

Upotreba senoterapeutika u terapiji kroničnih plućnih bolesti

Stokanović, Tihana

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:499259>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Tihana Stokanović

**Upotreba senoterapeutika u terapiji kroničnih
plućnih bolesti**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Biokemija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Anite Somborac Bačura.

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Aniti Somborac Bačura na stručnoj pomoći, savjetima, strpljenju te uloženom vremenu.

SADRŽAJ

| | | |
|---------|---|----|
| 1. | UVOD | 1 |
| 1.1. | SENESCENTNE STANICE | 2 |
| 1.1.1. | UZROCI NASTANKA SENESCENTNIH STANICA | 2 |
| 1.1.2. | BIOMARKERI SENESCENTNIH STANICA | 3 |
| 1.1.3. | SASP (SEKRETORNI FENOTIP POVEZAN SA SENESCENCIJOM) | 3 |
| 1.2. | KRONIČNE PLUĆNE BOLESTI..... | 4 |
| 1.2.1. | UZROCI SENESCENCIJE KOD KRONIČNIH PLUĆNIH BOLESTI..... | 5 |
| 1.2.2. | PATOFIZIOLOGIJA SENESCENCIJE KOD KRONIČNIH PLUĆNIH BOLESTI | 5 |
| 2. | OBRAZLOŽENJE TEME | 7 |
| 3. | MATERIJALI I METODE | 8 |
| 4. | REZULTATI I RASPRAVA | 9 |
| 4.1. | UPOTREBA SENOTERAPEUTIKA U KOPB-U I IPF-U | 9 |
| 4.2. | SENOSTATICI | 9 |
| 4.2.1. | RAPAMICIN KAO INHIBITOR mTOR | 10 |
| 4.2.2. | PTEN AKTIVATORI I ANTIOKSIDANSI..... | 11 |
| 4.2.3. | METFORMIN KAO AKTIVATOR AMPK | 11 |
| 4.2.4. | RESVERATROL KAO AKTIVATOR SIRTUINA..... | 12 |
| 4.2.5. | ANTAGOMIRI miR-34a/miR-570..... | 13 |
| 4.2.6. | MELATONIN | 13 |
| 4.3. | SENLITICI | 14 |
| 4.3.1. | NAVITOKLAKS (ABT263)..... | 15 |
| 4.3.2. | A1331852 I A1155463..... | 15 |
| 4.3.3. | PIPERLONGUMIN | 15 |
| 4.3.4. | FISETIN | 16 |
| 4.3.5. | DASATINIB I KVERCETIN | 16 |
| 4.3.6. | PANOBINOSTAT | 17 |
| 4.3.7. | FOXO4-DRI..... | 17 |
| 4.3.8. | KARDIOTONIČNI GLIKOZIDI | 18 |
| 4.3.9. | INHIBITORI Hsp90..... | 19 |
| 4.3.10. | GAL-PROLIJEKOVI | 20 |
| 4.3.11. | CAR T STANICE..... | 21 |
| 4.3.12. | KURKUMIN I ANALOG KURKUMINA EF24 | 22 |
| 4.4. | UPOTREBA SENOTERAPEUTIKA U DRUGIM PLUĆNIM BOLESTIMA | 24 |
| 4.4.1. | ASTMA..... | 24 |
| 4.4.2. | COVID-19..... | 25 |
| 5. | ZAKLJUČCI..... | 27 |
| 6. | POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA | 30 |
| 7. | LITERATURA..... | 33 |
| 8. | SAŽETAK/SUMMARY | 37 |
| 9. | TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD..... | 38 |

1. UVOD

Danas velik broj ljudi boluje od kroničnih plućnih bolesti. Najčešće je riječ o astmi koja dominantno pogađa djecu, a kod odraslih se često javljaju kronična opstruktivska plućna bolest (KOPB, engl. *chronic obstructive pulmonary disease*) i idiopatska pulmonarna fibroza (IPF, engl. *idiopathic pulmonary fibrosis*). Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, engl. *World Health Organization*), 235 milijuna ljudi boluje od astme, a 3 milijuna ljudi svake godine umre od KOPB-a (www.who.int).

Današnja dostupna terapija za liječenje kroničnih plućnih bolesti je usmjerena na liječenje posljedica bolesti. Senoterapeutici su novi lijekovi koji su u eksperimentalnoj fazi, a usmjereni su na uzrok bolesti i sprječavanje daljne progresije bolesti (Baker i sur., 2020).

Tu ubrajamo senolitike, a to su lijekovi koji ubijaju senescentne stanice tj. uzrokuju staničnu programiranu smrt (apoptozu) senescentnih stanica te senostatike, koji sprječavaju stanice da postanu senescentne. Senescentne stanice se nakupljaju kod kroničnih bolesti i tijekom procesa starenja. One su metabolički aktivne stanice koje se ne dijele i odupiru se procesu apoptoze (Baker i sur., 2020).

Senescentne stanice imaju fiziološku i patofiziološku ulogu. Njihova fiziološka uloga očituje se u embriogenezi kod pregradnje tkiva, kao i kod regeneracije i zacjeljivanja rana gdje dolazi do zaustavljanja staničnog ciklusa u fibroblastima nakon što ispune svoju funkciju, a potom imunosne stanice makrofagi učinkovito uklone senescentne stanice. Imaju važnu fiziološku ulogu i kod prevencije stvaranja karcinoma jer čim dođe do oštećenja DNA, stanični ciklus se zaustavlja i nastankom senescentnih stanica se sprječava dijeljenje oštećenih stanica i razvoj tumora. Do problema i patofiziološke uloge dolazi kada se senescentne stanice počnu nakupljati u ogromnim količinama i induciraju nastanak kroničnih bolesti, a mogu pridonijeti razvoju tumora i ubrzanom starenju jer imunosne stanice nisu sposobne ukloniti toliku količinu senescentnih stanica (Barnes i sur., 2019).

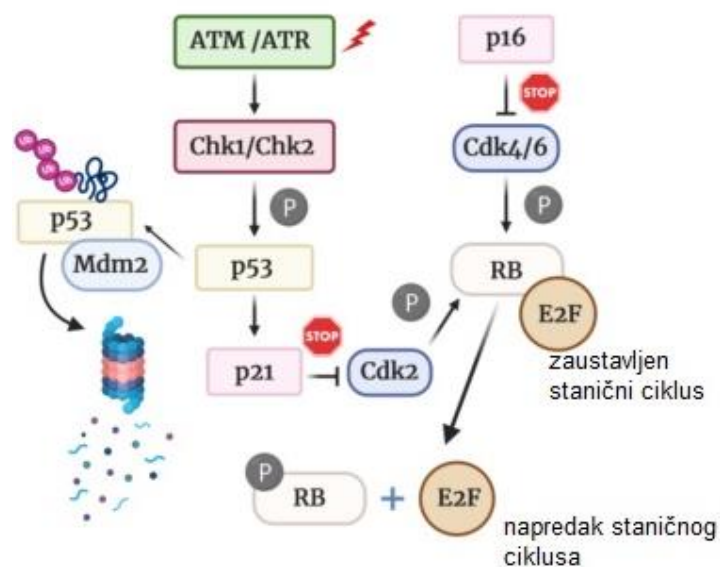
Kod kroničnih plućnih bolesti, kao što su KOPB, IPF i astma, te kod koronavirusne bolesti COVID-19 (engl. *coronavirus disease 2019*) koja može prijeći u kroničnu, postoji ogromna količina senescentnih stanica i zato se razvijaju novi lijekovi, senoterapeutici, koji sprječavanjem senescencije i ubijanjem senescentnih stanica djeluju na sam uzrok bolesti, a ne samo na simptome bolesti, čime se sprječava daljna progresija kroničnih plućnih bolesti.

1.1. SENESCENTNE STANICE

1.1.1. UZROCI NASTANKA SENESCENTNIH STANICA

Uzroci nastanka senescentnih stanica su skraćivanje telomera i oštećenje DNA pri čemu se zaustavlja stanični ciklus (Baker i sur., 2020).

Prosječne stanice se dijele određeni broj puta i pri svakoj diobi dolazi do skraćivanja krajeva kromosoma telomera. Telomere se skraćuju sve dok ne dosegnu Hayflickovu granicu pri čemu ne može više doći do daljnjeg skraćivanja. Dolazi do oštećenja DNA i aktivacije p53 što inducira zaustavljanje staničnog ciklusa. Ciklus se zaustavlja pod utjecajem tumor supresorskog proteina p53 koji aktivira p21, a koji dalje deaktivira ciklin-ovisnu kinazu 2 (Cdk2). Međutim, može doći i do aktivacije p16, inhibitora Cdk4/6, čime se sprječava fosforilacija proteina RB (retinoblastom protein) i inhibira transkripcijski čimbenik E2F te onemogućava daljni tijek staničnog ciklusa (**Slika 1**). Ako se ne uspije popraviti oštećenje, stanica odlazi u apoptozu ili u senescenciju. Do oštećenja DNA može doći i zbog oksidacijskog stresa, disfunkcije mitohondrija, ionizirajućeg zračenja itd. Oštećenje DNA može biti jednolančano ili dvolančano. ATM (engl. *ataxia telangiectasia mutated*) serin/treonin proteinska kinaza prepoznaje dvolančane lomove te fosforilacijom dolazi do aktivacije tumor supresorskog proteina p53 jer se odvaja negativni regulator Mdm2 (engl. *mouse double minute 2 homolog*), poznat i kao E3 ubikvitin protein ligaza, koja negativno regulira p53 preko ubikvitinacije i razgradnje u proteasomu (Demirci i sur., 2021).



Slika 1. Zaustavljanje staničnog ciklusa (preuzeto i prilagođeno prema Demirci i sur., 2021 uz dopuštenje izdavača)

1.1.2. BIOMARKERI SENESCENTNIH STANICA

Senescentne stanice imaju različite biomarkere koji predstavljaju mete za djelovanje senoterapeutika. Marker senescentnih stanica su β -galaktozidaza povezana sa senescencijom (SA- β -Gal, engl. *senescence-associated β -galactosidase*), p53, p21 i p16 (Liu R. i Liu G., 2020). Ti markeri nisu specifični za senescentne stanice jer makrofagi i ostale stanice mogu također eksprimirati ove molekule, ali senescentne stanice ih eksprimiraju u puno većoj količini u usporedbi s normalnim stanicama. Senescentne stanice su jako heterogene i ne eksprimiraju sve senescentne stanice iste markere te je zato teško stvoriti lijek koji bi selektivno ubijao sve senescentne stanice (Kirkland i Tchkonja, 2020).

Senescentnoj stanici je potrebno oko 6 tjedana da bi se razvila, pa se zato ne daje kontinuirana terapija senoliticima, nego se daje u prekidima kako bi mogli djelovati i na senescentne stanice koje naknadno nastanu pod utjecajem SASP (engl. *senescence associated secretory phenotype*) medijatora koje je izlučila jedna senescentna stanica (Kirkland i Tchkonja, 2020).

1.1.3. SASP (SEKRETORNI FENOTIP POVEZAN SA SENESCENCIJOM)

Senescentne stanice su metabolički aktivne stanice (Baker i sur., 2020).

Neke senescentne stanice imaju sekretorni fenotip povezan sa senescencijom, SASP (engl. *senescence associated secretory phenotype*) i izlučuju razne proupalne medijatore: citokine IL-6, IL-1 β i TNF- α (dolazi do aktivacije nuklearnog čimbenika κ B, NF- κ B, engl. *nuclear factor- κ B*, što dovodi do stvaranja ovih proupalnih citokina), čimbenike rasta VEGF (vaskularni endotelni čimbenik rasta, engl. *vascular endothelial growth factor*) i TGF- β (transformirajući čimbenik rasta beta, engl. *transforming growth factor beta*, koji može pridonijeti fibrozi), kemokine (CXCL1, CXCL8 i CCL2, koji privlače imunosne stanice), PAI-1 (inhibitor aktivatora plazminogena, engl. *plasminogen activator inhibitor*, koji pridonosi fibrozi) te metaloproteinaze matriksa (MMP-2, MMP-9) koje utječu na strukturne promjene i fibrozu (Barnes i sur., 2019).

Izlučeni medijatori mogu imati autokrino (djeluju na stanicu iz koje su izlučeni) i parakrino djelovanje (djeluju na susjedne stanice). Parakrino djelovanje je uzrok nakupljanja ogromne količine senescentnih stanica i njihove patofiziološke funkcije (Liu R. i Liu G., 2020).

