Universiteit
Leiden
The Netherlands

The skin as a mirror of the aging process

Waaijer, M.E.C.

Citation
Waaijer, M. E. C. (2016, October 12). *The skin as a mirror of the aging process*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/43472

Version:	Not Applicable (or Unknown)
License:	Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden
Downloaded from:	https://hdl.handle.net/1887/43472

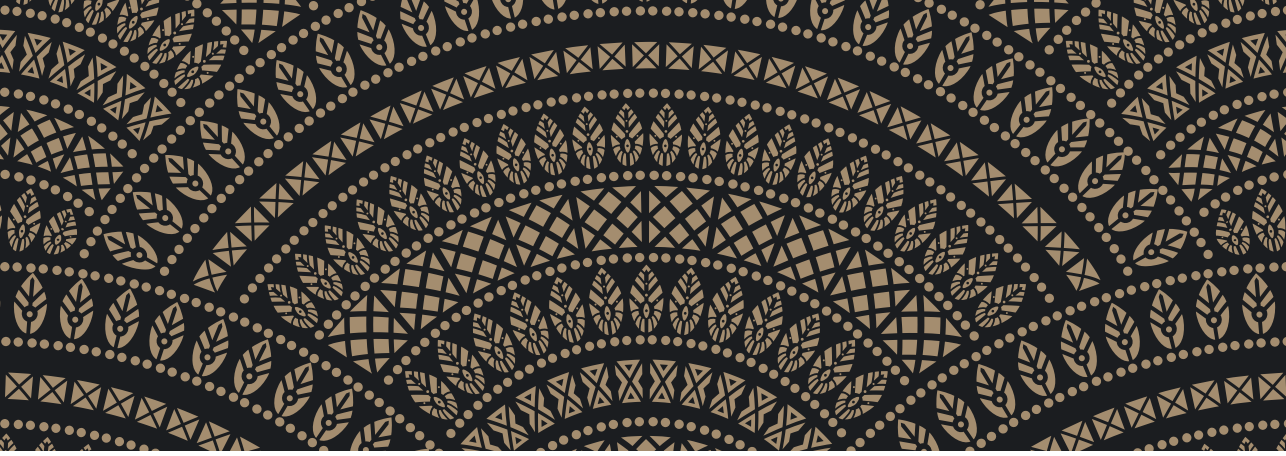
Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page

Universiteit Leiden

The handle http://hdl.handle.net/1887/43472 holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Waaijer, Mariëtte
Title: The skin as a mirror of the aging process
Issue Date: 2016-10-12



Summary and discussion

Nederlandse samenvatting

List of publications

Dankwoord / Acknowledgements

Curriculum Vitae

Summary and discussion

Description of the findings

This thesis describes to which extent the skin reflects the aging process, with a specific focus on cellular senescence. Since the first descriptions of the growth arrested state of fibroblasts upon multiple replication rounds [1;2], cellular senescence has now emerged as a promising target to regulate the aging process in vivo as well.

Part I of this thesis covers the question **if skin fibroblasts in vitro mirror the aging process.** For this purpose cultured skin fibroblasts from young and old donors were studied, aged on average 22 and 90 years respectively. We further aimed to describe differences based on membership of a long-lived family and health status. Comparisons were made between middle-aged to old offspring from long-lived families (members of a long-lived family) and their age and environmentally matched partners. As a measure for health status those persons with a history of none versus one or more cardiovascular/metabolic diseases (myocardial infarction, cerebrovascular accident, diabetes mellitus or hypertension) were compared.

First we described in **Chapter 1** whether microRNA-663 (miR-663), which has been shown to be differentially expressed in senescent cells in vitro, was differentially expressed in young versus old donors. We found that under non-stressed conditions fibroblasts from young and old donors did not differ in their miR-663 levels. However, when fibroblasts in culture were stressed with rotenone for three days, the fibroblasts from old donors showed higher levels of miR-663. We found no association between miR-663 levels in fibroblast cultures and membership of a long-lived family, or in donors with a different health status.

In **Chapter 2** we extend the comparison of senescent phenotypes of cultured human dermal fibroblasts dependent on age of the donor, membership of a long-lived family and health status to DNA damage markers. DNA damage foci were shown to be markers of senescent cells in culture as well as in situ. Here we compared the numbers of whole-nuclear DNA damage foci measured with 53BP1, DNA damage foci localized at telomeres (or TAF – telomere-associated foci) and micronuclei as measure of unresolved DNA damage and chromosomal instability. The numbers of 53BP1 foci and TAF in cultured fibroblasts, but not the number of micronuclei, were positively associated with the age of the donor. We did not find associations between DNA damage markers and membership of a long-lived family, or in donors with a different health status.

After finding an association between senescence-associated features in cultured cells and the age of the donor, we extrapolated these in vitro findings to markers of cellular senescence in situ. Using skin biopsies of the same donors, we compared several senescence markers as measured in vitro with the presence of the senescence marker p16INK4a in situ.

In **Chapter 3** we show that the same *in vitro* the senescence markers reactive oxygen species, telomere-associated foci, p16INK4a, senescence-associated β-gal, and telomere shortening, are reasonably correlated between duplicate cultures and between cultures in short-term versus long-term experiments. The different markers were correlated amongst each other to a lesser extent. However, when correlating the various senescence markers as obtained from *in vitro* cultures versus dermal p16INK4a positivity *in situ*, there was no correlation.

