

SENESCENCE: DEFINITION, MECHANISMS OF OCCURENCE AND DETECTION IN TISSUES

SENESENCIJA: DEFINICIJA, MEHANIZMI NASTANKA I DETEKCIJA U TKIVIMA

Vladimir Mijajlović¹, Silvio De Luka², Emilija Manojlović Gačić³

¹ Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Beograd, Srbija

² Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za patološku fiziologiju „Ljubodrag Buba Mihailović“, Beograd, Srbija

³ Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za patologiju "Dr Đorđe Joannović", Beograd, Srbija

Correspondence: md.vladapath@gmail.com

Abstract

A cellular senescence represents a state, which is defined as a stable blockage of the cellular cycle in the G1 phase, as an answer to multiple triggers and their qualitative and quantitative characteristics. Alongside the blockage of the cellular cycle, the cellular senescence process is very dynamic. The process includes different morphological and intracellular changes, gene expression changes, epigenetic modification, macromolecular damages, cellular metabolism deregulation and the appearance of complex proinflammation secretory phenotype, which is a powerful modulator and contributor in many biochemical processes, not only in senescent cells but also in their neighboring areas. Cellular senescence may have, next to the already mentioned autocrine, also a paracrine effect on the close and more distant surroundings. In past decades, in both *in vivo* and *in vitro* experiments, physiological and pathological influences of cellular senescence, on numerous processes in the human body, have been proven and documented. In particular, oncogene-induced cellular senescence (under *in vitro* conditions), has shown significant influence of this process on the suppression of tumorigenesis. Cellular senescence does not only suppress proliferation and promotion of tumour cells, but it also facilitates their removal through the process of immunological surveillance. In case immunological surveillance is not successful, senescent cells may lead to the state of chronic inflammation of the microenvironment (through different biochemical processes), which leads to the initiation of tumor formation, and later migration, angiogenesis, and final metastasis and implementation of tumor cells in remote parts of the human body. Next to all mentioned, cellular senescence may be initiated as an answer to a genotoxic stress, caused by the received therapy. Therefore, detection of senescence cells after the therapy, together with their monitoring is a key step to early detection of premalignant events, as well as to the application of adequate preventive and early therapeutic protocols.

Keywords:

senescence,
aging,
senescence associated
secretory phenotype,
tumorigenesis

Sažetak

Ključne reči:

senescencija,
starenje,
sekretorni
fenotip povezan
sa starenjem,
tumorogeneza

Senescencija predstavlja stanje koje se definiše kao stabilno zaustavljanje ćelijskog ciklusa, u njegovoj G1 fazi, a kao odgovor na delovanje pregršt različitih okidača i njihovih kvantitativnih i kvalitativnih karakteristika. Osim samog čina zaustavljanja ćelijskog ciklusa, proces senescencije je vrlo dinamičan, uključuje prateće i različite morfološke i intracelularne promene, promene u ekspresiji gena, epigenetske modifikacije, makromolekularna oštećenja, deregulaciju ćelijskog metabolizma i pojavu složenog proinflamatornog sekretornog fenotipa, moćnog modulatora i aktera brojnih biohemijskih dešavanja kako unutar samih senescentnih ćelija, tako i u njihovom okruženju. Osim pomenutog autokrinog, senescencija ima i parakrina dejstva na bližu i dalju okolinu. Decenijama unazad, u *in vivo* i *in vitro* uslovima, dokazani su i dokumentovani brojni, kako fiziološki, tako i patološki uticaji senescencije na mnogobrojne procese u ljudskom telu. Upravo je onkogenima izazvan proces senescencije u *in vitro* uslovima pokazao značajan uticaj ovog procesa na supresiju tumorogeneze. Senescencija ne samo da zaustavlja proliferaciju i promociju tumorskih ćelija već i značajno olakšava njihovo uklanjanje putem procesa imunološkog nadzora. Ukoliko imunološki nadzor doživi neuspeh, senescentne ćelije putem brojnih biohemijskih procesa dovode do stanja hronične inflamacije, mikrookruženja koje favorizuje inicijaciju nastanka tumora, kasnije migraciju i angiogenezu i, na kraju, metastaziranje i implantaciju tumorskih ćelija na udaljena mesta u ljudskom telu. Pored svega do sada navedenog, senescencija se može inicirati i kao odgovor na genotoksični stres nakon primenjene terapije. Upravo ovaj momenat, pojava senescentnih ćelija nakon primenjene terapije i njihovo praćenje, ključan je za otkrivanje potencijalnih premalignih događaja, kao i za primenu adekvatnih preventivnih i ranih terapijskih protokola.

