
Senoblockers	Agents affecting epigenetic regulators to reactivate programs of youthfulness and regeneration.
Senomorphics	Small molecules inhibiting SASP.
Senostatics	Drugs interfering cells entering to senescence.
Senomodulators	Drugs suppressing SASP activity.
Senosuppressors	Therapeutics slowing down SCs accumulation rate.

5.1. Senolytic and/or Senotoxic Small Molecules

When considering senolytic drug research, a few major therapeutic approaches and targets stand out. Logically, the first approach proposed in this area involved targeting the senescent cells themselves, in particular their resistance to apoptosis [133] and other pathways involved in senescence. However, efforts have also been made to target the SASP, which is a key characteristic of senescent cells that is regulated independently from

cell cycle arrest. [134] In addition, it is possible to induce the immune system to target senescent cells [135], and it may be possible to revoke the irreversibility of senescent cell fate [136]. Until recently, the cell cycle arrest of senescent cells was considered irreversible, but new studies have demonstrated they can re-enter the cell cycle in tumors [137] or can be reprogrammed into pluripotent stem cells [138]. As previously discussed, cells respond to oncogene activation with cellular senescence activation, but it is not always permanent. Cells may enter cell cycle again after some time spent in senescence, particularly if they gain epigenetic alterations derepressing the expression of anti-senescence genes, for instance, hTERT [139]. Tumor senescence is also one of the strategies of cancer cells to avoid the cytotoxic effects of anticancer therapy allowing survival in dormancy. Unfortunately, this may result in reservoir of tumor cells for future disease recurrence [140]. With regards to possible anticancer therapy, we can mention senescence key signaling molecules such as p16, p21, and p53 that also operate as regulators of stemness, because a gain of stemness in cancer cells can influence tumor aggressiveness and clinical outcome. It was shown that senescence-associated stemness is a detrimental feature helping cells to exit from cell cycle arrest and cause tumor recurrence [137,141]. Therefore, potential future use of senolytics includes anticancer therapies [142,143]. The most important targets of senolytic drugs identified to date are illustrated in Figure 4.

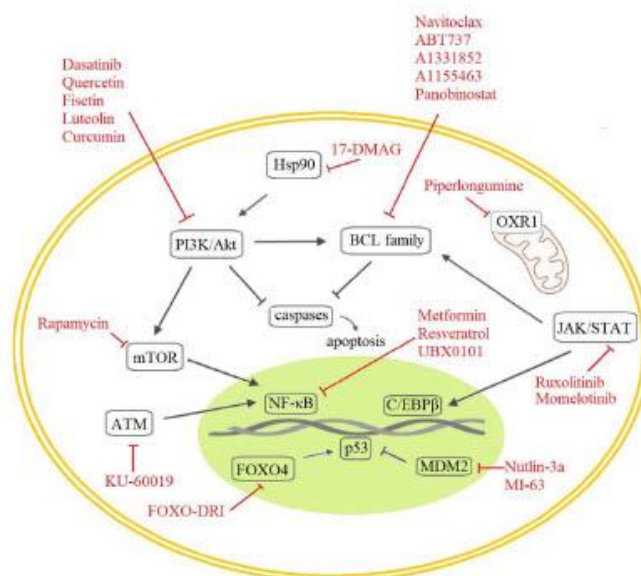


Figure 4. Molecular targets of senolytic drugs.

Senescent cells are characterized by the activation of anti-apoptotic pathways involving the BCL-2 protein family, p53, and the PI3K/AKT axis. Consequently, many current senolytic drug candidates target these proteins.

5.1.1. Anti-Apoptotic Pathways

The inhibition of BCL-2 family proteins causes selective apoptosis in senescent cells. Navitoclax (ABT263) and its paralogue ABT-737 are first-generation senolytic drugs that inhibit BCL-2, BCL-X_L, and BCL-w and thereby induce apoptosis in diverse cell types [6,144,145]. Both drugs also deplete senescent cells *in vivo* in sublethal irradiated and/or naturally aged mice [6,146], and Navitoclax suppresses SASP factor release in cells from

old mice [146]. An unfortunate drawback of these compounds is their toxicity towards neutrophils and platelets, which limits their potential for clinical development [147]. This problem prompted the development of second-generation BCL-2 family inhibitors such as A1331852 and A1155463, which cause apoptosis in some human cell types [148]. Another notable anti-apoptotic target for senolytic drugs is the BH4 domain, which is the functional component of all anti-apoptotic protein family members [149]. Potentially useful starting points for developing new senolytic agents targeting this domain include the recently discovered alkaloid Piperlongumine (PL) [150] and its analogs Geldanamycin, Tanespimycin, and Alvepimycin [151]. PL is a natural compound isolated from trees of the *Piper* genus that preferentially kills oncogene activation-/radiation-/replicative stress-induced senescent cells. Its effects were initially attributed to the induction of apoptosis [152], but more recent results suggest that it targets OXR1 (oxidation resistance 1), a protein that is upregulated in some senescent human cells and which regulates the expression of many antioxidant enzymes. PL binds OXR1 directly, leading to its degradation [153]. A final notable anti-apoptotic senolytic drug is Panobinostat, which suppresses Bcl-X_L expression in chemotherapy-induced senescent cells [154].

5.1.2. PI3K and Other Kinases

The first generation of hypothesis-driven senolytics includes some well-established small molecule drugs such as Dasatinib (D) and the flavonoid Quercetin (Q), which target multiple tyrosine kinases and PI3K, respectively. Dasatinib was originally an anti-cancer agent but also has senolytic effects in human senescent adipocyte progenitors. Quercetin is a natural compound with senolytic effects in umbilical vein endothelial cells. Their individual and combined senolytic effects have been demonstrated in vitro and in vivo [155]. Another compound in this group is the naturally occurring flavone Fisetin, which inhibits the PI3K/Akt pathway and has a stronger in vitro senolytic effect than quercetin, while also displaying lower toxicity and more selective Bcl-x_L inhibition than Navitoclax. Other notable flavones are luteolin and curcumin, which performed well when tested together with Fisetin as a combined senolytic treatment [148,156]. However, the D + Q combination provided better overall senolytic performance.

5.1.3. The p53 and p16 Axis and The DDR Pathway

As mentioned in the preceding sections, the p53 pathway plays a key role in regulating apoptosis and senescence and is, therefore, an attractive target for senotherapy. FOXO (Fork head box O) transcription factors are involved in diverse cellular functions including the induction of cell cycle arrest and senescence following interactions with p53 [157]. It was recently shown that the D-retro inverso (DRI)-isoform of FOXO4 can perturb the interaction of FOXO4 with p53 and thereby cause p53 to be excluded from the nucleus, triggering apoptosis in senescent cells both in vitro and in aged mice [150,158]. High-throughput screening of a small library of compounds in *Ercc1*^{-/-} mouse embryo fibroblasts (MEFs) with diminished repair capacity also revealed HSP90 inhibitors to be potentially useful senolytic agents: the HSP90 inhibitor 17-DMAG reduced p16 expression in both MEFs and a human progeroid syndrome model (*Ercc1*^{-/-} mice) [159]. Another screen identified the novel ATM inhibitor KU-60019 as a drug that alleviates senescence. ATM regulates lysosomal acidification, and treatment with KU-60019 reduced SA-β-galactosidase activity eliminated dysfunctional mitochondria and induced metabolic reprogramming in human fibroblasts. In addition, treatment with this compound facilitated wound healing in aged mice [160].

Another approach to senolytic discovery involves targeting a different characteristic of senescent cells—the SASP, i.e., their secretion of growth factors, chemokines, and cytokines. Under certain conditions, suppressing the deleterious paracrine and autocrine SASP effect can be more beneficial than affecting cell cycle arrest [134]. Many signaling pathways are at least partially involved in SASP regulation (mTOR, MAPK, PI3K, and GATA4/p62). They intersect in the induction of NF-κB and the CCAAT/enhancer binding

protein beta (C/EBP β) pathway, which offers a wide range of targets for senotherapy [66]. NF- κ B is the major signaling pathway involved in SASP activation [161].

5.1.4. NF- κ B and C/EBP β Regulation

Senolytic drugs can also directly target NF- κ B or C/EBP β , or upstream regulators of NF- κ B. For example, the serine/threonine kinase mTOR influences IL-1 α expression and activates NF- κ B via its interactions with the MAPK pathway. Accordingly, the mTOR inhibitor rapamycin was recently shown to cause the partial suppression or degradation of SASP components [162,163]. MAPK inhibitors (primarily p38MAPK inhibitors) have also been tested for senolytic activity but have only shown interesting results in some cell types or induced at best partial senolytic effects [163,164]. However, the activity of NF- κ B can be suppressed by Nutlin-3a in a p53-dependent manner because it inhibits Mdm2. Similar results were obtained with two other Mdm2 inhibitors, UBX0101 and MI-63 [124,165,166]. In addition, metformin and resveratrol reduce the nuclear translocation of NF- κ B, leading to the inhibition of some SASP components and have, therefore, been studied as potential senolytic drugs [167,168]. Another transcription factor influencing the expression of SASP components is C/EBP β , which is regulated by JAK/STAT pathway activation [169]. The drugs Ruxolitinib (INCB18424) and Momelotinib (CYT387) target JAK/STAT and, thus, significantly reduced SASP secretion in radiation-induced senescent human preadipocytes, and Ruxolitinib also had an effect in 2-year-old mice [170]. Another option is to target a specific SASP component (e.g., a certain interleukin or its receptor) using a target-directed monoclonal antibody. Such antibodies have already been developed [171].

5.2. Other Approaches to Eliminate Aging Cells

We have recently performed a high-throughput automatized screening HTS of the commercial LOPAC[®]Pfizer library on aphidicolin-induced senescent human fibroblasts, to identify novel senolytics. We discovered the nociceptin receptor FQ opioid receptor (NOP) selective ligand 1-[1-(1-methylcyclooctyl)-4-piperidinyl]-2-[(3R)-3-piperidinyl]-1H-benzimidazole (MCOPPB, a compound previously studied as a potential anxiolytic) as the best scoring hit. The ability of MCOPPB to eliminate senescent cells in *in vitro* models was further tested in mice and in *C. elegans*. MCOPPB reduced the senescence cell burden in peripheral tissues but not in the central nervous system. Mechanistically, MCOPPB treatment activated transcriptional networks involved in the immune responses to external stressors, implicating Toll-like receptors [172].

Since oxidative stress was linked to many age-related pathologies and senescence itself, some studies researched the possible therapeutic impact of antioxidants. For example, vitamins A, C, and E [173,174] were intensively investigated for their possible anti-aging effects. Unfortunately, those trials did not show any stable and convincing results supporting preventive vitamin use to reduce mortality [175]. The problem might be in targeting antioxidants to a particular tissue and also in antioxidant suitability for the damaging species. Another antioxidant compound, coenzyme Q10, plays an important role in mitochondrial respiration [176] and its deficit was associated with many pathological processes. Coenzyme Q10 is safe, well-absorbed, and distributed agent. Thus, it is frequently used in antioxidant strategies with reported symptomatic benefits [177]. Selenoproteins were also identified as antioxidant enzymes targetable with nutrients [178]. Several clinical trials indicated that selenium supplementation can prevent multiple diseases. However, there is also evidence of a higher risk of neuronal diseases after selenium administration as a consequence of its neurotoxic effects [179]. Therefore, it is necessary to balance selenium intake to maximize health benefits and minimize possible toxic effects [180]. Senolytics with antioxidant properties are also plant-derived polyphenols (quercetin and resveratrol) [181]. In addition to antioxidant agents, physical training balances oxidative stress and mobilizes antioxidative enzymes. Regular exercise of moderate intensity is one of the most important preconditions of health maintenance, reducing oxidative stress and avoiding chronic diseases progression [182,183].

The immune system also plays a vital role in eliminating senescent cells. However, aging impairs its functionality, rendering the clearance of senescent cells inaccurate. Senescent cells and/or immune cells releasing SASP factors with impact in cancer progression are CD4 + T cells, CD8 + T cells, B cells, NK cells, and macrophages [184]. The elimination of senescent cells is mediated by CD4 + T cells and NK cells in a process known as senescence surveillance [135,185]. During this process, the NK cell receptor NKG2D binds ligands found on the surfaces of senescent, damaged, and stressed cells [186]. Consequently, NKG2D and other immune system components have become important targets in senotherapy.

Generally said, senescent cells attract the innate immune system by inflammatory factors' secretion (components of SASP), which triggers the activation or suppression of a certain type of macrophages. Further, the inflammatory signaling recruits NK cells to senescent cells; NK cells have receptors binding ligands from senescent cells and this process ends with senescent cell death [187]. Interactions between senescent cells and macrophages were observed with different results and explanations over the past few years. Their exact interaction depends on precise SASP excretion, ligands presented on senescent cells, cell type, and the senescence inducing factor [67]. SASP components attract also NK cells leading to senescent cell clearance, which was proven in the murine model [188]. Current possible therapy for senescent cell clearance by the immune system is based on a few cell therapies for cancer, which might be considered as senolytic therapy [189]. Regarding senescent cancer cells, *in vivo* studies showed senescence induction in tumor cells. Senescent cell occurrence hampered tumor growth and also activated the immune system by SASP excretion, which can lead to the clearance of both senescent tumor cells and adjacent neoplastic cells with a beneficial impact on tumor regression [190–192]. Additionally, it is very important to emphasize the dual function of the immune system in cancer. Some chemokines can also attract inflammatory cells which promote tumor proliferation, angiogenesis, and invasiveness. Thus, opinions about the role of senescence in tumors differ and depend on context and surrounding conditions [193].

As the preceding discussion shows, many promising senolytic compounds (Table 3) have been discovered. However, an important question to consider is whether it is desirable to bypass or even revert cellular senescence. We know that it can be achieved; proliferation of senescent cells can be reactivated by enforced telomerase activity [136]. Moreover, OIS can be bypassed by depleting specific interleukins or inhibiting specific chemokine receptors [194,195]. However, reversing senescence may be dangerous; a recent study found that senescent cells that re-enter the proliferation phase frequently develop into lymphoma or leukemia cells with enhanced stemness, potentially giving rise to highly aggressive tumors [141].

Because senotherapy is a rather new therapeutic field, new strategies will be needed to translate discoveries resulting from laboratory experiments into drug candidates before clinical trials can begin. However, the discovery of new senolytic compounds *in vitro* or *in vivo* is challenging.

5.3. Senolytics in Anti-Cancer Therapy

Growing evidence supports the use of senolytics in complex anti-cancer therapy. Particularly interesting would be a combination of therapy-induced senescence and the subsequent elimination of remaining and therapy-resistant aged cells by senolytic drugs [142,196,197]. Proof-of-concept data were already shown for ABT263 (navitoclax) treatment of chemotherapy-induced senescent cells [198]. ABT263 was successfully tested in etoposide or doxorubicin-induced *in vitro* and animal models [155,198–200] and also in radiation-induced breast and lung cancer cellular models [200]. The application of ABT263 in animal models decreased the development of metastasis and occurrence of relapse [201]. The structurally similar compound, ABT737, eliminated senescent cancer cells in a radiation-induced model of cell lines and xenografts [202] and also showed efficacy in

etoposide-based chemotherapy in breast cancer cell lines [203]. Another BCL family inhibitor, Nav-Gal (galacto-conjugated navitoclax), was effective in senescence models induced by several anticancer agents: palbociclib, doxorubicin and radiation, and/or with cisplatin [204]. In addition, digoxin and ouabain (Na⁺/K⁺ pump inhibitors) affected many types of cancer cell lines and xenografts after senescence induction [158,205]. Another class of anticancer and senolytic agents used clinically are mTOR inhibitors, which showed efficacy in drug-induced senescent cancer cell lines and xenografts [206,207]. Last but not least, there are attempts to employ immunological strategies, for instance, blocking antibodies and CAR T cells to target senescence in tumor cells and animal models [117,208–211]. In summary, the abovementioned studies indicate that a two-step approach of pro-senescence anticancer therapy followed by senolytic treatment is a feasible strategy in curing human cancers [198]. However, we need to have more clinical trial data to implement those strategies into routine practice.

Table 3. List of senolytic drugs.

Senolytic Drug Targets	Compound	Target	Note
Anti-apoptotic pathway	Navitoclax	BCL-2, BCL-X _L , and BCL-w	ABT263
	ABT-737	BCL-2, BCL-X _L , and BCL-w	ABT263 paralogue and precursor
	A1331852	BCL-X _L	2 nd generation of BCL-2 family inhibitors
	A1155463	BCL-X _L	2 nd generation of BCL-2 family inhibitors
	Piperlongumine	apoptosis	An alkaloid, dietary natural product from <i>Piper</i> genus trees
	Geldanamycin	?	Piperlongumine analogue
	Tanespimycin	?	Piperlongumine analogue
	Alvespimycin	?	Piperlongumine analogue
PI3K and other kinases	Panobinostat	BCL-X _L	increases 3/7 caspase activity
	Dasatinib	PI3K/Akt pathway	small molecule inhibiting various tyrosine kinases
	Quercetin	PI3K/Akt and mTOR pathway	Flavonoid
	Fisetin	PI3K/Akt	natural flavonoid
	Luteolin	PI3K/Akt	Flavone
p53, p16, and DDR pathway	Curcumin	PI3K/Akt	Flavone
	FOXO4-DRI	FOXO4 and p53 interaction	mitochondrial activity boost
	17-DMAG	HSP90/Akt	SASP suppressor
	KU-60019	ATM	NF-κB inhibition
NF-κB or C/EBPβ regulation	Rapamycin	mTORC1 complex	next generation Mdm2 inhibitor
	Nutlin-3a	Mdm2	p53 stabilization and SASP reduction
	MI-63	Mdm2	p53 stabilization and SASP reduction
	UBX0101	Mdm2	derived from Nutlin
	Metformin	SASP	NF-κB inhibition
	Resveratrol	SASP	NF-κB inhibition
	Ruxolitinib	JAK	INC18424, C/EBPβ repression
Other	Momelotinib	JAK	CYT387, C/EBPβ repression
	MCOPPB	NOP	anxiolytic opioid

5.4. Nanoparticles for Delivery of Active Compounds into Senescent Cells

Nanoparticles (NPs) offer a new delivery strategy for targeting senescent cells *in vitro* and *in vivo* with potential diagnostic and therapeutic applications. Importantly, NPs can be used to encapsulate small molecules such as senolytic drugs, while also being coated with substances that facilitate their delivery to specific tissues or cell types of interest. Some very effective NP-based technologies for packaging and transporting loads to targets are available. However, problems may arise *in vivo* relating to the interactions, distribution, side effects, and clearance of the NPs. These tools, thus, remain challenging to use well and require further study.

The first reported strategy for targeting senescent cells with NPs relied on 100 nm spherical beads containing rhodamine on an MCM-41 silica matrix that was coated with galactooligosaccharides (Gos) of various lengths. The beads were taken up into cells by endocytosis and released via exocytosis, and the GosNPs preferentially fused with lysosomal vesicles in senescent cells. The coating was subsequently improved by using homogenous 6-mer galacto-oligosaccharides (Gal) and the resulting NPs were validated in damage-/chemotherapy-induced senescence models [212,213]. CaCO₃ NPs carrying rapamycin also showed senolytic activity. These NPs were coated with a conjugate of lactose with polyethylene glycol and an anti-CD9 monoclonal antibody (the CD9 receptor is strongly expressed in senescent cells) to improve their targeting [214]. In addition, molybdenum disulfide NPs (MoS₂ NPs) inhibited H₂O₂-induced senescence by halting lysosomal and mitochondrial dysfunction [215].

6. Clinical Trials (CTs)

Based on promising preclinical results in murine models, a few senolytics (identified from a group of 46 compounds showing potential senolytic effects) have been included in clinical trials in humans for the treatment of age-related pathologies. As the result of promising preclinical data (on mouse models), currently, some senolytics (from 46 compounds identified as having a possible senolytic effect) undergo clinical trials in humans for age-related pathology treatment. Unsurprisingly, the compounds with the greatest potential appear to be natural products and/or previously approved drugs. The outstanding and most heavily studied agents in this group are dasatinib and quercetin (individually or in combination) along with metformin, fisetin, and UBX0101. Early preclinical studies using aging and disease models have provided very promising results [216,217]. However, further work will be needed to clarify the potential of these prospective senolytics.

7. Conclusions

Because of the challenges posed by aging populations, there is a pressing need for drugs that can enable people to remain healthy as they age and to enjoy a long lifespan with a good quality of life. Consequently, there is great interest in cellular senescence and the development of senolytic drugs that can eliminate senescent cells or reverse senescence. This review summarizes current knowledge about senescence biomarkers, cellular and animal models of senescence, and the early development of senolytics. Challenges remaining to be overcome and areas where further clarity is needed have been highlighted; overcoming these challenges will enable the development and clinical testing of more effective senolytic medicines. The main barriers that must be overcome to enable the clinical use of senolytic drugs include our currently limited understanding of their targets and pathways, a limited range of animal models, a lack of highly selective therapies and probes, and the limited availability of data on the biodistribution and elimination of both senolytic drugs and nanoparticle vehicles for their delivery. Despite these challenges, the field of senescence research is vibrant and has the potential to ultimately offer personalized solutions for increasing human longevity.

Author Contributions: Literature search and manuscript writing, N.K.; critical reading, J.B.D.S.; writing and manuscript revision, M.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript

Funding: This work was financially supported in parts from the Czech Ministry of Education, Youth and Sports (EATRIS-CZ-LM2018133) and the European Regional Development Fund–Project ENOCH (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000868), the Technological agency of the Czech Republic (TE02000058) and IGA_LF_2021_036 (Palacky University in Olomouc).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors state that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

Search strategy and selection criteria: The search strategy used when conducting this review was designed to identify and evaluate well-documented studies on various aspects of senescence including the identification of senescent cells in vitro and in vivo, potential senescence markers, and newly discovered senolytics. The PubMed, Web of Science, and www.clinicaltrials.gov databases (access date March 1, 2022) were searched, focusing on articles and entries published between 1961 and 2021. All searches were up to date as of January 2022. The search terms used included “senescence”, “senescence marker”, “senescence model”, “aging”, “senolytics”. Only contributions in English were considered. All figures were created using the Biorender application.

References

- McHugh, D.; Gil, J. Senescence and Aging: Causes, Consequences, and Therapeutic Avenues. *J. Cell Biol.* **2018**, *217*, 65–77. <https://doi.org/10.1083/JCB.201708092>.
- Hayflick, L.; Moorhead, P.S. The Serial Cultivation of Human Diploid Cell Strains. *Exp. Cell Res.* **1961**, *25*, 585–621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6).
- 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.
- Adams, P.D. Healing and Hurting: Molecular Mechanisms, Functions, and Pathologies of Cellular Senescence. *Mol. Cell* **2009**, *36*, 2–14.
- Kuilman, T.; Michaloglou, C.; Mooi, W.J.; Peeper, D.S. The Essence of Senescence. *Genes Dev.* **2010**, *24*, 2463–2479.
- Yosef, R.; Pilpel, N.; Tokarsky-Amiel, R.; Biran, A.; Ovadya, Y.; Cohen, S.; Vadai, E.; Dassa, L.; Shahar, E.; Condiotti, R.; et al. Directed Elimination of Senescent Cells by Inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11190. <https://doi.org/10.1038/ncomms11190>.
- Hubackova, S.; Davidova, E.; Rohlenova, K.; Stursa, J.; Werner, L.; Andera, L.; Dong, L.F.; Terp, M.G.; Hodny, Z.; Ditzel, H.J.; et al. Selective Elimination of Senescent Cells by Mitochondrial Targeting Is Regulated by ANT2. *Cell Death Differ.* **2019**, *26*, 276–290. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0118-3>.
- Cai, Y.; Zhou, H.; Zhu, Y.; Sun, Q.; Ji, Y.; Xue, A.; Wang, Y.; Chen, W.; Yu, X.; Wang, L.; et al. Elimination of Senescent Cells by β -Galactosidase-Targeted Prodrug Attenuates Inflammation and Restores Physical Function in Aged Mice. *Cell Res.* **2020**, *30*, 574–589. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0314-9>.
- Herranz, N.; Gil, J. Mechanisms and Functions of Cellular Senescence. *J. Clin. Investig.* **2018**, *128*, 1238–1246.
- Muñoz-Espín, D.; Serrano, M. Cellular Senescence: From Physiology to Pathology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 482–496.
- Liguori, I.; Russo, G.; Curcio, F.; Bulli, G.; Aran, L.; Della-Morte, D.; Gargiulo, G.; Testa, G.; Cacciatore, F.; Bonaduce, D.; et al. Oxidative Stress, Aging, and Diseases. *Clin. Interv. Aging* **2018**, *13*, 757. <https://doi.org/10.2147/CIA.S158513>.
- Rajendran, P.; Alzahrani, A.M.; Hanieh, H.N.; Kumar, S.A.; Ben Ammar, R.; Rengarajan, T.; Alhoot, M.A. Autophagy and Senescence: A New Insight in Selected Human Diseases. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 21485–21492. <https://doi.org/10.1002/JCP.28895>.
- Wang, Y.; Wang, X.D.; Lapi, E.; Sullivan, A.; Jia, W.; He, Y.W.; Ratnayaka, I.; Zhong, S.; Goldin, R.D.; Goemans, C.G.; et al. Autophagic Activity Dictates the Cellular Response to Oncogenic RAS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 13325–13330. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1120193109/-/DCSUPPLEMENTAL>.
- Kang, C.; Xu, Q.; Martin, T.D.; Li, M.Z.; Demaria, M.; Aron, L.; Lu, T.; Yankner, B.A.; Campisi, J.; Elledge, S.J. The DNA Damage Response Induces Inflammation and Senescence by Inhibiting Autophagy of GATA4. *Science* **2015**, *349*, aaa5612. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAA5612>.

15. Fitzwalter, B.E.; Towers, C.G.; Sullivan, K.D.; Andrysiak, Z.; Hoh, M.; Ludwig, M.; O'Prey, J.; Ryan, K.M.; Espinosa, J.M.; Morgan, M.J.; et al. Autophagy Inhibition Mediates Apoptosis Sensitization in Cancer Therapy by Relieving FOXO3a Turnover. *Dev. Cell* **2018**, *44*, 555–565.e3. <https://doi.org/10.1016/j.DEVCEL.2018.02.014>.
16. Mariño, G.; Niso-Santano, M.; Baehrecke, E.H.; Kroemer, G. Self-Consumption: The Interplay of Autophagy and Apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 81–94. <https://doi.org/10.1038/NRM3735>.
17. Pérez-Mancera, P.A.; Young, A.R.J.; Narita, M. Inside and out: The Activities of Senescence in Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2014**, *14*, 547–558. <https://doi.org/10.1038/NRC3773>.
18. García-Prat, L.; Martínez-Vicente, M.; Perdiguero, E.; Ortet, L.; Rodríguez-Ubrea, J.; Rebollo, E.; Ruiz-Bonilla, V.; Gutarra, S.; Ballestar, E.; Serrano, A.L.; et al. Autophagy Maintains Stemness by Preventing Senescence. *Nature* **2016**, *529*, 37–42. <https://doi.org/10.1038/NATURE16187>.
19. Rufini, A.; Tucci, P.; Celardo, I.; Melino, G. Senescence and Aging: The Critical Roles of P53. *Oncogene* **2013**, *32*, 5129–5143.
20. Al Bitar, S.; Gali-Muhtasib, H. The Role of the Cyclin Dependent Kinase Inhibitor P21cip1/Waf1 in Targeting Cancer: Molecular Mechanisms and Novel Therapeutics. *Cancers* **2019**, *11*, 1475.
21. Benson, E.K.; Mungamuri, S.K.; Attie, O.; Krackivova, M.; Sachidanandam, R.; Manfredi, J.J.; Aaronson, S.A. P53-Dependent Gene Repression through P21 Is Mediated by Recruitment of E2F4 Repression Complexes. *Oncogene* **2014**, *33*, 3959–3969. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.378>.
22. Sharpless, N.E.; Sherr, C.J. Forging a Signature of in vivo Senescence. *Nat. Rev. Cancer* **2015**, *15*, 397–408.
23. Chen, J.; Huang, X.; Halicka, D.; Brodsky, S.; Avram, A.; Eskander, J.; Bloomgarden, N.A.; Darzynkiewicz, Z.; Goligorsky, M.S. Contribution of P16INK4a and P21CIP1 Pathways to Induction of Premature Senescence of Human Endothelial Cells: Permissive Role of P53. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **2006**, *290*, H1575–H1586. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00364.2005>.
24. Fiorentino, F.P.; Symonds, C.E.; MacAluso, M.; Giordano, A. Senescence and P130/Rb1: A New Beginning to the End. *Cell Res.* **2009**, *19*, 1044–1051. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.96>.
25. Rayess, H.; Wang, M.B.; Srivatsan, E.S. Cellular Senescence and Tumor Suppressor Gene P16. *Int. J. Cancer* **2012**, *130*, 1715–1725. <https://doi.org/10.1002/ijc.27316>.
26. Beauséjour, 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. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg417>.
27. Helmbold, H.; Kömm, K.; Deppert, W.; Bohn, W. Rb2/P130 Is the Dominating Pocket Protein in the P53–P21 DNA Damage Response Pathway Leading to Senescence. *Oncogene* **2009**, *28*, 3456–3467. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.222>.
28. Indovina, P.; Marcelli, E.; Casini, N.; Rizzo, V.; Giordano, A. Emerging Roles of RB Family: New Defense Mechanisms against Tumor Progression. *J. Cell. Physiol.* **2013**, *228*, 525–535.
29. Helmbold, H.; Deppert, W.; Bohn, W. Regulation of Cellular Senescence by Rb2/P130. *Oncogene* **2006**, *25*, 5257–5262. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209613>.
30. Rayman, J.B.; Takahashi, Y.; Indjeian, V.B.; Dannenberg, J.H.; Catchpole, S.; Watson, R.J.; Riele, H.; Dynlacht, B.D. E2F Mediates Cell Cycle-Dependent Transcriptional Repression in vivo by Recruitment of an HDAC1/MSin3B Corepressor Complex. *Genes Dev.* **2002**, *16*, 933–947. <https://doi.org/10.1101/GAD.969202>.
31. de Jesus, B.B.; Blasco, M.A. Assessing Cell and Organ Senescence Biomarkers. *Circ. Res.* **2012**, *111*, 97–109.
32. Noren Hooten, N.; Evans, M.K. Techniques to Induce and Quantify Cellular Senescence. *J. Vis. Exp.* **2017**, *2017*, 55533. <https://doi.org/10.3791/55533>.
33. Adewoye, A.B.; Tampakis, D.; Follenzi, A.; Stolzing, A. Multiparameter Flow Cytometric Detection and Quantification of Senescent Cells in vitro. *Biogerontology* **2020**, *21*, 773–786. <https://doi.org/10.1007/s10522-020-09893-9>.
34. Schmid, N.; Flenkenthaler, F.; Stöckl, J.B.; Dietrich, K.G.; Köhn, F.M.; Schwarzer, J.U.; Kunz, L.; Luckner, M.; Wanner, G.; Arnold, G.J.; et al. Insights into Replicative Senescence of Human Testicular Peritubular Cells. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 15052. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51380-w>.
35. Dimri, G.P.; Lee, X.; Basile, G.; Acosta, M.; Scott, G.; Roskelley, C.; Medrano, E.E.; Linskens, M.; Rubelj, I.; Pereira-Smith, O.; et al. A Biomarker That Identifies Senescent Human Cells in Culture and in Aging Skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 9363–9367. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9363>.
36. Debacq-Chainiaux, F.; Erusalimsky, J.D.; Campisi, J.; Toussaint, O. Protocols to Detect Senescence-Associated Beta-Galactosidase (SA-Bgal) Activity, a Biomarker of Senescent Cells in Culture and in vivo. *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 1798–1806. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.191>.
37. Itahana, K.; Itahana, Y.; Dimri, G.P. Colorimetric Detection of Senescence-Associated β Galactosidase. *Methods Mol. Biol.* **2013**, *965*, 143–156. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-239-1_8.
38. Piechota, M.; Sunderland, P.; Wysocka, A.; Nalberczak, M.; Sliwinski, M.A.; Radwanska, K.; Sikora, E. Is Senescence-Associated β -Galactosidase a Marker of Neuronal Senescence? *Oncotarget* **2016**, *7*, 81099–81109. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12752>.
39. de Mera-Rodríguez, J.A.; Álvarez-Hernán, G.; Gañán, Y.; Martín-Partido, G.; Rodríguez-León, J.; Francisco-Morcillo, J. Is Senescence-Associated β -Galactosidase a Reliable in vivo Marker of Cellular Senescence during Embryonic Development? *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 36.
40. Hildebrand, D.G.; Lehle, S.; Borst, A.; Haferkamp, S.; Essmann, F.; Schulze-Osthoff, K. α -Fucosidase as a Novel Convenient Biomarker for Cellular Senescence. *Cell Cycle* **2013**, *12*, 1922–1927. <https://doi.org/10.4161/cc.24944>.