The findings above mark the next part of this thesis, where we have studied several age related phenotypes within the skin biopsies from participants of the Leiden Longevity Study, **Part II - Does skin tissue mirror the aging process?**

In **Chapter 4** we describe age-dependent epidermal and dermal skin characteristics. We observed reduced epidermal thickness, a flatter epidermal-dermal junction and higher amount of elastic fibres in the reticular dermis in donors of higher ages. We did not observe any significant differences in morphological skin characteristics that were dependent on membership of a long-lived family.

In **Chapter 5** we show that the senescence associated marker p16INK4a is less frequently present in the skin of offspring from long-lived families when compared to the skin of their partners. We also observed a higher number of epidermal p16INK4a positive cells in skin from donors with cardiovascular or metabolic disease, and with a higher number of medications used. This findings indicate that cellular senescence is not only related to age, but may also be a marker of health status.

Chapter 6 describes the association between p16INK4a positive cells in the skin and elastic fibre characteristics, facial wrinkles and perceived facial age. We show that the number of p16INK4a positive cells in both epidermis and dermis are linked to age-associated changes in elastic fibre morphology. Also, the number of p16INK4a positive cells in the epidermis is positively associated with facial wrinkling and perceived age.

Our observations show that markers of cellular senescence in human skin biopsies reflect some aspects of the aging process in middle-aged and old individuals. We aimed to place our findings amidst earlier literature reports and in a clinical context, as described in **Part III- Does skin senescence mirror aging in vivo?**

The overview on markers in **Chapter 7** was written to place our work in human skin in context to that in various other human tissues. We performed a systematic review of the literature on prevalence of senescence markers dependent on chronological age in several human tissues. In general higher numbers of senescent cells are found in all tissues sampled from older donors. The scarcity of reports that find negative associations give rise to the question if also publication bias is at play.

In **Chapter 8** we show the cross-sectional associations between age, the presence of cardiovascular/metabolic disease as a marker of health status with functional capacity

measures (physical and cognitive tests), and a series of molecular measures (C-reactive protein (CRP) as inflammation marker, senescence-associated p16INK4a positivity in the skin, and CD57 in T-cells as putative marker for immunosenescence). All functional capacity measures associated with age, as well as CRP and epidermal p16INK4a positivity from the molecular measures but the latter were not as robustly associated. The associations of the functional capacity and molecular measures with cardiovascular or metabolic disease were less apparent when compared to those with age. Overall, in middle-aged to old persons the molecular measures were more weakly associated with age and health status than functional capacity measures.

Based on these findings, we conclude that several skin phenotypes are linked to chronological aging, familial propensity for longevity and/or health status, and thus reflect the aging process in humans. Residual questions remain however; (1) whether cellular senescence is a good marker of the aging process, (2) whether senescence is causally related to aging, and (3) whether senescence opens a therapeutic window to slow the aging process.

Cellular senescence as marker of the aging process

Using markers of cellular senescence to predict clinical phenotypes has been rarely studied so far, but p16INK4a positivity has been shown to successfully predict renal graft function in transplant patients better than age [3;4]. Others have studied whether p16INK4a levels in peripheral blood T-lymphocytes associated with the frailty status of middle-aged to old patients and also with the length of hospital stay after a coronary artery bypass operation, and did not find any clear association [5]. Our findings line up with these reports as we did find links between cellular senescence in skin and age and health status, but these links were not more robust than measures of functional capacity already used in the clinic. It seems too early to use senescence markers for identifying detrimental clinical phenotypes as the predictive value is still limited. New prospective studies are needed to assess the value of senescence markers (in addition to or in combination with other biomarkers) to identify those who age fast and are at a higher risk for adverse health outcomes.

Questions of causality

While causality is not a prerequisite for the use senescence as a marker of the aging process, it is an important issue to address as manifold scholars and entrepreneurs are venturing into therapeutically targeting senescent cells in an attempt to delay the aging process. The associations that we describe in this thesis between higher numbers of senescent cells and age-related disease might be explained by confounders such as smoking. This lifestyle factor was shown to induce senescence in mice [6] but is also a well-known risk factor of many age-related diseases. Another way of explaining the data is by reversed causation: an age-related disease such as type II diabetes is characterized by high glucose levels, which has also been

shown to drive senescence in cultured cells [7]. Thus, the higher numbers of senescent cells in biopsies from diabetic patients might be result rather than a contributing cause of diabetes as an age associated disease. Lastly, we found indications of publication bias in our systematic review. Publication bias, with an overrepresentation of small, positive studies, could lead to overestimating the association between senescent markers and aging. The actual contribution of cellular senescence to the aging process in humans would then be smaller than it appears to be.