Uvod i kratak istorijat senescencije

Senescencija je ireverzibilno zaustavljanje proliferacije u oštećenim normalnim ćelijama koje su izašle iz ćelijskog ciklusa. Ove ćelije pokazuju visoku metaboličku aktivnost, ostaju samoodržive i odolevaju apoptozi. Senescentne ćelije poseduju jedinstvene morfološke i molekularne karakteristike i funkcije koje ih razlikuju od drugih populacija ćelija koje se ne dele, kao što su ćelije u fazi mirovanja i terminalno diferencirane ćelije (1).

Hajflik (*Haiflick*) i Murhed (*Moorhead*) prvi put su opisali proces senescencije *in vitro* u sojevima ljudskih fetalnih diploidnih ćelija 1961. godine, da bi objasnili konačnost životnog veka normalnih ljudskih ćelija jer se one ne razmnožavaju beskonačno. Ovaj fenomen je ranije bio povezan sa malignom transformacijom, pošto maligne ćelije poseduju potencijal za neograničenu ćelijsku deobu i beskonačan životni vek. Tokom narednih decenija i kroz niz studija, hipoteza da senescencija predstavlja evolutivni homeostatski mehanizam, zadužen da nepovratno ograniči ćelijsku proliferaciju oštećenih ćelija koje su na korak od maligne transformacije, postala je šire prihvaćena (2, 3).

Cilj ovog rada je sagledavanje najnovijih naučnih saznanja iz oblasti senescencije, kao i njihove primene u terapiji pacijenata sa oboljenjima u kojima je detektovana senescencija.

Mehanizmi senescencije i regulacija procesa

Osnovna obeležja senescencije uključuju: produženo zaustavljanje ćelijskog ciklusa, promene na nivou procesa transkripcije, sticanje bioaktivnog sekretoma, poznatog kao sekretorni fenotip povezan sa senescencijom (engl.

senescence associated secretory phenotype - SASP), makromolekularna oštećenja i deregulisani metabolizam (4).

Brojna istraživanja ukazuju da postoji nekoliko tipova senescencije. Replikativna senescencija (engl. *replicative senescence* - RS) prvi je opisani podtip senescencije. Indukuje se nakon serijskog razmnožavanja normalnih ljudskih ćelija u kulturi i uzrokovana je skraćivanjem telomera i posledičnim nagomilavanjem lezija DNK (5). Na ograničeni životni vek kultivisanih primarnih ćelija utiču vrsta i tip tkiva iz koga su potekle. Osim pomenute replikativne senescencije, senescencija može biti pokrenuta i mnogim drugim, kako endogenim, tako i egzogenim faktorima, posebno oksidativnim oštećenjima, poremećajima metabolizma, citokinima, aktivacijom onkogenih - onkogenima idukovana senescencija (engl. *oncogene induced senescence* - OIS), stresom indukovana senescencija (engl. *stress induced senescence* - SIS) i senescencija indukovana hemioterapijskim agensima (engl. *therapy induced senescence* - TIS). Svi pomenuti faktori mogu dovesti do oštećenja DNK i indukcije procesa senescencije, kako u normalnim ćelijama, tako i u ćelijama koje su već oštećene (npr. u (pre)malignim ćelijama). Senescencija je proces koji se dešava ne samo *in vitro* (tj. u modelima ćelijskih kultura) već i u različitim tkivima *in vivo* (1, 6). Važan je faktor koji doprinosi malignoj transformaciji ćelija i starenju, na taj način ukrštajući i povezujući puteve dva biološka procesa koje karakterišu vremenski zavisna akumulacija oštećenja i posledična disfunkcija ćelija (7). Proliferativni zastoj predstavlja ranu barijeru u malignoj transformaciji ćelija, sprečavajući propagaciju oštećene DNK na sledeću generaciju ćelija. Iz pomenutog se nameće zaključak da je zaobilaženje aktivacije procesa senescencije korak neophodan za malignu transformaciju (8). Senescentne ćelije