Izlučeni medijatori mogu privući imunosne stanice koje će ukloniti senescentne stanice. Prirodne stanice ubojice (NK stanice) i CD8⁺ citotoksični T-limfociti mogu ubiti senescentne stanice ili ih makrofagi mogu fagocitirati (Di Micco i sur., 2021).

Problem je što se starenjem i zbog kroničnih bolesti može smanjiti sposobnost imunskog sustava da uklanja senescentne stanice te dolazi do njihovog nakupljanja (Parikh i sur., 2019).

SASP se aktivira preko p21 koji uzrokuje aktivaciju p38 MAPK (mitogenom-aktivirana proteinska kinaza) i JAK kinaza (Janus kinaze) što za posljedicu ima aktivaciju NF- κ B (Baker i sur., 2020). Stoga se kao lijekovi mogu koristiti **JAK inhibitori** (npr. ruksolitinib) i **NF- κ B inhibitori** (npr. metformin te biljni flavonoidi resveratrol, apigenin i kempferol) (Demirci i sur., 2021). **p38 MAPK inhibitori** su slabo učinkoviti i jako toksični (Baker i sur., 2020).

Problem ovakvih lijekova je što njihova meta djelovanja ima također i funkcije koje nisu vezane uz senescenciju pa su zato moguće nuspojave. NF- κ B ima bitnu ulogu u imunološkom odgovoru i kod akutnog upalnog odgovora. p38 sudjeluje kod oštećenja DNA, toplinskog šoka i kod ostalih stresnih situacija. Blokirajući takve komponente, koje osim patofiziološke imaju i fiziološku funkciju, može uzrokovati neželjene učinke (Kang, 2019).

1.2. KRONIČNE PLUĆNE BOLESTI

Senescentne stanice su prisutne kod kroničnih plućnih bolesti, kao što su kronična opstruktivska plućna bolest (KOPB, engl. *chronic obstructive pulmonary disease*) i idiopatska plućna fibroza (IPF, engl. *idiopathic pulmonary fibrosis*) (Barnes i sur., 2019).

KOPB je progresivna ireverzibilna kronična upala gdje dolazi do gubitka alveola i smanjenog protoka zraka čime se gubi plućna funkcija. Dolazi do produktivnog kašlja i pojačanog izlučivanja sluzi. Najčešći uzrok je pušenje ili starenje (Easter i sur., 2020).

IPF je progresivna ireverzibilna kronična bolest gdje dolazi do stvaranja ožiljaka na plućnom tkivu i time se smanjuje protok zraka i narušava se funkcija pluća. Javlja se neproduktivan kašalj, bol i otežano disanje. Riječ idiopatska je zato jer se u većini slučajeva ne zna uzrok plućne fibroze, ali čimbenici koji povećavaju rizik su pušenje, infekcije, lijekovi (kao što je bleomicin) i zračenje (Liu R. i Liu G., 2020).

1.2.1. UZROCI SENESCENCIJE KOD KRONIČNIH PLUĆNIH BOLESTI

Uzroci pojave senescentnih stanica su skraćivanje telomera, reducirana autofagija, disfunkcija mitohondrija, iscrpljivanje matičnih stanica, oksidacijski stres, ionizirajuće zračenje, kemoterapija i molekularni obrasci povezani s patogenima (PAMPs, engl. *pathogen-associated molecular patterns*), kao što je npr. bakterijski endotoksin. (Barnes i sur., 2019; Kirkland i Tchkonja, 2020). Uzrok skraćivanju telomera može biti prisutna mutacija u enzimu telomerazi, reverznoj transkriptazi koja služi za elongaciju telomera (Liu R. i Liu G., 2020).

Dolazi do oštećenja DNA i aktivacije tumor supresorskih proteina p53 i p21 ili p16, pri čemu nastaju senescentne stanice koje počnu izlučivati proupalne komponentne SASP-a (Baker i sur., 2020).

Glavni uzroci stvaranja senescentnih stanica kod KOPBa su pušenje i starenje. Zbog pušenja dolazi do oksidacijskog stresa i oštećenja DNA pri čemu se počnu stvarati senescentne stanice (Barnes i sur., 2019).

Glavni uzrok nastanka senescentnih stanica kod IPF-a je starenje, ali postoje i rizični čimbenici poput pušenja, mutacija gena, infekcija, pri čemu dolazi do oštećenja DNA i inducira se senescencija. Uklanjanjem senescentnih stanica se poboljšava funkcija pluća i dolazi do reverzije plućne fibroze na modelima inducirane fibroze na miševima (istraživanja senolitika su isključivo izvođena na miševima, a jako malo istraživanja je provedeno na ljudima). Bleomicin je antitumorski lijek koji za nuspojavu ima plućnu fibrozu koja predstavlja čest model za istraživanja kod miševa. Također se kao model može koristiti i radijacijom inducirana plućna fibroza kod miševa (Liu R. i Liu G., 2020).

1.2.2. PATOFIZIOLOGIJA SENESCENCIJE KOD KRONIČNIH PLUĆNIH BOLESTI

Kod KOPB-a alveolarne epitelne i endotelne stanice postaju senescentne, a kod IPF-a alveolarne epitelne i endotelne stanice te fibroblasti. (Barnes i sur., 2019.) Senescentni fibroblasti, čija je uloga proizvodnja izvanstaničnog matriksa, postaju otporni na apoptozu što uzrokuje pojačano odlaganje izvanstaničnog matriksa i fibrozu u plućima kod IPF-a. Kod KOPB-a i IPF-a senescentne stanice počnu izlučivati SASP medijatore koji onda djeluju na

susjedne stanice te dolazi do nakupljanja senescentnih stanica koje imaju razvijene SASP antiapoptozne putove, što ih čini otpornima na apoptozu (Liu R. i Liu G., 2020).

Razni SASP medijatori, kao što su TGF- β i PAI-1, pridonose i fibrozi kod IPF-a. TGF- β je ključni fibrozni citokin koji potiče aktivaciju fibroblasta. PAI-1 je inhibitor aktivatora plazminogena koji inhibira aktivaciju plazmina iz plazminogena pa ne može nastati plazmin (serinska proteaza) koji bi uzrokovao fibrinolizu te zato kažemo da PAI-1 pridonosi fibrozi (Liu R. i Liu G., 2020).

Alveolarne epitelne stanice tipa 2 i mezenhimske matične stanice su naročito podložne senescenciji. Problem je što se iz senescentnih matičnih stanica ne mogu stvarati nove stanice niti može doći do regeneracije tkiva. Imunosne stanice CD8⁺ citotoksični T-limfociti i makrofagi također postaju senescentne pa se može izgubiti njihova važna uloga u uklanjanju senescentnih stanica (Barnes i sur., 2019).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Velik broj ljudi boluje od kroničnih plućnih bolesti. Takve bolesti se ne mogu izliječiti, ali se mogu kontrolirati i smanjiti prisutni simptomi te se tako može poboljšati kvaliteta života bolesnika. Postojeća terapija često nije dovoljno učinkovita pa se ne može spriječiti daljna progresija bolesti. Stoga se razvijaju novi lijekovi, primjerice senoterapeutici koji djeluju na uzrok bolesti, a ne na posljedicu, čime se blokira daljnje napredovanje bolesti. Kronične plućne bolesti su u punoj većoj mjeri zastupljene kod starije populacije. S dužim životnim vijekom i s prisutnošću kroničnih plućnih bolesti dolazi do nakupljanja senescentnih stanica. Novom terapijom senoterapeuticima se postiže ubijanje senescentnih stanica ili se sprječava stvaranje takvih stanica te se time smanjuje daljne napredovanje bolesti.

Postavljena je hipoteza ovog rada da senoterapeutici mogu imati terapijsku primjenu kod kroničnih plućnih bolesti.

Ciljevi ovog diplomskog rada su definirati što su senoterapeutici, objasniti razliku između senostatika i senolitika, ispitati njihove mehanizme djelovanja, proučiti primjenu takvih lijekova kod kroničnih plućnih bolesti te razumjeti njihove prednosti i nedostatke.

3. MATERIJALI I METODE

U ovom preglednom diplomskom radu je korištena znanstvena i stručna literatura na temu kroničnih plućnih bolesti i senoterapeutika. Pretraživane su bibliografske baze, poput PubMed-a, te različite mrežne stranice, uključujući stranicu Svjetske zdravstvene organizacije. Diplomski rad ima 32 literaturna navoda. Ključne riječi (na engleskom jeziku) korištene prilikom pretraživanja su: *senotherapeutics*, *senolytics*, *senostatics*, *lung diseases*, COPD, IPF, *asthma* i COVID-19.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. UPOTREBA SENOTERAPEUTIKA U KOPB-U I IPF-U

Kod KOPB-a i IPF-a su prisutne velike nakupine senescentnih stanica koje otpuštajući SASP medijatore i proupalne citokine pridonose kroničnoj upali (Raffaele i Vinciguerra, 2022)

Razvili su se novi lijekovi senoterapeutici koji selektivno djeluju na senescentne stanice. Razlikujemo senolitike i senostatike (Kim E-C i Kim J-R, 2019).

Senolitici selektivno ubijaju senescentne stanice blokirajući antiapoptozne putove kojima se senescentne stanice odupiru apoptozi. Blokiranjem meta kao što su npr. p53, tirozin kinaza, Hsp90, Bcl-2 i Bcl-X_L, aktivira se apoptoza (Kim E-C i Kim J-R, 2019).

Senostatici sprječavaju nastanak senescentnih stanica blokirajući signalne putove, a time se sprječava stvaranje SASP medijatora. Blokiranjem meta, kao što su npr. mTOR i NF-κB, inhibira se signalni put koji vodi u senescenciju (Kim E-C i Kim J-R, 2019).

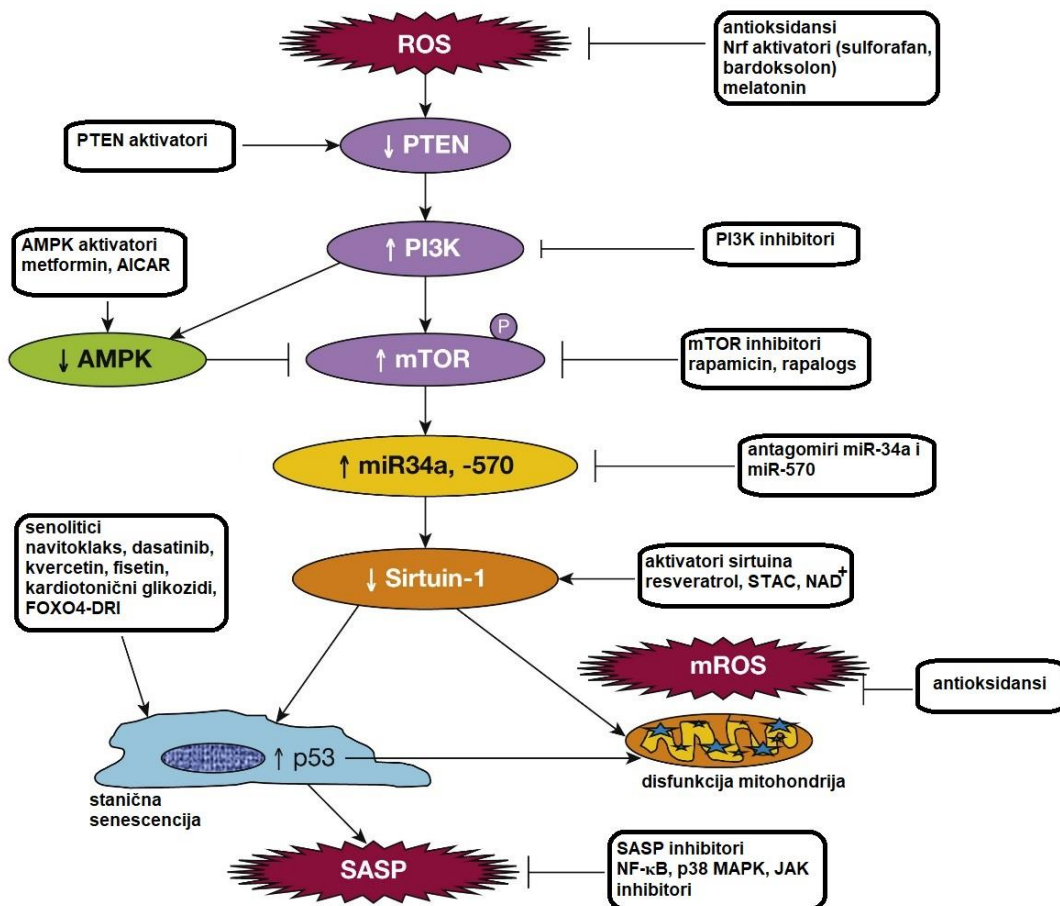
4.2. SENOSTATICI

Senostatici su lijekovi koji sprječavaju stanice da postanu senescentne blokirajući putove koji vode u senescenciju (Baker i sur., 2020).

