

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů



Michaela Rennerová

Vliv mitochondriálně cílených senolytických látek na rozvoj respiračních onemocnění

Effect of mitochondrially targeted senolytic agents on the development of respiratory diseases

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Soňa Štemberková Hubáčková, Ph.D.

Praha 2024

Prohlášení:

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

V Praze, 29.04.2024

Michaela Rennerová

Poděkování

Děkuji mé školitelce RNDr. Soně Štemberkové Hubáčkové, Ph.D. za vedení, pomoc, užitečné rady a ochotu během psaní bakalářské práce. Její odborné znalosti mi pomohly lépe porozumět problematice, se kterou jsem se potýkala. Jsem vděčná za její klíčový přínos k úspěšnému dokončení této práce. Děkuji také prof. MUDr. Martinovi Haluzíkovi, DrSc., že jsem se v rámci jeho laboratoře mohla věnovat tématu buněčné senescence.

Mé působení v laboratoři translační a experimentální diabetologie a obezitologie na pracovišti IKEM bylo podpořeno programem Národního ústavu pro výzkum metabolických a kardiovaskulárních onemocnění (Program EXCELES, ID projektu č. LX22NPO5104) – financovaný Evropskou unií – Next Generation EU.

Abstrakt

Stárnutí je komplexní biologický proces charakterizovaný postupným poklesem fyziologických funkcí buněk a tkání, které vedou k aktivaci procesu známého jako buněčná senescence. To vede k rozvoji strukturálních a funkčních změn v organismu doprovázených zvýšeným rizikem vzniku nejrůznějších onemocnění. Respirační onemocnění patří mezi nejčastější chronická onemocnění spojená s hromaděním senescentních buněk v organismu. Současná léčba chronických respiračních onemocnění zahrnuje spíše zmírnění příznaků než odstranění primární příčiny vzniku těchto onemocnění. Vzhledem k tomu, že senescentní buňky hrají důležitou roli v patogenezi respiračních onemocnění leží budoucnost terapií v jejich odstranění pomocí senolytických látek. I přes slibné výsledky některých studií je současný výzkum limitován heterogenitou senescentních buněk, což se odráží v jejich citlivosti na senolytické látky a variabilitě terapeutické odpovědi. Mitochondrie hrají ústřední roli při vzniku a udržení senescentního fenotypu buňky tím, že regulují klíčové procesy, jako je energetický metabolismus či regulace buněčné signalizace, a to nezávisle na typu senescentní buňky. Specifické cílení mitochondrií senescentních buněk tak může představovat slibnou terapeutickou strategii pro modulaci senescence a nemocí souvisejících s věkem, jako jsou chronická respirační onemocnění.

Klíčová slova

buněčná senescence, mitochondrie, respirační onemocnění, idiopatická plicní fibróza, chronická obstrukční plicní nemoc, metabolický syndrom, senolytické látky, terapie

Abstract

Aging is a complex biological process characterized by gradual decline in the physiological functions of cells and tissues, leading to the activation of a process known as cellular senescence. This results in the development of structural and functional changes in the organism accompanied by an increased risk of various diseases. Respiratory diseases are among the most common chronic conditions associated with the accumulation of senescent cells in the body. Current treatment for chronic respiratory diseases primarily focuses on symptom relief rather than addressing the primary cause of these conditions. Given that senescent cells play a significant role in the pathogenesis of respiratory diseases, the future of therapies lies in their elimination using senolytic agents. Despite promising results from some studies, current research is limited by the heterogeneity of senescent cells, which is reflected in their sensitivity to senolytic agents and the variability of therapeutic responses. Mitochondria play a central role in the development and maintenance of the senescent cell phenotype by regulating key processes such as energy metabolism and cellular signaling, regardless of the type of senescent cell. Thus, targeting mitochondria in senescent cells may represent a promising therapeutic strategy for modulating senescence and age-related diseases, such as chronic respiratory diseases.

Key words

cellular senescence, mitochondria, respiratory diseases, idiopathic pulmonary fibrosis, chronic obstructive pulmonary disease, metabolic syndrom, senolytic drugs, therapy

Seznam zkratek

| | |
|-----------|---|
| ACE2 | = Angiotenzin konvertující enzym 2 |
| ADP | = Adenosindifosfát |
| AECs | = Buňky epitelu amnionu |
| AMPK | = Adenosinmonofosfát aktivovaná protein kináza |
| ANT | = Adenin nukleotid translokáza |
| ATP | = Adenosintrifosfát |
| ATM | = Ataxia-Telangiektáza mutovaný protein |
| ATPP | = Alkyltrifenylfosfoniový vektor |
| ATR | = Ataxia-Telangiektáza a RAD3 příbuzný protein |
| BAK | = BCL-2 asociovaný antagonist 1 |
| BAX | = BCL-2 asociovaný X protein |
| BMI | = Index tělesné hmotnosti |
| BCL-2 | = B-buněčný lymfom 2 |
| BCL-XL | = B-buněčný lymfom-extra velký |
| BCL-W | = B-buněčný lymfom-w |
| β-gal | = β-galaktosidáza |
| BH3 | = BCL-2 homologní 3 doména |
| BRAF | = v-Raf virový onkogen myšního sarkomu, homolog B |
| CHK1 | = Kontrolní kináza 1 |
| CHK2 | = Kontrolní kináza 2 |
| C/EBP | = Protein vážící se na CCAAT motivy |
| COPD | = Chronická obstrukční plicní nemoc |
| CRP | = C-reaktivní protein |
| CI-IV | = Mitochondriální respirační komplexy I-IV |
| D | = Dasatinib |
| DNA | = Deoxyribonukleová kyselina |
| DDR | = Reakce na poškození DNA |
| DNA-SCARS | = Segmenty DNA s chromatinovými změnami posilující senescenci |
| Drp1 | = Dynamin-příbuzný protein 1 |
| ECM | = Extracelulární matrix |
| ERK/ERG1 | = Extracelulární regulovaná kináza ½ |
| ETC | = Elektron transportní řetězec |

| | |
|--------------------|---|
| FGF | = Fibroblastový růstový faktor |
| Fis1 | = Mitochondriálně štěpný protein 1 |
| FOXO | = „O“ podskupina forkhead box transkripčních faktorů |
| IL-6 | = Interleukin-6 |
| IL-1 α | = Interleukin-1 α |
| IPF | = Idiopatická plicní fibróza |
| MAPK | = Kináza aktivována mitogenem |
| MetS | = Metabolický syndrom |
| MIM | = Mitochondriální vnitřní membrána |
| MitoTam | = Mitochondriálně cílený Tamofixen |
| MMPs | = Matrixové metaloproteinázy |
| mtDNA | = Mitochondriální DNA |
| mTOR | = Mechanistický cíl rapamycinu |
| MYC | = Myelocytomatózní onkogen |
| NAD ⁺ | = Nikotinamidadeninukleotid |
| NF- κ B | = Nukleární faktor kappa B |
| OXPHOS | = Oxidativní fosforylace |
| PI3K | = Fosfatidylinositol-3-kinasa |
| PKB/Akt | = Protein kináza B |
| PTEN | = Fosfatáza a tensin homolog odstraněný z chromozomu 10 |
| Q | = Quercetin |
| RAS | = Rodina proteinů „Rat sarcoma“ |
| Rb | = Retinoblastomový protein |
| ROS | = Reaktivní formy kyslíku |
| SARS-CoV-2 | = Vážný akutní chronický syndrom koronavirus 2 |
| SASP | = Sekreční fenotyp asociovaný se senescencí |
| SAHF | = Heterochromatinové fokusy asociované se senescencí |
| SIRT1 | = Sirtuin 1 |
| TNBC | = Trojitě-negativní rakovina prsu |
| TNF- α | = Tumor nekrotizující faktor alfa |
| TGF- β 1 | = Transformující růstový faktor beta 1 |
| TPP | = Trifenylfosfoniový vektor |
| VEGF | = Vaskulární endoteliální růstový faktor |
| $\Delta\Psi_{m,i}$ | = Mitochondriální membránový potenciál |

Obsah

| | |
|--|-----------|
| 1 Úvod | 1 |
| 2 Senescence | 2 |
| 2.1 Úvod do senescence | 2 |
| 2.2. Charakterizace senescentní buňky | 3 |
| 2.3 Typy buněčné senescence | 4 |
| 2.3.1 Replikační senescence | 4 |
| 2.3.2 Stresem vyvolaná senescence | 5 |
| 2.3.3 Onkogeny vyvolaná senescence | 5 |
| 2.3.4 Sekundární senescence | 6 |
| 2.4 Úloha senescence v organismu | 6 |
| 2.4.1 Fyziologická role senescence..... | 7 |
| 2.4.2 Patologická senescence | 8 |
| 3 Respirační onemocnění | 9 |
| 3.1 Úvod do respiračních onemocnění | 9 |
| 3.2 Idiopatická pulmonální fibróza | 11 |
| 3.2.1 Role senescence v rozvoji IPF | 11 |
| 3.3 Chronické obstrukční onemocnění plic | 12 |
| 3.3.1 Role senescence v rozvoji COPD..... | 13 |
| 4 Vztah mezi metabolickým syndromem a respiračními onemocněními | 14 |
| 4.1 Metabolický syndrom | 14 |
| 4.2 Vliv metabolického syndromu na rozvoj chronických respiračních onemocnění | 15 |
| 4.3 Vliv chronických respiračních onemocnění na rozvoj metabolických onemocnění | 16 |
| 4.4 Vztah mezi metabolickým syndromem a rozvojem onemocnění COVID-19 | 17 |
| 5 Senolytika | 18 |
| 5.1 Úvod do senolytik | 18 |
| 5.2 Testovaná senolytika | 18 |
| 5.3 Role mitochondrií v senescenci | 20 |
| 5.4 Mitochondriálně cílená senolytika | 22 |
| 5.4.1 Senolytické látky cílené na proteiny rodiny BCL-2 | 23 |
| 5.4.2 Metformin..... | 24 |
| 5.4.3 MitoTam | 25 |
| 5.4.4 Budoucnost mitochondriálně cílených senolytických látek | 27 |
| 6 Závěr | 29 |
| 7 Seznam použité literatury | 30 |

1 Úvod

Respirační onemocnění představují závažný zdravotní problém postihující miliony lidí po celém světě. V posledních desetiletích výskyt respiračních onemocnění každoročně narůstá zejména v důsledku nárůstu rizikových faktorů, jako je zvýšené vystavení organismu znečištěnému ovzduší, špatné životní návyky (kouření a konzumace alkoholu) či vystavení jedinců nebezpečným látkám v rámci povolání. Zejména pro chronická respirační onemocnění dosud neexistuje účinný lék, který by pouze netlumil příznaky nemocí a dočasně neulevoval pacientům, ale cílil na zdroj problému a zcela vyléčil postižené jedince. Tato onemocnění jsou život ohrožující, ročně dle odhadu světové zdravotnické organizace (WHO) zemře na chronická respirační onemocnění přibližně 4 miliony lidí. Ačkoliv je možné do určité míry předcházet těmto onemocněním zdravým životním stylem a minimalizací vystavení se enviromentálním faktorům přispívajícím k jejich vzniku, není to dostatečně účinné řešení. Výzkum nových přístupů léčby, které budou cílit na primární zdroj onemocnění, je nutným krokem k záchraně mnoha životů¹.

Jedním z klíčových faktorů ovlivňujících vývoj a průběh těchto chronických onemocnění je buněčná senescence. Buněčná senescence, jakožto nedílná část procesu stárnutí, hraje významnou roli v patogenezi respiračních onemocnění. Senescentní buňky se vyznačují zástavou buněčného cyklu a produkcí různých faktorů souhrnně nazývaných jako „se senescencí asociovaný sekreční fenotyp“ (SASP), které mohou přispět k chronickému zánětu, poškození tkání, a rozvoji patogeneze respiračních onemocnění².

Téma buněčné senescence a její role v respiračních onemocněních je stále více aktuální vzhledem k stárnutí populace, rostoucímu výskytu těchto onemocnění a potřebě nových účinných terapeutických přístupů, které by spíše než na potlačení patofyziologických jevů, cílily na zdroj problému. Existuje stále mnoho neznámých ohledně mechanismů, prostřednictvím kterých senescentní buňky ovlivňují patogenezi respiračních onemocnění, a také ohledně terapeutických přístupů. V nedávné době se objevila nová terapeutická strategie zaměřená na eliminaci senescentních buněk pomocí senolytických látek, které nabízejí různé úrovně účinnosti a použití. Tyto látky mají potenciál ovlivnit průběh onemocnění, která jsou spojena se stárnutím a zlepšit kvalitu života postižených jedinců³.

Tato práce se zabývá mechanismy buněčné senescence, identifikací a popisem respiračních onemocnění a souvisejících komplikací a potenciálem senolytických látek v léčbě respiračních onemocnění.

Cílem této práce je nejen analyzovat vztah mezi buněčnou senescencí a respiračními onemocněními a zhodnotit účinnost dostupných senolytických látek v terapii těchto onemocnění v porovnání se standardně využívanou terapií, ale také nastínit nové možnosti cílení senescentních buněk.

2 Senescence

2.1 Úvod do senescence

Leonard Hayflick, profesor a průkopník v oblasti procesů stárnutí, v roce 1964 formuloval hypotézu stárnutí na základě experimentu prováděného na lidských diploidních buňkách kultivovaných *in vitro*. Popsal, že buňky po čase ztrácí schopnost dělení, nicméně zůstávají stále metabolicky velmi aktivní a započínají procesy vedoucí k degeneraci kultury. Hayflickova hypotéza tvrdí, že právě dosažení hraničního množství dělení je příčinou rozvoje stárnutí neboli senescence na buněčné úrovni^{4,5}. Senescence tedy představuje proces zástavy buněčného dělení v důsledku nadměrného vnitrobuněčného či vnějšího stresu nebo poškození⁶. Na rozdíl od zástavy proliferace klidových, postmitotických buněk, které hrají klíčovou roli v normální fyziologii a homeostázi tkání, představuje buněčná senescence zejména protinádorový obranný mechanismus, který nutí poškozené a potenciálně nádorové buňky k zástavě buněčného cyklu a zabraňuje tak přenosu poškození do dalších generací buněk. V porovnání s klidovými či terminálně diferencovanými buňkami dochází u senescentních buněk k významným změnám v degradačních cestách proteinů, zvýšení metabolické aktivity mitochondrií a energetické produkci, ale zejména k rozsáhlým změnám v expresi genů a produkci proteinů⁷. Přestože může být krátkodobá přítomnost buněčné senescence v organismu prospěšná, dlouhodobé hromadění senescentních buněk vede k řadě negativních efektů.

Senescentní buňky jsou známy svou odolností vůči různým formám buněčné smrti, což přispívá k jejich hromadění v tkáních. Zejména zvýšená exprese proteinů rodiny B-buněčný lymfom 2 (BCL-2), které brání uvolňování cytochromu c z mitochondrií a zabraňují aktivaci kaspáz, hraje důležitou roli v regulaci buněčné smrti a zvyšuje odolnost senescentních buněk vůči apoptóze či jiným druhům buněčné smrti závislých na aktivaci kaspáz⁸. Jak senescence, tak apoptóza jsou klíčové mechanismy, jež pomáhají zabrzdit či odstranit poškozené buňky. I přes určité rozdíly je hranice mezi apoptózou a senescencí velmi tenká vzhledem k řadě proteinů a signálních drah, které se účastní obou procesů. Klíčovou roli v tom, který proces u buňky převáží, hraje délka a intenzita stresu a množství a druh poškození DNA⁹.