41. Terman, A.; Brunk, U.T. Lipofuscin: Mechanisms of Formation and Increase with Age. *APMIS* **1998**, *106*, 265–276.
42. Terman, A.; Brunk, U.T. Lipofuscin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, *36*, 1400–1404.
43. Salmonowicz, H.; Passos, J.F. Detecting Senescence: A New Method for an Old Pigment. *Aging Cell* **2017**, *16*, 432–434.
44. Mah, L.-J.; El-Osta, A.; Karagiannis, T.C. γ H2AX as a Molecular Marker of Aging and Disease. *Epigenetics* **2010**, *5*, 129–136. <https://doi.org/10.4161/epi.5.2.11080>.
45. De Jager, M.; Dronkert, M.L.G.; Modesti, M.; Beerens, C.E.M.T.; Kanaar, R.; Van Gent, D.C. DNA-Binding and Strand-Annealing Activities of Human Mre11: Implications for Its Roles in DNA Double-Strand Break Repair Pathways. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 1317–1325. <https://doi.org/10.1093/nar/29.6.1317>.
46. Sancar, A.; Lindsey-Boltz, L.A.; Ünsal-Kaçmaz, K.; Linn, S. Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 39–85.
47. Wang, B.; Matsuoka, S.; Carpenter, P.B.; Elledge, S.J. 53BP1, a Mediator of the DNA Damage Checkpoint. *Science* **2002**, *298*, 1435–1438. <https://doi.org/10.1126/science.1076182>.
48. Stucki, M.; Jackson, S.P. γ H2AX and MDC1: Anchoring the DNA-Damage-Response Machinery to Broken Chromosomes. *DNA Repair* **2006**, *5*, 534–543.
49. Takai, H.; Smogorzewska, A.; De Lange, T. DNA Damage Foci at Dysfunctional Telomeres. *Curr. Biol.* **2003**, *13*, 1549–1556. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00542-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00542-6).
50. Herbig, U.; Jobling, W.A.; Chen, B.P.C.; Chen, D.J.; Sedivy, J.M. Telomere Shortening Triggers Senescence of Human Cells through a Pathway Involving ATM, P53, and P21CIP1, but Not P16INK4a. *Mol. Cell* **2004**, *14*, 501–513. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(04\)00256-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(04)00256-4).
51. Olovnikov, A.M. Telomeres, Telomerase, and Aging: Origin of the Theory. *Exp. Gerontol.* **1996**, *31*, 443–448. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(96\)00005-8](https://doi.org/10.1016/0531-5565(96)00005-8).
52. Parrinello, S.; Samper, E.; Krtolica, A.; Goldstein, J.; Melov, S.; Campisi, J. Oxygen Sensitivity Severely Limits the Replicative Lifespan of Murine Fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* **2003**, *5*, 741–747. <https://doi.org/10.1038/ncb1024>.
53. Correia-Melo, C.; Marques, F.D.; Anderson, R.; Hewitt, G.; Hewitt, R.; Cole, J.; Carroll, B.M.; Miwa, S.; Birch, J.; Merz, A.; et al. Mitochondria Are Required for Pro-Ageing Features of the Senescent Phenotype. *EMBO J.* **2016**, *35*, 724–742. <https://doi.org/10.15252/EMBJ.201592862>.
54. Pole, A.; Dimri, M.; Dimri, G.P. Oxidative Stress, Cellular Senescence and Ageing. *AIMS Mol. Sci.* **2016**, *3*, 300–324. <https://doi.org/10.3934/molsci.2016.3.300>.
55. Agrawal, K.; Das, V.; Táborská, N.; Gurský, J.; Džubák, P.; Hajdúch, M. Differential Regulation of Methylation-Regulating Enzymes by Senescent Stromal Cells Drives Colorectal Cancer Cell Response to DNA-Demethylating Epi-Drugs. *Stem Cells Int.* **2018**, *2018*, 6013728. <https://doi.org/10.1155/2018/6013728>.
56. Aird, K.M.; Zhang, R. Detection of Senescence-Associated Heterochromatin Foci (SAHF). *Methods Mol. Biol.* **2013**, *965*, 185–196. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-239-1_12.
57. Zhang, R.; Chen, W.; Adams, P.D. Molecular Dissection of Formation of Senescence-Associated Heterochromatin Foci. *Mol. Cell Biol.* **2007**, *27*, 2343–2358. <https://doi.org/10.1128/MCB.02019-06>.
58. Rodier, F.; Muñoz, D.P.; Teachenor, R.; Chu, V.; Le, O.; Bhaumik, D.; Coppé, J.P.; Campeau, E.; Beauséjour, C.M.; Kim, S.H.; et al. DNA-SCARS: Distinct Nuclear Structures That Sustain Damage-Induced Senescence Growth Arrest and Inflammatory Cytokine Secretion. *J. Cell Sci.* **2011**, *124*, 68–81. <https://doi.org/10.1242/JCS.071340>.
59. Freund, A.; Laberge, R.-M.; Demaria, M.; Campisi, J. Lamin B1 Loss Is a Senescence-Associated Biomarker. *Mol. Biol. Cell* **2012**, *23*, 2066–2075. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-10-0884>.
60. Gratzner, H.G. Monoclonal Antibody to 5-Bromo- and 5-Iododeoxyuridine: A New Reagent for Detection of DNA Replication. *Science* **1982**, *218*, 474–475. <https://doi.org/10.1126/science.7123245>.
61. Buck, S.B.; Bradford, J.; Gee, K.R.; Agnew, B.J.; Clarke, S.T.; Salic, A. Detection of S-Phase Cell Cycle Progression Using 5-Ethynyl-2'-Deoxyuridine Incorporation with Click Chemistry, an Alternative to Using 5-Bromo-2'-Deoxyuridine Antibodies. *Biotechniques* **2008**, *44*, 927–929. <https://doi.org/10.2144/000112812>.
62. Scholzen, T.; Gerdes, J. The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown. *J. Cell. Physiol.* **2000**, *182*, 311–322.
63. Zhang, H. Molecular Signaling and Genetic Pathways of Senescence: Its Role in Tumorigenesis and Aging. *J. Cell. Physiol.* **2007**, *210*, 567–574. <https://doi.org/10.1002/jcp.20919>.
64. Qian, Y.; Zhang, J.; Yan, B.; Chen, X. DEC1, a Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor and a Novel Target Gene of the P53 Family, Mediates P53-Dependent Premature Senescence* | Elsevier Enhanced Reader. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 2896–2905. Available online: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0021925820555385?token=088C94F7A5AE15857D34F420A29A72A3BE5345F5D1D288FFC595813C13C107D9B6E1F7759CFB209D116494F9DD7EAC6D&originRegion=eu-west-1&originCreation=20210412194802> (accessed on 12 April 2021).
65. Ruiz, L.; Traskine, M.; Ferrer, I.; Castro, E.; Leal, J.F.M.; Kaufman, M.; Carnero, A. Characterization of the P53 Response to Oncogene-Induced Senescence. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e3230. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003230>.
66. Cuollo, L.; Antonangeli, F.; Santoni, A.; Soriani, A. The Senescence-Associated Secretory Phenotype (Sasp) in the Challenging Future of Cancer Therapy and Age-Related Diseases. *Biology* **2020**, *9*, 485.

67. Basisty, N.; Kale, A.; Jeon, O.H.; Kuehnemann, C.; Payne, T.; Rao, C.; Holtz, A.; Shah, S.; Sharma, V.; Ferrucci, L.; et al. A Proteomic Atlas of Senescence-Associated Secretomes for Aging Biomarker Development. *PLoS Biol.* **2020**, *18*, e3000599. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.3000599>.
68. Mrazkova, B.; Dzijak, R.; Imrichova, T.; Kyjacova, L.; Barath, P.; Dzubak, P.; Holub, D.; Hajdich, M.; Nahacka, Z.; Andera, L.; et al. Induction, Regulation and Roles of Neural Adhesion Molecule L1CAM in Cellular Senescence. *Aging* **2018**, *10*, 434–462. <https://doi.org/10.18632/AGING.101404>.
69. Coppé, 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. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PATHOL-121808-102144>.
70. Althubiti, M.; Lezina, L.; Carrera, S.; Jukes-Jones, R.; Giblett, S.M.; Antonov, A.; Barlev, N.; Saldanha, G.S.; Pritchard, C.A.; Cain, K.; et al. Characterization of Novel Markers of Senescence and Their Prognostic Potential in Cancer. *Cell Death Dis.* **2014**, *5*, e1528. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.489>.
71. Soto-Gamez, A.; Quax, W.J.; Demaria, M. Regulation of Survival Networks in Senescent Cells: From Mechanisms to Interventions. *J. Mol. Biol.* **2019**, *431*, 2629–2643. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.05.036>.
72. Lee, H.W.; Heo, C.H.; Sen, D.; Byun, H.O.; Kwak, I.H.; Yoon, G.; Kim, H.M. Ratiometric Two-Photon Fluorescent Probe for Quantitative Detection of β -Galactosidase Activity in Senescent Cells. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 10001–10005. https://doi.org/10.1021/AC5031013/SUPPL_FILE/AC5031013_SI_001.PDF.
73. Zhang, J.; Li, C.; Dutta, C.; Fang, M.; Zhang, S.; Tiwari, A.; Werner, T.; Luo, F.T.; Liu, H. A Novel Near-Infrared Fluorescent Probe for Sensitive Detection of β -Galactosidase in Living Cells. *Anal. Chim. Acta* **2017**, *968*, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.02.039>.
74. Lozano-Torres, B.; Galiana, I.; Rovira, M.; Garrido, E.; Chaib, S.; Bernardos, A.; Muñoz-Espín, D.; Serrano, M.; Martínez-Máñez, R.; Sancenón, F. An OFF-ON Two-Photon Fluorescent Probe for Tracking Cell Senescence in vivo. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 8808–8811. https://doi.org/10.1021/JACS.7B04985/SUPPL_FILE/JA7B04985_SI_001.PDF.
75. Wang, Y.; Liu, J.; Ma, X.; Cui, C.; Deenik, P.R.; Henderson, P.K.P.; Sigler, A.L.; Cui, L. Real-Time Imaging of Senescence in Tumors with DNA Damage. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 2102. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38511-z>.
76. Becker, T.; Haferkamp, S. Molecular Mechanisms of Cellular Senescence. In *Senescence and Senescence-Related Disorders*; InTech: Vienna, Austria, 2013.
77. Eriksson, D.; Stigbrand, T. Radiation-Induced Cell Death Mechanisms. *Tumor Biol.* **2010**, *31*, 363–372.
78. Wang, Y.; Wang, Y.; Liu, S.; Liu, Y.; Xu, H.; Liang, J.; Zhu, J.; Zhang, G.; Su, W.; Dong, W.; et al. Upregulation of EID3 Sensitizes Breast Cancer Cells to Ionizing Radiation-Induced Cellular Senescence. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *107*, 606–614. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.022>.
79. Wang, Y.; Boerma, M.; Zhou, D. Ionizing Radiation-Induced Endothelial Cell Senescence and Cardiovascular Diseases. *Radiat. Res.* **2016**, *186*, 153–161.
80. Dolan, D.W.P.; Zupanec, A.; Nelson, G.; Hall, P.; Miwa, S.; Kirkwood, T.B.L.; Shanley, D.P. Integrated Stochastic Model of DNA Damage Repair by Non-Homologous End Joining and P53/P21-Mediated Early Senescence Signaling. *PLoS Comput. Biol.* **2015**, *11*, e1004246. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004246>.
81. Day, R.M.; Snow, A.L.; Panganiban, R.A.M. Radiation-Induced Accelerated Senescence: A Fate Worse than Death? *Cell Cycle* **2014**, *13*, 2011–2012.
82. Gladyshev, V.N. The Free Radical Theory of Aging Is Dead. Long Live the Damage Theory! *Antioxid. Redox Signal.* **2014**, *20*, 727–731. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5228>.
83. Chen, Q.; Fischer, A.; Reagan, J.D.; Yan, L.J.; Ames, B.N. Oxidative DNA Damage and Senescence of Human Diploid Fibroblast Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 4337–4341. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.10.4337>.
84. López-Otin, C.; Blasco, M.A.; Partridge, L.; Serrano, M.; Kroemer, G. The Hallmarks of Aging. *Cell* **2013**, *153*, 1194.
85. Chen, Q.M.; Bartholomew, J.C.; Campisi, J.; Acosta, M.; Reagan, J.D.; Ames, B.N. Molecular Analysis of H₂O₂-Induced Senescent-like Growth Arrest in Normal Human Fibroblasts: P53 and Rb Control G1 Arrest but Not Cell Replication. *Biochem. J.* **1998**, *332*, 43–50. <https://doi.org/10.1042/bj3320043>.
86. Chen, J.-H.; Ozanne, S.E.; Hales, C.N. Methods of Cellular Senescence Induction Using Oxidative Stress. In *Biological Aging*; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2007; pp. 179–189.
87. 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. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81902-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81902-9).
88. Gupta, R.; Wajapeyee, N. Induction of Cellular Senescence by Oncogenic RAS. *Methods Mol. Biol.* **2013**, *1048*, 127–133. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-556-9_10.
89. Zhang, F.; Zakaria, S.M.; Höggqvist Tabor, V.; Singh, M.; Tronnorsjö, S.; Goodwin, J.; Selivanova, G.; Bartek, J.; Castell, A.; Larsson, L.G. MYC and RAS Are Unable to Cooperate in Overcoming Cellular Senescence and Apoptosis in Normal Human Fibroblasts. *Cell Cycle* **2018**, *17*, 2697–2715. <https://doi.org/10.1080/15384101.2018.1553339>.
90. *The NIA Aging Cell Repository: Facilitating Research with Aging Cells*; National Institute on Aging: Bethesda, MD, USA, year. Available online: <https://www.nia.nih.gov/research/blog/2018/05/nia-aging-cell-repository-facilitating-research-aging-cells> (accessed on 19 April 2021).

91. Kudlow, B.A.; Kennedy, B.K.; Monnat, R.J. Werner and Hutchinson-Gilford Progeria Syndromes: Mechanistic Basis of Human Progeroid Diseases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 394–404.
92. Harkema, L.; Yousef, S.A.; De Bruin, A. Pathology of Mouse Models of Accelerated Aging. *Vet. Pathol.* **2016**, *53*, 366–389. <https://doi.org/10.1177/0300985815625169>.
93. Yousefzadeh, M.J.; Melos, K.L.; Angelini, L.; Burd, C.E.; Robbins, P.D.; Niedernhofer, L.J. Mouse Models of Accelerated Cellular Senescence. In *Methods in Molecular Biology*; Humana Press Inc.: Totowa, NJ, USA, 2019; Volume 1896, pp. 203–230.
94. Sorrentino, J.A.; Krishnamurthy, J.; Tilley, S.; Alb, J.G.; Burd, C.E.; Sharpless, N.E. P16INK4a Reporter Mice Reveal Age-Promoting Effects of Environmental Toxicants. *J. Clin. Investig.* **2014**, *124*, 169–173. <https://doi.org/10.1172/JCI70960>.
95. Le, O.N.L.; Rodier, F.; Fontaine, F.; Coppe, J.P.; Campisi, J.; DeGregori, J.; Laverdière, C.; Kokta, V.; Haddad, E.; Beauséjour, C.M. Ionizing Radiation-Induced Long-Term Expression of Senescence Markers in Mice Is Independent of P53 and Immune Status. *Aging Cell* **2010**, *9*, 398–409. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00567.x>.
96. Seol, M.-A.; Jung, U.; Eom, S.; Kim, S.-H.; Park, H.-R.; Jo, S.-K. Chronic Induction of Senescence Marker in Gamma-Irradiation Mice. In Proceedings of the Transactions of the Korean Nuclear Society Autumn Meeting, Gyeongju, Korea, 27–28 October 2011.
97. Seol, M.A.; Jung, U.; Eom, H.S.; Kim, S.H.; Park, H.R.; Jo, S.K. Prolonged Expression of Senescence Markers in Mice Exposed to Gamma-Irradiation. *J. Vet. Sci.* **2012**, *13*, 331–338. <https://doi.org/10.4142/jvs.2012.13.4.331>.
98. Tong, J.; Hei, T.K. Aging and Age-Related Health Effects of Ionizing Radiation. *Radiat. Med. Prot.* **2020**, *1*, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.radmp.2020.01.005>.
99. Kudlova, N.; Slavik, H.; Duskova, P.; Furst, T.; Srovnal, J.; Bartek, J.; Mistrik, M.; Hajdich, M. An Efficient, Non-Invasive Approach for in-vivo Sampling of Hair Follicles: Design and Applications in Monitoring DNA Damage and Aging. *Aging* **2021**, *13*, 25004–25024. <https://doi.org/10.18632/AGING.203744>.
100. Li, S.Y.; Du, M.; Dolence, E.K.; Fang, C.X.; Mayer, G.E.; Ceylan-Isik, A.F.; LaCour, K.H.; Yang, X.; Wilbert, C.J.; Sreejayan, N.; et al. Aging Induces Cardiac Diastolic Dysfunction, Oxidative Stress, Accumulation of Advanced Glycation Endproducts and Protein Modification. *Aging Cell* **2005**, *4*, 57–64. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9728.2005.00146.x>.
101. Yoo, D.Y.; Kim, W.; Lee, C.H.; Shin, B.N.; Nam, S.M.; Choi, J.H.; Won, M.H.; Yoon, Y.S.; Hwang, I.K. Melatonin Improves D-Galactose-Induced Aging Effects on Behavior, Neurogenesis, and Lipid Peroxidation in the Mouse Dentate Gyrus via Increasing PCREB Expression. *J. Pineal Res.* **2012**, *52*, 21–28. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00912.x>.
102. Salehpour, F.; Ahmadian, N.; Rasta, S.H.; Farhoudi, M.; Karimi, P.; Sadigh-Eteghad, S. Transcranial Low-Level Laser Therapy Improves Brain Mitochondrial Function and Cognitive Impairment in D-Galactose-Induced Aging Mice. *Neurobiol. Aging* **2017**, *58*, 140–150. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.06.025>.
103. Remigante, A.; Spinelli, S.; Trichilo, V.; Loddo, S.; Sarikas, A.; Pusch, M.; Dossena, S.; Marino, A.; Morabito, R. D-Galactose Induced Early Aging in Human Erythrocytes: Role of Band 3 Protein. *J. Cell. Physiol.* **2022**, *237*, 1586–1596. <https://doi.org/10.1002/JCP.30632>.
104. Sun, K.; Yang, P.; Zhao, R.; Bai, Y.; Guo, Z. Matrine Attenuates D-Galactose-Induced Aging-Related Behavior in Mice via Inhibition of Cellular Senescence and Oxidative Stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, *2018*, 7108604. <https://doi.org/10.1155/2018/7108604>.
105. Liu, Y.; Liu, Y.; Guo, Y.; Xu, L.; Wang, H. Phlorizin Exerts Potent Effects against Aging Induced by D-Galactose in Mice and PC12 Cells. *Food Funct.* **2021**, *12*, 2148–2160. <https://doi.org/10.1039/D0FO02707C>.
106. Li, J.-H.; Wei, T.-T.; Guo, L.; Cao, J.-H.; Feng, Y.-K.; Guo, S.-N.; Liu, G.-H.; Ding, Y.; Chai, Y.-R. Curcumin Protects Thymus against D-Galactose-Induced Senescence in Mice. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* **2021**, *394*, 411–420. <https://doi.org/10.1007/S00210-020-01945-8>.
107. Wang, S.H.; Liang, C.J.; Weng, Y.W.; Chen, Y.H.; Hsu, H.Y.; Chien, H.F.; Tsai, J.S.; Tseng, Y.C.; Li, C.Y.; Chen, Y.L. Ganoderma Lucidum Polysaccharides Prevent Platelet-Derived Growth Factor-Stimulated Smooth Muscle Cell Proliferation in vitro and Neointimal Hyperplasia in the Endothelial-Denuded Artery in vivo. *J. Cell. Physiol.* **2012**, *227*, 3063–3071. <https://doi.org/10.1002/JCP.23053>.
108. Lee, J.; Kim, Y.S.; Kim, E.; Kim, Y.; Kim, Y. Curcumin and Hesperetin Attenuate D-Galactose-Induced Brain Senescence in vitro and in vivo. *Nutr. Res. Pract.* **2020**, *14*, 438. <https://doi.org/10.4162/NRP.2020.14.5.438>.
109. Chen, X.; Li, Y.; Chen, W.; Nong, Z.; Huang, J.; Chen, C. Protective Effect of Hyperbaric Oxygen on Cognitive Impairment Induced by D-Galactose in Mice. *Neurochem. Res.* **2016**, *41*, 3032–3041. <https://doi.org/10.1007/S11064-016-2022-X>.
110. Sarkisian, C.J.; Keister, B.A.; Stairs, D.B.; Boxer, R.B.; Moody, S.E.; Chodosh, L.A. Dose-Dependent Oncogene-Induced Senescence in vivo and Its Evasion during Mammary Tumorigenesis. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 493–505. <https://doi.org/10.1038/ncb1567>.
111. Baek, K.H.; Ryeom, S. Detection of Oncogene-Induced Senescence in vivo. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1534*, 185–198. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6670-7_18.
112. Toogood, P.L.; Harvey, P.J.; Repine, J.T.; Sheehan, D.J.; VanderWel, S.N.; Zhou, H.; Keller, P.R.; McNamara, D.J.; Sherry, D.; Zhu, T.; et al. Discovery of a Potent and Selective Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinase 4/6. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2388–2406. <https://doi.org/10.1021/JM049354H>.
113. Fry, D.W.; Harvey, P.J.; Keller, P.R.; Elliott, W.L.; Meade, M.; Trachet, E.; Albassam, M.; Zheng, X.; Leopold, W.R.; Pryer, N.K.; et al. Specific Inhibition of Cyclin-Dependent Kinase 4/6 by PD 0332991 and Associated Antitumor Activity in Human Tumor Xenografts. *Mol. Cancer Ther.* **2004**, *3*, 1427–1438. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.1427.3.11>.

114. Gelbert, L.M.; Cai, S.; Lin, X.; Sanchez-Martinez, C.; Del Prado, M.; Lallena, M.J.; Torres, R.; Ajamie, R.T.; Wishart, G.N.; Flack, R.S.; et al. Preclinical Characterization of the CDK4/6 Inhibitor LY2835219: In-Vivo Cell Cycle-Dependent/Independent Anti-Tumor Activities Alone/in Combination with Gemcitabine. *Investig. New Drugs* **2014**, *32*, 825–837. <https://doi.org/10.1007/S10637-014-0120-7>.
115. Kim, S.; Loo, A.; Chopra, R.; Caponigro, G.; Huang, A.; Vora, S.; Parasuraman, S.; Howard, S.; Keen, N.; Sellers, W.; et al. Abstract PR02: LEE011: An Orally Bioavailable, Selective Small Molecule Inhibitor of CDK4/6– Reactivating Rb in Cancer. *Mol. Cancer Ther.* **2013**, *12*, PR02. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.TARG-13-PR02>.
116. Vijayaraghavan, S.; Karakas, C.; Doostan, I.; Chen, X.; Bui, T.; Yi, M.; Raghavendra, A.S.; Zhao, Y.; Bashour, S.I.; Ibrahim, N.K.; et al. CDK4/6 and Autophagy Inhibitors Synergistically Induce Senescence in Rb Positive Cytoplasmic Cyclin E Negative Cancers. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15916. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS15916>.
117. Goel, S.; Decristo, M.J.; Watt, A.C.; Brinjones, H.; Sceneay, J.; Li, B.B.; Khan, N.; Ubellacker, J.M.; Xie, S.; Metzger-Filho, O.; et al. CDK4/6 Inhibition Triggers Anti-Tumour Immunity. *Nature* **2017**, *548*, 471–475. <https://doi.org/10.1038/NATURE23465>.
118. Anders, L.; Ke, N.; Hydring, P.; Choi, Y.J.; Widlund, H.R.; Chick, J.M.; Zhai, H.; Vidal, M.; Gygi, S.P.; Braun, P.; et al. A Systematic Screen for CDK4/6 Substrates Links FOXM1 Phosphorylation to Senescence Suppression in Cancer Cells. *Cancer Cell* **2011**, *20*, 620–634. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.10.001>.
119. Yoshida, A.; Lee, E.K.; Diehl, J.A. Induction of Therapeutic Senescence in Vemurafenib-Resistant Melanoma by Extended Inhibition of CDK4/6. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 2990–3002. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2931>.
120. Bollard, J.; Miguéla, V.; Ruiz De Galarreta, M.; Venkatesh, A.; Bian, C.B.; Roberto, M.P.; Tovar, V.; Sia, D.; Molina-Sánchez, P.; Nguyen, C.B.; et al. Palbociclib (PD-0332991), a Selective CDK4/6 Inhibitor, Restricts Tumour Growth in Preclinical Models of Hepatocellular Carcinoma. *Gut* **2017**, *66*, 1286–1296. <https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2016-312268>.
121. Rader, J.; Russell, M.R.; Hart, L.S.; Nakazawa, M.S.; Belcastro, L.T.; Martinez, D.; Li, Y.; Carpenter, E.L.; Attiyeh, E.F.; Diskin, S.J.; et al. Dual CDK4/CDK6 Inhibition Induces Cell-Cycle Arrest and Senescence in Neuroblastoma. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 6173–6182. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1675>.
122. Valenzuela, C.A.; Vargas, L.; Martinez, V.; Bravo, S.; Brown, N.E. Palbociclib-Induced Autophagy and Senescence in Gastric Cancer Cells. *Exp. Cell Res.* **2017**, *360*, 390–396. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.09.031>.
123. Kovatcheva, M.; Liao, W.; Klein, M.E.; Robine, N.; Geiger, H.; Crago, A.M.; Dickson, M.A.; Tap, W.D.; Singer, S.; Koff, A. ATRX Is a Regulator of Therapy Induced Senescence in Human Cells. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 386. <https://doi.org/10.1038/S41467-017-00540-5>.
124. Zhuang, C.; Miao, Z.; Wu, Y.; Guo, Z.; Li, J.; Yao, J.; Xing, C.; Sheng, C.; Zhang, W. Double-Edged Swords as Cancer Therapeutics: Novel, Orally Active, Small Molecules Simultaneously Inhibit P53-MDM2 Interaction and the NF-KB Pathway. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 567–577. <https://doi.org/10.1021/JM401800K>.
125. Kovatcheva, M.; Liu, D.D.; Dickson, M.A.; Klein, M.E.; O'Connor, R.; Wilder, F.O.; Socci, N.D.; Tap, W.D.; Schwartz, G.K.; Singer, S.; et al. MDM2 Turnover and Expression of ATRX Determine the Choice between Quiescence and Senescence in Response to CDK4 Inhibition. *Oncotarget* **2015**, *6*, 8226–8243. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.3364>.
126. Wang, B.; Varela-Eirin, M.; Brandenburg, S.M.; Hernandez-Segura, A.; van Vliet, T.; Jongbloed, E.M.; Wilting, S.M.; Ohtani, N.; Jager, A.; Demaria, M. Pharmacological CDK4/6 Inhibition Reveals a P53-Dependent Senescent State with Restricted Toxicity. *EMBO J.* **2022**, *41*, e108946. <https://doi.org/10.15252/EMBJ.2021108946>.
127. Wong, C.H.; Ma, B.B.Y.; Hui, C.W.C.; Lo, K.W.; Hui, E.P.; Chan, A.T.C. Preclinical Evaluation of Ribociclib and Its Synergistic Effect in Combination with Alpelisib in Non-Keratinizing Nasopharyngeal Carcinoma. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 8010. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26201-1>.
128. Kirkland, J.L.; Tchkonja, T. Senolytic Drugs: From Discovery to Translation. *J. Intern. Med.* **2020**, *288*, 518–536.
129. Van Deursen, J.M. The Role of Senescent Cells in Ageing. *Nature* **2014**, *509*, 439–446. <https://doi.org/10.1038/nature13193>.
130. Sikora, E.; Bielak-Zmijewska, A.; Mosieniak, G. Targeting Normal and Cancer Senescent Cells as a Strategy of Senotherapy. *Ageing Res. Rev.* **2019**, *55*, 100941.
131. Childs, B.G.; Durik, M.; Baker, D.J.; Van Deursen, J.M. Cellular Senescence in Aging and Age-Related Disease: From Mechanisms to Therapy HHS Public Access. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 1424–1435. <https://doi.org/10.1038/nm.4000>.
132. Dolgin, E. Send in the Senolytics. *Nat. Biotechnol.* **2020**, *38*, 1371–1377. <https://doi.org/10.1038/S41587-020-00750-1>.
133. Childs, B.G.; Baker, D.J.; Kirkland, J.L.; Campisi, J.; Deursen, J.M. Senescence and Apoptosis: Dueling or Complementary Cell Fates? *EMBO Rep.* **2014**, *15*, 1139–1153. <https://doi.org/10.15252/embr.201439245>.
134. Coppé, J.P.; Rodier, F.; Patil, C.K.; Freund, A.; Desprez, P.Y.; Campisi, J. Tumor Suppressor and Aging Biomarker P16(INK4a) Induces Cellular Senescence without the Associated Inflammatory Secretory Phenotype. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 36396–36403. <https://doi.org/10.1074/JBC.M111.257071>.
135. Burton, D.G.A.; Stolzing, A. Cellular Senescence: Immunosurveillance and Future Immunotherapy. *Ageing Res. Rev.* **2018**, *43*, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.02.001>.
136. Pellegrini, G.; Dellambra, E.; Paterna, P.; Golisano, O.; Traverso, C.E.; Rama, P.; Lacial, P.; De Luca, M. Telomerase Activity Is Sufficient to Bypass Replicative Senescence in Human Limbal and Conjunctival but Not Corneal Keratinocytes. *Eur. J. Cell Biol.* **2004**, *83*, 691–700. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00424>.