Kod KOPB-a i IPF-a u stanicama se signali prenose preko fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3K, engl. *phosphoinositide-3-kinase*) i ciljnog enzima za rapamicin u sisavaca (mTOR, engl. *mammalian target of rapamycin*), tj. PI3K-mTOR putom koji vodi u senescenciju (Baker i sur., 2020).

U epitelnim stanicama i mononuklearnim stanicama periferne krvi pod utjecajem oksidacijskog stresa dolazi do aktivacije PI3K koja dalje aktivira mTOR (**Slika 2**) (Barnes i sur., 2019). Pojedini dijelovi slike će biti opisani u sljedećim potpoglavljima.

Senostatici mogu inhibirati prijenos signala. **PI3K inhibitori** su jako toksični te nisu testirani na životinjama, ali postoje **mTOR inhibitori** čija je učinkovitost dokazana na životinjama (Baker i sur., 2020).



Slika 2. PI3K-mTOR signaliziranje (preuzeto i prilagođeno prema Baker i sur., 2020 uz dopuštenje izdavača).

4.2.1. RAPAMICIN KAO INHIBITOR mTOR

mTOR je proteinska serin/treonin kinaza koja regulira stanični rast, diobu i metabolizam. mTOR sadrži dva kompleksa mTORC1 i mTORC2. **Rapamicin (sirolimus)** inhibira mTOR1 čime se smanjuje i aktivnost mTORC2 kompleksa. Rapamicin također smanjuje izlučivanje SASP medijatora iz senescentnih stanica. Time senescentna stanica sa smanjenim izlučivanjem SASP medijatora ne može utjecati na okolne zdrave stanice te se sprječava nagomilavanje senescentnih stanica (Barnes i sur., 2019).

Rapamicin je proizvod bakterije *Streptomyces hygroscopicus*. (<https://en.wikipedia.org>)

Rapamicin se inače koristi kao imunosupresiv za sprječavanje odbacivanja transplantiranih organa (Baker i sur., 2020). Problem je što rapamicin ima jako česte respiratorne nuspojave (dispneja, pneumonija, česte plućne infekcije) uz gastrointestinalne, kardiovaskularne, metaboličke i ostale nuspojave (Barnes i sur., 2019).

S obzirom na nuspojave koje su povezane s inhibicijom mTORC2 pokušavaju se napraviti rapamicin-analozi (**rapalogs**) koji će imati manje nuspojave. (npr. everolimus, temsirolimus) (Baker i sur., 2020).

Problem je što meta rapamicina mTOR nije isključivo vezana uz senescenciju i patofiziološku funkciju, nego ima i fiziološku funkciju kod staničnog rasta, proliferacije i sinteze proteina pa su zato moguće i nuspojave (Kang, 2019).

4.2.2. PTEN AKTIVATORI I ANTIOKSIDANSI

Homolog fosfataze i tenzina (PTEN, engl. *phosphatase and tensin homolog*) i domena Src homologije 2 (SH2) koja sadrži inozitol polifosfat-5-fosfatazu-1 (SHIP-1, engl. *Src homology 2 (SH2) domain containing inositol polyphosphate 5-phosphatase 1*) su naši endogeni enzimi koji blokiraju aktivaciju PI3K-mTOR puta. Kod KOPB-a je pod utjecajem oksidacijskog stresa onemogućena funkcija tih fosfataza PTEN i SHIP-1 jer u katalitičkom mjestu imaju cistein koji se oksidira (Barnes i sur., 2019).

PTEN aktivatori su lijekovi koji su još uvijek u razvoju (Baker i sur., 2020). Upotrebom **antioksidansa** se može spriječiti oksidacijski stres, pa će fosfataze bit aktivne i time se blokira aktivacija PI3K-mTOR puta.

Postoje novi antioksidansi, poput inhibitora NADPH (reducirani oblik nikotinamid adenin dinukleotid fosfat) oksidaze, mimetika superoksid dismutaze i **aktivatora Nrf2** (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), transkripcijskog čimbenika koji regulira ekspresiju gena za antioksidanse, ali je njegova ekspresija reducirana kod KOPB-a (Barnes i sur., 2019).

Primjer aktivatora Nrf2 su **sulforafan** i **bardoksolon**, ali su nespecifični i toksični pa se moraju razviti bolji lijekovi. Disfunkcijom mitohondrija može doći do oksidacijskog stresa pa postoje i antioksidansi koji su usmjereni na mitohondrije (Baker i sur., 2020).

4.2.3. METFORMIN KAO AKTIVATOR AMPK

AMPK (5'-adenozin monofosfat aktivirana proteinska kinaza) je naš endogeni enzim koji inhibira mTOR. AMPK utječe na energetske metabolizam i aktivira se u stanju nedostatka hranjivih tvari kada je koncentracija ATP-a jako niska. Kod aktiviranog PI3K-mTOR puta smanjena je ekspresija AMPK. **Metformin** aktivira AMPK, a time se inhibira mTOR. Metformin kod IPF-a smanjuje fibrozu u miofibroblastima miševa kod fibroze inducirane bleomicinom (Barnes i sur., 2019).

Metformin je inače antidijabetik iz skupine bigvanida, ali se koristi i kod sindroma policističkih jajnika (Easter i sur., 2020).

Flavonoidi **kvercetin** i **AICAR** (5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonukleotid, analog AMP-a) također aktiviraju AMPK (Barnes i sur., 2019; Baker i sur., 2020).

4.2.4. RESVERATROL KAO AKTIVATOR SIRTUINA

Kod senescencije i KOPB-a u epitelnim stanicama pluća i u imunosnim stanicama u krvi su reducirane endogene zaštitne molekule sirtuin-1 i sirtuin-6 (proteini koji imaju aktivnost deacetilaze ovisne o NAD^+) koje nas štite od starenja i senescencije, inhibiraju PI3K-mTOR put te potiču autofagiju (Baker i sur., 2020).

Sirtuin 1 aktivira FOXO3a (engl. *forkhead box family O*), transkripcijski čimbenik koji je bitan za rezistenciju na oksidacijski stres. Aktivacijom PI3K i mTOR dolazi do smanjene količine sirtuina i inhibicije FOXO transkripcijskog čimbenika što dodatno pridonosi senescenciji. Sirtuin-6 aktivira Nrf2, transkripcijski čimbenik koji regulira ekspresiju gena za antioksidanse. Zbog smanjene količine sirtuina-6 doći će do inhibicije Nrf2 transkripcijskog čimbenika čime se inducira oksidacijski stres i senescencija. Sirtuin-1 inhibira TGF- β i time sprječava aktivaciju fibroblasta kod IPF-a. Zbog nedostatka sirtuina-1 i sirtuina-6 doći će do acetilacije raznih regulatornih proteina, što će za posljedicu imati aktivaciju NF- κ B i stvaranje SASP medijatora, bit će reducirana autofagija pa će se smanjiti uklanjanje oštećenih organela i proteina u stanicama te će se smanjiti ekspresija FOXO3a i Nrf2 transkripcijskih čimbenika (Barnes i sur., 2019).

Reducirana količina sirtuina će uzrokovati disfunkciju mitohondrija jer je inhibiran transkripcijski koaktivator PGC-1 α (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator*) (Baker i sur., 2020).

Resveratrol je polifenol iz biljaka koji aktivira sirtuin-1, ali nema jak učinak jer se slabo apsorbira iz crijeva i prebrzo se metabolizira (Barnes i sur., 2019). Ima lošu bioraspoloživost i slabo djelovanje pa su se morali razviti sintetski lijekovi **STAC** (engl. *sirtuin activating compounds*) koji će imati jače djelovanje i bolju bioraspoloživost u usporedbi s resveratrolom (Baker i sur., 2020).

Resveratrol također ima antioksidacijsko i protuupalno djelovanje.

Oksidirani **nikotinamid adenin dinukleotid** NAD^+ je endogeni aktivator svih sirtuina jer sirtuini za aktivnost deacetilaze trebaju imati dostupan NAD^+ . Flavonoidi **kvercetin** i

apigenin inhibiraju NAD⁺-azu, a time se povećava količina NAD⁺ i aktivacija sirtuina (Baker i sur., 2020).

4.2.5. ANTAGOMIRI miR-34a/miR-570

Kod senescencije pod utjecajem oksidacijskog stresa i zbog aktivacije PI3K-mTOR puta dolazi do povećane ekspresije malih nekodirajućih molekula RNA (engl. *microRNA*, miRNA), kao što su miR-34a i miR-570. Postoje razne miRNA molekule koje imaju različitu funkciju kod senescencije. Primjerice, mogu regulirati markere senescentnih stanica (p16, p23, p53), SASP medijatore (IL-6, IL-8, TNF- α , MMP) i reducirati količinu sirtuina tako što vezanjem za komplementarnu regiju mRNA sprječavaju translaciju i nastanak proteina sirtuina. MiR-34a inhibira sirtuin-1 i sirtuin-6, dok miR-570 inhibira isključivo sirtuin-1. Lijekovi **antagomiri miR-34a/miR-570** su kemijski modificirani oligonukleotidi koji komplementarnim vezanjem blokiraju specifičnu miRNA. Time se povećava količina sirtuina, smanjuju se markeri senescentnih stanica i količina SASP medijatora te se inducira napredak staničnog ciklusa i proliferacija pa može čak doći i do reverzije senescencije (Barnes i sur., 2019).

Senescentne stanice mogu od svoje membrane pupanjem izdvojiti izvanstanične vezikule koje sadrže proteine i miRNA, a nazivaju se egzosomi. Te vezikule se prenose do drugih susjednih stanica koje mogu endocitozom uvući sadržaj egzosoma ili dolazi do prepoznavanja preko receptora na stanicama. Također se i cirkulacijom mogu prenijeti egzosomi do drugih organa. Novi lijekovi antagomiri miR ili miRNA mimetici bi mogli djelovati tako što bi se prenosili izvanstaničnim vezikulama i transportirali do ciljne stanice (Barnes i sur., 2019).

4.2.6. MELATONIN

Kod KOPB-a je primjećena snižena koncentracija melatonina. **Melatonin** ima protuupalno djelovanje jer smanjuje stvaranje proupalnog citokina IL-6 i ima antioksidacijsko djelovanje jer hvata kisikove radikale čime se smanjuje oksidacijski stres. Oksidacijski stres može uzrokovati oštećenje DNA koje vodi u senescenciju. Smanjenjem oksidacijskog stresa sprječava se induciranje senescencije. Melatonin je inače hormon koji oslobađa epifiza i bitan je za reguliranje ciklusa spavanja pa zato ima kliničku primjenu u liječenju nesanicice (Easter i sur., 2020).

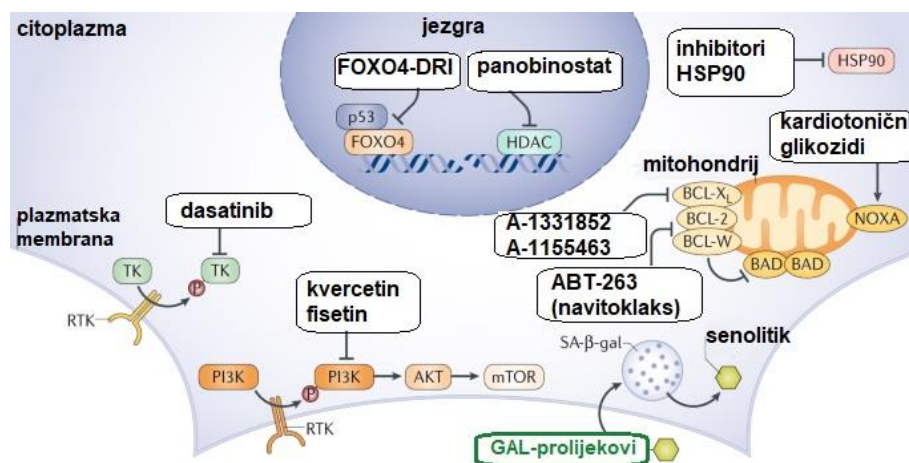
Melatonin potiče aktivnost antioksidacijskih enzima kao što su superoksid dismutaza i glutation peroksidaza. U znatno većoj mjeri melatonin inducira glutation peroksidazu, a u vrlo maloj količini superoksid dismutazu. Time se smanjuje oksidacijski stres u stanicama (Sumsuzzman i sur., 2021).