Buněčnou senescenci může vyvolat řada vnitřních i vnějších faktorů, včetně genetických vlivů a vlivů prostředí. Regulace buněčné senescence je komplexní a zahrnuje propojení signálních drah a molekulárních mechanismů. Všechny tyto změny vedou k hromadění poškození DNA či k epigenetické regulaci DNA a aktivaci signálních drah, jako jsou zejména Ataxia-Telangiektáza mutovaný protein/kontrolní kináza 2 (ATM/CHK2) a Ataxia-Telangiektáza a RAD3 příbuzný protein/kontrolní kináza 1 (ATR/CHK1). Ty následně modulují aktivitu klíčových regulátorů senescence, mezi které řadíme především dráhy p53/p21^{cip1/waf1} a p16^{INK4A}/pRb.

Ačkoli byla buněčná senescence původně popisována jako nevratná zástava buněčného cyklu, některé studie naznačují, že za určitých okolností může u těchto buněk dojít k obnovení buněčné proliferace. Díky inhibici p16^{INK4A} v buňkách s deficitem proteinu p53 a následné fosforylaci proteinu retinoblastomu (pRb) dochází k zvrácení senescentního fenotypu a k opětovnému zapojení buňky do buněčného cyklu. Bylo popsáno, že tyto buňky zvyšují klonogenní růstový potenciál a vykazují znaky podobné nádorovým kmenovým buňkám¹⁰.

2.2. Charakterizace senescentní buňky

Buněčná senescence je forma zástavy buněčného cyklu, která omezuje proliferační potenciál poškozených buněk. Fáze buněčného cyklu, ve které dochází k zástavě růstu, závisí na druhu, původu buňky a typu poškození. Kromě zástavy buněčného cyklu procházejí senescentní buňky mnoha dalšími fenotypovými změnami. Nejpoužívanějším znakem senescence je detekce aktivity enzymu β -galaktosidázy (β -gal)¹¹. Ta se v senescentních buňkách výrazně zvyšuje v důsledku akumulace lyzozomů, kde je tento enzym lokalizován. Zvýšené množství lyzozomů odráží jejich podíl na proteolytickém zpracování poškozených organel, špatně složených proteinů nebo fragmentů chromatinu, které vznikají odštěpováním z jader během vývoje senescence¹². Zástava buněčné proliferace a změny genové exprese spojené se vznikem senescence jsou doprovázeny významným zvýšením hladin mRNA a proteinů četných cytokinů, chemokinů, růstových faktorů a proteáz označovaných souhrnně jako „se senescencí asociovaný sekreční fenotyp“ (SASP). SASP hraje důležitou roli v autokrinní/parakrinní signalizaci a udržování senescentního fenotypu. Protože je SASP primárně výsledkem reakce na poškození genomu, jedna z jeho prospěšných funkcí zahrnuje komunikaci s buňkami imunitního systému prostřednictvím produkce prozánětlivých cytokinů, které signalizují poškozenou buňku. Nicméně z dlouhodobého hlediska produkce SASP zásadně ovlivňuje

chování buněk v okolí a přispívá k rozvoji systémového zánětu a onemocnění souvisejících s věkem^{13,14}.

Chronické a neopravitelné poškození DNA u senescentních buněk vede k permanentní aktivaci proteinů a signálních drah účastnících se odpovědi na DNA poškození (DDR), tzv. "segmentů DNA s chromatinovými změnami posilujícími senescenci" (DNA-SCARS)¹⁵. U některých typů buněčné senescence se můžeme v jádře setkat s takzvanými „se senescencí-asociovanými heterochromatinovými fokusy“ (SAHF), které jsou tvořeny koncentrací transkripčně neaktivního chromatinu¹⁶. *In vitro* jsou patrné morfologické změny senescentních buněk v důsledku přestavby cytoskeletu řízené rozproštěním cytoplazmy a zvětšením jádra, což je většinou doprovázeno zvýšenou ploditou buněk v důsledku poškozené cytokineze. Ztráta laminu B, jednoho ze strukturálních proteinů stabilizujících jaderný obal, navíc zpomaluje buněčnou proliferaci a podporuje buněčnou senescenci prostřednictvím uvolnění chromatinu z jaderné periferie, což vede ke zvýšené expresi SASP¹⁷. I když jsou tyto fenotypové změny dobře známé, neexistuje žádný specifický znak společný pro všechny typy senescence nebo typ senescentní buňky, což komplikuje detekci těchto buněk v organismu.

2.3 Typy buněčné senescence

Buněčná senescence je proces vyvolaný různými typy stresu, které vedou k rozsáhlým genetickým a metabolickým změnám, jež mají za následek zastavení buněčného cyklu a výrazné buněčné změny. V závislosti na typu stresu rozeznáváme přirozeně vzniklou senescenci zjištěnou u buněk s vyčerpaným replikačním potenciálem a předčasně vzniklou senescenci, ke které dochází u buněk vystavených vnějšímu nebo vnitřnímu poškození (Obrázek 1).

2.3.1 Replikační senescence

Replikační senescence je základním aspektem stárnutí, jelikož významně přispívá ke stárnutí tkání a organismu. Replikační neboli přirozená senescence je primárně způsobena postupným zkracováním telomer při každém buněčném dělení. Tento koncept poprvé popsali Leonard Hayflick a Paul Moorhead v 60. letech 20. století. Telomery hrají klíčovou roli při ochraně integrity chromozomů a udržování stability genomu. Když telomery dosáhnou kriticky krátké délky vykazující známky poškození DNA, buňky aktivují signální dráhy v odpovědi na toto poškození, což vede k zastavení buněčného cyklu. Replikační senescence tedy slouží jako

mechanismus zabraňující nekontrolovanému růstu a potenciální transformaci v nádorové buňky^{18,19}.

2.3.2 Stresem vyvolaná senescence

Senescence může nastat i předčasně, aniž by došlo ke zkrácení telomer. *In vitro* může být tento proces iniciován v reakci na různé stresory, jako jsou nevyhovující podmínky pro kultivaci, které vyžadují adaptaci buněk na umělé prostředí s neobvyklými hladinami kyslíku, složení živin atd. Tyto změny podmínek mohou vést k stresem vyvolané senescenci²⁰. *In vivo* mohou předčasnou senescenci vyvolat fyzikální mutageny jako ionizující a neionizující záření, které poškozují DNA a následně spouštějí DDR²¹. Záření může vyvolat vznik pyrimidinových dimerů, oxidativní poškození DNA, nesprávné zařazení nukleotidů, cross-linking DNA-DNA či DNA-protein a způsobuje jedno- i dvouřetězcové zlomy^{22,23}. Oxidační stres, způsobený ionizujícím zářením nebo změny v okolním prostředí jako změna pH či teploty, mohou také vyvolat poškození DNA a stresem vyvolanou senescenci^{24–26}.

Chemicky vyvolaná senescence představuje podskupinu senescence vyvolané stresem, kde vzniká předčasná senescence jako následek stresu po poškození DNA, které je představováno především jedno- nebo dvouřetězcovými zlomy po vystavení buněk různým chemickým látkám včetně terapií používaných v klinické praxi. Většina léků používaných hlavně v onkologii jsou látky vázající se na DNA, inhibující replikaci DNA v důsledku inaktivace DNA polymerázy nebo ribonukleotidreduktázy²⁷ či inhibitory topoizomerázy I a II, u nichž neschopnost uvolnit tlak v replikační vidlici DNA způsobuje zlomy DNA, aktivaci opravných mechanismů a zástavu buněčného cyklu²⁸

Mitochondrie jsou klíčové orgány pro buňku kvůli své roli v energetickém metabolismu. Během zvýšené oxidativní fosforylace v důsledku vnějších stresorů vznikají jako vedlejší produkt ROS²⁹, které mohou zpětně způsobit poškození mitochondrie. Hromadění poškozených mitochondrií v organismu a nerovnováha v metabolismu mitochondrií mohou spustit signální dráhy p53/p21^{cip1/waf1} a/nebo p16^{INK4A}/pRb a přispět tím k procesu stárnutí^{19,30}. Podrobnější mechanismy role mitochondrií při vzniku buněčné senescence budou popsány v kapitole 5.3.

2.3.3 Onkogeny vyvolaná senescence

Onkogen je gen, který má potenciál způsobit nádorové bujení, pokud je mutovaný nebo abnormálně přepisovaný, případně pokud dojde k abnormální aktivaci přepsaného proteinu. Tento onkogenní potenciál je způsoben aktivací signálních drah, které se podílí na proliferaci,

jako jsou především RAS-MAPK, PI3K-AKT a MYC dráhy. Neustálá aktivace těchto drah podporuje dělení a růst buněk, což vede k rozvoji nádorového bujení. Onkogeny také potlačují programovanou buněčnou smrt, čímž umožňují nádorovým buňkám pokračovat v množení navzdory genetickému poškození nebo buněčnému stresu. Abnormální aktivace onkogenů však také může regulovat tzv. onkogenem vyvolanou senescenci. Příliš silná aktivace onkogenů vede k akumulaci poškození DNA a aktivaci signálních drah vedoucích k zástavě buněčného cyklu, jako jsou zejména dráhy p53/p21^{cip1/waf1} a p16^{INK4a}/pRb³¹. Tento jev byl poprvé pozorován v primárních fibroblastech s nepřetržitě aktivovaným proteinem RAS, který patří do rodiny protoonkogenů. Později byly detekovány další onkogeny, zejména BRAF, MEK a PTEN, jejichž abnormální aktivace může vést k rozvoji senescence³²⁻³⁵.

2.3.4 Sekundární senescence

Podobně jako jiné buňky mohou i senescentní buňky ovlivňovat své okolí pomocí SASP, ať už se jedná o buňky v bezprostřední blízkosti v rámci parakrinní komunikace nebo ty, které jsou vzdálenější a molekuly se k nim dostávají prostřednictvím krevního oběhu (tzv. endokrinní komunikace). Signalizace SASP vede u zdravých buněk k aktivaci zejména NFκB a C/EBPβ, což vede k následné zvýšené expresi zánětlivých molekul a aktivaci drah p53/p21^{cip1/waf1} a p16^{INK4a}/pRb, zástavě buněčného cyklu a k rozvoji senescence. Tato data ukazují, že nejen přímé poškození, ale i dlouhodobé působení stresových molekul aktivuje odpovědi vyvolávající zástavu růstu a tzv. sekundární „bystander“ senescenci. To objasňuje mechanismus, jakým jsou senescentní buňky schopny zvyšovat svůj počet a akumulovat se i v tkáních, které nejsou zasaženy primárním stresem^{36,37}.

2.4 Úloha senescence v organismu

Senescence hraje zásadní úlohu v životním cyklu a fyziologii živých organismů. Neovlivňuje pouze jednotlivé buňky, ale i tkáně, orgány a celý organismus. Jedná se o nesmírně důležitý proces, který má multifunkční roli. Je zahrnut od embryonálního vývoje až po ukončení života organismu. Bez senescence by nebylo možné hojení ran či oprava tkání, jsou však také důvodem vzniku řady patologií spojených s rostoucím věkem^{38,39}.

Senescenci dělíme na dvě hlavní formy – akutní (fyziologická) a chronickou (patologická) (Obrázek 1). Akutní senescence představuje dobře načasovanou a kontrolovanou reakci organismu na konkrétní podněty včetně následné včasné eliminace vzniklých senescentních buněk³⁸. Chronická senescence je pak spojena nejen se stárnutím organismu, ale

zejména s neschopností imunitního systému senescentní buňky eliminovat, což vede k patologickým změnám v organismu⁴⁰.

2.4.1 Fyziologická role senescence

Buněčná senescence byla původně popsána jako protinádorová bariéra tím, že nutí potenciálně onkogenní buňky zastavit buněčný cyklus. Nádorové buňky se stávají senescentními zejména v reakci na řadu konvenčních chemoterapií, při kterých vzniká chronické poškození DNA, dochází k aktivaci onkogenů, případně dochází ke vzniku senescence spontánně v důsledku nedostatku kyslíku či živin.

Kromě prevence nádorového bujení hraje krátkodobá přítomnost senescentních buněk důležitou roli při snižování fibrotické tkáně hromadící se v průběhu hojení ran, při kterém pojivová tkáň nahrazuje normální parenchymovou tkáň, což vede k remodelaci tkáně a tvorbě trvalých jizev. Zvýšená produkce metaloproteináz senescentními buňkami vede k degradaci matrix a snížení hromadění pojivové tkáně v místě poranění³⁸.

Přítomnost senescentních buněk je nedílnou součástí při prenatálním vývoji ledvin či vnitřního ucha. Na modelu myši s odstraněným genem pro p21^{cip1/waf1} byly pozorovány defekty v remodelaci ledvin a nesprávné skládání endolymfatického vaku⁴¹. Senescence zapojená do embryonálního vývoje je závislá na zvýšené expresi p21^{cip1/waf1}⁴². V souvislosti s embryonálním vývojem hraje senescence také důležitou roli v procesu implantace embrya⁴³. Buněčná senescence je součástí organizovaného programu, který remodeluje děložní sliznici a podporuje vaskularizaci, což je zásadní pro úspěšnou implantaci embrya^{43,44}. Při tvorbě placenty pak hraje důležitou úlohu senescence syncytiotrofoblastů. Tento mechanismus je nezbytný pro udržení životaschopnosti plodu a zahrnuje zvýšené senescentní markery, jako jsou SA-β-gal, p16^{INK4A}, p21^{cip1/waf1} a p53^{45,46}. Fyziologická přítomnost senescence není omezena pouze na embryogenezi, uplatňuje se i v dospělém organismu, kdy výzkum ukázal, že megakaryocyty, zásadní pro tvorbu krevních destiček, vykazují senescenci, jež je aktivována dráhou ERK/ERG1, která následně aktivuje expresi p21^{cip1/waf1}⁴⁷.

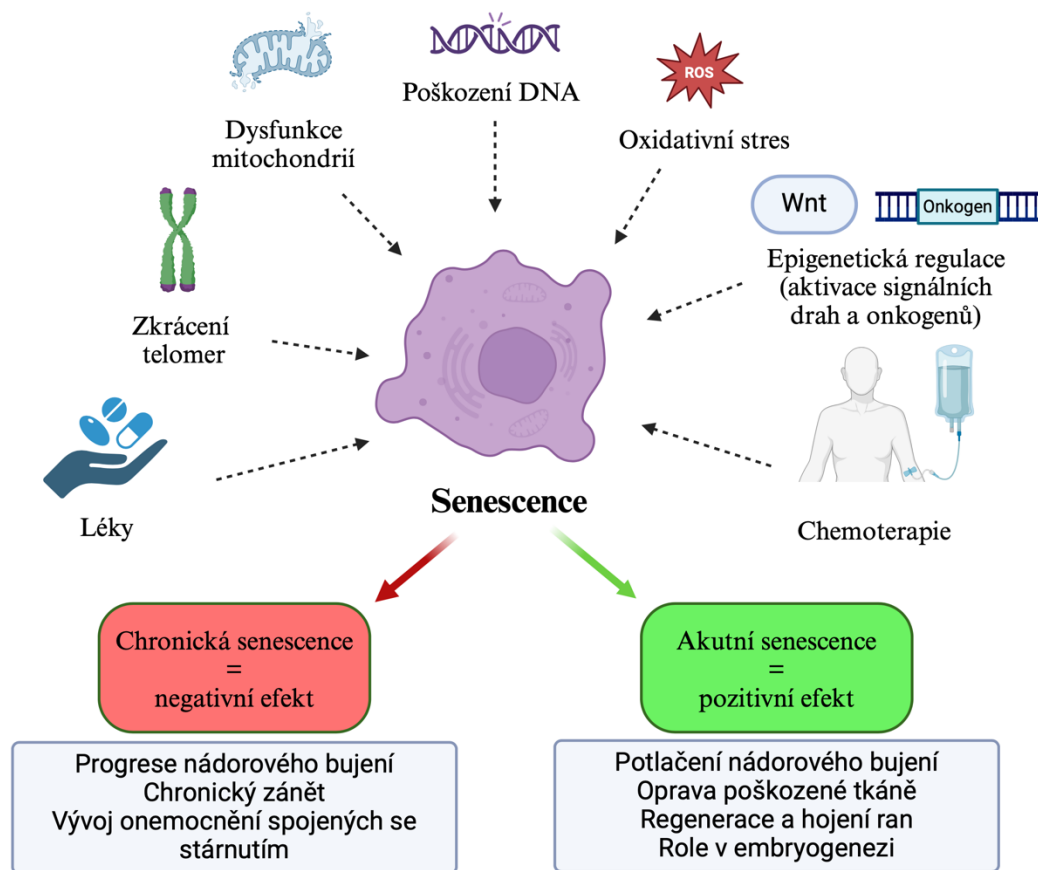
Senescence v organismu tedy není pouze destruktivní ve spojitosti se stárnutím, ale spíše komplexní systém, který ovlivňuje organismus od embryonálního vývoje až po procesy hojení ran a tkáňových oprav. Dynamika senescence ovlivňuje zdraví a dlouhověkost organismu, reguluje klíčové biologické události v různých fázích života a ukazuje, že je neodmyslitelnou součástí životního cyklu.