Therapeutic potential

In contrast, there is important emerging evidence from experimental work in mice showing that senescent cells contribute to age-related disease, and that selective removal of these senescent cells improves health and life span of the animals. Prevention or attenuation of the detrimental effects of senescent cells (without losing the tumour-suppressive features) could therefore be a novel therapeutic target for various age-related diseases. For example, induction of p16INK4a resulted in several aging phenotypes in transgenic mice with conditional expression of p16INK4a, which were largely reversible upon de-induction [8]. In transgenic progeroid mice clearance of naturally occurring p16INK4a positive cells delayed age-related pathology, and increased the health span of these animals [9]. This study was recently extended to normally aged mice rather than progeroid mice. It was shown that removing accumulated senescent cells positively affected health and lifespan and removal attenuated age-related histological changes in several organs [10]. Positive effects of senescent cell removal are also seen in adipose tissue of mice, where upon removal fat mass and expression of mRNA's related to insulin sensitivity was preserved [11]. An approach that uses orally administered drugs that target senescent cells and evoke apoptosis ('senolytics') rather than using transgenic mice also showed promising results. In normally aged mice these drugs (dasatinib and quercetin) improved cardiac and vascular function, as well as improving the healthspan of progeroid mice [12]. The positive effects of this senolytic therapy on vasomotor were later confirmed in normally aged and in hypercholesterolemic mice [13]. Another variant of senolytic drugs, JAK inhibitors, prevented age-related fat loss in naturally aged mice, as well as preserving insulin sensitivity [11]. These studies show promising potential future applications of cellular senescence in the clinic, as also described in some reviews [14;15]. However some tissues seem to be less prone to the effects of removal of senescent cells than others. In addition, while attenuation of age-related disease is found histologically, more clinically relevant, functional measures such as grip strength, balance and memory were not affected [10]. These questions will undoubtedly be studied further in the coming years, and help clarify therapeutic benefits from senescent cell removal.

Of course, while promising, the beneficial results of removing senescent cells on healthspan extension in mice are not guaranteed to extrapolate to humans. Firstly, senescence mechanisms might differ between mouse and man; e.g. mouse and human fibroblasts differ in telomerase expression [16]. Secondly, discrepancies between different animals have emerged for other methods for lifespan extension. For example the benefits of caloric restriction seem to differ across and even within animals species and are thus still highly debated [17-19]. In regard to cellular senescence in vivo we are still on the verge of studying these interspecies differences. However, senescent cells do accumulate in humans with age [20-23], and are linked to age-related pathology [20;24-26], so the target is present in humans. Future studies will have to determine whether targeting senescent cells in humans can actually slow down the aging process and ameliorate the burden of age-related diseases.

References

(1) Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961;25:585-621.

(2) Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1965;37:614-636.

(3) Koppelstaetter C, Schratzberger G, Perco P et al. Markers of cellular senescence in zero hour biopsies predict outcome in renal transplantation. *Aging Cell* 2008;7:491-497.

(4) Gingell-Littlejohn M, McGuinness D, McGlynn LM et al. Pre-transplant CDKN2A expression in kidney biopsies predicts renal function and is a future component of donor scoring criteria. *PLoS One* 2013;8:e68133.

(5) Pustavoitau A, Barodka V, Sharpless NE et al. Role of senescence marker p16INK4a measured in peripheral blood T-lymphocytes in predicting length of hospital stay after coronary artery bypass surgery in older adults. *Experimental Gerontology*. In press.

(6) Sorrentino JA, Krishnamurthy J, Tilley S, Alb JG, Jr., Burd CE, Sharpless NE. p16INK4a reporter mice reveal age-promoting effects of environmental toxicants. *J Clin Invest* 2014;124:169-173.

(7) Dekker P, Maier AB, van HD et al. Stress-induced responses of human skin fibroblasts in vitro reflect human longevity. *Aging Cell* 2009;8:595-603.

(8) Boquoi A, Arora S, Chen T, Litwin S, Koh J, Enders GH. Reversible cell cycle inhibition and premature aging features imposed by conditional expression of p16Ink4a. *Aging Cell* 2015;14:139-147.

(9) Baker DJ, Wijshake T, Tchkonia T et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 2011;479:232-236.

(10) Baker DJ, Childs BG, Durik M et al. Naturally occurring p16-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* 2016.

(11) Xu M, Palmer AK, Ding H et al. Targeting senescent cells enhances adipogenesis and metabolic function in old age. *Elife* 2015;4.

(12) Zhu Y, Tchkonia T, Pirtskhalava T et al. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell* 2015;14:644-658.

(13) Roos CM, Zhang B, Palmer AK et al. Chronic senolytic treatment alleviates established vasomotor dysfunction in aged or atherosclerotic mice. *Aging Cell* 2016.

(14) Tchkonia T, Zhu Y, van DJ, Campisi J, Kirkland JL. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J Clin Invest* 2013;123:966-972.

(15) Kirkland JL, Tchkonia T. Clinical strategies and animal models for developing senolytic agents. *Exp Gerontol* 2015;68:19-25.

(16) Itahana K, Campisi J, Dimri GP. Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology* 2004;5:1-10.

(17) Demetrius L. Aging in mouse and human systems: a comparative study. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1067:66-82.

(18) Demetrius L. Of mice and men. When it comes to studying ageing and the means to slow it down, mice are not just small humans. *EMBO Rep* 2005;6 Spec No:S39-S44.

(19) Sohal RS, Forster MJ. Caloric restriction and the aging process: a critique. *Free Radic Biol Med* 2014;73:366-382.

(20) Bhat R, Crowe EP, Bitto A et al. Astrocyte senescence as a component of Alzheimer's disease. *PLoS One* 2012;7:e45069.

(21) Liu Y, Sanoff HK, Cho H et al. Expression of p16(INK4a) in peripheral blood T-cells is a biomarker of human aging. *Aging Cell* 2009;8:439-448.