4.3. SENOLITICI

Senolitici (Slika 3) su lijekovi koji induciraju apoptozu senescentnih stanica. Senolitici onemogućavaju SCAP (engl. *senescent cell anti-apoptotic pathways*) antiapoptozne putove kojima se senescentna stanica štiti od apoptoze (Kirkland i Tchkonja, 2020). Pojedini dijelovi slike će biti opisani u sljedećim potpoglavljima.

Osim ubijanja senescentnih stanica bitno je spriječiti da zdrave stanice postanu senescentne stanice pa se lijekovima nastoje prekinuti signalni putevi koji vode u senescenciju i spriječiti izlučivanje SASP medijatora koji utječu na okolne stanice.

Najbolje je kombinirati **senostatike** (sprječavaju stanice da postanu senescentne blokirajući putove koji vode u senescenciju) i **senolitike** (ubijaju senescentne stanice) (Baker i sur., 2020).



Slika 3. Primjena senolitika kod kroničnih plućnih bolesti (preuzeto i prilagođeno prema Di Micco i sur., 2021 uz dopuštenje izdavača).

4.3.1. NAVITOKLAKS (ABT263)

Navitoklaks (ABT263) je senolitik koji inhibira Bcl-2 (engl. *B cell lymphoma-2*) obitelj antiapoptoznih proteina, uključujući Bcl-X_L, Bcl-2 i Bcl-W (Baker i sur., 2020). Senescentne stanice su otporne na apoptozu zahvaljujući tim antiapoptoznim proteinima pa ih zato treba blokirati da bi se inducirala apoptoza. Inhibicijom antiapoptoznih proteina dolazi do aktivacije apoptoznih proteina BAK (engl. *Bcl-2 antagonist / killer*) i BAX (engl. *Bcl-2-associated X protein*) (Zhu i sur., 2017).

Na vanjskoj membrani mitohondrija se oligomerizacijom apoptoznih proteina stvara pora što će uzrokovat propusnost. Kroz poru mitohondrija se oslobađa citokrom C u citoplazmu. Citokrom C se veže za APAF-1 (engl. *apoptotic protease activating factor 1*) i formira se apoptosom koji uzrokuje aktivaciju kaspaza, a time i apoptozu. Nastaju apoptozna tjelešca koja makrofagi fagocitiraju i uklone (Elmore, 2007).

Glavna nuspojava koju uzrokuju Bcl-2 inhibitori je trombocitopenija pa se zato izbjegavaju kliničke studije na pacijentima (Zhu i sur., 2017).

Navitoklaks nije selektivan za senescentne stanice nego također pokazuje i citotoksičan učinak na trombocite i neutrofile što za posljedicu ima trombocitopeniju i neutropeniju. Uzrok tome je inhibicija Bcl-2, Bcl-X_L i Bcl-W pa su zato napravljeni novi lijekovi A1331852 i A1155463 koji selektivno inhibiraju Bcl-X_L te je time smanjena pojava toksičnih učinaka (Zhang i sur., 2022).

4.3.2. A1331852 I A1155463

A1331852 i A1155463 su senolitici. Oni su inhibitori Bcl-2 anti-apoptoznih proteina, specifično inhibitori Bcl-X_L. Selektivni su prema isključivo Bcl-X_L pa je manja vjerojatnost nuspojava za razliku od navitoklaksa (ABT263) (Baker i sur., 2020).

4.3.3. PIPERLONGUMIN

Piperlongumin je alkaloid iz biljke dugi papar (*piper longum*). Meta djelovanja piperlongumina je protein OXR1 (engl. *oxidation resistance 1*) koji je bitan za regulaciju ekspresije enzima antioksidansa. Piperlongumin potiče razgradnju proteina OXR1 u proteasomu i time se smanjuje razina prisutnih proteina OXR1 u senescentnim stanicama. Potiče se stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva i nastaje oksidacijski stres u senescentnim

stanicama. Testiranjem na aneksin V (marker apoptoze) dobiveni su pozitivni rezultati pa se po tome znalo da piperlongumin uzrokuje apoptozu senescentnih stanica (Liu i sur., 2018).

4.3.4. Fisetin

Fisetin je prirodni flavonoid iz voća i povrća koji djeluje kao senolitik, ali ima i protuupalno i antioksidacijsko djelovanje. Fisetin inhibira PI3K signalni put (Baker i sur., 2020). Senolitici flavonoidi mogu blokirati SCAP antiapoptozne putove tako što inhibiraju Bcl-2 obitelj antiapoptoznih proteina čiji je član Bcl-xL (Kirkland i Tchkonja, 2020).

4.3.5. Dasatinib i kvercetin

Dasatinib i kvercetin (prirodni flavonoid koji se može naći u crvenom vinu i voću) potiču apoptozu senescentnih stanica i reduciraju SASP odgovor. Dasatinib je inhibitor tirozin kinaza. Kvercetin je inhibitor Bcl-2 i Bcl-xL, PI3K i p53/p21/PAI-1. Daje se kombinacija ova dva lijeka jer djeluju na različitu vrstu stanica. Dasatinib djeluje na senescentne kultivirane adipocitne progenitorske stanice, a kvercetin djeluje na senescentne kultivirane stanice HUVEC (engl. *human umbilical vein endothelial primary cells*), ljudske primarne endotelne stanice pupčane vene (Kirkland i Tchkonja, 2020).

Terapija se daje u prekidima, a ne konstantno jer se pod utjecajem SASP medijatora s vremenom mogu razviti senescentne stanice na koje također treba djelovati terapijom nakon što nastanu.

Prvo istraživanje provedeno na ljudima s IPF-om je kombinacija dasatinib i kvercetin. Terapija je trajala 3 tjedna, a primjenjivala se 3 dana u tjednu. Primijetilo se poboljšanje fizičke funkcije takvih bolesnika. Javile su se i nuspojave (gastrointestinalne, respiratorne, iritacija kože, glavobolje) koje su bile prihvatljive (Justice i sur., 2019).

Dasatinib se inače koristi kao inhibitor tirozin kinaze u antitumorskoj terapiji (Kirkland i Tchkonja, 2020).

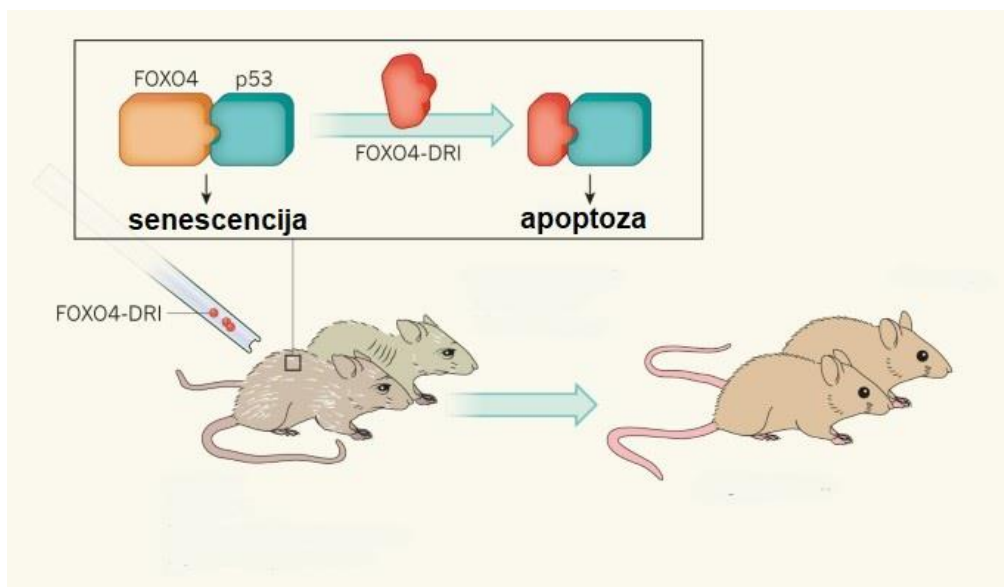
Tumorske stanice nalikuju na senescentne stanice jer su otporne na apoptozu. Senescentne stanice su otporne na apoptozu zahvaljujući antiapoptoznim proteinima Bcl-2 obitelji i PI3K signalnom putu. Senolitici blokirajući antiapoptozne komponente potiču apoptozu senescentnih stanica (Kang, 2019).

4.3.6. PANOBINOSTAT

Panobinostat je inhibitor histonske deacetilaze (HDAC). HDAC je enzim koji uklanja acetilne skupine sa proteina histona, ima bitnu ulogu u regulaciji ekspresije gena te regulira ekspresiju Bcl-2 antiapoptoznih proteina, uključujući Bcl-2 i Bcl-X_L. Senolitički učinak panobinostata je ispitan na modelu raka pluća. Senescencija je povezana sa smanjenom acetilacijom histon 3 (H3) proteina i povećanom Bcl-X_L ekspresijom. Panobinostat ima senolitički učinak pri čemu smanjuje ekspresiju Bcl-X_L antiapoptoznog proteina i kao inhibitor HDAC povećava acetilaciju H3 proteina. Panobinostat se inače koristi u terapiji multiplog mijeloma (Samaraweera i sur., 2017).

4.3.7. FOXO4-DRI

FOXO4-DRI (D-retro-inverso) je peptid koji se veže za p53 te time inducira apoptozu. Kod senescencije FOXO4 je vezan za p53 te ne može doći do apoptoze. Kad dođe do aktivacije p53 prilikom oštećenja DNA dolazi do zaustavljanja staničnog ciklusa. Ako stanica ne uspije popraviti oštećenje onda može otići u apoptozu ili senescenciju. Upravo je FOXO4 transkripcijski čimbenik vezan za p53 te time sprječava apoptozu, a potiče senescenciju (Baker i sur., 2020). Provedena su ispitivanja na miševima kod kojih je kemoterapijom inducirana senescencija. FOXO4-DRI istisne FOXO4 i veže se za p53 pa se time potakne apoptoza i oporavak miševa (**Slika 4**) (Barnes i sur., 2019).



Slika 4. Oporavak miševa primjenom FOXO4-DRI (preuzeto i prilagođeno prema Serrano, 2017 uz dopuštenje izdavača).

4.3.8. KARDIOTONIČNI GLIKOZIDI

Kardiotonični glikozidi su senolitici. Inače imaju primjenu kod zatajenja srca jer pojačavaju kontrakciju srčanog mišića. Istraživanja su provedena na proscilaridinu A, ouabainu i digoksinu. Iako kardiotonični glikozidi imaju kliničku primjenu kod srca, napravljena su istraživanja na modelu plućne fibroze uzrokovana bleomicinom i primjetio se senolitički učinak na senescentnim stanicama (Triana-Martinez i sur., 2019).

Meta djelovanja kardiotoničnih glikozida je alfa podjedinica Na^+/K^+ ATPaze. Blokadom Na^+/K^+ pumpe se pokazao senolitički učinak kardiotoničnih glikozida. Dolazi do disbalansa elektrokemijskog gradijenta i depolarizacije. Blokadom Na^+/K^+ pumpe povećava se koncentracija Na^+ , a smanjuje se koncentracija K^+ u stanici. Dodatkom KCl-a se dokazalo da je došlo do normalne polarizacije i time se smanjio senolitički učinak digoksina. Povećanjem koncentracije digoksina se uspio prevladati zaštitni učinak KCl-a. Blokadom Na^+/K^+ pumpe i zbog povećane koncentracije Na^+ dolazi također i do blokade $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ pumpe i Na^+/H^+ pumpe, a time se povećava koncentracija Ca^{2+} i H^+ . Nakupljanjem H^+ iona se snizuje pH vrijednost te dolazi do acidifikacije koja inducira apoptozu. (Triana-Martinez i sur., 2019.)

Senescentne stanice imaju same po sebi blago depolariziranu membranu i veće koncentracije H^+ pa su podložnije djelovanju kardiotoničnih glikozida, a pod utjecajem kardiotoničnih glikozida dodatno dolazi do još veće koncentracije H^+ iona i do depolarizacije čime se inducira apoptoza (Triana-Martinez i sur., 2019).

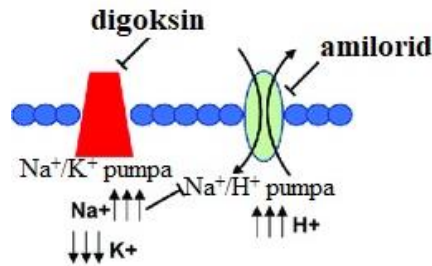
Kardiotonični glikozidi uzrokuju apoptozu senescentnih stanica također i preko induciranja proapoptoznog proteina NOXA (PMAIP1, engl. *phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*) iz Bcl-2 obitelji proteina (Guerrero i sur., 2019).