2.4.2 Patologická senescence

S rostoucím věkem narůstá výskyt patologické (chronické) senescence, neboť imunitní systém ve starším organismu není schopen efektivně odstraňovat senescentní buňky, jež se v těle hromadí^{48,49}. Během patologické senescence dochází k narušení normálních buněčných funkcí kvůli dlouhotrvající přítomnosti senescentních buněk, což má významný vliv na funkci tkání a orgánů. Mezi projevy chronické přítomnosti senescence se řadí snížená regenerace tkáně, hromadění fibrotických buněk a ztráta elasticity tkáně či zvýšený zánět. Dochází k vzniku stresových podmínek, aktivaci inhibitorů buněčného cyklu p16^{INK4A}, p21^{cip1/waf1} a p53, aktivaci onkogenů a poškození DNA, což může vést k mutacím či ztrátám genetické informace. Hromadění senescentních buněk a jejich negativních faktorů může vyústit v různá onemocnění, včetně respiračních onemocnění, diabetes mellitus 2. typu (T2DM), kardiovaskulárních onemocnění, neurodegenerativních chorob a rakoviny, které se řadí mezi 5 nejčastějších onemocnění spojených s výskytem senescence.

I když byla původně senescence popsána jako protinádorové opatření organismu, produkce zánětlivých cytokinů a chemokinů může při chronické senescenci naopak přispět k rozvoji rakoviny. Zvýšená produkce SASP může poskytnout ochranu nádorům před imunitním systémem, což znemožňuje jeho efektivní reakci proti nádorovým buňkám, růstovým faktorům stimulující růst a invazivitu nádorových buněk či faktorům zvyšující angiogenezi v nádoru⁵⁰. Přímý kontakt se senescentní buňkou může také přispět k rozvoji nádorových onemocnění⁵¹.

SASP hraje důležitou roli ve všech zmíněných onemocněních spojených s patologickou senescencí. Na rozdíl od příznivé funkce při snižování fibrotické tkáně během hojení ran může dlouhodobé působení senescentních buněk ve tkáni naopak fibrózu podporovat. U respiračních onemocnění byl výskyt senescentních buněk spojen se zvýšeným poškozením DNA, zkracováním telomer, zánětem a oxidativním stresem, což podporuje fibrotizaci v plicích a postupně dochází k poklesu funkčnosti plic a zhoršení životních podmínek postižených jedinců^{2,52}. Podobně mohou být i neurony a gliové buňky v souvislosti s akumulací senescentních buněk vystaveny zvýšenému zánětu, poškození DNA a oxidativnímu stresu, což přispívá k rozvoji neurodegenerativních onemocnění, jako například Alzheimerova či Parkinsonova choroba⁵³. Pro tyto choroby zatím neexistuje lék, který by cílil na původní zdroj nemoci, a pouze nezpomaloval či neutralizoval průběh nemoci.



Obrázek 1 – Faktory přispívající ke vzniku senescence a její dopady pro organismus. Vytvořeno pomocí BioRender.com

3 Respirační onemocnění

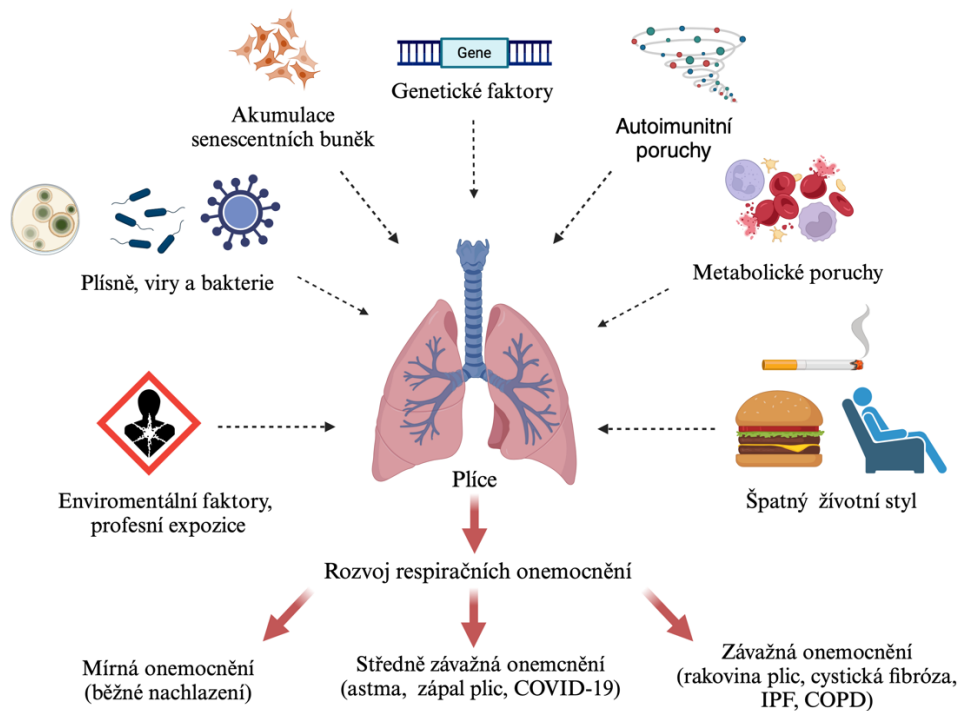
3.1 Úvod do respiračních onemocnění

Respirační onemocnění představují širokou kategorii onemocnění, která postihují dýchací systém zahrnující plíce, dýchací cesty a dýchací svaly. Mohou být způsobena různými faktory, včetně infekcí (virových, bakteriálních nebo plísňových), znečišťujících látek v životním prostředí, kouřením, přítomností genetických predispozic, autoimunitních poruch či na základě profesních expozií. V závislosti na závažnosti můžeme tato onemocnění rozdělit do několika skupin od mírných stavů, jako je běžné nachlazení, onemocnění střední závažnosti, kam řadíme například astma, zápal plic či nově také COVID-19, až po závažná onemocnění, jako jsou rakovina plic, cystická fibróza, idiopatická pulmonální fibróza (IPF) a chronické obstrukční onemocnění plic (COPD) (Obrázek 2). Zatímco první dvě skupiny patří mezi takzvané akutní respirační onemocnění, třetí skupina se řadí mezi chronická respirační onemocnění, která představují významnou zdravotní i finanční zátěž pro společnost na celém světě. V Evropě se

zastoupení těchto chronických respiračních onemocnění pohybuje mezi 4-10% dospělé populace^{1,54}.

Ačkoliv důsledky na každodenní fungování pacienta jsou často devastující, dosud neexistuje žádná účinná léčba, která by tato onemocnění mohla odstranit. Současné terapie se zaměřují na zmírnění příznaků a zpomalení progresu nemoci, nicméně to je pro pacienty nedostatečné. Tyto komplexní poruchy, závislé na genotypových i fenotypových faktorech, značně komplikují život postiženým jednotlivcům. I přes intenzivní výzkum není patogeneze těchto onemocnění stále zcela objasněna. Důležitá je prevence, včasná diagnostika a multidisciplinární přístup, aby byla zajištěna optimální léčba^{1,54}.

Velkou roli v rozvoji nejen IPF a COPD, ale také ostatních respiračních onemocnění hraje buněčná senescence⁵⁵. Byla zaznamenána pozitivní korelace nejen mezi věkem pacienta a výskytem těchto onemocnění, ale také jejich závažností. Stárnutí je spojeno se strukturálními změnami dýchacího systému, včetně snížené elasticity plic, snížené poddajnosti hrudní stěny a oslabení dýchacích svalů. Tyto změny mohou přispívat ke snížení funkce plic a respirační kapacity a vyšší náchylnosti vůči respiračním onemocněním. S přibývajícím věkem také dochází v imunitním systému ke změnám známým jako imunosenescence, které mohou vést ke snížené funkci imunitních buněk a zhoršené schopnosti bojovat s respiračními infekcemi. Plíce u starších jedinců jsou také mnohem náchylnější na škodlivé vnější vlivy, kterými jsou například kouření cigaret nebo život v prostředí se silně znečištěným ovzduším².



Obrázek 2 – Faktory přispívající ke vzniku respiračních onemocnění. Vytvořeno pomocí BioRender.com

3.2 Idiopatická pulmonální fibróza

IPF je nejčastějším typem idiopatických intersticiálních pneumonií vyskytující se převážně u starších pacientů kolem 60-70 let a její výskyt v posledních letech stále roste⁵⁴. Jedná se o progresivní, chronické a nezvratné onemocnění, které je charakterizováno rozsáhlou akumulací fibrotické tkáně v plicích, což vede k postupnému poklesu respiračních funkcí a ve většině případů končí úmrtím pacienta do 5 let od diagnózy⁵⁶. Rozvoj IPF zahrnuje genetickou predispozici v kombinaci s nezdravým životním stylem (kouření) a vystavení rizikovému prostředí (oblasti s vyšší prašností, industriální prostředí, práce s chemickými látkami apod.). Předpokládá se, že prvotní příčinou IPF jsou opakovaná mikroporanění plicního epitelu. Tato poškození epitelu vedou k aktivaci fibroblastů, čímž se spustí reakce hojení ran. U IPF však dochází k nekontrolovanému procesu hojení, to vede k nadměrnému ukládání extracelulární matrix (ECM) a tvorbě fibrotické tkáně. K úplnému objasnění molekulárních mechanismů IPF je však zapotřebí dalšího výzkumu⁵⁷.

Ačkoliv se primárně nejedná o zánětlivé onemocnění, v minulosti byla pacientům podávána protizánětlivá terapeutika jako kortikosteroidy nebo imunosupresiva a cytostatika. Tento způsob léčby však nijak neovlivňoval délku dožití od diagnózy, která se obvykle pohybuje mezi 2-5 lety⁵⁸. V nejlepším případě byla pozitivně ovlivněna rychlost poklesu respiračních funkcí, k výraznějšímu zlepšení oproti podávání placebo však nedošlo⁵⁹. V současnosti jsou nejvíce využívána antifibrotika jako je nintedanib a pirfenidon, které snižují vznik a proliferaci fibroblastů, produkci kolagenu a inhibují zánětlivé prostředí v plicích. Oba léky mají časté vedlejší účinky, ale pacienti je obvykle dobře snášejí⁶⁰. U pacientů s pokročilou IPF se často předepisuje doplňková léčba kyslíkem ke zmírnění nízké hladiny kyslíku v krvi. Všechny současné léčby však pouze zpomalují selhání funkce plic, nikoli mortalitu pacientů s IPF⁶¹.

3.2.1 Role senescence v rozvoji IPF

Současné studie ukazují, že senescence hraje klíčovou roli v patogenezi IPF. Projevuje se předčasným stárnutím alveolárních epitelových buněk (AECs) v důsledku zkrácených telomer, což vede k jejich narušení, čímž se omezí regenerační mechanismy plicní tkáně⁶². Následkem je parenchymální přestavba plic v důsledku aktivace Wnt/ β -katenin dráhy, strukturní deformace, proliferace lézí, které negativně ovlivňují průdušky a dochází k fibrotizaci plic⁶³. Aktivace Wnt/ β -katenin dráhy u senescentních buněk také vede k neobvyklé regeneraci epitelu na bronchiolárně-alveolárních spojích, což může vést k úbytku alveolárního epitelu na jedné

straně, zatímco na druhé přibývá bronchiolárního epitelu⁶⁴. Inhibice Wnt dráhy může reverzně působit na vzniklou fibrózu, proto představuje slibný terapeutický cíl v redukci patogeneze IPF^{62,63}.

Senescentní buňky produkují široké spektrum zánětlivých cytokinů, růstových faktorů a volných radikálů v důsledku zvýšeného oxidačního stresu, které podporují vznik fibrotického prostředí a narušují tkáňovou homeostázi v plicích⁶⁵. To vede k nepřiměřené imunitní regulaci, zvýšení chronické zánětlivé reakce a hromadění imunitních buněk v plicích, což ještě zvyšuje celkový zánět⁶⁶. Tato zánětlivá reakce vede následně k diferenciaci fibroblastů v myofibroblasty, které snižují schopnost správné regenerace tkáně zvýšenou produkcí ECM, která vyplňuje plíce a nahrazuje funkční tkáň a jsou tedy klíčovými efektorovými buňkami v patogenezi plicní fibrózy⁶⁵. Akumulace fibrotické tkáně v důsledku zvýšené přítomnosti senescentních buněk může být v neposlední řadě také důvodem zvýšeného rizika vzniku karcinomu plic u pacientů s IPF^{67,68}.

Kromě zvýšené hladiny prozánětlivých faktorů produkují senescentní buňky ve zvýšené míře také faktory, jako je vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), fibroblastový růstový faktor (FGF) a matrixové metaloproteinázy (MMP), které mohou podporovat angiogenezi a remodelaci cév stimulací proliferace, migrace a tvorby endoteliálních buněk. Narušení plicního cévního řečiště vlivem abnormální angiogeneze a zhoršené funkce endotelu mohou přispívat k patogenezi IPF tím, že mění dodávku kyslíku, podporují hypoxii a stimulují aktivaci fibroblastů a ukládání ECM⁵⁷.

3.3 Chronické obstrukční onemocnění plic

Stejně jako IPF je i COPD velmi častým onemocněním postihující až 10% dospělé populace⁶⁹. Toto onemocnění pacientům způsobuje komplikace při dýchání v důsledku omezeného průtoku vzduchu, což časem přeroste až do chronické protizánětlivé odpovědi v plicích. Zásadní rozdíl oproti IPF spočívá v tom, že toto onemocnění má zánětlivý charakter a může se objevit mnohem dříve, zpravidla již od 20-45 let věku pacienta. COPD postihuje především dýchací cesty a plicní parenchym (emfyzém). Hlavními příznaky COPD jsou chronická bronchitida, charakterizovaná chronickým kašlem trvajícím alespoň 3 měsíce během 2 let po sobě, který zároveň není způsobený jinými plicními či kardiovaskulárními onemocněními, a plicní emfyzém, spojený s anatomickou destruktivní přestavbou plicních sklípků, což má za následek problémy s vydechováním⁷⁰.