(22) Melk A, Schmidt BM, Takeuchi O, Sawitzki B, Rayner DC, Halloran PF. Expression of p16INK4a and other cell cycle regulator and senescence associated genes in aging human kidney. *Kidney Int* 2004;65:510-520.

(23) Ressler S, Bartkova J, Niederegger H et al. p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell* 2006;5:379-389.

(24) Tsuji T, Aoshiba K, Nagai A. Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:886-893.

(25) Sis B, Tasanarong A, Khoshjou F, Dadras F, Solez K, Halloran PF. Accelerated expression of senescence associated cell cycle inhibitor p16INK4A in kidneys with glomerular disease. *Kidney Int* 2007;71:218-226.

(26) Verzola D, Gandolfo MT, Gaetani G et al. Accelerated senescence in the kidneys of patients with type 2 diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;295:F1563-F1573.

Nederlandse samenvatting

Overzicht van de bevindingen

In dit proefschrift wordt beschreven in welke mate de huid het verouderingsproces weerspiegelt, waarbij de nadruk ligt op cellulaire 'senescence'. Hieronder wordt een situatie waarin cellen zich niet meer delen na een aantal vermeerderingen verstaan. Sinds de eerste beschrijving van dit fenomeen, [1,2], blijkt cellulaire 'senescence' inmiddels een veelbelovend aangrijpingspunt waarmee het verouderingsproces gereguleerd kan worden.

Deel I van dit proefschrift behandelt de vraag of **fibroblasten uit de huid het verouderingsproces kunnen weerspiegelen**. Hiertoe zijn gekweekte fibroblasten uit de huid van jonge (gemiddeld 22 jaar) en oudere donoren (gemiddeld 90 jaar) bestudeerd. Tevens bestudeerden we of er verschillen waren in deze fibroblasten berustend op familiaire langlevendheid of gezondheidsstatus. Er werden daarom vergelijkingen gemaakt tussen middelbare tot oudere nakomelingen van langlevende families en hun levenspartners, die een vergelijkbare leeftijd hebben en in een vergelijkbare leefomgeving verkeren. Als maatstaf voor de gezondheidsstatus werd gekeken naar de mensen zonder en die met een ziektegeschiedenis van één of meer cardiovasculaire en/of metabole ziekten (myocardinfarct, herseninfarct, diabetes mellitus of hypertensie).

In **Hoofdstuk 1** beschrijven we het verschil in de expressie van microRNA-663 (miR-663) in fibroblasten tussen jonge en oudere donoren, aangezien eerder aangetoond is dat de expressie van miR-663 hoger is in gekweekte 'senescent' cellen. We hebben aangetoond dat onder normale, niet-gestresste condities er geen verschil is in miR-663 expressie tussen jonge en oudere donoren. Echter, onder gestresste condities (na een behandeling van drie dagen met de stof rotenon) is de miR-663 expressie hoger in de fibroblasten van oudere donoren dan in die van de jongere donoren. Er werd geen associatie gevonden tussen miR-663 en familiaire langlevendheid of gezondheidsstatus.

In **Hoofdstuk 2** vervolgen we deze vergelijkingen tussen leeftijdsgroepen, nakomelingen van langlevende families en hun partners, en mensen met een verschillende gezondheidsstatus, waarbij we ditmaal markers van DNA-schade in de gekweekte fibroblasten bestuderen. Deze markers van DNA-schade zijn zowel in gekweekte cellen ('in vitro') als in cellen in weefselbiopten ('in situ') een marker voor cellulaire 'senescence'. Hiertoe werden de aantallen van DNA-schade foci (gemeten met het eiwit 53BP1) in de hele celkern, DNA-schade foci op telomeren (ook wel 'TAF' genoemd) en micronuclei gemeten. Er werd een positieve associatie waargenomen tussen de aantallen DNA-schade foci in de hele celkern en TAF met de leeftijd van de donor, maar dit werd niet waargenomen voor micronuclei. Er werden geen associaties gevonden tussen een van deze DNA-schade markers en familiaire langlevendheid of gezondheidsstatus.

Gezien deze bevindingen over de samenhang tussen 'senescente' kenmerken in gekweekte fibroblasten ('in vitro') en de leeftijd van de donoren hebben we deze 'in vitro senescence' kenmerken hierna tevens gerelateerd aan een 'senescence' marker in huidbiopten ('in situ').
In **Hoofdstuk 3** bestuderen we de onderlinge correlaties tussen meerdere markers van cellulaire 'senescence' in vitro: zuurstofradicalen ('ROS'), DNA-schade foci op telomeren ('TAF'), p16INK4a (een celcyclusremmer), 'senescence associated-β-galactosidase' ('SAβ-gal') en telomeerverkorting. Dezelfde markers zijn redelijk gecorreleerd in herhaalde experimenten, en ook tussen de korte versus lange stresscondities. De verschillende markers zijn onderling in mindere mate gecorreleerd. Wanneer de in vitro markers binnen de individuele donors worden vergeleken met het aantal p16INK4a positieve fibroblasten in situ, blijken er geen correlaties te zijn.