Testiranjem na prisutnost markera apoptoze kao što je kaspasa-3 i aneksin V dobili su se pozitivni rezultati. Aneksin V je indikator rane apoptoze (Triana-Martinez i sur., 2019).

Kod apoptoze fosfatidilserin aktivno izlazi iz unutrašnje na vanjsku stranu membrane. Fluorescentno obilježeni aneksin V se veže za fosfatidilserin i emitira se fluorescentni signal koji pokazuje da je apoptoza u tijeku (Elmore, 2007).

Amilorid (Slika 5) je izravni inhibitor Na^+/H^+ pumpe i pokazuje isto senolitički učinak kao i kardiotonični glikozidi koji neizravno inhibiraju Na^+/H^+ pumpu izravnom blokadom Na^+/K^+ pumpe (Triana-Martinez i sur., 2019).

Amilorid se inače koristi kao diuretik.



Slika 5. Amilorid kao izravan inhibitor i digoksin kao neizravan inhibitor Na⁺/H⁺ pumpe (preuzeto i prilagođeno prema Triana-Martinez i sur., 2019 uz dopuštenje izdavača).

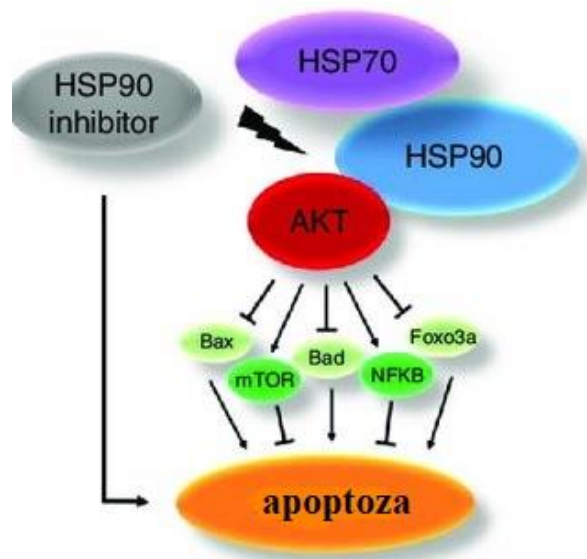
4.3.9. INHIBITORI Hsp90

Inhibitori Hsp90 geldanamycin i ganetespib su senolitici.

Pod utjecajem topline, kiseline, lužina, metala, ali i oksidacijskog stresa stvara se povećana količina proteina toplinskog šoka (Hsp, engl. *heat shock proteins*). Hsp proteini u stresnoj okolini stabiliziraju krivo smotane ili oštećene proteine te imaju funkciju šaperona čime pomažu stanici da pravilno smota proteine. Hsp90 sprječava apoptozu senescentnih stanica. Senolitici inhibitori Hsp90 se vežu za N-terminalni kraj ATP vezujuće domene proteina Hsp90 (Fuhrmann-Stroissnigg i sur., 2018).

Hsp90 regulira fosforilaciju AKT kinaze poznate kao serin/treonin proteinska kinaza B (PKB, eng. *protein kinase B*) koja aktivira mTOR, a inhibira apoptozne proteine BAD i BAX te time sprječava apoptozu senescentnih stanica (**Slika 6**) (Fuhrmann-Stroissnigg i sur., 2017).

Inhibicija HSP90 će inducirati defosforilaciju AKT, a time povećati osjetljivost senescentnih stanica na apoptozu (Fuhrmann-Stroissnigg i sur., 2018).



Slika 6. Poticanje apoptoze primjenom inhibitora Hsp90 koji blokiraju aktivnost AKT kinaze (preuzeto i prilagođeno prema Fuhrmann-Stroissnigg i sur., 2017 uz dopuštenje izdavača).

4.3.10. GAL-PROLIJEKOVI

Senescentne stanice imaju povećanu količinu SA- β -Gal. Galaktoza-konjugirani senolitički prolijejkovi će biti procesirani od strane SA- β -Gal i time će se senoliticici selektivno aktivirati u senescentnim stanicama (Cai i sur., 2020).

Sintetiziran je novi prolijejk SSK1 (engl. *senescence-specific killing compound 1*) koji sadrži citotoksični lijek gemcitabin i galaktozu koja je modificirana s acetilnim skupinama koje olakšavaju permeabilnost i ulazak u stanicu zbog povećanja lipofilnosti. Prolijejk se selektivno aktivirao u senescentnim stanicama. SSK1 se aktivira uz pomoć lizosomalne β -galaktozidaze te slobodan gemcitabin selektivno ubija senescentne stanice preko aktivacije p38 MAPK i inducira apoptozu (Cai i sur., 2020).

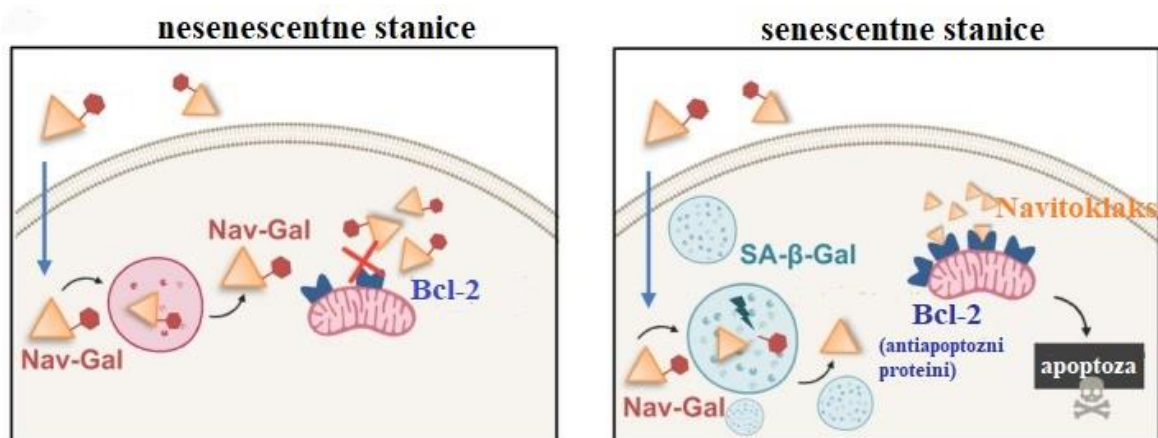
Testiranjem na prisutnost markera apoptoze kao što je kaspasa-3 i aneksin V dobili su se pozitivni rezultati čime je dokazano da SSK1 inducira apoptozu senescentnih stanica.

Na modelu plućne fibroze na mišu u kojem je senescencija inducirana upotrebom bleomicina je testirano djelovanje SSK1 lijeka i dokazalo se da SSK1 uspješno uzrokuje apoptozu senescentnih stanica, smanjuje ekspresiju i stvaranje SASP medijatora i poboljšava fizičku funkciju (Cai i sur., 2020).

Sintetiziran je Nav-Gal prolijejk koji sadrži senolitik navitoklaks konjugiran s acetiliranom galaktozom. U senescentnim stanicama dolazi do cjepanja galaktoze pri čemu se oslobađa

lijek navitoklaks koji inhibira Bcl-2 antiapoptozne proteine i time potiče apoptozu senescentnih stanica (**Slika 7**) (Gonzalez-Gualda i sur., 2020).

Nav-Gal prolijek ima veću selektivnost prema senescentnim stanicama i manju mogućnost nuspojave trombocitopenije u usporedbi s navitoklaksom jer je smanjena apoptoza trombocita zbog veće selektivnosti prema senescentnim stanicama. Primjećena je manja količina markera apoptoze aneksina V u trombocitima prilikom upotrebe Nav-Gal, a puno veća količina aneksina V u trombocitima prilikom upotrebe navitoklaksa. Navitoklaks uzrokuje trombocitopeniju jer je za preživljavanje trombocita bitan antiapoptozni protein Bcl-xL, a navitoklaks inhibira Bcl-xL pa se time potiče aktivacija apoptoznog proteina BAK (Gonzalez-Gualda i sur., 2020).



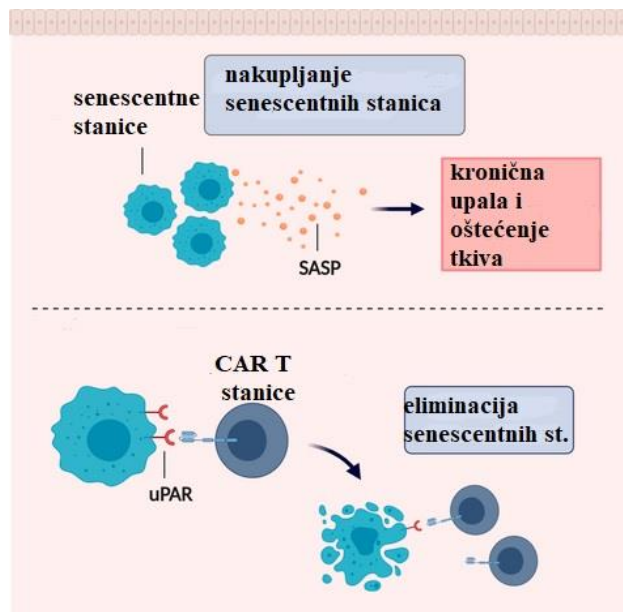
Slika 7. Aktivacija GAL-prolijekova u senescentnim stanicama (preuzeto i prilagođeno prema Gonzalez-Gualda i sur., 2020 uz dopuštenje izdavača).

4.3.11. CAR T STANICE

Kod IPF-a senescentne stanice imaju povećanu količinu eksprimiranih receptora uPAR (engl. *urokinase plasminogen activator receptor*). uPAR je receptor za urokinaza tip plazminogen aktivatora koji aktivira nastanak plazmina koji doprinosi fibrinolizi i razgradnji izvanstaničnog matriksa (Amor i sur., 2020).

Iz ljudske krvi se izoliraju T-stanice te se u laboratoriju naprave modificirane imunosne T stanice koje se nazivaju **CAR T stanice** (engl. *chimeric antigen receptor T cells*). CAR T stanice imaju na svojoj površini transmembranske kimerne antigenske receptore koji imaju sposobnost prepoznati antigen preko svoje izvanstanične domene, a preko unutarstanične domene dolazi do prijenosa signala i aktiviraju se T stanice koje će imati citotoksično djelovanje. CAR T stanice se mogu koristiti kao senolitici jer preko svojih površinskih

kimernih antigenskih receptora mogu prepoznati uPAR receptore na površini senescentnih stanica te potaknuti selektivno uklanjanje senescentnih stanica (**Slika 8**). Terapija CAR T stanicama se inače koristi i kao antitumorska terapija za selektivno uklanjanje tumorskih stanica, ali se mogu upotrebljavati i kao senolitici za selektivno uklanjanje senescentnih stanica (Amor i sur., 2020).

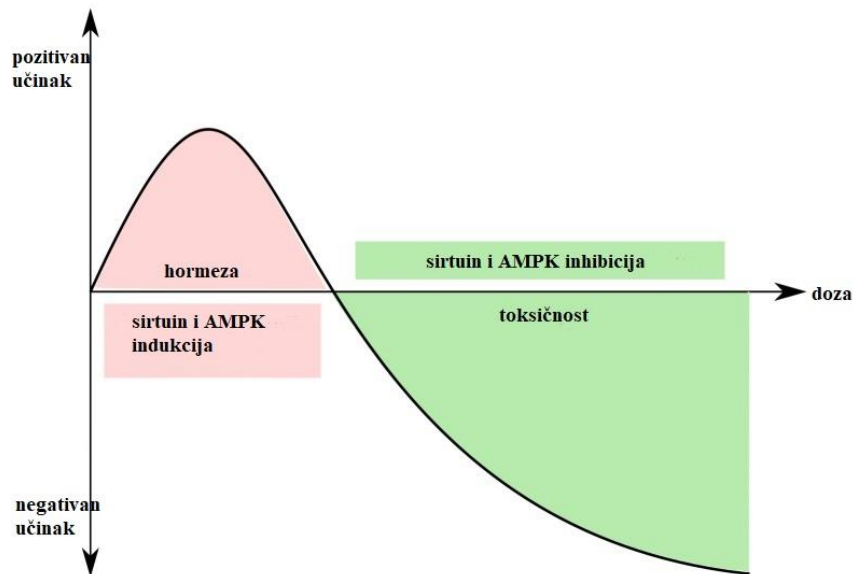


Slika 8. CAR T stanice selektivno ubijaju senescentne stanice preko prepoznavanja uPAR receptora (preuzeto i prilagođeno prema Hajdu i Bonamino, 2020 uz dopuštenje izdavača).

