

# Reprogramiranje homeostaze i regeneracije kože uporabom nove tehnologije mikrotransplatacije stanica

---

**Cedilak, Andrea**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:674765>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-17**

*Repository / Repozitorij:*



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Andrea Cedilak

**REPROGRAMIRANJE HOMEOSTAZE I  
REGENERACIJE KOŽE UPORABOM  
NOVE TEHNOLOGIJE  
MIKROTRANSPLANTACIJE STANICA**

DOKTORSKI RAD

Rijeka, 2023.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Andrea Cedilak

**REPROGRAMIRANJE HOMEOSTAZE I  
REGENERACIJE KOŽE UPORABOM  
NOVE TEHNOLOGIJE  
MIKROTRANSPLANTACIJE STANICA**

Mentor: Prof.dr.sc. Ivica Rubelj

Rijeka, 2023.

UNIVERSITY OF RIJEKA  
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Andrea Cedilak

**REPROGRAMMING OF SKIN  
HOMEOSTASIS AND REGENERATION  
USING A NOVEL CELL MICRO-  
TRANSPLANTATION TECHNOLOGY**

DOCTORAL THESIS

Rijeka, 2023.

Ova doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za molekularnu i staničnu biologiju, Zavoda za molekularnu biologiju, Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom prof. dr. sc. Ivice Rubelja, u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost „Reprogramiranje homeostaze i regeneracije kože uporabom nove tehnike mikrotransplantacije stanica (IP-01-2018)“.

Mentor: Prof. dr. sc. Ivica Rubelj, znanstveni savjetnik, predstojnik Zavoda za molekularnu biologiju

Doktorski rad obranjen je dana 13.7.2023. na Odjelu za biotehnologiju, Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Izv. prof. dr. sc. Jelena Ban, predsjednik Povjerenstva
2. Izv. prof. dr. sc. Andreja Ambriović Ristov, znanstvena savjetnica u trajnom izboru, član
3. Izv. prof. dr. sc. Inga Urlić, član

Veliko hvala

mentoru Prof. dr. sc. Ivici Rubelju na stručnom vodstvu i savjetima tijekom izrade doktorske disertacije,

Luciji, kolegici i prijateljici, na nesebičnoj pomoći tijekom izrade ovog dokorskog rada. Zahvalna sam što si sve ove godine bila zajedno sa mnom u našem malom laboratoriju i svojim prijateljstvom i razgovorima ga uljepšala,

Anamariji, na velikom prijateljstvu i podršci tijekom ovog dokorskog studija te najbitnije na našim mnogobrojnim putovanjima koji su ovo iskustvo učinili još nezaboravnijim,

Vladi i Ani na njihovoj neprocjenjivoj potpori i prijateljstvu tijekom mog dokorskog puta,

mojim roditeljima, sestri na razumijevanju, ljubavi i potpori koju mi pružaju.

Sažetak

**Reprogramiranje homeostaze i regeneracije kože uporabom nove tehnologije  
mikrotransplantacije stanica**

Andrea Cedilak

Laboratorij za molekularnu i staničnu biologiju, Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer  
Bošković, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb, Hrvatska

Očekivani životni vijek drastično se povećao tijekom posljednjih nekoliko desetljeća diljem svijeta, pri čemu je povećana pojava brojnih kroničnih bolesti. Starenje je složen proces koji uključuje progresivno smanjenje funkcije tkiva i gubitak regenerativnog kapaciteta. U osnovi toga je stanična senescencija, stanje stabilnog zastoja staničnog ciklusa koje se javlja kao odgovor na oštećenje i akumulaciju staničnog stresa. Starenjem se povećava učestalost nastanka senescentnih stanica, te se stoga posljednjih godina razvijaju različite strategije njihove inhibicije i eliminacije. Ovim istraživanjem sam htjela pokazati da će promjenom omjera mladih i starih stanica u koži štakora Fischer 344 doći do promjene tkivnog mikrookoliša i smanjenja efekta sekretornog fenotipa senescentnih stanica (engl. *Senescence-associated secretory phenotype*, SASP) na okolne stanice i tkiva. Dobiveni rezultati pokazuju kako mikrotransplantacija mladih stanica u kožu štakora pozitivno utječe na revitalizaciju niše matičnih stanica i povećanje ukupnog broja stanica u tkivu te sam ujedno pokazala dugotrajnost tog efekta. Pokazana je i promjena u genskoj ekspresiji u tkivu kože sa starenjem, te promjena profila ekspresije nakon tretmana. Zaključno, pokazala sam da sam uspješno smanjila sekretorni fenotip senescentnih stanica, promijenila homeostazu starog tkiva i uspješno regenerirala kožu.

**Mentor:** Prof. dr. sc. Ivica Rubelj

**Broj stranica:** 114

**Broj slika:** 28

**Broj tablica:** 4

**Broj literaturnih navoda:** 195

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** koža; starenje kože; senescencija; revitalizacija; pomlađivanje



Abstract

**Reprogramming of skin homeostasis and regeneration using young cells micro-transplantation**

Andrea Cedilak

Laboratory for Molecular and Cellular Biology, Division of Molecular Biology, Ruđer Bošković  
Institute, Bijenička cesta 54, Zagreb, Croatia

Life expectancy has increased dramatically over the past few decades worldwide, with an increase in the occurrence of numerous chronic diseases. Aging is a complex process that involves a progressive decrease in tissue function and loss of regenerative capacity, underlined by cellular senescence, a stable state of cell cycle arrest that occurs in response to damage and accumulation of cellular stress. Aging increases the frequency of occurrence of senescent cells, and for this reason, various anti-aging strategies have been developed in recent years. In this work, I wanted to show that by changing the ratio of young vs. old cells in the skin of Fischer 344 rats, we can change the tissue microenvironment and reduce the effect of senescence-associated secretory phenotype (SASP). The obtained results show that the micro-transplantation of young cells in the skin of rats has a positive effect on the revitalization of the niche of stem cells and an increase in the total number of cells in the tissue, and at the same time I have demonstrated that this effect persists for a longer period of time. Changes in gene expression in skin tissue with aging, or changes as a result of treatment, were also shown. In conclusion, I have shown that I successfully reduced the secretory phenotype of senescent cells, changed the homeostasis of old tissue and successfully regenerated the skin.

**Mentor:** Ivica Rubelj, PhD

**Number of pages:** 114

**Number of figures:** 28

**Number of tables:** 4

**Number of references:** 195

**Original in:** Croatian

**Key words:** skin; skin aging; senescence; revitalization; rejuvenation

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Starenje .....	2
1.2. Molekularni mehanizmi stanične senescencije .....	2
1.2.1. Oštećenje DNA .....	3
1.2.2. Skraćivanje i oštećenje telomera .....	4
1.2.3. Senescencija uzrokovana onkogenima .....	4
1.2.4. Glavna obilježja stanične senescencije .....	6
1.2.5. Regulatorni putevi SASP-a .....	9
1.2.5.1. Regulatorni put NF- $\kappa$ B .....	9
1.2.5.2. Regulatorni put C/EBP .....	10
1.2.5.3. Regulatorni put p53 i GATA4 .....	10
1.2.6. Uloge senescencije .....	11
1.2.7. Utjecaj senescentnih stanica na tkiva i organe .....	13
1.3. Uloga telomera i telomeraze u starenju .....	15
1.4. Koža .....	17
1.4.1. Epidermis .....	18
1.4.2. Dermalno-epidermalna bazalna membrana .....	19
1.4.3. Dermis .....	19
1.5. Strategije za uklanjanje senescentnih stanica iz organizma .....	21
1.5.1. Senolitici .....	21
1.5.2. Senomorfni spojevi .....	23
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>26</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>28</b>
3.1. Materijali .....	29
3.1.1. Osnovne kemikalije .....	29
3.1.2. Kompleti kemikalija .....	30

3.1.3. Enzimi, proteini, protutijela i nukleotidi .....	30
3.1.4. Hranjivi mediji za uzgoj stanica.....	30
3.1.5. Organizmi i stanice.....	31
3.1.5.1. Životinjski model.....	31
3.1.5.2. Primarne stanične kulture .....	31
3.2. Metode .....	32
3.2.1. Uspostava primarne kulture stanica kože štakora .....	32
3.2.2. Uzgoj stanica u kulturi .....	33
3.2.3. Imunoflorescencija na stanicama .....	33
3.2.4. Obilježavanje stanica bojom DiI.....	34
3.2.5. Transdukcija stanica adenovirusnim vektorima .....	34
3.2.6. Mikrotransplantacija stanica kože štakora .....	35
3.2.7. Uzorkovanje i priprema preparata kože .....	36
3.2.7.1. Uklapanje tkiva u parafin .....	36
3.2.7.2. Smrzavanje uzoraka tkiva.....	36
3.2.7.3. Pohrana uzoraka tkiva u RNAlater.....	36
3.2.7.4. Analiza uspješnosti implantacije stanica u kožu štakora.....	37
3.2.7.5. Bojanje hematoksilin eozinom (H&E) .....	37
3.2.7.6. Analiza tkiva imunofluorescencijom.....	37
3.2.8. Određivanje aktivnosti SA $\beta$ -galaktozidaze (SA- $\beta$ -gal) .....	38
3.2.9. Umnažanje i pročišćavanje adenovirusnih vektora centrifugiranjem u cezijevoj kloridu .....	39
3.2.10. Određivanje koncentracije adenovirusa .....	40
3.2.11. Izdvajanje RNA.....	40
3.2.12. Određivanje slijeda RNA .....	41
3.2.13. Bioinformatička obrada i analiza podataka.....	41
3.2.14. Statistička obrada rezultata.....	42
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>43</b>
4.1.1. Uspješna implantacija mladih fibroblasta u kožu štakora različite dobi.....	44
4.1.2. Implantacija mladih fibroblasta obnavlja gustoću stanica u koži štakora.....	47

4.1.3. Revitalizacija proliferacije matičnih stanica nakon mikrotransplantacije mladih fibroblasta.....	49
4.1.4. Mikrotransplantacija mladih fibroblasta obnavlja matriks kolagena I i III u koži štakora .....	52
4.1.5. Praćenje oštećenja DNA i žarišta heterokromatina u tkivima nakon mikrotransplantacije stanica.....	54
4.1.6. Tretman mladim fibroblastima kratkoročno povećava SA- $\beta$ -Gal u koži štakora	56
4.1.7. Implantacija mladih stanica mijenja gensku ekspresiju u tretiranim tkivima .....	57
4.1.7.1. Analiza glavnih sastavnica (PCA).....	57
4.1.7.2. Rezultati analize diferencijalne ekspresije gena.....	58
4.1.7.3. Rezultati analize genske ontologije .....	62
4.1.8. Dugoročno praćenje regeneracije kože nakon mikrotransplantacije fibroblasta, endotelnih i matičnih mladih stanica u kožu štakora .....	68
4.1.9. Implantacija mladih fibroblasta, matičnih ili endotelnih stanica dugoročno obnavlja gustoću stanica u koži štakora .....	70
4.1.10. Mikrotransplantacije mladih fibroblasta, matičnih ili endotelnih stanica uzrokuje dugoročnu revitalizaciju matičnih stanica.....	73
4.1.11. Tretman mladim stanicama dugoročno smanjuje broj SA- $\beta$ -Gal pozitivnih stanica.....	76
4.1.12. Mikrotransplantacije fibroblasta, matičnih ili endotelnih stanica obnavlja matriks kolagena I i III.....	78
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>82</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>89</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>92</b>
<b>8. POPIS SLIKA I TABLICA .....</b>	<b>109</b>
<b>9. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>112</b>

## **1. UVOD**

## 1.1. Starenje

Starenje je proces postupnih i spontanih promjena koji je u viših organizama opisan progresivnim slabljenjem fizioloških funkcija, propadanjem tkiva i organa, a time i organizma u cjelini što na kraju dovodi do smrti. Kao posljedica sve većeg udjela starog stanovništva na svjetskoj razini, dolazi do povećanja brojnih kroničnih bolesti u populaciji poput kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, ateroskleroze, neurodegenerativnih bolesti i demencije te povećanja pojavnosti tumora što su ujedno i najčešći uzroci smrti (Christensen i sur., 2009; Fontana i sur., 2014). To značajno opterećuje zdravstveni i financijski sustav te je stoga razumijevanje mehanizama starenja presudno za intervenciju u taj proces i produžetak zdravog života.

Eksperimentalni dokazi upućuju na to da je nakupljanje starih stanica glavni uzrok starenja organizma te se taj proces još naziva i stanična senescencija (Dimri i sur., 1995). To je proces u kojemu normalne somatske stanice dosegnu krajnju granicu svojih dioba, tzv. Hayflickov limit (Hayflick i Moorhead, 1961).

Ograničeni rast somatskih stanica je u prvom redu posljedica skraćivanja telomera, zaštitnih struktura na krajevima kromosoma, što se događa sa svakom staničnom diobom (C. B. Harley, Futcher i Greider, 1990). Stanica prepoznaje kritično skraćenu telomeru kao dvolančani lom DNA koji potiče odgovor stanice na oštećenje DNA što trajno zaustavlja daljnje diobe i pokreće senescenciju (Shay i Wright, 2000; Bernadotte, Mikhelson i Spivak, 2016). Budući da se senescentne stanice ne mogu više dijeliti, dolazi do gubitka sposobnosti obnove tkiva i organa, te u konačnici do promjena koje uočavamo kod starenja (Dimri i sur., 1995).

Stanična senescencija može se aktivirati i kao odgovor na vanjske štetne čimbenike kao što su razna zračenja, otrovi iz okoliša i sl., a koji uzrokuju oštećenje DNA, poremećaj funkcije telomera, aktivaciju onkogeni i stres organela. Također, senescencija je povezana i s procesima kao što je zaustavljanje rasta tumora, popravak oštećenog tkiva i embriogeneza (Khalil, Diab-Assaf i Lemaitre, 2023). Ipak, u procesima normalnog starenja najvažnije su nefunkcionalne telomere.

## 1.2. Molekularni mehanizmi stanične senescencije

Stanična senescencija je stabilno i krajnje stanje zaustavljanja rasta u kojem stanice ne mogu proliferirati unatoč pogodnim uvjetima i podražajima mitogena (Di Micco i sur., 2021). Senescentne stanice imaju povećanu otpornost na staničnu smrt apoptozom upravo zbog aktivacije

puteva preživljenja, uključujući obitelj protuapoptotskih proteina Bcl-2 (engl. *B-cell lymphoma 2*) (Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xl, Bfl-1, i Mcl-1), ili puteva p53-p21-serpin i fosfoinozimid 3-kinaze (PI3K)/AKT čak i pri izloženosti okolišnom stresu (Chang i sur., 2016; Yosef i sur., 2016). Ipak, tip stanice određuje koji će proapoptotski ili protuapoptotski protein biti eksprimiran (Di Micco i sur., 2006). Do sada nisu u potpunosti razjašnjeni molekularni mehanizmi koji određuju hoće li stanica ići u apoptozu ili senescenciju, što moguće ovisi o jačini i trajanju početnog podražaja, kao i prirodi oštećenja i tipu stanice (Childs i sur., 2014). Također, moguće je da pokretanje apoptoze odnosno otpornosti na nju ovisi o razini i aktivnosti proteina p53 u stanici te njegovoj interakciji s proteinom FOXO-4 (engl. *forkhead box O4*) (Kirschner i sur., 2015).

### 1.2.1. Oštećenje DNA

Oštećenje DNA se često navodi kao uzrok stanične senescencije, uglavnom u obliku dvolančanog loma DNA (engl. *double strand breaks*, DSBs) (Ovadya i sur., 2018) koji pokreće odgovor popravka DNA (engl. *DNA damage response*, DDR) (Slika 1). DDR djeluje kao kontrolna točka za zaustavljanje staničnog ciklusa i na taj način sprječava širenje oštećenja stanica tijekom daljnjih dioba. Čimbenici DDR-a se nakupljaju na mjestima oštećenja DNA gdje oblikuju specifična žarišta izmjenom kromatina uzrokovanom primjerice fosforilacijom histona H2AX i proteina povezanih s njima, uključujući MDC1 (engl. *mediator of DNA damage checkpoint protein 1*) i 53BP1 (engl. *p53 Binding Protein 1*). Ukoliko se oštećenja ne poprave i signal potraje, dolazi do trajnog zastoja staničnog ciklusa i samim time do pokretanja senescencije (Fumagalli i sur., 2014).

Tumor supresori p53 i pRB igraju ključnu ulogu u nastanku senescencije. Protein p53 je meta kinaze ATM (engl. *Ataxia Telangiectasia Mutated*) i njezinog paraloga ATR (engl. *Ataxia Telangiectasia Rad3-related*) te se nalazi na dnu kaskade DDR kad se aktivira te potiče ekspresiju p21, inhibitora nekoliko ciklina i ciklin-ovisnih kinaza, čime se zaustavlja stanični ciklus. Protein p16<sup>INK4a</sup>, inhibitor ciklin ovisnih kinaza 4 i 6 (CDK4 i CDK6), također je ključan za pokretanje senescencije preko blokade pRB-a (Beauséjour i sur., 2003). Dok se p21 aktivira u ranoj fazi senescencije kad je proces još moguće zaustaviti, p16<sup>INK4a</sup> se aktivira kasnije kad je proces nepovratan (Dulić i sur., 2000) (Slika 1).

### 1.2.2. Skraćivanje i oštećenje telomera

Najvažniji mehanizam pokretanja stanične senescencije je skraćivanje i/ili oštećenje telomera i još se naziva replikativno starenje (Slika 1). Kod normalne replikacije DNA, DNA polimeraza ne može u potpunosti sintetizirati krajeve kromosoma te uz dodatnu enzimatsku doradu (Wu, Takai i de Lange, 2012), a u nedostatku telomeraze, dolazi do skraćivanja telomera sa svakom staničnom diobom. Nakon što barem jedna telomera postane kritično kratka dolazi do aktivacije DDR na sličan način koji pokreću DSB unutar DNA (d'Adda di Fagagna i sur., 2003; Herbig i sur., 2004), a samo jedan DDR signal je dovoljan za pokretanje mehanizama senescencije (Hemann i sur., 2001).

Kinaze ATM, AT (engl. *Ataxia Telangiectasia*) i ATR su prve kinaze na kontrolnoj točki koje postanu aktivne kao odgovor na oštećenje DNA (Guo i sur., 2007). Nakon toga, one aktiviraju različite proteine, uključujući Chk2 (engl. *Checkpoint kinase 2*) koja djeluje kao kontrolna točka staničnog ciklusa. Fosforilacija ATM aktivira Chk2 tako što aktivira oligomerizaciju i autofosforilaciju Chk2 koji potom prenosi signale za oštećenja DNA na druge članove uključene u zastoje staničnog ciklusa, apoptozu i popravak DNA. To uključuje fosforilaciju i aktivaciju proteina za supresiju tumora puta p53-p21. Protein p21 dalje inhibira ciklin ovisnu kinazu 2 (engl. *Cyclin-dependent kinase 2*, CDK2) kinazu i time sprječava fosforilaciju proteina retinoblastoma blokirajući stanični ciklus u G1 fazi (Childs i sur., 2014; van Deursen, 2014). Humane diploidne stanice u fazi rane senescencije imaju povišenu ekspresiju proteina p21 koja s vremenom opada, a raste ekspresija proteina p16<sup>INK4a</sup> kako nastupa duboka senescencija. Protein p16<sup>INK4a</sup> je poznat i kao inhibitor ciklin ovisnih kinaza 2A (CDKN2A). Potonje usporavaju staničnu diobu odgađajući prijelaz iz faze G1 u S fazu staničnog ciklusa dok se ne završe potrebni popravci. Inače, CDKN2A s kinazama CDK4 i CDK6, tvori kompleks koji blokira fosforilaciju pRB-a, što p16<sup>INK4a</sup> čini glavnim čimbenikom stabilizacije senescencije. To bi ujedno bio i glavni razlog zbog kojeg stanice raka češće imaju mutacije u p16<sup>INK4a</sup> u usporedbi s mutacijama p21 (Alcorta i sur., 1996).

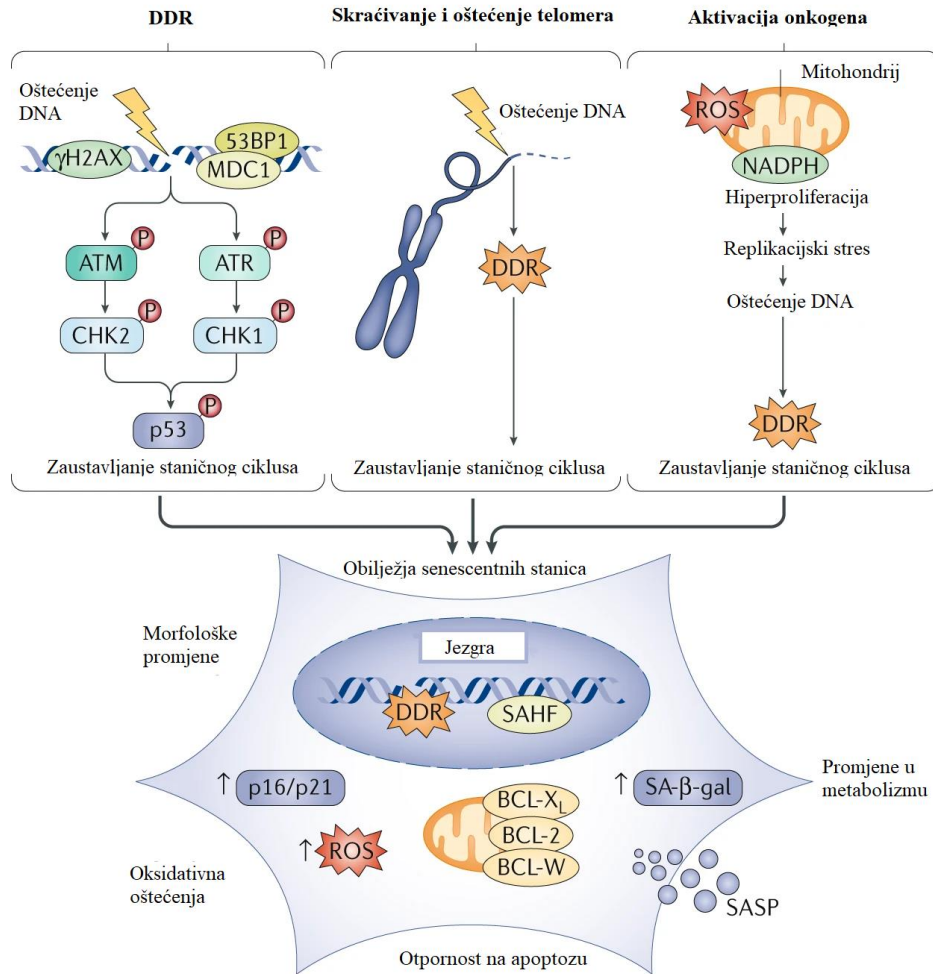
### 1.2.3. Senescencija uzrokovana onkogenima

Aktivacija onkogeni koji potiču proliferaciju stanica je jedan od kritičnih mehanizama za nastanak i razvoj tumora. Iako je aktivacija onkogeni događaj koji promiče razvoj tumora i neizostavan je korak tumorigeneze, također može djelovati kao genetski stres i uzrokovati



nepovratan zastoj u rastu stanica u kulturi i tumorskim tkivima (Saretzki, 2010). Na primjer, onkogene mutacije u proteinu Ras (engl. *Rat sarcoma virus*) uzrokuju staničnu senescenciju u primarnim fibroblastima pluća čovjeka IMR90 (Serrano i sur., 1997), te povećana ekspresija Ras u stanicama epitela dojke čovjeka pokreće aktivaciju puteva za suzbijanje tumora i uzrokuje nepovratan zastoj rasta stanica *in vivo* (Sarkisian i sur., 2007). Ovaj tip stanične senescencije se još naziva i preuranjena senescencija te može biti pokrenuta, pored Ras i aktivacijom drugih onkogeno poput *BRAF*, *AKT*, *E2F1* i inaktivacijom tumor supresorskih gena uključujući *PTEN* i *NF1* (Courtois-Cox, Jones i Cichowski, 2008). Pri tome je sama razina ekspresije bitna za pokretanje senescencije, kao što npr. istraživanja pokazuju da indukcija senescencije onkogenom Ras nastaje samo u slučajevima kada je Ras prekomjerno eksprimiran (Guerra i sur., 2003).

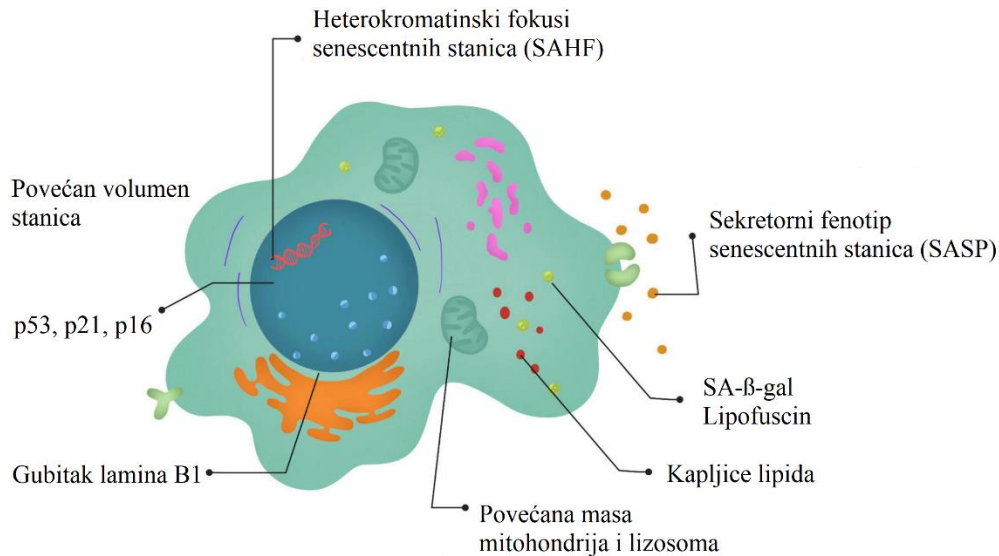
Istraživanja su pokazala da senescenciju mogu pokrenuti i različiti vanjski/okolišni stresovi, nefunkcionalni mitohondriji te promjene na kromatinu, međutim njihova je uloga tijekom starenja manje bitna.



**Slika 1.** Mehanizmi pokretanja senescencije i signalni putevi njihovog djelovanja (preuzeto i prilagođeno iz Di Micco i sur., 2021).

#### 1.2.4. Glavna obilježja stanične senescencije

Jedno od ograničenja u polju istraživanja starenja je nedostatak općenitih i posebnih obilježja za utvrđivanje senescentnih stanica u kulturi ili uzorcima tkiva. Trenutno se opis senescentnih stanica oslanja na korištenje više različitih obilježja koji, kad su prisutni istovremeno, mogu razlikovati trajno zaustavljene senescentne stanice od onih u mirovanju ili onih koje su trenutno pod stresom.



**Slika 2.** Morfološka i molekularna obilježja senescentnih stanica (preuzeto i prilagođeno iz Hamsanathan i Gurkar, 2022).

Najpouzdaniji te najčešće korišten biološki marker za detekciju senescentnih stanica je aktivacija lizosomalnog enzima nazvanog  $\beta$ -galaktozidaza povezana s senescencijom (SA- $\beta$ -gal) koji stare stanice specifično boji u plavo (Slika 2). U normalnim stanicama  $\beta$ -galaktozidazna aktivnost je prirodno prisutna pri pH 4, a naknadno je otkriveno da pri pH 6 dolazi do specifičnog obojenja samo senescentnih stanica (Dimri i sur., 1995). Ovaj marker može se detektirati histokemijskim bojanjem u senescentnim stanicama i općenito se ne nalazi u predsenescentnim stanicama, stanicama u mirovanju ili besmrtnim stanicama.

Senescentne stanice se i morfološki razlikuju od normalnih stanica, pri čemu dolazi do povećanja volumena stanica i stupnja granularnosti, povećanja jezgre i lizosoma, smanjenja funkcije proteosoma te povećanja proizvodnje reaktivnih kisikovih radikala (engl. *reactive oxygen species*, ROS) kao posljedica oštećenja mitohondrija (De Cecco i sur., 2011; Hamsanathan i Gurkar, 2022) (Slika 2). Senescencija je proces koji troši puno energije te zahtijeva stalnu opskrbu ATP-om zbog povećanog sadržaja disfunkcionalnih mitohondrija po stanici. Pri tome se oni fuzioniraju sa zdravim mitohondrijima, ali i međusobno stvarajući duge fuzijske produkte. To rezultira većim mitohondrijskim kapacitetom i povećanjem respiracije (Hubackova i sur., 2019). Iako je u senescentnim stanicama povećana masa mitohondrija, zbog disfunkcije ne sintetiziraju ATP već doprinose akumulaciji visokih razina ROS-a. Njihovo uklanjanje autofagijom stoga je

nužno, ali je energetska vrlo zahtjevno, a uz to ga kompromitiraju disfunkcionalni lizosomi, što u kombinaciji značajno povećava stanični stres (Kang i sur., 2017). Nadalje, kod senescentnih stanica izostaje replikacija DNA zbog prestanka stanične diobe, što se tipično detektira imunološkim bojenjem za markere proliferacije, kao što su PCNA (engl. *proliferating cell nuclear antigen*) i Ki-67, dolazi do aktivacije DDR faktora ( $\gamma$ H2AX ili p53BP1 fokusi) te akumulacije kompleksnog pigmenta lipofuscina.

Inhibitori ciklin ovisnih kinaza p21 i p16<sup>INK4a</sup> su komponente tumor supresorskih puteva kojima upravljaju p53 i pRB, a eksprimirani su u senescentnim stanicama (Slika 2). Budući da su razine ekspresije p21 i p16<sup>INK4a</sup> dovoljne za uspostavljanje i održavanje prestanka rasta povezanog sa starenjem, koriste se za identifikaciju senescentnih stanica u tkivima i staničnim kulturama (Witkiewicz i sur., 2011).