mogu uticati na svoje lokalno okruženje putem proinflatornih sposobnosti, čime mogu da podstiču rast transformisanih i/ili (pre)malignih susednih ćelija u kulturi i *in vivo* (9). Akumulacija senescentnih ćelija u različitim tkivima promoviše inflamatorno okruženje, koje doprinosi održavanju i ubrzavanju procesa povezanih sa starenjem. Štaviše, senescencija uzrokovana skraćivanjem telomera može negativno da utiče na homeostazu i regeneraciju tkiva. Važno je napomenuti da eliminacija senescentnih ćelija može da podstakne proliferaciju matičnih ćelija i odloži procese vezane za starenje. Problem je u tome što se senescentne ćelije ne uklanjaju efikasno u tkivima koja stare ili se, i ako se uklanjaju, to dešava izuzetno sporo i može uticati na opadanje imunoloških funkcija povezanih sa starenjem (9-11). Senescentne ćelije su primećene u različitim fiziološkim procesima tokom života. Za razliku od hronične senescencije (tj. akumulacije štetnih senescentnih ćelija sa starenjem), akutna indukcija senescencije predstavlja prolazni fiziološki odgovor tokom embrionalnog razvoja i homeostaze tkiva odraslih (npr. da bi se olakšala popravka tkiva nakon oštećenja jetre, kod fibroze kože i zarastanja rana (12).

Teorija da senescencija ima samo pozitivan, tumor supresorski efekat, pobijena je rezultatima mnogih studija, koji pokazuju da senescentne maligne, kao i senescentne nemaligne ćelije imaju podjednaku sposobnost da podstaknu malignu transformaciju i održavaju protumorigeno, tj. maligno okruženje (13). Senescentne ćelije ostaju metabolički aktivne i mogu da luče mnoštvo u velikoj meri proinflatornih citokina, hemokina, faktora rasta i proteaza za remodelovanje matriksa, zajednički poznatih kao SASP, sposobnih da stvore protumorigeno mikrookruženje i pokrenu malignu transformaciju (14). Zbog svoje genomske nestabilnosti i mogućnosti sticanja dodatnih mutacija, (pre)maligne ćelije imaju sposobnost da prevaziđu zaustavljanje ćelijskog ciklusa povezano sa senescencijom i na taj način izbegnu proliferativni zastoj (15). Dakle, ireverzibilno zaustavljanje ćelijskog ciklusa povezano sa senescencijom nije neophodan korak za senescentne (pre)maligne ćelije. Pored toga, količina i nemalignih senescentnih ćelija i (pre)malignih ćelija akumulira se starenjem zbog neefikasnog odstranjivanja senescentnih ćelija od strane imunog sistema tokom vremena i akumulacije onkogenih mutacija stečenih tokom života. Kumulativni efekat pomenutih dešavanja nam govori da SASP nemalignih senescentnih ćelija može pokrenuti malignu transformaciju predisponiranih premalignih ćelija, suprotstavljajući se pozitivnom efektu senescentnih ćelija kao regulatora homeostaze tkiva i supresora tumora, što paradoksalno doprinosi razvoju tumora (16, 17). Pored uloge tumorskog supresora, senescencija se kod pacijenata sa malignom bolešću sve više prepoznaje kao *in vivo* odgovor na primenjene različite terapijske protokole (senescencija indukovana terapijom) (18, 19).