S COPD se kromě problému s dýcháním pojí i řada přidružených komplikací postihujících různé orgány. Proto ho někteří přezdívali jako „systematická nemoc“⁷¹. Mezi tyto komplikace patří ubytok hmotnosti způsobený zejména ztrátou svalové hmoty, což společně s dýchacími problémy zásadně snižuje kvalitu života a nutí pacienty omezit fyzickou aktivitu. Mezi další komplikace patří kardiovaskulární problémy, zvýšené riziko vývoje T2DM, osteoporóza, anémie, autoimunitní onemocnění a v neposlední řadě deprese, která se objevují u většiny pacientů s těžší formou COPD⁷².

Léčba COPD obvykle zahrnuje kombinaci farmakologických a nefarmakologických přístupů zaměřených na zmírnění příznaků, zlepšení funkce plic a zlepšení kvality života. Bronchodilatancia, léky zajišťující uvolnění a rozšíření dýchacích cest, se používají jako udržovací léčba k zajištění průchodnosti dýchacích cest a dlouhodobému zlepšení příznaků a funkce plic. U pacientů s těžší formou COPD se používají v kombinaci s inhalačními kortikosteroidy, které pomáhají snižovat zánět dýchacích cest. Jejich užívání je však spojeno se zvýšeným rizikem pneumonie a dalšími nežádoucími účinky. Alternativou kortikosteroidů jsou inhibitory fosfodiesterázy-4, které také redukuje záněty dýchacích cest⁷³. I přes nesporné pozitivní účinky pro pacienta se však stejně jako u terapií IFP i v tomto případě jedná pouze o redukci patofyziologických symptomů než o léčbu příčiny onemocnění.

3.3.1 Role senescence v rozvoji COPD

Podobně jako u IPF je buněčná senescence jedním z klíčových faktorů regulujících dysfunkci plicní tkáně a zánětu u pacientů s COPD. Obecně má senescence na obě onemocnění podobný efekt zahrnující produkci SASP ovlivňujících okolní prostředí a přispívajících k zánětlivému prostředí v plicích, které může přejít až do chronické zánětlivé odpovědi⁶⁵ a způsobit remodelaci plic⁷⁴. Avšak jsou zde drobné rozdíly v projevu a ovlivnění stavu plic. Akumulace senescentních buněk v emfyzému vede k jeho patogenezi, která se vyznačuje destrukcí alveolárních stěn. Senescentní buňky k tomuto procesu přispívají uvolňováním enzymů, jako jsou MMPs, které degradují ECM, což vede k destrukci alveolární stěny a zvětšení vzdušného prostoru. Následkem je omezení průtoku vzduchu, zhoršení výměny plynů a rozvoj komplikací jako je plicní hypertenze.

Signální dráha Wnt/ β -katenin hraje roli v patogenezi IPF i COPD. Zatímco v případě IPF je tato dráha u senescentních alveolárních epitelových buněk hyperaktivní, což má za následek zvýšenou produkci proteinů ECM a akumulaci fibrotické tkáně, u senescentních buněk plicního parenchymu akumulujících se v rámci rozvoje COPD dochází k její inaktivaci, což podporuje produkci MMPs. Deaktivace Wnt/ β -katenin dráhy je reverzibilní mechanismus,

který lze stimulovat pomocí TGF- β 1, což může napomoci zmírnit emfyzém COPD a podpořit regeneraci plicní tkáně⁷⁵. Je tedy zřejmé, že senescentní buňky mohou ovlivnit funkci plic různými mechanismy v závislosti na typu buňky a tkáně, ze které vznikly.

Sirtuin 1 (SIRT1) je nikotinamidadenindinukleotid (NAD⁺) závislá deacetyláza, která se podílí na regulaci buněčné senescence. Má významnou roli v regulaci zánětlivých procesů a v antioxidačních procesech. Snížení hladiny SIRT1 v parenchymu plic pozorované u COPD vede k zvýšené produkci prozánětlivých cytokinů díky aktivaci NF- κ B dráhy⁷⁶ a indukci buněčné senescence v důsledku aktivace senescentních drah p53/p21^{cip1/waf1} či p16^{INK4A}/Rb a snížení anti-senescentní aktivity proteinu FOXO3^{76,77}. SIRT1 se podílí na procesech obnovy a regenerace tkání, včetně udržování, diferenciaci a proliferaci kmenových buněk. Cílená aktivace SIRT1 tak může podpořit regenerační schopnost plicních buněk a tím usnadnit obnovu tkání v plicích poškozených během rozvoje COPD. V tomto směru se v preklinických studiích jeví použití látky SRT1720, specifického aktivátoru SIRT1, jako slibný způsob léčby COPD, protože tato látka snižovala vznik emfyzému v plicích^{78,79}. Jeho klinický vývoj se však potýká s problémy a údaje, které by potvrdily jeho účinnost a bezpečnost u lidí, jsou velmi omezené^{78,79}.

I přes intenzivní výzkum současná léčba chronických respiračních onemocnění, zejména pak IPF a COPD, stále zahrnuje farmakologickou léčbu a podpůrnou péči zaměřenou pouze na zpomalení progresu onemocnění, zmírnění příznaků a zlepšení kvality života, ne však na odstranění primární příčiny onemocnění. Budoucnost léčby těchto chronických onemocnění tak představuje vývoj nových léčebných postupů zaměřených na redukci zánětu, oxidativního stresu či myofibroblastů. Jelikož se senescentní buňky, akumulující se v plicích pacientů s IPF a COPD, významně podílí na vzniku všech těchto patologických projevů, jejich specifické cílení představuje velmi slibný způsob léčby chronických respiračních onemocnění a zvýšení přežívání a kvality života pacientů s tímto onemocněním.

4 Vztah mezi metabolickým syndromem a respiračními onemocněními

4.1 Metabolický syndrom

Nadváha a obezita patří mezi nejzávažnější zdravotní problémy novodobé historie. V roce 2016 světová zdravotnická organizace (WHO) odhadovala, že téměř 39% osob starších 18 let trpí nadváhou (index tělesné hmotnosti – BMI vyšší než 25) a více než 13% osob trpí obezitou (BMI vyšší než 30). Česká republika patří dlouhodobě mezi státy s vyšším výskytem obezity (19.8% populace trpí nadváhou či obezitou). Toto procento se každoročně zvyšuje také díky

stále častějšímu výskytu nadváhy a obezity u dětí a dospívajících. Důvodem tak masivního rozšíření je především špatný životní styl, který kombinuje zvýšený příjem energeticky vydatných potravin s vysokým obsahem cukru a tuku, sníženou fyzickou aktivitu, hektický životní styl a nepravidelný či nedostatečný spánek⁸⁰. Obezita je spojena nejen s estetickými problémy, ale především s řadou závažných zdravotních komplikací. Je předpokladem mnoha poruch souhrnně označovaných jako metabolický syndrom (MetS), který zahrnuje mimo jiné zvýšenou glykémii, arteriální hypertenzi, dyslipidemii a inzulinovou rezistenci. Tyto syndromy společně představují riziko pro rozvoj T2DM a jeho komplikací, jako je i zvýšený výskyt chronických respiračních onemocnění, které se u pacientů s obezitou a T2DM vyskytují až dvakrát častěji⁸¹.

4.2 Vliv metabolického syndromu na rozvoj chronických respiračních onemocnění

T2DM je charakterizován chronickým zánětem doprovázeným zvýšenou hladinou prozánětlivých cytokinů, jako je tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) a C-reaktivní protein (CRP). Chronický zánět přispívá k zánětu dýchacích cest a rozvoji oxidačního stresu v plicích, což podporuje vznik chronických respiračních onemocnění mimo jiné aktivací profibrotických signálních drah a podporou hromadění proteinů ECM⁸². T2DM může vést k mechanickým změnám v dýchacím systému, včetně sníženého objemu plic, zhoršené funkce bránice a zvýšeného odporu dýchacích cest, což může jedince předurčovat ke stavům jako je obstrukční spánková apnoe a obezitní hypoventilační syndrom. T2DM je také spojen s mikrovaskulárními komplikacemi, které mohou postihnout plicní cévy a vést k rozvoji hypoxie, plicní hypertenze a zvýšenému riziku plicní embolie či fibrózy. V neposlední řadě je T2DM spojen s poruchou funkce imunitních buněk jako jsou neutrofilů, makrofágů a T-lymfocytů, což vede ke zvýšené náchylnosti k respiračním infekcím, včetně bakteriální pneumonie, virových respiračních infekcí (jako je chřipka a COVID-19) a plísňových infekcí (jako např. invazivní plicní aspergilóza).

Metabolická nerovnováha u pacientů s obezitou a T2DM vede k akumulaci senescentních buněk v organismu, které přispívají k mnoha aspektům patofyziologie T2DM, což má za následek progresi onemocnění, vznik komplikací spojených s diabetem a zhoršení prognózy pacienta. Zejména akumulace senescentních β -buněk ve slinivce vede k poruchám v produkci inzulinu, což má za následek vznik inzulinové rezistence a hyperglykémie⁸³. Dalším klíčovým místem je i vzhledem k velikosti této tkáně hromadění senescentních buněk v tukové

tkáni, což vede k narušení homeostáze tukové tkáně zvýšenou produkcí lipidů a přispívá k metabolické dysfunkci. Senescentní adipocyty a jimi přivolané buňky imunitního systému produkují prozánětlivé cytokiny a adipokiny, které mohou zhoršovat inzulinovou rezistenci a podporovat systémový zánět⁸⁴, který je příčinou vzniku IPF a COPD u pacientů s obezitou a T2DM.

4.3 Vliv chronických respiračních onemocnění na rozvoj metabolických onemocnění

Zatímco neexistují přímé důkazy o tom, že IPF může přímo vyvolat metabolické poruchy, u pacientů s diagnostikovaným COPD byla detekována vysoká pravděpodobnost rozvoje metabolických onemocnění. Studie ukazují, že až 47% pacientů s pokročilou COPD trpí metabolickým syndromem, který může mít fatální dopad na již oslabený organismus⁸¹. Mezi nejčastější metabolická onemocnění, která COPD doprovázejí, patří T2DM, obezita, dyslipidémie (poruchy metabolismu lipidů), hypertenze (vysoký krevní tlak), hyperglykémie (zvýšená hladina glukózy v krvi) a zvýšené riziko kardiovaskulárních onemocnění⁸⁵. Vznik MetS souvisí s tím, že pacienti s rozvinutým COPD mají zánět v plicích, který může vést až k rozvoji systémového zánětu, který je spojen se vznikem inzulinové rezistence a s ovlivněním metabolismu glukózy. Ten může být ovlivněn také kortikosteroidy, které jsou pacientům často předepisovány. Dušnost, snížená chuť k jídlu, potíže s příjmem potravy nebo zvýšený energetický výdej v důsledku namáhavého dýchání u pacientů s COPD mohou vést k úbytku hmotnosti nebo podvýživě, následkem čeho dochází k ovlivnění metabolismu glukózy a zvyšuje se riziko vzniku T2DM^{86,87}.

Kromě specifických charakteristik pacientů s COPD a MetS existuje úzká spojitost mezi těmito dvěma stavy, která může vést ke zhoršení celkového stavu pacienta. Společné rizikové faktory pro COPD a MetS zahrnují kromě genetické predispozice zejména nedostatek fyzické aktivity, nezdravou stravu a hromadění buněčné senescence. Tyto faktory se vzájemně ovlivňují a přispívají k rozvoji obou onemocnění. Jak COPD, tak i MetS jsou spojeny s chronickým zánětem v organismu, který negativně ovlivňuje zdraví pacienta. U pacientů s COPD a MetS se zánětlivé procesy vzájemně posilují, čímž se zhoršuje prognóza pacienta a kvalita jeho života. Dalším příkladem vzájemného ovlivnění je, že obezita a inzulinová rezistence zhoršují plicní funkce a zvyšují riziko progresu onemocnění u pacientů s COPD. COPD pak následně omezuje fyzickou aktivitu a přispívá k rozvoji inzulinové rezistence. Proto jsou pacienti s COPD a MetS vystaveni výrazně většímu riziku úmrtí než ti, kteří trpí pouze COPD^{87,88}.

Z výše uvedených důvodů je nezbytná komplexní terapie, která zahrnuje léčbu plicních symptomů COPD, kontrolu metabolických faktorů a prevenci a léčbu přidružených komplikací, aby se zlepšila kvalita života a přežívání pacientů.

4.4 Vztah mezi metabolickým syndromem a rozvojem onemocnění COVID-19

Koronavirové onemocnění-2019 (COVID-19), způsobené vysoce patogenním virem SARS-CoV-2, představuje jednu z nejnáročnějších zdravotnických krizí v novodobé historii České republiky. Toto onemocnění vykazuje vysokou morbiditu a mortalitu způsobenou rozvojem těžkého akutního respiračního syndromu. Mnoho studií ukázalo, že jedinci s MetS mohou být vystaveni vyššímu riziku závažných následků COVID-19. Onemocnění jako zejména T2DM a obezita, které se vyskytuje až u 20% populace v České republice, významně korelovaly nejen se zvýšenou hladinou SARS-CoV-2 virových částic detekovaných u těchto pacientů, ale i s horším průběhem zahrnujícím hospitalizaci, nutnost plicní ventilace, připojení na mimotělní oběh a zvýšenou úmrtnost. Další studie porovnávající rozdíl mezi lehkým a těžkým průběhem onemocnění prokázaly přítomnost MetS jako jeden z hlavních rizikových faktorů těžkého průběhu onemocnění.

Infekce SARS-CoV-2 vede ke zvýšenému uvolňování prozánětlivých cytokinů a chemokinů, které hrají klíčovou roli při rozvoji plicní fibrózy, která podporuje zvýšenou virovou zátěž pro pacienta, ztrátu plicních funkcí, poškození plic a zvýšenou úmrtnost. Vzhledem k jejich zvýšenému hromadění, pozorovaném u pacientů s MetS, hrají senescentní buňky významnou roli v závažnosti průběhu COVID-19 u pacientů s obezitou a T2DM. Kromě jejich vlivu na zhoršenou funkci imunitních buněk, vytváření zánětu a snížení schopnosti regenerace tkání může mít výskyt senescentních buněk přímý dopad na rozvoj onemocnění COVID-19. Některé studie uvádějí, že senescentní buňky akumulující se ve viscerální tukové tkáni zvyšují expresi angiotenzin konvertujícího enzymu 2 (ACE2), který slouží jako receptor pro vstup viru SARS-CoV-2 do buňky, kde pak dochází k jeho množení a akumulaci. Zvětšená tuková tkáň u pacientů s MetS tak představuje rezervoár viru SARS-CoV-2, což výrazně přispívá ke zhoršené prognóze těchto pacientů^{89,90}.

5 Senolytika

5.1 Úvod do senolytik

Buněčná senescence je jedním z hlavních mechanismů vzniku a rozvoje závažných chronických onemocnění, včetně respiračních onemocnění, které zvyšují úmrtnost pacientů a náklady na zdravotní péči po celém světě. Předpokládá se tedy, že terapie zaměřená na tyto procesy oddálí, zabrání nebo zmírní chronická onemocnění a postižení související s věkem. K farmakologickému odstranění senescentních buněk se vyvíjejí takzvané senolytické či senomorfní látky, které selektivně eliminují senescentní buňky z tkáně (senolytika) či brání vzniku buněčné senescence (senomorfní látky)⁹¹.