137. Galanos, P.; Vougas, K.; Walter, D.; Polyzos, A.; Maya-Mendoza, A.; Haagensen, E.J.; Kokkalis, A.; Roumelioti, F.M.; Gagos, S.; Tzetis, M.; et al. Chronic P53-Independent P21 Expression Causes Genomic Instability by Deregulating Replication Licensing. *Nat. Cell Biol.* **2016**, *18*, 777–789. <https://doi.org/10.1038/ncb3378>.
138. Lapasset, L.; Milhavel, O.; Prieur, A.; Besnard, E.; Babled, A.; Àt-Hamou, N.; Leschik, J.; Pellestor, F.; Ramirez, J.M.; De Vos, J.; et al. Rejuvenating Senescent and Centenarian Human Cells by Reprogramming through the Pluripotent State. *Genes Dev.* **2011**, *25*, 2248–2253. <https://doi.org/10.1101/GAD.173922.111>.
139. Patel, P.L.; Suram, A.; Mirani, N.; Bischof, O.; Herbig, U. Derepression of HTERT Gene Expression Promotes Escape from Oncogene-Induced Cellular Senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, E5024–E5033. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1602379113>.
140. Saleh, T.; Tyutyunyuk-Massey, L.; Gewirtz, D.A. Tumor Cell Escape from Therapy-Induced Senescence as a Model of Disease Recurrence after Dormancy. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 1044–1046. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3437/661365/P/TUMOR-CELL-ESCAPE-FROM-THERAPY-INDUCED-SENESCENCE>.
141. Milanovic, M.; Fan, D.N.Y.; Belenki, D.; Däbritz, J.H.M.; Zhao, Z.; Yu, Y.; Dörr, J.R.; Dimitrova, L.; Lenze, D.; Monteiro Barbosa, I.A.; et al. Senescence-Associated Reprogramming Promotes Cancer Stemness. *Nature* **2017**, *553*, 96–100. <https://doi.org/10.1038/nature25167>.
142. Short, S.; Fielder, E.; Miwa, S.; von Zglinicki, T. Senolytics and Senostatics as Adjuvant Tumour Therapy. *EBioMedicine* **2019**, *41*, 683–692. <https://doi.org/10.1016/j.EBIOM.2019.01.056>.
143. Carpenter, V.J.; Saleh, T.; Gewirtz, D.A. Senolytics for Cancer Therapy: Is All That Glitters Really Gold? *Cancers* **2021**, *13*, 723. <https://doi.org/10.3390/CANCERS13040723>.
144. Zhu, Y.; Tchkonja, T.; Fuhrmann-Stroissnigg, H.; Dai, H.M.; Ling, Y.Y.; Stout, M.B.; Pirtskhalava, T.; Giorgadze, N.; Johnson, K.O.; Giles, C.B.; et al. Identification of a Novel Senolytic Agent, Navitoclax, Targeting the Bcl-2 Family of Anti-Apoptotic Factors. *Aging Cell* **2016**, *15*, 428–435. <https://doi.org/10.1111/accel.12445>.
145. Chang, J.; Wang, Y.; Shao, L.; Laberge, R.M.; Demaria, M.; Campisi, J.; Janakiraman, K.; Sharpless, N.E.; Ding, S.; Feng, W.; et al. Clearance of Senescent Cells by ABT263 Rejuvenates Aged Hematopoietic Stem Cells in Mice. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 78–83. <https://doi.org/10.1038/nm.4010>.
146. Kim, H.N.; Chang, J.; Shao, L.; Han, L.; Iyer, S.; Manolagas, S.C.; O'Brien, C.A.; Jilka, R.L.; Zhou, D.; Almeida, M. DNA Damage and Senescence in Osteoprogenitors Expressing Osx1 May Cause Their Decrease with Age. *Aging Cell* **2017**, *16*, 693–703. <https://doi.org/10.1111/ACEL.12597>.
147. Cang, S.; Iragavarapu, C.; Savooji, J.; Song, Y.; Liu, D. ABT-199 (Venetoclax) and BCL-2 Inhibitors in Clinical Development. *J. Hematol. Oncol.* **2015**, *8*, 129. <https://doi.org/10.1186/S13045-015-0224-3>.
148. Zhu, Y.; Doornbal, E.J.; Pirtskhalava, T.; Giorgadze, N.; Wentworth, M.; Fuhrmann-Stroissnigg, H.; Niedernhofer, L.J.; Robbins, P.D.; Tchkonja, T.; Kirkland, J.L. New Agents That Target Senescent Cells: The Flavone, Fisetin, and the BCL-XL Inhibitors, A1331852 and A1155463. *Aging* **2017**, *9*, 955–963. <https://doi.org/10.18632/aging.101202>.
149. Liu, Z.; Wild, C.; Ding, Y.; Ye, N.; Chen, H.; Wold, E.A.; Zhou, J. BH4 Domain of Bcl-2 as a Novel Target for Cancer Therapy. *Drug Discov. Today* **2016**, *21*, 989–996. <https://doi.org/10.1016/j.DRUDIS.2015.11.008>.
150. Baar, M.P.; Brandt, R.M.C.; Putavet, D.A.; Klein, J.D.D.; Derks, K.W.J.; Bourgeois, B.R.M.; Stryeck, S.; Rijksen, Y.; van Willigenburg, H.; Feijtel, D.A.; et al. Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell* **2017**, *169*, 132–147.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.031>.
151. Liu, X.; Wang, Y.; Zhang, X.; Gao, Z.; Zhang, S.; Shi, P.; Zhang, X.; Song, L.; Hendrickson, H.; Zhou, D.; et al. Senolytic Activity of Piperlongumine Analogues: Synthesis and Biological Evaluation. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 3925–3938. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.06.013>.
152. Wang, Y.; Chang, J.; Liu, X.; Zhang, X.; Zhang, S.; Zhang, X.; Zhou, D.; Zheng, G. Discovery of Piperlongumine as a Potential Novel Lead for the Development of Senolytic Agents. *Aging* **2016**, *8*, 2915. <https://doi.org/10.18632/AGING.101100>.
153. Zhang, X.; Zhang, S.; Liu, X.; Wang, Y.; Chang, J.; Zhang, X.; Mackintosh, S.G.; Tackett, A.J.; He, Y.; Lv, D.; et al. Oxidation Resistance 1 Is a Novel Senolytic Target. *Aging Cell* **2018**, *17*, 12780. <https://doi.org/10.1111/ACEL.12780>.
154. Samaraweera, L.; Adomako, A.; Rodriguez-Gabin, A.; McDaid, H.M. A Novel Indication for Panobinostat as a Senolytic Drug in NSCLC and HNSCC. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1900. <https://doi.org/10.1038/S41598-017-01964-1>.
155. Zhu, Y.; Tchkonja, T.; Pirtskhalava, T.; Gower, A.C.; Ding, H.; Giorgadze, N.; Palmer, A.K.; Ikeno, Y.; Hubbard, G.B.; Lenburg, M.; et al. The Achilles' Heel of Senescent Cells: From Transcriptome to Senolytic Drugs. *Aging Cell* **2015**, *14*, 644–658. <https://doi.org/10.1111/ACEL.12344>.
156. Yousefzadeh, M.J.; Zhu, Y.; McGowan, S.J.; Angelini, L.; Fuhrmann-Stroissnigg, H.; Xu, M.; Ling, Y.Y.; Melos, K.I.; Pirtskhalava, T.; Inman, C.L.; et al. Fisetin Is a Senotherapeutic That Extends Health and Lifespan. *EBioMedicine* **2018**, *36*, 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.09.015>.
157. Tia, N.; Singh, A.K.; Pandey, P.; Azad, C.S.; Chaudhary, P.; Gambhir, I.S. Role of Forkhead Box O (FOXO) Transcription Factor in Aging and Diseases. *Gene* **2018**, *648*, 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.GENE.2018.01.051>.
158. Triana-Martinez, F.; Picallos-Rabina, P.; Da Silva-Álvarez, S.; Pietroccola, F.; Llanos, S.; Rodilla, V.; Soprano, E.; Pedrosa, P.; Ferreirós, A.; Barradas, M.; et al. Identification and Characterization of Cardiac Glycosides as Senolytic Compounds. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 4731. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12888-x>.

159. Fuhrmann-Stroissnigg, H.; Ling, Y.Y.; Zhao, J.; McGowan, S.J.; Zhu, Y.; Brooks, R.W.; Grassi, D.; Gregg, S.Q.; Stripay, J.L.; Dorronsoro, A.; et al. Identification of HSP90 Inhibitors as a Novel Class of Senolytics. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 422. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00314-z>.
160. Kang, H.T.; Park, J.T.; Choi, K.; Kim, Y.; Choi, H.J.C.; Jung, C.W.; Lee, Y.S.; Park, S.C. Chemical Screening Identifies ATM as a Target for Alleviating Senescence. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 616–623. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2342>.
161. Salminen, A.; Kauppinen, A.; Kaarniranta, K. Emerging Role of NF- κ B Signaling in the Induction of Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP). *Cell. Signal.* **2012**, *24*, 835–845. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.12.006>.
162. Herranz, N.; Gallage, S.; Mellone, M.; Wuestefeld, T.; Klotz, S.; Hanley, C.J.; Raguz, S.; Acosta, J.C.; Innes, A.J.; Banito, A.; et al. MTOR Regulates MAPKAPK2 Translation to Control the Senescence-Associated Secretory Phenotype. *Nat. Cell Biol.* **2015**, *17*, 1205–1217. <https://doi.org/10.1038/ncb3225>.
163. Laberge, R.M.; Sun, Y.; Orjalo, A.V.; Patil, C.K.; Freund, A.; Zhou, L.; Curran, S.C.; Davalos, A.R.; Wilson-Edell, K.A.; Liu, S.; et al. MTOR Regulates the Pro-Tumorigenic Senescence-Associated Secretory Phenotype by Promoting IL1A Translation. *Nat. Cell Biol.* **2015**, *17*, 1049–1061. <https://doi.org/10.1038/ncb3195>.
164. Alimbetov, D.; Davis, T.; Brook, A.J.C.; Cox, L.S.; Faragher, R.G.A.; Nurgozhin, T.; Zhumadilov, Z.; Kipling, D. Suppression of the Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) in Human Fibroblasts Using Small Molecule Inhibitors of P38 MAP Kinase and MK2. *Biogerontology* **2016**, *17*, 305. <https://doi.org/10.1007/s10522-015-9610-Z>.
165. Wiley, C.D.; Schaum, N.; Alimirah, F.; Lopez-Dominguez, J.A.; Orjalo, A.V.; Scott, G.; Desprez, P.Y.; Benz, C.; Davalos, A.R.; Campisi, J. Small-Molecule MDM2 Antagonists Attenuate the Senescence-Associated Secretory Phenotype. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 2410. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20000-4>.
166. Jeon, O.H.; Kim, C.; Laberge, R.M.; Demaria, M.; Rathod, S.; Vasserot, A.P.; Chung, J.W.; Kim, D.H.; Poon, Y.; David, N.; et al. Local Clearance of Senescent Cells Attenuates the Development of Post-Traumatic Osteoarthritis and Creates a pro-Regenerative Environment. *Nat. Med.* **2017**, *23*, 775–781. <https://doi.org/10.1038/NM.4324>.
167. Moiseeva, O.; Deschênes-Simard, X.; St-Germain, E.; Igelmann, S.; Huot, G.; Cadar, A.E.; Bourdeau, V.; Pollak, M.N.; Ferbeyre, G. Metformin Inhibits the Senescence-Associated Secretory Phenotype by Interfering with IKK/NF- κ B Activation. *Aging Cell* **2013**, *12*, 489–498. <https://doi.org/10.1111/ACEL.12075>.
168. Pitozzi, V.; Mocali, A.; Laurenzana, A.; Giannoni, E.; Cifola, I.; Battaglia, C.; Chiarugi, P.; Dolara, P.; Giovannelli, L. Chronic Resveratrol Treatment Ameliorates Cell Adhesion and Mitigates the Inflammatory Phenotype in Senescent Human Fibroblasts. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **2013**, *68*, 371–381. <https://doi.org/10.1093/GERONA/GLS183>.
169. Faget, D.V.; Ren, Q.; Stewart, S.A. Unmasking Senescence: Context-Dependent Effects of SASP in Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2019**, *19*, 439–453. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0156-2>.
170. Xu, M.; Tchkonina, T.; Ding, H.; Ogrodnik, M.; Lubbers, E.R.; Pirtskhalava, T.; White, T.A.; Johnson, K.O.; Stout, M.B.; Mezera, V.; et al. JAK Inhibition Alleviates the Cellular Senescence-Associated Secretory Phenotype and Frailty in Old Age. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, E6301–E6310. <https://doi.org/10.1073/pnas.1515386112>.
171. Van Rhee, F.; Wong, R.S.; Munshi, N.; Rossi, J.F.; Ke, X.Y.; Fossà, A.; Simpson, D.; Capra, M.; Liu, T.; Hsieh, R.K.; et al. Siltuximab for Multicentric Castlemans Disease: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Lancet Oncol.* **2014**, *15*, 966–974. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70319-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70319-5).
172. Raffaele, M.; Kovacicovcova, K.; Biagini, T.; Lo Re, O.; Frohlich, J.; Giallongo, S.; Nhan, J.D.; Giannone, A.G.; Cabibi, D.; Ivanov, M.; et al. Nociceptin/Orphanin FQ Opioid Receptor (NOP) Selective Ligand MCOPPB Links Anxiolytic and Senolytic Effects. *GeroScience* **2022**, *44*, 463–483. <https://doi.org/10.1007/S11357-021-00487-Y>.
173. Cochemé, H.M.; Murphy, M.P. Can Antioxidants Be Effective Therapeutics? *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2010**, *11*, 426–431. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20336590/> (accessed on 20 March 2022).
174. Firuzi, O.; Miri, R.; Tavakkoli, M.; Saso, L. Antioxidant Therapy: Current Status and Future Prospects. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 3871–3888. <https://doi.org/10.2174/092986711803414368>.
175. Bjelakovic, G.; Nikolova, D.; Gluud, L.L.; Simonetti, R.G.; Gluud, C. Mortality in Randomized Trials of Antioxidant Supplements for Primary and Secondary Prevention: Systematic Review and Meta-Analysis. *JAMA* **2007**, *297*, 842–857. <https://doi.org/10.1001/JAMA.297.8.842>.
176. Dallner, G.; Sindelar, P.J. Regulation of Ubiquinone Metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, *29*, 285–294. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00307-5](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00307-5).
177. Garrido-Maraver, J.; Cordero, M.D.; Oropesa-Ávila, M.; Fernández Vega, A.; De La Mata, M.; Delgado Pavón, A.; De Miguel, M.; Pérez Calero, C.; Villanueva Paz, M.; Cotán, D.; et al. Coenzyme Q10 Therapy. *Mol. Syndromol.* **2014**, *5*, 187–197. <https://doi.org/10.1159/000360101>.
178. Reeves, M.A.; Hoffmann, P.R. The Human Selenoproteome: Recent Insights into Functions and Regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 2457–2478. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0032-4>.
179. Vinceti, M.; Bonvicini, F.; Bergomi, M.; Malagoli, C. Possible Involvement of Overexposure to Environmental Selenium in the Etiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Short Review. *Ann. Dell'istituto Super. Sanità* **2010**, *46*, 279–283. https://doi.org/10.4415/ANN_10_03_09.
180. Sanmartin, C.; Plano, D.; Font, M.; Palop, J.A. Selenium and Clinical Trials: New Therapeutic Evidence for Multiple Diseases. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 4635–4650. <https://doi.org/10.2174/092986711797379249>.

181. Artero, A.; Artero, A.; Tarín, J.J.; Cano, A. The Impact of Moderate Wine Consumption on Health. *Maturitas* **2015**, *80*, 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.MATURITAS.2014.09.007>.
182. Bouzid, M.A.; Filaire, E.; McCall, A.; Fabre, C. Radical Oxygen Species, Exercise and Aging: An Update. *Sports Med.* **2015**, *45*, 1245–1261. <https://doi.org/10.1007/S40279-015-0348-1>.
183. Radak, Z.; Zhao, Z.; Koltai, E.; Ohno, H.; Atalay, M. Oxygen Consumption and Usage during Physical Exercise: The Balance between Oxidative Stress and ROS-Dependent Adaptive Signaling. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *18*, 1208–1246. <https://doi.org/10.1089/ARS.2011.4498>.
184. Battram, A.M.; Bachiller, M.; Martín-Antonio, B. Senescence in the Development and Response to Cancer with Immunotherapy: A Double-Edged Sword. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4346. <https://doi.org/10.3390/IJMS21124346>.
185. Krizhanovsky, V.; Yon, M.; Dickins, R.A.; Hearn, S.; Simon, J.; Miething, C.; Yee, H.; Zender, L.; Lowe, S.W. Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis. *Cell* **2008**, *134*, 657–667. <https://doi.org/10.1016/j.CELL.2008.06.049>.
186. Sagiv, A.; Burton, D.G.A.; Moshayev, Z.; Vadai, E.; Wensveen, F.; Ben-Dor, S.; Golani, O.; Polic, B.; Krizhanovsky, V. NKG2D Ligands Mediate Immunosurveillance of Senescent Cells. *Aging* **2016**, *8*, 328–344. <https://doi.org/10.18632/AGING.100897>.
187. Kale, A.; Sharma, A.; Stolzing, A.; Stolzing, A.; Desprez, P.Y.; Desprez, P.Y.; Campisi, J.; Campisi, J. Role of Immune Cells in the Removal of Deleterious Senescent Cells. *Immun. Ageing* **2020**, *17*, 16. <https://doi.org/10.1186/S12979-020-00187-9>.
188. Ovadya, Y.; Landsberger, T.; Leins, H.; Vadai, E.; Gal, H.; Biran, A.; Yosef, R.; Sagiv, A.; Agrawal, A.; Shapira, A.; et al. Impaired Immune Surveillance Accelerates Accumulation of Senescent Cells and Aging. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 5435. <https://doi.org/10.1038/S41467-018-07825-3>.
189. Moutsatsou, P.; Ochs, J.; Schmitt, R.H.; Hewitt, C.J.; Hanga, M.P. Automation in Cell and Gene Therapy Manufacturing: From Past to Future. *Biotechnol. Lett.* **2019**, *41*, 1245–1253. <https://doi.org/10.1007/S10529-019-02732-Z>.
190. Kang, T.W.; Yevsa, T.; Woller, N.; Hoenicke, L.; Wuestefeld, T.; Dauch, D.; Hohmeyer, A.; Gereke, M.; Rudalska, R.; Potapova, A.; et al. Senescence Surveillance of Pre-Malignant Hepatocytes Limits Liver Cancer Development. *Nature* **2011**, *479*, 547–551. <https://doi.org/10.1038/NATURE10599>.
191. Iannello, A.; Thompson, T.W.; Ardolino, M.; Lowe, S.W.; Raulet, D.H. P53-Dependent Chemokine Production by Senescent Tumor Cells Supports NKG2D-Dependent Tumor Elimination by Natural Killer Cells. *J. Exp. Med.* **2013**, *210*, 2057–2069. <https://doi.org/10.1084/JEM.20130783>.
192. Eggert, T.; Wolter, K.; Ji, J.; Ma, C.; Yevsa, T.; Klotz, S.; Medina-Echeverez, J.; Longerich, T.; Forgues, M.; Reisinger, F.; et al. Distinct Functions of Senescence-Associated Immune Responses in Liver Tumor Surveillance and Tumor Progression. *Cancer Cell* **2016**, *30*, 533–547. <https://doi.org/10.1016/j.CCELL.2016.09.003>.
193. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.CELL.2011.02.013>.
194. Kuilman, T.; Michaloglou, C.; Vredeveld, L.C.W.; Douma, S.; van Doorn, R.; Desmet, C.J.; Aarden, L.A.; Mooi, W.J.; Peeper, D.S. Oncogene-Induced Senescence Relayed by an Interleukin-Dependent Inflammatory Network. *Cell* **2008**, *133*, 1019–1031. <https://doi.org/10.1016/j.CELL.2008.03.039>.
195. Acosta, J.C.; O’Loughlin, A.; Banito, A.; Guijarro, M.V.; Augert, A.; Raguz, S.; Fumagalli, M.; Da Costa, M.; Brown, C.; Popov, N.; et al. Chemokine Signaling via the CXCR2 Receptor Reinforces Senescence. *Cell* **2008**, *133*, 1006–1018. <https://doi.org/10.1016/j.CELL.2008.03.038>.
196. Birch, J.; Passos, J.F. Targeting the SASP to Combat Ageing: Mitochondria as Possible Intracellular Allies? *Bioessays* **2017**, *39*, 1600235. <https://doi.org/10.1002/BIES.201600235>.
197. Sieben, C.J.; Sturmlechner, I.; van de Sluis, B.; van Deursen, J.M. Two-Step Senescence-Focused Cancer Therapies. *Trends Cell Biol.* **2018**, *28*, 723–737. <https://doi.org/10.1016/j.TCB.2018.04.006>.
198. Wang, L.; Leite de Oliveira, R.; Wang, C.; Fernandes Neto, J.M.; Mainardi, S.; Evers, B.; Liefink, C.; Morris, B.; Jochems, F.; Willemsen, L.; et al. High-Throughput Functional Genetic and Compound Screens Identify Targets for Senescence Induction in Cancer. *Cell Rep.* **2017**, *21*, 773–783. <https://doi.org/10.1016/j.CELREP.2017.09.085>.
199. Jochems, F.; Thijssen, B.; De Conti, G.; Jansen, R.; Pogacar, Z.; Groot, K.; Wang, L.; Schepers, A.; Wang, C.; Jin, H.; et al. The Cancer SENESclopedia: A Delineation of Cancer Cell Senescence. *Cell Rep.* **2021**, *36*, 109441. <https://doi.org/10.1016/j.CELREP.2021.109441>.
200. Saleh, T.; Carpenter, V.J.; Tyutyunyk-Massey, L.; Murray, G.; Levenson, J.D.; Souers, A.J.; Alotaibi, M.R.; Faber, A.C.; Reed, J.; Harada, H.; et al. Clearance of Therapy-Induced Senescent Tumor Cells by the Senolytic ABT-263 via Interference with BCL-X L-BAX Interaction. *Mol. Oncol.* **2020**, *14*, 2504–2519. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12761>.
201. Demaria, M.; O’Leary, M.N.; Chang, J.; Shao, L.; Liu, S.; Alimirah, F.; Koenig, K.; Le, C.; Mitin, N.; Deal, A.M.; et al. Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse. *Cancer Discov.* **2017**, *7*, 165–176. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0241>.
202. Wu, H.; Schiff, D.S.; Lin, Y.; Neboori, H.J.R.; Goyal, S.; Feng, Z.; Haffty, B.G. Ionizing Radiation Sensitizes Breast Cancer Cells to Bcl-2 Inhibitor, ABT-737, through Regulating Mcl-1. *Radiat. Res.* **2014**, *182*, 618–625. <https://doi.org/10.1667/RR13856.1>.
203. Hann, C.L.; Daniel, V.C.; Sugar, E.A.; Dobromilskaya, I.; Murphy, S.C.; Cope, L.; Lin, X.; Hierman, J.S.; Wilburn, D.L.; Watkins, D.N.; et al. Therapeutic Efficacy of ABT-737, a Selective Inhibitor of BCL-2, in Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 2321–2328. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5031>.

204. González-Gualda, E.; Páez-Ribes, M.; Lozano-Torres, B.; Macías, D.; Wilson, J.R.; González-López, C.; Ou, H.L.; Mirón-Barroso, S.; Zhang, Z.; Lérída-Viso, A.; et al. Galacto-Conjugation of Navitoclax as an Efficient Strategy to Increase Senolytic Specificity and Reduce Platelet Toxicity. *Aging Cell* **2020**, *19*, e13142. <https://doi.org/10.1111/ACEL.13142>.
205. Guerrero, A.; Herranz, N.; Sun, B.; Wagner, V.; Gallage, S.; Guiho, R.; Wolter, K.; Pombo, J.; Irvine, E.E.; Innes, A.J.; et al. Cardiac Glycosides Are Broad-Spectrum Senolytics. *Nat. Metab.* **2019**, *1*, 1074–1088. <https://doi.org/10.1038/S42255-019-0122-Z>.
206. Fung, A.S.; Wu, L.; Tannock, I.F. Concurrent and Sequential Administration of Chemotherapy and the Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor Temsirolimus in Human Cancer Cells and Xenografts. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 5389–5395. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-3007>.
207. Wang, C.; Vegna, S.; Jin, H.; Benedict, B.; Liefink, C.; Ramirez, C.; de Oliveira, R.L.; Morris, B.; Gadiot, J.; Wang, W.; et al. Inducing and Exploiting Vulnerabilities for the Treatment of Liver Cancer. *Nature* **2019**, *574*, 268–272. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1607-3>.
208. Deng, J.; Wang, E.S.; Jenkins, R.W.; Li, S.; Dries, R.; Yates, K.; Chhabra, S.; Huang, W.; Liu, H.; Aref, A.R.; et al. CDK4/6 Inhibition Augments Antitumor Immunity by Enhancing T-Cell Activation. *Cancer Discov.* **2018**, *8*, 216–233. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0915>.
209. Knudsen, E.S.; Kumarasamy, V.; Chung, S.; Ruiz, A.; Vail, P.; Tzetzio, S.; Wu, J.; Nambiar, R.; Sivinski, J.; Chauhan, S.S.; et al. Targeting Dual Signalling Pathways in Concert with Immune Checkpoints for the Treatment of Pancreatic Cancer. *Gut* **2021**, *70*, 127–138. <https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2020-321000>.
210. Brenner, E.; Schörg, B.F.; Ahmetlić, F.; Wieder, T.; Hilke, F.J.; Simon, N.; Schroeder, C.; Demidov, G.; Riedel, T.; Fehrenbacher, B.; et al. Cancer Immune Control Needs Senescence Induction by Interferon-Dependent Cell Cycle Regulator Pathways in Tumours. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1335. <https://doi.org/10.1038/S41467-020-14987-6>.
211. Amor, C.; Feucht, J.; Leibold, J.; Ho, Y.J.; Zhu, C.; Alonso-Curbelo, D.; Mansilla-Soto, J.; Boyer, J.A.; Li, X.; Giavridis, T.; et al. Senolytic CAR T Cells Reverse Senescence-Associated Pathologies. *Nature* **2020**, *583*, 127–132. <https://doi.org/10.1038/S41586-020-2403-9>.
212. Agostini, A.; Mondragón, L.; Bernardos, A.; Martínez-Mañez, R.; Dolores Marcos, M.; Sancenón, F.; Soto, J.; Costero, A.; Manguan-García, C.; Perona, R.; et al. Targeted Cargo Delivery in Senescent Cells Using Capped Mesoporous Silica Nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10556–10560. <https://doi.org/10.1002/ANIE.201204663>.
213. Muñoz-Espín, D.; Rovira, M.; Galiana, I.; Giménez, C.; Lozano-Torres, B.; Páez-Ribes, M.; Llanos, S.; Chaib, S.; Muñoz-Martín, M.; Uceró, A.C.; et al. A Versatile Drug Delivery System Targeting Senescent Cells. *EMBO Mol. Med.* **2018**, *10*, e9355. <https://doi.org/10.15252/EMMM.201809355>.
214. Thapa, R.K.; Nguyen, H.T.; Jeong, J.H.; Kim, J.R.; Choi, H.G.; Yong, C.S.; Kim, J.O. Progressive Slowdown/Prevention of Cellular Senescence by CD9-Targeted Delivery of Rapamycin Using Lactose-Wrapped Calcium Carbonate Nanoparticles. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 43299. <https://doi.org/10.1038/SREP43299>.
215. Ke, S.; Lai, Y.; Zhou, T.; Li, L.; Wang, Y.; Ren, L.; Ye, S. Molybdenum Disulfide Nanoparticles Resist Oxidative Stress-Mediated Impairment of Autophagic Flux and Mitigate Endothelial Cell Senescence and Angiogenic Dysfunctions. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2018**, *4*, 663–674. https://doi.org/10.1021/ACSBIOMATERIALS.7B00714/SUPPL_FILE/AB7B00714_SI_001.PDF.
216. Thoppil, H.; Riabowol, K. Senolytics: A Translational Bridge between Cellular Senescence and Organismal Aging. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *7*, 367. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2019.00367/BIBTEX>.
217. Wissler Gerdes, E.O.; Misra, A.; Netto, J.M.E.; Tchkonja, T.; Kirkland, J.L. Strategies for Late Phase Preclinical and Early Clinical Trials of Senolytics. *Mech. Ageing Dev.* **2021**, *200*, 111591. <https://doi.org/10.1016/J.MAD.2021.111591>.