Važna karakteristika senescentnih ćelija je da je njihov rast zaustavljen, ali one ostaju izuzetno metabolički aktivne. Iako je proliferacija ćelija inhibirana, senescentne ćelije aktivno proizvode i luče mnoge vrste proteina

(20, 21). Senescentne ćelije ekspresiraju interlekin 6 (IL-6) i IL-8, koji su inflamatorni citokini, kao i hemokini koji privlače inflamatorne ćelije. Ekspresija matriksnih metaloproteinaza (engl. *matrix metalloproteinases* - MMPs), koje menjaju ekstracelularni matriks, visoka je u senescentnim ćelijama. Sekretacija pomenutih različitih proteina može uticati na okolne susedne ćelije i/ili izazvati promene u tkivnom mikrookruženju. Ovaj fenomen se naziva SASP (22). Ekspresija SASP-a je vrlo različita, u zavisnosti od porekla ćelija. Obrazac ekspresije SASP-a se razlikuje između epitelnih i mezenhimalnih ćelija, što podržava teoriju da je uticaj SASP-a na ćelijsko mikrookruženje svakog tkiva različit. Heterogena ekspresija SASP-a ide u prilog nalazima da su senescentne ćelije aktivno uključene kako u fiziološke, tako i u mnogobrojne patološke procese. Inflamacija je, na primer, sveprisutan proces u različitim tkivima tokom starenja, a bez dokaza o patogenoj infekciji, što sugerise da su senescentne ćelije uključene u inflamatorni odgovor putem ekspresije SASP-a (20, 23). Ekspresija SASP-a, osim što zavisi od porekla i vrste ćelija koje podležu procesu senescencije, zavisi i od vrste delujućeg stimulansa, dok efekti SASP-a na mikrookruženje senescentnih ćelija u tkivima takođe mogu biti različiti, pozitivni i negativni (20).

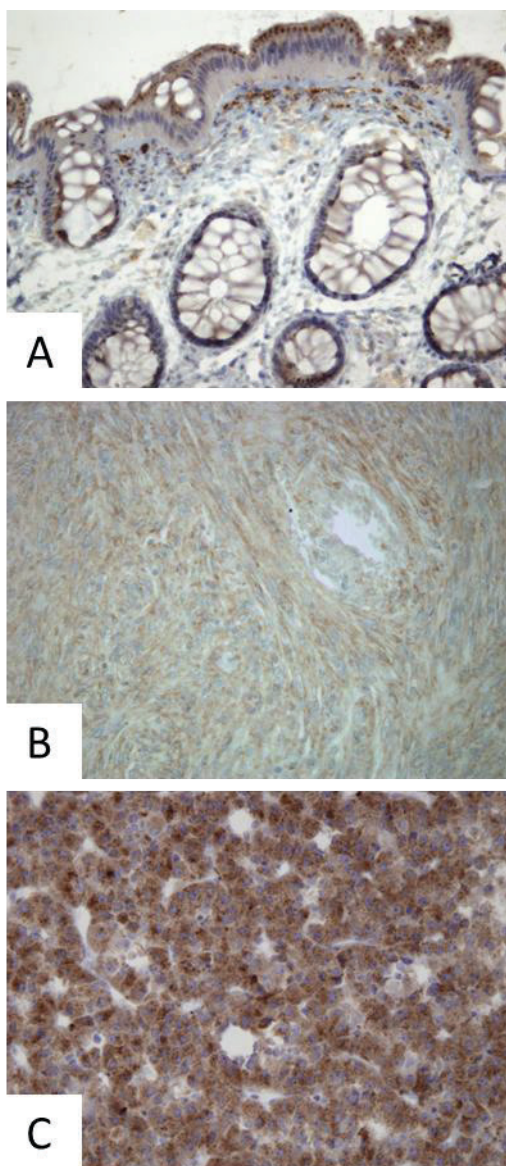
Pozitivni efekti senescencije uključuju lokalno zarastanje rana, regeneraciju tkiva iz oštećenih ćelija i inhibiciju imunoloških reakcija u oštećenim ćelijama, kao procese koji pomažu procesu zarastanja (20, 23). Sekretorni fenotip povezan sa senescencijom takođe može da pojača ekspresiju MMP u patološkim stanjima, kao što je fibroza jetre ili kože, sprečavajući fibrozu tokom procesa zarastanja oštećenja jetre ili povreda na koži. Citokini SASP-a, IL-6 i IL-8, takođe pojačavaju proliferativni zastoj u senescentnim ćelijama (24, 25). Negativni efekti uključuju povećan inflamatorni odgovor, stimulisanje rasta obližnjih (pre)malignih ćelija i promociju metastaza malignih ćelija. Primećeno je i da SASP može da izazove fenomen epitelne mezenhimalne tranzicije (engl. *epithelial mesenchymal transition* - EMT) (7, 13).