Koncept senolytik byl poprvé navržen v roce 2004, kdy studie ukázala, že některé léčby zpomalují hromadění senescentních buněk⁹². To vedlo k hypotéze, že cílení na senescentní buňky může zmírnit různá onemocnění spojená se stárnutím. Senolytika fungují na principu aktivace programované buněčné smrti specificky v senescentních buňkách, což vede k jejich odstranění z těla. Většina v současnosti testovaných senolytických látek cílí na specifické dráhy, které chrání senescentní buňky před apoptózou. Jedním z hlavních mechanismů je ovlivnění anti-apoptické signální dráhy senescentních buněk a cílení na specifické enzymy zapojené do anti-apoptických mechanismů, mezi které patří p53, p21, BCL-2 proteiny, PI3K/Akt dráha, SIRT1 či FOXO4. Senomorfní látky pak zejména potlačují produkci SASP pomocí cílení na signalizační dráhy jako NF- κ B, mTOR, IL-1 α a p38 MAPK⁹³. Redukce senescence pomocí senolytických a senomorfních látek tak může zmírnit degenerativní procesy v těle a zlepšit zdravotní stav pacientů^{3,94}.

5.2 Testovaná senolytika

V současné době je preklinických studiích testováno mnoho senolytických látek, z nichž některé postoupily do různých fází klinického testování. Mezi nejnadějnější senolytika patří kombinace léčiv dasatinib a quercetin (D + Q). Dasatinib je inhibitor tyrozinové kinázy schválený ústavem pro kontrolu léčiv, který účinně potlačuje proliferaci a migraci buněk, aktivuje apoptózu a je používán v léčbě rakoviny. Quercetin je přírodní flavonoid s rozmanitými biologickými aktivitami. Tato kombinace byla identifikovaná jako první senolytikum, které podporuje apoptózu senescentních buněk cílením PI3K/AKT dráhy⁹¹. Tyto látky samy o sobě neprokázaly výrazný účinek, ale jejich kombinace vykazuje vysokou efektivitu při eliminaci senescentních buněk. D + Q kombinace účinně zabírá na různá

onemocnění spojená se stárnutím, mezi kterými je i IPF, kde byl prokázán pozitivní účinek D + Q na redukci plicní fibrózy a zlepšení respiračních funkcí³. V souvislosti s tímto onemocněním probíhá 1. fáze klinického testování (registrační číslo studie: NCT02874989)⁹⁵. Další studie ukazují příznivý efekt D+Q na redukci poškození ledvin, kde odstranění senescentních buněk vede ke zlepšení funkce tohoto orgánu⁹⁶. Využití této léčby u pacientů s chronickým poškozením ledvin v klinické praxi je momentálně testováno v rámci 2. fáze klinického testování (registrační číslo studie: NCT02848131)⁹⁷. Z dalších onemocnění spojených se stářím je D + Q preklinicky testován ve spojitosti s jaterní steatózou a osteoporózou.

Dalším přírodním flavonoidem příbuzným Q je fisetin, který má antioxidační vlastnosti a je proto studován pro svůj anti-senescentní potenciál. Fisetin se na rozdíl od D + Q běžně vyskytuje v nízkých koncentracích např. v ovoci a zelenině. V preklinickém výzkumu bylo prokázáno, že fisetin zmírňuje systematický zánět, SASP a snižuje senescentní markery u starých myší, čímž došlo k prodloužení jejich délky života⁹⁸. Další studie naznačují, že fisetin zmírňuje poškození podocytů vyvolané diabetickou nefropatií⁹⁹, a zvyšuje antioxidační obranyschopnost srdce diabetických zvířat¹⁰⁰. V souvislosti s tím momentálně probíhá 2. fáze klinického testování s cílem posoudit účinek eliminace senescentních buněk na zlepšení kardiovaskulárních funkcí (registrační číslo studie: NCT06133634)¹⁰¹.

Rapamycin, známý také jako Sirolimus, je lék s širokými farmakologickými účinky, včetně imunosuprese a protinádorových vlastností. V poslední době se však rapamycin intenzivně zkoumá pro své senolytické účinky. Bylo prokázáno, že rapamycin selektivně indukuje apoptózu u senescentních buněk inhibicí dráhy mTOR (mechanistický cíl rapamycinu), která je u senescentních buněk aktivována a hraje důležitou roli v jejich přežívání¹⁰².

Resveratrol je přírodní polyfenolová sloučenina, která se přirozeně vyskytuje například v červených hroznech, lesních plodech a arašidech. Díky svým protizánětlivým a antioxidačním účinkům u něj byl detekován senolytický efekt zejména díky inhibici dráhy AMPK/SIRT1 obdobně jako Metformin, a mTOR dráhy popsané u Rapamycinu, což vede ke zvýšené náchylnosti k buněčné smrti u senescentních buněk¹⁰³.

I když současná senolytika nabízí slibné možnosti, je nutný rozsáhlý výzkum k potvrzení jejich bezpečnosti a účinnosti, jelikož se jedná o relativně nový typ léčiv. Mezi nedostatky současných senolytik patří především omezená účinnost v různých typech senescentních buněk díky cílení konkrétních proteinů či drah, které nemusí být exprimovány/aktivovány u všech typů senescentních buněk.

5.3 Role mitochondrií v senescenci

Mitochondrie jsou zásadní součástí každé eukaryotické buňky účastníci se široké škály funkcí, mezi něž nepatří pouze produkce energie, ale také intracelulární signalizace, regulace buněčného metabolismu včetně metabolismu aminokyselin, cholesterolu, lipidů, steroidů a nukleotidů, hrají důležitou roli při regulaci buněčné proliferace a buněčné smrti a přispívají k zachování buněčné rovnováhy¹⁰⁴.

Mitochondriální respirace je řízena systémem oxidativní fosforylace (OXPHOS), který se nachází v mitochondriální vnitřní membráně (MIM) a skládá se z elektronového transportního řetězce (ETC) a mitochondriální ATP syntázy. ETC využívá elektrony dodané z cyklu trikarboxylových kyselin ve formě NADH a sukcinátu k redukci kyslíku v několikastupňovém procesu mitochondriálního dýchání, na němž se podílejí respirační komplexy I-IV (CI-IV). Během přenosu elektronů na kyslík vytvářejí tyto komplexy (s výjimkou CII) elektrostatický a protonový gradient přes MIM označovaný jako mitochondriální membránový potenciál ($\Delta\Psi_{m,i}$). $\Delta\Psi_{m,i}$ pohání ATP syntázu k výrobě ATP z ADP a anorganického fosfátu. To vyžaduje transport ATP/ADP a fosfátu přes MIM, který zajišťují adenosin nukleotid translokázy (ANT1-3 u savců) a fosfátový přenašeč. OXPHOS a ADP/ATP transportéry jsou tedy funkčně propojeny a narušení tohoto spojení může významně přispět k buněčné smrti¹⁰⁵.

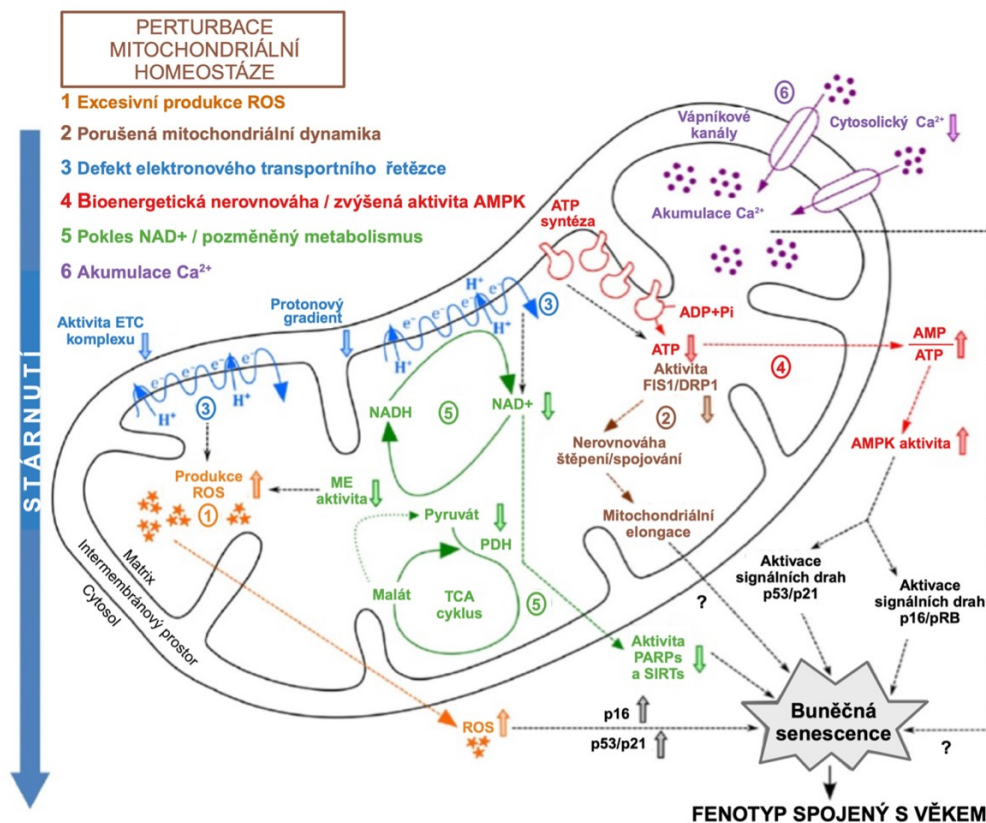
Mitochondrie jsou úzce spojeny s procesem stárnutí, kdy postupně dochází k poškození či oslabení funkcí mitochondrií¹⁰⁶. Vzniklé poruchy mohou ovlivnit energetický metabolismus buněk, vést k narušení produkce energie a energetické nerovnováze, což může vést ke vzniku buněčné senescence (Obrázek 3). V průběhu senescence se dramaticky mění i morfologicky¹⁰⁷. Dochází k transformaci mitochondriální sítě, která neustále prochází procesy štěpení a fúze, do stavu hyper-fúze v důsledku snížené exprese proteinů dynamin-příbuzný protein 1 (Drp1) a mitochondriální štěpný protein 1 (Fis1)¹⁰⁸. V senescentních buňkách se tak vyskytuje větší množství mitochondrií, které jsou však méně funkční. K jejich hromadění dochází také kvůli změnám v procesu mitofágie, která má u zdravých buněk za úkol odstranit poškozené a nefunkční mitochondrie^{109,110}. Hromadění nefunkčních mitochondrií má za následek zvýšení $\Delta\Psi_{m,i}$ u těchto mitochondrií a zvýšenou tvorbu ROS¹⁰⁷. Nadměrná produkce ROS může být také důsledkem poruchy elektronového transportního řetězce v mitochondriích, což vede k úniku elektronů a tvorbě superoxidových radikálů a přispívá k procesu stárnutí¹¹¹.

V senescentních buňkách se mění nejen proces mitofágie, ale také autofágie. Současný výzkum poukazuje na rozpor ohledně její role v procesu senescence. Některé práce naznačují,

že zvýšená aktivita autofágie přispívá k senescenci a je spojena s negativní zpětnou vazbou dráhy PI3K/mTOR, což může být klíčový krok při přechodu do senescence¹¹². Naopak další práce uvádí, že porucha procesu autofágie může být důvodem předčasné senescence, neboť v poškozených a neodstraněných mitochondriích vznikají ROS, což následně aktivuje dráhu p53^{113,114}. Bez ohledu na to, zda je aktivita autofágie nadměrná či nedostatečná, obě možnosti mají negativní dopad. Vyvážená a správně fungující autofágie je klíčem (jedním z mnoha) k udržení buněčného zdraví. S rostoucím věkem se zvyšuje hladina poškození mitochondriální DNA (mtDNA), což negativně ovlivňuje regulaci buněčných funkcí a může to přispět k věkem indukovaným onemocněním¹⁰⁷ či způsobit předčasné stárnutí¹¹⁵. Mitochondrie také ovlivňují proces stárnutí aktivací drah spojených s produkcí zánětlivých cytokinů.

Důležitou úlohu v regulaci buněčného cyklu a apoptózy hrají proteiny BCL-2 rodiny, které jsou lokalizovány v membránách mitochondrií, kde ovlivňují jejich funkci a permeabilitu. Porucha regulace BCL-2 proteinů může ovlivnit celkovou buněčnou homeostázu a reakci buněk na stresové podněty. V senescentních buňkách může docházet k poruše regulace exprese BCL-2, což ovlivňuje rovnováhu mezi buněčným přežitím a smrtí. Zvýšená produkce anti-apoptických BCL-2 proteinů může přispět k přežití senescentních buněk a jejich odolnosti vůči apoptóze.

Porozumění mechanismů, které stojí za poruchou funkce mitochondrií během senescence, může poskytnout důležité informace pro vývoj terapeutických strategií zaměřených na obnovu mitochondriální funkce a zpomalení procesu stárnutí¹⁰⁷.



Obrázek 3 – Procesy v mitochondriích podílející se na vzniku a udržení buněčné senescence. Převzato a upraveno z přehledového článku¹¹⁶. Upraveno pomocí BioRender.com

5.4 Mitochondriálně cílená senolytika

Mitochondriálně cílená senolytika jsou skupinou látek, které se specificky zaměřují na dysfunkční mitochondrie v senescentních buňkách a vedou k jejich selektivní eliminaci. Cílem těchto látek je využít jedinečných vlastností mitochondrií senescentních buněk k vyvolání buněčné smrti a zároveň nepoškodit buňky normální. Existuje několik přístupů, jak specificky cílit mitochondrie senescentních buněk.

Jedním přístupem je narušení mitochondriálního transmembránového potenciálu, který je se u senescentních buněk snižuje na -150 až -180mV v porovnání s normální buňkou, kde se hodnoty pohybují mezi -100 až -120mV. Tento snížený potenciál lze využít k specifickému cílení na mitochondrie senescentních buněk pomocí pozitivně nabitých molekul, které jsou přitahovány k mitochondriím elektrostatickou silou. Tyto molekuly následně narušují protonový gradient přes vnitřní mitochondriální membránu, což vede k odpojení OXPHOS od syntézy ATP. To má za následek zvýšenou propustnost mitochondriální membrány a uvolnění proapoptotických faktorů, což v konečném důsledku vede k buněčné smrti¹¹⁷. Většina

v současné době dostupných „rozpřahovačů“ protonového gradientu je však toxická pro organismus.

Dále lze využít specifického fosfolipidového složení vnitřní membrány mitochondrie pomocí látek, které s nimi interagují, jako je například kardiolipin, vykazují však nízkou selektivitu *in vivo*. Další možností je cílit na transport látek do mitochondrií. Potencionální využití těchto drah pro import látek do mitochondrie, které by vyléčily poškozené mitochondrie přímým ovlivněním mtDNA¹¹⁸, má však mnoho praktických nedostatků a dosud tento způsob nebyl využit v mechanismu žádného léku. Další cesta je využití lipofilních kationtů, což jsou antioxidanty, které mají schopnost proniknout do mitochondrií díky svému náboji a lipofilní povaze, čímž chrání mitochondrie před oxidativním stresem a zlepšují jejich funkci. Každá z těchto metod má však své omezení a specifické podmínky účinnosti^{119,120}.

5.4.1 Senolytické látky cílené na proteiny rodiny BCL-2

BCL-2 cílená senolytika jsou léčiva zaměřená na anti-apoptotické členy rodiny BCL-2 proteinů, jako jsou BCL-2, BCL-XL a BCL-W, které se přirozeně vyskytují ve vyšších hladinách u senescentních buněk. Tyto proteiny jsou klíčovými regulátory buněčného přežití a poskytují senescentním buňkám odolnost vůči apoptóze. Látky z této skupiny senolytik fungují tím způsobem, že blokují anti-apoptické funkce členů rodiny BCL-2. Vazbou na specifické místo zmíněných BCL-2 proteinů naruší inhibitory jejich schopnost blokovat vytvoření BAX/BAK permeabilizačního kanálu na vnější mitochondriální membráně, což vede k uvolnění pro-apoptotických faktorů z mitochondrie, aktivaci apoptotických drah v senescentních buňkách a jejich následné eliminaci⁸.