An efficient, non-invasive approach for *in-vivo* sampling of hair follicles: design and applications in monitoring DNA damage and aging

Natalie Kudlova^{1,*}, Hanus Slavik^{1,*}, Pavlina Duskova¹, Tomas Furst², Josef Srovnal¹, Jiri Bartek^{1,3,4}, Martin Mistrik¹, Marian Hajduch¹

¹Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University and University Hospital Olomouc, Olomouc 779 00, Czech Republic

²Faculty of Science, Palacky University and University Hospital in Olomouc, Olomouc 779 00, Czech Republic

³Danish Cancer Society Research Center, Copenhagen DK-2100, Denmark

⁴Division of Genome Biology, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Science for Life Laboratory, Karolinska Institute, Stockholm 171 77, Sweden

*Equal contribution

Correspondence to: Martin Mistrik, Marian Hajduch; email: martin.mistrik@upol.cz, marian.hajduch@upol.cz

Keywords: hair follicle cells, non-invasive sampling, irradiation, cellular senescence, DNA damage response

Received: July 15, 2021

Accepted: November 22, 2021

Published: December 6, 2021

Copyright: © 2021 Kudlova et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/) (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

In accordance with the 3 Rs principle (to replace, reduce and refine) animal models in biomedical research, we have developed and applied a new approach for sampling and analyzing hair follicles in various experimental settings. This involves use of a convenient device for non-invasive collection of hair follicles and processing methods that provide sufficient amounts of biological material to replace stressful and painful biopsies. Moreover, the main components of hair follicles are live cells of epithelial origin, which are highly relevant for most types of malignant tumors, so they provide opportunities for studying aging-related pathologies including cancer. Here, we report the successful use of the method to obtain mouse hair follicular cells for genotyping, quantitative PCR, and quantitative immunofluorescence. We present proof of concept data demonstrating its utility for routine genotyping and monitoring changes in quality and expression levels of selected proteins in mice after gamma irradiation and during natural or experimentally induced aging. We also performed pilot translation of animal experiments to human hair follicles irradiated *ex vivo*. Our results highlight the value of hair follicles as biological material for convenient *in vivo* sampling and processing in both translational research and routine applications, with a broad range of ethical and logistic advantages over currently used biopsy-based approaches.

INTRODUCTION

Hair follicles provide a very accessible source of biological material that can be non-invasively obtained from most mammals [1, 2]. Such material is particularly valuable for experiments with rodent models involving repeated sampling that currently require multiple invasive biopsies, which are relatively laborious and

stressful for the animals [3]. Replacement of blood or skin tissue collection would also be convenient for specific examinations in human medicine [4–6]. This micro-organ structure also has other advantages in biomarker studies, including suitability for investigations of circadian rhythms [5, 7], and the presence of numerous cell types in a small area, which can be easily distinguished, such as keratinocytes, melanocytes, or

perifollicular macrophages and mast cells [8–10]. However, the epithelial component of the follicles is the most promising for biomarker investigations because most neoplastic diseases have an epithelial origin.

Here, we present a proof of concept study involving use of a newly designed and constructed device allowing collection of large amounts of murine hairs with their hair roots containing follicular cells. We also demonstrate that DNA, RNA, and proteins in the collected hair follicle cells can be conveniently analyzed using standard cell and molecular biology methods such as genotyping, qPCR, and immunofluorescence analyses. The study focused on changes associated with the DNA damage response (DDR), especially double-strand breaks, and cellular senescence both in naturally aged tissue and induced using ionizing radiation (IR).

RESULTS

Design of the follicular cells' collector

The device we developed sucks hair from skin by vacuum suction. It uses removable disposable forceps of inert fixation-compatible material; forceps are made from a pair of modified pipette tips of different sizes (one inside the other). The bigger pipette tip is connected to a pistol-like device and covers the smaller tip connected to a piston. The smaller tip clicks into the bigger one by piston push, thereby firmly gripping the sucked hairs. The tip is removed from the pistol by a further push of the piston and stays attached to the skin via the squeezed hair. The forceps with gripped hairs are then manually removed. The removed hairs include follicles composed of multiple live follicular cells (Figure 1). Approximately 200 mice hairs can be

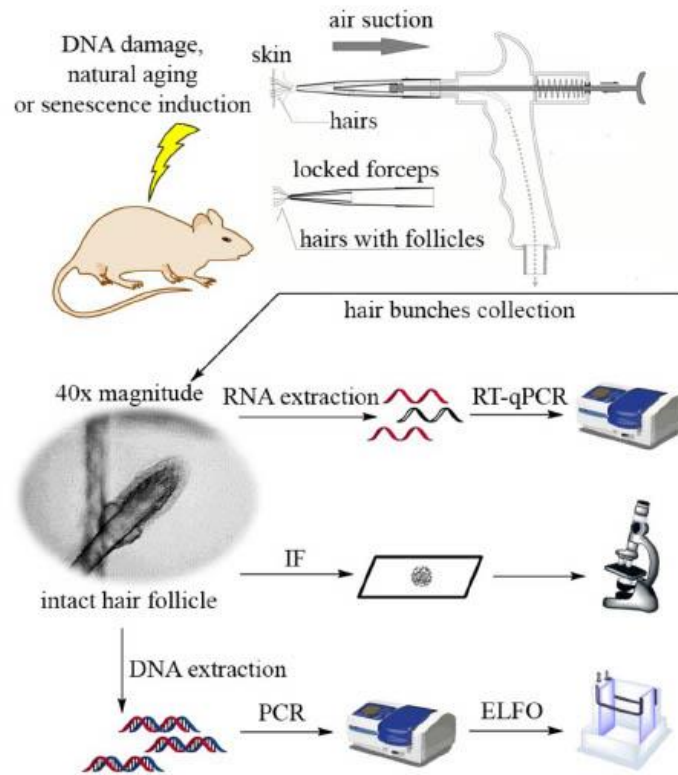


Figure 1. Design of the customized suction-based collector of hair follicle samples and scheme of the experimental workflow in the study.

removed in a single sample and each follicle contains approximately 50 cells. Inert and disposable forceps allow easy manipulation and immediate processing of the sample by fixation or lysis. The process is fast, easy, and does not involve touching the hair (Supplementary Video 1). Other advantages of the method include noninvasiveness, allowing many repetitive multi-site collections with minimal stress to the experimental animals.

Pre-processing of murine hairs

Hair follicles are morphologically intact and can be easily recognized during microscopic evaluation (Figure 2A). Collected hairs can be stored in a dry state or suitable medium, e.g. for nucleic acid extraction. We obtained median yields of 275 and 486 ng of total RNA and DNA per pluck of hairs obtained with our collection device according to analyses with a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Moreover, the quality of RNA is usually high and suitable for further analyses with a RIN (RNA integrity number) of ca. 8 units according to analysis with an Agilent Bioanalyzer 2100. Thus, we consider DNA and RNA yields and qualities, presented in Figure 2B, sufficient for further experiments. There is no need for any special processing steps such as homogenization for isolating nucleic acids or cutting slices for microscopic analyses, and the material can be collected and processed repeatedly, within short times and in high amounts, from mice.

Genotyping of collected follicular cells fully replaces tail biopsies

Genotyping is one of the most common reasons for biopsy in research and commercial procedures involving genetically modified mice. Usually, a tip of the tail or an ear punch is collected from the examined mice to obtain DNA for analysis. To minimize pain and stress, the ethical standards of many countries require anesthesia before the collection, which complicates and prolongs the procedure. Here we show, that follicles collected by the specialized device described above can fully substitute tail tip biopsies. 5XFAD mice commonly used as a model for Alzheimer's and senescence-related diseases [11, 12], were used for proof of this concept. We compared the genotyping results from 151 tail biopsies and 151 hair samples from the offspring of 5XFAD transgenic males and C57Bl/6 females. For this, we assessed by PCR the presence or absence of two genes carried by the transgenic mice: *APP695* (*APP*, encoding an amyloid-beta [A β] mouse/human chimeric precursor protein) and *PSEN1* (*PST*, encoding human presenilin 1). Results obtained with DNA samples from hair bunches and tail biopsies were fully consistent (presence of both transgenes or absence of both, with no sample showing presence of only one of the transgenes). Thus, hair follicles could apparently fully replace tail biopsy for genotyping, with no loss of accuracy. Results of electrophoretic separation analysis demonstrating the transgenes' presence or absence are shown in Figure 3.

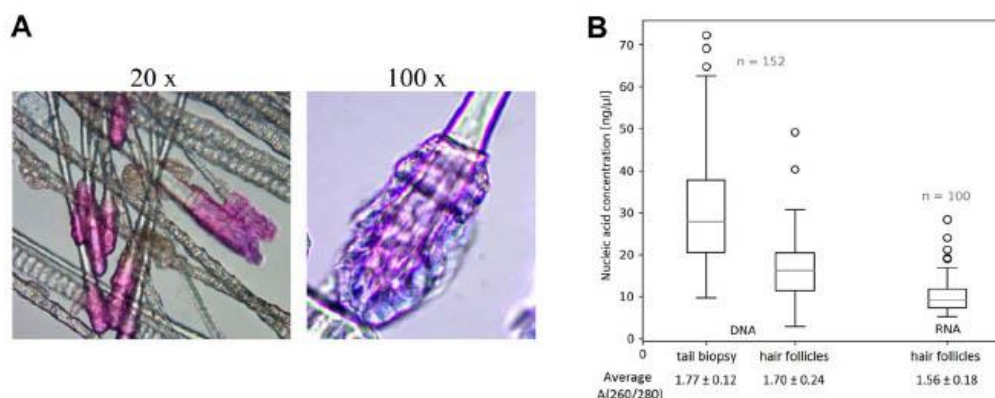


Figure 2. Murine hair follicles as starting material. (A) Representative images of hairs highlighted with Giemsa – Romanowsky staining (and indicated magnification) showing intact hair follicles obtained by sampling with our vacuum collector. (B) Comparison of DNA isolation results from hair follicles obtained with our device and common tail biopsies, and yields of RNA isolated from hair follicles. The quantity and quality of all nucleic acid samples, in 30 μ l solutions, were measured using a ND 1000 Spectrophotometer. Data are presented as boxplots showing median, maximum and minimum values, their quartile distribution, interquartile range, and outlier values.

Downstream transcriptional DNA damage response in hair follicle cells after gamma irradiation *in-vivo*

Gamma irradiation, the most common mode of cancer treatment, causes complex responses in exposed cells called the DNA damage response (DDR). The DDR involves multiple transcriptional and posttranscriptional changes which are intensively investigated in cancer studies, and quantitative evaluation of DDR can be used for quick assessments of radiation exposure, radiotherapy monitoring, and identification of radiosensitive individuals [2, 13, 14]. Three commonly used markers (*p21*, *SESNI*, and *MDM2*) in the ATM/CHEK2/p53 pathway, which directly responds to DNA damage, were tested for acute radiation response by RT-qPCR. The

stability of their expression in the absence of IR was checked and *p21* showed the least variability between samples obtained on multiple occasions (significance of between-time differences: $p = 0.530$). In contrast, there were significant between-time differences in *SESNI* expression in irradiated samples and even in the absence of IR ($p = 0.025$). We also consider *SESNI* an inappropriate marker for monitoring hair follicles after IR because it has very low basal expression (late Ct values or negativity). However, there was significant upregulation of *SESNI* 30 minutes after IR and downregulation after 24 h, especially at the highest doses (Figure 4). In further contrast, *MDM2* showed a much more stable amplification pattern, but very weak dependence on IR. Thus, *p21* provided the most valuable

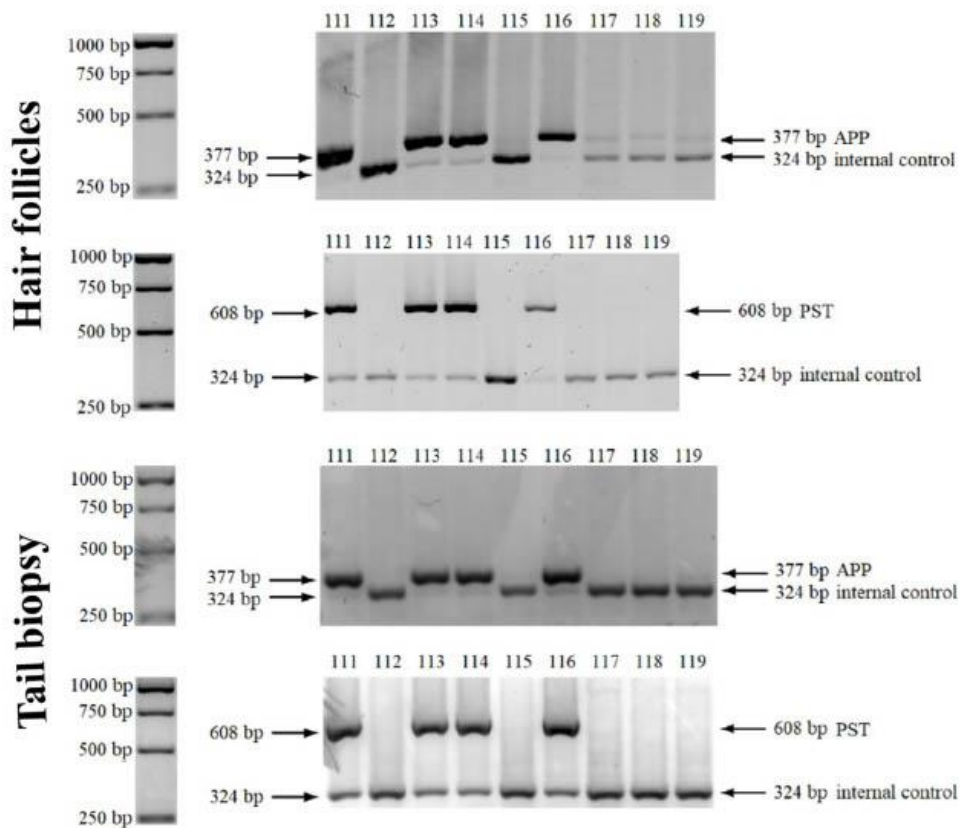


Figure 3. Genotyping using murine hair follicles. Results of PCR-agarose gel electrophoresis showing the presence or absence of *APP* and *PST* transgenes in representative samples (from mice 111 – 119), of both biological materials - hair follicles and tail biopsies. A 1 kb GeneRuler DNA ladder is presented on the left side.

amplification pattern, with the lowest variability and highest potential for distinguishing samples subjected to different IR doses and/or collected at different times. We observed a 2.5 median fold change (FC_m) 30 min after a 2 Gy dose, followed by a reduction to -1.54 after 24 h (Figure 4). A 6 Gy dose induced a longer response, with $FC_m = 1.81$ at 30 min after radiation, and no observed reduction until the 6 h time-point ($FC_m = 1.94$) and slight reduction to $FC_m = 1.24$ at the 24 h time point. The 10 Gy dose even induced an increase between the 30 min and 6 h time points ($FC_m = 2.25$ and 3.71, respectively). In summary, *p21* showed the most significant increase ($p < 0.01$) until 6 h after IR at all tested doses (Figure 4), with clear between-dose distinctions at some time points (with higher doses inducing higher FC_m values, except at the initial sampling point, 30 min after IR). In summary, our data provide some proof of concept by showing that our device and protocols can detect changes in expression patterns induced by external factors.

Immunofluorescence (IF) analysis of γ -H2AX lesions after gamma irradiation

In the previously mentioned ATM/CHEK2/p53 pathway and DDR, ATM kinase is directly recruited to DNA damage sites, where it phosphorylates histone H2AX on serine S139, forming γ -H2AX detectable as the immunofluorescent foci pattern in nuclei (Figure 5A - detail). We identified typical intense foci in the nuclei of irradiated hair follicles (Figure 5A). An IDD (intensity of DNA damage) value was calculated, as described in the methods section, for each hair follicle projection as averages from z-stack imaging (Figure 5B). Three to five morphologically intact follicles from each sample were scanned and analyzed. There were no statistically significant differences between measurements from either the same or different mice under defined conditions. Thus, we did not detect any inter-individual variability and there was no distinction between

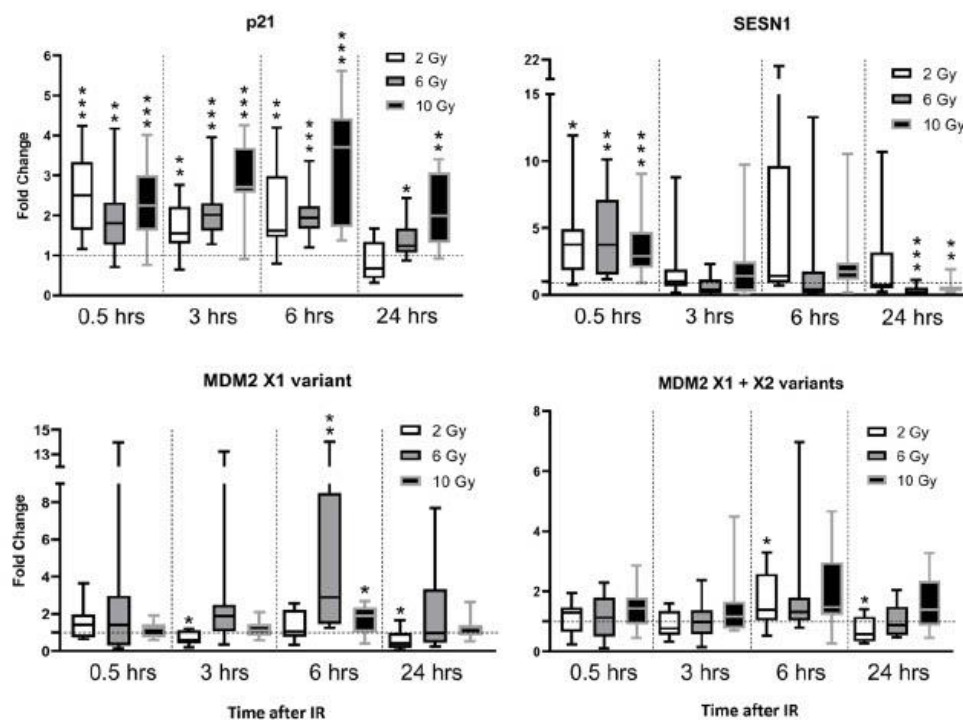


Figure 4. Gene expression changes (mRNA level) in murine hair follicles after *in vivo* ionizing irradiation. Data are expressed in boxplot graphs showing median, first quartile data distribution and maximum and minimum values of fold changes relative to expression at time zero (immediately before irradiation) normalized using *HPRT* mRNA levels. Results of paired t-tests of the significance of differences between indicated groups and times (relative to the zero-time point) are also depicted (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

biological and technical replicates in further calculations. The low numbers of subjects in our experiments ($n = 5$ per condition) may have contributed to this, but they were sufficient for clear quantitative resolution of samples differing in radiation dose and/or time after IR. There was a strong increase in IDD shortly after irradiation, with a gradual reduction during the following 24 h. The IDD was also quantitatively dependent on dose, with clear separation between samples given 2 Gy from those given 6 and 10 Gy doses. Thus, the direct DDR after IR quantitatively differed between doses, but followed similar dynamic patterns under all three doses, in the murine hair follicles (Figure 5C). Not only recognizable foci were detected, but also areas with continuous green γ -H2AX signal, which we attributed to apoptotic lesions, based on previous reports [2] and their general occurrence in samples from mice given the 10 Gy treatment. The 10 Gy treatment also resulted in lower IDD values than the 6 Gy treatment, possibly due to cell damage exceeding thresholds allowing proper

quantification, although there was no significant difference between 6 Gy- and 10 Gy-treated samples at any time point. The other between-dose differences in samples collected 30 min, 3 h, and 6 h after IR were significant according to the Kruskal-Wallis non-parametric test with multiple comparisons.

Apart from gamma irradiation, we tested also the possibility to induce DDR after topical application of chemical clastogens. To address such an option, we dissolved DNA damaging agents bleomycin and cisplatin in DMSO and applied them directly to small areas of the skin of tested animals. Collected hair follicles from the exposed areas indeed showed increased γ -H2AX staining in the nuclei compared to the control areas (Supplementary Figure 3). These data confirm that the topical application of various chemical compounds and direct assessment of their effects in follicular cells *in-vivo* is possible which enriches the portfolio of applications of the method significantly.

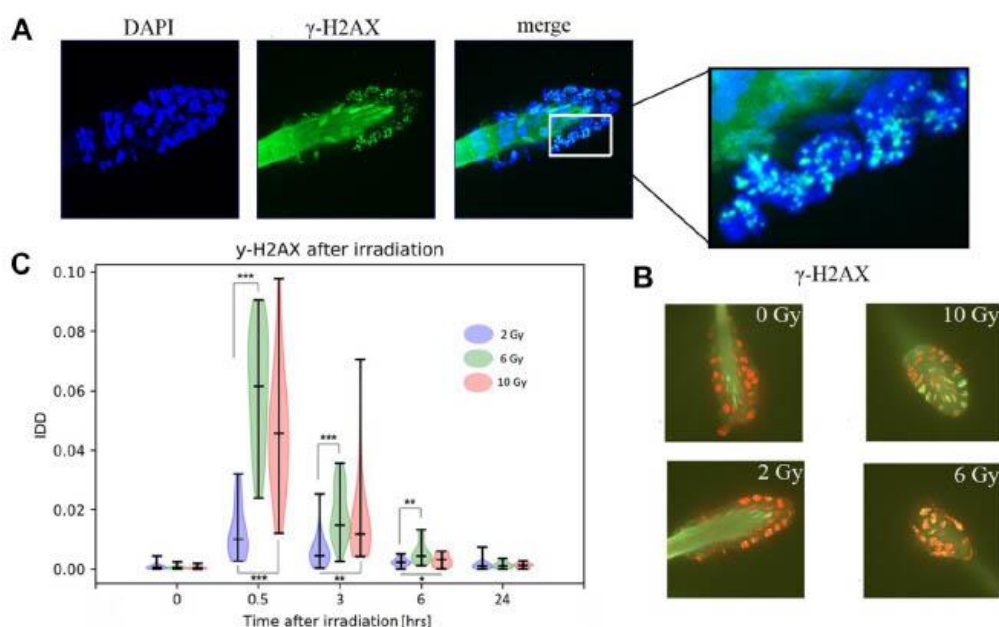


Figure 5. Immunofluorescent detection of γ -H2AX in murine hair follicles. (A) Representative images of a follicle after ionizing irradiation, extracted as maximum intensity projection from z-stack scanning by confocal spinning disc microscopy. Nuclei stained with DAPI and γ -H2AX foci and hair shaft autofluorescence are visible in the green channel. (B) Representative images used in the computational analyses of one z-stack layer, the red color of the nuclei (DNA) was selected artificially to maximize the visibility of green γ -H2AX foci. (C) Results of image analyses in terms of IDD (intensity of DNA damage), with each data point representing the area of the γ -H2AX signal related to the area of the nuclei in one scanned hair follicle in z-stack mode. Probability density of the data, maximal and minimal values, medians, and results of a multiple Kruskal-Wallis test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) are showed in violin plots.

Expression patterns of selected markers in mice hair follicular cells reflect their biological age

Senescent cells are commonly identified by increases in senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) activity [15–17], but assays of this activity have multiple limitations [18]. In contrast, *p16* and *p21* have known senescence-associated activities and functions [19–21], and their expression is highly elevated in a

wide variety of human and mouse senescent cell lines, so we used them as biomarkers for our age-related senescence measurements [22–24]. qPCR analyses of *p16* and *p21* expression levels using the acquired cDNA samples revealed significant differences in these two senescence biomarkers' expressions. *Inter alia*, there were strong differences in gene expression between young (6 months old, n=6) and old (2.5-3 years old, n=6) animals (Figure 6A) with $p < 0.05$, $p < 0.01$ or

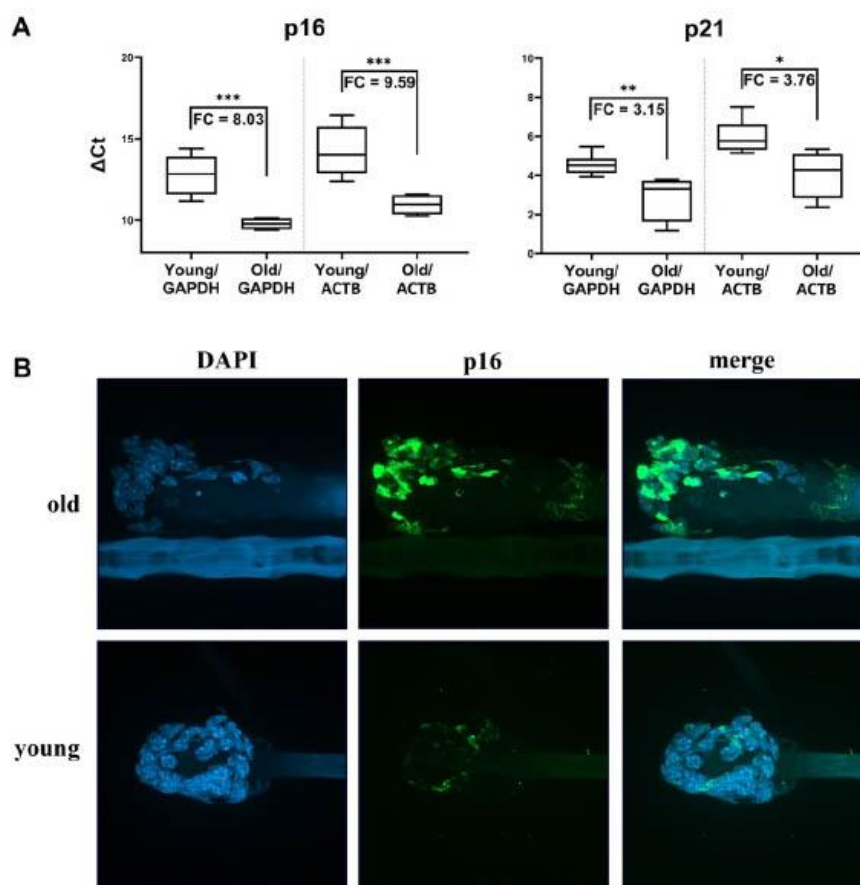


Figure 6. Markers of senescence analysis in hair follicular cells. (A) *p16* and *p21* gene expression (mRNA level) in hair follicles from young mice (6 months old) and old mice (2.5-3 years old) in boxplot graphs of Δ Ct values normalized using *GAPDH* or *ACTB*. Graphs show medians, first quartile data distribution, minimal and maximal points, and fold change values as a specifying detail. Results of a t-test are also shown (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). **(B)** Representative images showing the higher *p16* protein levels in murine hair follicles of old animals relative to those of young animals. Images were obtained from z-stack scanning with a confocal spinning disc microscope. DAPI-stained nuclei are shown in the blue channel and *p16* signals in the green channel. Autofluorescence can be seen in a hair shaft. Magnification 60x objective with oil immersion.

$p < 0.001$ depending on the housekeeping gene used for the data normalization and the target gene. Fold change differences in expression between the young and old animals of 8.03 and 9.58 ($p < 0.001$) were calculated for the *p16* marker, and 3.15 ($p < 0.01$) and 3.76 ($p < 0.05$) for *p21*. Naturally, no significant difference in expression of target senescence markers was detected using animals with the age difference of just a few months (data not shown). To support our qPCR data, we confirmed the changes in p16 expression at the protein level using immunofluorescence assays and the same mice cohort, which showed that cells from the older animals had higher levels of p16 protein (Figure 6B).

Radiation-induced senescence detection in murine hair follicles

The number of senescent cells in tissues can also be increased artificially by exposure to various DNA damaging factors. Gamma radiation is a very well-known inducer, and even mildly dosing of cells or animals can generate detectable senescence features [25, 26]. In addition, patients who have undergone anticancer chemo- and/or radiotherapy typically have higher numbers of senescent cells than non-treated counterparts of the same chronological age [27, 28]. We detected clear irradiation-dependent senescence induction in a mouse model, as irradiated soft tissue in the right hind leg acquired more senescent cells (according to expression levels of the *p16* and *p21* markers) than control tissue in the left hind leg. Hair follicles were collected at seven time-points (the first before IR) from the left and right hind legs of 10

mice. Significant elevation in expression of the selected *p16* and *p21* markers was observed in irradiated legs from 21 and 28 days after IR, respectively, relative to levels in samples collected directly before IR. Both markers remained constantly up-regulated until the last sampling time (35 days after IR), clearly indicating that senescence was induced in the irradiated tissue. The quantitative changes were not very strong, the highest observed FC_m was 2.26, for the *p16* marker 21 days after IR. However, the changes were significant ($p < 0.01$) at all of the last three sampling times for *p16* expression. The other marker, *p21*, showed weaker potential for discrimination between senescent and normal tissue in mice using hair follicle samples, with FC_m peaking at 1.25, 28 days after IR ($p < 0.05$). The expression of both markers remained unchanged in hair follicles of the control left legs during the experimental investigations (Figure 7). Those findings prompted the idea of using hair follicle cells as a murine irradiation-induced senescence model for studying senescence markers, aging experiments, and *in vivo* senolytic drug identification.