Heterokromatinski fokusi senescentnih stanica (engl. *Senescence-associated heterochromatin foci*, SAHF) (Slika 2) također se koriste za identifikaciju senescencije i izraženiji su u senescenciji izazvanoj onkogenima te kao odgovor na oštećenje DNA (Di Micco i sur., 2011). Nastaju kao posljedica jake kondenzacije kromatina u pojedinim regijama genoma te se geni bitni za proliferaciju stanica više ne mogu transkribirati, a ta prostorna preraspodjela heterokromatina povezana je sa smanjenom ekspresijom lamina B1 (LMNB1). Razvoj SAHF-ova nije ograničen samo smanjenjem LMNB1, promiče ga i pRB put, nehistonski proteini povezani s kromatinom, histonski šaperon HIRA i Asf1a i DNMT1 (Sati i sur., 2020). Osim toga, povezivanje TPR nukleoporina sa kompleksom nuklearnih pora u Ras induciranoj senescenciji IMR90 (fibroblasti pluća čovjeka) stanica odgovorno je za stvaranje SAHF-a i aktivaciju SASP-a (Boumendil i sur., 2019). Specifična protutijela se mogu koristiti za identifikaciju SAHF-a fluorescencijom kao što su H3K9Me2 (engl. *histone H3 lysine 9 dimethylation*), H3K9Me3 (engl. *histone 3 lysine 9 trimethylation*), macroH2A (engl. *macroH2A histon*), HP-1 $\alpha$  (engl. *heterochromatin Protein 1 $\alpha$* ), HP-1 $\beta$  (engl. *heterochromatin Protein 1 $\beta$* ) ili HP-1 $\gamma$  (engl. *heterochromatin Protein 1 $\gamma$* ) u kombinaciji s DAPI (engl. *4',6-diamidino-2-phenylindole*) bojom (Khalil, Diab-Assaf i Lemaitre, 2023).

Sekretorni fenotip senescentnih stanica (Slika 2) je jedan od najvažnijih obilježja senescencije te uglavnom uključuje pojačanu ekspresiju i sekreciju brojnih proupalnih citokina i kemokina, faktora rasta, metaloproteinaza, serinskih proteaza, fibronektina i reaktivnih kisikovih i

dušikovih vrsta (ROS/RNS) (Coppé i sur., 2008; Rodier i sur., 2009). Osnovni SASP sastoji se od transformirajućeg čimbenika rasta (TGF), interleukina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukina-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), interleukina-6 (IL-6), interleukina-8 (IL-8), kemokinskih liganda 20 C-C motiva (CCL20), kemokinskih liganda 4 C-X-C motiva (CXCL 4), monocitnih kemoatraktantnih proteina 1 (MCP1), inhibitora aktivatora plazminogena-1 (PAI1), metaloproteinaza matriksa 3 (MMP3), prostaglandina E2 (PGE2) itd. Neke od komponenta SASP-a su zastupljenije od drugih, ali to općenito ovisi o tipu stanice i uzroku nastanka senescencije (Coppé i sur., 2010; Özcan i sur., 2016; Lopes-Paciencia i sur., 2019; Basisty i sur., 2020). Osim toga, više aspekata može kontrolirati ekspresiju i proizvodnju komponenti SASP-a, od kojih su najvažniji NF- $\kappa$ B put (engl. *nuclear factor kappa B*), p53 put, CCAT-pojačivač-vezujući protein (C/EBP) put (Huggins i sur., 2013; Lopes-Paciencia i sur., 2019) i protein GATA4 put (Lopes-Paciencia i sur., 2019).

Zaključno, do sada još uvijek nije otkriven univerzalni biomarker senescencije upravo zbog toga što su fenotipovi starenja vrlo heterogeni i mogu se razlikovati ovisno o inicijalnom okidaču i vrsti stanice koja se proučava te je zbog toga potrebno koristiti adekvatne markere za pojedine stanične situacije.

## **1.2.5. Regulatorni putevi SASP-a**

### **1.2.5.1. Regulatorni put NF- $\kappa$ B**

Ključan put koji upravlja SASP-om koji se često navodi i kao ključni faktor transkripcije komponenti SASP-a je regulatorni put NF- $\kappa$ B (Malaquin, Martinez i Rodier, 2016; Lopes-Paciencia i sur., 2019). Regulira stvaranje dimera između NF- $\kappa$ B i DNA, regulira transkripciju, sintezu citokina i preživljavanje stanica. U citoplazmi, dimer p65/p50 je blokiran inhibitorom proteina nuklearnog faktora kappa B (I $\kappa$ B) (Slika 3). Kinaza I $\kappa$ B (IKK), koja se sastoji od heterodimera IKK- $\alpha$  i IKK- $\beta$  plus regulatornog proteina IKK $\gamma$  (poznat i kao modulator NF- $\kappa$ B, NEMO) aktivira NF- $\kappa$ B. Aktivni IKK fosforilira protein I $\kappa$ B, što rezultira njegovom razgradnjom i omogućuje da NF- $\kappa$ B putuje u jezgru i sudjeluje u transkripciji gena SASP-a. Različiti podražaji, uključujući oksidativni stres, bolesti, čimbenici rasta i proupalni citokini mogu aktivirati IKK. Alternativno, može ga uključiti mTOR (engl. *mammalian target of rapamycin*) interakcijom s IKK-

om ili DDR-om pri čemu se kompleks ATM/NEMO nalazi u citoplazmi i NEMO se veže na IKK- $\alpha$  i kompleks IKK- $\beta$  i na taj način ga aktivira (Tilstra i sur., 2012).

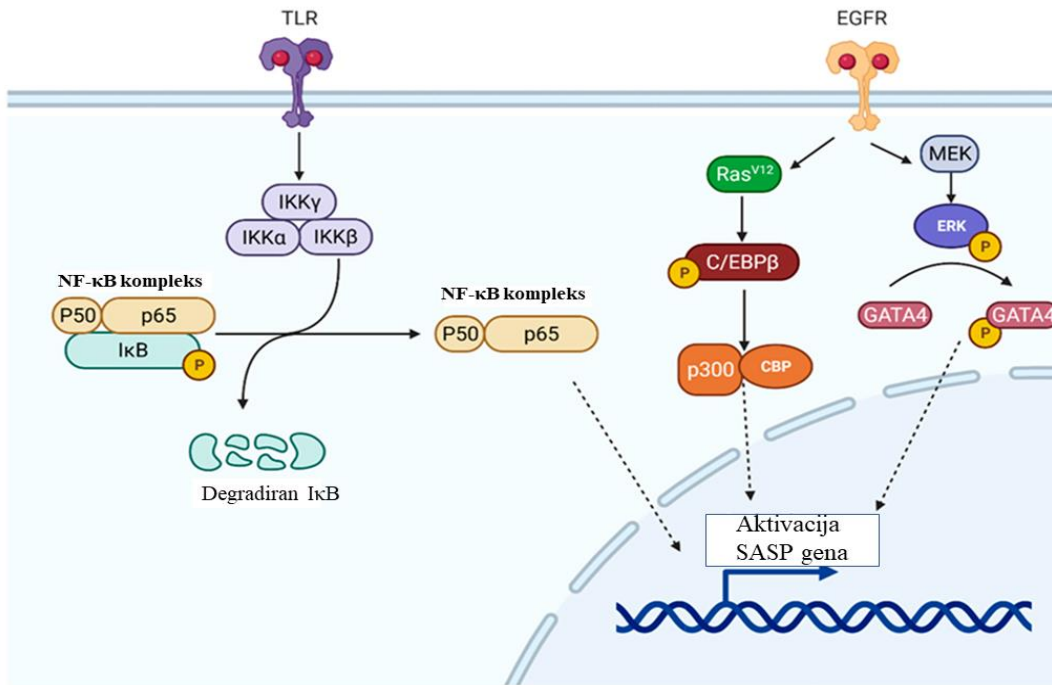
### 1.2.5.2. Regulatorni put C/EBP

Članovi iste obitelji faktora transkripcije, kao što su CCAAT/pojačivač-vezujući protein (C/EBP), C/EBP $\beta$  i C/EBP $\gamma$ , mogu imati suprotne učinke na regulaciju SASP-a. C/EBP $\beta$  je inducibilni faktor transkripcije, sličan NF- $\kappa$ B-u, koji aktivira regulatorne puteve tijekom senescencije uzrokovane onkogenima i kontrolira otpuštanje citokina, kao što je IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-6, GRO $\alpha$ /CXCL1 (engl. *growth related oncogene- $\alpha$  /C-X-C motif chemokine ligand 1*) i NAP2/CXCL7 (engl. *neutrophil activating peptide 2/C-X-C motif chemokine ligand 7*) (Lopes-Paciencia i sur., 2019). C/EBP se fosforilira u prisutnosti RasV12, koji potiče stvaranje homodimera i interakciju s p300/CBP (Slika 3). Potonji kompleks uzrokuje senescenciju i transkripciju SASP gena. C/EBP $\gamma$  s druge strane, smanjuje ekspresiju SASP gena u primarnim fibroblastima miša kroz stvaranje dimera s C/EBP $\beta$  (Lopes-Paciencia i sur., 2019).

### 1.2.5.3. Regulatorni put p53 i GATA4

Jedan regulatorni put može potencijalno imati različite učinke na različite faktore SASP-a. Na primjer, p53 stimulira ekspresiju nekih faktora SASP-a dok inhibira ekspresiju drugih. Osim toga, može inhibirati p38MAPK (engl. *mitogen-activated protein kinase*), jedan od ključnih regulatornih mehanizama uključenih u stvaranje SASP-a (Lopes-Paciencia i sur., 2019). Inhibitori MDM2 (engl. *mouse double minute 2 homolog*) sprječavaju degradaciju p53 i time potiču njegovu funkciju, također smanjuju ekspresiju i IL-6 i IL-1 $\alpha$  (Wiley i sur., 2018). To upućuje na to da se inhibitori MDM2 mogu primjenjivati i kao senoterapeutici uz svoju primjenu za liječenje raka (Wang i sur., 2020).

Dodatni ključni regulator SASP-a je regulatorni put GATA4 (Slika 3), pri čemu GATA4 aktivira ATM i ATR te to potiče stvaranje IL-1 $\alpha$  i aktivaciju NF- $\kappa$ B (Watanabe i sur., 2017; Lopes-Paciencia i sur., 2019). Zajedno, ta dva procesa, aktivacija ekspresije IL-1 $\alpha$  i NF- $\kappa$ B imaju značajan utjecaj na ekspresiju komponenti SASP-a (Orjalo i sur., 2009; Lopes-Paciencia i sur., 2019).



**Slika 3.** Glavni signalni putevi koji upravljaju SASP-om (preuzeto i prilagođeno iz Khalil i sur., 2023).

### 1.2.6. Uloge senescencije

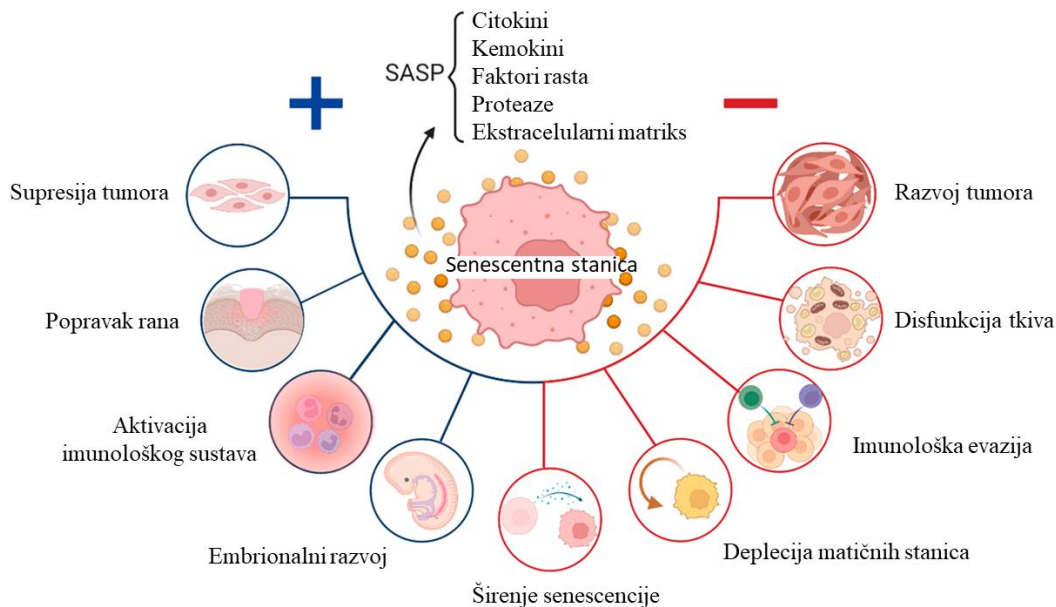
Senescencija je složen i evolucijski očuvan proces koji je odgovoran za obavljanje brojnih bitnih i korisnih procesa te prema funkciji u organizmu može imati pozitivan ili negativan utjecaj (Burton i Krizhanovsky, 2014). Pozitivne funkcije senescentnih stanica vidljive su prilikom embrionalnog razvoja i morfogeneze te kasnije u životu prilikom popravka tkiva i inhibicije nastanka tumora (Slika 4). Taj proces je strogo kontroliran; utječe samo na određeni tip stanica u tkivu, koje zatim imunološki sustav brzo eliminira. Na primjer, tijekom embriogeneze, senescencija počinje u određenoj fazi razvoja i lokalizaciji, te je uključena u morfogenezu, remodeliranje tkiva i proliferaciju stanica (Muñoz-Espín i sur., 2013; Storer i sur., 2013). Embriji u srednjim do kasnijim fazama razvoja sadrže senescentne stanice u vrlo specifičnim anatomskim strukturama unutar embrija poput udova, vrhu repa, ušnim i moždanim mjehurićima, srasloj prsnoj kosti i crijevnom endodermu. U svakom od ovih slučajeva, senescentne stanice moraju biti učinkovito uklonjene od strane makrofaga kako bi se omogućilo pravilno formiranje tkiva i sazrijevanje. Ovaj proces je vrlo važan jer ukoliko dođe do supresije senescencije doći će do

razvoja abnormalnosti kod miševa te je time pokazana ključna pozitivna funkcija stanične senescencije kod pravilne embriogeneze (Muñoz-Espín i Serrano, 2014). Ekspresija p21 i drugih komponenti SASP-a dvije su karakteristike koje embrionalne senescentne stanice imaju zajedničko sa stanicama u kojima je senescencija inducirana onkogenom. S druge strane, odsutnost ekspresije p16<sup>INK4a</sup>, oštećenja DNA i otpuštanja IL-6 i IL-8 su neke od razlika između senescencije uzrokovane starenjem i senescencije tijekom embrionalnog razvoja (Storer i sur., 2013). Senescentne stanice se u embriju pojavljuju tijekom kratkog vremenskog perioda, podvrgnute su staničnoj smrti, a zatim ih imunološki sustav eliminira prije rođenja (Muñoz-Espín i sur., 2013; Storer i sur., 2013). Kao rezultat toga, tijekom razvoja embrija, TGF- $\beta$  (engl. *transforming growth factor-beta*) aktivira SMAD (engl. *suppressor of mothers against decapentaplegic*), koji djeluje zajedno s proteinima FOXO kako bi regulirao ekspresiju p21 i aktivirao zastoj staničnog ciklusa.

Senescentne stanice također ograničavaju tkivna oštećenja sprječavanjem prekomjerne proliferacije stanica te pospješuju zacjeljivanje rana lučenjem PDGF-AA (engl. *platelet-derived growth factor*) koji stimulira diferencijaciju miofibroblasta i granulaciju tkiva (Demaria i sur., 2014). Jedna od najvažnijih funkcija senescencije je supresija tumora. Stare stanice ograničavaju razvoj tumora nakon oštećenja DNA blokiranjem staničnog ciklusa preko pozitivne regulacije p53, p16<sup>INK4a</sup> i p21, ali i promicanjem nastanka senescencije susjednih stanica lučenjem IL-6 i IL-8. Zaključno, primarna je funkcija senescencije da regulira reakciju organizma na oštećenje tkiva i olakša popravak i remodeliranje tkiva te da vrati tkivo u funkcionalno stanje (Khalil, Diab-Assaf, i Lemaitre, 2023).

Iako SASP pogoduje pravilnom razvoju tkiva, popravku tkiva i regrutiranju imunoloških stanica, s vremenom njegova postojanost može uzrokovati kroničnu upalu i pridonijeti bolestima povezanim sa starenjem i, paradoksalno, nastanku raka. Proupalno starenje (engl. *inflammageing*) nastaje kao posljedica cirkuliranja visokih razina raznih upalnih molekula u organizmu (Franceschi i sur., 2000). Faktori SASP-a, uključujući IL-6 i interleukin 1 receptor antagonist (IL-1RA), GRO $\alpha$  i interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) su glavni posrednici ovog učinka (Slika 4). Dodatno, metaloproteinaze matriksa (MMP) oštećuju arhitekturu tkiva i potiču upalu te promoviraju tumorigenezu. Zbog pojačane ekspresije proteina staničnog ciklusa, kao što su p16<sup>INK4a</sup> i p21, matične ili progenitorske stanice usporeno se dijele te ulaze u senescenciju pa unatoč stalno prisutnoj aktivnosti telomeraze više ne mogu normalno obavljati svoju funkciju u regeneraciji tkiva (Khalil, Diab-Assaf i Lemaitre 2023).





**Slika 4.** Pozitivne i negativne biološke uloge senescentnih stanica (preuzeto i prilagođeno iz Khalil i sur., 2023).

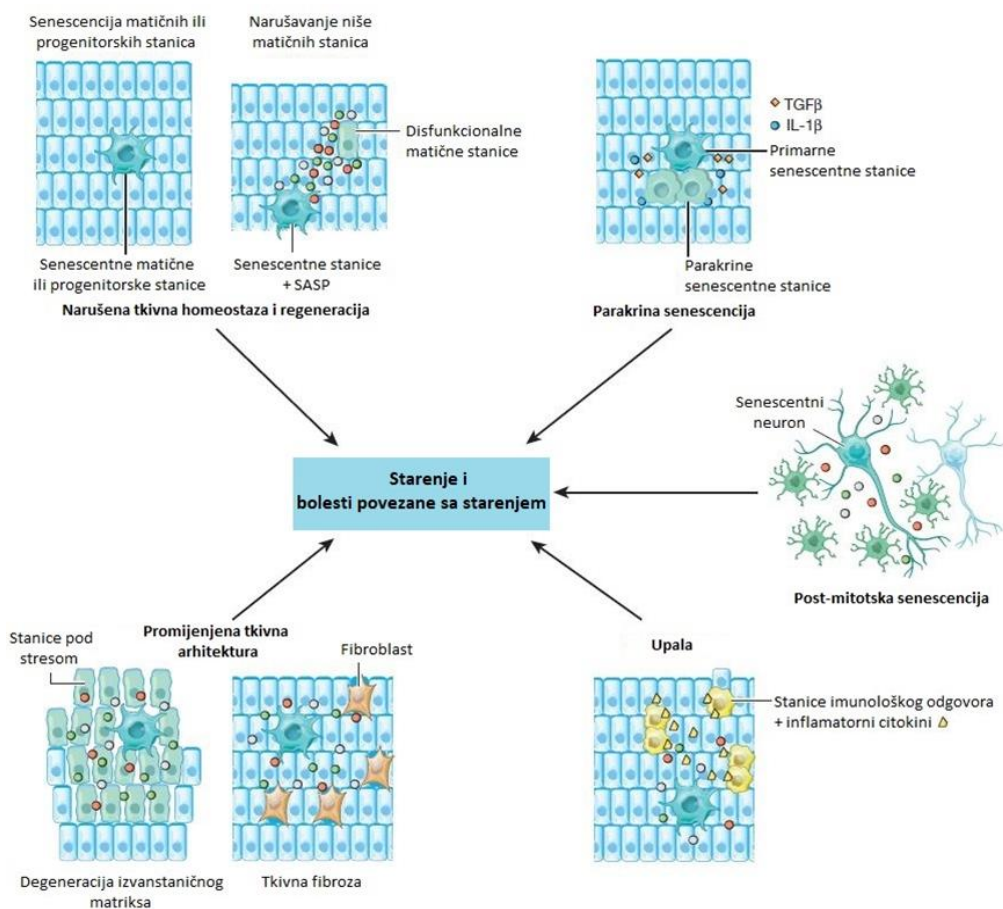
### 1.2.7. Utjecaj senescentnih stanica na tkiva i organe

Stare stanice negativno utječu na homeostazu i obnovu tkiva putem SASP-a na način da pridonose ukupnom padu regenerativnog potencijala tkiva koji se javlja sa starenjem. Jedan od mehanizama je da sprječavaju funkciju susjednih progenitorskih i matičnih stanica mijenjajući mikrookoliš i izvanstanični matriks (Brack i sur., 2007; Pricola i sur., 2009; Krtolica i sur., 2011) (Slika 5). To je potvrđeno na način da se regenerativni potencijal matičnih stanica starog organizma značajno poboljšao kada su one presađivanjem na mladi organizam promijenile mikrookoliš što je vidljivo i u eksperimentima parabioze (Conboy i sur., 2005; Brack i sur., 2007). Parabioza se odnosi na stanje u kojem se dvije cijele žive životinje spajaju kirurški i razvijaju jedinstven, zajednički krvožilni sustav.

Senescentne stanice kronično luče i proteaze koje remete arhitekturu i organizaciju tkiva razgradnjom membranskih receptora, signalnih liganada, proteina izvanstaničnog matriksa ili drugih komponenti u tkivnom mikrookruženju (Parrinello i sur., 2005; Coppé i sur., 2008) (Slika 5). Osim toga, druge komponente SASP-a, poput IL-6 i IL-8, mogu stimulirati tkivnu fibrozu u

određenim tkivima induciranjem tranzicije epitelnih u mezenhimske stanice (engl. *epithelial to mesenchymal transition*, EMT) (Parrinello i sur., 2005; Laberge i sur., 2012). Kronična sterilna upala tkiva (Slika 5) karakterizirana infiltracijom makrofaga, limfocita, pojavom fibroze te staničnom smrću, povezuje se sa razvojem raznih bolesti koje se pojavljuju sa starenjem (Freund i sur., 2010). Također, procesi sterilne upale uzrokuju parakrino starenje kada se faktori SASP-a prenose iz primarnih senescentnih stanica u okolne stanice u tkivu sekretacijom IL-1 $\beta$  i TGF $\beta$  te određenih kemokinskih liganada (Nelson i sur., 2012; Acosta i sur., 2013) (Slika 5). Isto tako, sterilna upala povezana sa starenjem snažno utječe i na postmitotske diferencirane stanice kao što su neuroni i mišićne stanice otpuštanjem SASP faktora u njihovu okolinu.

Do svih ovih značajnih promjena sa starenjem organizma dolazi postepeno tijekom vremena što se dovodi u vezu sa postupnom akumulacijom senescentnih stanica (D. J. Baker i sur., 2004; Garinis i sur., 2008; Faggioli i sur., 2012). U mladom organizmu se senescentne stanice efikasno uklanjaju pomoću imunološkog sustava privlačenjem T stanica, makrofaga i stanica prirodnih ubojica, te kroz lučenje proupalnih citokina i kemokina (Xue i sur., 2007; Freund i sur., 2010; T.-W. Kang i sur., 2011). Starenjem imunološki sustav prolazi kroz složen niz promjena u urođenom i stečenom imunitetu koji kulminiraju imunodeficijencijom povezanom sa starošću (Nikolich-Zugich, 2008) što uzrokuje smanjenu učinkovitost uklanjanja starih stanica iz organizma.



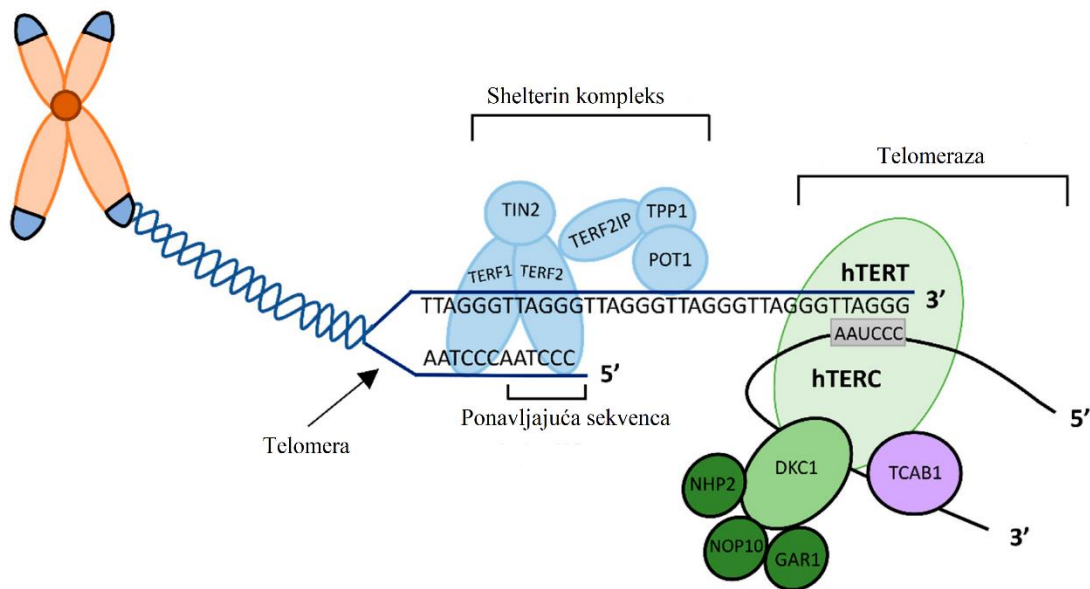
**Slika 5.** Mehanizmi kojima stanična senescencija narušava homeostazu tkiva i organa (preuzeto i prilagođeno iz van Deursen, 2014).

### 1.3. Uloga telomera i telomeraze u starenju

Telomere su specijalizirane strukture ponavljajuće DNA na krajevima kromosoma eukariotskih organizama. Kod sisavaca, ponavljajuća sekvenca je TTAGGG čiji nizovi se ponavljaju više tisuća puta (Moyzis i sur., 1988; Button i sur., 2022). Uloga telomera je da štite krajeve kromosoma od razgradnje te da se isti ne prepoznaju kao dvolančani lom DNA. Bez telomera, došlo bi do spajanja kromosoma i samim time do genetske nestabilnosti (O’Sullivan i Karlseder, 2010). Na ponavljajuće sekvence telomera veže se velik broj proteina od kojih je najvažnijih 6 koji čine tzv. shelterin kompleks (Slika 6.). Taj kompleks stabilizira telomere na način da specifično savija telomernu DNA i tvori takozvanu telomernu petlju, tj. T-petlju (de Lange, 2005). Skraćivanje telomera, oštećenje telomera ili ekspresija mutiranih proteina koji se vežu na

telomere i time naruše njihovu strukturu mogu poremetiti kompleks shelterin i dovesti do aktivacije odgovora na oštećenje DNA i zaustavljanja staničnog ciklusa te posljedično i do senescencije (d'Adda di Fagagna i sur., 2003). Skraćivanje telomera događa se tijekom normalne replikacije DNA uslijed nepotpune replikacije i dodatne modifikacije krajeva kromosoma (Levy i sur., 1992). Na taj način skraćivanje telomera djeluje kao unutarnji mehanizam koji broji stanične diobe i odgovoran je za ulazak stanica u staničnu senescenciju (Aubert i Lansdorp, 2008).

Telomeraza je enzim čija je primarna funkcija produljivanje kratkih telomera (Collins i Mitchell, 2002). Sastoji se od 2 glavne podjedinice, proteinske reverzne transkriptaze nazvane TERT i RNA komponente nazvane TERC (Slika 6.) koja služi kao kalup za TERT prilikom dodavanja telomernih ponavljajućih sljedova na jednolančani 3' produžetak (Greider i Blackburn, 1989). Ekspresija enzima telomeraze strogo je regulirana u ljudskim stanicama, pri čemu je njezina aktivnost prisutna u matičnim stanicama i spolnim stanicama, dok diferencirane somatske stanice ne pokazuju njenu aktivnost (Wright i sur., 1996). Mnogi radovi pokazuju da je TERT komponenta ograničavajući faktor aktivnosti telomeraze (Liu, 1999; Smogorzewska i de Lange, 2004; Bellon i Nicot, 2008) dok je RNA komponenta TERC eksprimirana u većini somatskih stanica, uključujući kožne fibroblaste i epidermalne stanice (Ogoshi i sur., 1998).