Smatra se da se zaustavljanje rasta senescentnih ćelija dešava blokadom ćelijskog ciklusa u G1 fazi, da bi se sprečilo pokretanje replikacije DNK u oštećenim ćelijama. Senescentne ćelije se mogu zaustaviti i u G2 fazi ćelijskog ciklusa da bi se blokirale mitoze u prisustvu već postojećih oštećenja DNK (1, 26). Pošto se zaustavljanje ćelijskog ciklusa, tj. proces senescencije pokreće kako bi se osiguralo da oštećene ili transformisane ćelije ne propagiraju mutacije, njegovo započinjanje i sledstveno održavanje mora biti strogo kontrolisano. Istraživanja potvrđuju da su početak i održavanje senescencije kontrolisani putem supresora tumora p53/p21Cip1 i proteina retinoblastoma (pRb/p16Ink4a). Aktivacija jednog i/ili oba pomenuta puta može da pokrene proces senescencije. Genetske mutacije ili epigenetska utišavanja na nivou pomenutih puteva onemogućavaju ulazak ćelija u senescentno stanje (27, 28).

Detekcija senescencije u tkivima

Najpoznatiji i najčešće korišćeni marker senescencije

je pojačana aktivnost kisele lizosomalne beta galaktozidaze (SA- β -Gal) u senescentnim ćelijama, pošto se lizozomi povećavaju u broju i veličini kada ćelije postanu senescentne. Aktivnost beta galaktozidaze povezana sa senescencijom često se smatra zlatnim standardom za identifikaciju senescentnih ćelija. Iako je odsutna u većini proliferišućih i mirujućih ćelija, aktivnost SA- β -Gal je izražena u određenim tipovima ćelija kao što su makrofagi, ćelije koštane srži, melanociti i ćelije lojnih i ekrinih žlezda. Takođe, SA- β -Gal nije patognomoničan marker senescencije jer ćelije mogu postati senescentne i bez ekspresije ovog markera (slika 1) (29,30).