DISCUSSION

To meet ethical standards, experiments involving laboratory animals should be designed to obtain maximum information while minimizing stress, and ideally, they should be replaced wherever possible. Unfortunately, they cannot currently be replaced by alternative assays in numerous applications in basic and pre-clinical research. However, we present here a simple method for obtaining biological material in the

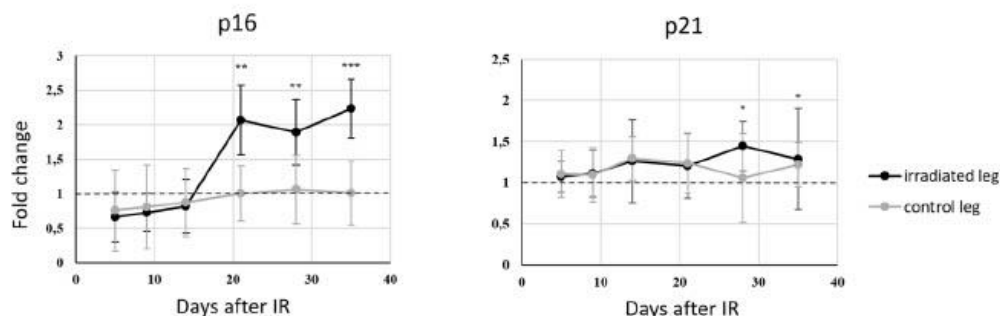


Figure 7. Changes with time in *p16* and *p21* gene expression (mRNA level) in murine hair follicles after a fractionated dose of 3×8 Gy applied *in vivo* to the right hind leg of a mouse, using each animal's left hind leg as a control. Data are expressed as fold changes relative to expression at the zero-time point (shortly before irradiation) normalized using *GAPDH* mRNA levels. Means and standard deviations are shown. ΔCt values from certain time points were compared using paired t-tests and relevant time points on curves are marked with asterisks (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$).

form of follicular cells from laboratory mice with sufficient quantities and quality for multiple analyses using standard modern molecular biology methods. The material has numerous advantages, including the convenience, non-invasiveness, and repeatability of the sample collection together with its contents of cells of epithelial origin and distal tissue, as well as the ease of exposing follicular tissue to test substances with topical applications (Supplementary Figure 3). The biggest limitations of follicular cell collection in the past were the complex logistics involved in processing the samples. Ordinary tweezers and forceps used in previous setups are extremely impractical with a high risk of cross-contamination, thus this material has been used in relatively few studies. We have circumvented these limitations by using our simple device, which enables a fast, convenient collection of follicular cells. The speed by which the samples can be collected and processed (e.g. by fixation) is among the biggest advantages of our solution as it can be performed within seconds. This fact limits any potential underlying cellular responses and additional DDR caused by confounding stressing factors related to the withdrawal process [2]. To corroborate the method's practical utility, we selected three applications. First, we proved that a sample of mouse hairs collected using disposable forceps in less than a minute (Supplementary Video 1) provides enough DNA for analysis by standard genotyping methods developed for tail tip biopsies or ear punches. As millions of laboratory mice are routinely genotyped globally every year this approach represents a major ethical and logistic breakthrough. Compared to such standard methods of biological biopsies (including phlebotomy) the amount of distress to the laboratory mice is relatively low caused mostly by the animal hand-grip as there is no visible pain reaction during the process of hair withdrawal (no twitching and/or squeaking). The absence of pain is supported also by the fact that the mice hair roots are, compared e.g. to humans, embedded relatively shallowly in upper skin layers [4, 10, 29] and very little strength is necessary for the withdrawal process.

Although hair samples have been previously used for that purpose [29–31], our sample collection approach may motivate researchers to use them more routinely and widely.

As we showed, mRNA can also be obtained from the collected samples in sufficient quantity and quality, so we designed another set of experiments in which we monitored changes in the expression of selected genes using qPCR. We targeted genes that respond to DNA damage caused by gamma irradiation and genes whose expression changes during oncogenesis. The DDR is intensively studied in carcinogenesis and cancer treatment research. IR markers often respond differently in different

biological materials, so there is no universally optimal marker that consistently provides quantitative responses, especially on the mRNA level. However, acute DDR has been detected accurately and dose-dependently by monitoring the dynamics of *p21* in previous studies [14, 32–34]. We dedicated *p21* as a suitable marker for gene expression measurements in hair follicles. It is also known that responses to IR differ and topically applied drugs can be more meaningfully evaluated using hair follicles than blood samples [2, 6]. Moreover, *p16* mRNA levels differ between samples of young and old human skin [35], which supports our use of its qPCR-based quantification to distinguish follicular cells of young and old mice. The marker has also been applied, for more than 10 years, in analyses of processes associated with senescence caused by G1 arrest, and thus oncogenesis [36], as well as for monitoring tissue degeneration (which can be regarded as premature tissue aging) caused by gamma irradiation or cytotoxic drugs [37]. Irradiation was used as the inducing factor in our artificially triggered senescence experiments, in which we applied fractionated doses of IR based on recent literature [38, 39], clinical experience together with our previous knowledge and optimization. We did not apply a single high IR dose as in previous studies [40] to avoid the formation of post-radiation skin lesions, which did not develop when using fractionated doses. Our approach opens new possibilities for research to find new drugs that can selectively eliminate senescent cells from organisms [41]. Thus, monitoring *p16* and *p21* mRNA levels by this method might replace laborious and less accurate methods, such as SA- β -gal assays in 'senolytics' research [42].

We also optimized the immunofluorescent (IF) approach for analyzing the collected follicular cells and thus monitoring selected proteins, including quantitative microscopy-based analysis of the DNA lesion marker γ -H2AX after gamma irradiation (Figure 5). For this, we developed software for routine evaluation of IDD by analysis of γ -H2AX foci in z-stack images of individual hair follicles and investigation of acute DDR after IR, which was made publicly available (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.14822643.v1>). The temporal dynamics we observed in our samples are consistent with previous results [2, 43] and generally, we proved that murine follicular cells can be used in IF assays of both nuclear and cytoplasmic proteins (Supplementary Figures 1, 2). It might be that the sensitivity of the method will be able to map functional differences between various GMO animals on the cellular level [4, 8]. For example, GMO mice harboring changes in genes involved in DDR could reveal differences in the DNA repair dynamics within the nuclei of follicular cells. Moreover, such tests could be also performed *ex-vivo*, because collected follicular cells are viable [5], without compromising genome

integrity [2], and can be kept alive for a significant time allowing various functional tests (Supplementary Figure 4). However, further research is needed to confirm such intriguing potential applications.

Last but not least, the method can be easily adapted for sampling other laboratory mammals, as hairs can be readily collected from rats, rabbits, dogs, monkeys, and even humans by the presented device (Supplementary Figure 4), opening a plethora of future research and biomedical applications.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement

All investigations were conducted following the ethical standards stated in the Declaration of Helsinki and other relevant national and international guidelines, with approval of the author's institutional review board.

Mouse hair collection

We collected each sample using an extraction device with modified pipette tips (described in patents EP2928382A1 and US 20150297253). We then placed the tips with the samples directly into 500 µl portions of RNeasy lysis buffer (Qiagen, Hilden, Germany) for RT-qPCR analysis or 500 µl of 10% neutral buffered formalin solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for immunofluorescence assays.

Human hair collection and *ex-vivo* irradiation

Hair follicles were collected from surface disinfected human calves and immediately put into the Dulbecco's modified Eagle's medium containing 4.5 g/l glucose (Biosera, Nuaille, France), supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco/Thermo Fisher Scientific, Grand Island, NY, USA) and 1% penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich). Samples were stored in the cell culture medium under normal cultivation conditions (5% CO₂, 37° C, 100% humidity) during the necessary incubation steps until the fixation for immunofluorescence assays. Human hair follicle samples were irradiated on Petri dishes with DMEM culture medium using X-ray RS225M Research Cabinet (Xstrahl, Suwanee, GA, USA) with a 2 Gy dose. Samples were fixed 30 min after irradiation and processed in the same way as described below in the „Immunofluorescence and image acquisition” chapter.

Irradiation

Thirty C57Bl/6 wild-type mice (Envigo, Huntingdon, UK) were used in the first part of the study, 10 mice for

each dose of ionizing radiation. An RS225M Research Cabinet (Xstrahl, Suwanee, GA, USA) was used to generate X-rays in all experiments. Each mouse was anesthetized with isoflurane (FORANE inhalation solution, Aesica, Hemel Hempstead, UK) before and during the application of the radiation. Only the right hind leg and adjacent parts of the body were irradiated, while the rest was covered by lead armor. Additionally, 10 mice Balb/cOlaHsd (Envigo, The Netherlands) were irradiated to induce senescence in muscle tissue with a fractionated dose of 3 x 8 Gy.

Topical application of chemical clastogens

HsdWin:NMRI mice (Envigo, Huntingdon, UK) females (3 animals per group) were treated with two clastogens (bleomycin or cis-platin) topically. Both compounds were dissolved in DMSO. We applied 16,6 µl of bleomycin solution (5 µg/ml) and 30 µl of cis-platin solution (0,5 mg/ml). Each mouse was treated on the right body side by gentle rubbing of the compound into the skin. The treated spot had approximately 1,5 cm in diameter, each treated spot was marked. Bleomycin-treated animals were incubated in their homecages for 1 hour and animals treated with cisplatin were incubated for 5 hours. Then we collected hair samples (treated samples from the marked spot, control samples from the left body side). All samples underwent IF staining for γ-H2AX detection.

DNA isolation and genotyping

We genotyped the offspring (151 animals) of 5XFAD transgenic males (B6Cg-TgTg(APP^SSwILon, PSEN1^{*M146L*L286V})6799Vas/Mmjax) obtained from The Jackson Laboratory and C57Bl/6 JOlaHsd females from Envigo (Huntingdon, UK) as genetic background. Genomic DNA was isolated from both mouse hair follicles and mouse tail biopsies with a Cobas® DNA Sample Preparation Kit (Roche, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. The presence of APP and PST transgenes was confirmed by optimized PCR, the reaction mixture contained 2 µl of template sample, 2 µl of 10 µM APP or PST primer mix, 2 µl of 10 µM internal control primer mix, 5 µl 5x GC buffer, 0.5 µl 10 mM deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs), 0.75 µl DMSO, 0.25 µl Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase and 12,5 µl nuclease-free water (reagents from New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Primers are listed in Supplementary Table 1. Reactions were performed using the following program: 98° C for 30 s, followed by 30 amplification cycles of 98° C for 10 s, 63° C for 30 s, 72° C for 10 s, then 72° C for 5 min and cooling afterward. PCR products were visualized and checked using 1% agarose/TBE gels and an Odyssey Fc

electrophoresis system (LI-COR, Lincoln, NE, USA). The presence or absence of target genes was determined and animals were categorized as GMO-positive (with both transgenes present) or GMO-negative (lacking both genes). Each sample had to contain a band for internal control (bp).

RNA extraction and reverse transcription

Total RNA was extracted from hair stacks lysed in 700 μ l of QIAzol Lysis Reagent and processed immediately using a miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommended protocol, except the need to discard hair samples before solutions were transferred into columns. Finally, RNA from each sample was eluted into 30 μ l RNase-free water. RNA concentration and quality were assessed by a Nanodrop ND 1000 Spectrophotometer (ThermoScientific, Wilmington, DE, USA). To obtain cDNA, total RNA was used for reverse transcription using 18.9 μ l of each sample, mixed with 0.3 μ g of Random Primers (Promega, Madison, WI, USA) to a final volume of 19.5 μ l and incubated at 70° C for 5 min. Then, samples were cooled for 1 min. A solution containing 6 μ l of RevertAid 5x RT buffer (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 3 μ l of 10 mM deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs), and 0.75 μ l of 40 U/ μ l RNAsin ribonuclease inhibitor (Promega) was added to each sample. The mixed solutions were incubated for 5 min at room temperature. In the last step, 150 U (0.75 μ l) of RevertAid Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase (Fermentas) was added to each sample. The final 30 μ l mixtures were incubated at room temperature for 10 min, 42° C for 60 min, and 70° C for 10 min. The resulting samples of cDNA were stored at -20° C. RNA for the subsequent aging experiment was obtained from mouse hair follicles of the mouse strain used for genotyping.

Quantitative PCR (qPCR)

For quantification of *p21*, *SENS1*, *MDM2* expression, as studied markers, and expression of *HPRT* as a housekeeping gene for relative quantification in the radiation experiment, real-time PCR was performed using a LightCycler 480 instrument (Roche). SYBR Green intercalation chemistry was used to detect the fluorescence signal and supplied software was used for Ct data generation and Tm analyses. An 18 μ l volume solution of each sample was mixed with 12.43 μ l DEPC-treated water (Ambion, Austin, TX, USA), 2 μ l 10X Thermo-Start PCR Buffer, 1.6 μ l of 25 mM MgCl₂, and 0.2 μ l of 5 U/ μ l Thermo-Start Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A 0.61 μ l portion of SYBR® Green I nucleic acid gel stain (10 000 x in DMSO) diluted in 10 mM Tris-HCl buffer

pH 8 (Sigma-Aldrich) was added to each mixture, followed by 0.16 μ l of 25 mM dNTPs (Promega) and 1 μ l of a solution of specific primers for the selected marker and species. Specific oligonucleotides were custom synthesized by Generi Biotech (Hradec Králové, Czech Republic) and are presented in Supplementary Table 1. Reactions were performed in doublets using 2 μ l cDNA. Touch-down programs were chosen for murine samples with the following cycling parameters: 95° C for 10 min, then 95° C for 15 s and 67° C for 20 s with a target temperature of 62° C and 1° C steps for the first touchdown, and 95° C for 15 s and 60° C for 20 s with a target temperature of 58° C and 2° C steps for the second touchdown. Fluorescence signals were acquired during 50 cycles of 95° C for 15 s and 54° C (60° C for *MDM2*) for 45 s. For qPCR analyses of senescence marker (*p16* or *p21*) expression and housekeeping genes (*GAPDH* and *ACTB*), 2 μ l of cDNA of each sample was used within reaction mixtures further containing 10 μ l LightCycler 480 probes Master 2x conc. (Roche), 7 μ l LightCycler 480 Probes Master H₂O PCR grade (Roche) and 1 μ l FAM-MGB Taqman probe (ThermoFisher Scientific). Reactions were performed using the following program: 95° C for 10 min, followed by 50 amplification cycles of 95° C for 15 s and 60° C for 60 s.

Immunofluorescence and image acquisition

Murine hair follicles for IF assays were obtained from HsdWin:NMRI mice (Envigo, UK). All samples were fixed in 10% neutral buffered formalin (Sigma-Aldrich) for 20 min and permeabilized with 0.5% TritonX-100 (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany) in phosphate-buffered saline (PBS) for 10 min. After every step, samples were washed in PBS (2 x 2 min). Then they were blocked in PBS containing 1% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) for 20 min. The blocking solution was also used to dilute the antibodies. Samples were incubated in primary antibody solution overnight at 4° C. After washing with PBS, samples were incubated in secondary antibody solution for one hour. The primary and secondary antibodies are listed in Supplementary Tables 2, 3. Samples were washed in PBS and mounted using Vectashield antifade medium with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Images of mouse hair follicles were obtained using an Axio Observer.Z1/Cell Observer Spinning Disc microscopic system (Zeiss, Oberkochen, Germany) with a 63x oil objective. All images were processed using ZEN Blue Image processing software (Zeiss).

Giemsa - Romanowsky staining

To investigate the mouse hair follicle cells' general morphology, we used classical Giemsa-Romanowsky

staining, as follows. Immediately after collecting samples of murine hairs in collection tips they were incubated in 4% methanol solution for 15 min, washed three times for 2 min in PBS, then soaked for 30 seconds in May - Grünwald solution (Penta, Prague, Czech Republic) and subsequently rinsed in distilled water for 2 min, gently dried and finally incubated in 10x diluted Giemsa-Romanowsky solution (Penta). The rest of the staining solution was discarded by washing the samples in distilled water for 2 min. Hair endings with follicles were cut and placed between a microscopic glass and coverslip in a water drop. Images were obtained at 20x or 100x magnification with a transmission light microscope (Zeiss, Primo Vert).

Data processing and statistical analyses

Matlab R2017a and Microsoft Excel were used for all data processing analyses and visualizations. Fold changes in gene expression were calculated from qPCR data using the $\Delta\Delta C_t$ method, with averages of raw technical measurements as the inputs. The Kruskal-Wallis test was used for irradiation-dependence verification of the results at zero doses. T-tests were used to investigate differences between irradiated and non-irradiated samples at each time point. T-tests were also used to generate p-values describing the significance of differences between old and young animals and between variables measured at the zero-time point and all other time points in both irradiated and control hind legs in the radiation-induced senescence experiment. In γ -H2AX analyses, green dots and areas were sought in z-stack images (in tiff format) of DAPI-stained tissues. Two median filters were used for automatic identification of the foci and suppression of background signals. The intensity of DNA damage (IDD) was calculated as shares of the signals and DAPI area, where one data point represents the average value from z-stack images from one hair follicle. The software with example 6 Gy data set is publically available on the Figshare platform at the following link: <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.14822643.v1>. The Kruskal-Wallis test was used to test the null hypothesis that there was no treatment- or sample-related differences in technical measurements.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MH, MM, JB, and JS designed the experiments and interpreted data. qPCR experiments were performed by NK and HS. Microscopy experiments were performed by MM, HS, and NK. Animal handling, sample collection, and sample *ex-vivo* treatments were done by NK, HS, and PD. TF developed and programmed a method for quantitative analysis of microscopic images. MM, NK, HS, JB, and MH wrote the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge expert assistance in sample collection by Katerina Frantikova and Tereza Schneiderova and partial assistance in sample preparation for RT-qPCR set-up by Petra Svarcova and Tereza Lausova during their internship at our institute.

CONFLICTS OF INTEREST

MM, JB, MH are co-inventors on patents EP2928382A1 and US 20150297253, utilizing the method for extraction of follicular cells and device for the pursuance of this method. All authors declare they have no conflicts of interest.

FUNDING

The study was supported by MEYS CR: (Large RI Project LM2018129 – Czech-BioImaging), ERDF (project No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_013/0001775), ENOCH project (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000868), and Czech national node of the European infrastructure for translational medicine (LM2018133), Technological Agency of the Czech Republic (TN01000013), Grant of the Czech Ministry of Interior (VG20102014001), The Novo Nordisk Foundation (16854 and 0060590), The Swedish Research Council VR-MH 2014-46602-117891-30, The Swedish Cancer Foundation/Cancerfonden (# 170176) and The Danish National Research Foundation (project CARD, DNRF 125).

REFERENCES

1. Green MR, Clay CS, Gibson WT, Hughes TC, Smith CG, Westgate GE, White M, Kealey T. Rapid isolation in large numbers of intact, viable, individual hair follicles from skin: biochemical and ultrastructural characterization. *J Invest Dermatol*. 1986; 87:768–70. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12457348> PMID:3782859
2. Redon CE, Nakamura AJ, Gouliava K, Rahman A, Blakely WF, Bonner WM. The use of gamma-H2AX as a biodosimeter for total-body radiation exposure in non-human primates. *PLoS One*. 2010; 5:e15544. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015544> PMID:21124906
3. Bhogal N, Kaspler P, Jalali F, Hyrien O, Chen R, Hill RP, Bristow RG. Late residual gamma-H2AX foci in murine skin are dose responsive and predict radiosensitivity *in vivo*. *Radiat Res*. 2010; 173:1–9. <https://doi.org/10.1667/RR1851.1> PMID:20041754

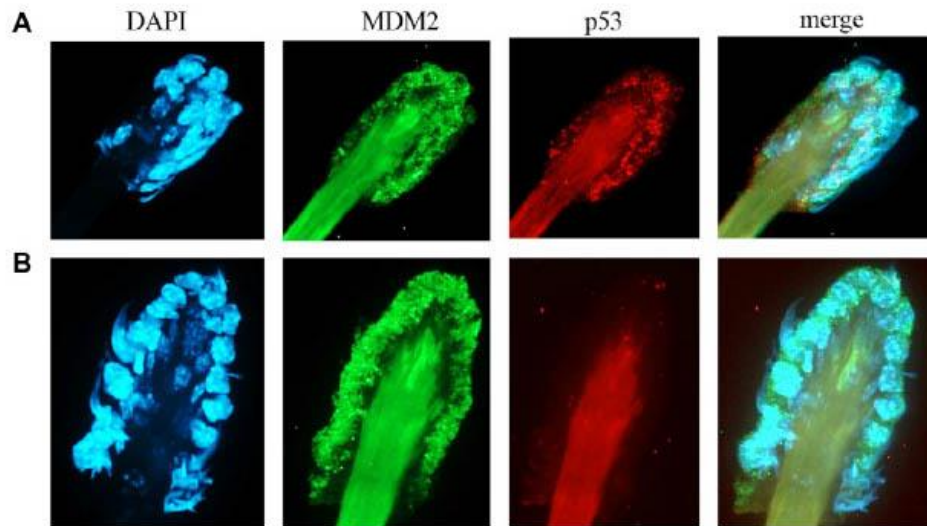
4. Wang GY, Wang J, Mancianti ML, Epstein EH Jr. Basal cell carcinomas arise from hair follicle stem cells in Ptch1(+/-) mice. *Cancer Cell*. 2011; 19:114–24. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.11.007> PMID:21215705
5. Yamaguchi A, Matsumura R, Matsuzaki T, Nakamura W, Node K, Akashi M. A simple method using *ex vivo* culture of hair follicle tissue to investigate intrinsic circadian characteristics in humans. *Sci Rep*. 2017; 7:6824. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07268-8> PMID:28755004
6. Randall KJ, Foster JR. The demonstration of immunohistochemical biomarkers in methyl methacrylate-embedded plucked human hair follicles. *Toxicol Pathol*. 2007; 35:952–57. <https://doi.org/10.1080/01926230701748198> PMID:18098041
7. Watts LM, Browne JA, Murphy BA. Investigation of a non-invasive method of assessing the equine circadian clock using hair follicle cells. *J Circadian Rhythms*. 2012; 10:7. <https://doi.org/10.1186/1740-3391-10-7> PMID:23039139
8. Chou WC, Takeo M, Rabbani P, Hu H, Lee W, Chung YR, Carucci J, Overbeek P, Ito M. Direct migration of follicular melanocyte stem cells to the epidermis after wounding or UVB irradiation is dependent on Mc1r signaling. *Nat Med*. 2013; 19:924–29. <https://doi.org/10.1038/nm.3194> PMID:23749232
9. Aoki H, Hara A, Motohashi T, Kunisada T. Keratinocyte stem cells but not melanocyte stem cells are the primary target for radiation-induced hair graying. *J Invest Dermatol*. 2013; 133:2143–51. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.155> PMID:23549419
10. Paus R, Cotsarelis G. The biology of hair follicles. *N Engl J Med*. 1999; 341:491–97. <https://doi.org/10.1056/NEJM199908123410706> PMID:10441606
11. Griñán-Ferré C, Sarroca S, Ivanova A, Puigoriol-Illamola D, Aguado F, Camins A, Sanfeliu C, Pallàs M. Epigenetic mechanisms underlying cognitive impairment and Alzheimer disease hallmarks in 5XFAD mice. *Aging (Albany NY)*. 2016; 8:664–84. <https://doi.org/10.18632/aging.100906> PMID:27013617
12. Kritsilis M, V Rizou S, Koutsoudaki PN, Evangelou K, Gorgoulis VG, Papadopoulos D. Ageing, Cellular Senescence and Neurodegenerative Disease. *Int J Mol Sci*. 2018; 19:2937. <https://doi.org/10.3390/ijms19102937> PMID:30261683
13. Mayer C, Popanda O, Greve B, Fritz E, Illig T, Eckardt-Schupp F, Gomolka M, Benner A, Schmezer P. A radiation-induced gene expression signature as a tool to predict acute radiotherapy-induced adverse side effects. *Cancer Lett*. 2011; 302:20–28. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.12.006> PMID:21236564
14. Kabacik S, Ortega-Molina A, Efeyan A, Finnon P, Bouffler S, Serrano M, Badie C. A minimally invasive assay for individual assessment of the ATM/CHEK2/p53 pathway activity. *Cell Cycle*. 2011; 10:1152–61. <https://doi.org/10.4161/cc.10.7.15231> PMID:21389785
15. Gire V, Roux P, Wynford-Thomas D, Brondello JM, Dulic V. DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence. *EMBO J*. 2004; 23:2554–63. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600259> PMID:15192702
16. Campisi J. Cancer, aging and cellular senescence. *In Vivo*. 2000; 14:183–88. PMID:10757076
17. Itahana K, Dimri G, Campisi J. Regulation of cellular senescence by p53. *Eur J Biochem*. 2001; 268:2784–91. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02228.x> PMID:11358493
18. Evangelou K, Lougiakis N, Rizou SV, Kotsinas A, Kletsas D, Muñoz-Espín D, Kastrinakis NG, Pouli N, Marakos P, Townsend P, Serrano M, Bartek J, Gorgoulis VG. Robust, universal biomarker assay to detect senescent cells in biological specimens. *Aging Cell*. 2017; 16:192–97. <https://doi.org/10.1111/acer.12545> PMID:28165661
19. Collado M, Serrano M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer*. 2010; 10:51–57. <https://doi.org/10.1038/nrc2772> PMID:20029423
20. Brown JP, Wei W, Sedivy JM. Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science*. 1997; 277:831–34. <https://doi.org/10.1126/science.277.5327.831> PMID:9242615
21. Hall BM, Balan V, Gleiberman AS, Strom E, Krasnov P, Virtuoso LP, Rydkina E, Vujcic S, Balan K, Gitlin I, Leonova K, Polinsky A, Chernova OB, Gudkov AV. Aging of mice is associated with p16(Ink4a)- and β -galactosidase-positive macrophage accumulation that can be induced in young mice by senescent cells. *Aging (Albany NY)*. 2016; 8:1294–315. <https://doi.org/10.18632/aging.100991> PMID:27391570
22. Liu JY, Souroullas GP, Diekman BO, Krishnamurthy J, Hall BM, Sorrentino JA, Parker JS, Sessions GA,

- Gudkov AV, Sharpless NE. Cells exhibiting strong *p16^{INK4a}* promoter activation *in vivo* display features of senescence. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019; 116:2603–11.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1818313116>
PMID:30683717
23. Sherr CJ, DePinho RA. Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell*. 2000; 102:407–10.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00046-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00046-5)
PMID:10966103
24. Wright WE, Shay JW. Telomere dynamics in cancer progression and prevention: fundamental differences in human and mouse telomere biology. *Nat Med*. 2000; 6:849–51.
<https://doi.org/10.1038/78592> PMID:10932210
25. Rodier F, Coppé JP, Patil CK, Hoeijmakers WA, Muñoz DP, Raza SR, Freund A, Campeau E, Davalos AR, Campisi J. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol*. 2009; 11:973–79.
<https://doi.org/10.1038/ncb1909> PMID:19597488
26. Tsai KK, Stuart J, Chuang YY, Little JB, Yuan ZM. Low-dose radiation-induced senescent stromal fibroblasts render nearby breast cancer cells radioresistant. *Radiat Res*. 2009; 172:306–13.
<https://doi.org/10.1667/RR1764.1>
PMID:19708779
27. Guillon J, Petit C, Moreau M, Toutain B, Henry C, Roché H, Bonichon-Lamichhane N, Salmon JP, Lemonnier J, Campane M, Verrière V, Lelièvre E, Guette C, Coqueret O. Regulation of senescence escape by TSP1 and CD47 following chemotherapy treatment. *Cell Death Dis*. 2019; 10:199.
<https://doi.org/10.1038/s41419-019-1406-7>
PMID:30814491
28. Li M, You L, Xue J, Lu Y. Ionizing Radiation-Induced Cellular Senescence in Normal, Non-transformed Cells and the Involved DNA Damage Response: A Mini Review. *Front Pharmacol*. 2018; 9:522.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00522>
PMID:29872395
29. Schmitteckert EM, Prokop CM, Hedrich HJ. DNA detection in hair of transgenic mice—a simple technique minimizing the distress on the animals. *Lab Anim*. 1999; 33:385–89.
<https://doi.org/10.1258/002367799780487922>
PMID:10778788
30. Meldgaard M, Bollen PJ, Finsen B. Non-invasive method for sampling and extraction of mouse DNA for PCR. *Lab Anim*. 2004; 38:413–17.
<https://doi.org/10.1258/0023677041958981>
PMID:15479556
31. Picazo M, García-olmo D. DNA from tissues of young mice is optimal for genotyping. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2015; 18:83–87.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S071734581400147X>
<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.12.002>
32. Paul S, Amundson SA. Development of gene expression signatures for practical radiation biodosimetry. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2008; 71:1236–44.
<https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2008.03.043>
PMID:18572087
33. Kabacik S, Manning G, Raffy C, Bouffler S, Badie C. Time, dose and ataxia telangiectasia mutated (ATM) status dependency of coding and noncoding RNA expression after ionizing radiation exposure. *Radiat Res*. 2015; 183:325–37.
<https://doi.org/10.1667/RR13876.1> PMID:25738893
34. Albrecht H, Durbin-Johnson B, Yunis R, Kalanetra KM, Wu S, Chen R, Stevenson TR, Rocke DM. Transcriptional response of *ex vivo* human skin to ionizing radiation: comparison between low- and high-dose effects. *Radiat Res*. 2012; 177:69–83.
<https://doi.org/10.1667/rr2524.1> PMID:22029842
35. Ressler S, Bartkova J, Niederegger H, Bartek J, Scharffetter-Kochanek K, Jansen-Dürr P, Wlaschek M. p16INK4A is a robust *in vivo* biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell*. 2006; 5:379–89.
<https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00231.x>
PMID:16911562
36. Lukas J, Sørensen CS, Lukas C, Santoni-Rugiu E, Bartek J. p16INK4a, but not constitutively active pRb, can impose a sustained G1 arrest: molecular mechanisms and implications for oncogenesis. *Oncogene*. 1999; 18:3930–35.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202777>
PMID:10435615
37. Nasto LA, Wang D, Robinson AR, Clauson CL, Ngo K, Dong Q, Roughley P, Epperly M, Huq SM, Pola E, Sowa G, Robbins PD, Kang J, et al. Genotoxic stress accelerates age-associated degenerative changes in intervertebral discs. *Mech Ageing Dev*. 2013; 134:35–42.
<https://doi.org/10.1016/j.mad.2012.11.002>
PMID:23262094
38. Seol MA, Jung U, Eom HS, Kim SH, Park HR, Jo SK. Prolonged expression of senescence markers in mice exposed to gamma-irradiation. *J Vet Sci*. 2012; 13:331–38.
<https://doi.org/10.4142/jvs.2012.13.4.331>
PMID:23271173
39. Kim BC, Yoo HJ, Lee HC, Kang KA, Jung SH, Lee HJ, Lee M, Park S, Ji YH, Lee YS, Ko YG, Lee JS. Evaluation of