**Slika 6.** Građa kompleksa shelterin i telomeraze (preuzeto i prilagođeno iz Button i sur., 2021).

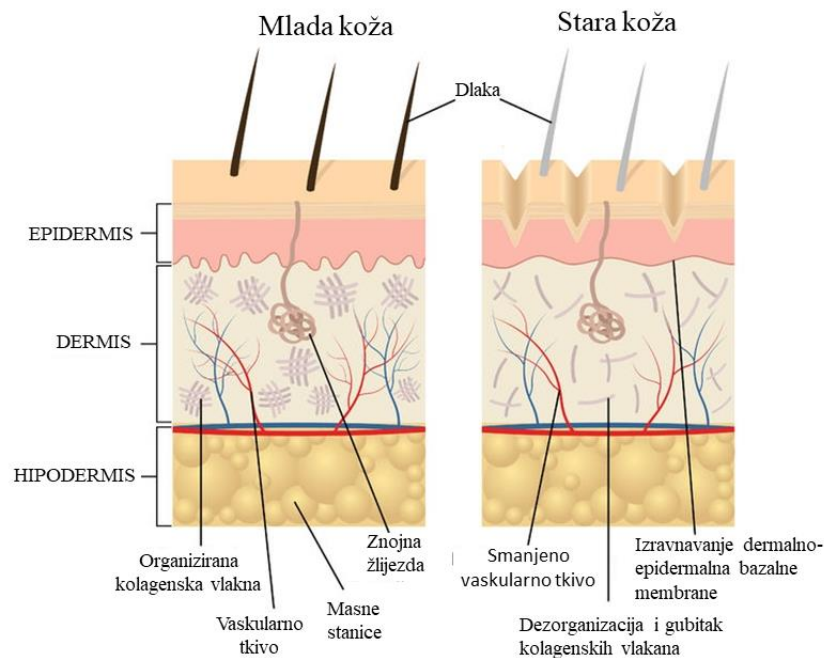
Posebno treba istaknuti da eksprimiranje telomeraze u potpunosti revitalizira stanice. Umjesto uobičajenih 55-60 dioba, telomeraza omogućava stanicama čovjeka neograničen diobeni potencijal istovremeno zadržavajući normalan mladi genotip i fenotip (Jiang i sur., 1999; Morales i sur., 1999). Ovo je prvi put pokazano na fibroblastima i epitelnim stanicama čovjeka, a ubrzo i na mnogim drugim tipovima stanica iz raznih organizama (Calvin B. Harley, 2002). Sve stanične kulture modificirane na način da kontinuirano eksprimiraju telomerazu ne pokazuju znakove senescencije ni nakon stotina dioba (Narzt i sur., 2021), zadržavaju profil ekspresije gena kao i sekretorni profil mladih stanica te formiraju kvalitetne trodimenzionalne tkivne formacije *in vitro* ili u tkivnim komoricama u miševima bez imuniteta (engl. *nude mice*) (Funk i sur., 2000).

Efekti produženja životne dobi, vitalnosti i revitalizacije eksprimiranjem telomeraze u raznim modelima transgeničnih miševa dokazuju da su telomere primarni mehanizam kontrole starenja na razini organizma (Tomás-Loba i sur., 2008) te da se tim mehanizmima može uspješno manipulirati. De Jesus i suradnici (de Jesus i sur., 2012) pokazali su da tretman miševa telomerazom, odnosno transdukcija adenovirusom koji eksprimira mišji TERT ima izvanredne učinke na zdravlje i kondiciju, uključujući osjetljivost na inzulin, osteoporozu, neuromuskularni fitnes te još nekoliko molekularnih biomarkera starenja. Pri tome su tretirani miševi imali smanjenu incidenciju nastanka tumora uz bolje preživljenje dok se profil nastalih tumora nije mijenjao u odnosu na kontrolne životinje. Konačno, miševima tretiranima telomerazom u dobi od 1 godine i u dobi od 2 godine, povećan je srednji životni vijek za 24%, odnosno 13%. Time su pokazali da aktivacija telomeraze na razini organizma omogućuje odgađanje fiziološkog starenja i produljuje normalni životni vijek.

#### **1.4. Koža**

Koža je najveći organ čovjeka koji prekriva cijelo tijelo s ukupnom površinom od prosječno  $2\text{ m}^2$ . Sastoji se od tri karakteristična sloja, a to su epidermis, dermis i hipodermis (Slika 7). Njezina glavna funkcija je da djeluje kao barijera koja pruža zaštitu od mehaničkih naprezanja, ekstremnih temperatura, toksina, zračenja i mikroorganizama te ima osjetilnu i regulatornu funkciju (Limbert i sur., 2019; Swaney i Kalan, 2021). Starenjem dolazi do promjena u morfologiji i funkciji kože kao posljedica kontinuiranog izlaganja vanjskim i unutarnjim čimbenicima (Limbert i sur., 2019).

Vanjsko ili ekstrinzično starenje pokreću čimbenici iz okoliša (ultraljubičasto zračenje (UV), onečišćenje zraka), mehanički čimbenici te način života kao npr. dijeta, način spavanja, pušenje cigareta itd. (Limbert i sur., 2019; Kim, Park i Kang, 2022). Pri tome je jedan od glavnih vanjskih uzročnika starenja kontinuirano nezaštićeno izlaganje suncu, poznato i kao fotostarenje (Tobin, 2017; Kim, Park i Kang, 2022). Unutrašnji čimbenici pokreću kronološko ili intrinzično starenje, a kao glavni uzročnici se smatraju genetski i hormonalni faktori (Limbert i sur., 2019).



**Slika 7.** Razlike između mlade i stare kože kao posljedica starenja kože (preuzeto i prilagođeno iz <https://apothekari.com/aging-skin-7-things-that-can-happen/>).

### 1.4.1. Epidermis

Vanjski sloj kože poznat je kao epidermis i tanji je 15 do 40 puta u usporedbi s dermisom (Limbert i sur., 2019). Sastoji se prvenstveno od keratinoznog slojevitog pločastog epitela koji nije vaskulariziran. Komponente epidermisa možemo podijeliti u dva dijela. Prvi dio naziva se *stratum corneum* i nalazi se na krajnjem vanjskom dijelu kože. Sastoji se od mrtvih spljoštenih korneocita i odgovoran je za zaštitu kože, sprječavanje gubitka vode, održavanje optimalne hidratacije kože i sprječavanje prekomjerne dehidracije te mnoge druge zaštitne funkcije. Drugi dio se uglavnom sastoji od živih stanica kao što su keratinociti (90-95%), Langerhansove stanice (2%), melanociti

(3%) i Merkel stanice (0,5%) (Tobin, 2017). U najdubljem dijelu epidermisa nalazi se bazalni sloj koju čine epidermalne matične stanice i one doprinose njegovoj visokoj proliferativnoj sposobnosti. Sposobne su diferencirati u keratinocite koji će zatim migrirati prema *stratum corneumu* procesom keratinizacije (Limbert i sur., 2019). Pri tome će pomicati starije keratinocite prema površini i na kraju postati korneociti. Međutim, sposobnost proliferacije epidermalnih matičnih stanica značajno se smanjuje starenjem, točnije pada za polovicu u dobi od 30 do 70 godina (Limbert i sur., 2019). Najveća promjena tijekom starenja u epidermisu je upravo na bazalnoj membrani koja postaje sve tanja.

#### **1.4.2. Dermalno-epidermalna bazalna membrana**

Dermalno-epidermalna bazalna membrana služi kao granica između epidermisa i dermisa te nosi epidermalne matične stanice (Taghavikhalilbad i sur., 2017; Bonté i sur., 2019). Pored toga, funkcija joj je da omogućava razmjenu hranjivih tvari, staničnu signalizaciju i uklanjanje otpada avaskularnog epidermisa. Starenjem, dermalno-epidermalna bazalna membrana će se izravnati (dolazi do smanjenja naboranosti) zbog smanjene gustoće dermalnih papila (Bonifant i Holloway, 2019; Limbert i sur., 2019; Franco, Aveleira i Cavadas, 2022). Navedeno dovodi do smanjenja debljine epidermisa (čak do 80%). Kao posljedica smanjenja dermalnih papila tog sloja, smanjit će se i površina kontakta između epidermisa i dermisa, što na kraju uzrokuje smanjenje razmjene hranjivih tvari i otpada, ali i smanjenje elastičnosti kože i dovodi do stvaranja bora (Tobin, 2017; Franco, Aveleira i Cavadas, 2022).

#### **1.4.3. Dermis**

Srednji sloj kože poznat je kao dermis, smješten između potkožnog tkiva i dermalno-epidermalne bazalne membrane. Dermis je odgovoran za prijenos hranjivih tvari i potporu cirkulaciji (epidermis nema vlastitu opskrbu krvlju) te koži daje mehaničku čvrstoću (Limbert i sur., 2019). Dermis se sastoji od 2 dijela: površinski papilarni dermis i dublji retikularni dermis. Najveći dio dermisa sačinjavaju vezivno tkivo, kolageni i elastini, u koje su uklopljeni dermalni fibroblasti te znojne žlijezde, lojne žlijezde, krvne žile, živci i korijen dlake (Wong i sur., 2016). Fibroblasti su najzastupljeniji tip stanica u dermisu te su odgovorni za sintezu komponenata

izvanstaničnog matriksa kao što su kolageni, elastini i glikozaminoglikani i drugih proteina izvanstaničnog matriksa (Cole i sur., 2018).

Kolagen je najzastupljeniji protein u koži te doprinosi strukturnoj čvrstoći kože (Limbert i sur., 2019; Mathew-Steiner, Roy i Sen, 2021). Starenjem dolazi do promjene u strukturi kolagena (Slika 7). U mladoj koži, mreža kolagena je pravilno organizirana i čvrsto zbijena unutar papilarnog dermisa (Limbert i sur., 2019). Također, širi se u epidermis tvoreći dermalno-epidermalnu bazalnu membranu, koja dalje pruža strukturnu potporu koži. Glavni tip kolagena u mladoj koži je kolagen tipa I (80%) te potom kolagen tipa III (15%) (Tobin, 2017). Međutim, u starijoj koži, dermis je ozbiljno oštećen i stanjen, što je uglavnom uzrokovano povećanom fragmentacijom kolagena i smanjenjem kolagena tipa I u dermisu.

U ostarjeloj koži također je povećana ekspresija metaloproteinaza matriksa (MMP), enzima koji degradiraju kolagenska vlakna te dovode do njihove fragmentacije (Limbert i sur., 2019; Blair i sur., 2020). Posljedično, dolazi do povećanja cijepanja kolagena što dovodi do nastanka degradiranog i neorganiziranog izvanstaničnog matriksa. Osim toga, fragmentacija kolagena uzrokuje gubitak mjesta za pričvršćivanje fibroblasta (Cole i sur., 2018; Blair i sur., 2020), što rezultira smanjenjem broja fibroblasta (Cole i sur., 2018) (Slika 5). Stoga će biti manje dostupnih fibroblasta za sintezu novih kolagenskih vlakna.

Sljedeća važna komponenta izvanstaničnog matriksa je elastin koji je odgovoran za rastezljivost i elastičnost kože te je isprepleten s vlaknima kolagena (Xiong i sur., 2017). Starenjem dolazi do gubitka elastičnosti kože uglavnom zbog UV zračenja koje pokreće remodeliranje i razgradnju elastičnih vlakana putem aktivacije MMP-a (Tobin, 2017). Posljedično, smanjenje elastina kao i kolagena rezultirat će smanjenjem elastičnosti i povećanjem plastičnosti dermisa.

Jedan od najvažnijih glikozaminoglikana u koži je hijaluronska kiselina i smatra se glavnom molekulom odgovornom za vlažnost kože (Bukhari i sur., 2018), uglavnom zbog njezine sposobnosti zadržavanja molekula vode koja je i do 1000 puta veće od njezine molekulske mase (D. H. Lee, Oh i Chung, 2016). Međutim, u ostarjeloj koži dolazi do smanjenja sinteze hijaluronske kiseline (Papakonstantinou, Roth i Karakioulakis, 2012), kao posljedice smanjenog broja fibroblasta odgovornih za njezinu proizvodnju. Prisutnost hijaluronske kiseline u koži također osigurava pravilnu konfiguraciju kolagena i elastina kako bi struktura ostala netaknuta (Bukhari i sur., 2018). Dakle, smanjenje hijaluronske kiseline i povećanje dezorganizacije kolagena i elastina u ostarjeloj koži dovodi do istaknutosti finih linija i bora.



## 1.5. Strategije za uklanjanje senescentnih stanica iz organizma

U literaturi se mogu pronaći brojni radovi koji pokazuju kako je nakupljanje senescentnih stanica u organizmu glavni uzročnik brojnih bolesti povezanih sa starenjem (Childs i sur., 2017). Također, pokazano je i da njihovo uklanjanje ima velike pozitivne učinke te da je otkrivanje novih uzročnika i strategija za uklanjanje senescentnih stanica ključno u borbi protiv starenja. Strategije za uklanjanje senescentnih stanica iz organizma možemo općenito podijeliti u dvije kategorije: na senolitike, spojeve koji eliminiraju senescentne stanice te na senomorfne spojeve, koji sprječavaju štetne stanično-okolišne učinke senescentnih stanica i uključuju inhibitore SASP-a (Di Micco i sur., 2021).

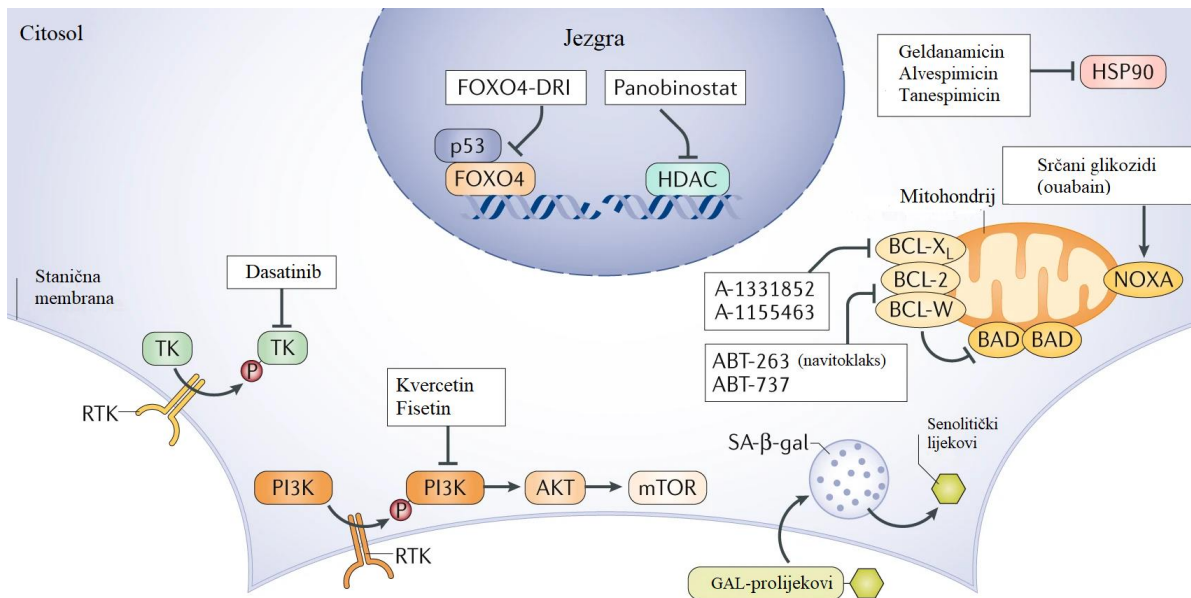
### 1.5.1. Senolitici

Senescentne stanice često imaju pojačanu ekspresiju negativnih čimbenika koji utječu na apoptozu, uključujući članove obitelji BCL-2 (uključujući BCL-2, BCL-W i BCL-xL), koji daju otpornost stanici na signale koji izazivaju apoptozu (Chang i sur., 2016; Yosef i sur., 2016). Senolitički spojevi poput ABT-737 i ABT-263 (Slika 8), također poznat kao Navitoclax, inhibiraju aktivnost članova obitelji BCL-2, omogućujući senescentnim stanicama ulazak u apoptozu. Navitoclax ciljano pokreće apoptozu u replikativnoj, onkogenom induciranoj ili zračenjem induciranoj senescenciji u različitim tipovima stanica (epitelnim stanicama pupčane vene, fibroblastima pluća čovjeka i embrionalnim fibroblastima miša), ali ne u primarnim preadipocitima čovjeka (Zhu i sur., 2016). Ispitivanje na ozračenim miševima otkrilo je da Navitoclax uklanja senescentne stanice, pomlađuje koštanu srž i mišićne hematopoetske matične stanice i tako smanjuje rano starenje hematopoetskog sustava (Chang i sur., 2016). Osim toga, Navitoclax smanjuje sekreciju mnogih faktora senescentnih stanica u mišjim plućima, kao što su p16<sup>INK4A</sup> i TNF $\alpha$ , što umanjuje mogućnost post-traumatskog osteoartrisa selektivnom eliminacijom senescentnih stanica iz zglobne hrskavice i sinovijalne membrane (Jeon i sur., 2017). Također, provedena su i istraživanja na strukturnom srodniku Navitoclaxa ABT-737, koristeći fetalne stanice fibroblasta pluća čovjeka IMR 90 i MEF (embrionalni fibroblasti miša) koje su karakterizirane visokom ekspresijom BCL-2, BCL-W, i BCL-xL protuapoptotskih proteina, a senescencija je potaknuta različitim stimulansima (Yosef i sur., 2016). ABT-737 je uspješno uklonio senescentne stanice iz pluća i epidermisa ozračenih miševa te je došlo do poboljšane

proliferacije matičnih stanica u folikulima dlake. Unatoč pozitivnim efektima, Navitoclax i ABT-737 se smatraju opasnim zbog njihovog toksičnog učinka na neutrofile i trombocite što ograničava njihovu primjenu. Trenutno je u ispitivanjima druga generacija inhibitora A-1331852 i A-1155463 koji su pokazali dobru senolitičku aktivnost, a smatra se da inhibiraju BCL-xL (Zhu i sur., 2017).

FOXO4-DRI je sintetski peptid sastavljen od D-aminokiselina koji djeluje tako da interferira s p53 i onemogućuje mu vezanje s FOXO4 (W. Li i sur., 2019) (Slika 8). U senescentnim stanicama, FOXO4 se veže s p53 i onemogućuje njegov put iz jezgre. Kad je ova interakcija onemogućena interkaliranjem FOXO4-DRI, p53 izlazi iz jezgre, inicirajući oslobađanje citokroma c iz mitohondrija i omogućena je apoptoza senescentnih stanica (Baar i sur., 2017). Korištenje raznih prirodnih flavonoida, uključujući kvercetin i fisetin, same ili u kombinaciji s dasatinibom, inhibitorom pan-tirozin kinaze koji blokira c-KIT (engl. *receptor tyrosine kinase protein*), efrin receptore i različite kinaze, pokazano je da može stimulirati senolizu u *in vitro* i *in vivo* uvjetima (Zhu i sur., 2015; Roos i sur., 2016; Schafer i sur., 2017; Yousefzadeh i sur., 2018) (Slika 8). Kod starih miševa tretiranih kombinacijom dasatiniba i kvercetina dobiveni su rezultati da je došlo do poboljšanja fizičke funkcije i produženja životnog vijeka životinja (Xu i sur., 2018). Važno je istaknuti da je primjena dasatiniba i kvercetina pokazala i učinkovitost u smanjenju ekspresije p16<sup>INK4a</sup> i SA- $\beta$ -gal u fazi I kliničkog ispitivanja među pacijentima s dijabetičkom bubrežnom bolešću (Hickson i sur., 2019) i idiopatskom plućnom fibrozom (Justice i sur., 2019).

Provedene su brojne studije i na MitoTamu, lijeku koji spada u skupinu tamoksifena koji cilja mitohondrije te se pokazao kao novi senolitik koji selektivno aktivira apoptozu senescentnih stanica smanjenjem potencijala mitohondrijske membrane i prevencijom oksidativne fosforilacije (OXPHOS), čime se poboljšava mitohondrijska stabilnost (Hubackova i sur., 2019). Nadalje, pokazalo se da MitoTam učinkovito uništava i inhibira razne vrste stanica raka bubrega u modelu glodavaca, što rezultira smanjenom tumorigenezom (EudraCT 2017-004441-25) te pokazuje potencijal za kliničku fazu II ispitivanja. Također, MitoTam se pokazao i kao potencijalni lijek za dijabetes, jednu od najčešćih bolesti povezanih sa starenjem (Vacurova i sur., 2022).

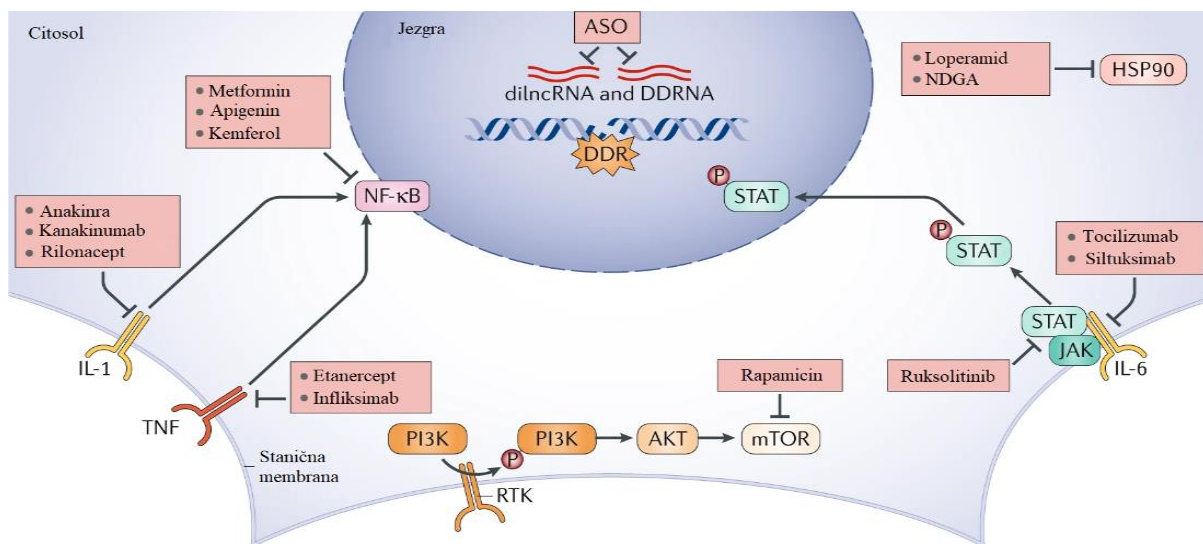


**Slika 8.** Strategije za uklanjanje senescentnih stanica iz organizma pomoću senolitika (preuzeto i prilagođeno iz Di Micco i sur., 2021).

### 1.5.2. Senomorfni spojevi

Kao druga opcija aktivnom uklanjanju senescentnih stanica, pristup baziran na senomorfim spojevima pokušava ograničiti štetne utjecaje tih stanica, uglavnom kroz podešavanje SASP-a. Kod sisavaca to uključuje spojeve poput rapamicina koji djeluje na put mTOR koji usklađuje rast stanica i metabolizma kao odgovor na prisutnost hranjivih tvari (Slika 9). Rapamicin djeluje kao inhibitor  $IL-1\alpha$  i samim time smanjuje proizvodnju SASP-a te ujedno utišava protumorigena svojstva SASP-a (Herranz i sur., 2015), sprječava senescenciju (Thapa i sur., 2017) i produljuje životni vijek laboratorijskih miševa. Nuklearni faktor- $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) (Slika 9) kritična je komponenta za proizvodnju SASP-a, i inhibicija njegove aktivnosti smanjuje mogućnost upale. U spojeve koji moduliraju NF- $\kappa B$  spadaju metformin (Moiseeva i sur., 2013; Maruthur i sur., 2016; Noren Hooten i sur., 2016; Oubaha i sur., 2016), apigenin (Lim, Park i Kim, 2015), kemferol (Lim, Park i Kim, 2015) i BAY 11-7082 (D. J. Baker i sur., 2011) te svi oni utječu na smanjenje proizvodnje komponenti SASP-a. Metformin, lijek protiv dijabetesa tipa 2, inhibira ulazak NF- $\kappa B$ -a u jezgru i na taj način ograničava razinu njegove ekspresije (Moiseeva i sur., 2013). Metformin smanjuje upalne reakcije u modelu miša, na taj način ublažava nekoliko bolesti povezanih sa starenjem i produžava život miševa (Martin-Montalvo i sur., 2013). Klinička

ispitivanja utjecaja metformina na starenje su u tijeku (Barzilai i sur., 2016; Campbell i sur., 2017) te je ovo prvo probno ispitivanje nekog lijeka gdje se starenje tretira kao bolest. Također, dobra senomorfna svojstva pokazala su i brojna protutijela usmjerena protiv ključnih komponenti SASP-a ili njihovih receptora, uključujući IL-6, IL-1a, IL-1 $\beta$  i TNF (Cohen i sur., 2002; Klareskog i sur., 2004; Hoffman i sur., 2008; Kuemmerle-Deschner i sur., 2011; Laberge i sur., 2012; S. Liu i sur., 2015; Wakita i sur., 2020) te brojni drugi putevi koji djeluju na uklanjanje štetnog djelovanja SASP-a. Ciljanje IL-6 ili njegovog receptora može se postići primjenom lijekova kao što su siltuksimab ili tocilizumab, koji inhibiraju citokine odnosno njegove receptore (Emery i sur., 2008; Karkera i sur., 2011; van Rhee i sur., 2014). Međutim, potrebno je prethodno ispitati utjecaj tih spojeva na SASP i starenje prije nego što se mogu sigurno primjenjivati terapijski kao regulatori starenja. Inhibitor aktivatora plazminogena-1 (PAI-1), također poznat pod nazivom SERPINE1, ključna je komponenta SASP-a i izravni posrednik staničnog starenja. U mišjem modelu ubrzanog starenja, i nedavno kod ljudi iz Amiške zajednice, utvrđeno je da smanjena razina tog inhibitora štiti od bolesti povezanih sa starenjem i produljuje životni vijek (Eren i sur., 2014; Khan i sur., 2017). Ciljana inhibicija PAI-1 s TM5441 pokazala je sličnu aktivnost u miševa te je trenutno u fazi kliničkog ispitivanja.



**Slika 9.** Strategije za uklanjanje senescentnih stanica iz organizma pomoću senomorfa (preuzeto i prilagođeno iz Di Micco i sur., 2021).

Objekte navedene strategije ciljaju različite skupine staničnih puteva, što ukazuje na širok raspon različitih spojeva koji mogu utjecati na senescentne stanice odnosno komponente SASP-a što je ujedno i prednost i mana. Nedostaci ovih strategija su što ovi spojevi mogu biti i toksični za organizam i nisu svi specifični za senescentne stanice što ograničava njihovu primjenu kod ljudi. Senescentne stanice i komponente SASP-a također imaju i pozitivnu ulogu u organizmu te dosad otkriveni spojevi ne mogu razlikovati njihovu pozitivnu od štetne uloge (Hernandez-Segura, Nehme i Demaria, 2018).

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Stare stanice svojom akumulacijom i sekretornim fenotipom narušavaju tkivnu homeostazu i doprinose propadanju tkiva. Vođena tim saznanjem, očekujem da ću povećanjem udjela mladih stanica u koži starog štakora promijeniti metabolički profil tretiranog tkiva, poboljšati regenerativni potencijal stanica te revitalizirati tretirano tkivo. Na temelju navedene hipoteze istraživanja definirani su sljedeći ciljevi:

- I. Istražiti dinamiku starenja kože štakora Fischer 344 metodama histologije, imunofluorescencije i molekularno biološkim metodama.
- II. Intervenirati u starenje kože štakora Fischer 344 mikrotransplantacijom mladih fibroblasta, endotelnih ili matičnih stanica.
- III. Mikrotransplantacijom mladih stanica navedenih pod II u kožu starih štakora Fischer 344 povećati udio mladih stanica u dermisu kože starih štakora Fischer 344 metodom mikrotransplantacije mladih stanica kako bi se rekonstruirao mikrookoliš i homeostaza mladog tkiva.
- IV. Proučiti učinak mikrotransplantacije mladih stanica u koži štakora Fischer 344 različite starosti na proliferaciju matičnih stanica epiderme i regeneraciju tkiva.
- V. Dugoročno pratiti (1, 6 i 12 mjeseci) utjecaj mikrotransplantacije mladih stanica u koži štakora Fischer 344 na proliferaciju matičnih stanica epidermisa i obnovu tkiva.
- VI. Proučiti promjenu ekspresije gena u koži štakora Fischer 344 nakon mikrotransplantacije mladih stanica kod starih (24 mjeseca), odnosno mladih (6 mjeseci) životinja.

### **3. MATERIJALI I METODE**



### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Osnovne kemikalije

Tablica 1. Popis osnovnih kemikalija

Kemikalija	Proizvođač
etanol	Kemika, Hrvatska
agaroz	Sigma-Aldrich
etidijev bromid	Roth, Njemačka
izopropanol	Kemika, Hrvatska
kalijev fericijanid ( $K_3Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ )	Kemika, Hrvatska
kalijev ferocijanid ( $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ )	Kemika, Hrvatska
kloridna kiselina (HCl)	Kemika, Hrvatska
magnezijev klorid ( $MgCl_2$ )	Fluka, Njemačka
natrijev hidroksid (NaOH)	Kemika, Hrvatska
natrijev klorid (NaCl)	Kemika, Hrvatska
Triton X-100	Thermo Scientific
kalijev klorid (KCl)	Kemika, Hrvatska
natrijev hidrogenfosfat ( $Na_2HPO_4$ )	Kemika, Hrvatska
kalijev dihidrogenfosfat ( $KH_2PO_4$ )	Kemika, Hrvatska
natrijev dodecilsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Isofluran	Piramal, Indija
Paraformaldehid 4%	Sigma-Aldrich, SAD
Dimetil sulfoksid (DMSO)	Sigma-Aldrich, SAD
Saharoza ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ )	Kemika, Hrvatska
RNAprotect	Qiagen, Njemačka
Cezijev klorid (CsCl)	Sigma-Aldrich, SAD
ksilen	Biognost, Hrvatska
Limunska kiselina monohidrat	Kemika, Hrvatska
X-gal	AppliChem, Njemačka
DMF	Merch, Njemačka
Trizol	Sigma-Aldrich, SAD
kloroform	Kemika, Hrvatska
PBS	Sigma-Aldrich, SAD

### 3.1.2. Kompleti kemikalija

Komplet za pročišćavanje izdvojene RNA: RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen, Njemačka)

Komplet za obrnuto prepisivanje RNA u cDNA: iScript™ cDNA Synthesis Kit (BioRad)

### 3.1.3. Enzimi, proteini, protutijela i nukleotidi

Dispaza (Gibco, SAD)

Kolagenaza (Gibco, SAD)

Tripsin (Sigma-Aldrich, SAD)

Protu-Ki67 protutijelo (Abcam, UK)

Protu-Collagen I protutijelo (Abcam, UK)

Protu-Collagen III protutijelo (Abcam, UK)

Protu-HP1 gamma/ CBX3 protutijelo (Abcam, UK)

Protu-gamma H2A.X protutijelo (Abcam, UK)

Protu-53BP1 protutijelo (Abcam, UK)

Protu-CD31 protutijelo (Abcam, UK)

Protu-integrin alpha 6 protutijelo (Abcam, UK)

### 3.1.4. Hranjivi mediji za uzgoj stanica

Dulbecco modificirani minimalni hranjivi medij za uzgoj stanica (engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium*, DMEM, Sigma-Aldrich, SAD) s 4500 mg/L glukoze, L-glutaminom, fenolnim crvenilom i 3,7 g/L NaHCO<sub>3</sub>, obogaćen s 10% fetalnog seruma goveda (engl. *Fetal Bovine Serum*, FBS).