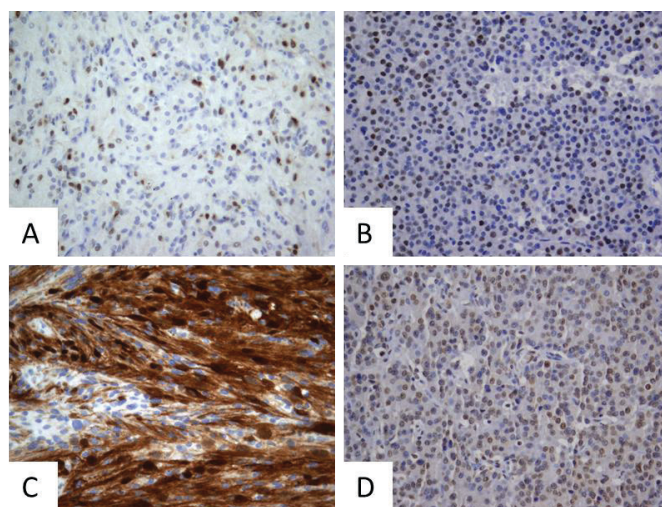


Slika 1. Imunohistohemijska detekcija beta galaktozidaze u sluzokoži debelog creva (A), u meningiomu stepena 1 CNS SZO (B) i somatotrofnom neuroendokrinom tumoru hipofize (C).

Da bi se prevazišli nedostaci SA- β -Gal kao markera senescencije, biotinom vezan *Sudan Black B* (SBB) omogućava detekciju akumulacije lipofuscina u senescentnim ćelijama. Lipofuscin je nerazgrađivi agregat oksidisanih lipida i proteina, koji se akumuliraju u lizozomima senescentnih ćelija zbog disfunkcije lizozoma indukovane senescencijom i smatra se jednim od obeležja senescencije. Za razliku od enzimske aktivnosti SA- β -Gal lipofuscin je

očuvan u fiksiranim materijalima. Shodno tome, detekcija senescentnih ćelija je izvodljiva u arhivskim uzorcima tkiva fiksiranog u parafinskim kalupima (engl. *formalin fixed paraffin embedded* - FFPE) korišćenjem SSB histohe-mijskog bojenja. Tumačenje testa zahteva određeno iskustvo, pošto agregati lipofuscina mogu biti veoma mali, dok kontaminacija tkiva može biti pogrešno protumačena kao pozitivni SBB - pozitivni agregati lipofuscina (29,31).

Drugi često korišćeni markeri ćelijskog starenja su inhibitori ćelijskog ciklusa p16INK4a i p21/WAF1/CIP1/CDKN1A (slika 2), pošto većina pokretača koji indukuju senescenciju dovodi do aktivacije puteva inhibitora ćelijskog ciklusa p53/p21/WAF1/CIP1/CDKN1A i/ili p16INK4a. Dok se ekspresija p21/WAF1/CIP1/CDKN1A javlja rano nakon indukcije senescencije i reverzibilna je nakon inaktivacije tumor supresorskog proteina p53, ekspresija p16INK4a se uglavnom eksprimira kasno, nakon indukcije senescencije i ireverzibilna je, čak i nakon inaktivacije p53. Smatra se da ekspresija p21/WAF1/CIP1/CDKN1A predstavlja ranu fazu aktivacije senescencije, dok ekspresija p16INK4a predstavlja kasni, stabilniji odgovor na aktivaciju senescencije. Takođe je poznato da p21/WAF1/CIP1/CDKN1A može biti eksprimiran i od strane nesenescentnih ćelija u slučaju oštećenja DNK i gena koji kodiraju za p21/WAF1/CIP1/CDKN1A i p16INK4a (tj. CDKN1A i CDKN2A) (29,32).



Slika 2. Pozitivna imunohistohemijska detekcija za p21 kod meningioma stepena 1 CNS SZO (A) i somatotrofnog neuroendokrinog tumora hipofize (B), pozitivnost P16 otkrivena imunohistohemijom kod meningioma stepena 1 CNS SZO (C) i gonadotropnog tumora hipofize (D).

Zaključak

Iako informacije date u ovom tekstu čine razumevanje senescencije naizgled veoma komplikovanim, one su u isto vreme veoma korisne za razumevanje doprinosa procesa senescencije savremenoj medicini, sa važnim naučnim i kliničkim implikacijama i smernicama za njeno dalje razumevanje i praktičnu upotrebu.