4.3.12. KURKUMIN I ANALOG KURKUMINA EF24

Kurkumin je polifenol iz žutog korijena biljke kurkuma (lat. *Curcuma longa*). Problem je loša biorasploživost, slabo se apsorbira iz crijeva i prebrzo se metabolizira te eliminira iz organizma. Biorasploživost kurkumina se poboljšava dodatkom piperina koji se dobiva iz papra. Konjugacijom kurkumina s alginatom se može povećati topljivost u vodi i stabilnost ili izradom liposoma, nanočestica, mikroemulzija. Prisutan je hormeza odgovor kurkumina pri čemu kod niskih doza djeluje stimulirajuće i kao zaštitni agens, a pri visokim dozama djeluje inhibirajuće i kao toksični agens koji potiče senescenciju. Kurkumin ima pleiotropni učinak jer ima sposobnost da ulazi u interakciju s brojnim transkripcijskim čimbenicima (npr. NF- κ B, STAT), čimbenicima rasta (TGF- β), receptorima, enzimima, kinazama (MAPK), regulatorima apoptoze (Bcl-2), proteinima (p53) te citokinima (IL-8, TNF). Kurkumin ima antitumorsko djelovanje. Također, ima protuupalno i antioksidacijsko djelovanje, čime se sprječava oštećenje DNA i senescencija uzrokovana oksidacijskim stresom. Kurkumin u

niskim dozama može povećati razinu sirtuina i AMPK što sprječava induciranje senescencije, a u visokim dozama smanjuje razinu sirtuina i AMPK što potiče senescenciju (**Slika 9**). Povećanjem razine sirtuina (deacetilaze) dolazi do deacetiliranja i inhibiranja transkripcijskog čimbenika NF- κ B. Aktivacijom AMPK dolazi do inhibiranja mTOR signalnog puta (Bielak-Zmijewska i sur., 2019).



Slika 9. Pozitivan i negativan učinak kurkumina ovisno o dozi (preuzeto i prilagođeno prema Bielak-Zmijewska i sur., 2019 uz dopuštenje izdavača).

Problem je što nije definirana točna doza koja bi trebala biti dovoljno visoka za terapijski učinak unatoč slaboj biorasploživosti, a da nije previsoka da ne prijeđe u toksičan učinak.

EF24 je analog kurkumina koji pokazuje senolitički učinak i ima bolju biorasploživost u usporedbi s kurkuminom. Selektivno u senescentnim stanicama potiče razgradnju antiapoptoznih Bcl-2 proteina u proteasomu. Time senescentne stanice gube sposobnost da se odupiru apoptozi. Dodatkom inhibitora proteasoma MG132 se poništio učinak EF24 čime je dokazan mehanizam djelovanja EF24 (Li i sur., 2019).

Navitoklaks (ABT263) je inhibitor Bcl-2 antiapoptoznih proteina koji pokazuje sinergistički učinak sa EF24 pa se u toj kombinaciji može smanjiti doza navitoklaksa. U toj kombinaciji se smanjenjem doze navitoklaksa može spriječiti nuspojava trombocitopenija (Li i sur., 2019).

4.4. UPOTREBA SENOTERAPEUTIKA U DRUGIM PLUĆNIM BOLESTIMA

4.4.1. ASTMA

Astma je kronična upalna bolest dišnih puteva. Dolazi do bronhospazma, stezanja glatkih mišića dišnih puteva pa je time otežan protok zraka. Najčešći simptomi su kašljanje, kratkoća daha i osjećaj pritiska u prsima.

Astma može biti uzrokovana genetskim i okolišnim čimbenicima (alergeni, zagađen zrak, kemijske tvari) (Wang i sur., 2020).

Kod astme dolazi do nakupljanja senescentnih stanica. Senescentne stanice izlučuju proupalne SASP medijatore pa to dodatno pridonosi samoj kroničnoj upali. Senescentne stanice nastaju zbog oštećenja DNA prilikom skraćivanja telomera, zbog oksidacijskog stresa ili disfunkcije mitohondrija te također i pod utjecajem alergena se može inducirati senescencija u epitelnim, matičnim i imunskim stanicama. Povećana je količina markera oštećenja DNA γ H2AX, člana obitelji histona koji prepoznaje dvolančane lomove DNA (Wang i sur., 2020).

Kod astme je provedeno jako malo istraživanja.

Primijećena je povećana količina senescentnih stanica s povišenom ekspresijom markera p16, p21 i β -gal te povećano izlučivanje proupalnog citokina IL-6 koji uzrokuje povećano nakupljanje neutrofila i eozinofila kod astme (Parikh i sur., 2019).

Epitelne i stromalne stanice proizvode timusni stromalni limfopoetin (TSLP, engl. *thymic stromal lymphopoetin*), proalergijski hematopoetski citokin koji je povišen kod astme i uzrokuje Th2 (engl. *T helper cell*) upalu te dodatno potiče ekspresiju markera senescentnih stanica p21, p16 i SA- β -Gal. Male interferirajuće RNA (siRNA, engl. *small interfering RNA*) su nekodirajuće male RNA koje mogu blokirati p21 i p16, a time i TSLP-induciranu senescenciju (Parikh i sur., 2019).

STAT3 (engl. *signal transducer and activator of transcription 3*) je transkripcijski čimbenik koji je povećano ekspimiran u senescentnim fibroblastima (Wang i sur., 2020).

STAT3 inhibitor će blokadom STAT3 uzrokovati inhibiciju TSLP signalnog puta, a time i senescenciju. Terapija kortikosteroidima ne utječe na povećanu ekspresiju p21 (Parikh i sur., 2019).

Predlaže se da senoterapeutici azitromicin, metformin, rapamicin i resveratrol mogu poticati apoptozu senescentnih stanica i time smanjiti izlučivanje proupalnih SASP medijatora pa će se smanjiti kronična upala. Na ljudima se još nisu provela istraživanja s ovim lijekovima, ali se smatra da bi trebali djelovati (Wang i sur., 2020).

Navedeni lijekovi se već koriste radi drugih indikacija pa bi istraživanje i ispitivanje trebalo biti olakšano zbog toga.

4.4.2. COVID-19

Koronavirusna bolest COVID-19 (engl. *coronavirus disease 2019*) je zarazna bolest uzrokovana novim koronavirusom SARS-CoV-2 (engl. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*). Ovaj koronavirus ima sposobnost prepoznati receptore na stanici domaćina i ući u stanicu. Receptori koje prepoznaje su angiotenzin konvertirajući enzim 2 (ACE2, engl. *angiotensin-converting enzyme 2*) i CD26 (Sargiacomo i sur., 2020).

Senescentne stanice imaju povećanu ekspresiju tih receptora i zato osobe koje su starije dobi će biti više pogođene tim virusom jer imaju veću količinu senescentnih stanica u plućima koje su meta virusa. Starije osobe i osobe s kroničnim bolestima (rak, KOPB, dijabetes, hipertenzija) imaju veću količinu senescentnih stanica koje su meta koronavirusa i zato takve osobe koje se razbole od COVID-19 češće završe sa smrtnim ishodom. Pretpostavlja se da bi osobe na terapiji senoterapeuticima (npr. rapamicinom) bile manje podložne infekciji koronavirusom zato jer bi se smanjila količina senescentnih stanica koje su meta koronavirusa (Sargiacomo i sur., 2020).

Jako je malo istraživanja provedeno na ljudima pa se sva predložena terapija mora tek istražiti i ispitati. Istraživanja bi mogla biti olakšana jer je riječ o lijekovima koji su već u prometu jer se koriste u svrhu određenih indikacija pa je sigurnost lijekova već provjerena te treba provjeriti učinkovitost i mogu li se navedeni lijekovi koristiti izvan navedenih indikacija.

Za liječenje se predlažu **rapamicin (sirolimus)** i **kvercetin** koji imaju senolitički učinak i blokiraju SASP. Rapamicin je inhibitor mTORa. Kvercetin može vezati virusni protein šiljak (engl. *spike protein*) i time sprječiti interakciju virusa s ACE2 receptorima na stanicama domaćina. Predlažu se i antibiotici **doksiciklin** i **azitromicin** jer blokiraju sintezu proteina, blokiraju virusnu replikaciju i djeluju protuupalno reducirajući stvaranje SASP medijatora kao što je IL-6, te pokazuju senolitički učinak (Sargiacomo i sur., 2020).

Govorimo o virusnoj infekciji, a istraživanja su provedena s antibioticima jer iako se antibiotici inače koriste za liječenje bakterijskih infekcija, imaju također protuupalno i potencijalno protuvirusno djelovanje.

Kombinacija hidroksi-klorokina i azitromicina je učinkovita za sprječavanje stvaranja novih virusnih čestica. Spoj srodan klorokinu, **hidroksi-klorokin** se primarno koristi za prevenciju i liječenje malarije. Klorokin i derivati se također mogu koristiti kao senolitici jer imaju sposobnost da u lizosomima senescentnih stanica povise pH u alkalni što sprječava nakupljanje β -galaktozidaze koja je marker senescentnih stanica (Sargiacomo i sur., 2020).

Azitromicin inducira apoptozu jer inhibira Bcl-xL antiapoptozni protein (Malavolta i sur., 2020).

Postoje još neki lijekovi koji se predlažu za terapiju COVID-19.

Tocilizumab je monoklonsko protutijelo koje blokira IL-6R (receptor za IL-6) koji je glavni proupalni SASP medijator. Tocilizumab se inače koristi za liječenje reumatoidnog artritisa (Malavolta i sur., 2020).

Ruksolitinib je inhibitor JAK kinaze, a blokadom Janus kinaza se inhibira signalizacija citokina. Ruksolitinib inhibira SASP odgovor (Malavolta i sur., 2020). Ovaj lijek inače ima terapijsku primjenu kod mijelofibroze za liječenje splenomegalije i kod policitemije vere (prekomjerne proizvodnje crvenih krvnih stanica).

Melatonin blokira SASP u fibroblastima pluća (Malavolta i sur., 2020).

5. ZAKLJUČCI

Razvijeni su novi lijekovi senoterapeutici koji se mogu koristiti kao terapija kroničnih plućnih bolesti. Senoterapeutici djeluju na sam uzrok bolesti i time se sprječava napredak kroničnih plućnih bolesti. Kod takvih bolesti su prisutne velike nakupine senescentnih stanica. Razlikujemo senolitike i senostatike. Senolitici su lijekovi koji ubijaju senescentne stanice, dok su senostatici lijekovi koji sprječavaju nastanak senescentnih stanica.

Prirodni senolitici su kvercetin, fisetin, piperlongumin, kurkumin i kardiotionični glikozidi. Nedostatak im je slaba bioraspodivost, a prednost im je niska toksičnost.

Piperlongumin je alkaloid iz biljke koji potiče razgradnju proteina OXR1 u proteasomu, a time potiče stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva i oksidacijski stres u senescentnim stanicama.

Fisetin i kvercetin su biljni flavonoidi koji pokazuju senolitički učinak. Fisetin inhibira PI3K signalni put te pokazuje protuupalno i antioksidacijsko djelovanje. Kvercetin je inhibitor antiapoptoznih proteina Bcl-2 i Bcl-xL te inhibira PI3K signalni put.

Blokadom Na^+/K^+ pumpe se pokazao senolitički učinak kardiotioničnih glikozida. Kardiotionični glikozidi uzrokuju apoptozu senescentnih stanica također i preko induciranja proapoptoznog proteina NOXA.

Kurkumin u niskim dozama može povećati razinu sirtuina i AMPK što sprječava induciranje senescencije.

EF24 je analog kurkumina koji ima bolju bioraspodivost u usporedbi s kurkuminom, a potiče razgradnju antiapoptoznih Bcl-2 proteina u proteasomu.

Sintetizirani su sintetski senolitici, ali dosta njih ima nuspojave i toksični su što otežava moguća ispitivanja na ljudima, pa su zato većinom istraživanja provedena na miševima.

Problem je što meta djelovanja senolitika nije dovoljno selektivna za senescentne stanice, jer je meta djelovanja prisutna također u nesenescentnim stanicama.

Proizvedeni su galaktoza-konjugirani senolitički prolijekovi čime se riješio problem toksičnosti navitoklaksa jer su se takvi prolijekovi aktivirali selektivno u senescentnim stanicama.