KSFM medij (Gibco, SAD) za uzgoj keratinocita bez seruma s dodatkom epidermalnog faktora rasta (rEGF, 0,2 ng/mL) i ekstrakta goveđe hipofize (BPE, 30µg/mL).

Medij za uzgoj endotelnih stanica (ECM-r, ScienCell, SAD) koji se sastoji od bazičnog medija s dodatkom 20% FBS-a i 1% dodatka za rast endotelnih stanica (ECGS).

### **3.1.5. Organizmi i stanice**

#### **3.1.5.1. Životinjski model**

Izogena linija štakora Fisher 344 korištena je za pokuse heterotransplantacije stanica. Za eksperimente obnove kože životinja različitih starosti (6, 12, 18 i 24 mjeseca, n = 5-6) mikrotransplantirani su fibroblasti u kožu štakora i uzorkovanje je bilo provedeno nakon 4-6 tjedana. Za dugotrajne pokuse korišteni su štakori stari 6 mjeseci (n = 3-4) u vrijeme unosa stanica, prvo uzorkovanje je nakon mjesec dana te 6 i 12 mjeseci nakon implantacije. Pri čemu se mikrotransplantiraju fibroblasti, matične ili endotelne stanice u kožu štakora.

Istraživanje je odobreno od strane etičkog povjerenstva (Ministarstvo poljoprivrede, Zagreb, Hrvatska) HR-POK-003, odobreno 14. studenog 2018. Štakori se uzgajaju na Institutu Ruđer Bošković u laboratoriju za Pogon laboratorijskih životinja.

#### **3.1.5.2. Primarne stanične kulture**

Primarna stanična kultura fibroblasta uspostavljena od stanica izdvojenih iz kože mladih izogenih jedinki štakora Fisher 344.

Primarna stanična kultura matičnih stanica uspostavljena od stanica izdvojenih iz epiderme kože mladih izogenih jedinki štakora Fisher 344.

Primarna stanična kultura endotelnih stanica uspostavljena od stanica izdvojenih iz derme kože mladih izogenih jedinki štakora Fisher 344.

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Uspostava primarne kulture stanica kože štakora

Novorođeni štakori Fisher 344, stari 3 do 5 dana, žrtvovani su i eksplantati njihove kože su sakupljeni i enzimatski razlagani u 0,25% otopini tripsina 2x30 minuta u inkubatoru pri 37°C uz stalno miješanje. Dobivena suspenzija je centrifugirana 5 minuta na 1000 x g, supernatant je odbačen, a talog je resuspendiran u DMEM-u s dodatkom 10% FBS-a i 2,5x penicilin/streptomycin/amfotericin B (10000 U penicilina, 10 mg streptomicina, 25 µg amfotericina/ml-100x, PSA, Sigma-Aldrich, SAD) i tako izolirana primarna kultura fibroblasta prebačena je u bočicu za uzgoj kulture stanica te je pohranjena u inkubator pri 37°C s 5% CO<sub>2</sub>.

Matične stanice epiderme izolirane su iz kože novorođenih štakora Fisher 344, starih 3 do 5 dana, te tako dobiveni kožni eksplantanti razlagani su u otopini dispaze (Gibco, SAD, 10 mg/mL) preko noći pri 4°C. Sljedeći dan razdvajan je epidermis od dermisa kože i epidermis kože je enzimatski razlagan u 0,25% otopini tripsina 20 minuta u inkubatoru pri 37°C uz stalno miješanje. Staničnoj suspenziji je dodan Dulbeccov modificirani minimalni medij (DMEM, Sigma-Aldrich, SAD) s dodatkom 20% fetalnog goveđeg seruma (FBS, Gibco, SAD). Suspenzija je profiltrirana i centrifugirana 5 minuta na 1000 x g, uklonjen je supernatant i ponovno dodan svježiji medij te je suspenzija prebačena u kultivacijsku bočicu prethodno obloženu kolagenom IV (Sigma-Aldrich, SAD; 2 mg/mL). Nakon 15 minuta medij je uklonjen iz kultivacijske bočice i na adherentne matične stanice ponovno je dodan svježiji medij te su pohranjene u inkubator pri 37°C s 5% CO<sub>2</sub>. Sutradan je opet promijenjen medij, ali sada je korišten medij specifičan za uzgoj matičnih stanica (K-SFM, Gibco, SAD).

Endotelne stanice su izolirane kao prethodno opisane matične stanice, razlika je što se prilikom razdvajanja epidermisa od dermisa prikuplja dermis i razlaže u otopini 4% kolagenaze IV (Gibco, SAD; 2,5mg/mL) preko noći pri 4°C. Stanična suspenzija je profiltrirana i centrifugirana 5 minuta na 1000 x g te resuspendirana u 200 µL PBS-a. Dobivena suspenzija je nanosena na Percoll otopinu (Biovit, Hrvatska) prethodno pripremljenu prema uputama proizvođača i centrifugirana na 400 x g 10 minuta. Sloj u kojima se nalaze endotelne stanice (1,033g/mL-1,047g/mL) su prikupljene pomoću pipetora te nasađene u kultivacijske bočice prethodno obložene kolagenom IV (Sigma-Aldrich, SAD; 2 mg/mL). Za uzgoj stanica koristi se medij specifičan za uzgoj endotelnih stanica ECM-r (ScienCell, SAD).

### 3.2.2. Uzgoj stanica u kulturi

Fibroblasti, matične i endotelne stanice izolirane iz novorođenih štakora uzgajane su u DMEM mediju uz dodatak 10% FBS i antibiotika (2,5x Penicilin/Streptomycin/Amfotericin B), KFSM mediju za uzgoj keratinocita uz dodatak antibiotika (2,5x Penicilin/Streptomycin/Amfotericin B, Sigma-Aldrich, USA), odnosno ECM-r mediju za uzgoj endotelnih stanica uz dodatak antibiotika (2,5x Penicilin/Streptomycin/Amfotericin B, Sigma-Aldrich, USA). U trenutku kada stanice dosegnu 90% konfluencije presađivane su u sterilnim uvjetima. Stanice su tripsinizirane u 0,25%-tnoj otopini tripsina 10 minuta pri 37°C, a reakcija je zaustavljena dodatkom medija sa serumom. Prosječni ukupni broj stanica je određen na elektronskom brojaču (Coulter Counter).

### 3.2.3. Imunofluorescencija na stanicama

Identitet izoliranih matičnih i endotelnih stanica je provjeravan određivanjem ekspresije specifičnih proteina (markera) na njihovoj površini. Za endotelne stanice korištena su protutijela specifična za CD31 (Abcam, UK) dok je za matične stanice korišteno protutijelo specifično za integrin  $\alpha$  6 (Abcam, UK). Ukupno je 100 000 stanica nasadeno na pokrovnice prethodno obložene kolagenom IV i dodano je 2 mL hranjive podloge (K-SFM ili ECM-r) te ostavljeno u inkubatoru pri 37°C preko noći. Sutradan je uklonjen medij i stanice su isprane u PBS-u te su stanice fiksirane u 4% paraformaldehidu 10 minuta. Pokrovnice su potom inkubirane s 0,5% Triton X-100/PBS na sobnoj temperaturi 5 minuta i dodatno isprane 5 minuta u PBS-u. Kako bi se smanjila pozadinska fluorescencija, uzorci su inkubirani s 3% BSA jedan sat pri sobnoj temperaturi. Nakon toga slijedi inkubacija u primarnom protutijelu preko noći pri 4°C.

**Tablica 2.** Popis korištenih primarnih i sekundarnih protutijela za imunofluorescenciju na stanicama

<b>Primarna protutijela</b>	<b>Razrijeđenja</b>
Rabbit Anti-Integrin alpha 6, Abcam	1:300
Mouse Anti-CD31, Abcam	1:250
<b>Sekundarna protutijela</b>	<b>Razrijeđenja</b>
Anti-Rabbit IgG (Alexa Fluor 488), Abcam	1:500
Anti-Mouse IgG (Alexa Fluor 647), Abcam	1:500

Sutradan su stakalca nakon ispiranja u PBS-u 3x 5 minuta inkubirana sekundarnim protutijelom jedan sat na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon dodatnog ispiranja u PBS-u uzorci su obojeni Hoechstom 33342, isprani i uklopljeni u mediju za uklapanje (Permafluor, Thermo Scientific, SAD). Uzorci su pretraživani i snimani konfokalnim mikroskopom LSM 700 (Zeiss).

### **3.2.4. Obilježavanje stanica bojom DiI**

Za eksperimente regeneracije kože kod životinja različite starosti korištena je karbocijaninska boja DiI za obilježavanje staničnih membrana fibroblasta kako bi se omogućila identifikacija implantiranih stanica u koži. DiI je fluorescentna boja koja se integrira u plazma-membrane i membrane staničnih organela, nema utjecaj na stabilnost, razvoj ili osnovne fiziološke osobine stanica. Nije toksična i daje visoko stabilno obojenje pa se koristi za dugoročno praćenje stanica u kulturi, ali i u živim embrijima i životinjama.

DiI boja dodana je u suspenziju DMEM s 10% FBS i stanica ( $8 \times 10^6$ ) u konačnoj koncentraciji od 5  $\mu$ M i stanice su inkubirane u mraku 20 minuta pri 37°C. Stanice su zatim istaložene 5 minuta na 1000 x g, supernatant je odbačen, a stanični talog je 3 puta ispran u DMEM-u s 10% FBS-a. Nakon posljednjeg taloženja je stanicama dodan medij bez seruma tako da je ukupni volumen stanične suspenzije 100  $\mu$ L i tako obilježene stanice su implantirane u štakore.

### **3.2.5. Transdukcija stanica adenovirusnim vektorima**

Kako bi omogućili dugoročno praćenje implantiranih stanica (uzorkovanje nakon 1, 6 i 12 mjeseci) korišten je zeleni fluorescentni protein (engl. *Green Fluorescent Protein*, GFP) za obilježavanje matičnih stanica i mCherry s hTERT podjedinicom (Vector biosystems inc, SAD) za obilježavanje fibroblasta i endotelnih stanica. Kao vektor korišten je adenovirus tipa 5 (Ad5). Ad5 vektori transduciraju širok raspon tipova stanica i ne ugrađuju se u genom (Wold and Toth 2013). Transducirani fibroblasti i endotelne stanice su revitalizirane indukcijom katalitičke podjedinice enzima telomeraze (hTERT-a).

Prvi korak je utvrđivanje najboljih uvjeta transdukcije fibroblasta, matičnih i endotelnih stanica. Stanice su nasadene u pločice za uzgoj kulture stanica sa 6 bunarića ( $1 \times 10^5$  stanica po bunariću) te su nakon 24 sata transducirane s Ad5-GFP ili Ad5-mCherry. Broj dodanih

adenoviralnih čestica po stanici (engl. *multiplicity of infection*, MOI) je  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$  i  $1 \times 10^6$  vp/st (engl. *viral particle*), vrijeme inkubacije je 24 i 72 sata. Nakon inkubacije u inkubatoru za uzgoj kulture stanica, uklonjena je hranjiva podloga sa stanica i one su isprane s PBS-om (500  $\mu$ L) te je dodan tripsin (300  $\mu$ L). Nakon odvajanja stanica od podloge, dodan je medij sa serumom te su stanice centrifugirane 5 minuta pri 1200 x g. Supernatant je uklonjen, a stanični talog je resuspendiran u 100  $\mu$ L PFA1%/PBS pufera kako bi se stanice fiksirale. Nakon inkubacije 10 minuta pri sobnoj temperaturi, stanice su isprane s PBS-om (500  $\mu$ L) i centrifugirane 10 minuta pri 1200 x g. Supernatant je uklonjen, a talog stanica je resuspendiran u 250  $\mu$ L PBS-a i prebačen u epruvete za protočni citometar. Uspješnost transdukcije određena je na protočnom citometrijom na uređaju FACSCalibur. Stanice u protočnom citometru prolaze kroz lasersku zraku pri čemu dolazi do emisije fotona određene valne duljine, a signal se bilježi detektorom. Rezultati su prikazani kao uspješnost transdukcije koja odgovara geometrijskoj srednjoj vrijednosti intenziteta fluorescencije prikazanoj kao apsolutna ili relativna vrijednost.

Optimizacijom su dobivene vrijednosti za transdukciju za sve stanične tipove, za fibroblaste i endotelne stanice transducirane s Ad5-mCherry je MOI  $1 \times 10^5$  vp/st 72 sata i kod matičnih stanica transduciranih s Ad5-GFP je MOI  $1 \times 10^4$  vp/st 24 sata. Dobivene vrijednosti su korištene za transdukciju stanica za dugoročno praćenje mikrotransplantacije.

### **3.2.6. Mikrotransplantacija stanica kože štakora**

Mikrotransplantacija je metoda razvijena u Laboratoriju za molekularnu i staničnu biologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, a temelji se na difuznoj implantaciji stanica u tkivo kože u svrhu regeneracije kože. Najmanje tjedan dana prije implantacije trajno se obilježavaju polja od 1  $\text{cm}^2$  na leđima štakora pomoću uređaja za tetoviranje (iStar 3000, MEI-CHA, SAD) s nastavkom s jednom iglom. Mikrotransplantacije stanica su provedene korištenjem istog uređaja, ali sa nastavkom s 11 igala. Implantirano je  $8 \times 10^6$  obilježenih mladih stanica u 150  $\mu$ L medija (DMEM bez seruma, K-SFM ili ECM-r). Sa svake životinje se uzima kontrolno tkivo (negativna kontrola; NK), mehanički tretirano tkivo (mehanička kontrola; MK), te tkivo tretirano mladim stanicama (TT). Nakon što koža u potpunosti zacijeli uzimaju se uzorci 4-6 tjedana nakon implantacije, odnosno u eksperimentima gdje se prati dugoročni utjecaj nakon 1, 6 i 12 mjeseci.

### **3.2.7. Uzorkovanje i priprema preparata kože**

Životinje su anestetizirane u uređaju za inhalacijsku anesteziju (Somnosuite, Kent Scientific, SAD) s isofluranom i uzorci su uzeti pomoću cilindra za biopsiju. Tri različita uzorka biopsije prikupljena su sa svakog anestetiziranog štakora; netretirano tkivo (negativna kontrola; NK), mehanički tretirano tkivo (mehanička kontrola; MK), te tkivo tretirano mladim stanicama (TT). Tako dobiveni uzorci su podijeljeni u 3 dijela i fiksirani i uklopljeni u parafin, uklopljeni u O.C.T. i smrznuti pri  $-80^{\circ}\text{C}$  (Tissue-Tek) i pohranjeni u RNAlater (Qiagen, Njemačka) (detaljnije objašnjeno u daljnjem tekstu).

#### **3.2.7.1. Uklapanje tkiva u parafin**

Jedan dio svakog uzorka je fiksiran na sobnoj temperaturi u 4% paraformaldehidu preko noći. Sutradan su uzorci dehidrirani u uzlaznom nizu koncentracije etilnog alkohola (70% - 100%) te potom slijedi korak prosvjetljivanja u otopini ksilena kako bi se tkivo proželo otapalom za parafin te u konačnici uklopilo u parafin. Tako pohranjeno tkivo narezano je na mikrotomu na debljinu od 5  $\mu\text{m}$  i korišteno za daljnje analize.

#### **3.2.7.2. Smrzavanje uzoraka tkiva**

Dio uzorka namijenjen za smrzavanje prvo je fiksiran dva sata pri  $4^{\circ}\text{C}$  u 4% paraformaldehidu, te nakon toga je krioprotektirano prvo u 5% saharozi preko noći pri  $4^{\circ}\text{C}$ , a zatim u 30% saharozi preko noći pri  $4^{\circ}\text{C}$ . Uzorci su nakon toga uklopljeni u mediju za smrzavanje O.C.T. (Sakura, Japan) i pohranjeni pri  $-80^{\circ}\text{C}$  te su narezani na kriotomu na debljinu od 7  $\mu\text{m}$  i 60  $\mu\text{m}$  i čuvaju se na predmetnim stakalcima također pri  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **3.2.7.3. Pohrana uzoraka tkiva u RNAlater**

Dio tkiva nakon uzorkovanja je ispran u PBS-u i pohranjeno u otopinu s RNAlaterom (Qiagen, Njemačka) te pohranjen pri  $-20^{\circ}\text{C}$ . RNAlater je reagens koji se koristi za dugoročnu



pohranu tkiva jer stabilizira i štiti RNA na način da brzo prodire u svježe tkivo i denaturira RNaze, DNaze i proteaze kako bi se spriječila razgradnja RNA.

#### **3.2.7.4. Analiza uspješnosti implantacije stanica u kožu štakora**

U svrhu detekcije implantiranih stanica u tkivu kože štakora korištena su tkiva pohranjena pri  $-80^{\circ}\text{C}$ , koja su potom narezana na kriotomu na  $5\ \mu\text{m}$  i obojana Hoechst 33342 bojom, 20 minuta pri sobnoj temperaturi. Hoechst boja nukleinske kiseline te pobuđen UV svjetlošću emitira u plavom spektru u rasponu od  $460 - 490\ \text{nm}$  kad je vezan za dvolančanu DNA. Implantirane stanice su prethodno mikrotransplantaciji obilježene s DiI bojom (ekscitacijski maksimum na  $549\ \text{nm}$  i maksimalnu emisiju na  $565\ \text{nm}$ ) ili transducirane adenoviralnim vektorima koji sadrže GFP (ekscitacijski maksimum na  $489\ \text{nm}$  i maksimalna emisija na  $511\ \text{nm}$ ) ili mCherry (ekscitacijski maksimum na  $587\ \text{nm}$  i maksimalna emisija na  $610\ \text{nm}$ ) te nam omogućuju raspoznavanje i praćenje implantiranih stanica. Pripremljeni preparati su pretraživani i snimani konfokalnim mikroskopom TCS SP8 X (Leica) i uređajem ImageXpress Micro XLS (Molecular Devices).

#### **3.2.7.5. Bojanje hematoksinom eozinom (H&E)**

Uzorci uklopljeni u parafin ( $5\ \mu\text{m}$ ) su oslobođeni parafina grijanjem pri  $60^{\circ}\text{C}$ , potom se uranjaju u ksilen i rehidriraju u silaznom nizu koncentracije etilnog alkohola (100%, 80%, 30%) te destiliranom vodom. Zatim su obojani hematoksinom (Merck, SAD) 7 minuta na sobnoj temperaturi, isprani vodovodnom vodom i obojeni eozinom (Merck, SAD) 7 minuta. Prerezi su potom dehidrirani u uzlaznom nizu koncentracija etilnog alkohola (30%, 80%, 100%) i uklopljeni u mediju za uklapanje (Biomount New, Biognost, Hrvatska). Uzorci su pretraživani i snimani fluorescencijskim mikroskopom AX70 (Olympus).

#### **3.2.7.6. Analiza tkiva imunofluorescencijom**

Uzorci uklopljeni u parafin ( $5\ \mu\text{m}$ ) se deparafiniziraju grijanjem pri  $60^{\circ}\text{C}$ , potom se uranjaju u ksilen i rehidriraju u silaznom nizu koncentracija etilnog alkohola (100%, 80%, 30%) te

destiliranom vodom. Razotkrivanje antigena provedeno je inducirano toplinom u 10 mM citratnom puferu pH 6,0 (Dako, SAD). Zatim su uzorci inkubirani pola sata u Protein blockeru (Dako, SAD), nakon čega slijedi inkubacija s primarnim protutijelom u 1% BSA u PBS-u preko noći pri 4°C. Uzorci su sutradan isprani u PBS-u i inkubirani sa sekundarnim protutijelom u 10% -tnom normalnom serumu vrste u kojoj je sekundarno protutijelo proizvedeno i 1% BSA u PBS-u jedan sat na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon dodatnog ispiranja u PBSu uzorci su obojeni Hoechstom 33342, isprani i uklopljeni u mediju za uklapanje (Permafluor, Thermo Scientific, SAD). Uzorci su pretraživani i snimani konfokalnim mikroskopom LSM 700 (Zeiss).

Dobivena očitavanja signala imunofluorescencije za kolagen I i kolagen III su analizirana pomoću softvera ImageJ korištenjem CTCF metode (engl. *Corrected Total Cell Fluorescence*) prema formuli:

CTCF = integrirana gustoća - (površina analiziranog polja x srednja vrijednost pozadinske fluorescencije)

**Tablica 3.** Kombinacije i razrijeđenja primarnih i sekundarnih protutijela koja su korištena za imunofluorescenciju.

<b>Primarna protutijela</b>	<b>Razrijeđenja</b>
Rabbit Anti-Ki67, Abcam	5 µg/mL
Rabbit Anti-Collagen I, Abcam	5 µg/mL
Mouse Anti-Collagen III, Abcam	1:600
Rabbit Anti -53BP1, Abcam	1:100
Rabbit Anti-HP1 gamma, Abcam	1:1000
<b>Sekundarna protutijela</b>	<b>Razrijeđenja</b>
Anti -Rabbit IgG (Alexa Fluor 488), Abcam	1:500
Anti -Mouse IgG (Alexa Fluor 647), Abcam	1:500

### 3.2.8. Određivanje aktivnosti SA β-galaktozidaze (SA-β-gal)

Smrznuti uzorci pohranjeni pri -80°C rezani su na kriotomu na temperaturi od -25°C na debljinu od 60 µm. SA-β gal bojanje izvedeno je tako što su uzorci isprani tri puta s 1xPBS i inkubirani u otopini koja je sadržavala 1 mg/mL supstrata za β-galaktozidazu X-gal (engl. *5-bromo-4-chloro-3-indolylβ-D-galactopyranoides*) u puferu za bojanje (sadrži 40 mM limunske kiseline / Na fosfatnog pufera pH 6.0, 5 mM kalij-ferocijanida, 5 mM kalijevog ferocijanida, 150

mM NaCl i 2 mM MgCl<sub>2</sub>). Uzorci su inkubirani preko noći pri 37°C i uklopljeni s medijem za uklapanje. Uzorci su pretraživani i snimani fluorescencijskim mikroskopom AX70 (Olympus).

### **3.2.9. Umnažanje i pročišćavanje adenovirusnih vektora centrifugiranjem u cezijeovom kloridu**

Prilikom umnažanja adenoviralnih vektora koriste se HEK-293 stanice koje u svom genomu imaju stabilno ugrađeno E1 područje adenoviralnog genoma. Za svaku preparaciju adenoviralnih vektora HEK-293 stanice su uzgajane u 40 Petrijevih zdjelica promjera 10 cm i inficirane suspenzijom adenoviralnih vektora tako da je multiplicitet infekcije 5-10 PFU (engl. *plaque forming unit*) po stanici te ostavljene u inkubatoru pri 37°C 72 sata. Nakon 72 sata postiže se potpuni citopatogeni učinak što je vidljivo po odvajanju stanica od podloge. Stanice sa hranjivom podlogom se skupljaju u epruvetu i centrifugiraju 10 minuta pri 1100 x g nakon čega se ostavlja 10 ml medija, a ostatak se odbacuje. Dobivena suspenzija se nakon toga tri puta smrzava (-80°C) i odmrzava (37°C) kako bi se stanice lizirale i kako bi došlo do oslobađanja adenoviralnih čestica iz stanica. Suspenzija liziranih stanica se nakon toga centrifugira 10 minuta pri 3600 x g, supernatant se prebacuje u novu epruvetu, a talog se odbacuje. Adenovirusi iz supernatanta se dalje pročišćavaju u dva koraka: prvo na jastučiću cezijeovog klorida (CsCl), a potom u gradijentu CsCl. Pročišćavanje na jastučiću CsCl započinje tako da se u epruvetu za centrifugiranje dodaje 2.4 mL CsCl gustoće 1.4 g/mL i na njega nježno uz stijenkku nadsloji 2.4 mL CsCl gustoće 1.25 g/mL pazeći da ne dođe do miješanja slojeva. Nadalje se u epruvetu za centrifugiranje dodaje supernatant lizata stanica s oslobođenim česticama adenoviralnih vektora i potom se do vrha epruvete dodaje PBS. Uzorci se centrifugiraju u Beckman ultracentrifugi u rotoru SW41Ti tijekom 90 minuta pri 20°C i 35 000 x g. Sloj adenovirusa vidljiv je kao bijela vrpca na granici između dva sloja CsCl, a iznad tog sloja nalazi se i druga bijela vrpca koja sadrži nepotpune adenovirusne čestice. Pomoću šprice se pokupi sloj adenovirusa u volumenu do 1.5 mL i pomiješa s CsCl gustoće 1.34 g/mL do vrha epruvete za centrifugiranje. Uzorci se ponovno centrifugiraju preko noći pri 20°C i 35 000 x g. Adenovirusi se pomoću šprice s iglom skupljaju u novu epruvetu, a CsCl se uklanja pomoću kolone Sephadex G-25M (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Prvo se kolona ispire 6 puta PBS-om nakon čega se na kolonu dodaje pročišćeni adenovirusi (ne više od 1 mL) i u mikroeprevetu se skupi eluat (frakcija 0). Nadalje se dodaje po 0.5 mL pufera PBS na kolonu, pritom skupljajući

frakcije u numerirane epruvete. Frakcije u kojima se nalaze adenovirusi (najčešće frakcije 5, 6 i 7) se skupe te im se dodaje glicerol tako da mu konačan volumni udio bude 10% i pohrane pri -80°C.

### 3.2.10. Određivanje koncentracije adenovirusa

Metoda po Mitterederu (Mittereder, March i Trapnell, 1996) je korištena za određivanje koncentracije pročišćenih adenovirusnih čestica. Pripremljena su razrjeđenja adenovirusa u PS pufetu (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.1 % SDS) i inkubirana 10 min pri 56°C kako bi došlo do oslobađanja viralne DNA iz kapsida. Mikroepuvete s uzorcima se kratko centrifugiraju (30 s) pri 10000 x g i izmjerena je apsorbancija 260 nm (vrijednosti apsorbancije trebaju biti između 0.02 i 0.15). Koncentracija viralnih čestica računa se prema formuli:

$$N = A_{260} \cdot r \cdot 1,1 \cdot 10^{12}$$

N – broj viralnih čestica u mL

A<sub>260</sub> – izmjerena apsorbancija pri 260 nm

r – razrjeđenje suspenzije adenovirusa

### 3.2.11. Izdvajanje RNA

RNA je izolirana iz tkiva pohranjenih u RNAlater pomoću trizola (TRIzol Reagent, Sigma-Aldrich, SAD). Tkivo je usitnjeno i premješteno u tubicu s metalnim kuglicama za homogenizaciju uzorka (Precellys-lysing kit, Bertin instruments, Francuska) uz dodatak 1mL hladnog trizola. Ciklus homogenizacije je ponovljen dva puta na uređaju za homogenizaciju (Precellys 24, Bertin instruments, Francuska). Stanična suspenzija je premještena u nove tubice i dodano je 200μL kloroforma (Kemika, Hrvatska). Stanice su inkubirane 5 minuta pri sobnoj temperaturi, centrifugirane pri 14000 x g 15 minuta 4°C, nakon čega su dobivene tri faze. Gornja vodena faza u kojoj se nalazi RNA pažljivo je odvojena, te joj je dodan isti volumen izopropanola (Kemika, Hrvatska). Otopina je nekoliko puta lagano promiješana i stavljena pri -20°C 2 sata kako bi se potaknula precipitacija. Nakon toga je centrifugirana 15 minuta pri 14000 x g i 4°C. Supernatant je dekantiran, na talog je dodan 1 mL 75% etanola (Kemika, Hrvatska) te je bez miješanja

centrifugirano 15 minuta pri 1400 x g i 4°C, nakon čega je supernatant dekantiran. Postupak je ponovljen s 100% EtOH. Nakon 10 minuta sušenja na zraku, talog je otopljen u 40 µL miliQ vode bez RNaza gdje je dodan i inhibitor RNaze (0,25 U/µL Ribolock Rnase inhibitor, Thermo Scientific, USA). Koncentracija i kvaliteta (čistoća) RNA izmjerena je na uređaju NanoDrop (Thermo Scientific, USA) koji iz omjera apsorbancije 260/280 određuje čistoću izolirane RNA (omjer treba biti oko 2.0). Izolirana RNA je dodatno pročišćena pomoću kompleta (RNeasy MiniElute Cleanup Kit, Qiagen, Njemačka) i uzorci su pohranjeni pri -80°C.

### 3.2.12. Određivanje slijeda RNA

RNA sekvenciranje je napravljeno na Medicinskom sveučilištu u Beču u sklopu servisa za sekvenciranje. Sekvenciranjem ukupne RNA dobivene su biblioteke uzoraka koristeći QuantSeq FWD protokol (Lexogen). Za pripremu biblioteke korišteno je 18 PCR ciklusa, kao što je prethodno utvrđeno qPCR-om prema priručniku za pripremu biblioteke. Biblioteke su provjerene QC-om na Bioanalyzeru 2100 (Agilent) koristeći DNA komplet visoke osjetljivosti za ispravnu veličinu inserta i kvantificiran pomoću Qubit dsDNA HS testa (Invitrogen). Prikupljene biblioteke sekvencirane su na instrumentu NextSeq500 (Illumina) u 1x75bp načinu jednostranog sekvenciranja. U prosjeku je generirano 3 milijuna očitavanja po uzorku.