Deze bevindingen leiden tot het volgende deel van dit proefschrift, waarin we een aantal verouderingsgerelateerde huidkenmerken bestuderen in de biopten van deelnemers uit de Leiden Langleven Studie: **Deel II – Kan huidweefsel het verouderingsproces weerspiegelen?**
In **Hoofdstuk 4** beschrijven we verouderingsgerelateerde kenmerken in de epidermis en dermis. Bij onze deelnemers zagen wij bij hogere leeftijden een dunnere epidermis, een verminderde welving van de scheiding tussen epidermis en dermis, en meer elastische vezels. Deze huidkenmerken verschilden niet tussen nakomelingen van langlevende families en hun partners.
In **Hoofdstuk 5** tonen we aan dat bij nakomelingen van langlevenden de cellen in de huid minder frequent positief aankleuren voor de 'senescence' marker p16INK4a dan bij hun partners. Tevens zagen we dat de mensen met meer cardiovasculaire en metabole ziekten, en de mensen die meer medicatie gebruiken, ook een hoog aantal p16INK4a positieve epidermale cellen hebben. De bevindingen wijzen erop dat cellulaire 'senescence' niet alleen gerelateerd is aan een hogere kalenderleeftijd, maar ook een marker kan zijn voor een slechtere gezondheid.
Hoofdstuk 6 beschrijft de associaties tussen p16INK4a positieve cellen in de huid en elastische vezelkenmerken, gezichtsrimpels en de geschatte leeftijd (iemands leeftijd geschat door externe beoordelaars). Het aantal p16INK4a positieve cellen in de epidermis en dermis is geassocieerd met verouderingsgerelateerde kenmerken van elastische vezels. Tevens is een hoger aantal p16INK4a positieve epidermale cellen geassocieerd met gezichtsrimpels en de geschatte leeftijd.
Deze observaties tonen aan dat cellulaire ´senescence´ in menselijke huidbiopten enkele aspecten van het verouderingsproces kan weerspiegelen. In **Deel III- Kan 'senescence' in de huid het verouderingsproces van de mens weerspiegelen?** trachten we deze bevindingen te positioneren binnen de bestaande literatuur en in een klinische context.
In **Hoofdstuk 7** wordt een overzicht gegeven van verschillende 'senescence' markers in diverse menselijke weefselsoorten. In een systematische review worden studies samengevat die een

verband tussen 'senescence' markers en leeftijd beschrijven. Over het algemeen worden er meer 'senescent' cellen gevonden in weefsel van oudere donoren. De zeldzaamheid van studies die negatieve associaties rapporteren doet de vraag rijzen of er sprake is van publicatie bias.
In **Hoofdstuk 8** tonen we de cross-sectionele associaties van leeftijd en gezondheidsstatus met zowel testen van functionaliteit (fysieke en cognitieve functionaliteit) als met enkele moleculaire markers (C-reactief proteïne (CRP) als maat voor ontsteking, p16INK4a in de huid als 'senescence' marker en CD57 in T-cellen als vermeende 'immunosenescence' marker). De testen voor functionele capaciteit zijn geassocieerd met leeftijd, evenals met CRP en p16INK4a, hoewel deze laatste minder robuust geassocieerd zijn. De associaties tussen gezondheidsstatus en functionele capaciteit en moleculaire markers zijn minder evident in vergelijking tot die met leeftijd. Globaal gezien kunnen we concluderen dat bij middelbare tot oudere mensen de hier geteste moleculaire markers zwakker geassocieerd zijn met leeftijd en gezondheidsstatus dan de testen van functionele capaciteit.
Gebaseerd op bovenstaande bevindingen kunnen we concluderen dat meerdere huidkenmerken gerelateerd zijn aan kalenderleeftijd, familiaire langlevendheid en/of gezondheidsstatus, en dus het verouderingsproces in mensen kunnen weerspiegelen. Echter, een aantal vragen resteert, te weten: (1) is cellulaire 'senescence' een goede marker voor het verouderingsproces, (2) leidt cellulaire 'senescence' tot veroudering (oftewel: is er sprake van causaliteit) en (3) biedt 'senescence' therapeutische mogelijkheden om het verouderingsproces te vertragen?

Cellulaire 'senescence' als marker voor het verouderingsproces
Het gebruik van cellulaire 'senescence' markers om klinische uitkomsten te voorspellen is nog zelden bestudeerd. P16INK4a blijkt echter het functioneren van een niertransplantaat beter te kunnen voorspellen dan alleen leeftijd van de donor [3,4]. In een andere studie is onderzocht of p16INK4a in bloedcellen geassocieerd is met kwetsbaarheid en tevens met opnameduur na een coronaire bypassoperatie bij middelbare tot oudere patiënten. Deze associatie kon niet worden aangetoond [5]. Onze bevindingen zijn hiermee in overeenstemming, aangezien wij wel associaties vonden tussen cellulaire 'senescence' in de huid en leeftijd en gezondheidsstatus, maar deze associaties niet zo robuust waren als de testen van functionele capaciteit die reeds gebruikt worden in de praktijk. Nieuwe prospectieve onderzoeken zijn nodig om de waarde van 'senescence' markers (in toevoeging op, of in combinatie met andere biomarkers) te kunnen bepalen bij het identificeren van diegenen die snel verouderen en een hoger risico hebben op nadelige uitkomsten van ziekte.