Literatura

1. Di Fagagna FD. Living on a break: Cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8(7):512–22.
2. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961; 25:585–621.
3. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1965; 37:614–36.
4. Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, Bennett D, Bischof O, Bishop C, et al. Cellular senescence: Defining a path forward. *Cell*. 2019; 179(4):813–27.
5. Herbig U, Jobling WA, Chen BP, Chen DJ, Sedivy JM. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21CIP1, but not p16INK4a. *Mol Cell*. 2004; 14(4):501–13.
6. De Keizer PL. The fountain of youth by targeting senescent cells? *Trends Mol Med*. 2017; 23(1):6–17.
7. Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, et al. Senescence in premalignant tumours. *Nature*. 2005; 436(7051):642.
8. Ben-Porath I, Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005; 37(5):961–76.
9. Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol*. 2013; 75:685–705.
10. Muñoz-Espín D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014; 15(7):482–96.
11. Muñoz-Espín D, Cañamero M, Maraver A, Gómez-López G, Contreras J, Murillo-Cuesta S, et al. Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell*. 2013; 155(5):1104–18.
12. Storer M, Mas A, Robert-Moreno A, Pecoraro M, Ortells MC, Di Giacomo V, et al. Senescence as a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell*. 2013; 155(5):1119–30.
13. Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez PY, Campisi J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98(21):12072–7.
14. Wang L, Lankhorst L, Bernards R. Exploiting senescence for the treatment of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2022; 22(6):340–55.
15. Galanos P, Vougas K, Walter D, Polyzos A, Maya-Mendoza A, Haagensen EJ, et al. Chronic p53-independent p21 expression causes genomic instability by deregulating replication licensing. *Nat Cell Biol*. 2016; 18(7):777–89.
16. Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*. 2005; 120(4):513–22.
17. Laconi E, Marongiu F, DeGregori J. Cancer as a disease of old age: changing mutational and microenvironmental landscapes. *Br J Cancer*. 2020; 122(7):943–52.
18. Ewald JA, Desotelle JA, Wilding G, Jarrard DF. Therapy-induced senescence in cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2010; 102(20):1536–46.
19. Wang B, Kohli J, Demaria M. Senescent Cells in Cancer Therapy: Friends or Foes? *Trends Cancer*. 2020; 6(10):838–57.
20. Coppe JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol*. 2010; 5:99–118.
21. Freund A, Orjalo AV, Desprez PY, Campisi J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med*. 2010; 16(5):238–46.
22. Parrinello S, Coppe JP, Krtolica A, Campisi J. Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J Cell Sci*. 2005; 118(Pt 3):485–96.
23. Tchkonian T, Zhu Y, van Deursen J, Campisi J, Kirkland JL. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J Clin Invest*. 2013; 123(3):966–72.
24. Ancrile B, Lim KH, Counter CM. Oncogenic Ras-induced secretion of IL6 is required for tumorigenesis. *Genes Dev*. 2007; 21(14):1714–9.
25. Sparmann A, Bar-Sagi D. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell*. 2004; 6(5):447–58.
26. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8(9):729–40.
27. Sherr CJ, McCormick F. The RB and P53 pathways in cancer. *Cancer Cell*. 2002; 2(2):103–12.
28. Engeland K. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death Differ*. 2022; 29(5):946–60.
29. Calcinotto A, Kohli J, Zagato E, Pellegrini L, Demaria M, Alimonti A. Cellular senescence: aging, cancer, and injury. *Physiol Rev*. 2019; 99(2):1047–78.
30. Hall BM, Balan V, Gleiberman AS, Strom E, Krasnov P, Virtuoso LP, et al. p16(Ink4a) and senescence-associated β -galactosidase can be induced in macrophages as part of a reversible response to physiological stimuli. *Aging (Albany NY)* 2017; 9(8):1867–84.
31. Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol*. 2018; 28(6):436–53.
32. Beauséjour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P, et al. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *Embo J*. 2003; 22(16):4212–22.