### 3.2.13. Bioinformatička obrada i analiza podataka

Očitavanja u fastq formatu su generirana pomoću Illumina bcl2fastq alata. Očitavanja su usklađena s referentnim genomom štakora verzija rnor 6.0 s anotacijom ensembla 96 pomoću STAR alignera verzija 2.6.1a. Očitavanja po genu su prebrojani pomoću STAR-a.

Diferencijalna ekspresija gena izračunata je pomoću DESeq2 verzija 1.22.2. Kako bi geni bili karakterizirani kao diferencijalno eksprimirani morali su zadovoljiti dva kriterija:  $|\log_2FC| \geq 1$  (engl. *logarithmic fold change*) i prilagođene statističke značajnosti  $p < 0,05$  (engl. *adjusted p value*).

Za PCA analize i heatmaps korišten je R paket 'stats' a za grafičke prikaze paket 'ggplot2'. Za k-means clustering i generiranje pojedinih heatmapa korišten je javno dostupan servis iDEP (<http://bioinformatics.sdstate.edu/idep/>). PCA analiza omogućava grupiranje podataka na temelju ekspresije gena stvarajući reprezentacije uzoraka u prostoru koji na taj način opisuju varijacije

između uzoraka. Heatmap se temelji na klasteriranju prema vrijednosti ekspresija gena i povezivanju sličnih uzoraka i formiranju klastera.

Za biološku značajnost promjene razine ekspresije gena i njihova uloga u biološkim procesima korišten je javno dostupan program DAVID (engl. *The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) Gene Functional Classification alat kojim su geni provučeni kroz GO\_TERM\_BP (engl. *gene ontology, biological process*) direkt bazu.

### **3.2.14. Statistička obrada rezultata**

Rezultati su statistički obrađeni u programu Statistica 14 (Dell Software). Za analizu ovisnosti mjerene varijable Y (ili njezinih transformacija) s obzirom na varijablu dob u mjesecima ili vrijeme nakon imlancije u mjesecima (x), koristili smo model linearne regresije s dobi u mjesecima/ vrijeme nakon imlancije u mjesecima kao regresor. Značajnost modela, primjerenost modela i nedostatak prilagodbe testirani su t-testom. Grupiranja unutar dobne skupine (s klasama NK, MK, i TT) su testirani one-way ANOVA testom s LSD *post hoc* testom). P vrijednosti ispod 0.05 smatrane su značajnim (\*), ispod 0.01 vrlo značajnim (\*\*), ispod 0.001 izuzetno statistički značajnim (\*\*\*) i ispod 0.0001 vrlo izuzetno statistički značajnim (\*\*\*\*).

## **4. REZULTATI**

#### 4.1.1. Uspješna implantacija mladih fibroblasta u kožu štakora različite dobi

Koža je najveći ljudski organ, prekriva površinu tijela te je glavni zaštitni organ tijela prema okolišu. Starenjem njegova zaštitna uloga slabi što je povezano s raznim upalnim procesima, smanjenjem efikasnosti zacjeljivanja rana i povećanim rizikom od malignih promjena. Fenotip starenja nastaje kao posljedica smanjenog potencijala za regeneraciju tkiva uz istovremeno narušavanje homeostaze tkiva i akumulacijom oštećenja. Akumulacija senescentnih stanica u tkivima glavni je katalizator starenja kod čovjeka. Kako je navedeno, stare stanice imaju promijenjenu ekspresiju gena, karakteriziranu jakim povećanjem sekrecije citokina, kemokina i ekstracelularnih proteinaza tzv. SASP, koja također uključuje niz faktora upale i rasta koji djeluju na remodeliranje tkiva, aktiviraju stanični imuni odgovor i stvaraju metabolički profil upale. Dodatno, sve te promjene imaju negativan utjecaj na epidermalne matične stanice (ESC) i regeneraciju.

Na temelju prethodno opisanih promjena na koži koje nastaju kao posljedica akumulacije senescentnih stanica, koristila sam metodu mikrotransplantacije kako bih povećala udio mladih stanica u dermisu. Mikrotransplantacija je metoda razvijena u Laboratoriju za molekularnu i staničnu biologiju na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu, a temelji se na difuznoj implantaciji stanica u tkivo kože u svrhu njene regeneracije. Prethodno dobiveni rezultati pokazuju da je transplantacija DiI obilježenih fibroblasta izoliranih iz kože štakora u dorzalnu kožu 12-mjesečnih životinja uspješna, te da se najbolji učinak postiže jednom mikrotransplantacijom korištenjem  $8 \times 10^6$  stanica po polju od  $1 \text{ cm}^2$ . Dobivena je učinkovitost implantacije od prosječno  $\sim 33.11\%$  te je pokazano kako su te stanice stabilne i održive u tkivu čak i nakon duljeg vremena (10 mjeseci) (Nanić i sur., 2022).

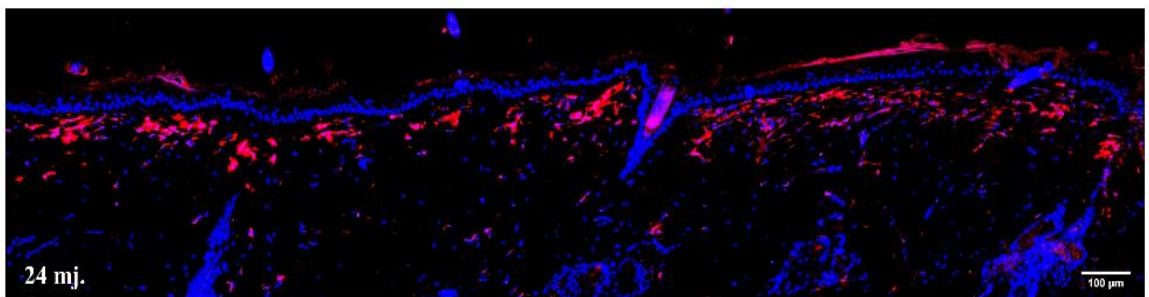
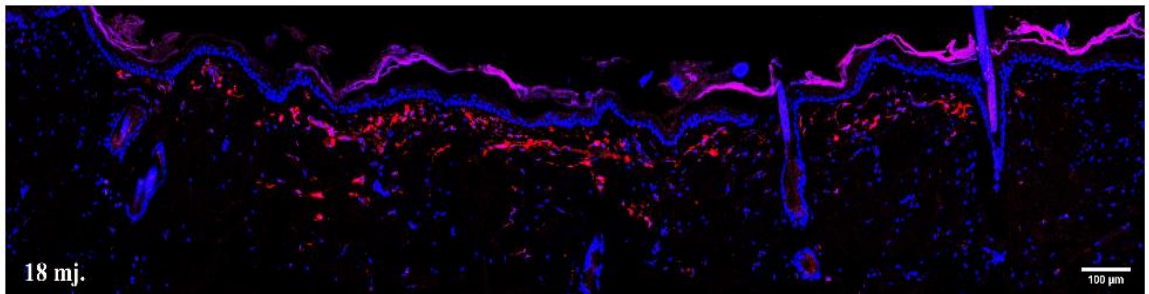
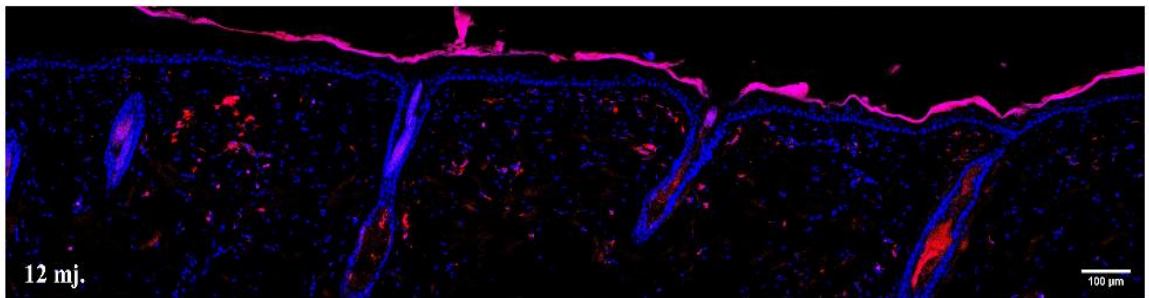
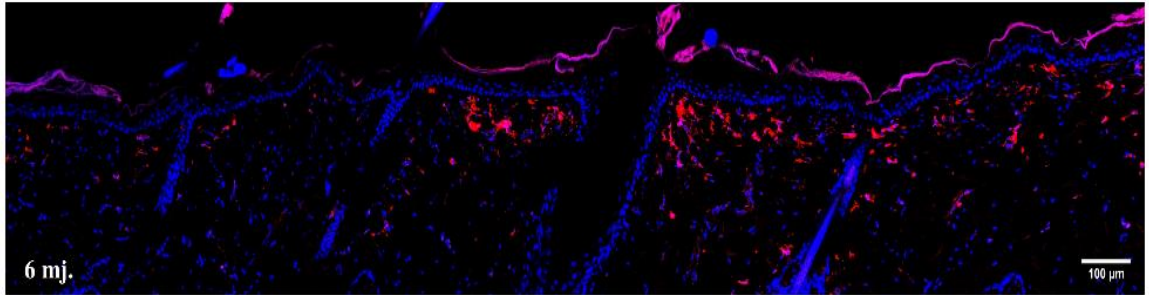
Na temelju prethodno opisanih rezultata, prilikom mikrotransplantacije koristila sam 8 milijuna mladih stanica u polje površine  $1 \text{ cm}^2$ , a kako bi ispitala uspješnost same metode ovisno o starosti životinje korišteni su štakori starosti 6, 12, 18 i 24 mjeseca. Svakom štakoru sam prije transplantacije stanica označila rubove dvaju polja, u jedno polje sam implantirala stanice, a u drugo polje sam aplicirala DMEM medij bez stanica što služi kao kontrola mehaničkog tretmana kože. Pored ova dva uzorka, prilikom uzorkovanja uzimala sam kao dodatnu kontrolu i komad netretirane kože. Tkiva su pohranjena na način opisan u materijalima i metodama.

Kako bi se analizirala koža nakon implantacije, uzorci štakora različite starosti pohranjeni su u O.C.T. mediju i rezani na debljinu od  $7 \mu\text{m}$  za analizu i dokumentaciju konfokalnim

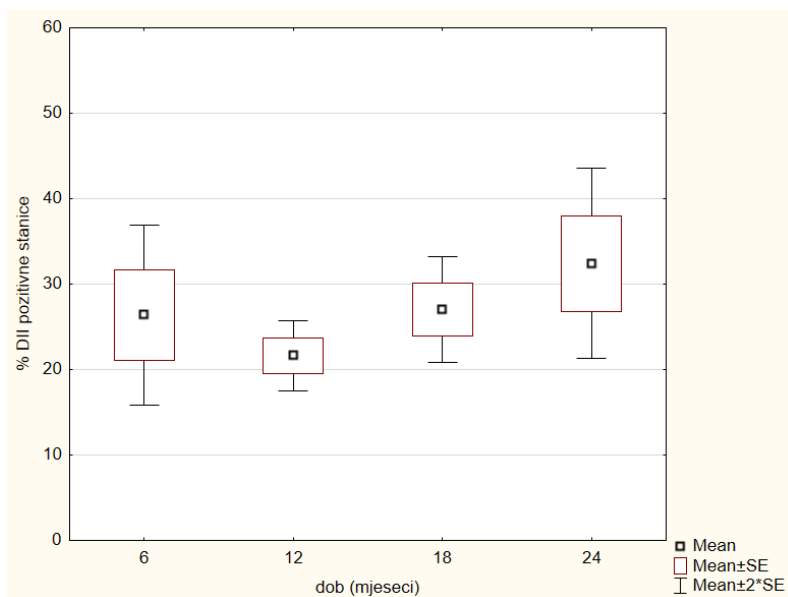


mikroskopom. Pri tome se je pratio biološki marker DiI koji boji stanične membrane crveno, a stanične jezgre su bojane s Hoechst u plavo (Slika 10).

A)



B)



**Slika 10.** Uspješnost implantacije fibroblasta obilježenih DiI bojom u kožu štakora različite dobi. A) Prerezi kože nakon tretmana mikrotransplantacije, jezgre stanica obojane su plavo, a stanične membrane implantiranih stanica crveno. Snimljeno konfokalnim mikroskopom SP8 X (Leica), povećanje 20X. B) Grafički prikaz uspješnosti implantacije stanica u kožu štakora različite starosti nakon mikrotransplantacije. n = 6 za 6, 12 i 18 mjeseci; n = 5 za 24 mjeseca stare životinje.

Analizom tretiranih tkiva pokazano je da su fibroblasti uspješno implantirani u kožu štakora (~22-33%; slika 10A), te da su prisutni i vijabilni nakon 4-6 tjedana od mikrotransplantacije. Stanice obilježene s DiI (crveni signali) nalaze se prvenstveno ispod bazalne membrane kože, no čak su prisutni i duboko ispod kapilarne mreže. Za svaki uzorak brojila sam DiI pozitivne stanice u dermisu u pravokutniku veličine 3000 x 300  $\mu\text{m}$  što obuhvaća većinu svakog tkivnog prereza te izračunala njihov postotak u odnosu na ukupan broj stanica u kvadratu. Svaka dobna skupina se sastojala od pet do šest životinja.

Dobiveni rezultati pokazuju da je najuspješnija implantacija bila kod 24 mjeseca starih životinja pri čemu je implantirano 17.45-49.66% stanica ovisno o analiziranom prerezu, a prosječno 32.4%. To znači da su skoro trećina ukupnih stanica nove mlade implantirane stanice. Kod 6, 12 i 18 mjeseci starih životinja uspješnost implantacije je bila nešto niža i iznosila je od prosječno 21.63-26.99%. Razlike između dobnih skupina nisu statistički značajne.

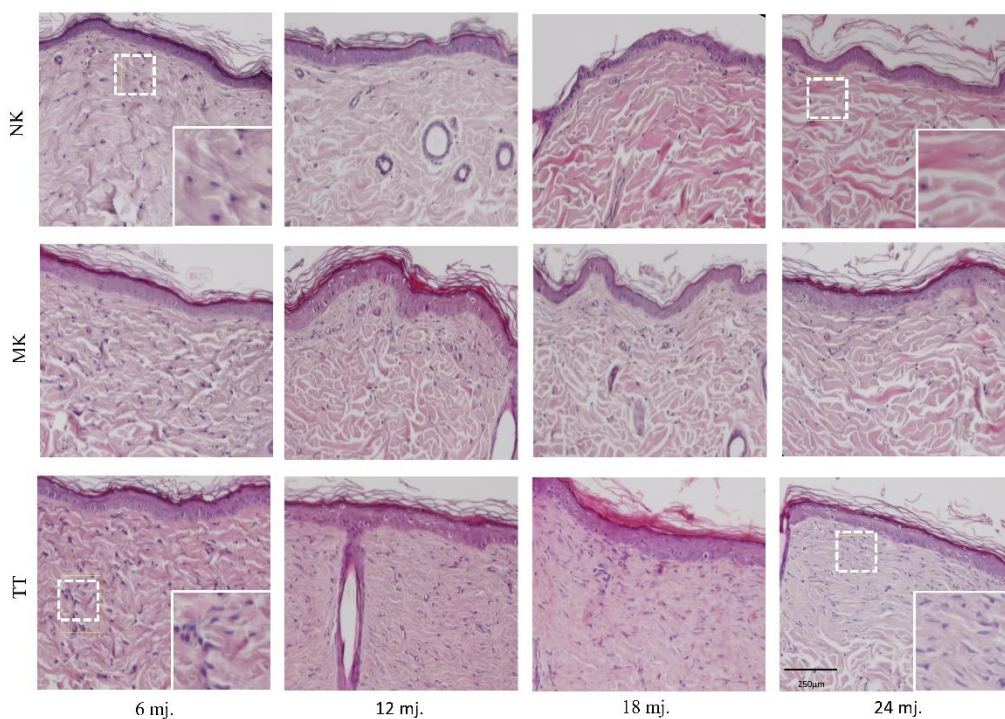
Pratila sam i morfološke promjene na koži nakon implantacije mladih fibroblasta. Koža na tretiranim mjestima (mehanička kontrola i implantacija) nije pokazala upalne procese i urtikariju.

Zarastanje je bilo brzo i uredno. Nakon samo 4 dana je mjesto implantacije potpuno zaraslo, a krzno je uvelike obnovljeno. Kontrolno polje tj. samo mehanički tretman je također dobro i brzo zaraslo, ali je obnova krzna znatno slabija i sličnija je netretiranom okolnom tkivu.

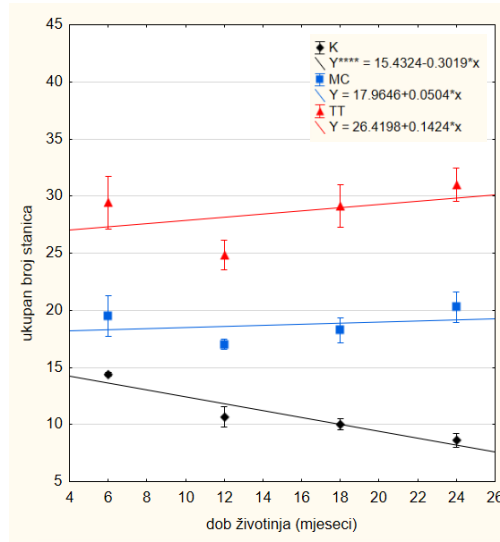
#### 4.1.2. Implantacija mladih fibroblasta obnavlja gustoću stanica u koži štakora

Za praćenje strukturnih promjena tkiva korišteno je standardno H&E bojanje. Hematoksilin je tamne plavo-ljubičaste boje i boja nukleinske kiseline, a eozin ružičaste boje i nespecifično boja proteine i omogućuje raspoznavanje različitih tkiva i praćenje strukturnih promjena na tkivnim prerezima. Na preparatima obojanim s H&E vide se plave jezgre, dok su citoplazma i izvanstanični matriks u nijansama ružičaste. Korišteni su uzorci pohranjeni u parafin narezani na mikrotomu na debljinu od 5  $\mu\text{m}$ . Za kvantitativnu analizu brojila sam stanice u poljima veličine 100  $\mu\text{m}$  x 100  $\mu\text{m}$ . Brojila sam 4 polja po prerezu, a za svaku životinju napravljena su 2 prereza. Svaka skupina sastojala se od pet do šest životinja te je izračunat prosječni broj stanica za svaku dobnu skupinu životinja.

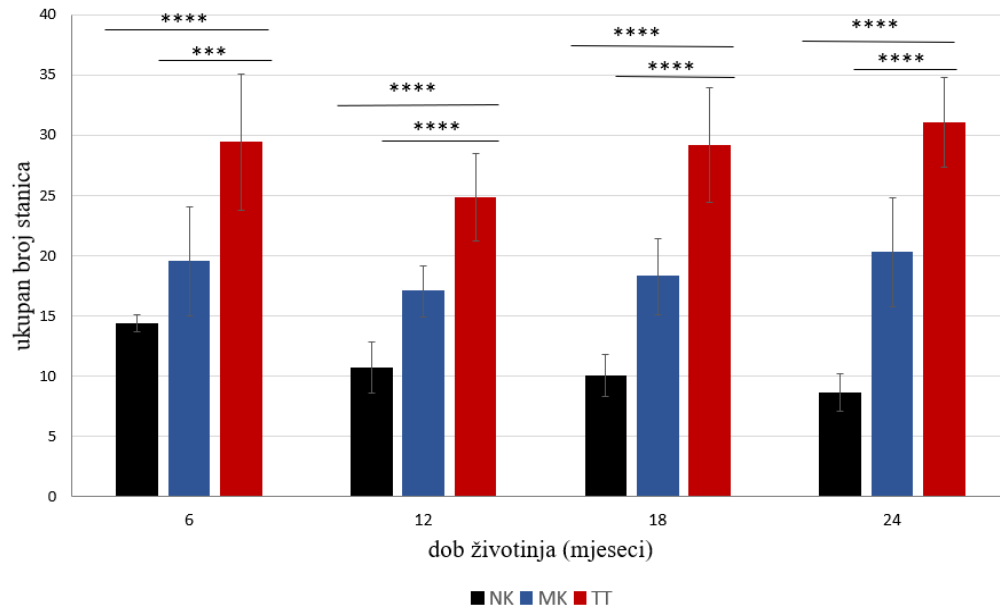
A)



B)



C)



**Slika 11.** Promjene u strukturi tretirane i netretirane kože praćeno H&E bojanjem. A) Histološki prikaz kože štakora starih 6, 12, 18 i 24 mjeseci (NK-netretirane kontrole; MK-mehanička kontrola; TT-tretirano tkivo mladim fibroblastima). Snimljeno mikroskopom AX70 (Olympus), povećanje 20X. B) Grafički prikaz prosječnog broja stanica u dermisu kože ovisno o starosti životinja, graf pokazuje regresijske pravce (testovi značajnosti) za netretirano tkivo (crni pravac), mehanička kontrola (plavi pravac) i tkivo tretirano mladim fibroblastima (crveni pravac), C) graf pokazuje statistički značajne razlike unutar dobnih skupina. n = 6 za 6, 12 i 18 mjeseci; n = 5 za 24-mjeseca stare životinje, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001.

Histološka analiza prereza kože štakora starih 6, 12, 18 i 24 mjeseca pokazala je da se dermis kontinuirano mijenja u procesu starenja organizma, vidljiv je značajan pad broja stanica sa prosječno 14.37 stanica na 10000  $\mu\text{m}^2$  kod 6 mjesecne kontrole na 8.62 stanica kod 24 mjesecne kontrole (slika 11). Daljnja analiza tkiva pokazala je da je došlo do promjene homeostaze u koži starih štakora u koju su implantirane mlade stanice, u dermisu tretiranog tkiva značajno je povećan broj stanica (ovisno o dobi životinja taj postotak varira između 24.83-31.03%) koje su puno gušće pakirane te je izvanstanični matriks kompaktan (slika 11A, TT). Mehanički tretman (slika 11, MK) pokazuje da je došlo do povećanja broja stanica i kod svih dobnih skupina to povećanje doseže svoju maksimalnu vrijednost od prosječno 17.02-20.28% stanica, ali u puno manjem opsegu nego u tretiranom tkivu. Razlika unutar dobne skupine je statistički značajna, p vrijednost je ispod 0.001 i možemo primjetiti da je ta razlika prisutna i u 6, 12, 18 i 24 mjeseca starim životinjama (slika 11C). Morfološki je vidljiva razlika tretiranog tkiva u odnosu na mehaničku kontrolu i netretiranu kontrolu pri čemu su stanice puno gušće pakirane, prosječna udaljenost stanica u dermisu je manja, a izvanstanični matriks je kompaktniji (slika 11A. uvećane slike).

#### **4.1.3. Revitalizacija proliferacije matičnih stanica nakon mikrotransplantacije mladih fibroblasta**

Nagomilavanje starih odnosno senescentnih stanica u okolini niše matičnih stanica narušava njihov mikrookoliš i homeostazu, povećava stres i tako utječe na smanjenje njihove aktivnosti tako da unatoč stalno prisutnoj telomeraznoj aktivnosti, ne mogu zadržati kontinuitet dioba (Chen, 2004; Park, Morrison i Clarke, 2004; Villa i sur., 2004). Kao posljedica narušene funkcije matičnih stanica dolazi do smanjenja regeneracijskog potencijala tkiva, a s vremenom može doći i do iscrpljivanja zalihe matičnih stanica (Flores i sur., 2008; Tomás-Loba i sur., 2008).

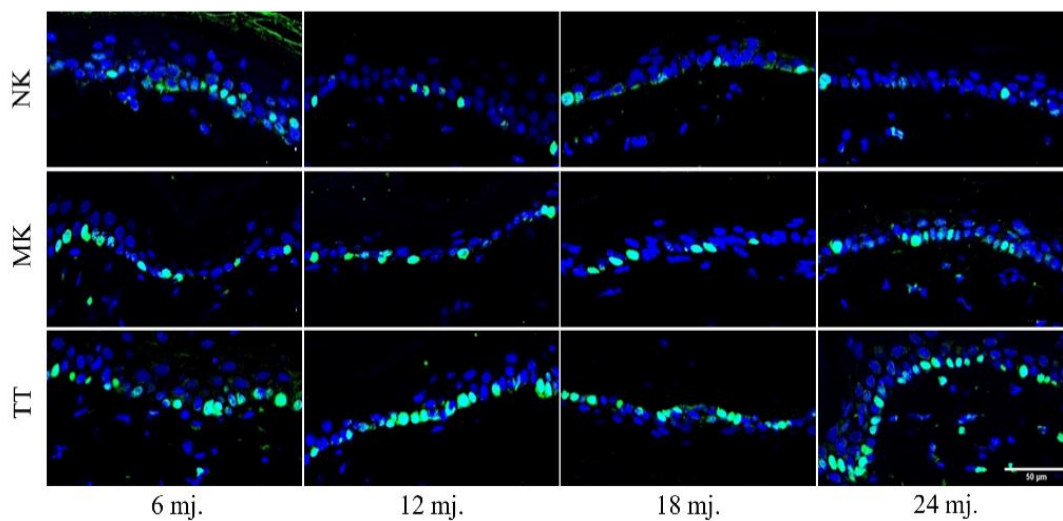
Novija istraživanja pokazuju da je taj proces reverzibilan te da ostarjele matične stanice sa smanjenim potencijalom proliferacije mogu biti pomlađene kroz određene promjene u svom sistemskom okolišu putem parabiotičkog sparivanja ili putem presađivanja na mlade imunodeficientne miševе (Gilhar, Pillar i David, 1991; Conboy i sur., 2005; Stanley i sur., 2012). Dakle, promjenom mikrookoliša matičnih stanica, smanjenjem broja starih i povećanjem broja mladih stanica bilo bi moguće revitalizirati matične stanice *in vivo*. Gore opisani rezultati pokazuju



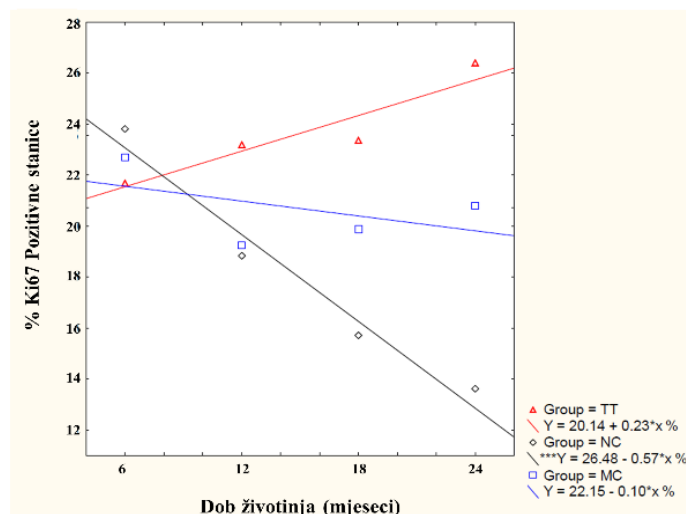
da sam mikrotransplantacijom uspješno povećala omjer mladih stanica u tkivu te upravo iz toga razloga sam provjeravala je li je posljedično došlo i do promjene aktivosti matičnih stanica.

Provedena analiza pokazuje kako se proliferacijski status matičnih stanica kože mijenja ovisno o dobi štakora u trenutku mikrotransplantacije (slika 12). Implantacija je rađena sa  $8 \times 10^6$  stanica fibroblasta po  $1 \text{ cm}^2$  polja dorzalne kože kod 6, 12, 18 i 24-mjesečnih štakora Fischer 344. Četiri do šest tjedana nakon implantacije, uzorci kože su prikupljeni za analizu. Glavnina Ki67 signala smještena je u bazalnom sloju epidermisa koji je niša epidermalnih matičnih stanica. Za daljnju analizu uočenih promjena, brojala sam Ki67 pozitivne stanice epidermisa te izračunavala njihov postotak u odnosu na ukupan broj stanica u epidermisu. Za kvantitativnu analizu sam brojala cijeli epidermalni prerez svakog štakora, a skupine su se sastojale od pet do šest životinja.

A)



B)



**Slika 12.** Utjecaj implantiranih mladih fibroblasta na nišu matičnih stanica. A) Proliferacija matičnih stanica u koži štakora u dobi od 6, 12, 18 i 24 mjeseca (NK-netretirane kontrole; MK-mehanička kontrola; TT-tretirano tkivo mladim fibroblastima). Proliferacijski status matičnih stanica je praćen markerom proliferacije Ki67 (zeleno) na bazalnoj membrani epidermisa, jezgre stanica obojane su plavo (Hoechst). Snimljeno konfokalnim mikroskopom SP8 X (Leica), povećanje 20X. B) Grafički prikaz postotka Ki67 pozitivnih stanica na bazalnoj membrani epidermisa ovisno o starosti životinja za netretirano tkivo (crni pravac), mehanička kontrola (plavi pravac) i tkivo tretirano mladim fibroblastima (crveni pravac). n = 6 za 6, 12 i 18 mjeseci; n = 5 za 24 mjeseca stare životinje; \*\*\* p < 0,001.