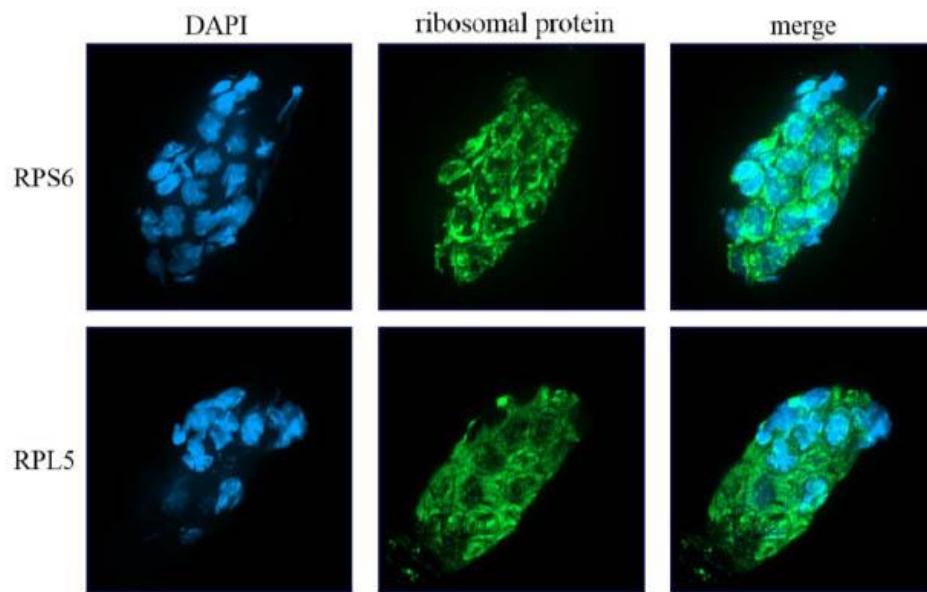
- premature senescence and senescence biomarkers in carcinoma cells and xenograft mice exposed to single or fractionated irradiation. *Oncol Rep.* 2014; 31:2229–35.
<https://doi.org/10.3892/or.2014.3069> PMID:24626611
40. Peng X, Wu Y, Brouwer U, van Vliet T, Wang B, Demaria M, Barazzuol L, Coppes RP. Cellular senescence contributes to radiation-induced hyposalivation by affecting the stem/progenitor cell niche. *Cell Death Dis.* 2020; 11:854.
<https://doi.org/10.1038/s41419-020-03074-9>
PMID:33056980
41. Lee S, Schmitt CA. The dynamic nature of senescence in cancer. *Nat Cell Biol.* 2019; 21:94–101.
<https://doi.org/10.1038/s41556-018-0249-2>
PMID:30602768
42. Capparelli C, Chiavarina B, Whitaker-Menezes D, Pestell TG, Pestell RG, Hult J, Andò S, Howell A, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP. CDK inhibitors (p16/p19/p21) induce senescence and autophagy in cancer-associated fibroblasts, “fueling” tumor growth via paracrine interactions, without an increase in neo-angiogenesis. *Cell Cycle.* 2012; 11:3599–610.
<https://doi.org/10.4161/cc.21884>
PMID:22935696
43. Suzuki K, Nakashima M, Yamashita S. Dynamics of ionizing radiation-induced DNA damage response in reconstituted three-dimensional human skin tissue. *Radiat Res.* 2010; 174:415–23.
<https://doi.org/10.1667/RR2007.1>
PMID:20726705

SUPPLEMENTARY MATERIALS

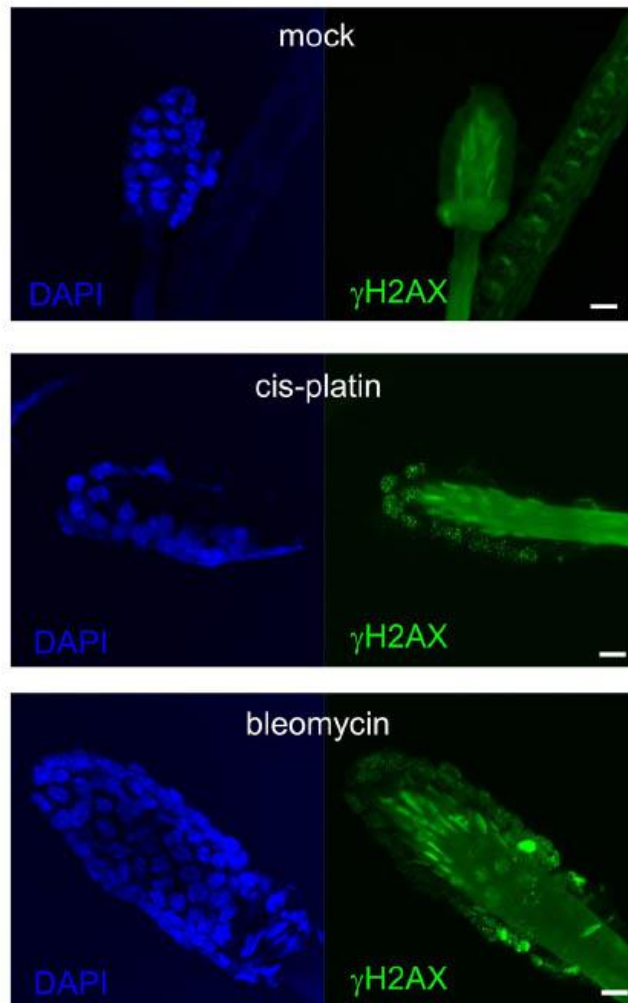
Supplementary Figures



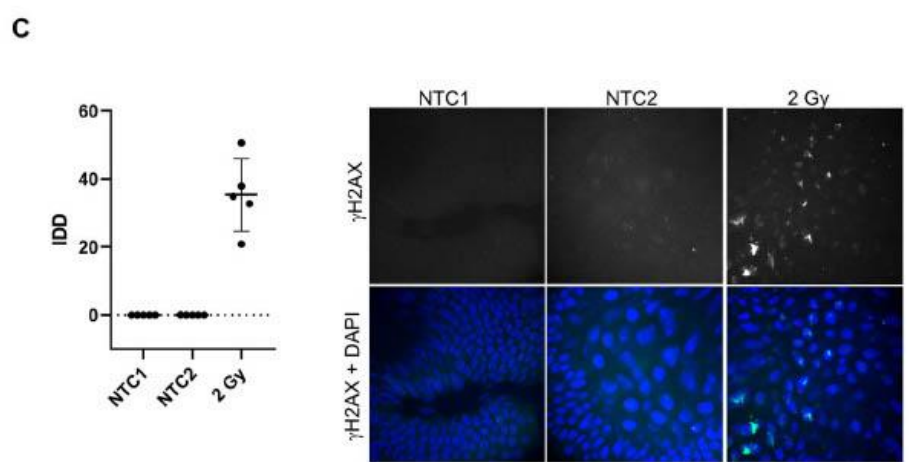
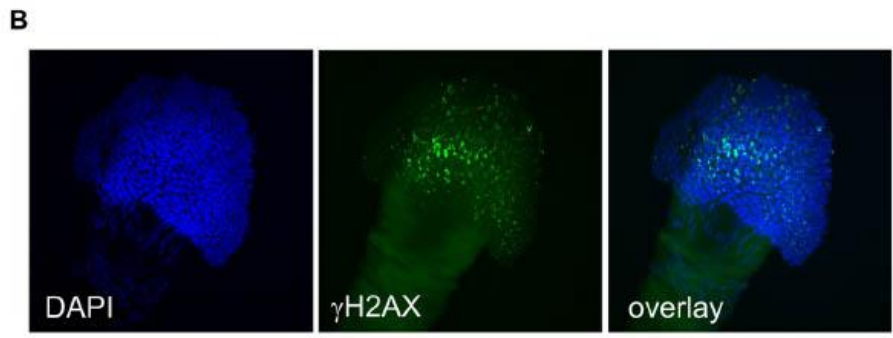
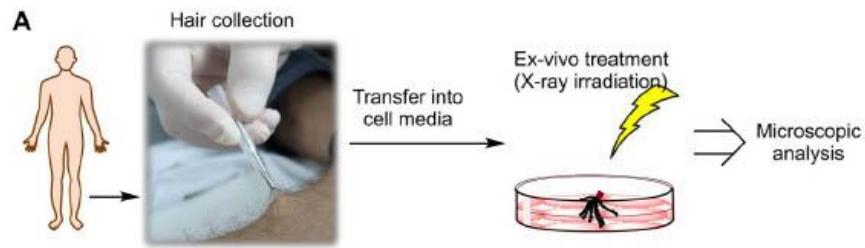
Supplementary Figure 1. Immunofluorescent detection of MDM2 and p53 proteins in murine hair follicles. (A) Representative images of a hair follicle as maximum intensity projections from z-stack scanning with a confocal spinning disc microscope. Nuclei are stained with DAPI, green and red autofluorescence is visible in a hair shaft. **(B)** Representative images for autofluorescence estimation in the red channel. No primary antibody for p53 was used to show the difference between autofluorescence and real signals in the red channel. Magnification 60x objective with oil immersion.



Supplementary Figure 2. Example of immunofluorescent detection of cytoplasmic proteins - ribosomal proteins RPS6 and RPL5 in murine hair follicles. Nuclei are stained with Hoechst 33342 and shown in the blue channel, ribosomal proteins are shown in the green channel. Representative images were obtained from z-stack scanning with a confocal spinning disc microscope. Magnification 60x objective with oil immersion.



Supplementary Figure 3. Immunofluorescent detection of γ -H2AX in murine hair follicles after the treatment with topically applied clastogens (bleomycin and cisplatin).



Supplementary Figure 4. Immunofluorescent detection of γ -H2AX in human hair follicles. (A) Scheme of the experimental workflow. (B) Representative image of human hair follicle *ex-vivo* irradiated by 2 Gy of ionizing irradiation. Nuclei stained with DAPI (blue), γ -H2AX (green). Hair shaft autofluorescence is also visible in the green channel. (C) Results of image analyses in terms of IDD (Intensity of DNA damage), with each data point representing the area of the γ -H2AX signal related to the area of the nuclei in one scanned hair follicle in z-stack mode and representative images used in the computational analyses of one z-stack layer. NTC1 and 2 are the non-irradiated controls. NTC1 was fixed immediately after the collection and NTC2 was incubated for 30 min in cell media, as well as the 2 Gy samples after irradiation.

Supplementary Tables

Supplementary Table 1. Primers for PCR.

Type	Gene	Forward primer 5' - 3'	Reverse primer 5' - 3'	Amplicon
mRNA	<i>HPRT</i>	GGACAGGACTGAAAGACTTG	TAATCCAGCAGGTCAGCAAA	114 bps
mRNA	<i>p21</i>	GCAAGAGAAAACCTGAAGTG	CACACAGAGTGAGGGCTAAG	100 bps
mRNA	<i>SESNI</i>	CCATAGGCCTTGGCTGATTA	TCCACACTGTGATTGCCATT	246 bps
mRNA	<i>MDM2 X1</i>	TGCAAGCACCTCACAGATTC	ACACAATGTGCTGCTGCTTC	188 bps
	<i>MDM2 X1+X2</i>	ATGAATCCTCCCCTTCCATC	CTGTCAGCTTTTTGCCATCA	169 bps
DNA	<i>APP</i>	AGGACTGACCACTCGACCAG	CGGGGTCTAGTTCTGCAT	377 bps
DNA	<i>PST</i>	AATAGAGAACGGCAGGAGCA	GCCATGAGGGCCTAATCAT	608 bps
DNA	Internal control	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC	324 bps

Two pairs of primers were designed for MDM2. One (MDM2 X1) only covers transcript variant 1 (NM_010786.4) and the other (MDM2 X1+X2) covers both known variants (NM_001288586.2 as well as NM_010786.4). Amplicon lengths for each marker were verified using an Agilent Bioanalyzer 2100 and Agilent DNA 1000 Kit. Primers for both transgenes (APP and PST) and internal controls were designed and their sequences were provided by the Jackson Laboratory.

Supplementary Table 2. Primary antibodies.

Antigen	Species	Company	Catalog no.	Dilution	Application
p16	Mouse	Santa Cruz Biotechnology	sc-1661	1:100	IF
H2AX	Rabbit	Cell Signaling	#9718	1:400	IF
MDM2	Mouse	Abcam	ab16895	1:200	IF
p53	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology	Sc-6243	1:100	IF
RPS6	Rabbit	Cell Signaling	#2217	1:100	IF
RPL5	Rabbit	Cell Signaling	#14568	1:100	IF

Supplementary Table 3. Secondary antibodies.

Host	Recognizes	Fluorophore	Company	Catalog no.	Dilution	Application
Goat	Mouse IgG	Alexa Fluor 488	ThermoFisher	A-1101	1:1000	IF
Goat	Rabbit IgG	Alexa Fluor 488	ThermoFisher	A-11034	1:1000	IF
Goat	Rabbit IgG	Alexa Fluor 488	Abcam	ab150077	1:1000	IF

Supplementary Video

Please browse Full Text version to see the data of Supplementary Video 1.

Supplementary Video 1. Collection of hair samples using the vacuum collector invented by our team.

Research Article

Differential Regulation of Methylation-Regulating Enzymes by Senescent Stromal Cells Drives Colorectal Cancer Cell Response to DNA-Demethylating Epi-Drugs

Khushboo Agrawal,^{1,2} Viswanath Das,^{1,2} Natálie Táborská,¹ Ján Gurský,¹ Petr Džubák,^{1,2} and Marián Hajdúch^{1,2} 

¹Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Hněvotínská 5, 77900 Olomouc, Czech Republic

²Cancer Research Czech Republic, Hněvotínská 5, 77900 Olomouc, Czech Republic

Correspondence should be addressed to Marián Hajdúch; marian.hajduch@upol.cz

Received 14 April 2018; Accepted 12 July 2018; Published 12 August 2018

Academic Editor: Steven Curley

Copyright © 2018 Khushboo Agrawal et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The advanced-stage colon cancer spreads from primary tumor site to distant organs where the colon-unassociated stromal population provides a favorable niche for the growth of tumor cells. The heterocellular interactions between colon cancer cells and colon-unassociated fibroblasts at distant metastatic sites are important, yet these cell-cell interactions for therapeutic strategies for metastatic colon cancer remain underestimated. Recent studies have shown the therapeutic potential of DNA-demethylating epi-drugs 5-azacytidine (AZA) and 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC) for the treatment of solid tumors. While the effects of these epi-drugs alone or in combination with other anticancer therapies are well described, the influence of stromal cells and their secretome on cancer cell response to these agents remain elusive. In this study, we determined the effect of normal and senescent colon-unassociated fibroblasts and their conditioned medium on colorectal cancer (CRC) cell response to AZA and DAC using a cell-based DNA demethylation reporter system. Our data show that fibroblasts accelerate cell proliferation and differentially regulate the expression of DNA methylation-regulating enzymes, enhancing DAC-induced demethylation in CRC cells. In contrast, the conditioned medium from senescent fibroblasts that upregulated NF- κ B activity altered deoxycytidine kinase levels in drug-untreated CRC cells and abrogated DAC effect on degradation of DNA methyltransferase 1. Similar to 2D cultures, senescent fibroblasts increased DNA demethylation of CRC cells in coculture spheroids, in addition to increasing the stemness of CRC cells. This study presents the first evidence of the effect of normal and senescent stromal cells and their conditioned medium on DNA demethylation by DAC. The data show an increased activity of DAC in high stromal cell cocultures and suggest the potential of the tumor-stroma ratio in predicting the outcome of DNA-demethylating epigenetic cancer therapy.

1. Introduction

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common cancers with heterogeneous treatment outcomes [1, 2], and growing evidence indicates the key role of the stroma in CRC invasion, metastasis, and response to chemo- and radiotherapy [3–5]. An image-based quantitative study conducted in CRC patient samples suggests the abundance of cancer-associated fibroblasts in tumor stroma as an

indicator of disease recurrence after curative CRC surgery [6]. In poor-prognosis CRC subtypes that are characterized by stemness and/or epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), elevated expression of mesenchymal genes is mainly contributed by tumor-associated stroma [7]. High Wnt signaling activity in tumor cells that are located close to stromal myofibroblasts further indicates that stemness of colon cancer cells is partly regulated by the tumor microenvironment [8].

The cellular heterogeneity in the tumor microenvironment plays a key role in tumor progression, invasion, metastasis, and the outcome of anticancer therapy [9]. While the tumor stroma is not malignant per se, stromal cells acquire abnormal phenotype and support the growth and progression of cancer [9, 10]. Importantly, the role of senescent stromal cells in the tumor microenvironment is coming into light due to their ability to drive the unrestrained growth of tumors, which cause a differential response of cancer cells to anticancer drugs [11, 12]. Senescence is one of the normal cellular events triggered in cancer cells following genotoxic stress, such as radiotherapy and chemotherapy [13]. However, therapy-induced bystander senescence in other noncancerous cell types of the tumor microenvironment has been suggested to result in cancer relapse and aggravate the side effects of chemotherapy [12, 14, 15]. Therefore, there is a growing interest to understand how senescent stromal cells alter the response of tumor cells to different classes of anticancer drugs [16].

DNA methyltransferase inhibitors (DNMTIs), such as 5-azacytidine (AZA) and 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC), have shown promising activity as priming agents in the treatment of solid tumors in early clinical trials [17–20]. DNMTIs have been reported to work synergistically in combination with various other anticancer therapies [21–25] and radiotherapy [26, 27]. Although the effects of DNMTIs alone or in combination with radiotherapy are well reported, it is not known how the senescent and/or normal stromal cells of the tumor microenvironment influence the response of cancer cells to DNA-demethylating drugs. Besides tumor-stroma cross-talk, the colonic fibroblast secretome and senescence-associated secreted phenotype (SASP) play a crucial role in regulating the proliferation of cancer cells [11, 28]. Secreted factors from normal and senescent stromal cells have also been suggested to contribute to tumorigenesis and differential drug effects [29].

Since the advanced-stage colon cancers spread from primary tumor site to distant organs and tissues [30], the colon-unassociated stromal population may play an important role in forming a favorable metastatic niche for CRC cells. The interactions between CRC cells and noncolon fibroblasts at the distant metastatic sites are important, yet these heterocellular tumor-stroma interactions for preventive and/or therapeutic strategies for metastatic colorectal cancer remain understudied. In this study, we investigated the effect of colon-unassociated normal human foreskin and lung fibroblasts and their radiation-induced senescent counterparts on CRC cell response to AZA and DAC in two-dimensional (2D) and spheroid cultures. In addition, we studied the effect of conditioned medium from normal and senescent fibroblasts cells on colon cancer cell proliferation and DAC-induced DNA demethylation. This study was performed using our recently described demethylation reporter, HCT116-pFLJ-H2B cells, henceforth referred to as HCT116 [31].

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals, Cell Culture, and Reporter Cells. AZA and DAC were synthesized as described previously [32]. DMSO concentration was always less than 0.1% in treated wells.

Human normal BJ foreskin fibroblasts (ATCC® CRL-2522™) and human normal MRC-5 lung fibroblasts (ATCC CCL-171™) were purchased from ATCC (Middlesex, UK) and cultured in EMEM (Gibco®, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Thermo Fisher Scientific). Human A549 lung carcinoma cells (ATCC CCL-185™) were cultured in Ham's F-12 medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10% FBS. All cells were maintained in a standard humidified incubator in 5% CO₂/atmospheric air at 37°C.

Demethylation reporter HCT116 cells were generated and cultured as described previously [31]. GFP-expressing BJ cells (BJ-GFP) were generated by transduction using Cignal Lenti GFP lentiviral particles, whereas nuclear factor- κ B (NF- κ B) reporter A549 cells (A549-NF- κ B) were generated using Cignal Lenti NF- κ B Reporter lentiviral particles from Qiagen (Hilden, Germany) following the manufacturer's protocol. Briefly, all cells were infected at a multiplicity of infection of 10 pfu/cell. To enhance the efficiency of transduction, SureENTRY Transduction Reagent (Qiagen) was used at a concentration of 8 μ g/mL. Transduced cells were subjected to selection pressure of 3 μ M puromycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). BJ-GFP cells were isolated by single-cell sorting in a BD FACSAria II cell sorter (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) in order to avoid multiple passages and replicative senescence during clonal selection.

2.2. Senescence Induction by X-Ray Irradiation, Conditioned Medium, and Cell Viability Assay. The fibroblast cultures were exposed to 10 Gy X-ray irradiation in an X-ray RS225 irradiator (Xstrahl, Surrey, UK) at a dose rate of 2.3 Gy/min. Irradiated cells were then maintained for 1 to 3 weeks before the collection of conditioned medium or the use of cells for experiments. Collected conditioned medium was filtered using a 0.22 μ m sterile syringe filter (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) and diluted to 25% in the complete fresh medium before experiments to provide the vital components necessary to support the cell growth.

For cell viability assays, HCT116 were seeded in 96-well plates and exposed to X-ray irradiation as described above. After 8 h, irradiated HCT116 were treated with DAC (0.2–20 μ M) either in 25% conditioned medium from irradiated BJ or complete medium for 72 h, and cell viability was determined by a standard 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay.

2.3. β -Galactosidase Assay for Senescent Cells. Senescent cells in nonirradiated and 1- to 3-week-old irradiated fibroblast cultures were stained using a β -Galactosidase (β -Gal) Staining Kit (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) following the manufacturer's protocol. Cells were counterstained with Hoechst 33342 (Molecular Probes®, Eugene, OR, USA) prior to imaging in a Cell Voyager CV7000S microscope (Yokogawa, Tokyo, Japan) using a 20x objective and 405/488/561 nm laser line (Hoechst) and bright field filter for β -Gal. Captured images were imported to Columbus™ Image Analysis System (PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

Senescent cells were quantified using a texture-based analysis of the nuclear and cytoplasmic regions by a Saddle-Edges-Ridges (SER) algorithm in Columbus Image Analysis System [33]. Briefly, cell nuclei were identified based on Hoechst staining. Then, the area and roundness of identified nuclei were calculated, and cell population was selected based on area and roundness. Next, the cytoplasm around the selected population of nuclei was identified to calculate the texture properties (in bright field channel) based on SER spot features. Cells with SER spot value higher than the threshold value were quantified and calculated.

To analyze protein markers of cellular senescence, replicating and senescent fibroblasts were collected and processed for Western blot analysis as described below.

2.4. Coculture and Conditioned Medium Culture Setup. Monocultures of HCT116 and cocultures of HCT116 and nonirradiated or 1- to 3-week-old irradiated senescent fibroblasts were established in clear-bottom CellCarrier 384-well plates (PerkinElmer) at 7:3 and 3:7 ratios, hereafter referred to as low stromal cocultures and high stromal cocultures, respectively. The total cell density was always 1000 cells/well. Note that all cocultures were established in EMEM that supported the normal growth of all cell types.

For studying the effects of conditioned medium from senescent fibroblast cultures on HCT116 proliferation and demethylation, the experiment was set in a way that there was a free exchange of medium between HCT116 cells and 1- to 3-week-old irradiated fibroblasts in different wells in the absence of a direct cell-to-cell contact.

2.5. Drug Treatment, Demethylation, and Cell Proliferation Analysis in 2D Cultures. Cells were treated for 72 h with DAC or AZA at 1 μ M and 5 μ M concentrations diluted in appropriate medium and imaged and analyzed to evaluate the intensity of EGFP signal as described elsewhere [31]. The rate of HCT116 cell proliferation (72 h/24 h) in untreated culture types was determined by counting the total number of RFP-H2B-tagged HCT116 cell nuclei using Columbus Image Analysis System (PerkinElmer), as described previously [31].

2.6. Spheroid Culture, Drug Treatment, and Imaging. Spheroids were generated as described elsewhere [34]. Low stromal coculture and high stromal coculture spheroids of HCT116 and nonirradiated or 1- to 3-week-old irradiated fibroblasts were established at ratios described above (see Section 2.4). Spheroids were grown for at least 1 week before the start of any treatment. To study the effect of conditioned medium, spheroids were transferred to a new agarose-coated 384-well plate containing 25% conditioned medium from irradiated fibroblast cultures. Spheroid imaging and quantification of EGFP intensity and spheroid size were carried out as described elsewhere [31, 34]. All drug treatments in spheroids were done for 96 h.

Images of DAC-treated spheroids were acquired using a Light Sheet Z.1 microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany). Prior to imaging, DAC-treated spheroids were collected and washed in 1x phosphate-buffered saline (PBS). Spheroids were then stained for 2 h with 10 μ M Hoechst nuclear dye at

room temperature. Spheroids were washed in 1x PBS to remove residual Hoechst and mounted in 1.5% (w/v) low-melting agarose (40°C). Spheroids were then drawn into a 0.5 mm glass capillary tube with a metal plunger (Carl Zeiss) and allowed to polymerize for 5 min at room temperature. The capillary tube was then vertically mounted on a sample holder and immersed in a sample chamber filled with phenol-red free EMEM. The polymerized agarose containing spheroids was then extruded into the sample chamber using the metal plunger, and multidirectional z-stack images were acquired using a 20x detection optics and two 10x illumination optics with appropriate lasers and filters. The captured images were processed using ZEN Blue image processing software (Carl Zeiss).

2.7. Cell Sorting and Western Blot Analysis. HCT116 cultured in 25% conditioned medium from nonirradiated or 1- to 3-week-old irradiated fibroblast cultures and high stromal cocultures of HCT116 with nonirradiated or irradiated fibroblasts were treated with 1 μ M DAC for 72 h. HCT116 from conditioned medium cultures were collected and immediately lysed and processed for Western blot analysis following drug treatment. To analyze the effect of DAC on HCT116 in cocultures, RFP-expressing HCT116 were first isolated by sorting in a FACSAria II Cell Sorter (BD Biosciences) and then processed for Western blotting. Nonfluorescent normal BJ and sBJ cells from cocultures were also isolated simultaneously for Western blot experiments.

Cells were lysed in RIPA buffer (150 mM NaCl, 1.0% NP-40 or Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 50 mM Tris, (pH 8.0)) supplemented with cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche Holding AG, Basel, Switzerland) by sonication on ice. Protein lysates (20–50 μ g) were electrophoresed and transferred onto a PVDF membrane (Merck Millipore) and probed with antibodies as described elsewhere [35]. Primary antibodies against DNA methyltransferase 1 (DNMT1; catalogue number: 5032, 1:1000 dilution), vimentin (catalogue number: 5741, 1:1000 dilution), β -catenin (catalogue number: 8480, 1:1000 dilution), and p21^{waf1/cip} (catalogue number: 2947, 1:1000 dilution) were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA); p53 (catalogue number: ab131442, 0.02 μ g/mL dilution) from Abcam (Cambridge, UK); p16 (catalogue number: sc-759; 1:500 dilution) from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA); and Tet methylcytosine dioxygenase 1 (TET1; catalogue number: NBP2-15135; 1:1000 dilution) and deoxycytidine kinase (dCK; catalogue number: H00001633-B01P; 1 μ g/mL dilution) from Novus Biologicals (Littleton, CO, USA). Mouse anti- β -actin antibody (catalogue number: A5441; 1:4000 dilution) was used as a loading control and was purchased from Sigma-Aldrich. Blots were developed using either goat anti-mouse or anti-rabbit Alexa Fluor® 488 secondary antibodies (1:2000 dilution) from Life Technologies (Carlsbad, CA, USA).

2.8. NF- κ B Activity and Cytokine Assays. To determine NF- κ B activity, in-house developed A549-NF- κ B reporter cells [36] were seeded at a density of 10,000 cells/well in Ham's F-12

medium in white opaque 96-well plates (PerkinElmer). After 24 h, the old medium was replaced with undiluted conditioned medium from nonirradiated or 1- to 3-week-old irradiated fibroblast cultures, and the cells were further incubated for 24 and 48 h. At the end of each incubation, 100 μ L Britelite Plus luminescent reagent (PerkinElmer) was added per well, plate content was mixed in a plate shaker, and the luminescent signal was measured in an EnVision Multilabel Plate Reader (PerkinElmer).

The proinflammatory cytokines and/or chemokines in conditioned medium were assayed using a Cytokine Human Magnetic 25-Plex Panel Luminex™ Kit (Life Technologies) following the manufacturer's protocol and analyzed in a Luminex 200 System Analyzer (Austin, TX, USA).

All assays were performed with samples of condition medium obtained from three independent cultures of nonirradiated or irradiated fibroblast cultures.

2.9. Statistical Analysis. All statistical analyses were performed on at least 2–4 independent biological replicates using GraphPad Prism (GraphPad Software version 7, San Diego, CA, USA), and differences were considered significant at $p < 0.05$. Unless otherwise mentioned, data were analyzed using one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test. For one-sample t -test, data were compared with a hypothetical value of 100%.

3. Results

3.1. Irradiation Increased the Number of β -Gal-Positive Senescent Fibroblast Cells. Irradiation is a well-reported inducer of senescence in different cell types [13]. Therefore, we first determined the number of β -Gal-stained senescent cells in nonirradiated and 1-week-old irradiated BJ fibroblast cultures by high content image analysis as described in Materials and Methods. Compared to nonirradiated BJ cultures, there was a significant increase in the number of β -Gal-positive senescent BJ (sBJ) fibroblasts post 1 week of irradiation (Figure S1a; $2.7 \pm 0.3\%$ in nonirradiated BJ versus $5.5 \pm 0.5\%$ in 1-wk-IR sBJ cultures, $p < 0.001$, $n = 2$, Student's t -test, unpaired). Culturing the irradiated BJ fibroblasts for an additional 2 weeks further increased the percentage of β -Gal-positive cells to $42.9 \pm 3.1\%$ ($p < 0.001$ versus nonirradiated BJ, $n = 2$, Student's t -test, unpaired).