BCL-2 cílená senolytika se stále nacházejí ve fázi vývoje a testování. Většina z těchto látek je testována v rámci preklinického výzkumu, nicméně některé z nich již podstupují testování v klinických studiích. Nejnadějnější výsledky v rámci klinického testování zatím prokazuje Navitoclax známý také jako ABT-263. Navitoclax se váže na žlábek BH3 v rámci BCL-2 proteinů a naruší jejich interakci s proteiny BAX a BAK, což spouští apoptózu senescentních buněk. V preklinickém testování prokázal Navitoclax schopnost selektivně aktivovat apoptózu v senescentních buňkách¹²¹. V klinických studiích pak byl testován jako senolytická látka u různých onemocnění souvisejících s věkem, včetně chronického onemocnění ledvin, osteoartrity a idiopatické plicní fibrózy. Cílem těchto studií bylo posoudit bezpečnost, snášenlivost a účinnost přípravku Navitoclax při redukcí senescentních buněk a zlepšování prognózy onemocnění. Ačkoli Navitoclax v preklinických studiích vykazoval slibné výsledky, jeho klinický vývoj jako senolytika se potýkal s problémy kvůli úzkému

terapeutickému oknu a vedlejšími účinkům souvisejícím s jeho inhibicí BCL-XL, která je nezbytná pro přežití krevních destiček. Trombocytopenie (nízký počet krevních destiček) je běžnou toxicitou limitující dávku spojenou s přípravkem Navitoclax. Aby se zmírnily vedlejší účinky přípravku Navitoclax a zlepšil jeho terapeutický potenciál jako senolytické látky, zkoumají vědci možnosti modifikace této látky. Cílem je zvýšit senolytickou aktivitu přípravku Navitoclax a zároveň minimalizovat nežádoucí účinky¹²².

Kromě nežádoucích efektů na hematopoetické buňky se obecně BCL-2 inhibitory potýkají s problémem, že u některých typů senescence, zejména pak u sekundární senescence, nejsou proteiny z této rodiny zvýšené, což v konečném důsledku snižuje účinnost těchto látek jako senolytik.

5.4.2 Metformin

Metformin je schváleným a v současnosti jedním z nejpoužívanějších léků pro léčbu T2DM. Kromě hypoglykemického účinku zprostředkovaného inhibicí absorpce glukózy, zvýšením periferní citlivosti na inzulin a snížením syntézy glukózy má metformin příznivý vliv na metabolické a buněčné procesy úzce spojené s rozvojem stavů souvisejících s věkem, jako je zánět a buněčná senescence¹²³.

Jeden z popsáných mechanismů účinku metforminu na eliminaci senescentních buněk zahrnuje inhibici CI, klíčového enzymového komplexu, který se podílí na buněčném dýchání a produkci ATP. Bylo prokázáno, že metformin inhibuje aktivitu CI v různých typech buněk a tkání. Inhibicí CI metformin narušuje tok elektronů přes ETC, což vede ke změnám v buněčném metabolismu a ke snížení produkce ATP prostřednictvím OXPHOS. Toto snížení hladiny ATP vyvolává aktivaci AMPK, která následně aktivuje buněčnou smrt u senescentních buněk¹²⁴. Inhibice CI a následná aktivace AMPK také zvyšuje produkci NAD⁺, kofaktoru nezbytného pro aktivitu SIRT1. SIRT1 reguluje expresi p53 a p21^{cip1/waf1}, dvou klíčových proteinů při vzniku senescence. Bylo prokázáno, že aktivace SIRT1 zlepšuje funkci mitochondrií a chrání před nemocemi souvisejícími s věkem, jako jsou kardiovaskulární onemocnění, neurodegenerativní poruchy a rakovina¹²⁵. Cílem klinické studie TAME (Targeting Aging with Metformin; registrační číslo studie: NCT02432287) která byla zahájena v roce 2018, je prokázat, že metformin cíleně ovlivňuje stárnutí člověka a současně brání rozvoji komplikací souvisejících se stárnutím. Další z cílů studie pak zahrnuje měření fyzických a kognitivních funkcí a kvality života jedinců¹²⁶.

I když Metformin vykazuje účinky v redukci buněčné senescence, nebyl původně navržen jako senolytická látka a jeho senolytické účinky mohou být méně specifické

ve srovnání se sloučeninami speciálně určenými k působení na senescentní buňky. Není také stále stanovena optimální dávka a délka léčby pro dosažení senolytického účinku. Stanovení správné rovnováhy mezi účinností a bezpečností je zásadní, protože metformin může mít ve vyšších dávkách negativní vliv na gastrointestinální trakt a ve vzácných případech může způsobit laktátovou acidózu¹²⁷. V neposlední řadě zde hraje opět roli heterogenita senescentních buněk. Podobně, jako BCL-2 inhibitory, nemusí metformin zabírat na všechny typy senescentních buněk.

5.4.3 MitoTam

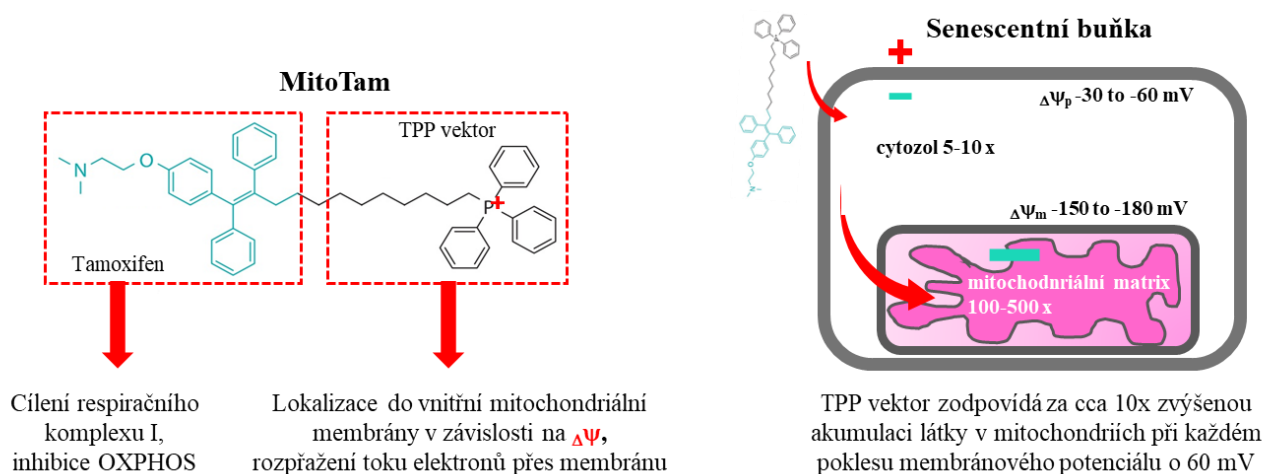
Mitochondriálně cílený Tamoxifen (MitoTam) byl původně vyvinut jako potenciální protinádorové léčivo pro léčbu trojitě-negativní rakoviny prsu (TNBC). Hlavní myšlenkou bylo využít schopnosti Tamoxifenu, standardně využívaného k léčbě rakoviny prsu, částečně inhibovat mitochondriální CI a zacílit ho přímo do mitochondrie pomocí trifenylyfosfoniového vektoru (TPP), což by zvýšilo a zacílilo jeho efekt na inhibici CI a OXPHOS a snížilo růst TNBC nádorů, které vykazují vysokou rezistenci na většinu současné dostupné léčby¹²⁸. Experimenty však ukázaly, že navázání TPP na Tamoxifen vede ke změně mechanismu, který je na rozdíl od působení samotného Tamoxifenu nezávislý na estrogenovém receptoru. Spíše než inhibice CI hraje u MitoTamu důležitou roli depolarizace mitochondriální membrány, což vede k elektrochemické nerovnováze a snížení integrity mitochondrií a vyvolává buněčnou smrt¹²⁹. Tento nový mechanismus podobný „rozpřahovačům“ protonového gradientu, rozšířil efekt MitoTamu nejen na všechny typy nádorů prsu bez ohledu na genetické pozadí, ale také na různé typy nádorů bez ohledu na původ jejich vzniku (Štemberková Hubáčková, S. a Neužil, J., nepublikovaná data). Tohoto efektu bylo dosaženo díky schopnosti MitoTamu specificky cílit mitochondrie nádorových buněk, které všechny bez ohledu na svůj původ snižují mitochondriální potenciál podobně, jako senescentní buňky (Obrázek 4).

Během preklinického i klinického testování bylo zjištěno, že MitoTam vykazuje velmi dobré výsledky mimo jiné i proto, že na rozdíl od jiných chemoterapeutických látek nevyvolává v nádorech buněčnou senescenci, která je často příčinou obnovení růstu nádorů a metastáz. Další výzkum pak prokázal, že MitoTam nejen že nevyvolává buněčnou senescenci, ale aktivně ji také redukuje¹³⁰. Při redukci buněčné senescence MitoTam využívá stejných principů cílení, jako u buněk nádorových.

K prokázání efektu MitoTamu na redukci onemocnění spojených s akumulací senescentních buněk byl použit zvířecí model obezity a prediabetu. MitoTam nejenže redukoval obezitu, ale také upravil hladinu glykémie na lačno, zlepšil vstřebávání glukózy z krve a snížil

hyperinzulinémií. Účinek MitoTamu na snížení hladiny glukózy byl také spojen se zlepšením profilu hormonů souvisejících s T2DM a byl doprovázen snížením hromadění lipidů v játrech, které je příčinou vzniku nealkoholického ztlustění jater a jaterní steatózy. Redukce senescence vedla také k nižší hladině cirkulujících zánětlivých mediátorů, které posilují MetS¹³¹. Snížená přítomnost senescentních buněk v ledvinách navíc snížila fibrózu ledvin, což je častá komplikace T2DM, která vede až k selhání ledvin a rapidně zhoršuje prognózu pacienta s T2DM. Ve srovnání s finerenonem, zavedenou antifibrotickou léčbou snižující selhání ledvin, MitoTam díky redukci buněčné senescence nejen zabraňuje expresi fibrotických proteinů, ale také eliminuje již vzniklé fibrotické buňky (Štemberková Hubáčková, S. a kol., nepublikovaná data).

Tyto výsledky společně s vysokou biodistribucí látky MitoTam v plicích (data získaná v rámci preklinických studií na potkanech a prasatech¹²⁹) tak naznačují veliký potenciál MitoTamu při léčbě chronických respiračních onemocnění včetně těch, která jsou doprovázena MetS. Dvojitý senolytický/onkolytický efekt MitoTamu také naznačuje potenciál prevence vzniku či růstu nádorů plic, které se ve zvýšené míře vyskytují u pacientů s respiračními onemocněními. V roce 2022 prošel MitoTam úspěšně 1. fází klinického testování u pacientů s metastazujícími solidními nádory (EudraCT 2017-004441-25), kdy byl u těchto pacientů zjištěny jen minimální vedlejší negativní efekty¹³². MitoTam má proto dobré předpoklady podstoupit klinické testování také pro neonkologická onemocnění. Velkou překážkou je však jeho podávání přes centrální katetr. V současné době proto probíhá intenzivní výzkum ústního podávání této látky.



Obrázek 4 – Struktura MitoTamu a jeho vliv na mitochondrie. Převzato z posteru, jenž vznikl za účelem prezentování výsledků v rámci CarDia OffMeeting 2024 v laboratoři prof. MUDr. Martinovi Haluzíkovi, DrSc.

5.4.4 Budoucnost mitochondriálně cílených senolytických látek

Tamoxifen je znám především jako lék používaný při léčbě rakoviny prsu. Některé studie naznačují, že tamoxifen může mít potenciální přínos i v léčbě plicních onemocnění, zejména těch, která zahrnují akumulaci fibrotické tkáně. S užíváním tamoxifenu jsou nicméně spojeny také negativní vedlejší efekty včetně negativního efektu na plicní tkáň. Jedním z nejzávažnějších možných nežádoucích účinků tamoxifenu je zvýšené riziko vzniku krevních sraženin, včetně plicní embolie, ke které dochází, když se krevní sraženina dostane do plic a zablokuje průtok krve¹³⁴. Toto riziko je zvýšené zejména u osob s již existujícími rizikovými faktory vzniku krevních sraženin, jako je například hluboká žilní trombóza nebo plicní embolie v anamnéze. Ve vzácných případech může tamoxifen způsobit intersticiální pneumonitidu, typ zánětu plic, který se projevuje dušností, kašlem a horečkou. Tato plicní toxicita je obvykle reverzibilní po vysazení tamoxifenu, ale v některých případech může vést k závažným komplikacím¹³⁵.

I když navázání TPP kotvy na tamoxifen prokazatelně změnilo mechanismus účinku výsledné látky MitoTam a v průběhu klinických testů nebyl zaznamenán žádný případ jeho negativního dopadu na respiraci či poškození plicní či jiné tkáně¹³², při použití vyšších dávek této látky v rámci testování maximální tolerované dávky při léčbě nádorů *in vivo* byl zaznamenán výskyt krevních sraženin v plicích (Štemberková Hubáčková, nepublikované výsledky). Vzhledem k nově odhalenému účinku látky MitoTam, kde hraje stěžejní roli narušení integrity mitochondrií u senescentních buněk, představují molekuly specificky cílící na integritu mitochondrií nové nadějně přístupy k eliminaci senescentních buněk a léčbě patologií spojených s jejich akumulací.

Alkyltrifenylfosfoniové (ATPP) soli, použité v modifikované formě u MitoTamu jako TPP kotva cílící Tamoxifen do mitochondrií, se díky svým jedinečným chemickým vlastnostem využívají v celé řadě vědeckých a průmyslových oblastí. V oblasti biochemie a buněčné biologie se tyto sloučeniny vyznačují schopností selektivně pronikat mitochondriálními membránami, což je dáno přirozeným negativním membránovým potenciálem mitochondrií¹³⁶. Jejich vlastností se dlouhodobě využívá v oblasti farmaceutických výrobků, kde slouží jako katalyzátory fázového přenosu, které zvyšují účinnost reakcí při organické syntéze, či v oblasti materiálových věd, kde přispívají k vývoji nových polymerů a povlaků s výraznými elektrickými a optickými vlastnostmi¹³⁷. ATPP jsou také zavedené jako mitochondriální cílový vektor spojený s farmaceuticky účinnou sloučeninou. Například látka MitoQ, obsahující antioxidant chinon kovalentně navázaný na ATPP, je v současné době celosvětově užívaný

potravinový doplněk¹³⁸. Nedávne publikace také naznačují terapeutický potenciál ATPP při léčbě rakoviny¹³⁹. Navzdory známé schopnosti ATPP cílit na mitochondrie byl jejich terapeutický potenciál v kontextu senolytických účinků prozkoumán minimálně. Stávající literatura nabízí vhled do biochemických a buněčných účinků těchto sloučenin, ale chybí komplexní zkoumání jejich účinnosti na senescentní buňky či v kontextu patologických stavů spojených se senescencí. Modifikované ATPP tak představují do budoucna nové potenciální senolytické látky využitelné v léčbě nejen respiračních a metabolických poruch.

6 Závěr

Z předložené práce vyplývá, že výskyt chronických respiračních onemocnění celosvětově neustále roste především kvůli stárnutí populace a nedostatku účinných opatření ke snížení rizikových faktorů spojených s rozvojem/progresí těchto onemocnění. Navzdory rozsáhlému výzkumu, který v posledních letech přinesl mnoho nových poznatků o patogenezi těchto onemocnění, v současnosti stále chybí účinné léčebné postupy, které by bylo možné potenciálně využít k léčbě a/nebo prevenci těchto onemocnění, což kromě negativního dopadu pro pacienta zvyšuje také zdravotní a ekonomickou zátěž pro společnost. Současná léčba pacientů s chronickým poškozením plic zahrnuje spíše paliativní léčbu s cílem zmírnit obtíže a oddálit selhání plic.