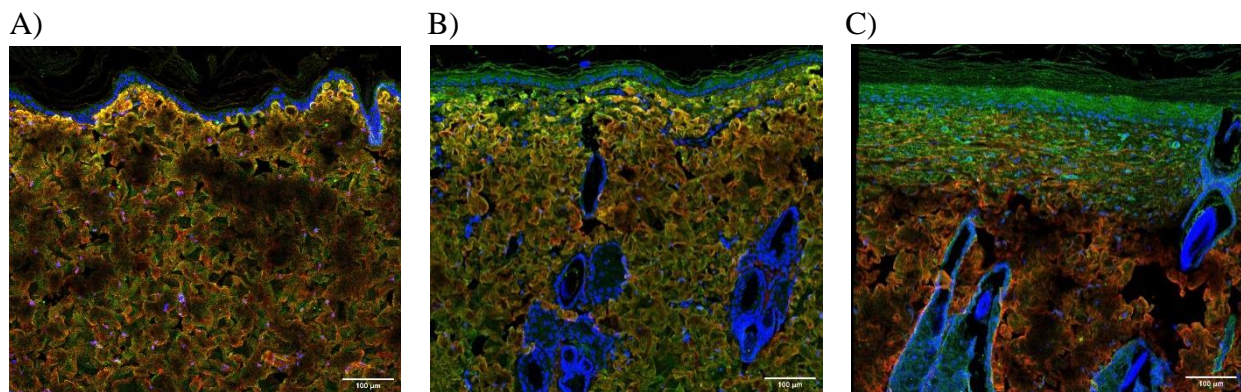
U šestomjesečnih životinja primijećen je utjecaj na dinamiku epidermalne proliferacije matičnih stanica u mehaničkoj kontroli i tretiranom tkivu. S porastom starosti životinja, netretirana tkiva pokazuju progresivno i statistički značajno smanjenje stanične proliferacije s 23,81% na 13,61% kod 6 odnosno 24 mjeseci (slika 12). Uočila sam snažan pozitivan učinak u tkivima tretiranim s mladim dermalnim fibroblastima, dosežući 26,41% u skupini od 24 mjeseca, gotovo udvostručivši vrijednosti netretiranih kontrola, a u isto vrijeme čak premašuju 6-mjesečne netretirane kontrole (slika 12). Utjecaj mehaničke kontrole umjereno povećava postotak Ki67-pozitivnih matičnih stanica na 20,81%, a može se objasniti kao posljedica procesa zacijeljivanja.

#### 4.1.4. Mikrotransplantacija mladih fibroblasta obnavlja matriks kolagena I i III u koži štakora

Promjene dermisa uzrokovane starenjem na molekulskoj, staničnoj i morfološkoj razini utječu na funkciju i strukturu kože (Langton i sur., 2010; Naylor, Watson i Sherratt, 2011). Pri tome dermis postaje rigidan i neelastičan i smanjuje se njegova sposobnost odgovora na razne endogene i egzogene stresove.

U vezivnom tkivu kože prisutni su brojni tipovi kolagena, no najzastupljeniji strukturni protein kože je kolagen tipa I koji koži daje čvrstoću i potporu, a drugi najzastupljeniji je kolagen III. Kolagen tipa I se udružuje s drugim proteinima izvanstaničnog matriksa fibrilogenezom koji čine snopove kolagena i odgovorni su za čvrstoću i elastičnost kože. Starenjem kolagenska vlakna postaju deblja, a organizacija kolagenskih snopova manje uređena. Također dolazi i do nastanka i stabilizacije unakrsnih veza među kolagenskim snopovima što za posljedicu ima smanjenu elastičnost kože (Fenske i Lober, 1986).

Fibroblasti su najbrojnije stanice vezivnog tkiva koje sintetiziraju kolagen, elastin, glikozaminoglikane, proteoglikane, adhezivne glikoproteine, fibronektin i druge proteine izvanstaničnog matriksa (Cole i sur., 2018). Budući da sam pokazala da nakon tretmana mikrotransplantacijom dolazi do povećanja broja mladih fibroblasta u dermisu kože štakora, pretpostavila sam da će implantirane mlade stanice utjecati na promjenu ultrastrukture kože, odnosno na sastav kolagena I i III.

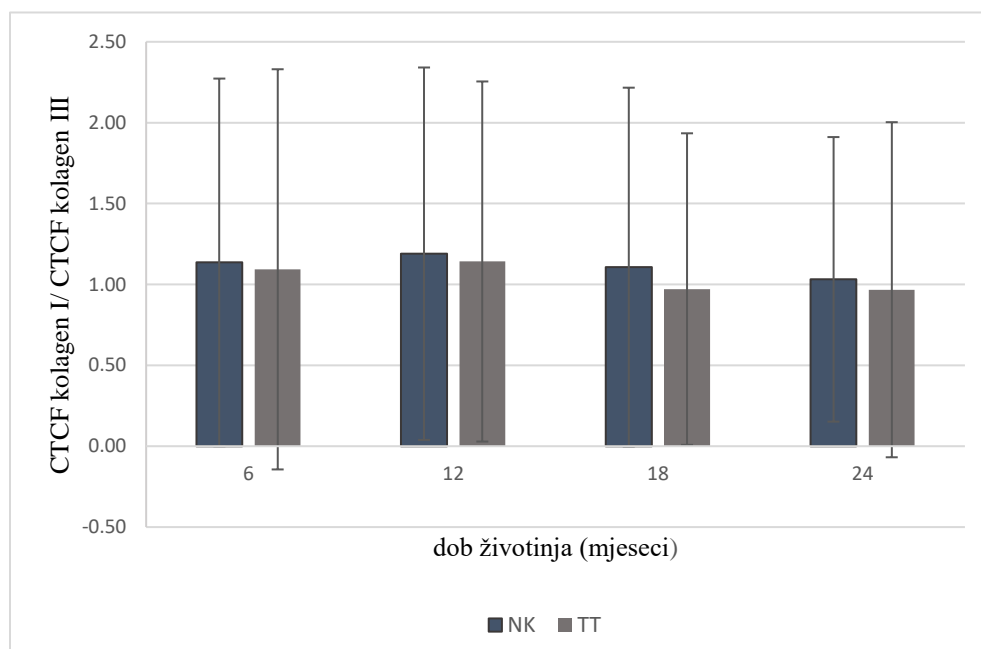


**Slika 13.** Reprezentativni primjer vizualizacije kolagena I i kolagena III u koži 24 mjeseca starog štakora. A) netretirano tkivo, B) mehanički tretirano tkivo, C) tkivo tretirano mladim stanicama. Kolagen I (zeleno), kolagen III (crveno), preklapanje signala (žuto), jezgre stanica obojane su plavo (Hoechst). Snimljeno konfokalnim mikroskopom SP8 X (Leica), povećanje 20X.



Na slici 13. su prikazane promjene u ultrastrukтури dermisa koje se događaju nakon implantacije mladih stanica u kožu životinje stare 24 mjeseca. Kolageni u tkivu starog štakora tretiranom mladim fibroblastima (slika 13C) su tanji, pravilnije organizirani u snopove i prevladavaju zeleni signali (kolagen I) dok u netretiranom tkivu iste životinje kolagenski snopovi pokazuju neuređenu, raspršenu strukturu te zauzimaju veću površinu budući da je gustoća stanica u starom dermisu značajno manja (slika 13A).

Analiza je obavljena za pet polja veličine 100 x 100 µm svakog prereza, a svaka skupina se sastojala od 5 do 6 životinja. Rezultati su prikazani kao omjer kolagena I i kolagena III.

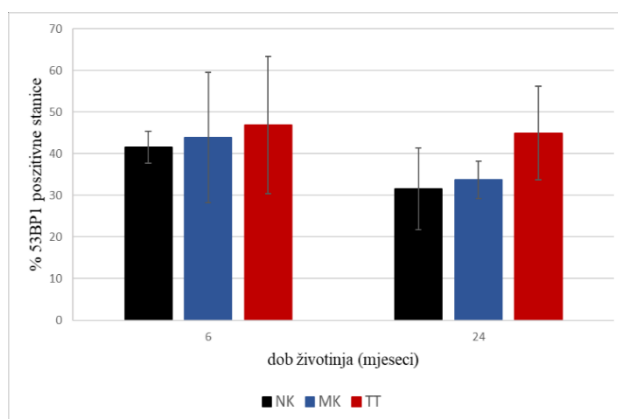
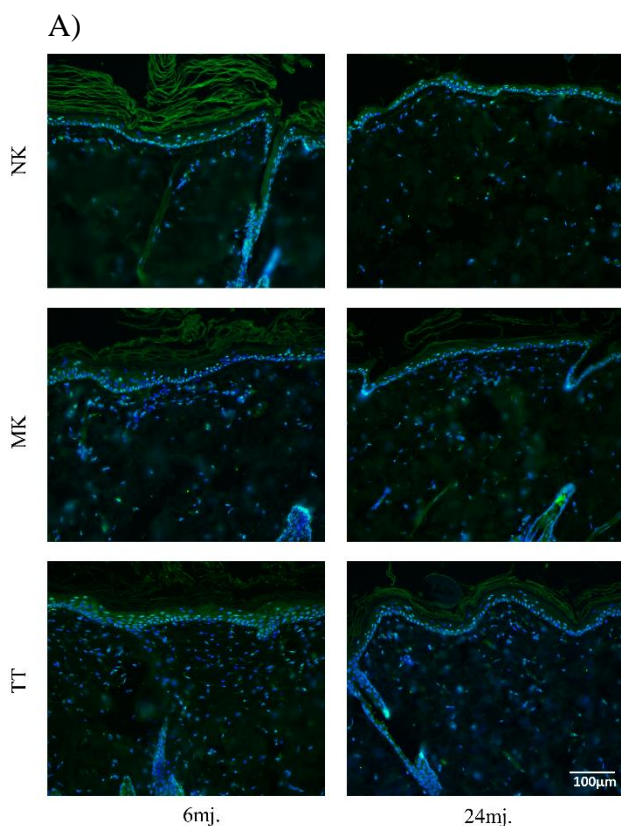


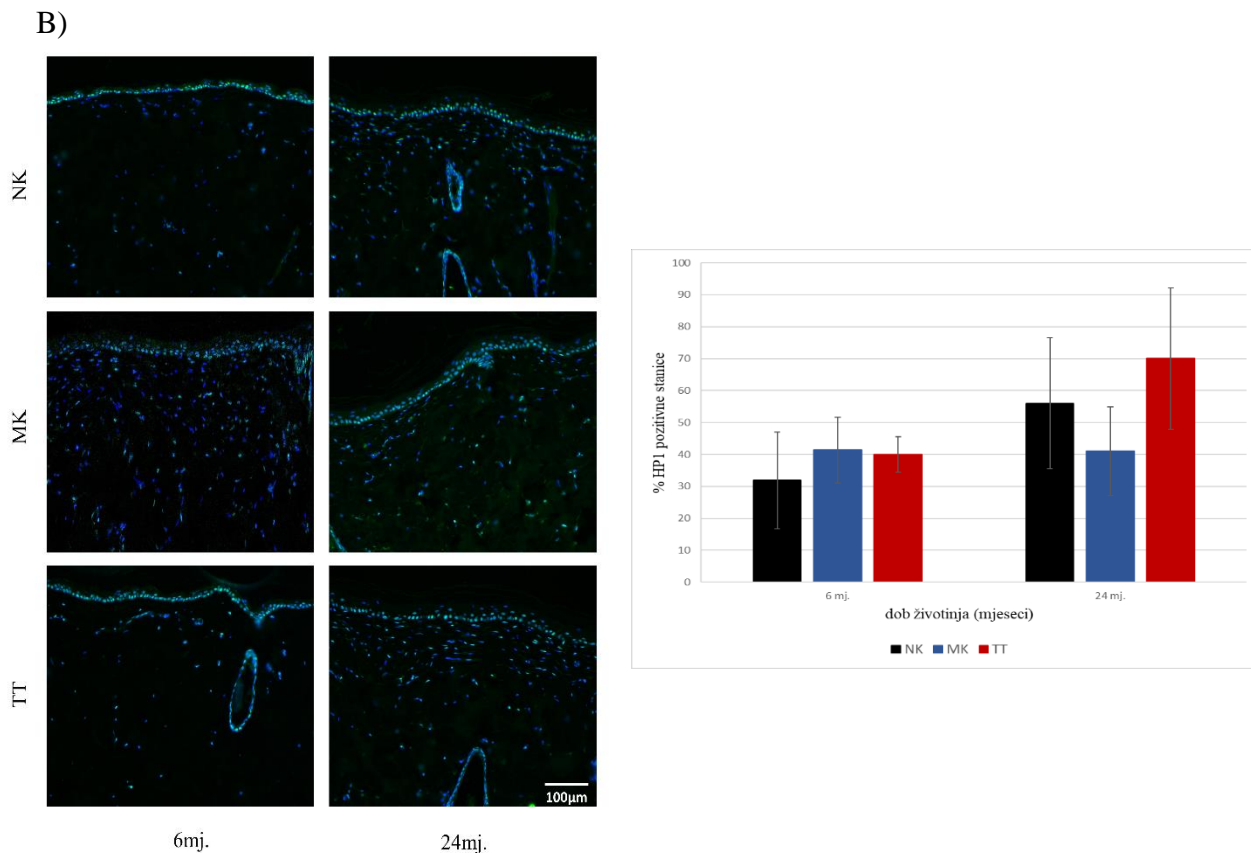
**Slika 14.** Omjer intenziteta fluorescencijskih signala za Col I/Col III u koži štakora različite starosti (6, 12, 18 i 24 mjeseca) NK-netretirane kontrole; TT-tretirano tkivo mladim fibroblastima. N=5-6 životinja po skupini.

Kod svih dobnih skupina kod tretiranih tkiva primjećen je trend pada omjera intenziteta fluorescencije Col I/ Col III u odnosu na kontrole. Kod 6, 12 i 24 mjeseca starih životinja je taj trend između 4,2-5,82%, a kod 18 mjeseci starih životinja je on čak 12,61% (slika 14).

#### 4.1.5. Praćenje oštećenja DNA i žarišta heterokromatina u tkivima nakon mikrotransplantacije stanica

53BP1 (engl. *tumor suppressor P53-binding protein 1*) je jedan od glavnih medijatora DDR-a te ima ključnu ulogu u izboru puta popravka dvolančanog loma DNA (DSB) i omogućava interakcije brojnih proteina koji su nužni za popravak DNA i replikaciju (Bártová i sur., 2019). Heterokromatinski protein 1 (HP1) je transkripcijski represor koji se izravno veže na metilirani lizin 9 ostatak histona H3 (H3K9me), što je karakteristična modifikacija histona za transkripcijski utišani heterokromatin. HP1 protein stupa u interakciju s različitim proteinima te ima brojne funkcije unutar jezgre, kao što je remodeliranje kromatina važnog za utišavanje gena, a novija istraživanja pokazuju da sudjeluje i u održavanju telomera i popravku DNA (Zeng, Ball i Yokomori, 2010).





**Slika 15.** Učestalost formiranja 53BP1 fokusa i heterokromatinskih fokusa HP1- $\gamma$  praćena je imunofluorescencijskom analizom preparata za kontrole, mehaničke kontrole i tretirano tkivo kod 6 i 24 mjeseca starih životinja. A) Imunofluorescencija za 53BP1 (zeleno), jezgre stanica obojane su plavo (Hoechst) i pripadajući grafički prikaz ukupnog broja 53BP1 pozitivnih stanica. B) Imunofluorescencija za HP1- $\gamma$  (zeleno), jezgre stanica obojane su plavo (Hoechst) i pripadajući grafički prikaz ukupnog broja HP1- $\gamma$  pozitivnih stanica. NK-netretirane kontrole; MK-mehanička kontrola; TT-tretirano tkivo mladim fibroblastima. Snimljeno konfokalnim mikroskopom SP8 X (Leica), povećanje 20X.

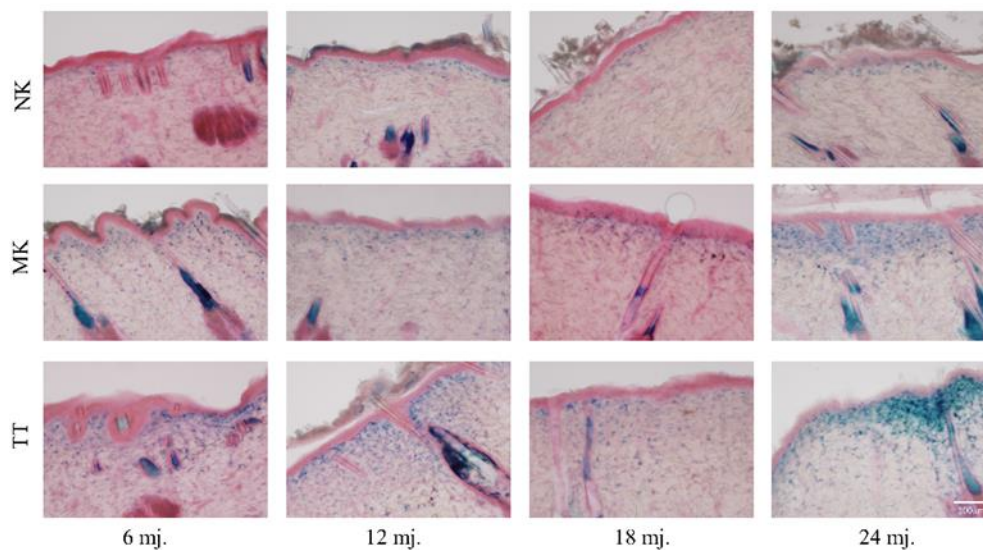
Učestalost formiranja 53BP1 fokusa praćena je imunohistokemijskom analizom preparata prije i nakon mikrotransplantacije stanica. Pomoću protutijela za HP1- $\gamma$  protein imunofluorescencijom su praćeni heterokromatinski fokusi. Za analize su korišteni uzorci pohranjeni u parafin te narezani na mikrotomu na debljinu od 5  $\mu$ m. Za daljnju analizu uočenih promjena, brojala sam 53BP1 i HP1- $\gamma$  pozitivne stanice u bazalnom sloju te izračunavala njihov postotak u odnosu na ukupan broj stanica u bazalnom sloju epidermisa. Za kvantitativnu analizu sam brojala cijeli prevez svakog štakora, a skupine su se sastojale od pet do šest životinja.

Kod 6 mjeseci starih životinja za 53BP1 vidljivo je da kod kontrole, mehaničke kontrole i tretiranog tkiva postotak pozitivnih stanica veći nego kod 24 mjeseca starih životinja (slika 15A). U obje dobne skupine tretirano tkivo u odnosu na kontrolu pokazuje povećanje učestalosti signala za 53BP1 što odgovara povećanoj proliferaciji stanica, a time i replikaciji DNA. Suprotno tome za HP1- $\gamma$  je vidljivo da je postotak pozitivnih stanica veći u starijim životinjama (slika 15B). Promjene unutar dobne skupine nisu statistički značajne i vrlo su varijabilne.

#### 4.1.6. Tretman mladim fibroblastima kratkoročno povećava SA- $\beta$ -Gal u koži štakora

SA- $\beta$ -Gal se primjenjuje kao jedan od osnovnih biomarkera u određivanju i razumijevanju biološke starosti stanica u kulturi i *in vivo* te specifično boja stare stanice u plavo kod pH 6.00 omogućujući praćenje promjene omjera starih i mladih stanica u koži štakora. Ovaj biomarker nije prisutan u mladim fibroblastima kao ni kod stanica u mirovanju te terminalno diferenciranim stanicama npr. keratinocitima (Dimri i sur., 1995).

Uzorci životinja starih 6, 12, 18 i 24 mjeseci, uzorkovani nakon 4-6 tjedana od implantacije, pohranjeni su u O.C.T. mediju i rezani na debljinu od 60  $\mu$ m (slika 16).



**Slika 16.** SA- $\beta$ -Gal analiza kože štakora starih 6, 12, 18 i 24 mjeseca. Prikazano je netretirano tkivo (NK), mehanički tretirano tkivo (MK) i tkivo u koje su implantirane mlade stanice (TT) metodom mikrotransplantacije. Slike prikazuju različite uzorke kože s leđa jednog reprezentativnog štakora za svaku dobnu skupinu. Snimljeno mikroskopom AX70 (Olympus), povećanje 20X.

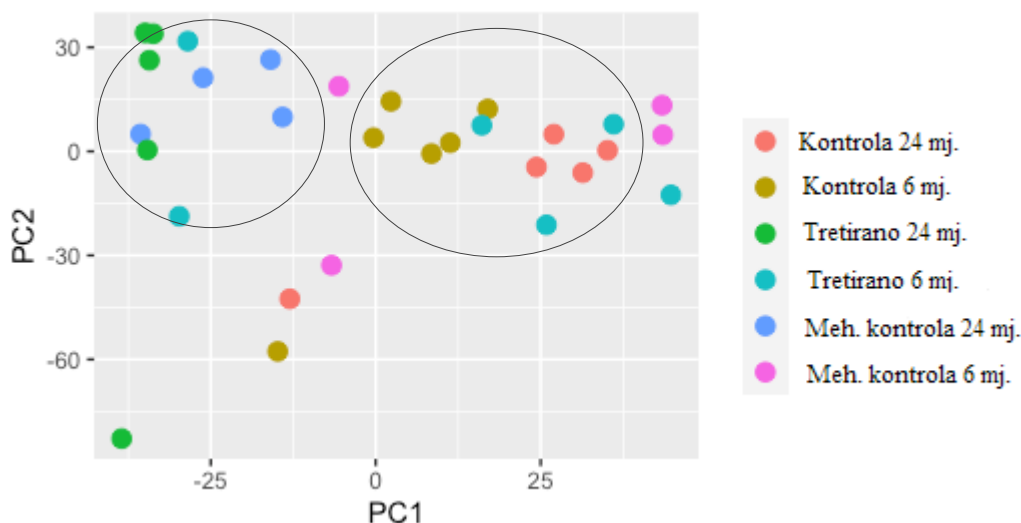
Iako SA- $\beta$ -Gal varira unutar tkivnog preparata i između individualnih životinja, vidi se efekt značajnog povećanja SA- $\beta$ -Gal kod mehaničkog i tretiranog tkiva, osobito kod 24 mjeseci starih životinja (slika 16). Ovaj efekt povećanja SA- $\beta$ -Gal nakon tretmana se pripisuje povećanoj prisutnosti makrofaga tijekom procesa zarastanja tkiva nakon oštećenja (Hall i sur., 2017), pogledati 4.1.11 i diskusiju).

#### **4.1.7. Implantacija mladih stanica mijenja gensku ekspresiju u tretiranim tkivima**

##### **4.1.7.1. Analiza glavnih sastavnica (PCA)**

Provedena je RNA seq analiza na koži štakora 6 i 24 mjeseca starosti za kontrole, mehaničke kontrole i tretirana tkiva. Svaka skupina sastojala se od 5 do 6 životinja, a izolacija RNA i sekvenciranje su detaljnije objašnjeni u Materijalima i metodama. Nakon početne obrade rezultata sekvenciranja transkriptoma (sirovih sekvenci) i poravnavanja sekvenci na referentni štakorski genom provjerena je grupiranost podataka PCA analizom. Analiza glavnih sastavnica (*Principal Component Analysis*, PCA) je bioinformatička analiza koja omogućuje predočavanje varijacije u podacima pomoću dijagrama MDS.

Rezultati analize PCA pokazali su visoki stupanj sličnosti promjene ekspresije gena za kontrole 6 (žuto) i 24 mjeseci (svjetlo roza) i tretiranog tkiva 6 mjeseci (svjetlo plavo) koje čine jednu skupinu za razliku od tretiranog tkiva 24 mjeseca (zeleno) i mehaničke kontrole 24 mjeseca (tamno plavo) koji čine drugu. Kod mehaničke kontrole 6 mjeseci (tamno roza) vidimo da se dio uzoraka svrstava u prvu skupinu, a dio u drugoj (slika 17).



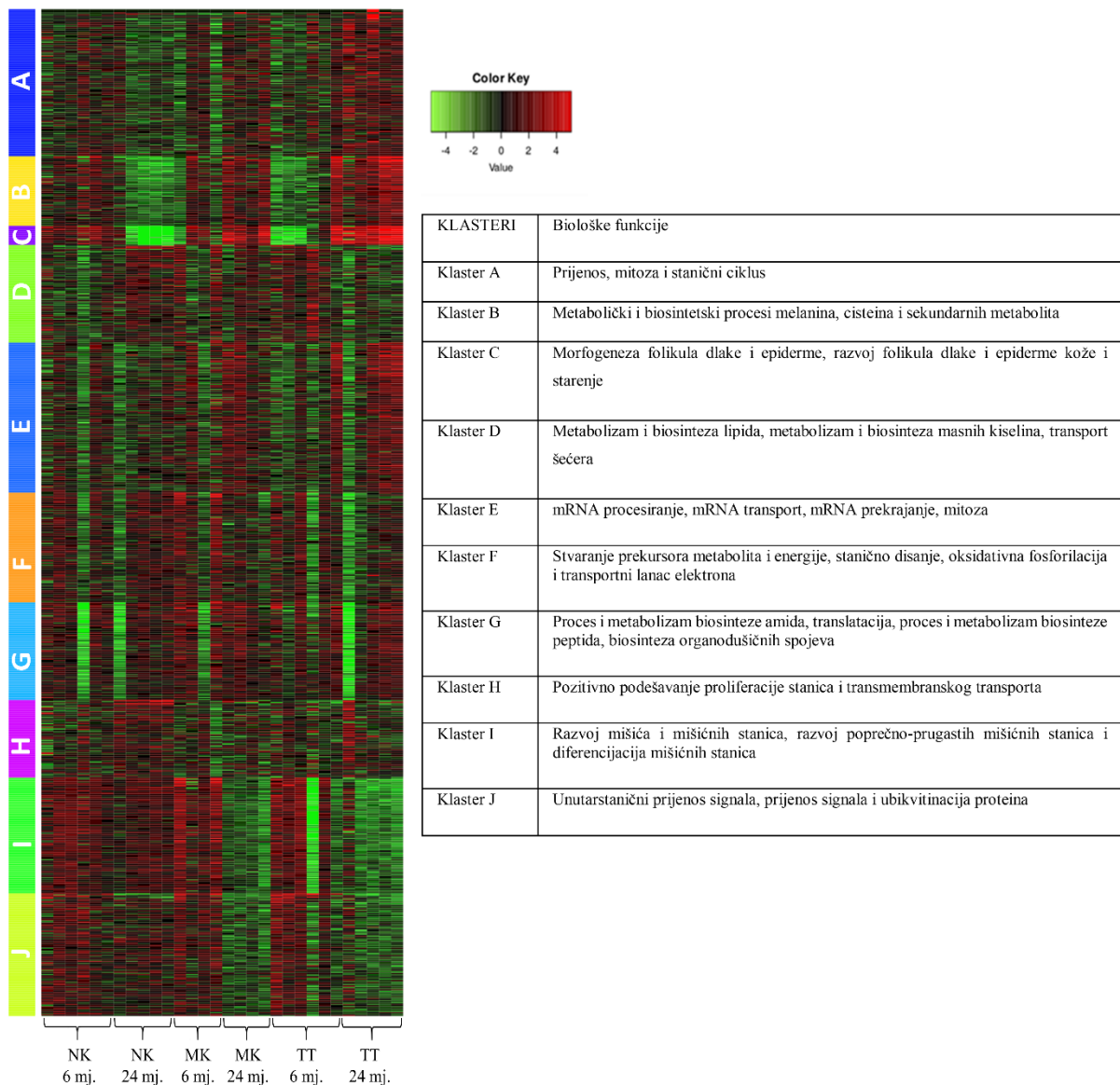
**Slika 17.** Analiza PCA grupiranja uzoraka sekvenciranja RNA. Skupine uzoraka su razvrstane prema sličnosti promjene ekspresije svih gena, vidljivo je grupiranje unutar 2 skupine.

#### 4.1.7.2. Rezultati analize diferencijalne ekspresije gena

Kako bi se ispitala razlika u profilu ekspresije gena između tkiva kože nakon mikrotransplantacije mladih fibroblasta, mehaničke kontrole i netretirane kontrole, napravljena je analiza diferencijalne ekspresije gena (DEG). Kako bi geni bili okarakterizirani kao diferencijalno eksprimirani morali su zadovoljiti dva kriterija:  $|\log_2FC| \geq 1$  i prilagođene statističke značajnosti  $p < 0,05$ . Također, pomoću R paket je napravljena toplinska mapa koja slikovito prikazuje razliku uzoraka na temelju profila ekspresije gena (Slika 18).