Causaliteit
Causaliteit is geen vereiste om cellulaire 'senescence' te gebruiken als marker voor het verouderingsproces, maar het is een belangrijke vraag om te beantwoorden nu wetenschappers

en ondernemers zich begeven in het gebied van therapeutische opties om 'senescent' cellen te verwijderen om zo het verouderingsproces te vertragen. De associaties tussen 'senescent' cellen en ouderdomsgerelateerde ziekten, die in dit proefschrift worden beschreven, kunnen mogelijk verklaard worden verstorende ('confounding') effecten van bijvoorbeeld roken. Deze leefstijlfactor kan 'senescence' induceren in muizen [6] en is tevens een bekende risicofactor voor verscheidene ouderdomsgerelateerde ziekten. De bevindingen zouden ook verklaard kunnen worden door omgekeerde causaliteit: een ouderdomsziekte zoals type II diabetes wordt gekenmerkt door hoge glucosewaarden, hetgeen tevens 'senescence' kan aandrijven in gekweekte cellen [7]. De hogere aantallen 'senescent' cellen in nierbiopten van patiënten met diabetes zouden dus het resultaat en niet een (bijdragende) oorzaak zijn van deze ouderdomsziekte. We hebben verder aanwijzingen gevonden voor publicatiebias in de verrichte systematische review. Publicatiebias, waarbij er een oververtegenwoordiging is van kleine studies met een positieve uitkomst, zou kunnen leiden tot een overschatting van de associatie tussen 'senescence' markers en veroudering. De feitelijke bijdrage van cellulaire 'senescence' aan het verouderingsproces in mensen zou dan kleiner zijn dan deze lijkt op basis van de huidige gegevens.

Cellulaire 'senescence' – therapie

Hier tegenover staan de recente belangrijke bevindingen uit experimentele onderzoeken in muizen. Deze tonen aan dat 'senescent' cellen inderdaad bijdragen aan ouderdomsgerelateerde ziekten en dat het selectief verwijderen van deze cellen de levensduur en de gezondheid van deze dieren kan verbeteren. Het voorkomen of vertragen van de schadelijke gevolgen van 'senescent' cellen (zonder hierbij de tumoronderdrukkende effecten te verliezen) kan daarom een vernieuwende manier zijn om ouderdomsgerelateerde ziekten te behandelen. Zo is eerder aangetoond dat het induceren van p16INK4a in transgene muizen leidt tot velerlei lichamelijke uitingen van veroudering, wat grotendeels reversibel blijkt na de-inductie [8]. In transgene muizen met vormen van progeria (syndromen waarbij sprake is van versnelde veroudering) vertraagt het verwijderen van (natuurlijk voorkomende) p16INK4a positieve cellen het ontstaan van ouderdomsgerelateerde ziekten, en verhoogt hiermee de gezonde levensduur van deze muizen [9]. Dit type onderzoek is recent uitgebreid naar muizen die normaal verouderd zijn, in tegenstelling tot de versneld verouderde progeria muizen. Het verwijderen van in het leven opgestapelde 'senescent' cellen blijkt ook hier de (gezonde) levensduur positief te beïnvloeden, en het verwijderen dempt tevens histologische tekenen van veroudering in meerdere organen [10]. Deze goede effecten van verwijdering van 'senescent' cellen worden ook gezien in vetweefsel van muizen, aangezien na verwijdering de vetmassa en expressie van mRNA's die met insulinegevoeligheid samenhangen behouden bleven [11]. Een andere aanpak is om gebruik te maken van oraal toegediende medicijnen die specifiek 'senescent' cellen aanzetten tot apoptose ('senolytica'), hetgeen ook veelbelovend lijkt. In

normaal verouderde muizen verbeteren deze medicijnen (dasatinib en quercetine) de hartfunctie en de functie van de vaten, en verbeteren tevens de gezonde levensduur in muizen met progeria [12]. De gunstige effecten van deze senolytica op vasomotorfunctie zijn daarnaast bevestigd in normaal verouderde muizen en muizen met hypercholesterolemie [13]. Een andere variant van senolytica, JAK remmers, draagt bij aan het voorkomen vetverlies bij veroudering en het behoud van insulinegevoeligheid in normaal verouderde muizen [11]. Deze studies tonen veelbelovende mogelijkheden om cellulaire 'senescence' therapieën toe te passen in de kliniek, zoals tevens in enkele reviewartikelen beschreven is [14;15]. Sommige weefselsoorten lijken echter minder vatbaar te zijn voor de effecten van 'senescent' celverwijdering dan anderen [10]. Tevens worden wel minder histologische tekenen van veroudering gezien, maar andere, waarschijnlijk klinisch relevantere uitkomsten zoals knijpkracht, balans en geheugen waren onveranderd [10]. Deze vragen zullen ongetwijfeld bestudeerd worden de komende jaren en de voordelen van therapeutische verwijdering van 'senescent' cellen verhelderen.