Next, we determined the induction of molecular markers of senescence in nonirradiated and 1- to 3-week-old irradiated BJ cultures. The nonirradiated BJ fibroblasts showed a weakly elevated level of p21^{waf1/cip}. In accordance with the β -Gal staining data, irradiation induced the expression of senescence markers, p16 and p21^{waf1/cip}, in addition to p53, in 1- to 3-week-old sBJ cultures (Figure S1b).

3.2. Fibroblasts Increased the Susceptibility of HCT116 to DAC in 2D Cocultures. To examine the effect of senescent fibroblasts on HCT116 response to DNA-demethylating drugs, low and high stromal cocultures of HCT116 and 1-week-old irradiated sBJ were established. A comparison of EGFP intensities showed a culture-dependent increase in the effect of DAC and AZA on HCT116 DNA demethylation

in the order of high stromal coculture > low stromal coculture > monoculture (Figure 1(a)). To examine if this effect was limited to senescent cells, we performed a similar comparison following DAC and AZA treatment of HCT116 in coculture with nonirradiated BJ fibroblasts. Similar to sBJ fibroblasts, the presence of nonirradiated BJ fibroblasts significantly increased DAC-induced HCT116 DNA demethylation, but there was no difference in the effect of AZA (Figure 1(a)). Since DAC had a greater effect on HCT116 demethylation in cocultures, we decided to perform all subsequent studies with DAC. Also, as evident from the previous study conducted in HCT116 cells, DAC showed maximum demethylation at 1 μ M concentration; therefore, we chose 1 μ M DAC concentration for the further studies [37]. Next, to see if the observed senescent cell effect was reproduced by other senescent fibroblast types, we treated cocultures of HCT116 and 3-week-old irradiated senescent MRC-5 (sMRC-5) and sBJ fibroblasts with 1 μ M DAC. The data showed an increased demethylation effect of DAC on HCT116 in coculture with both sMRC-5 and 3-week irradiated sBJ fibroblasts (Figure 1(b)). Overall, the data indicate that the increase in demethylation of HCT116 by DNMTIs is more pronounced in the presence of senescent fibroblasts.

We next examined the effect of SASP on HCT116 response towards DAC-induced demethylation. Cells were cultured in a way that there was a free exchange of medium between HCT116 and sBJ or sMRC-5 cells, but there was no direct HCT116 to sBJ or sMRC-5 cell-cell contact (Figure 1(b)). The results showed no significant effect of SASP on 1 μ M DAC-induced demethylation in HCT116 (Figure 1(b)).

3.3. Fibroblasts and Their Conditioned Medium Affect DAC-Induced Alteration in DNA Methyltransferase 1 Level. To further decipher the effect of normal and senescent fibroblasts, we analyzed the changes in the protein levels of DNA methylation and demethylation-regulating enzymes, DNMT1 and TET1, respectively, in HCT116 isolated from cocultures of HCT116 and nonirradiated BJ or sBJ fibroblasts. The results showed significant downregulation of DNMT1 in untreated HCT116 that were cocultured with nonirradiated BJ or sBJ fibroblasts compared to HCT116 monocultures. Although 1 μ M DAC downregulated DNMT1 levels in monoculture HCT116, the downregulation was significantly greater in HCT116 cocultured with sBJ (Figure 2(a); $p = 0.03$, two-way ANOVA). Although there were alterations in the level of TET1 in HCT116 following DAC treatment in different culture types, the difference was statistically nonsignificant (Figure 2(a)).

We further studied the effect of conditioned medium from nonirradiated BJ and sBJ fibroblasts on DNMT1 and TET1 levels in HCT116. While 1 μ M DAC inhibited DNMT1 levels in HCT116 when the treatment was done in the presence of conditioned medium from normal BJ fibroblasts, this inhibition was abrogated in the presence of conditioned medium from sBJ cultures (Figure 2(b)). The data relates to the lack of significant increase in DAC-induced HCT116 DNA demethylation in the presence of conditioned medium from sBJ cultures (see Figure 1(b)). There was no significant

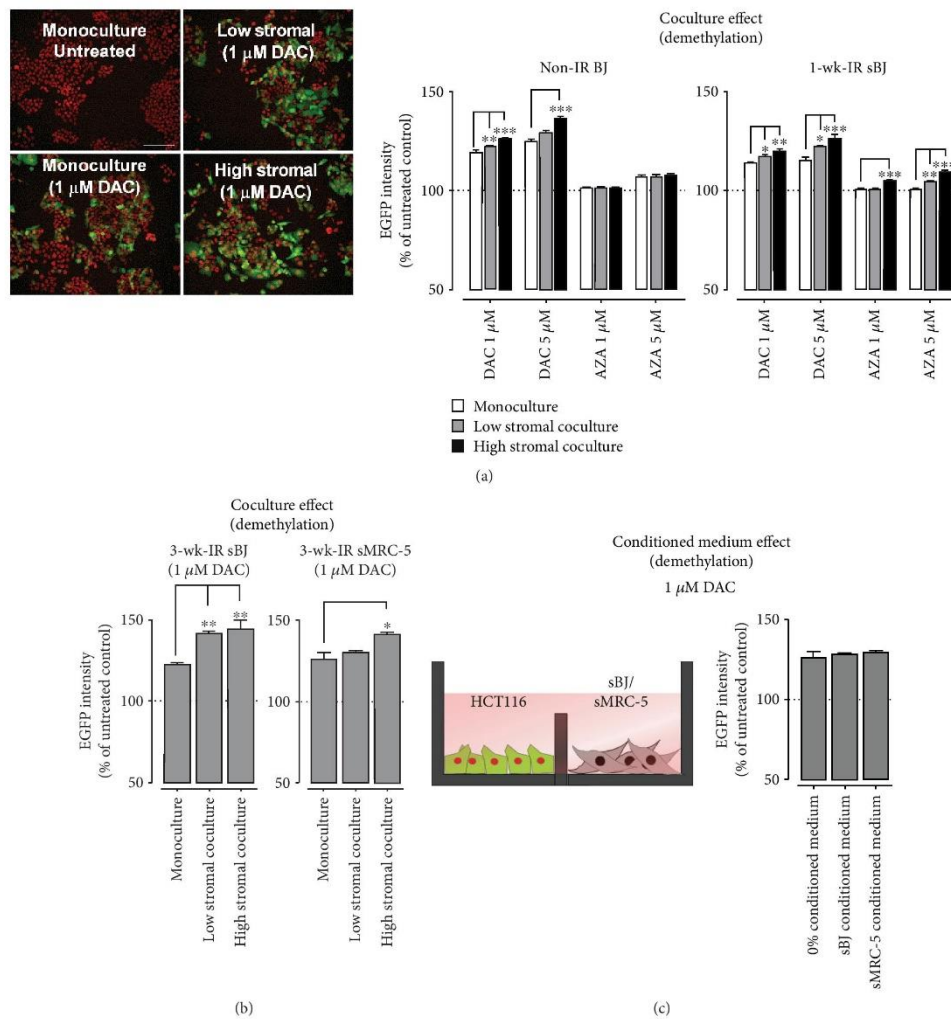


FIGURE 1: Effect of fibroblasts and their conditioned medium on HCT116 DNA demethylation in 2D cultures. (a) Representative images showing RFP nuclear fluorescence but no EGFP fluorescence in the untreated control, and changes in EGFP fluorescence following DAC treatment in HCT116 monocultures or cocultures with BJ. 20x objective; scale bar: 100 μ m. Graphs showing a significant increase in EGFP intensity in HCT116 cocultured with normal nonirradiated (non-IR) BJ and 1-week-irradiated (1-wk-IR) sBJ fibroblasts in comparison to HCT116 monocultures following treatment with different concentrations of DAC and AZA. Data are mean \pm SEM, $n = 2 - 4$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared to HCT116 monocultures. (b) A significant increase in EGFP intensity of HCT116 cells cocultured with 3-week-irradiated (3-wk-IR) sBJ or sMRC-5 cells following treatment with 1 μ M DAC. (c) Schematic diagram of the setup of conditioned medium culture and graph showing no effect of sBJ or sMRC-5 conditioned medium on EGFP intensity following treatment of HCT116 monocultures with 1 μ M DAC. Data are mean \pm SEM, $n = 2 - 4$.

difference in TET1 levels in HCT116 cells in condition medium cultures (Figure 2(b)).

Radiation elevates dCK mRNA and protein levels [38], and there is a clear correlation between dCK levels and radiosensitizing effects of gemcitabine [39]. dCK adds the first

phosphoryl group to DAC and is the rate-limiting enzyme of the overall process of converting DAC to its triphosphate form that incorporates into DNA [40]. We next examined the protein levels of dCK in DAC-treated HCT116 isolated from cocultures with BJ or sBJ fibroblasts and those cultured

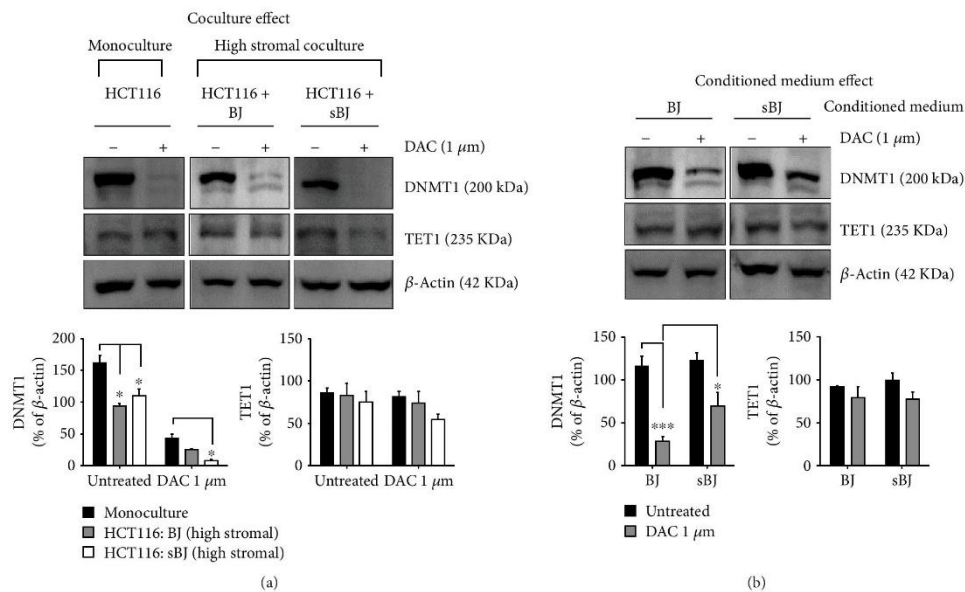


FIGURE 2: Changes in the expression of DNMT1 and TET1. Representative western blots and densitometry analysis of DNMT1 and TET1 levels in untreated or DAC-treated (a) HCT116 monocultures and cocultures with normal BJ or sBJ and (b) HCT116 monocultures grown in conditioned medium from normal BJ or sBJ cells. DNMT1 and TET1 blots in (a) and (b) are taken from different gels. Data are mean \pm SEM, $n = 3$, *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$.

in conditioned medium from BJ or sBJ cultures. Indeed, our data revealed an elevated level of dCK in DAC-untreated HCT116 isolated from cocultures of HCT116 with BJ or sBJ fibroblasts; however, this expression was higher in HCT116 isolated from cocultures with sBJ fibroblasts (Figure S2a). The treatment with DAC seemed to further increase the levels of dCK in coculture-isolated HCT116. Interestingly, the presence of conditioned medium from sBJ cultures reduced the level of dCK in HCT116 treated with or without DAC (Figure S2b).

3.4. Fibroblasts and their Conditioned Medium Increased Cell Proliferation in 2D Cultures. Since the demethylation by DAC is more pronounced in proliferating cells [41], we examined the effects of normal and senescent fibroblasts and their conditioned medium on HCT116 proliferation. Compared to monocultures, HCT116 proliferation was markedly increased when cocultured with either normal, sBJ, or sMRC-5 fibroblasts or in the presence of conditioned medium from senescent fibroblasts (Figures 3(a) and 3(b)).

3.5. Senescent Fibroblast Conditioned Medium Increased DAC-Induced Cytotoxicity and Displayed High Levels of Proinflammatory Cytokines and Chemokines. To determine if senescent fibroblast conditioned medium-induced increase in the proliferation of HCT116 was partly responsible for increasing the susceptibility of HCT116 to DAC, we next determined the cytotoxic/cytostatic effects of DAC in

nonproliferating HCT116 in the presence of conditioned medium. We first irradiated HCT116 to induce cell cycle arrest [42] and then treated irradiated HCT116 with DAC (0.2–20 μ M) in the absence or presence of conditioned medium from sBJ cultures. Irradiation of HCT116 attenuated the cytotoxic/cytostatic effect of DAC in the absence of conditioned medium; however, the addition of sBJ conditioned medium reversed this effect (Figure 3(c), left). Although DAC was significantly effective in altering the viability of nonirradiated HCT116, the addition of conditioned medium further increased DAC effect (Figure 3(c), right).

The NF- κ B pathway is suggested to contribute to senescence program [43], and DNA-demethylating agents induce apoptosis by inhibiting NF- κ B activity [44]. Evidence also suggests a correlation between NF- κ B and DNMT1 levels [45]. Besides, a recent study showed the role of inflammatory cytokines in regulating the activity of enzymes involved in DNA methylation and demethylation [46]. Given this correlation, we analyzed the levels of a panel of 25 human cytokines and chemokines in conditioned medium from normal BJ and sBJ cultures and the effect of condition medium on NF- κ B activity. Conditioned medium from sBJ showed a high level of interferon-alpha (IFN- α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-8 (IL-8), and monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) compared to conditioned medium from normal BJ cultures (Figure 3(d)). The conditioned medium from sBJ significantly increased NF- κ B activity in NF- κ B reporter cellular model (Figure 3(d)).

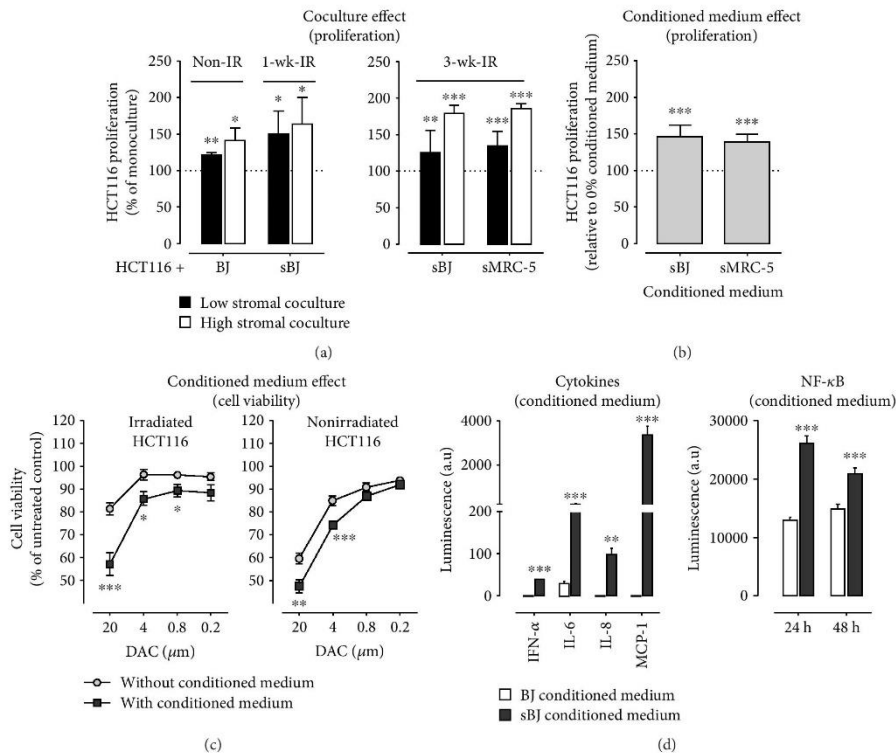


FIGURE 3: Coculture effect on HCT116 proliferation and analysis of secretory factors in conditioned medium. (a, b) The effect of normal and senescent fibroblasts (a) and SASP of senescent fibroblasts (b) on the proliferation of HCT116. Data are mean \pm SEM, $n = 2 - 4$, $***p < 0.001$, $**p < 0.01$, $*p < 0.05$ compared to HCT116 monocultures or 0% conditioned medium, one-sample t -test. (c) Viability of nonirradiated and irradiated HCT116 following DAC treatment. Data are mean \pm SEM, $n = 4$, $***p < 0.001$, $**p < 0.01$ comparing cell viability with or without conditioned medium, Student's t -test, unpaired. (d) Increased levels of IFN- α , IL-6, IL-8, and MCP-1 in sBJ conditioned medium compared to conditioned medium from normal BJ cells and its effect on NF- κ B activity. Data are mean \pm SEM, $n = 3$, $***p < 0.001$, $**p < 0.01$ comparing conditioned medium from BJ to sBJ, Student's t -test, unpaired.

3.6. Increased Susceptibility of HCT116 to DAC in Coculture Spheroids. Cell-cell interactions in spheroids are closer to physiological conditions, and therefore spheroids are excellent models to study the effect of tumor-stroma interaction on tumor cell response to anticancer drugs. We next investigated the effect of normal BJ and sBJ fibroblasts on HCT116 DNA demethylation in coculture spheroids following $1 \mu\text{M}$ DAC treatment. First, despite the cell number, BJ fibroblasts always occupied the center of spheroids surrounded by HCT116. The GFP-expressing BJ fibroblasts were visible only after approximately $100 \mu\text{m}$ z -plane height (Figure 4(a)), indicating a limited stromal-tumor cell contact and underlying the importance of autocrine and/or paracrine factors. Similar to 2D cultures, the presence of a high number of normal BJ or sBJ cells increased HCT116 demethylation in coculture spheroids (Figures 4(b) and 4(c)); however, this effect was more pronounced in sBJ fibroblast-containing spheroids (Figure 4(b)).

Next, to determine the effect of conditioned medium on DAC-induced HCT116 demethylation, we treated monoculture spheroids of HCT116 with $1 \mu\text{M}$ DAC in the presence of conditioned medium from normal BJ and sBJ cultures. There was no significant effect of sBJ conditioned medium on DAC-induced demethylation on monoculture spheroids (Figure 4(d)).

Given the fact that DAC is more effective in proliferating cells [41], we determined whether the increased demethylation in coculture spheroids is related to the increased growth of spheroids. We compared the size of HCT116 monoculture spheroids with coculture spheroids of HCT116 and normal BJ or sBJ fibroblasts. The results showed a significant increase in the size of coculture spheroids compared to monoculture spheroids (Figure 4(e)). However, there was no major difference in the effect of $1 \mu\text{M}$ DAC on coculture spheroid size compared to monoculture spheroids (Figure 4(e)).

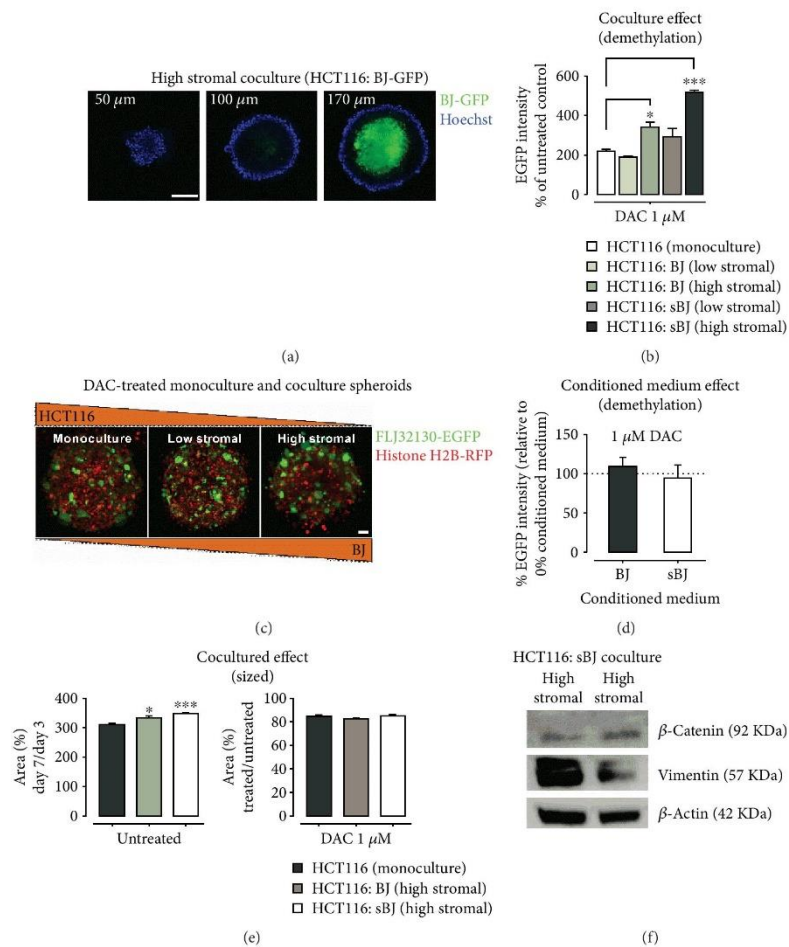


FIGURE 4: Fibroblasts and conditioned medium-induced effects on HCT116 susceptibility to DAC in spheroid cultures and expression of EMT markers. (a) Images of high stromal cell coculture spheroids showing the presence of BJ cells in the spheroid interior. The z -plane heights are indicated on the top of images. HCT116 are nonfluorescent and the exterior of the spheroid is stained blue with Hoechst. 20x objective; scale bar: 50 μm . (b) Increase in EGFP intensity in coculture spheroids of HCT116 and BJ or sBJ cells compared to HCT116 monoculture spheroids. Data are mean \pm SEM, $n > 20$ spheroids per group from 3 independent experiments, $***p < 0.001$, $*p < 0.05$, Kruskal-Wallis test with Dunnet's multiple comparisons test. (c) Representative images showing the effect of DAC on HCT116 monoculture spheroids and coculture spheroids of HCT116 and BJ fibroblasts. 20x objective; scale bar: 10 μm . (d) The effect of conditioned medium from normal and sBJ cultures on DAC-induced demethylation of HCT116 monoculture spheroids. Data are mean \pm SEM, $n > 20$ spheroids per group from 3 independent experiments, one-sample t -test. (e) Increase in the size of untreated coculture spheroids of HCT116 and BJ or sBJ compared to HCT116 monoculture spheroids (left) and no effect of DAC treatment on coculture spheroid size (right). Data are mean \pm SEM, $n > 20$ spheroids per group from 3 independent experiments, $***p < 0.001$, $*p < 0.05$, Kruskal-Wallis test with Dunnet's multiple comparison test. (f) Representative Western blots showing the induction of vimentin expression in HCT116 sorted from high and low stromal cell coculture spheroids of HCT116 and sBJ.

A recently published study elucidated that although cellular senescence arrests cell cycle program, the key signaling components of the senescence machinery, such as p16, p21^{waf1/cip1}, and p53, critically regulate stem cell functions

and promote stemness of cancer cells [47]. Therefore, we examined the protein expression levels of vimentin, a typical phenotype of EMT, and activation of Wnt/ β -catenin in HCT116 sorted from coculture spheroids of HCT116 and

sBJ. The results demonstrated an upregulated expression of vimentin in HCT116 from high stromal coculture spheroids (Figure 4(f)). The results (Figure S1 and Figure 4(f)) relate increased growth of coculture spheroids to sBJ-induced stemness in HCT116.

4. Discussion

Studies indicate potential synergistic effects of DNMTs and radiotherapy for the treatment of solid tumors [26, 27]. Given the senescence-inducing property of radiation, it remains to be seen whether and/or how the senescent stromal cells affect tumor cell response to DNMTs. Using our recently developed DNA demethylation reporter cells [31], we show that senescent fibroblasts increase the demethylation effects of DAC in HCT116 under coculture conditions in both 2D and spheroid cultures (Figures 1 and 4). Furthermore, the increased DNA demethylation in high stromal cocultures than monocultures suggests the increased susceptibility of HCT116 to DAC in a higher stromal microenvironment. The increased demethylation effect of DAC was not just limited to cocultures containing senescent fibroblasts as the presence of nonirradiated normal fibroblast also induced a similar effect, albeit smaller, on HCT116 DNA demethylation in both 2D and spheroid cultures. Nevertheless, the demethylation effect was more pronounced in cocultures of HCT116 with irradiation-induced senescent fibroblasts that showed increased expression of p21^{waf1/cip} and p16 (Figure S1, Figures 1 and 4). Repeated subculturing has been reported to induce replicative senescence in fibroblasts [48]. The increased HCT116 DNA demethylation in cocultures with nonirradiated fibroblasts could have presumably resulted due to the presence of presenescent fibroblasts. This is evident from the presence of a small fraction of β -Gal-stained cells and expression of p21^{waf1/cip} in nonirradiated BJ cells (Figure S1).

Our data also demonstrate the fibroblast-induced downregulation of endogenous levels of DNMT1 in untreated HCT116. Additionally, the data also show the increased effect of DAC on DNMT1 levels in HCT116 sorted from cocultures than monocultures (Figure 2). Exposing cancer cells to gamma irradiation has been reported to decrease the protein levels of DNMT1 and DNMT3b [49, 50]. Further, studies indicate that activation of nucleoside analogs correlates with dCK activity [39, 51]. We show an elevation of dCK protein levels in HCT116 cocultured with fibroblasts, in particular, irradiation-induced sBJ cultures (Figure S2). This increase in dCK levels corresponds to the increased demethylation effect of DAC on HCT116 in high stromal cocultures (Figure 1). Overall, the data indicate the potential role of radiation-induced bystander effect through tumor-stroma cross-talk in regulating epigenetic changes in tumor cells in high stromal cocultures.

The stroma has been reported to regulate the growth of tumor cells, increasing their invasive and metastatic properties [10]. In line with this, we observed normal and senescent fibroblast-induced increased proliferation of HCT116 in 2D and spheroid cocultures (Figures 3 and 4). Since DAC, like other anticancer drugs, is reported to have a greater effect

in actively proliferating cells [41], the increased proliferation of HCT116 in both 2D and spheroid cocultures potentially makes HCT116 more susceptible to DAC (Figures 3 and 4). This is partly shown by the decreased effect of DAC on the viability of irradiated HCT116 (Figure 3).

Apart from fibroblast-induced effects in cocultures, we also studied the effect of conditioned medium from senescent fibroblasts on HCT116 proliferation in 2D cultures. The results demonstrated an increased effect of conditioned medium from senescent fibroblast cultures on HCT116 proliferation only. However, conditioned medium from senescent fibroblasts abrogated DAC effect on DNMT1 expression in treated cells and decreased dCK levels in untreated and DAC-treated HCT116 (Figure S2). Analysis of conditioned medium from senescent fibroblasts showed upregulation of proinflammatory cytokine and chemokine levels. This cytokine/chemokine-laden condition medium increased NF- κ B activity in NF- κ B A549 reporter cells. The correlation between demethylation effects of DNMTs and NF- κ B remains debatable in the literature. While one study suggests that the apoptosis induced by DNMTs via inhibition of NF- κ B is not due to epigenetic reprogramming [44], another study showed that an increase in NF- κ B activity downregulates DNMT1 levels [45]. In our study, we did not observe any direct effect of senescent fibroblast conditioned medium on the protein levels of DNMT1 (Figure 2). Nonetheless, the inability of DAC to reduce DNMT1 levels in cells treated in conditioned medium from senescent fibroblast cultures (Figure 2) indicates the potential negative effect of SASP on DNA demethylation. The present study was conducted using established cell line cultures only; therefore, a further line of evidence from primary cells and DNMT1 knockout cell types is required. Also, secretome analysis is clearly required to substantiate the correlation between NF- κ B activity and/or proinflammatory cytokines and chemokines on DNA methylation and demethylation.

5. Conclusions

In agreement with the prognostic significance of tumor-stroma ratio in different cancer types, the results of our study indicate the potential of the tumor-stroma ratio for predicting the outcome of DNA-demethylating epigenetic anticancer therapy in CRC or other cancer types. The study further correlates the increased susceptibility of HCT116 to DAC due to fibroblast-induced increased proliferation and differential regulation of methylation- and demethylation-regulating enzymes by senescent stromal cells. In conclusion, this study provides the evidence of the senescent stromal cell-induced effects on CRC cell response towards prototypal DNA-demethylating drug, DAC. Further studies are required to confer the mechanism behind observed stromal cell-induced alterations in DAC-induced DNA demethylation effects.

Data Availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Conflicts of Interest

There are no competing interests to declare.

Authors' Contributions

Khushboo Agrawal and Viswanath Das designed and performed 2D and 3D culture experiments and contributed to the conceptual design, data analysis and interpretation, and manuscript writing. Natálie Táborská performed senescence experiments and analyzed data. Ján Gurský and Petr Džubák performed flow-cytometry experiments. All these works were planned and supervised by Marián Hajdúch. All authors have read and approved the final manuscript. Both Khushboo Agrawal and Viswanath Das contributed equally as co-first authors to this work.

Acknowledgments

The authors thank Jana Václavková (Institute of Molecular and Translational Medicine) for the help with cytokine analysis and Jana Vrbková (Institute of Molecular and Translational Medicine) for statistical analysis. This study was supported by the grants awarded by the Czech Ministry of Education, Youth and Sports (Grant nos. LO1304, LM2015091, and LM2015064), Technology Agency of the Czech Republic (TE01020028), and Internal Grant Agency of Palacky University (IGA_LF_2016_019).