Na Slici 18 prikazana je toplinska mapa uzoraka te ujedno podjela na 10 različitih klastera. Slika pokazuje da je u klasterima C, I i J došlo do specifičnog grupiranja ovisno o grupi uzoraka. U klasteru I i J uzorci netretiranih kontrola kože životinja starih 6 i 24 mjeseca su svrstani zajedno jer imaju slični profil ekspresije gena. Tretirani uzorci se također svrstavaju zajedno, ali je profil genske ekspresije u tretiranim uzorcima heterogeniji u odnosu na kontrole. Točnije, profil ekspresije tretiranog tkiva 6 mjeseci je raznolika. Kod mehanički tretiranih tkiva je došlo do podjele ovisno o dobi. Kod netretiranih kontrola za klaster I i J je vidljivo da je došlo do povećane ekspresije gena (signali jače crvene boje), dok kod tretiranih tkiva prevladavaju signali jače zelene

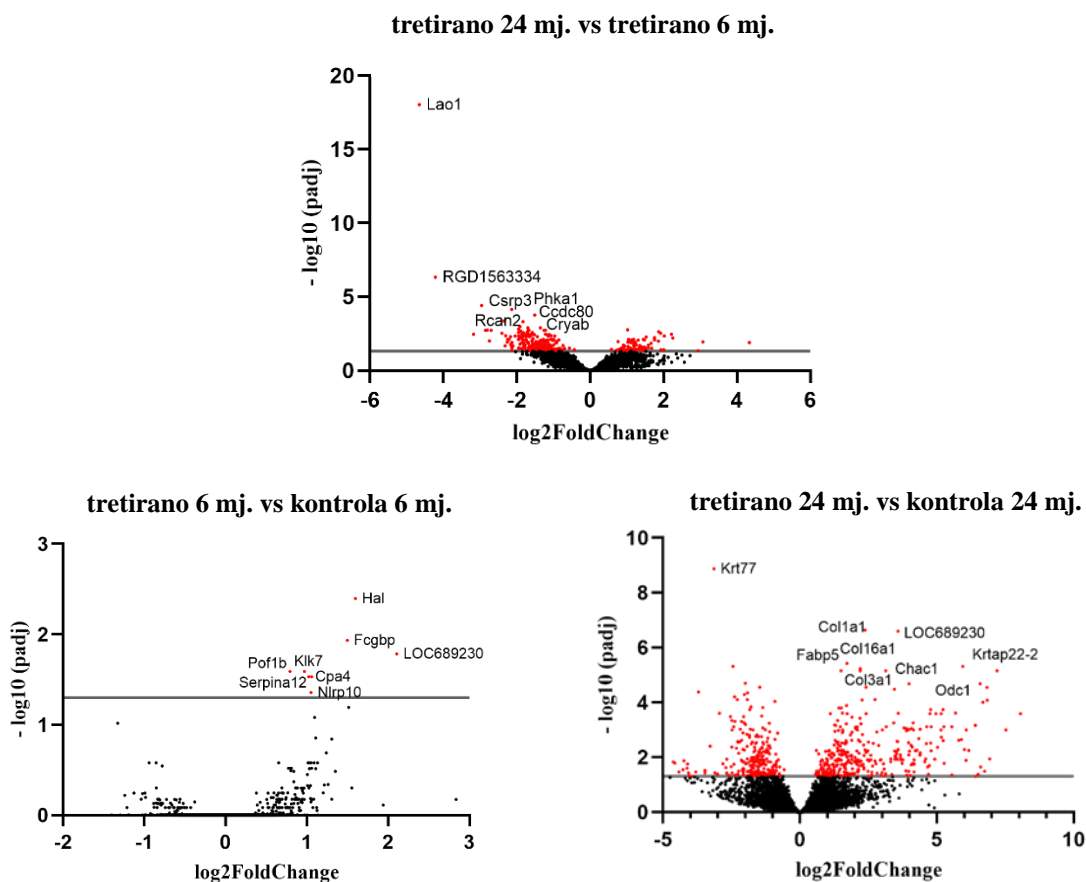
boje (smanjena ekspresija). Klaster I obuhvaća gene vezane uz razvoj mišića i mišićnih stanica, razvoj poprečno-prugastih mišićnih stanica i diferencijaciju mišićnih stanica, dok klaster J obuhvaća gene vezane uz unutarstanični prijenos signala, međustanični prijenos signala i ubikvitinaciju proteina. Klaster C obuhvaća gene vezane uz morfogenezu folikula dlake i epidermisa, razvoj folikula dlake i epiderme kože te uz starenje.



**Slika 18.** Toplinska mapa genske ekspresije u kontrolnim uzorcima, mehaničkoj kontroli i tretiranom tkivu kože štakora. Redovi predstavljaju diferencijalnu razinu ekspresije gena, gdje crvena znači povećanje ekspresije dok zeleno znači smanjenju ekspresiju, a kolone predstavljaju uzorke u analizi. Geni su podijeljeni u 10 klastera. NK-netretirane kontrole; MK-mehanička kontrola; TT-tretirano tkivo.



Rezultati analize diferencijalne ekspresije gena kod tretiranih tkiva (implantacija fibroblasta) kože životinja starih 24 mjeseca pokazali su da 558 gena u uzorcima tkiva kože ima promijenjenu ekspresiju u odnosu na netretirane kontrole. Od 558 gena, 319 gen ima povećanu, a 239 gena smanjenu ekspresiju, u odnosu na kontrole 24 mjeseca. Promjene u ekspresiji 261 gena pokazuje usporedba kože tretiranih životinja starih 24 mjeseca s tretiranim životinjama starim 6 mjeseci. Najmanja promjena je kada se uspoređuju 6 mjeseci tretirane životinje u odnosu na 6 mjeseci kontrolu i iznosi svega 6 gena (slika 19).

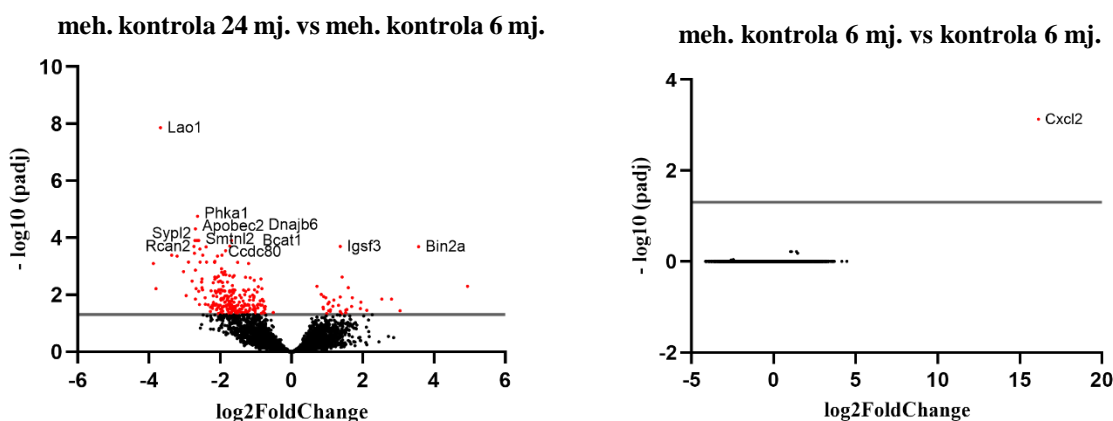


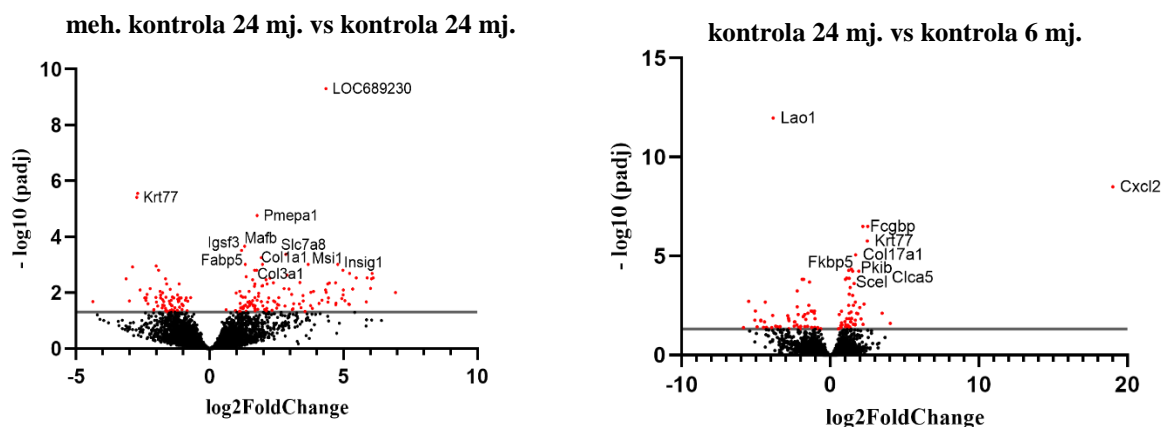
**Slika 19.** Vulkano prikaz relativne promjene ekspresije gena kod tretiranih tkiva u odnosu na kontrole (6 i 24 mjeseca stare životinje), odnosno na tretirano tkivo za različitu dob (6 i 24 mjeseca stare životinje). Na svakom grafu s lijeve strane su prikazani geni s negativno promjenjenom razinom ekspresije, a s desne strane geni s pozitivno promjenjenom razinom ekspresije. Siva crta označava postavljene granične vrijednosti razlike ekspresije i p vrijednosti.



Na Slici 19. prikazani su rezultati analize diferencijalne ekspresije gena. Kod tretiranih životinja starih 24 mjeseca u odnosu na 24 mjesecne kontrole najznačajnije promijene detektirane su za gene *Krt77* (keratin 77), *Col1a1* (engl. *collagen type I alpha 1 chain*), *Col3a1* (engl. *collagen type III alpha 1 chain*), *Col16a1* (engl. *collagen type XVI alpha 1 chain*). To su najzastupljeniji kolageni u koži odgovorni za čvrstoću i elastičnost kože (Tobin, 2017; Limbert i sur., 2019), *Odc1* (engl. *ornithine decarboxylase 1*), *Krtap22-2* (engl. *keratin associated protein 22-2*), *Fabp5* (engl. *fatty acid binding protein 5*), *Chac1* (engl. *ChaC glutathione-specific gamma-glutamylcyclotransferase 1*). Kod tretiranih životinja starih 6 mjeseci u odnosu na 6 mjesecne kontrole najznačajnije promijene uočene su za gene *Hal* (engl. *Histidine Ammonia-Lyase*), *Fcgbp* (engl. *Fc gamma binding protein*), *Klk 7* (engl. *Kallikrein-related peptidase 7*) (slika 19) koji u tkivu održavaju homeostazu kožne barijere kroz antimikrobnu ulogu, urođeni imuni odgovor i održavanje tkivne barijere (Di Paolo, Diamandis i Prassas, 2021).

Kod mehanički tretiranih tkiva kože životinja starih 6 mjeseci u odnosu na odgovarajuće kontrole rezultati analize diferencijalne ekspresije gena pokazuju razliku u ekspresiji samo jednog gena (*Cxcl2*) koji je pojačano eksprimiran (slika 20). Veće razlike u broju diferencijalno eksprimiranih gena vidljive su kod starih životinja (24 mjeseca MK) u usporedbi s kontrolom gdje je razlika u ekspresiji u 185 gena. Također gledala sam i razliku u ekspresiji 24 i 6 mjeseca mehaničke kontrole pri čemu je 29 gena pojačano, a 211 gena smanjeno eksprimirano. Kako bih dobila bolji uvid u promjene kože koje se događaju starenjem usporedila sam 24 i 6 mjesecne kontrole i dobiveno je da se tkiva razlikuju u ekspresiji 100 gena. Rezultati diferencijalne ekspresije prikazani su na Slici 20. u obliku vulkano prikaza i istaknuti su geni koji su statistički najznačajnije promijenjeni.

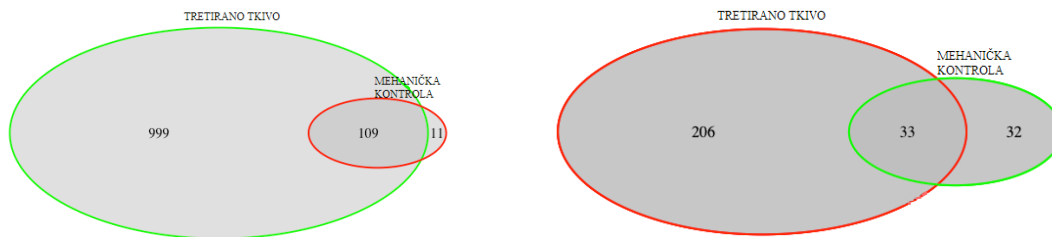




**Slika 20.** Vulkano prikaz relativne promjene ekspresije gena kod mehaničke kontrole u odnosu na kontrole (6 i 24 mjeseca stare životinje), odnosno na mehaničke kontrole i kontrole za različitu dob (6 i 24 mjeseca stare životinje). Na svakom grafu s lijeve strane su prikazani geni s negativno promjenjenom razinom ekspresije, a s desne strane geni s pozitivno promjenjenom razinom ekspresije. Siva crta označava postavljene granične vrijednosti razlike ekspresije i p vrijednosti.

#### 4.1.7.3. Rezultati analize genske ontologije

Na temelju prethodno opisanih rezultata, zanimalo me koji je od diferencijalno eksprimiranih gena izravna posljedica tretmana mikrotransplantacije mladih fibroblasta te sam stoga izvojila samo gene promjenjene ekspresije nakon mikrotransplantacije i isključila gene koji su posljedica mehaničkog tretmana. Tako dobiveni rezultati pokazuju da je ta promjena najveća kod tretiranih životinja starih 24 mjeseca, stoga sam te skupine životinja koristila u daljnjim analizama. Od ukupno 1108 pojačano i 239 gena smanjeno eksprimiranih gena u tretiranom tkivu (slika 21), manji dio (109, i 33) su posljedica mehaničkog tretmana. Tako je tretman mikrotransplantacije direktno povećao 999, a smanjio ekspresiju 206 gena. Također, vidimo da je broj gena koji je promijenjen samo isključivo zbog mehaničkog tretman puno manji nego za tretirano tkivo, pojačano 11 i smanjeno 32 gena.



**Slika 21.** Vennovi dijagrami za 24 mjesecne tretirane životinje u odnosu na mehaničke kontrole. Lijevi dijagram pokazuje broj pozitivno reguliranih gena, a desni negativno regulirane gene.

Kako bi se odredila biološka značajnost promjene razine ekspresije gena i njihova uloga u biološkim procesima dodijelila sam im anotacije genske ontologije (GO). Analiza genske ontologije napravljena je pomoću mrežnog alata DAVID, zasebno za gene s povećanom (999 gena) i sa smanjenom ekspresijom (206 gena) u tretiranom tkivu.

Rezultati analize genske ontologije gena promjene razine ekspresije u tretiranim uzorcima pokazuju da je u kategoriji Biološki procesi (Slika 22) značajno obogaćeno 65 termina genske ontologije. Sedam najviše obogaćenih termina genske ontologije (pojačano ekspimirani), prema Benjamini p-vrijednostima, koji su povezani s biološkim procesima su: Intermedijarna organizacija filameta ( $7.60E-09$ ), Keratinizacija ( $7.60E-09$ ), Dioba stanica ( $7.30E-05$ ), Segregacija kromosoma ( $4.70E-04$ ), Stanična homeostaza iona cinka ( $5.60E-04$ ), Diferencijacija epitelnih stanica ( $6.60E-04$ ) i Starenje ( $1.90E-02$ ). Najveći broj gena sa povećanom ekspresijom u GO pojmu su: Odgovor na ksenobiotski podražaj (41), Starenje (35), Dioba stanica (32), Proliferacija stanica (29), Popravak DNA (23).

Sedam najviše rangiranih obogaćenih pojmova GO (smanjeno ekspimirani) koji su povezani sa biološkim procesima su: Organizacija aktinskog citoskeleta ( $2.40E-03$ ), Organizacija sarkomera ( $2.40E-03$ ), Razvoj skeletnog mišićnog tkiva ( $5.80E-03$ ), Kontrakcija mišića ( $5.80E-03$ ), Metabolički proces prostaglandina ( $3.60E-02$ ), Stanična homeostaza mišićnih stanica ( $4.60E-02$ ) i Odgovor na istezanje mišića ( $2.30E-01$ ). Najveći broj gena sa smanjenom ekspresijom u GO pojmu su: Pozitivna regulacija transkripcije s promotora RNA polimeraze II (23), Negativna regulacija prepisivanja s promotora RNA polimeraze II (19), Prepisivanje, DNA-kalup (13), Negativna regulacija transkripcije, DNA-kalup (13), Organizacija aktinskog citoskeleta (12).

Na temelju dobivenih rezultata izdvojila sam biološke procese značajne za proces pomlađivanja i regeneracije, odnosno one koji su karakteristični za mladu kožu i gube se starenjem. Tu pripadaju Keratinizacija, Dioba stanica, Starenje i Proliferacija stanica, a svi geni vezani uz te procese su navedeni u Tablici 4. U proces Keratinizacije pripadaju brojni keratini i proteini vezani uz keratine koji su strukturni proteini odgovorni za stabilnost i oblik stanice (Bragulla i Homberger, 2009).

Kod Dioba stanica nalazimo brojne gene vezane uz ciklus stanične diobe poput *Cdc20*, *Cdc7*, *Cdca2* i *Cdca8* koji imaju različite funkcije poput razdvajanje kromosoma i regulacija strukture kromosoma tijekom anafaze, kinazna aktivnost koja je kritična za prijelaz G1/S fazu i regulacija dinamičke lokalizacije stanice tijekom mitoze (Jares, Donaldson i Blow, 2000; Bruno i sur., 2022).

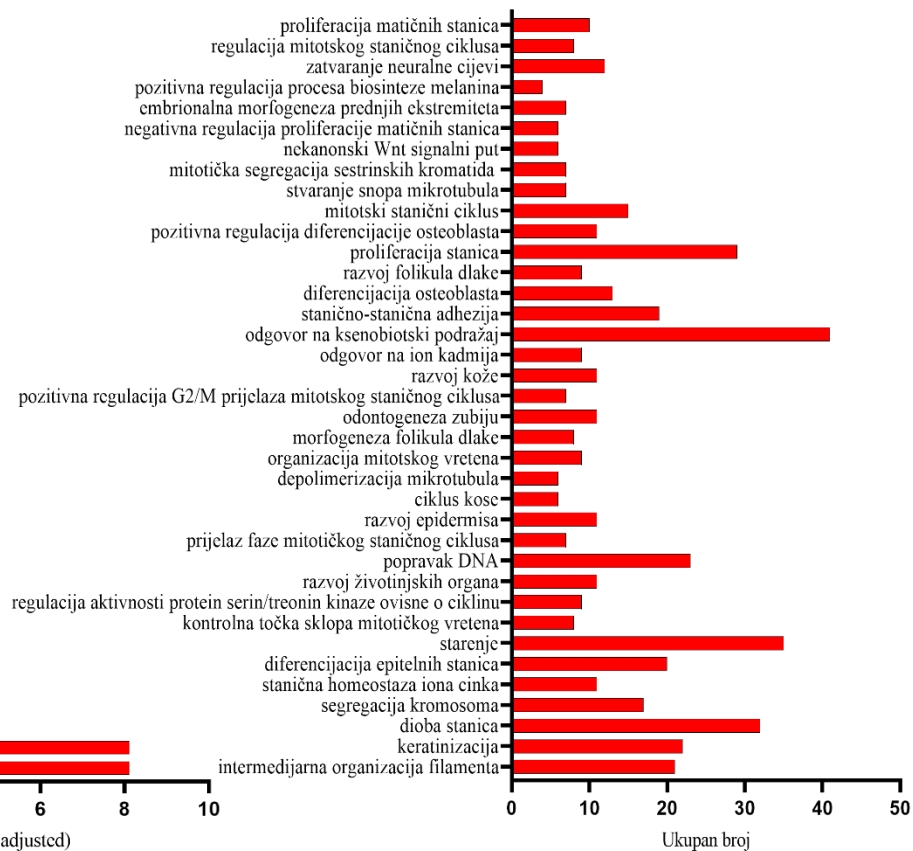
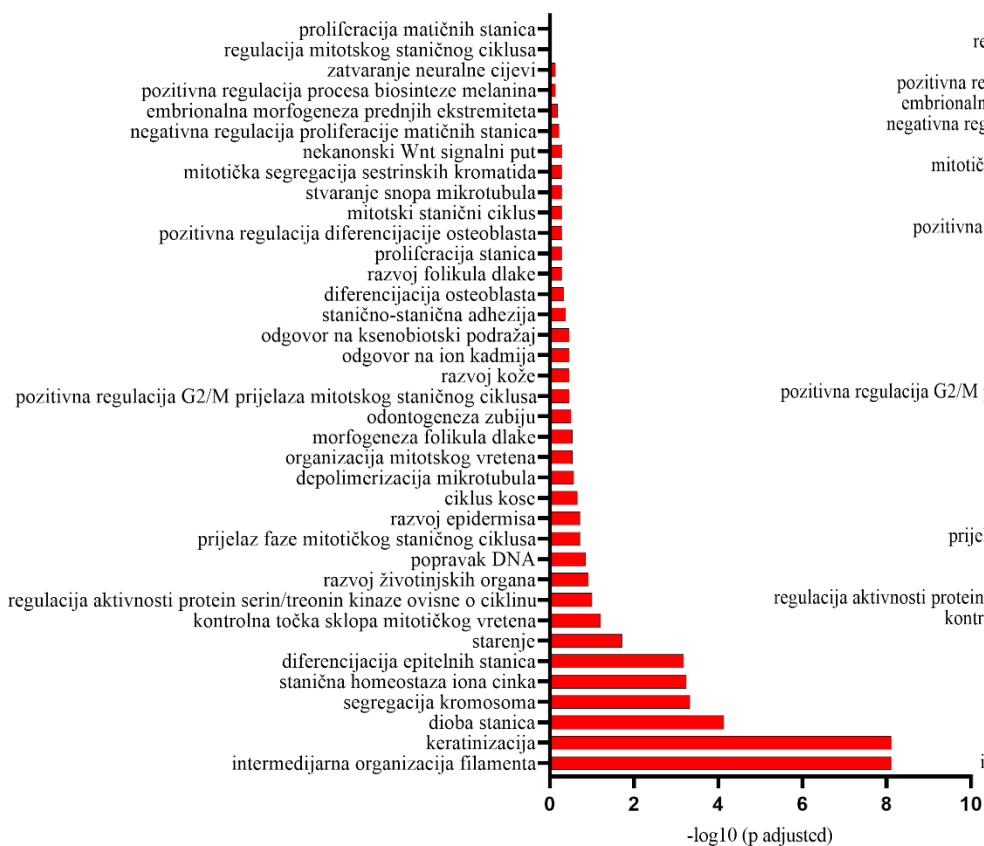
Grupa Starenje uz brojne keratine uključuje i kaspazu 9 (*Casp9*) koja je ključna za eliminaciju stanica aktivacijom apoptoze te je bitna za rano uklanjanje oštećenih stanica (Li i sur., 2017). Rezistin (*Retn*) se prvenstveno izlučuje iz mononuklearnih stanica periferne krvi i makrofaga, te djeluje na te stanice, snažno pojačavajući upalu (pro-upala) i uzrokujući inzulinsku rezistenciju putem aktivacije nuklearnog faktora- $\kappa$ B (Li i sur., 2021).

U grupi Proliferacija stanica ističe se ciklin ovisna kinaza 1 (*Cdk1*) čija funkcija je da kontrolira sve aspekte stanične diobe, uključujući ulazak u stanični ciklus iz stanja mirovanja, prijelaz G1/S faze, replikaciju DNA u S fazi, kondenzacija i segregacija kromosoma i citokineza (Diril i sur., 2012). Također, aurora kinaza (*Aurkb*) je visoko konzervirana serin/treonin kinaza koja regulira poravnanje kromosoma i segregaciju tijekom mitoze i mejoze (Willems i sur., 2018). Neuregulin-1 (*Nrg1*), komponenta obitelji epidermalnih faktora rasta, potiče proliferaciju, diferencijaciju i preživljavanje nekoliko vrsta stanica (Gambarotta i sur., 2013). Glavna funkcija *Vegfc* je promicanje rasta limfnih žila (limfangiogeneza) te može pospješiti rast krvnih žila i regulirati njihovu propusnost (Cursiefen i sur., 2004). Beta-katenin (*Ctnnb1*) ima važnu ulogu u stvaranju veza između stanica (stanična adhezija) i u komunikaciji između stanica i staničnu signalizaciju (van der Wal i van Amerongen, 2020).

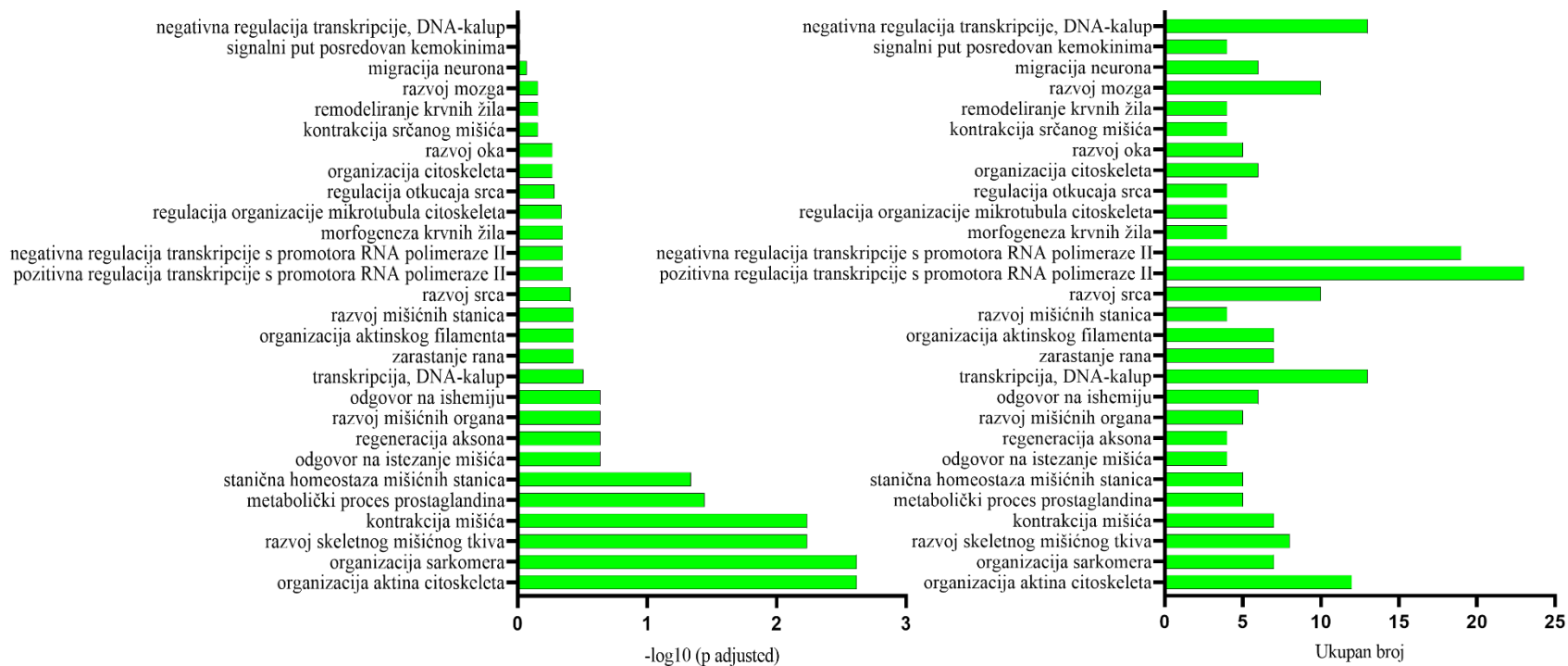
**Tablica 4.** Tablični prikaz odabranih bioloških procesa i gena koji pripadaju pojedinoj skupini značajne za proces pomlađivanja i regeneracije.

BIOLOŠKI PROCESI	GENI
Keratinizacija	<i>Cdh3, LOC100363136, Krt16, Krt17, Krt71, Krt73, Krt75, Krt76, Krt81, Krt82, Krt83, Krt84, Krt85, Krt86, Krt83, Krtap11-1, Krtap14, Krtap26-1, Lcelf, LOC102552128, Sfn, Tgm3</i>
Dioba stanica	<i>Lig1, Fbxo5, Haus8, Mis18a, Nek6, Nuf2, Pttg1, Spc24, Ankle2, Aurkb, Birc5, Cdc20, Cdc7, Cdca2, Cdca8, Cenpw, Ccnb1, Ccne1, Ccnf, Cdk1, Cdk4, Kif11, Kif18b, Kif2c, Knl1, Knstrn, Mapre3, Mcm5, Ncapd2, Pmf1, Psrc1, Prkce</i>
Starenje	<i>Abcg2, Bcl2l1, Top2a, Ercc2, Jund, Lck, Napepld, Adrald, Adm, Asl, Ass1, Aurkb, Casp9, Ctsc, Cyp1a1, Eef1a1, Eif2b5, Eif5a, Fads1, Ggt1, Gjb6, Gclc, Gss, Gsk3a, Ireb2, Krt16, Krt25, Krt83, Krt83, Krtap31-1, Krtap4-3, Mmp2, Penk, Retn, Ucp2</i>
Proliferacija stanica	<i>Bcl2l1, Dazap1, Ercc2, Larpl1, Oca2, Pak1ip1, Runx2, Adm, Aldh1a2, Aurkb, Bysl, Cttnb1, Cdk1, Cdkn2c, Cyp1a1, Dach1, Fam83a, Fam83d, Fgf10, Mta3, Mcm10, Mcm7, Mrps27, Nrg1, Ovol2, Ptma, Sphk1, Slpr1, Vegfc</i>

A)



B)

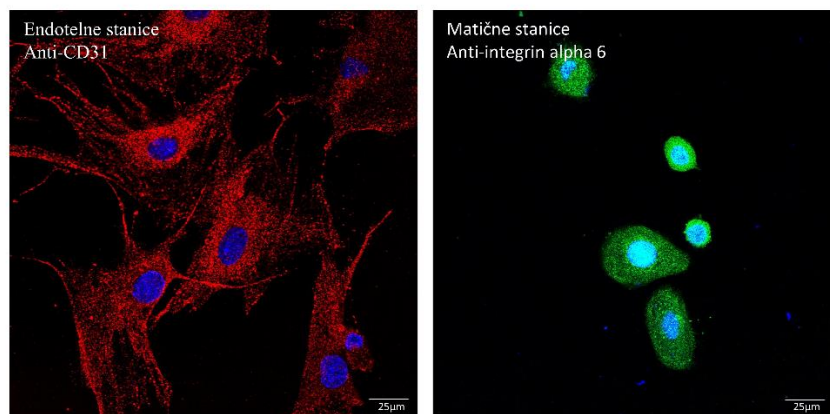


**Slika 22.** Analiza genske ontologije za gene sa: A) pojačanom i B) smanjenom promijenjenom ekspresijom u kategoriji Biološki procesi za 24 mjeseca tretirana tkiva u odnosu na kontrole. Na x-osi prikazan je  $-\log p$  vrijednosti (lijevo) i broj gena (desno) sa pojačanom/smanjenom ekspresijom koji su obogaćeni u određenom GO pojmu, prikazanim na y-osi.