I když zatím neexistuje přímá léčba zaměřená na příčinu těchto onemocnění, existuje nová potenciální strategie, která se zaměřuje na selektivní eliminaci senescentních buněk jakožto jednu z hlavních příčin poškození plic a vzniku chronických respiračních onemocnění. Senolytika byla objevena na začátku 21. století a od té doby se pracuje na zdokonalení jejich účinnosti. Senolytika cílí na mechanismy, které brání senescentní buňky před buněčnou smrtí. Většina z nich se nicméně i přes slibné výsledky v klinickém testování potýká s heterogenitou senescentních buněk, která má za následek nedostatečnou efektivitu současných senolytik. Jelikož mají mitochondrie zásadní vliv na vznik a přežití senescentních buněk bez ohledu na jejich původ či genetické pozadí, mitochondriálně cílená senolytika, která jsou v současnosti testována a některá z nich vykazují nadějně výsledky na eliminaci senescentních buněk, tvoří velký potenciál v léčbě onemocnění spojených se stárnutím a představují výzvu, před níž stojí výzkum budoucí účinné terapie nejen chronických respiračních onemocnění.

Nicméně i u těchto látek byly zjištěny určité limity a je zde tedy poptávka po specifitějších látkách. Jako nadějně se zdají být ATPP látky cílicí integritu mitochondrií, jejichž *in vitro* i *in vivo* účinnost byla prokázána na řadě modelů, ale jejich terapeutický potenciál v kontextu senolytických účinků byl prozkoumán minimálně. V naší laboratoři bylo vyvinuto a nasyntetizováno několik takových molekul, které vychází z ATPP struktur. Úpravy těchto molekul vycházely z předchozích zkušeností s látkou MitoTam, kde byl zmapován účinek nejen v rámci senescentní buňky, ale díky klinické studii na pacientech se solidním nádorem také jeho účinek na organismus. Náš budoucí výzkum bude proto zaměřen nejen na testování senolytických účinků těchto nových látek, ale zejména na jejich využití v léčbě onemocnění spojených s buněčnou senescencí, včetně chronických respiračních onemocnění.

7 Seznam použité literatury

(* přehledové články)

- 1.* Ferkol, T. & Schraufnagel, D. The global burden of respiratory disease. *Annals of the American Thoracic Society* vol. 11 404–406 Preprint at <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201311-405PS> (2014).
- 2.* Barnes, P. J. Senescence in COPD and Its Comorbidities. *Annual Review of Physiology* vol. 79 517–539 Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034314> (2017).
- 3.* Wissler Gerdes, E. O., Zhu, Y., Tchkonja, T. & Kirkland, J. L. Discovery, development, and future application of senolytics: theories and predictions. *FEBS J* **287**, 2418–2427 (2020).
4. Hayflick, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **37**, 614–636 (1965).
5. Hayflick, L. HUMAN CELLS AND AGING. *Sci Am* **218**, 32–37 (1968).
6. Noren Hooten, N. & Evans, M. K. Techniques to induce and quantify cellular senescence. *Journal of Visualized Experiments* **2017**, (2017).
- 7.* Salama, R., Sadaie, M., Hoare, M. & Narita, M. Cellular senescence and its effector programs. *Genes and Development* vol. 28 99–114 Preprint at <https://doi.org/10.1101/gad.235184.113> (2014).
8. Yosef, R., Pilpel, N., Tokarsky-Amiel, R., Biran, A., Ovadya, Y. *et al.* Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat Commun* **7**, (2016).
- 9.* Rodier, F. & Campisi, J. Four faces of cellular senescence. *Journal of Cell Biology* vol. 192 547–556 Preprint at <https://doi.org/10.1083/jcb.201009094> (2011).
10. Sage, J., Miller, A. L., Pérez-Mancera, P. A., Wysocki, J. M. & Jacks, T. Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. *Nature* **424**, 223–228 (2003).
11. Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y. & Erusalimsky, J. D. Senescence-associated β -galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci* **113**, 3613–3622 (2000).
12. Ivanov, A., Pawlikowski, J., Manoharan, I., van Tuyn, J., Nelson, D. M. *et al.* Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence. *Journal of Cell Biology* **202**, 129–143 (2013).
- 13.* Davalos, A. R., Coppe, J.-P., Campisi, J. & Desprez, P.-Y. Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer and Metastasis Reviews* **29**, 273–283 (2010).
14. Soriani, A., Zingoni, A., Cerboni, C., Iannitto, M. L., Ricciardi, M. R. *et al.* ATM-ATR-dependent up-regulation of DNAM-1 and NKG2D ligands on multiple myeloma cells by therapeutic agents results in enhanced NK-cell susceptibility and is associated with a senescent phenotype. *Blood* **113**, 3503–3511 (2009).

15. Rodier, F., Muñoz, D. P., Teachenor, R., Chu, V., Le, O. *et al.* DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J Cell Sci* **124**, 68–81 (2011).
16. Kosar, M., Bartkova, J., Hubackova, S., Hodny, Z., Lukas, J. & Bartek, J. Senescence-associated heterochromatin foci are dispensable for cellular senescence, occur in a cell type- and insult-dependent manner and follow expression of p16^{ink4a}. *Cell Cycle* **10**, 457–468 (2011).
17. En, A., Takauji, Y., Ayusawa, D. & Fujii, M. The role of lamin B receptor in the regulation of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Exp Cell Res* **390**, 111927 (2020).
18. Hemann, M. T., Strong, M. A., Hao, L.-Y. & Greider, C. W. The Shortest Telomere, Not Average Telomere Length, Is Critical for Cell Viability and Chromosome Stability. *Cell* **107**, 67–77 (2001).
19. Fumagalli, M., Rossiello, F., Clerici, M., Barozzi, S., Cittaro, D. *et al.* Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nat Cell Biol* **14**, 355–365 (2012).
- 20.* Sherr, C. J. & DePinho, R. A. Cellular Senescence. *Cell* **102**, 407–410 (2000).
21. Galbiati, A., Beauséjour, C. & d’Adda di Fagagna, F. A novel single-cell method provides direct evidence of persistent DNA damage in senescent cells and aged mammalian tissues. *Aging Cell* **16**, 422–427 (2017).
22. Sachs, R. K., Chen, P.-L., Hahnfeldt, P. J. & Hlatky, L. R. DNA damage caused by ionizing radiation. *Math Biosci* **112**, 271–303 (1992).
23. Tavana, O., Benjamin, C. L., Puebla-Osorio, N., Sang, M., Ullrich, S. E. *et al.* Absence of p53-dependent apoptosis leads to UV radiation hypersensitivity, enhanced immunosuppression and cellular senescence. *Cell Cycle* **9**, 3348–3356 (2010).
24. Chen, Q., Fischer, A., Reagan, J. D., Yan, L. J. & Ames, B. N. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**, 4337–4341 (1995).
25. Xiao, H., Li, T.-K., Yang, J.-M. & Liu, L. F. Acidic pH induces topoisomerase II-mediated DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 5205–5210 (2003).
26. Paul, C., Murray, A. A., Spears, N. & Saunders, P. T. K. A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. *REPRODUCTION* **136**, 73–84 (2008).
27. Hyun-Seok, K., Eui-ju, Y., Seong-Hoon, P., Joo-In, P., Sang-Chul, P. *et al.* p21WAF/CIP1/SDI1 is upregulated due to increased mRNA stability during hydroxyurea-induced senescence of human fibroblasts. *Mech Ageing Dev* **126**, 1255–1261 (2005).
28. Patro, B. S., Fröhlich, R., Bohr, V. A. & Stevnsner, T. WRN helicase regulates the ATR–CHK1-induced S-phase checkpoint pathway in response to topoisomerase-I–DNA covalent complexes. *J Cell Sci* **124**, 3967–3979 (2011).

29. Quinlan, C. L., Perevoshchikova, I. V., Hey-Mogensen, M., Orr, A. L. & Brand, M. D. Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox Biol* **1**, 304–312 (2013).
30. Macip, S. Inhibition of p21-mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence. *EMBO J* **21**, 2180–2188 (2002).
31. 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 p16INK4a. *Cell* **88**, 593–602 (1997).
32. Astle, M. V., Hannan, K. M., Ng, P. Y., Lee, R. S., George, A. J. *et al.* AKT induces senescence in human cells via mTORC1 and p53 in the absence of DNA damage: implications for targeting mTOR during malignancy. *Oncogene* **31**, 1949–1962 (2012).
33. Michaloglou, C., Vredeveld, L. C. W., Soengas, M. S., Denoyelle, C., Kuilman, T. *et al.* BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **436**, 720–724 (2005).
34. Guerra, C., Mijimolle, N., Dhawahir, A., Dubus, P., Barradas, M. *et al.* Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell* **4**, 111–120 (2003).
35. Lin, A. W., Barradas, M., Stone, J. C., van Aelst, L., Serrano, M. *et al.* Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev* **12**, 3008–3019 (1998).
36. Acosta, J. C., O’Loghlen, A., Banito, A., Guijarro, M. V., Augert, A. *et al.* Chemokine Signaling via the CXCR2 Receptor Reinforces Senescence. *Cell* **133**, 1006–1018 (2008).
37. Acosta, J. C., Banito, A., Wuestefeld, T., Georgilis, A., Janich, P. *et al.* A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol* **15**, 978–990 (2013).
- 38.* Van Deursen, J. M. The role of senescent cells in ageing. *Nature* vol. 509 439–446 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nature13193> (2014).
39. Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S. A., Rodier, F., Toussaint, W. *et al.* An Essential Role for Senescent Cells in Optimal Wound Healing through Secretion of PDGF-AA. *Dev Cell* **31**, 722–733 (2014).
- 40.* Wang, J., Geiger, H. & Rudolph, K. L. Immunoaging induced by hematopoietic stem cell aging. *Curr Opin Immunol* **23**, 532–536 (2011).
41. Storer, M., Mas, A., Robert-Moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, M. C. *et al.* Senescence Is a Developmental Mechanism that Contributes to Embryonic Growth and Patterning. *Cell* **155**, 1119–1130 (2013).

42. Muñoz-Espín, D., Cañamero, M., Maraver, A., Gómez-López, G., Contreras, J. *et al.* Programmed Cell Senescence during Mammalian Embryonic Development. *Cell* **155**, 1104–1118 (2013).
43. Rajagopalan, S. & Long, E. O. Cellular senescence induced by CD158d reprograms natural killer cells to promote vascular remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 20596–20601 (2012).
44. Fu, B., Li, X., Sun, R., Tong, X., Ling, B. *et al.* Natural killer cells promote immune tolerance by regulating inflammatory T_H 17 cells at the human maternal–fetal interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, (2013).
45. Chuprin, A., Gal, H., Biron-Shental, T., Biran, A., Amiel, A. *et al.* Cell fusion induced by ERVWE1 or measles virus causes cellular senescence. *Genes Dev* **27**, 2356–2366 (2013).
46. Gal, H., Lysenko, M., Stroganov, S., Vadai, E., Youssef, S. A. *et al.* Molecular pathways of senescence regulate placental structure and function. *EMBO J* **38**, (2019).
47. Besancenot, R., Chaligné, R., Tonetti, C., Pasquier, F., Marty, C. *et al.* A Senescence-Like Cell-Cycle Arrest Occurs During Megakaryocytic Maturation: Implications for Physiological and Pathological Megakaryocytic Proliferation. *PLoS Biol* **8**, e1000476 (2010).
- 48.* Sagiv, A. & Krizhanovsky, V. Immunosurveillance of senescent cells: the bright side of the senescence program. *Biogerontology* **14**, 617–628 (2013).
49. Hazeldine, J. & Lord, J. M. The impact of ageing on natural killer cell function and potential consequences for health in older adults. *Ageing Res Rev* **12**, 1069–1078 (2013).
50. Salam, R., Saliou, A., Bielle, F., Bertrand, M., Antoniewski, C. *et al.* Cellular senescence in malignant cells promotes tumor progression in mouse and patient Glioblastoma. *Nat Commun* **14**, 441 (2023).
51. Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P.-Y. & Campisi, J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 12072–12077 (2001).
52. Schafer, M. J., White, T. A., Iijima, K., Haak, A. J., Ligresti, G. *et al.* Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat Commun* **8**, 14532 (2017).
- 53.* Martínez-Cué, C. & Rueda, N. Cellular Senescence in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience* vol. 14 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00016> (2020).
- 54.* Hutchinson, J., Fogarty, A., Hubbard, R. & McKeever, T. Global incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review. *European Respiratory Journal* **46**, 795–806 (2015).
- 55.* Torres, A., Peetermans, W. E., Viegi, G. & Blasi, F. Risk factors for community-acquired pneumonia in adults in Europe: a literature review. *Thorax* **68**, 1057–1065 (2013).
- 56.* Meltzer, E. B. & Noble, P. W. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Orphanet J Rare Dis* **3**, 8 (2008).

- 57.* Ushakumary, M. G., Riccetti, M. & Perl, A. K. T. Resident interstitial lung fibroblasts and their role in alveolar stem cell niche development, homeostasis, injury, and regeneration. *Stem Cells Transl Med* **10**, 1021–1032 (2021).
58. Raghu, G., Collard, H. R., Egan, J. J., Martinez, F. J., Behr, J. *et al.* An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Statement: Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Evidence-based Guidelines for Diagnosis and Management. *Am J Respir Crit Care Med* **183**, 788–824 (2011).
59. Martinez, F. J., A de Andrade, J., Anstrom, K. J., King Jr, T. E., Raghu, G. Randomized Trial of Acetylcysteine in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *New England Journal of Medicine* **370**, 2093–2101 (2014).
60. Loveman, E., Copley, V. R., Scott, D. A., Colquitt, J. L., Clegg, A. J. *et al.* Comparing new treatments for idiopathic pulmonary fibrosis – a network meta-analysis. *BMC Pulm Med* **15**, 37 (2015).
61. Hagemeyer, L., Treml, M., Priegnitz, C. & Randerath, W. J. Successful Concomitant Therapy with Pirfenidone and Nintedanib in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Case Report. *Respiration* **91**, 327–332 (2016).
62. Wasnick, R., Korfei, M., Piskulak, K., Henneke, I., Wilhelm, J. *et al.* Notch1 Induces Defective Epithelial Surfactant Processing and Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **207**, 283–299 (2023).
- 63.* Selman, M., Pardo, A. & Kaminski, N. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Aberrant Recapitulation of Developmental Programs? *PLoS Med* **5**, e62 (2008).
64. Chilosi, M., Poletti, V., Zamò, A., Lestani, M., Montagna, L. *et al.* Aberrant Wnt/ β -Catenin Pathway Activation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Pathol* **162**, 1495–1502 (2003).
- 65.* Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A. & Campisi, J. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **5**, 99–118 (2010).
66. Marchal-Sommé, J., Uzunhan, Y., Marchand-Adam, S. Valeyre, D., Soumelis, V. *et al.* Cutting Edge: Nonproliferating Mature Immune Cells Form a Novel Type of Organized Lymphoid Structure in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *The Journal of Immunology* **176**, 5735–5739 (2006).
- 67.* Koo, H. J., Do, K.-H., Lee, J. B., Alblushi, S. & Lee, S. M. Lung Cancer in Combined Pulmonary Fibrosis and Emphysema: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* **11**, e0161437 (2016).
68. Takeuchi, S., Takahashi, A., Motoi, N., Yoshimoto, S., Tajima, T. *et al.* Intrinsic Cooperation between p16INK4a and p21Waf1/Cip1 in the Onset of Cellular Senescence and Tumor Suppression *In vivo*. *Cancer Res* **70**, 9381–9390 (2010).
- 69.* Agustí, A., Vogelmeier, C. & Faner, R. COPD 2020: changes and challenges. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **319**, L879–L883 (2020).