Supplementary Materials

Figure S1: radiation increased senescence in fibroblast cultures. (a) Representative images showing Hoechst- and β -Gal-stained cultures of nonirradiated (non-IR) and 1- to 3-week-old irradiation- (IR-) induced senescent BJ (sBJ) cultures. The values in the middle β -Gal panel show the percentage of β -Gal positive cells. Data are mean \pm SEM, $n > 10$ wells per 384-well plate from 2 independent experiments. 20x objective; scale bar: 100 μ m. (b) Western blots showing the expression of p53, p21^{waf1/cip} and p16 in nonirradiated (non-IR) BJ and 1- to 3-week-old sBJ cells following irradiation (IR). Figure S2: coculture and conditioned medium effect on dCK expression. (a) Western blots showing changes in dCK expression in BJ and HCT116 isolated from cocultures of HCT116 and normal and sBJ cells in the absence (-) or presence (+) of DAC. (b) Changes in the expression of dCK in DAC-treated HCT116 cultured in conditioned medium from BJ or sBJ cultures. The fold expression of dCK relative to β -actin loading control is shown below the blots in (a) and (b) from one experiment. (*Supplementary Materials*)

References

- [1] J. Guinney, R. Dienstmann, X. Wang et al., "The consensus molecular subtypes of colorectal cancer," *Nature Medicine*, vol. 21, no. 11, pp. 1350–1356, 2015.
- [2] J. F. Linnekamp, X. Wang, J. P. Medema, and L. Vermeulen, "Colorectal cancer heterogeneity and targeted therapy: a case for molecular disease subtypes," *Cancer Research*, vol. 75, no. 2, pp. 245–249, 2015.
- [3] J. Conti and G. Thomas, "The role of tumour stroma in colorectal cancer invasion and metastasis," *Cancer*, vol. 3, no. 2, pp. 2160–2168, 2011.
- [4] F. Lotti, A. M. Jarrar, R. K. Pai et al., "Chemotherapy activates cancer-associated fibroblasts to maintain colorectal cancer-initiating cells by IL-17A," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 210, no. 13, pp. 2851–2872, 2013.
- [5] C. Isella, A. Terrasi, S. E. Bellomo et al., "Stromal contribution to the colorectal cancer transcriptome," *Nature Genetics*, vol. 47, no. 4, pp. 312–319, 2015.
- [6] T. Tsujino, I. Seshimo, H. Yamamoto et al., "Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer," *Clinical Cancer Research*, vol. 13, no. 7, pp. 2082–2090, 2007.
- [7] A. Calon, E. Lonardo, A. Berenguer-Llergo et al., "Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer," *Nature Genetics*, vol. 47, no. 4, pp. 320–329, 2015.
- [8] L. Vermeulen, F. de Sousa E Melo, M. van der Heijden et al., "Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment," *Nature Cell Biology*, vol. 12, no. 5, pp. 468–476, 2010.
- [9] L. A. Liotta and E. C. Kohn, "The microenvironment of the tumour-host interface," *Nature*, vol. 411, no. 6835, pp. 375–379, 2001.
- [10] T. D. Tlsty and P. W. Hein, "Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals," *Current Opinion in Genetics & Development*, vol. 11, no. 1, pp. 54–59, 2001.
- [11] M. K. Ruhland, A. J. Loza, A.-H. Capietto et al., "Stromal senescence establishes an immunosuppressive microenvironment that drives tumorigenesis," *Nature Communications*, vol. 7, p. 11762, 2016.
- [12] M. Schosserer, J. Grillari, and M. Breitenbach, "The dual role of cellular senescence in developing tumors and their response to cancer therapy," *Frontiers in Oncology*, vol. 7, p. 278, 2017.
- [13] R. J. Sabin and R. M. Anderson, "Cellular senescence - its role in cancer and the response to ionizing radiation," *Genome Integrity*, vol. 2, no. 1, p. 7, 2011.
- [14] M. Demaria, M. N. O'Leary, J. Chang et al., "Cellular senescence promotes adverse effects of chemotherapy and cancer relapse," *Cancer Discovery*, vol. 7, no. 2, pp. 165–176, 2017.
- [15] E.-C. Liao, Y. T. Hsu, Q. Y. Chuah et al., "Radiation induces senescence and a bystander effect through metabolic alterations," *Cell Death & Disease*, vol. 5, no. 5, article e1255, 2014.
- [16] D. W. McMillin, J. M. Negri, and C. S. Mitsiades, "The role of tumour-stromal interactions in modifying drug response: challenges and opportunities," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 12, no. 3, pp. 217–228, 2013.
- [17] R. Brown, E. Curry, L. Magnani, C. S. Wilhelm-Benartzi, and J. Borley, "Poised epigenetic states and acquired drug resistance in cancer," *Nature Reviews. Cancer*, vol. 14, no. 11, pp. 747–753, 2014.
- [18] L. A. Cowan, S. Talwar, and A. S. Yang, "Will DNA methylation inhibitors work in solid tumors? A review of the clinical experience with azacitidine and decitabine in solid tumors," *Epigenomics*, vol. 2, no. 1, pp. 71–86, 2010.
- [19] X. Li, Q. Mei, J. Nie, X. Fu, and W. Han, "Decitabine: a promising epi-immunotherapeutic agent in solid tumors," *Expert Review of Clinical Immunology*, vol. 11, no. 3, pp. 363–375, 2015.
- [20] A. M. Tsimberidou, R. Said, K. Culotta et al., "Phase I study of azacitidine and oxaliplatin in patients with advanced cancers

- that have relapsed or are refractory to any platinum therapy," *Clinical Epigenetics*, vol. 7, no. 1, p. 29, 2015.
- [21] W. Blum, S. Schwind, S. S. Tarighat et al., "Clinical and pharmacodynamic activity of bortezomib and decitabine in acute myeloid leukemia," *Blood*, vol. 119, no. 25, pp. 6025–6031, 2012.
- [22] K. B. Chiappinelli, P. L. Strissel, A. Desrichard et al., "Inhibiting DNA methylation causes an interferon response in cancer via dsRNA including endogenous retroviruses," *Cell*, vol. 162, no. 5, pp. 974–986, 2015.
- [23] H. Li, K. B. Chiappinelli, A. A. Guzzetta et al., "Immune regulation by low doses of the DNA methyltransferase inhibitor 5-azacytidine in common human epithelial cancers," *Oncotarget*, vol. 5, no. 3, pp. 587–598, 2014.
- [24] D. Matei, F. Fang, C. Shen et al., "Epigenetic Resensitization to platinum in ovarian Cancer," *Cancer Research*, vol. 72, no. 9, pp. 2197–2205, 2012.
- [25] J. Wrangle, W. Wang, A. Koch et al., "Alterations of immune response of non-small cell lung cancer with azacytidine," *Oncotarget*, vol. 4, no. 11, pp. 2067–2079, 2013.
- [26] G. L. Gravina, C. Festuccia, F. Marampon et al., "Biological rationale for the use of DNA methyltransferase inhibitors as new strategy for modulation of tumor response to chemotherapy and radiation," *Molecular Cancer*, vol. 9, no. 1, p. 305, 2010.
- [27] J.-G. Kim, J.-H. Bae, J.-A. Kim, K. Heo, K. Yang, and J. M. Yi, "Combination effect of epigenetic regulation and ionizing radiation in colorectal cancer cells," *PLoS One*, vol. 9, no. 8, article e105405, 2014.
- [28] S.-X. Chen, X.-E. Xu, X.-Q. Wang et al., "Identification of clonic fibroblast secretomes reveals secretory factors regulating colon cancer cell proliferation," *Journal of Proteomics*, vol. 110, pp. 155–171, 2014.
- [29] M. H. Barcellos-Hoff, C. Park, and E. G. Wright, "Radiation and the microenvironment - tumorigenesis and therapy," *Nature Reviews Cancer*, vol. 5, no. 11, pp. 867–875, 2005.
- [30] J. R. Robinson, P. A. Newcomb, S. Hardikar, S. A. Cohen, and A. I. Phipps, "Stage IV colorectal cancer primary site and patterns of distant metastasis," *Cancer Epidemiology*, vol. 48, pp. 92–95, 2017.
- [31] K. Agrawal, V. Das, M. Otmar, M. Krečmerová, P. Džubák, and M. Hajdúch, "Cell-based DNA demethylation detection system for screening of epigenetic drugs in 2D, 3D, and xenograft models," *Cytometry. Part A*, vol. 91, no. 2, pp. 133–143, 2017.
- [32] M. Matoušová, I. Votruba, M. Otmar, E. Tloušťová, J. Günterová, and H. Mertlíková-Kaiserová, "2'-deoxy-5,6-dihydro-5-azacytidine—a less toxic alternative of 2'-deoxy-5-azacytidine: a comparative study of hypomethylating potential," *Epigenetics*, vol. 6, no. 6, pp. 769–776, 2011.
- [33] P. Pascual-Vargas, S. Cooper, J. Sero, V. Bousgouni, M. Arias-Garcia, and C. Bakal, "RNAi screens for Rho GTPase regulators of cell shape and YAP/TAZ localisation in triple negative breast cancer," *Scientific Data*, vol. 4, article 170018, 2017.
- [34] V. Das, T. Fürst, S. Gurská, P. Džubák, and M. Hajdúch, "Evaporation-reducing culture condition increases the reproducibility of multicellular spheroid formation in microtiter plates," *Journal of Visualized Experiments*, no. 121, article e55403, 2017.
- [35] V. Das and J. H. Miller, "Non-taxoid site microtubule-stabilizing drugs work independently of tau overexpression in mouse N2a neuroblastoma cells," *Brain Research*, vol. 1489, pp. 121–132, 2012.
- [36] K. Agrawal, *Epigenetic Study of 5-Azacytidine Nucleosides and Their Derivatives*, [Ph. D. thesis], Palacký University Olomouc, 2017.
- [37] S. Hagemann, O. Heil, F. Lyko, and B. Brueckner, "Azacytidine and decitabine induce gene-specific and non-random DNA demethylation in human cancer cell lines," *PLoS One*, vol. 6, no. 3, article e17388, 2011.
- [38] B. Pauwels, A. E. C. Korst, G. G. O. Pattyn et al., "The relation between deoxycytidine kinase activity and the radiosensitising effect of gemcitabine in eight different human tumour cell lines," *BMC Cancer*, vol. 6, no. 1, p. 142, 2006.
- [39] V. Grégoire, J. F. Rosier, M. de Bast et al., "Role of deoxycytidine kinase (dCK) activity in gemcitabine's radioenhancement in mice and human cell lines in vitro," *Radiotherapy and Oncology*, vol. 63, no. 3, pp. 329–338, 2002.
- [40] K. Agrawal, V. Das, P. Vyas, and M. Hajdúch, "Nucleosidic DNA demethylating epigenetic drugs – a comprehensive review from discovery to clinic," *Pharmacology & Therapeutics*, 2018.
- [41] X. Yang, F. Lay, H. Han, and P. A. Jones, "Targeting DNA methylation for epigenetic therapy," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 31, no. 11, pp. 536–546, 2010.
- [42] D. M. Moran, G. Gawlak, M. S. Jayaprakash, S. Mayar, and C. G. Maki, "Geldanamycin promotes premature mitotic entry and micronucleation in irradiated p53/p21 deficient colon carcinoma cells," *Oncogene*, vol. 27, no. 42, pp. 5567–5577, 2008.
- [43] A. Salminen, A. Kauppinen, and K. Kaarniranta, "Emerging role of NF- κ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP)," *Cellular Signalling*, vol. 24, no. 4, pp. 835–845, 2012.
- [44] C. Fabre, J. Grosjean, M. Tailler et al., "A novel effect of DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors : NF κ B inhibition in malignant myeloblasts," *Cell Cycle*, vol. 7, no. 14, pp. 2139–2145, 2008.
- [45] H. Rajabi, A. Tagde, M. Alam et al., "Dna methylation by Dnmt1 and Dnmt3b methyltransferases is driven by the Muc1-C oncoprotein in human carcinoma cells," *Oncogene*, vol. 35, no. 50, pp. 6439–6445, 2016.
- [46] J. Winfield, A. Esbitt, S. F. Seutter et al., "Effect of inflammatory cytokines on DNA methylation and demethylation," *The FASEB Journal*, vol. 30, Supplement 1, p. 1053.3, 2016.
- [47] M. Milanovic, D. N. Y. Fan, D. Belenki et al., "Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness," *Nature*, vol. 553, no. 7686, pp. 96–100, 2017.
- [48] C. M. Beausejour, A. Krtolica, F. Galimi et al., "Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways," *The EMBO Journal*, vol. 22, no. 16, pp. 4212–4222, 2003.
- [49] J.-H. Bae, J.-G. Kim, K. Heo, K. Yang, T.-O. Kim, and J. M. Yi, "Identification of radiation-induced aberrant hypomethylation in colon cancer," *BMC Genomics*, vol. 16, no. 1, p. 56, 2015.
- [50] D. A. Antwi, K. M. Gabbara, W. D. Lancaster, D. M. Ruden, and S. P. Zieske, "Radiation-induced epigenetic DNA methylation modification of radiation-response pathways," *Epigenetics*, vol. 8, no. 8, pp. 839–848, 2013.
- [51] M. W. Lee, W. B. Parker, and B. Xu, "New insights into the synergism of nucleoside analogs with radiotherapy," *Radiation Oncology*, vol. 8, no. 1, p. 223, 2013.

11. Supplement

Tabulka S1: Přehled p hodnot látek testovaných SER spot analýzou po SA-β-gal barvení kitem.

látka	koncentrace (uM)	MRC5	U2OS	HCT116
		p hodnota	p hodnota	p hodnota
výběr látek z MTS				
quercetin	50	0,94681	0,000014	0,126959
	12,5	0,30617	0,03899	0,999995
	3,125	0,69299	0,542252	0,998899
	0,781	0,65393	0,712389	0,982356
	0,195	0,33774	0,169048	0,992906
	0,048	0,91502	0,41448	0,157353
	0,012	0,50394	0,999931	0,999999
dasatinib	50	0,5702	0,002278	0,000027
	12,5	0,92053	0,780104	0,000499
	3,125	1	0,000703	0,000103
	0,781	0,38977	0,126569	0,000034
	0,195	0,99899	0,006142	0,000169
	0,048	1	0,996308	0,164586
	0,012	1	0,888723	0,23838
D+Q	50	0,68275	0,036397	0,000429
	12,5	0,45131	1	0,000208
	3,125	1	0,005075	0,000164
	0,781	0,99963	0,086085	0,000073
	0,195	0,99995	0,486281	0,000032
	0,048	0,98745	0,627207	0,985948
	0,012	0,99913	0,941281	0,999952
decyltrimethylammonium bromid	50	0,99944	0,000006	0,015428
	12,5	0,98387	0,000112	0,004111
	3,125	0,64843	0,256551	0,971382
	0,781	0,61457	0,004103	0,121796
	0,195	0,27299	0,016922	0,394054
	0,048	0,81671	0,007092	0,962326
	0,012	0,38132	0,019597	0,076112
9-aminoakridin hydrochlorid monohydrát	50	0,03621	0,000045	0,000041
	12,5	0,06716	0,000042	0,000072
	3,125	0,80873	0,000108	0,071659
	0,781	0,9896	0,999799	0,945512
	0,195	0,99956	0,958628	0,999608
	0,048	0,99817	0,671211	0,151982
	0,012	1	0,753497	0,985065

Tabulka S1: Přehled p hodnot látek testovaných SER spot analýzou po SA-β-gal barvení kitem (pokrač).

látka	koncentrace (uM)	MRC5	U2OS	HCT116
		p hodnota	p hodnota	p hodnota
výběr látek z MTS				
valsopodar	50	0,584	0,0000067	0,010791
	12,5	0,50822	0,0000106	0,066673
	3,125	0,65469	0,0457531	0,800674
	0,781	0,98243	0,1912127	0,144254
	0,195	0,27321	0,0066792	0,960706
	0,048	0,99994	0,1709271	0,916829
	0,012	0,99996	0,1551175	0,999931
BMH-21	50	0,03519	0,0000056	0,000322
	12,5	0,05499	0,0000057	0,028621
	3,125	0,04726	0,5352815	0,999986
	0,781	0,07222	0,0000057	0,000053
	0,195	0,21868	0,0000062	0,999916
	0,048	0,9352	0,0230906	0,72577
	0,012	1	0,1373594	0,922489
1-hexyl-4-amino-2-methylquinolinium	50	0,08018	0,0000056	0,000228
	12,5	0,25761	0,0000061	0,000075
	3,125	0,79264	0,0000073	0,335725
	0,781	0,99954	0,0000057	0,999999
	0,195	1	0,0000865	0,503857
	0,048	0,99934	0,0540133	0,984825
	0,012	0,99998	0,0607434	0,697099
C1	50	0,27109	0,0000057	0,040378
	12,5	0,73747	0,0434437	0,108369
	3,125	0,98666	0,0431746	0,244187
	0,781	1	0,0583479	0,354889
	0,195	0,96322	0,1261959	0,15972
	0,048	0,98666	0,1874854	0,182034
	0,012	0,99961	0,1283268	0,282683
loperamid hydrochlorid	50	0,2409	0,0000056	0,000281
	12,5	0,92034	0,0000439	0,006482
	3,125	0,95092	0,026388	0,995173
	0,781	0,93938	0,0344273	0,859721
	0,195	0,73324	0,2658099	0,886827
	0,048	0,68804	0,8132826	1
	0,012	0,90103	0,8195226	0,677029

Pozn. nově nasyntetizované látky a některé další látky jsou anonymizovány pod číselnými kódy.

Tabulka S1: Přehled p hodnot látek testovaných SER spot analýzou po SA-β-gal barvení kitem (pokrač).

látka	koncentrace (uM)	MRC5	U2OS	HCT116
		p hodnota	p hodnota	p hodnota
výběr látek z MTS				
C2	50	0,67298	0,000152	0,000016
	12,5	0,27998	0,000836	0,01322
	3,125	0,9187	0,006212	0,01565
	0,781	0,98593	0,001585	0,120479
	0,195	1	0,000773	0,999991
	0,048	1	0,16998	0,494562
	0,012	0,59579	0,331468	0,998636
opioidy				
DAMGO	50	0,707074	0,006791	0,999993
	12,5	0,898644	0,999967	0,938599
	3,125	1	0,999982	0,889906
	0,781	0,999244	1	0,999997
	0,195	0,999939	0,999229	0,928117
	0,048	0,998364	1	0,87992
	0,012	0,932544	1	0,634925
(±)-metadon hydrochlorid	50	0,985596	0,00458	0,138737
	12,5	0,999994	0,995329	0,829567
	3,125	0,11932	0,715065	0,999957
	0,781	0,918799	0,926126	0,949092
	0,195	0,998671	0,269521	1
	0,048	0,893167	0,997126	0,999791
	0,012	0,99746	0,999934	0,839393
levorfanol (+)-tartrátová sůl dihydrát	50	0,957009	0,308986	0,283189
	12,5	0,956566	0,882573	0,998552
	3,125	0,966548	0,953275	0,99644
	0,781	1	0,463165	0,982778
	0,195	0,378651	0,117893	0,999999
	0,048	0,543579	0,793104	0,999153
	0,012	0,919777	0,947219	0,806698
oxykodon hydrochlorid	50	0,530398	0,676057	0,526642
	12,5	0,997267	0,999914	0,997488
	3,125	1	0,985827	0,998761
	0,781	0,501661	0,997343	1
	0,195	1	0,99996	1
	0,048	0,999953	0,938311	1
	0,012	0,980553	0,999577	0,996865

Pozn. nově nasyntetizované látky a některé další látky jsou anonymizovány pod číselnými kódy.

Tabulka S1: Přehled p hodnot látek testovaných SER spot analýzou po SA-β-gal barvení kitem (pokrač).

látka	koncentrace (uM)	MRC5	U2OS	HCT116
		p hodnota	p hodnota	p hodnota
opioidy				
hydromorfon hydrochlorid	50	0,901539	0,047117	0,351699
	12,5	0,94943	0,999965	0,672858
	3,125	0,465358	0,999987	0,974874
	0,781	0,999938	1	0,985239
	0,195	0,736651	0,999979	0,874586
	0,048	0,991476	0,9963	0,890411
	0,012	0,999995	0,998793	0,999727
butorfanol (+)- tartrátová sůl	50	0,994551	0,952182	0,748643
	12,5	0,992184	0,999996	0,703515
	3,125	0,990839	0,99392	0,790572
	0,781	0,881405	0,999655	0,979783
	0,195	1	1	0,996893
	0,048	0,850027	0,136614	0,586704
	0,012	0,969307	0,943936	0,669823
[Leu5]-enkefalin	50	0,963183	0,983837	0,999688
	12,5	1	0,95814	0,600782
	3,125	0,999999	0,982445	0,964611
	0,781	0,999986	0,397643	0,542125
	0,195	1	0,992103	0,998987
	0,048	0,996656	0,997447	0,917993
	0,012	0,999928	0,999695	0,999996
nalbufin	50	1	0,024152	0,998639
	12,5	0,996412	0,999745	0,790058
	3,125	0,857642	0,967815	0,880783
	0,781	0,990557	0,999997	0,999993
	0,195	1	0,966524	0,999995
	0,048	0,989196	0,998291	0,907109
	0,012	0,997739	0,931401	0,951072
mabron	50	1	0,551651	0,457191
	12,5	0,999436	0,306067	0,866986
	3,125	0,835263	0,940408	1
	0,781	0,931602	0,648287	0,999993
	0,195	0,469821	0,290233	0,98074
	0,048	0,999996	0,996659	0,93403
	0,012	0,584111	1	0,993706

Tabulka S1: Přehled p hodnot látek testovaných SER spot analýzou po SA-β-gal barvení kitem (pokrač).

látka	koncentrace (uM)	MRC5	U2OS	HCT116
		p hodnota	p hodnota	p hodnota
opioidy				
dipidolor	50	0,911473	0,531946	0,748
	12,5	0,999961	0,98281	1
	3,125	0,999998	0,031544	0,995172
	0,781	0,983955	0,999983	0,999269
	0,195	0,999452	0,999304	0,474298
	0,048	0,182189	0,961467	0,708079
	0,012	0,873004	0,999699	0,998846
remifentanyl	50	0,991943	0,014616	0,999658
	12,5	0,813158	0,999418	0,283166
	3,125	0,923237	0,999927	0,449571
	0,781	0,646455	0,976825	0,714245
	0,195	0,960092	1	0,398084
	0,048	0,5192	0,999164	0,575857
	0,012	0,110367	0,987111	0,256318
kodein	50	0,492818	0,212285	0,840874
	12,5	0,999118	0,410585	0,978408
	3,125	0,635228	0,962314	0,728747
	0,781	1	0,053879	0,70741
	0,195	0,931407	0,472173	0,958563
	0,048	0,999821	0,615368	0,291297
	0,012	0,237576	0,20966	0,022583
sufentanyl	50	0,882374	0,011964	0,999984
	12,5	0,995821	0,987937	0,697762
	3,125	1	0,999998	0,996309
	0,781	0,765989	0,996352	0,406094
	0,195	0,818581	0,999369	0,990172
	0,048	0,490488	0,917777	0,241723
	0,012	0,119253	0,122754	0,100349
fentanyl	50	0,345256	0,002594	0,014031
	12,5	0,949073	0,68274	0,976128
	3,125	0,656108	0,390871	0,9086
	0,781	0,999056	0,994969	0,994373
	0,195	0,965951	0,859599	0,517371
	0,048	0,614937	0,492982	0,0617
	0,012	0,194176	0,057216	1

Tabulka S1: Přehled p hodnot látek testovaných SER spot analýzou po SA-β-gal barvení kitem (pokrač).

látka	koncentrace (uM)	MRC5	U2OS	HCT116
		p hodnota	p hodnota	p hodnota
opioidy				
dolsin	50	0,952973	0,57281	0,959644
	12,5	0,704405	0,614699	0,997647
	3,125	0,971662	0,688491	1
	0,781	1	0,770328	1
	0,195	0,96476	0,972913	0,509471
	0,048	0,527348	0,928051	0,465369
	0,012	0,040323	0,150644	0,26546
morfin	50	0,37214	1	0,231534
	12,5	0,365866	1	0,958291
	3,125	0,769617	0,999306	0,999999
	0,781	0,436255	0,574524	0,556504
	0,195	0,420205	0,999959	0,999992
	0,048	0,927992	0,621933	0,960606
	0,012	0,819605	0,510114	0,996826
kokain	50	0,961561	0,025604	0,999263
	12,5	0,819423	0,007567	0,988593
	3,125	0,884267	0,999987	0,135591
	0,781	0,84546	0,083163	0,999999
	0,195	0,925755	1	1
	0,048	0,297618	0,884465	0,828341
	0,012	0,578484	0,999659	0,999928
U-50488	50	0,144099	0,004763	0,123673
	12,5	0,914148	0,006579	0,631792
	3,125	0,901123	0,454824	0,960121
	0,781	0,976211	0,228875	0,991355
	0,195	0,996868	0,608114	0,929693
	0,048	0,957582	0,38102	0,847693
	0,012	0,956093	0,836719	0,989271
GR 89696	50	0,659724	0,986627	0,012872
	12,5	0,99739	0,998888	0,999932
	3,125	0,999217	0,998674	0,99941
	0,781	0,999444	0,596099	0,957659
	0,195	0,997252	1	1
	0,048	0,948501	1	0,934825
	0,012	0,999956	0,851355	0,556522

Tabulka S1: Přehled p hodnot látek testovaných SER spot analýzou po SA-β-gal barvení kitem (pokrač).

látka	koncentrace (uM)	MRC5	U2OS	HCT116
		p hodnota	p hodnota	p hodnota
opioidy				
U-69593	50	0,992418	0,761437	0,517728
	12,5	0,95655	0,487298	0,962276
	3,125	0,999994	0,429676	0,994834
	0,781	0,941756	1	0,910932
	0,195	0,451497	0,999999	1
	0,048	1	0,955929	0,965975
	0,012	0,999785	0,999999	1
pentazocin	50	0,301342	0,929262	0,515443
	12,5	0,994472	0,372508	0,931638
	3,125	0,289546	0,165993	0,998784
	0,781	0,682635	0,788018	0,668489
	0,195	0,230699	0,504845	0,927897
	0,048	0,556237	0,877168	0,99439
	0,012	0,59037	0,998347	0,76686
buprenorfin hydrochlorid	50	0,003422	0,026987	0,006842
	12,5	1	0,173105	0,984007
	3,125	0,977771	0,559771	0,831775
	0,781	0,999147	0,640245	0,593316
	0,195	0,757059	0,999999	0,591788
	0,048	1	0,991742	1
	0,012	0,938631	0,927999	0,987463
SCH 221510	50	0,169274	0,861596	0,008641
	12,5	1	0,420735	0,142753
	3,125	0,467215	0,675541	0,305816
	0,781	0,999154	0,675541	0,793305
	0,195	0,557117	0,906647	0,720154
	0,048	0,999976	1	0,999987
	0,012	0,982621	0,999983	0,86773
naloxon	50	0,049014	0,759599	1
	12,5	0,997629	1	0,999275
	3,125	0,99812	0,928157	0,999646
	0,781	0,975464	0,778385	0,999765
	0,195	0,999913	1	0,874885
	0,048	1	0,759599	0,894155
	0,012	1	0,999999	0,982133

Tabulka S1: Přehled p hodnot látek testovaných SER spot analýzou po SA-β-gal barvení kitem (pokrač).

látka	koncentrace (uM)	MRC5	U2OS	HCT116
		p hodnota	p hodnota	p hodnota
opioidy				
naltrexon	50	0,930608	0,373223	0,96168
	12,5	0,431827	0,831041	0,738365
	3,125	0,974334	0,979752	0,74498
	0,781	0,999586	0,721118	0,999921
	0,195	1	0,999796	0,856137
	0,048	1	0,881881	0,997765
	0,012	0,69916	1	0,999937
nalmefen	50	0,043133	0,001481	0,024605
	12,5	0,519869	0,015694	0,994197
	3,125	0,87805	0,770356	0,999979
	0,781	0,852967	0,999999	0,956572
	0,195	0,999771	0,993069	0,999958
	0,048	1	0,954877	0,624225
	0,012	1	0,504276	0,999991
methylnaltrexon bromid	50	0,999994	0,047662	0,235212
	12,5	1	0,206073	0,289173
	3,125	0,999773	1	0,400882
	0,781	0,999465	0,999999	1
	0,195	0,99646	0,732105	1
	0,048	0,731067	0,365767	0,973079
	0,012	0,347904	0,111627	1
nor-binaltorfimin	50	0,914918	0,038374	0,016039
	12,5	0,091912	0,9133	0,890482
	3,125	0,998723	1	0,501653
	0,781	0,973234	0,213711	0,597453
	0,195	1	0,943075	0,964647
	0,048	0,979199	0,997203	0,837939
	0,012	0,70845	0,172915	1
guanidinonaltrindol	50	0,004778	0,017932	0,031167
	12,5	0,217471	0,002779	0,028867
	3,125	0,236531	0,876237	0,898267
	0,781	0,997886	0,695053	0,793365
	0,195	0,999978	0,997264	0,731489
	0,048	0,385169	0,627554	0,638673
	0,012	0,293651	0,945471	0,999628

Tabulka S1: Přehled p hodnot látek testovaných SER spot analýzou po SA-β-gal barvení kitem (pokrač).

látka	koncentrace (uM)	MRC5	U2OS	HCT116
		p hodnota	p hodnota	p hodnota
opioidy				
BAN ORL 24	50	0,038017	0,000303	0,014858
	12,5	0,441872	0,990282	0,961407
	3,125	0,999977	0,999995	0,999584
	0,781	0,996652	0,999986	0,999991
	0,195	0,814541	1	0,90149
	0,048	0,999993	0,988022	0,777023
	0,012	0,055692	0,996611	0,31576

Tabulka S2: Srovnání výsledků látek analyzovaných v obou testech (MTS vs. SA-β-gal).

látka	srovnání MTS a SA-β-gal výsledků					
	MRC5		U2OS		HCT116	
	MTS	β-gal	MTS	β-gal	MTS	β-gal
quercetin	+	-	+	+	+	-
dasatinib	-	-	+	+	+	+
D+Q	-	-	+	+	+	+
decyltrimethylammonium bromid	-	-	+	+	-	+
9-aminoacridine hydrochlorid monohydrát	-	+	-	+	-	+
valsopodar	-	-	+	+	+	+
BMH-21	-	+	+	+	-	+
haq iodid	-	-	+	+	+	+
C1	-	-	-	+	-	+
loperamide hydrochlorid	-	-	+	+	+	+
C2	+	-	+	+	+	+
S1	+	+	-	+	-	+
S3	+	-	-	+	-	+
shoda testů (%)	61,5		69,2		46,1	

Zeleně jsou vyznačeny shody pozitivních výsledků u obou testů, oranžově shody negativních výsledků. Pozn. nově nasyntetizované látky a některé další látky jsou anonymizovány pod číselnými kódy.