Hoe veelbelovend ook, de gunstige resultaten van het verwijderen van 'senescent' cellen op de gezonde levensduur in muizen zijn uiteraard niet met volledige zekerheid te extrapoleren naar mensen. Ten eerste kunnen mechanismen van 'senescence' verschillen tussen muizen en mensen, zoals bijvoorbeeld de telomerase expressie anders is in muizen dan in mensen [16]. Ten tweede zijn er verschillen tussen diersoorten gebleken in andere methoden voor levensduurverlenging. De voordelen van calorische restrictie lijken bijvoorbeeld te verschillen tussen verschillende diersoorten en zelfs binnen een diersoort, en deze methode blijft dus betwist [17-19]. Wat betreft cellulaire 'senescence' in levende organismen staan we nog aan het begin van het bestuderen van verschillen tussen diersoorten. Echter, 'senescent' cellen accumuleren ook in mensen met de leeftijd [20-23], en zijn geassocieerd met ouderdomsgerelateerde ziekten [20;24-26], dus dit biedt vooralsnog ook een onderzoeksdoel in mensen. Toekomstige onderzoeken zullen moeten uitwijzen of het verwijderen van 'senescent' cellen in mensen daadwerkelijk het verouderingsproces kan vertragen en de last van ouderdomsgerelateerde ziekten kan verlichten.

Referenties

(1) Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961;25:585-621.

(2) Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1965;37:614-636.

(3) Koppelstaetter C, Schratzberger G, Perco P et al. Markers of cellular senescence in zero hour biopsies predict outcome in renal transplantation. *Aging Cell* 2008;7:491-497.

(4) Gingell-Littlejohn M, McGuinness D, McGlynn LM et al. Pre-transplant CDKN2A expression in kidney biopsies predicts renal function and is a future component of donor scoring criteria. *PLoS One* 2013;8:e68133.

(5) Pustavoitau A, Barodka V, Sharpless NE et al. Role of senescence marker p16INK4a measured in peripheral blood T-lymphocytes in predicting length of hospital stay after coronary artery bypass surgery in older adults. *Experimental Gerontology*. In press.

(6) Sorrentino JA, Krishnamurthy J, Tilley S, Alb JG, Jr., Burd CE, Sharpless NE. p16INK4a reporter mice reveal age-promoting effects of environmental toxicants. *J Clin Invest* 2014;124:169-173.

(7) Dekker P, Maier AB, van HD et al. Stress-induced responses of human skin fibroblasts in vitro reflect human longevity. *Aging Cell* 2009;8:595-603.

(8) Boquoi A, Arora S, Chen T, Litwin S, Koh J, Enders GH. Reversible cell cycle inhibition and premature aging features imposed by conditional expression of p16Ink4a. *Aging Cell* 2015;14:139-147.

(9) Baker DJ, Wijshake T, Tchkonia T et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 2011;479:232-236.

(10) Baker DJ, Childs BG, Durik M et al. Naturally occurring p16-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* 2016.

(11) Xu M, Palmer AK, Ding H et al. Targeting senescent cells enhances adipogenesis and metabolic function in old age. *Elife* 2015;4.

(12) Zhu Y, Tchkonia T, Pirtskhalava T et al. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell* 2015;14:644-658.

(13) Roos CM, Zhang B, Palmer AK et al. Chronic senolytic treatment alleviates established vasomotor dysfunction in aged or atherosclerotic mice. *Aging Cell* 2016.

(14) Tchkonia T, Zhu Y, van DJ, Campisi J, Kirkland JL. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J Clin Invest* 2013;123:966-972.

(15) Kirkland JL, Tchkonia T. Clinical strategies and animal models for developing senolytic agents. *Exp Gerontol* 2015;68:19-25.

(16) Itahana K, Campisi J, Dimri GP. Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology* 2004;5:1-10.

(17) Demetrius L. Aging in mouse and human systems: a comparative study. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1067:66-82.

(18) Demetrius L. Of mice and men. When it comes to studying ageing and the means to slow it down, mice are not just small humans. *EMBO Rep* 2005;6 Spec No:S39-S44.

(19) Sohal RS, Forster MJ. Caloric restriction and the aging process: a critique. *Free Radic Biol Med* 2014;73:366-382.

(20) Bhat R, Crowe EP, Bitto A et al. Astrocyte senescence as a component of Alzheimer's disease. *PLoS One* 2012;7:e45069.

(21) Liu Y, Sanoff HK, Cho H et al. Expression of p16(INK4a) in peripheral blood T-cells is a biomarker of human aging. *Aging Cell* 2009;8:439-448.

(22) Melk A, Schmidt BM, Takeuchi O, Sawitzki B, Rayner DC, Halloran PF. Expression of p16INK4a and other cell cycle regulator and senescence associated genes in aging human kidney. *Kidney Int* 2004;65:510-520.

(23) Ressler S, Bartkova J, Niederegger H et al. p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell* 2006;5:379-389.

(24) Tsuji T, Aoshiba K, Nagai A. Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:886-893.

(25) Sis B, Tasanarong A, Khoshjou F, Dadras F, Solez K, Halloran PF. Accelerated expression of senescence associated cell cycle inhibitor p16INK4A in kidneys with glomerular disease. *Kidney Int* 2007;71:218-226.

(26) Verzola D, Gandolfo MT, Gaetani G et al. Accelerated senescence in the kidneys of patients with type 2 diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;295:F1563-F1573.

List of publications

Waaijer MEC, Westendorp RGJ, Goldeck D, Gunn DA, Pawelec G, Stijntjes M, Slagboom PE, Maier AB. *Assessment of health status by molecular measures, ready for clinical use?* Experimental Gerontology, April 2016.

Waaijer MEC, Croco E, Westendorp RGJ, Slagboom PE, Sedivy JM, Lorenzini A, Maier AB. *DNA damage markers in dermal fibroblasts in vitro reflect chronological donor age.* Aging, January 2016.