- 70.* Viegi, G., Pistelli, F., Sherrill, D. L., Maio, S., Baldacci, S. *et al.* Definition, epidemiology and natural history of COPD. *European Respiratory Journal* vol. 30 993–1013 Preprint at <https://doi.org/10.1183/09031936.00082507> (2007).
- 71.* Fabbri, L. M. & Rabe, K. F. From COPD to chronic systemic inflammatory syndrome? *The Lancet* **370**, 797–799 (2007).
- 72.* Agusti, À. & Soriano, J. B. COPD as a Systemic Disease. *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* **5**, 133–138 (2008).
73. Tashkin, D. P., Celli, B., Decramer, M., Liu, D., Burkhart, D. *et al.* Bronchodilator responsiveness in patients with COPD. *European Respiratory Journal* **31**, 742–750 (2008).
- 74.* Nouredine, H., Gary-Bobo, G., Alifano, M., Marcos, E., Saker, M. *et al.* Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Senescence Is a Pathogenic Mechanism for Pulmonary Hypertension in Chronic Lung Disease. *Circ Res* **109**, 543–553 (2011).
75. Kneidinger, N., Yildirim, A. Ö., Callegari, J., Takenaka, S., Stein, M. M. *et al.* Activation of the WNT/ β -Catenin Pathway Attenuates Experimental Emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* **183**, 723–733 (2011).
76. Rajendrasozhan, S., Yang, S.-R., Kinnula, V. L. & Rahman, I. SIRT1, an Antiinflammatory and Antiaging Protein, Is Decreased in Lungs of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* **177**, 861–870 (2008).
77. Houben, J. M. J., Mercken, E. M., Ketelslegers, H. B., Bast, A., Wouters, E. F. *et al.* Telomere shortening in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* **103**, 230–236 (2009).
78. Yao, H., Sundar, I. K., Ahmad, T., Lerner, C., Gerloff, J., *et al.* SIRT1 protects against cigarette smoke-induced lung oxidative stress via a FOXO3-dependent mechanism. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **306**, L816–L828 (2014).
- 79.* Rahman, I., Kinnula, V. L., Gorbunova, V. & Yao, H. SIRT1 as a therapeutic target in inflammaging of the pulmonary disease. *Prev Med (Baltim)* **54**, S20–S28 (2012).
80. WHO Technical Report Series OBESITY: PREVENTING AND MANAGING THE GLOBAL EPIDEMIC. (2000).
- 81.* Watz, H., Waschki, B., Kirsten, A., Müller, K.-C., Kretschmar, G. *et al.* The Metabolic Syndrome in Patients With Chronic Bronchitis and COPD. *Chest* **136**, 1039–1046 (2009).
82. Pradhan, A. D. C-Reactive Protein, Interleukin 6, and Risk of Developing Type 2 Diabetes Mellitus. *JAMA* **286**, 327 (2001).
83. Sone, H. & Kagawa, Y. Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice. *Diabetologia* **48**, 58–67 (2005).
84. Palmer, A. K., Xu, M., Zhu, Y., Pirtskhalava, T., Weivoda, M. M. *et al.* Targeting senescent cells alleviates obesity-induced metabolic dysfunction. *Aging Cell* **18**, (2019).

- 85.* Archer, J. R. H. & Baker, E. H. Diabetes and metabolic dysfunction in COPD. *Respiratory Medicine: COPD Update* vol. 5 67–74 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.rmedu.2009.10.001> (2009).
- 86.* Zafar, A., Davies, M., Azhar, A. & Khunti, K. Clinical inertia in management of T2DM. *Prim Care Diabetes* **4**, 203–207 (2010).
87. Mannino, D. M., Thorn, D., Swensen, A. & Holguin, F. Prevalence and outcomes of diabetes, hypertension and cardiovascular disease in COPD. *European Respiratory Journal* **32**, 962–969 (2008).
88. Díez-Manglano, J., Barquero-Romero, J., Almagro, P., Cabrera, F. J., López García, F. *et al.* COPD patients with and without metabolic syndrome: clinical and functional differences. *Intern Emerg Med* **9**, 419–425 (2014).
89. The Novel Coronavirus Pneumonia Emergency Response Epidemiology Team. *The Epidemiological Characteristics of an Outbreak of 2019 Novel Diseases (COVID-19)*. (2020).
90. Denson, J. L., Gillet, A. S., Zu, Y., Brown, M., Pham, T. *et al.* Metabolic Syndrome and Acute Respiratory Distress Syndrome in Hospitalized Patients With COVID-19. *JAMA Netw Open* **4**, e2140568 (2021).
- 91.* Zhu, Y., Tchkonja, T., Pirtskhalava, T., Gower, A. C., Ding, H. *et al.* The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell* **14**, 644–658 (2015).
92. Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M. R., Kovalev, G. I., Al-Regaiey, K. *et al.* Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *Journal of Clinical Investigation* **114**, 1299–1307 (2004).
- 93.* Zhang, L., Pitcher, L. E., Prahalad, V., Niedernhofer, L. J. & Robbins, P. D. Targeting cellular senescence with senotherapeutics: senolytics and senomorphics. *FEBS J* **290**, 1362–1383 (2023).
- 94.* Kirkland, J. L. & Tchkonja, T. Senolytic drugs: from discovery to translation. *J Intern Med* **288**, 518–536 (2020).
95. Justice, J. N., Nambiar, A. M., Tchkonja, T., LeBrasseur, N. K., Pascual, R. *et al.* Senolytics in idiopathic pulmonary fibrosis: Results from a first-in-human, open-label, pilot study. *EBioMedicine* **40**, 554–563 (2019).
96. Zhu, X., Zhang, C., Liu, L., Xu, L. & Yao, L. Senolytic combination of dasatinib and quercetin protects against diabetic kidney disease by activating autophagy to alleviate podocyte dedifferentiation via the Notch pathway. *Int J Mol Med* **53**, 26 (2024).
97. Hickson, L. J., Langhi Prata, L. G. P., Bobart, S. A., Evans, T. K., Giorgadze, N. *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* **47**, 446–456 (2019).
98. Yousefzadeh, M. J., Zhu, Y., McGowan, S. J., Angelini, L., Fuhrmann-Stroissnigg, H. *et al.* Fisetin is a senotherapeutic that extends health and lifespan. *EBioMedicine* **36**, 18–28 (2018).
99. Dong, W., Jia, C., Li, J., Zhou, Y., Luo, Y. *et al.* Fisetin Attenuates Diabetic Nephropathy-Induced Podocyte Injury by Inhibiting NLRP3 Inflammasome. *Front Pharmacol* **13**, (2022).

100. Althunibat, O. Y., Al Hroob, A. M., Abukhalil, M. H., Germoush, M. O., Bin-Jumah, M. *et al.* Fisetin ameliorates oxidative stress, inflammation and apoptosis in diabetic cardiomyopathy. *Life Sci* **221**, 83–92 (2019).
101. Matthew Rossman, U. of C. B. Fisetin to Improve Vascular Function in Older Adults. NCT06133634 (2023).
102. Harrison, D. E., Strong, R., Sharp, Z. D., Nelson, J. F., Astle, C. M. *et al.* Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* **460**, 392–395 (2009).
103. Park, S.-J., Ahmad, F., Philp, A., Baar, K., Williams, T. *et al.* Resveratrol Ameliorates Aging-Related Metabolic Phenotypes by Inhibiting cAMP Phosphodiesterases. *Cell* **148**, 421–433 (2012).
- 104.* Murphy, E., Ardehali, H., Balaban, R. S., DiLisa, F., Dorn, G. W. *et al.* Mitochondrial Function, Biology, and Role in Disease. *Circ Res* **118**, 1960–1991 (2016).
- 105.* Chaban, Y., Boekema, E. J. & Dudkina, N. V. Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1837**, 418–426 (2014).
- 106.* López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. The Hallmarks of Aging. *Cell* **153**, 1194–1217 (2013).
- 107.* Sun, N., Youle, R. J. & Finkel, T. The Mitochondrial Basis of Aging. *Mol Cell* **61**, 654–666 (2016).
108. Mai, S., Klinkenberg, M., Auburger, G., Bereiter-Hahn, J. & Jendrach, M. Decreased expression of Drp1 and Fis1 mediates mitochondrial elongation in senescent cells and enhances resistance to oxidative stress through PINK1. *J Cell Sci* **123**, 917–926 (2010).
109. Passos, J. F., Saretzki, G., Ahmed, S., Nelson, G., Richter, T. *et al.* Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. *PLoS Biol* **5**, 1138–1151 (2007).
110. Nelson, G., Kucheryavenko, O., Wordsworth, J. & von Zglinicki, T. The senescent bystander effect is caused by ROS-activated NF-κB signalling. *Mech Ageing Dev* **170**, 30–36 (2018).
- 111.* Korolchuk, V. I., Miwa, S., Carroll, B. & von Zglinicki, T. Mitochondria in Cell Senescence: Is Mitophagy the Weakest Link? *EBioMedicine* **21**, 7–13 (2017).
112. Young, A. R. J., Narita, M., Ferreira, M., Kirschner, K., Sadaie, M. *et al.* Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* **23**, 798–803 (2009).
113. Kang, H. T., Lee, K. B., Kim, S. Y., Choi, H. R. & Park, S. C. Autophagy Impairment Induces Premature Senescence in Primary Human Fibroblasts. *PLoS One* **6**, e23367 (2011).
114. García-Prat, L., Martínez-Vicente, M., Perdiguero, E., Ortet, L., Rodríguez-Ubreva, J. *et al.* Autophagy maintains stemness by preventing senescence. *Nature* **529**, 37–42 (2016).

115. Kujoth, G. C., Hiona, A., Pugh, T. D., Someya, S., Panzer, K. *et al.* Mitochondrial DNA Mutations, Oxidative Stress, and Apoptosis in Mammalian Aging. *Science (1979)* **309**, 481–484 (2005).
- 116.* Ziegler, D. V., Wiley, C. D. & Velarde, M. C. Mitochondrial effectors of cellular senescence: beyond the free radical theory of aging. *Aging Cell* **14**, 1–7 (2015).
- 117.* Adam-Vizi, V. & Chinopoulos, C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol Sci* **27**, 639–645 (2006).
118. Flierl, A., Jackson, C., Cottrell, B., Murdock, D., Seibel, P. & Wallace, D. C. Targeted delivery of DNA to the mitochondrial compartment via import sequence-conjugated peptide nucleic acid. *Molecular Therapy* **7**, 550–557 (2003).
119. Burns, R. J., Smith, R. A. J. & Murphy, M. P. Synthesis and Characterization of Thiobutyltriphenylphosphonium Bromide, a Novel Thiol Reagent Targeted to the Mitochondrial Matrix. *Arch Biochem Biophys* **322**, 60–68 (1995).
- 120.* Zinovkin, R. A. & Zamyatnin, A. A. Mitochondria-Targeted Drugs. *Curr Mol Pharmacol* **12**, 202–214 (2019).
121. Zhu, Y., Tchkonja, T., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Dai, H. M., Ling, Y. Y. *et al.* Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging Cell* **15**, 428–435 (2016).
122. González-Gualda, E., Páez-Ribes, M., Lozano-Torres, B., Macias, D., Wilson, J. R. *et al.* Galacto-conjugation of Navitoclax as an efficient strategy to increase senolytic specificity and reduce platelet toxicity. *Aging Cell* **19**, (2020).
123. Martin-Montalvo, A., Mercken, E. M., Mitchell, S. J., Palacios, H. H., Mote, P. L. *et al.* Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nat Commun* **4**, 2192 (2013).
124. Owen, M. R., Doran, E. & Halestrap, A. P. Evidence That Metformin Exerts Its Anti-Diabetic Effects through Inhibition of Complex I of the Mitochondrial Respiratory Chain. *Biochem. J* vol. 348 (2000).
125. Zheng, Z., Bian, Y., Zhang, Y., Ren, G. & Li, G. Metformin activates AMPK/SIRT1/NF- κ B pathway and induces mitochondrial dysfunction to drive caspase3/GSDME-mediated cancer cell pyroptosis. *Cell Cycle* **19**, 1089–1104 (2020).
126. Albert Einstein College of Medicine, N. Metformin in Longevity Study (MILES). (2021).
127. Raičević, B. & Janković, S. Predictors of gastrointestinal complaints in patients on metformin therapy. *Open Medicine* **18**, (2023).
128. Rohlenova, K., Sachaphibulkij, K., Stursa, J., Bezawork-Geleta, A., Blecha, J. *et al.* Selective Disruption of Respiratory Supercomplexes as a New Strategy to Suppress Her2^{high} Breast Cancer. *Antioxid Redox Signal* **26**, 84–103 (2017).

129. Stemberkova-Hubackova, S., Zobalova, R., Dubisova, M., Smigova, J., Dvorakova, S. *et al.* Simultaneous targeting of mitochondrial metabolism and immune checkpoints as a new strategy for renal cancer therapy. *Clin Transl Med* **12**, (2022).
130. Hubackova, S., Davidova, E., Rohlenova, K., Stursa, J., Werner, L. *et al.* Selective elimination of senescent cells by mitochondrial targeting is regulated by ANT2. *Cell Death Differ* **26**, 276–290 (2019).
131. Vacurova, E., Trnovska, J., Svoboda, P., Skop, V., Novosadova, V. *et al.* Mitochondrially targeted tamoxifen alleviates markers of obesity and type 2 diabetes mellitus in mice. *Nat Commun* **13**, 1866 (2022).
132. Bielicikova, Z., Stursa, J., Krizova, L., Dong, L., Spacek, J. *et al.* Mitochondrially targeted tamoxifen in patients with metastatic solid tumours: an open-label, phase I/Ib single-centre trial. *EClinicalMedicine* **57**, 101873 (2023).
133. Stemberkova Hubackova, S., Zizka, O., Havrlantova, T., Stursa, J., Skaroupkova, P. *et al.* Reduction of cellular senescence decreases the risk of diabetic kidney disease [poster]. *CarDia OffMeeting* (2024).
134. Lin, H.-F., Liao, K.-F., Chang, C.-M., Lin, C.-L., Lai, S.-W. *et al.* Correlation of the tamoxifen use with the increased risk of deep vein thrombosis and pulmonary embolism in elderly women with breast cancer. *Medicine* **97**, e12842 (2018).
135. Luck, L. A. & Falke, J. J. Fluorine-19 NMR studies of the D-galactose chemosensory receptor. 1. Sugar binding yields a global structural change. *Biochemistry* **30**, 4248–4256 (1991).
- 136.* Weissig, V. & Edeas, M. Recent developments in mitochondrial medicine (part 2). *4open* **5**, 5 (2022).
137. Desai, K., Dharaskar, S., Pandya, J., Shinde, S. & Gupta, T. Trihexyl tetradecyl phosphonium bromide as an effective catalyst/extractant in ultrasound-assisted extractive/oxidative desulfurization. *Environmental Science and Pollution Research* **29**, 49770–49783 (2022).
138. Ward, M. S., Flemming, N. B., Gallo, L. A., Fotheringham, A. K., McCarthy, D. A. *et al.* Targeted mitochondrial therapy using MitoQ shows equivalent renoprotection to angiotensin converting enzyme inhibition but no combined synergy in diabetes. *Sci Rep* **7**, 15190 (2017).
139. Capeloa, T., Krzystyniak, J., Rodriguez, A. C., Payen, V. L., Zampieri, L. C *et al.* MitoQ Prevents Human Breast Cancer Recurrence and Lung Metastasis in Mice. *Cancers (Basel)* **14**, 1488 (2022).