Izrađeni su sintetski lijekovi A1331852 i A1155463. Selektivni su prema isključivo Bcl-X_L pa je manja vjerojatnost nuspojava za razliku od navitoklaksa (ABT263) koji inhibira Bcl-X_L, Bcl-2 i Bcl-W. Blokadom antiapoptoznih proteina se potiče apoptoza senescentnih stanica.

Panobinostat ima senolitički učinak pri čemu smanjuje ekspresiju Bcl-X_L antiapoptoznog proteina i kao inhibitor HDAC povećava acetilaciju H3 proteina koja je kod senescencije inače smanjena.

Napravljen je sintetski peptid FOXO4-DRI koji istisne FOXO4 i veže se za p53 te se time potiče apoptoza.

Dasatinib kao antitumorski lijek pokazuje senolitički učinak blokadom tirozin kinaze. Senescentne stanice liče na tumorske stanice jer su otporne na apoptozu.

Inhibitori Hsp90 će inducirati defosforilaciju AKT, a time povećat osjetljivost senescentnih stanica na apoptozu.

U laboratoriju su napravljene modificirane imunosne T stanice koje se nazivaju CAR T stanice. CAR T stanice mogu preko svojih površinskih kimernih antigenskih receptora prepoznati uPAR receptore na površini senescentnih stanica te potaknuti selektivno uklanjanje senescentnih stanica.

Svi senolitici imaju različit mehanizam djelovanja, ali glavni princip je da senolitici onemogućavaju SCAP (engl. *senescent cell anti-apoptotic pathways*) antiapoptozne putove kojima se senescentna stanica štiti od apoptoze. Time se potiče apoptoza senescentnih stanica.

Najbolje je senolitike kombinirati sa senostaticima jer senostatici sprječavaju stanice da postanu senescentne blokirajući signalne putove koji vode u senescenciju.

Problem senostatika je što njihova meta djelovanja ima također i fiziološke funkcije koje nisu povezane sa senescencijom pa se povećava rizik od mogućih nuspojava.

Rapamicin (sirolimus) inhibira mTOR. Problem je što meta rapamicina mTOR nije isključivo vezana uz senescenciju nego ima i funkciju kod staničnog rasta, proliferacije i sinteze proteina pa su zato moguće i nuspojave. Pokušavaju se napraviti rapamicin-analozi (rapalogs) koji će imati manje nuspojave (npr. everolimus, temsirolimus).

Antioksidansi mogu spriječiti oksidacijski stres, a time i senescenciju. Postoje aktivatori Nrf2 (sulforafan i bardoksolon), ali su nespecifični i toksični. Melatonin ima protuupalno i antioksidacijsko djelovanje te se smanjuje oksidacijski stres. Melatonin potiče aktivnost antioksidacijskih enzima kao što su superoksid dismutaza i glutation peroksidaza. Sprječavanjem oksidacijskog stresa se sprječava senescencija.

Metformin i AICAR aktiviraju AMPK, a time se inhibira mTOR. Inhibicijom mTOR-a se blokira signalni put koji vodi u senescenciju.

Kod senescencije su reducirane endogene zaštitne molekule sirtuini. Resveratrol je polifenol iz biljaka koji aktivira sirtuin-1, ali se slabo apsorbira iz crijeva i prebrzo se metabolizira. Razvili su se sintetski lijekovi STAC koji imaju bolju bioraspodjelivost u usporedbi s resveratrolom.

Lijekovi antagomiri miR-34a/miR-570 su kemijski modificirani oligonukleotidi koji komplementarnim vezanjem blokiraju specifičnu miRNA. Time se povećava količina zaštitnih molekula sirtuina koji nas štite od senescencije.

Senescentne stanice su same po sebi jako heterogene pa treba proizvesti lijek koji će djelovati na sve senescentne stanice, a da pri tome neće negativno djelovati na zdrave stanice. Treba otkriti najbolju kombinaciju senolitikuma i senostatika koja bi djelovala na različite mehanizme istovremeno i koja bi obuhvatila sve štetne senescentne stanice. Učinkovitost takvih lijekova je dokazana na životinjskim modelima, ali je potrebno provesti još puno istraživanja i ispitivanja da bi se dokazala njihova učinkovitost i sigurnost za ljude.

6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

- ACE2 - angiotenzin konvertirajući enzim 2 (engl. *angiotensin-converting enzyme 2*)
- AICAR - 5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonukleotid (engl. *5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside*)
- AKT - PKB, proteinska kinaza B (engl. *protein kinase B*)
- AMPK - 5'-adenozin monofosfat aktivirana proteinska kinaza (engl. *AMP-activated protein kinase*)
- APAF-1 - aktivirajući čimbenik apoptotske proteaze 1 (engl. *apoptotic protease activating factor 1*)
- ATM - ataksija telangiektazija mutiran (engl. *ataxia telangiectasia mutated*)
- BAK - Bcl-2 antagonist (engl. *Bcl-2 antagonist / killer*)
- BAX - Bcl-2 povezan X protein (engl. *Bcl-2-associated X protein*)
- Bcl-2 - B stanica limfoma-2 (engl. *B cell lymphoma-2*)
- CAR - kimerni antigenski receptor (engl. *chimeric antigen receptor*)
- Cdk - ciklin-ovisna kinaza (engl. *cyclin-dependent kinase*)
- COVID - koronavirusna bolest (engl. *coronavirus disease*)
- FOXO - engl. *forkhead box family O*
- FOXO-DRI - engl. *forkhead box family O D-retro-inverso*
- HDAC - histonska deacetilaza (engl. *histone deacetylase*)
- Hsp - protein toplinskog šoka (engl. *heat shock proteins*)
- HUVEC - ljudske primarne endotelne stanice pupčane vene (engl. *human umbilical vein endothelial primary cells*)
- IL-6R - receptor za IL-6
- IPF - idiopatska plućna fibroza (engl. *idiopathic pulmonary fibrosis*)
- JAK - Janus kinaza (engl. *Janus kinase*)
- KOPB - kronična opstruktivska plućna bolest (engl. *chronic obstructive pulmonary disease*)
- MAPK- mitogenom -aktivirana proteinska kinaza (engl. *mitogen-activated protein kinase*)
- Mdm2 - mišja dvostruka minuta 2 homologije (eng. *mouse double minute 2 homolog*)
- miRNA - mikroRNA (engl. *microRNA*)
- mTOR - ciljni enzim za rapamicin u sisavaca (engl. *mammalian target of rapamycin*)
- NK - prirodne ubojice (engl. *natural killer*)

- NADPH - reducirani oblik nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)
- NF- κ B- nuklearni čimbenik κ B (engl. *nuclear factor- κ B*)
- NOXA - forbol-12-miristat-13-acetat-inducirani protein 1 (PMAIP1, engl. *phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*)
- OXR1 - rezistencija na oksidaciju 1 (engl. *oxidation resistance 1*)
- PAI - inhibitor aktivatora plazminogena (engl. *plasminogen activator inhibitor*)
- PAMP - molekularni obrasci povezani s patogenima (engl. *pathogen-associated molecular patterns*)
- PGC-1 α - peroksisom proliferator-aktiviran receptor γ koaktivator (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator*)
- PI3K - fosfatidilinozitol-3-kinaza (engl. *phosphoinositide-3-kinase*)
- PTEN - homolog fosfataze i tenzina (engl. *phosphatase and tensin homolog*)
- RB - retinoblastom protein (engl. *retinoblastoma protein*)
- SA- β -Gal - β -galaktozidaza povezana sa senescencijom (engl. *senescence-associated β -galactosidase*)
- SARS-CoV-2- teški akutni respiratorni sindrom koronavirus 2 (engl. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*)
- SASP - sekretorni fenotip povezan sa senescencijom (engl. *senescence associated secretory phenotype*)
- SCAP - antiapoptozni putevi senescentne stanice (engl. *senescent cell anti-apoptotic pathways*)
- SHIP-1 - domena Src homologije 2 (SH2) koja sadrži inozitol polifosfat-5-fosfatazu-1 (engl. *Src homology 2 (SH2) domain containing inositol polyphosphate 5-phosphatase 1*)
- siRNA - male interferirajuće RNA (engl. *small interfering RNA*)
- SSK1 - senescentna-specifična ubijajuća komponenta (engl. *senescence-specific killing compound 1*)
- STAC - sirtuin aktivirajuće komponente (engl. *sirtuin activating compounds*)
- STAT3 - pretvarač signala i aktivator transkripcije 3 (engl. *signal transducer and activator of transcription 3*)
- TGF- β - transformirajući čimbenik rasta beta (engl. *transforming growth factor beta*)
- Th2 - pomoćna T stanica (engl. *T helper cell*)
- TSLP - timusni stromalni limfopoetin (engl. *thymic stromal lymphopoetin*)

- uPAR - receptor za urokinaza tip plazminogen aktivatora (engl. *urokinase plasminogen activator receptor*)
- VEGF - vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*)
- WHO - Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)

7. LITERATURA

Amor C, Feucht J, Leibold J, Ho YJ, Zhu C, Alonso-Curbelo D, Mansilla-Soto J, Boyer JA, Li X, Giavridis T, Kulick A, Houlihan S, Peerscke E, Friedman SL, Ponomarev V, Piersigilli A, Sadelain M, Lowe SW. Senolytic CAR T cells reverse senescence-associated pathologies. *Nature*, 2020, 583(7814), 127-132.

Baker JR, Donnelly LE, Barnes PJ. Senotherapy: A New Horizon for COPD Therapy. *Chest*, 2020, 158(2), 562-570.

Barnes PJ, Baker J, Donnelly LE. Cellular Senescence as a Mechanism and Target in Chronic Lung Diseases. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019, 200(5), 556-564.

Bielak-Zmijewska A, Grabowska W, Ciolko A, Bojko A, Mosieniak G, Bijoch L, Sikora E. The Role of Curcumin in the Modulation of Ageing. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(5), 1239.

Cai Y, Zhou H, Zhu Y, Sun Q, Ji Y, Xue A, Wang Y, Chen W, Yu X, Wang L, Chen H, Li C, Luo T, Deng H. Elimination of senescent cells by β -galactosidase-targeted prodrug attenuates inflammation and restores physical function in aged mice. *Cell Res*, 2020, 30(7), 574-589.

Chronic respiratory diseases, <http://www.who.int>, pristupljeno 1.12.2021.

Demirci D, Dayanc B, Mazi FA, Senturk S. The Jekyll and Hyde of Cellular Senescence in Cancer. *Cells*, 2021, 10(2), 208.

Di Micco R, Krizhanovsky V, Baker D, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(2), 75-95.

Easter M, Bollenbecker S, Barnes JW, Krick S. Targeting Aging Pathways in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(18), 6924.

Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*, 2007, 35(4), 495-516.

Fuhrmann-Stroissnigg H, Niedernhofer LJ, Robbins PD. Hsp90 inhibitors as senolytic drugs to extend healthy aging. *Cell Cycle*, 2018, 17(9), 1048-1055.

Fuhrmann-Stroissnigg H, Ling YY, Zhao J, McGowan SJ, Zhu Y, Brooks RW, Grassi D, Gregg SQ, Stripay JL, Dorronsoro A, Corbo L, Tang P, Bukata C, Ring N, Giacca M, Li X, Tchkonja T, Kirkland JL, Niedernhofer LJ, Robbins PD. Identification of HSP90 inhibitors as a novel class of senolytics. *Nat Commun*, 2017, 8(1), 422.

Gonzalez-Gualda E, Paez-Ribes M, Lozano-Torres B, Macias D, Wilson 3rd JR, Gonzalez-Lopez C, Ou H-L, Miron-Barroso S, Zhang Z, Lerida-Viso A, Blandez JF, Bernardos A, Sancenon F, Rovira M, Fruk LJ, Martins CP, Serrano M, Doherty GH, Martinez-Manez R, Munoz-Espin D. Galacto-conjugation of Navitoclax as an efficient strategy to increase senolytic specificity and reduce platelet toxicity. *Aging Cell*, 2020, 19(4), e13142.

Guerrero A, Herranz N, Sun B, Wagner V, Gallage S, Guiho R, Wolter K, Pombo J, Irvine EE, Innes AJ, Birch J, Glegola J, Manshaei S, Heide D, Dharmalingam G, Harbig J, Olona A, Behmoaras J, Dauch D, Uren AG, Zender L, Vernia S, Martinez-Barbera JP, Heikenwalder M, Withers DJ, Gil J. Cardiac glycosides are broad-spectrum senolytics. *Nat Metabol*, 2019, 1(11), 1074-1088.