Waaijer MEC*, Gunn DA*, Adams PD, Pawlikowski JS, Griffiths CEM, van Heemst D, Slagboom PE, Westendorp RGJ, Maier AB. *P16INK4a positive cells in human skin are indicative of local elastic fibre morphology, facial wrinkling and perceived age.* Journal of Gerontology: Biological Sciences, August 2015.

Waaijer MEC*, Wieser M*, Grillari-Voglauer R, van Heemst D, Grillari J, Maier AB. *MicroRNA-663 induction upon oxidative stress in cultured human fibroblasts depends on the chronological age of the donor.* Biogerontology, June 2014.

Waaijer MEC, Gunn DA, Catt SD, van Ginkel M, de Craen AJM, Hudson NM, van Heemst D, Slagboom PE, Westendorp RGJ, Maier AB. *Morphometric skin characteristics dependent on chronological and biological age: the Leiden Longevity Study.* Age (Dordr), December 2012.

Waaijer MEC, Parish WE, Strongitharm BH, van Heemst D, Slagboom PE, de Craen AJM, Sedivy JM, Westendorp RGJ, Gunn DA, Maier AB. *The number of p16INK4a positive cells in human skin reflects biological age.* Aging Cell, August 2012.

Dankwoord / Acknowledgements

Allereerst wil ik de deelnemers van de Leiden Langleven Studie en de Leiden 85-Plus Studie bedanken. Zonder hun bereidwilligheid om deel te nemen aan onderzoek was dit proefschrift nooit tot stand gekomen. Tevens wil ik alle collega's van het Ouderengeneeskunde lab bedanken; ik heb mogen voortbouwen op een onderwerp waar al veel energie en werk in was gestoken.

Een goede begeleiding is essentieel: Rudi, dank voor de enthousiaste introductie met 'the aging process' en de prikkelende discussies sindsdien. Andrea, jouw onvermoeibare drang om het verouderingsonderzoek verder te brengen inspireert, en ik waardeer dat jij ook tijdens mijn coschappen de tijd voor begeleiding nam. Met twee promotoren op afstand is de Leidse basis echter ook belangrijk. Diana, bedankt voor je input op mijn papers en presentaties die ik je altijd kon vragen, het heeft mijn werk veel goeds gebracht. Ik wil postuum Ton de Craen bedanken, voor de vele (eigen)wijze lessen die ik van hem heb mogen leren over diverse facetten van de wetenschap.

I would further like to thank everyone who has collaborated with me on the projects included in this thesis for their valuable input.

During my time at the department I've had the pleasure to work with many colleagues. I have enjoyed learning from all of you, with all our different topics but surprisingly similar issues we faced in our research. Those coffee runs were moments of good discussion and ideas. I can honestly say that I've spent a good deal of my PhD with a smile on my face, and I thank you for that!

Lieve vrienden, zoals jullie weten ben ik enthousiast over mijn werk, maar zit ik ook in mijn vrije tijd niet graag stil. Dankjulliewel voor alle steun tijdens het schrijven van dit proefschrift maar vooral voor alle leuke afleiding daarvan! Ik heb genoten van alle gezellige, artistieke en sportieve momenten samen.

Ik wil ook mijn familie bedanken, en in het bijzonder oma, die mij inspireert om oud te worden met een glimlach voor alle mensen om mij heen. Cath, jij staat vandaag naast mij zoals je praktisch je hele leven hebt gedaan. Een grote zus met wie ik kon optrekken in dit wetenschappelijke avontuur, en hopelijk volgend jaar in ons IJslandse avontuur. Lieve pap en mam, jullie steun is een vast gegeven voor mij, maar die vanzelfsprekendheid is eigenlijk heel bijzonder. Jullie hebben me geïnspireerd om mezelf uit te dagen en tegelijkertijd van het leven te genieten. Laten we dan ook samen deze feestelijke mijlpaal vieren!

Curriculum Vitae

Mariëtte Waaijer werd op 18 november 1988 geboren te Delft. Haar middelbare schooltijd aan het Erasmiaans Gymnasium te Rotterdam rondde zij in 2007 af met het cum laude behalen van haar diploma. Aansluitend heeft zij Geneeskunde gestudeerd aan de Universiteit Leiden/ het Leids Universitair Medisch Centrum (LUMC), waar zij tijdens een keuzevak geïnteresseerd raakte in het verouderingsproces. Na selectie voor het MD-PhD traject voor excellente studenten heeft zij zich dan ook verder verdiept in verouderingsonderzoek. Binnen de afdeling Ouderengeneeskunde van het LUMC is zij in 2010 naast haar studie begonnen met promotieonderzoek onder begeleiding van prof. dr. R.G.J. Westendorp en prof. dr. A.B. Maier. Haar wetenschapsstage verrichtte zij in het lab van dr. Grillari aan de Universität für Bodenkultur te Wenen, Oostenrijk. Na het behalen van het Masterdiploma Geneeskunde (cum laude) heeft zij een MD-PhD beurs verworven, beschikbaar gesteld door het LUMC. Hiermee heeft zij gedurende 2014-2016 haar promotieonderzoek op de afdeling Ouderengeneeskunde van het LUMC voortgezet. Per mei 2015 is zij werkzaam als ANIOS Interne Geneeskunde in het Alrijne Ziekenhuis te Leiderdorp.