Justice JN, Nambiar AM, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Pascual R, Hashmi SK, Prata L, Masternak MM, Kritchevsky SB, Musi N, Kirkland JL. Senolytics in idiopathic pulmonary fibrosis: Results from a first-in-human, open-label, pilot study. *EbioMedicine*, 2019, 40, 554-563.

Kang C. Senolytics and Senostatics: A Two-Pronged Approach to Target Cellular Senescence for Delaying Aging and Age-Related Diseases. *Mol Cells*, 2019, 42(12), 821-827.

Kim E-C, Kim J-R. Senotherapeutics: emerging strategy for healthy aging and age-related disease. *BMB rep*, 2019, 52(1), 47-55.

Kirkland JL, Tchkonja T. Senolytic drugs: from discovery to translation. *J Intern Med*, 2020, 288(5), 518-536.

Li W, He Y, Zhang R, Zheng G, Zhou D. The curcumin analog EF24 is a novel senolytic agent. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(2), 771-782.

Liu R-M, Liu G. Cell senescence and fibrotic lung diseases. *Exp Gerontol*, 2020, 132, 110836.

Liu X, Wang Y, Zhang X, Gao Z, Zhang S, Shi P, Zhang X, Song L, Hendrickson H, Zhou D, Zheng G. Senolytic activity of piperlongumine analogues: Synthesis and biological evaluation. *Bioorg Med Chem*, 2018, 26(14), 3925-3938.

Malavolta M, Giacconi R, Brunetti D, Provinciali M, Maggi F. Exploring the Relevance of Senotherapeutics for the Current SARS-CoV-2 Emergency and Similar Future Global Health Threats. *Cells*, 2020, 9(4), 909.

Parikh P, Wicher S, Khandalavala K, Pabelick CM, Britt Jr RD, Prakash YS. Cellular senescence in the lung across the age spectrum. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2019, 316(5), L826-L842.

Raffaele M, Vinciguerra M. The costs and benefits of senotherapeutics for human health. *J-lancet*, 2022, volume 3, issue 1, E67-E77.

Samaraweera L, Adomako A, Rodriguez-Gabin A, McDaid HM. A Novel indication for Panobinostat as a Senolytic Drug in NSCLC and HNSCC. *Sci Rep*, 2017, 7(1), 1900.

Sargiacomo C, Sotgia F, Lisanti MP. COVID-19 and chronological aging: senolytics and other anti-aging drugs for the treatment or prevention of corona virus infection? *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(8), 6511-6517.

Sirolimus, <https://en.wikipedia.org/>, pristupljeno 9.1.2022.

Sumsuzzman DM, Khan ZA, Choi J, Hong Y. Differential role of melatonin in healthy brain aging: a systematic review and meta-analysis of the SAMP8 model. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(7), 9373-9397.

Triana-Martinez F, Picallos-Rabina P, Da Silva-Alvarez S, Pietrocola F, Lianos S, Rodilla V, Soprano E, Pedrosa P, Ferreiros A, Barradas M, Hernandez-Gonzalez F, Lalinde M, Prats N, Bernado C, Gonzalez P, Gomez M, Ikonomopoulou MP, Fernandez-Marcos PJ, Garcia-Caballero T, Del Pino P, Arribas J, Vidal A, Gonzalez-Barcia M, Serrano M, Loza MI, Dominguez E, Collado M. Identification and characterization of Cardiac Glycosides as senolytic compounds. *Nat Commun*, 2019, 10(1), 4731.

Wang Z-N, Su R-N, Yang B-Y, Yang K-X, Yang L-F, Yan Y, Chen Z-G. Potential Role of Cellular Senescence in Asthma. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8, 59.

Zhang L, Pitcher LE, Prahalad V, Niedernhofer LJ, Robbins PD. Targeting cellular senescence with senotherapeutics: senolytics and senomorphics. *FEBS J*, 2022, doi:10.1111/febs.16350.

Zhu Y, Doornebal EJ, Pirtskhalava T, Giorgadze N, Wentworth M, Fuhrmann-Stroissnigg H, Niedernhofer LJ, Robbins PD, Tchkonja T, Kirkland JL. New agents that target senescent cells: the flavone, fisetin, and the BCL- X_L inhibitors, A1331852 and A1155463. *Aging (Albany NY)*, 2017, 9(3), 955-963.

8. SAŽETAK

Kod kroničnih plućnih bolesti postoje nakupine senescentnih stanica. Senoterapeutici djeluju na sam uzrok bolesti i time se sprječava progresija plućnih bolesti. Senolitici su lijekovi koji potiču apoptozu senescentnih stanica. Prirodni senolitici su kvercetin, fisetin, piperlongumin, kurkumin i kardiotonični glikozidi. Nedostatak im je slaba bioraspoloživost, a prednost im je niska toksičnost. Sintetizirani su sintetski senolitici, ali dosta njih ima nuspojave. Senolitici onemogućavaju SCAP antiapoptozne putove kojima se senescentna stanica štiti od apoptoze. Time se potiče apoptoza senescentnih stanica. Postoje galaktoza-konjugirani senolitički prolijekovi, inhibitori Hsp90, dasatinib, panobinostat, A1331852, A1155463, navitoklaks (ABT263), sintetski peptid FOXO4-DRI te imunosna terapija CAR T stanicama. S druge strane, postoje senostatici koji sprječavaju stanice da postanu senescentne blokirajući signalne putove koji vode u senescenciju. Kombinacijom senolitika sa senostaticima se može djelovati na različite mehanizme istovremeno. Senostatici blokiraju PI3K-mTOR signalni put. Senostatici su rapamicin, metformin, AICAR, biljni polifenol resveratrol, STAC, antagonisti miR-34a/miR-570 te antioksidansi, uključujući melatonin. Sprječavanjem oksidacijskog stresa se sprječava oštećenje DNA, a time i senescencija. Zbog nuspojava rapamicina razvijeni su manje toksični lijekovi rapalogs. Zbog slabe bioraspoloživosti resveratrola razvijeni su sintetski STAC lijekovi. Većinom su sva ispitivanja provedena na miševima pa je potrebno još puno istraživanja provesti da bi se dokazala učinkovitost i sigurnost ovakvih lijekova na ljudima. Jedino ispitivanje na ljudima je provedeno s kombinacijom dasatinib i kvercetin čime se dokazala učinkovitost uz prihvatljive nuspojave.

SUMMARY

In chronic lung diseases, there are clusters of senescent cells. Senotherapeutics act on the cause of the disease and thus prevent the progression of lung diseases. Senolytics are drugs that promote apoptosis of senescent cells. Natural senolytics are quercetin, fisetin, piperlongumin, curcumin and cardiotonic glycosides. Their disadvantage is poor bioavailability, and their advantage is low toxicity. Synthetic senolytics have been synthesized, but many have side effects. Senolytics disable SCAP antiapoptotic pathways that protect the senescent cell from apoptosis. This promotes apoptosis of senescent cells. There are galactose-conjugated senolytic prodrugs, Hsp90 inhibitors, dasatinib, panobinostat, A1331852, A1155463, navitoclax (ABT263), the synthetic peptide FOXO4-DRI, and CAR T cell immune therapy. On the other hand, there are senostatics that prevent cells from becoming senescent by blocking signaling pathways leading to senescence. By combining senolytics with senostatics, different mechanisms can be acted upon simultaneously. Senostatics block the PI3K-mTOR signaling pathway. Senostatics include rapamycin, metformin, AICAR, plant polyphenol resveratrol, STAC, miR-34a / miR-570 antagonists, and antioxidants including melatonin. Preventing oxidative stress prevents DNA damage and thus senescence. Due to the side effects of rapamycin, less toxic drugs rapalogs have been developed. Due to the poor bioavailability of resveratrol, synthetic STAC drugs have been developed. Most of the tests have been performed on mice, so much more research is needed to prove the effectiveness and safety of such drugs in humans. The only human study was performed with a combination of dasatinib and quercetin to demonstrate efficacy with acceptable side effects.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

UPOTREBA SENOTERAPEUTIKA U TERAPIJI KRONIČNIH PLUĆNIH BOLESTI

Tihana Stokanović

SAŽETAK

Kod kroničnih plućnih bolesti postoje nakupine senescentnih stanica. Senoterapeutici djeluju na sam uzrok bolesti i time se sprječava progresija plućnih bolesti. Senolitici su lijekovi koji potiču apoptozu senescentnih stanica. Prirodni senolitici su kvercetin, fisetin, piperlongumin, kurkumin i kardiotionični glikozidi. Nedostatak im je slaba bioraspodijelivost, a prednost im je niska toksičnost. Sintetizirani su sintetski senolitici, ali dosta njih ima nuspojave. Senolitici onemogućavaju SCAP antiapoptozne putove kojima se senescentna stanica štiti od apoptoze. Time se potiče apoptoza senescentnih stanica. Postoje galaktoza-konjugirani senolitički prolijekovi, inhibitori Hsp90, dasatinib, panobinostat, A1331852, A1155463, navitoklaks (ABT263), sintetski peptid FOXO4-DRI te imunosna terapija CAR T stanicama. S druge strane, postoje senostatici koji sprječavaju stanice da postanu senescentne blokirajući signalne putove koji vode u senescenciju. Kombinacijom senolitika sa senostaticima se može djelovati na različite mehanizme istovremeno. Senostatici blokiraju PI3K-mTOR signalni put. Senostatici su rapamicin, metformin, AICAR, biljni polifenol resveratrol, STAC, antagomiri miR-34a/miR-570 te antioksidansi, uključujući melatonin. Sprječavanjem oksidacijskog stresa se sprječava oštećenje DNA, a time i senescencija. Zbog nuspojave rapamicina razvijeni su manje toksični lijekovi rapalogs. Zbog slabe bioraspodijelivosti resveratrola razvijeni su sintetski STAC lijekovi. Većinom su sva ispitivanja provedena na miševima pa je potrebno još puno istraživanja provesti da bi se dokazala učinkovitost i sigurnost ovakvih lijekova na ljudima. Jedino ispitivanje na ljudima je provedeno s kombinacijom dasatinib i kvercetin čime se dokazala učinkovitost uz prihvatljive nuspojave.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 38 stranica, 9 grafičkih prikaza, 0 tablica i 32 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Astma, COVID-19, idiopatska plućna fibroza, kronična opstruktivna plućna bolest, senolitici, senostatici, senoterapeutici

Mentor: **Dr. sc. Anita Somborac Bačura**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Anita Somborac Bačura**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Andrea Hulina Tomašković, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: travanj, 2022.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: pharmacy
Department of medical biochemistry and hematology
Kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

USE OF SENOTHERAPEUTICS IN THE TREATMENT OF CHRONIC PULMONARY DISEASES

Tihana Stokanović

SUMMARY

In chronic lung diseases, there are clusters of senescent cells. Senotherapeutics act on the cause of the disease and thus prevent the progression of lung diseases. Senolytics are drugs that promote apoptosis of senescent cells. Natural senolytics are quercetin, fisetin, piperlongumin, curcumin and cardiotonic glycosides. Their disadvantage is poor bioavailability, and their advantage is low toxicity. Synthetic senolytics have been synthesized, but many have side effects. Senolytics disable SCAP antiapoptotic pathways that protect the senescent cell from apoptosis. This promotes apoptosis of senescent cells. There are galactose-conjugated senolytic prodrugs, Hsp90 inhibitors, dasatinib, panobinostat, A1331852, A1155463, navitoclax (ABT263), the synthetic peptide FOXO4-DRI, and CAR T cell immune therapy. On the other hand, there are senostatics that prevent cells from becoming senescent by blocking signaling pathways leading to senescence. By combining senolytics with senostatics, different mechanisms can be acted upon simultaneously. Senostatics block the PI3K-mTOR signaling pathway. Senostatics include rapamycin, metformin, AICAR, plant polyphenol resveratrol, STAC, miR-34a / miR-570 antagonists, and antioxidants including melatonin. Preventing oxidative stress prevents DNA damage and thus senescence. Due to the side effects of rapamycin, less toxic drugs rapalogs have been developed. Due to the poor bioavailability of resveratrol, synthetic STAC drugs have been developed. Most of the tests have been performed on mice, so much more research is needed to prove the effectiveness and safety of such drugs in humans. The only human study was performed with a combination of dasatinib and quercetin to demonstrate efficacy with acceptable side effects.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 38 pages, 9 figures, 0 tables and 32 references. Original is in Croatian language.

Keywords: asthma, COVID-19, idiopathic pulmonary fibrosis, chronic obstructive pulmonary disease, senolytics, senostatics, senotherapeutics

Mentor: **Anita Somborac Bačura, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Anita Somborac Bačura, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Lidija Bach-Rojecky, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Andrea Hulina Tomašković, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: April, 2022