#### 4.1.8. Dugoročno praćenje regeneracije kože nakon mikrotransplantacije fibroblasta, endotelnih i matičnih mladih stanica u kožu štakora

Idući korak ovog istraživanja je dugoročno pratiti promjene nakon mikrotransplantacije pri čemu je korišteno 3 tipa stanica najzastupljenijih u koži; fibroblasti, endotelne i/ili matične stanice. Kako bi omogućili dugoročno praćenje implantiranih stanica koristila sam zeleni fluorescentni protein GFP za obilježavanje matičnih stanica i mCherry sa hTERT podjedinicom za obilježavanje fibroblasta i endotelnih stanica. Kao vektor korišten je replikacijski defektan adenovirus tipa 5 (Ad5). Ad5 transducira širok raspon tipova stanica i ne ugrađuje se u genom (C. S. Lee i sur., 2017). Transducirani fibroblasti i endotelne stanice su revitalizirane indukcijom hTERT-a, a bitno je naglasiti da matične stanice imaju konstitutivnu ekspresiju telomeraze.

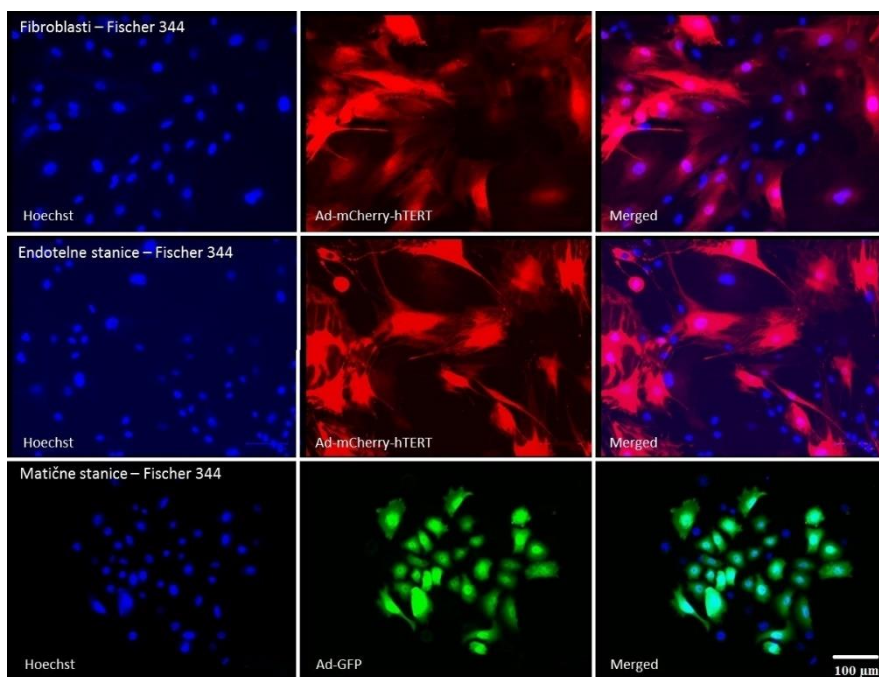
Prvi korak je optimizacija izolacije stanica u dovoljnom broju i njihova karakterizacija. Izolirane stanice kože potrebne za heterotransplantaciju su izrazito osjetljive i ne podnose uvjete koji se standardno koriste u metodama stanične kulture pa je prvo bilo potrebno optimizirati protokol za uspostavu, održavanje i čuvanje primarne stanične kulture tih stanica. Uspješno su karakterizirane izolirane endotelne i matične stanice kože štakora Fischer 344. Endotelne stanice su obilježene specifičnim protutijelima za CD-31, a matične stanice specifičnim protutijelima za integrin  $\alpha 6$  (slika 23).



**Slika 23.** Endotelne stanice obilježene specifičnim protutijelom Anti CD-31 (crveno). Imunofluorescencija matičnih stanica s Anti-Integrin alpha 6 (zeleno). Jezgre obojene s Hoechst (plavo). Stanice su izolirane iz kože štakora. Snimljeno konfokalnim mikroskopom SP8 X (Leica), povećanje 20X.



Nakon toga slijedila je optimizacija transdukcije za sva tri stanična tipa. Optimizacijom je dobiveno da za fibroblaste i endotelne stanice je optimalan MOI  $1 \times 10^5$  vp/st 72 sata s Ad5-mCherry, a kod matičnih stanica transduciranih s Ad5-GFP MOI  $1 \times 10^4$  vp/st 24 sata (slika 24). Protočnom citometrijom je dobiveno da je uspješno inficirano 35,44% stanica s Ad5-mCherry i 15,25% stanica s Ad5-GFP (neprikazani rezultati).

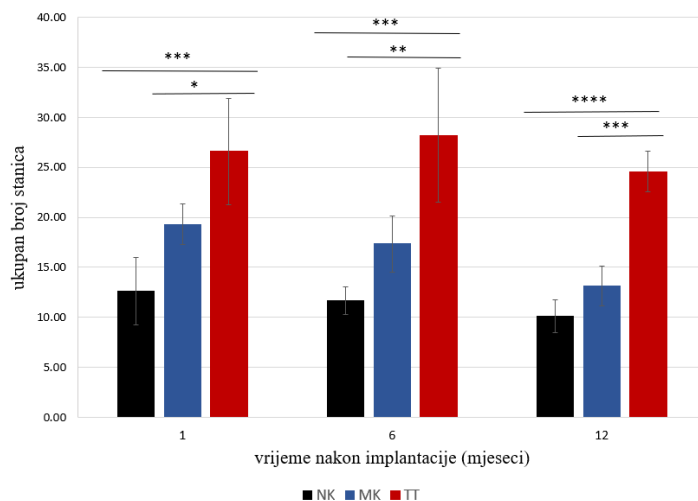
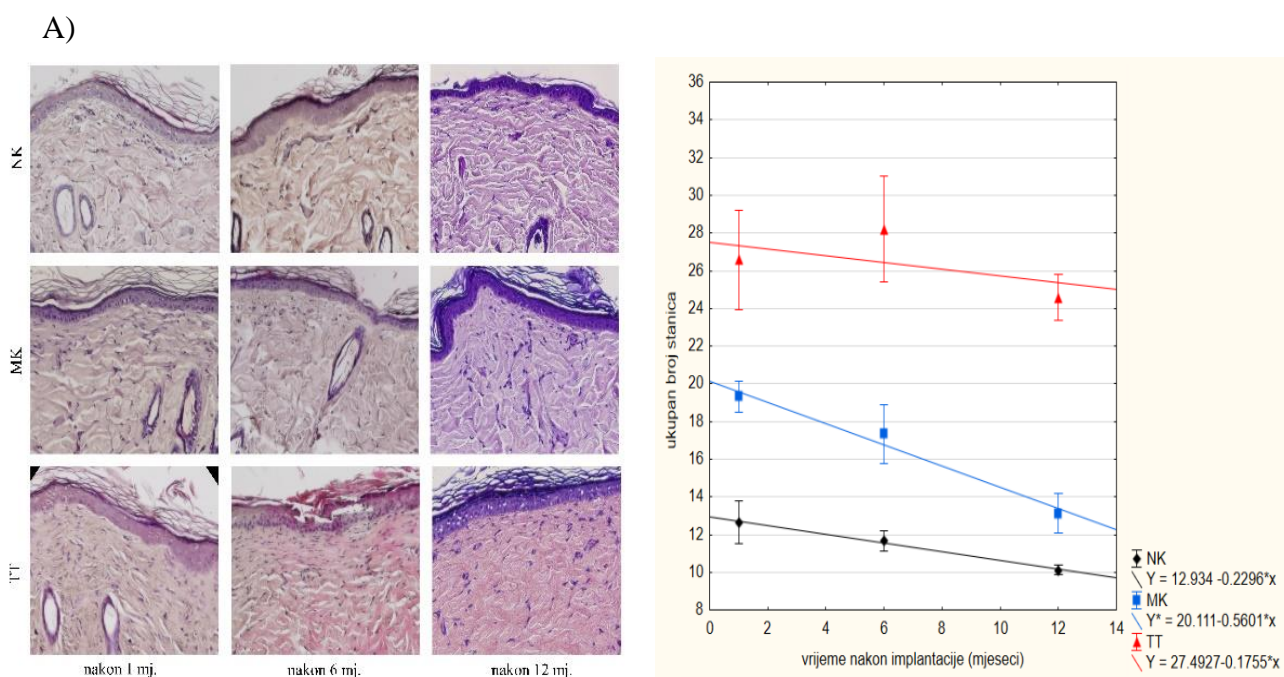


**Slika 24.** Fibroblasti, endotelne i matične stanice inficirane Ad5 adenovirusima koji nose reporter gen (mCherry) i gen za telomerazu, odnosno samo reporter gen (GFP). Matične stanice imaju konstitutivnu ekspresiju telomeraze. Snimljeno konfokalnim mikroskopom SP8 X (Leica), povećanje 20X.

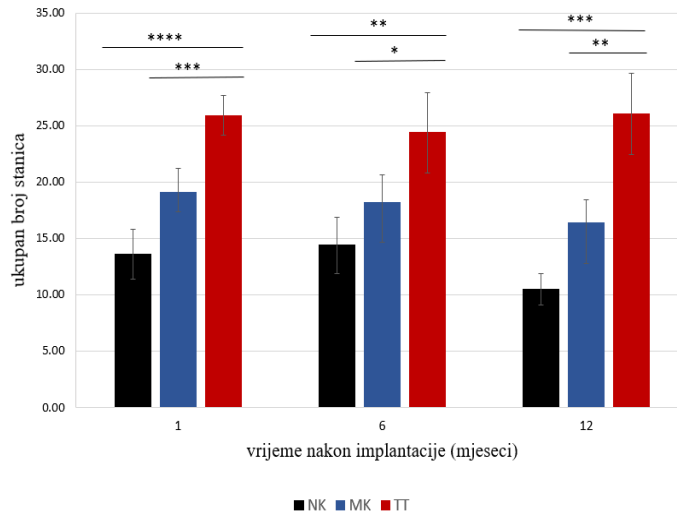
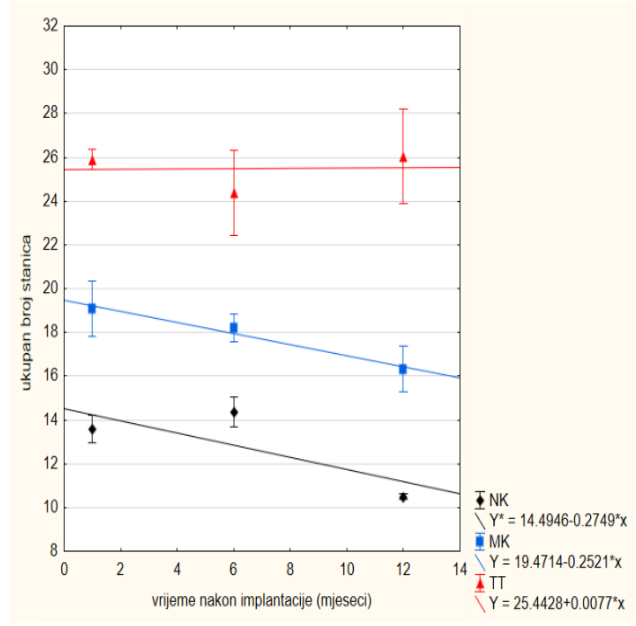
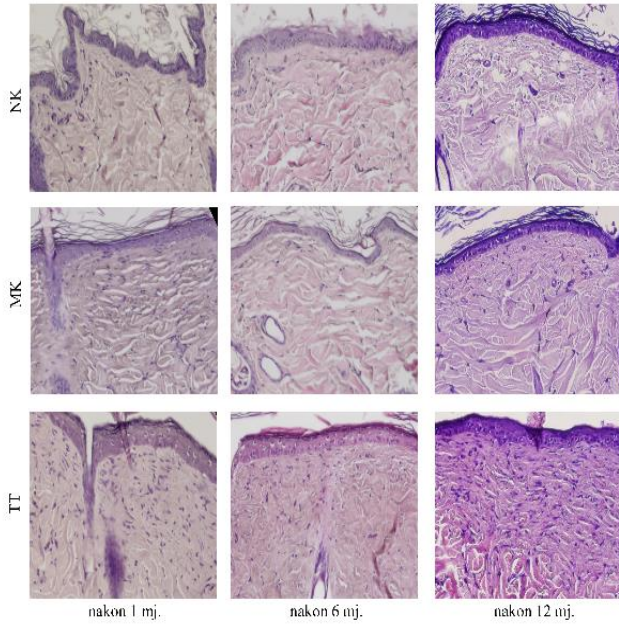
Tako transducirane stanice su korištene za implantaciju u kožu štakora starih 6 mjeseci ( $8 \times 10^6$  stanica/ $1 \text{cm}^2$ ). Svakom štakoru je omeđeno 6 polja (3 polja za implantaciju stanica i 3 za mehaničku kontrolu). Uzorkovanje se odvijalo sukcesivno nakon 1, 6 i 12 mjeseci. Skupine su se sastoje od 3-4 životinje (mužjaci). Tretirane su 3 zasebne skupine s: fibroblastima, matičnim ili endotelnim stanicama.

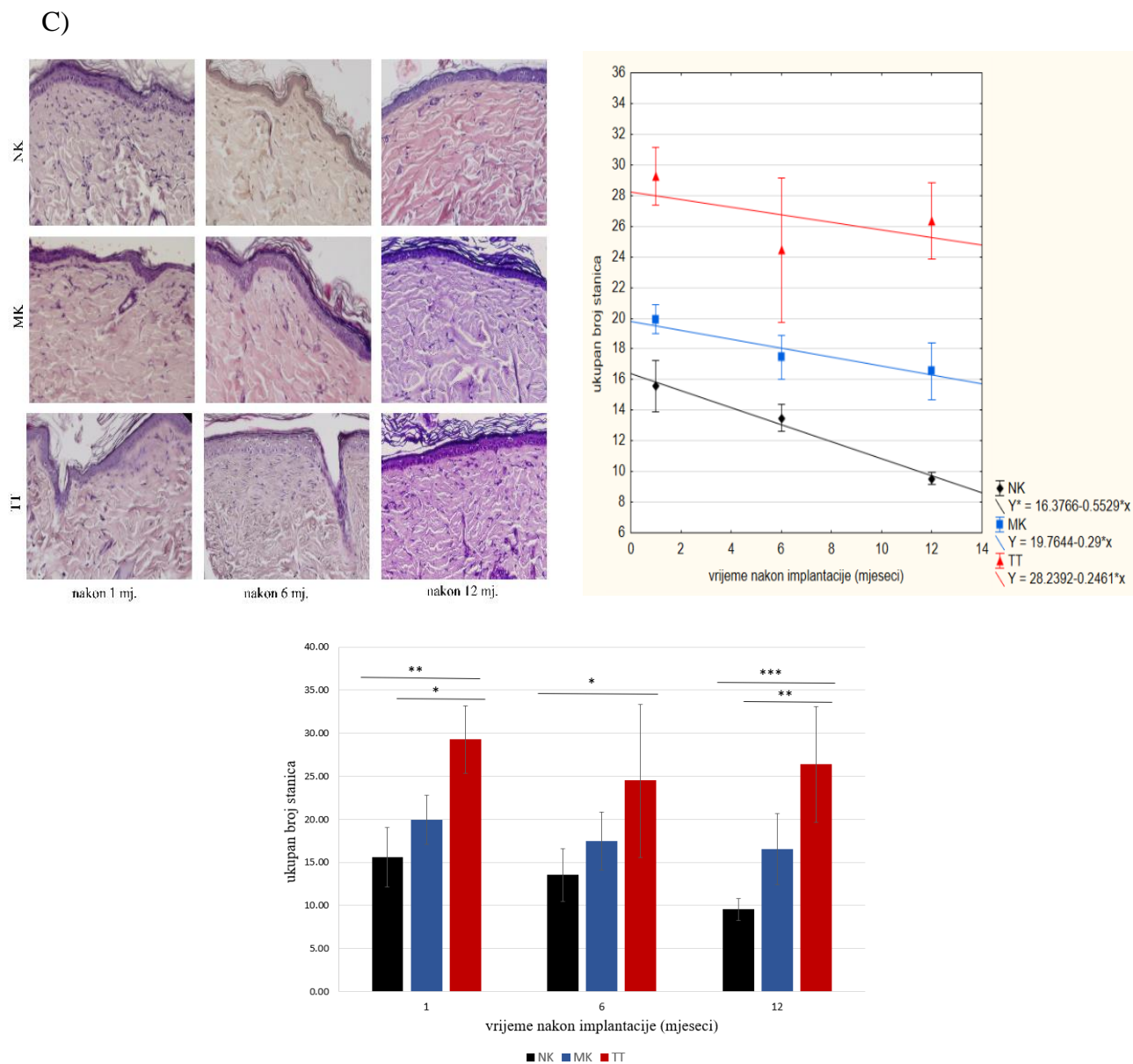
#### 4.1.9. Implantacija mladih fibroblasta, matičnih ili endotelnih stanica dugoročno obnavlja gustoću stanica u koži štakora

Kao i u prethodnim eksperimentima, za praćenje strukturnih promjena tkiva korišteno je H&E bojanje. Za tu svrhu, uzorci su pohranjeni u parafin i narezani na mikrotomu na 5µm. Za kvantitativnu analizu brojene su stanice u poljima veličine 100 µm x 100 µm (4 polja po prerezu, obrađena 2 prereza za svaku životinju). Svaka skupina sastojala se od tri do četiri životinje te je izračunat prosječni broj stanica za svaku skupinu životinja. Uzorkovanja su bila nakon 1, 6 i 12 mjeseci nakon mikrotransplantacije.



B)





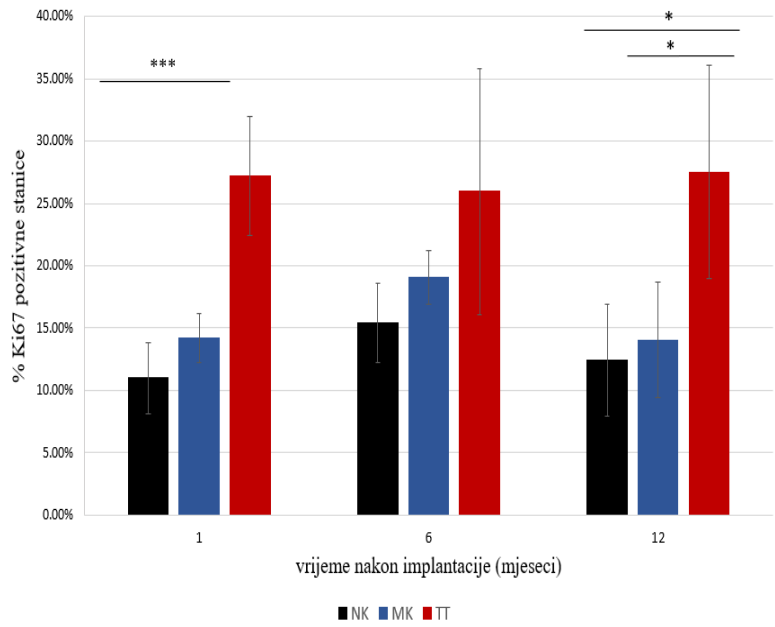
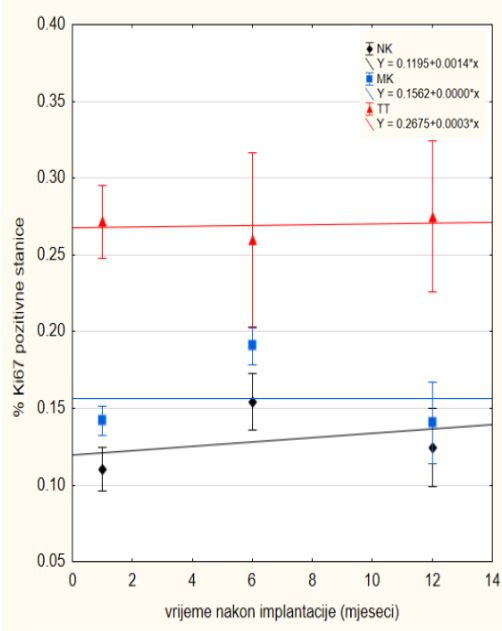
**Slika 25.** Dugoročno praćenje promjena u strukturi tretirane i netretirane kože H&E bojanjem. A) Histološka analiza kože štakora nakon implantacije fibroblasta i pripadajući grafički prikazi prosječnog broja stanica u dermisu kože nakon svakog uzorkovanja; gornji graf pokazuje regresijske pravce (testovi značajnosti) za NK (crni pravac), MK (plavi pravac) i TT (crveni pravac), donji graf pokazuje statistički značajne razlike unutar dobni skupina. B) matične stanice; C) endotelne stanice. n = 4 za uzorkovanja nakon mjesec dana; n = 3 za uzorkovanja nakon 6 i 12 mjeseci. NK-netretirane kontrole; MK-mehanička kontrola; TT-tretirano tkivo mladim fibroblastima. Snimljeno mikroskopom AX70 (Olympus), povećanje 20X, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001.

Analiza prereza pokazala je da je došlo do statistički značajne promjene homeostaze u koži štakora (promjena je konstantna nakon 1, 6 i 12 mjeseci) u koju su implantirani mladi fibroblasti, endotelne te matične stanice. Dobiveni rezultati pokazuju da nakon prvog uzorkovanja dermis tretiranog tkiva sadrži povećan broj stanica koje su puno gušće pakirane te je izvanstanični matriks kompaktan (slika 25, tretirana tkiva). Za sva 3 stanična tipa kod tretiranog tkiva nakon mjesec dana prosječni broj stanica je između 25.91 i 29.25, te je ta promjena dugoročna i stabilna i nakon godinu dana (prosječni broj stanica je između 24.58 i 26.33). Kod mehanički tretiranog tkiva (slika 25, mehaničke kontrole) također se vidi promjena u broju stanica s obzirom na netretirano tkivo i prosječno iznosi ~19 stanica nakon mjesec dana, ali i dalje u manjem opsegu nego u tretiranom tkivu (~1,5 puta manje od tkiva s implantiranim stanicama). Tijekom vremena dolazi do postepenog smanjenja efekta mehaničkog tretmana i prosječni broj stanica opada na 13.11 do 16.54 nakon 12 mjeseci. U kontrolnim uzorcima netretiranog tkiva (slika 25., negativne kontrole) vidljiv je u startu mnogo manji broj stanica koje su često morfološki veće te rahlo pakiran izvanstanični matriks. Broj stanica kod kontrola kontinuirano opada s vremenom i nakon 12 mjeseci iznosi prosječno ~10 stanica, što je u odnosu na tretirano tkivo nakon 12 mjeseci gotovo 3 puta manje stanica. Također, važno je naglasiti da je ta razlika u sva tri stanična tipa statistički značajna gotovo u svim dobnim skupinama (slika 25).

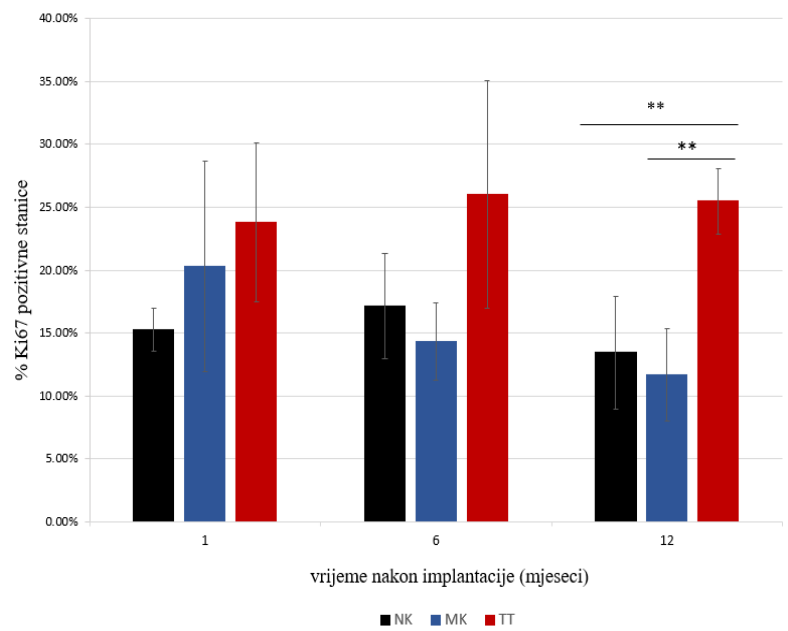
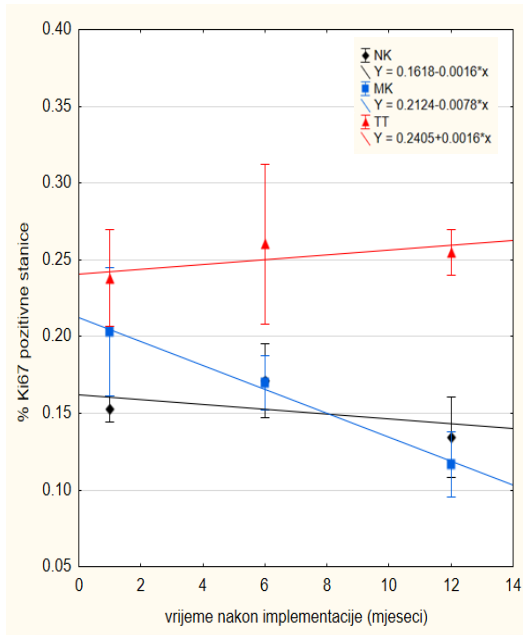
#### **4.1.10. Mikrotransplantacije mladih fibroblasta, matičnih ili endotelnih stanica uzrokuje dugoročnu revitalizaciju matičnih stanica**

Na parafinskim uzorcima tkiva pratio se proliferacijski status stanica kože s protutijelom na Ki67 (Slika 26). Za statističku obradu podataka brojene su Ki67 pozitivne stanice na bazalnoj membrani epidermisa te je izračunat njihov postotak u odnosu na ukupan broj stanica na bazalnoj membrani. Izbrojan je cijeli prerez za svakog štakora, a skupine su se sastojale od tri do četiri životinje.

A)

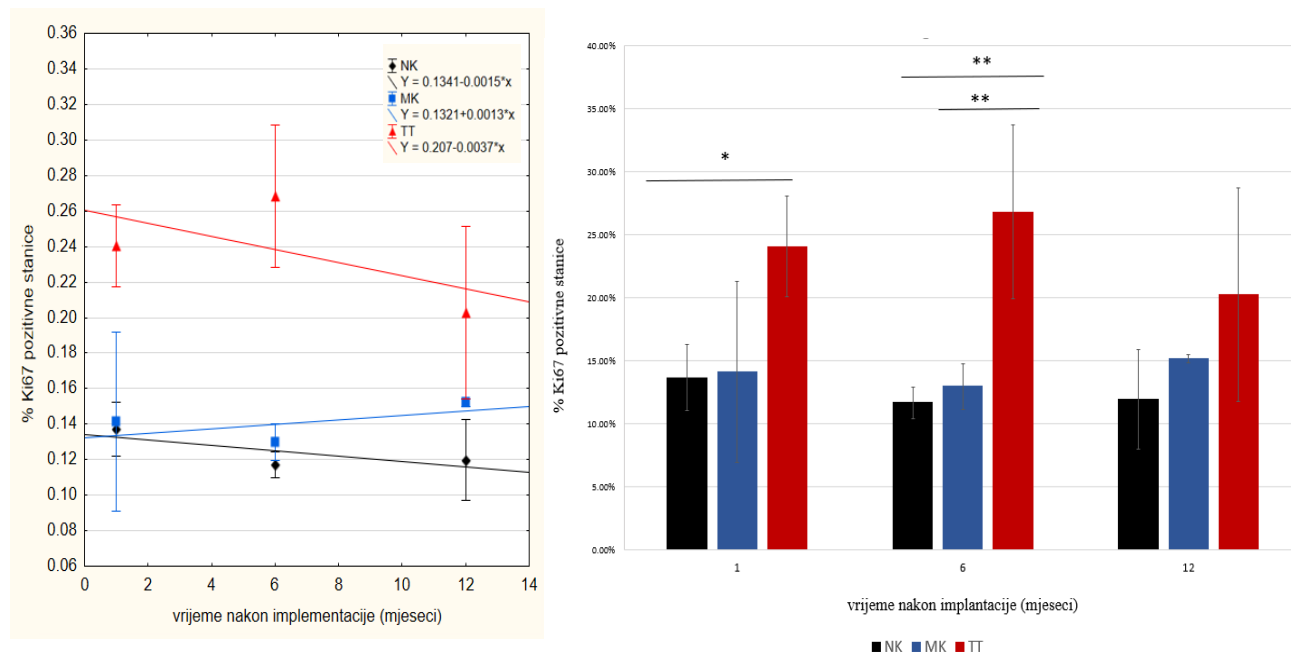


B)





C)



**Slika 26.** Grafički prikazi postotka Ki67 pozitivnih stanica na bazalnoj membrani epidermisa 1, 6 i 12 mjeseci nakon implantacije. A) nakon mikrotransplantacije fibroblasta; lijevi graf pokazuje regresijske pravce (testovi značajnosti) za netretirano tkivo (crni pravac, NK), mehanička kontrola (plavi pravac, MK) i tkivo tretirano mladim fibroblastima (crveni pravac, TT), desni graf pokazuje statistički značajne razlike unutar dobni skupina ovisno o starosti životinja. B) matičnih stanica C) endotelne stanice. N=3-4 životinje po skupini; \* p < 0.05, \*\* p < 0.01.

Iz grafičkog prikaza (slika 26) je razvidno da je kod sva tri tipa stanica došlo do značajne promjene proliferacijske aktivnosti matičnih stanica u tretiranim tkivima štakora 1, 6 i 12 mjeseci nakon implantacije. Graf A pokazuje proliferacijski status matičnih stanica nakon mikrotransplantacije fibroblasta i vidljiva je značajna razlika kod tretiranih tkiva koja iznosi između 25.95-27.49% ovisno o vremenu uzorkovanja. Taj postotak je značajno manji kod kontrola (11.01-15.43%) i mehanički tretiranih tkiva (11.01-19.09%) (slika 26A). Kod matičnih stanica također vidimo da je taj postotak kod kontrola između 13.45-15.25% i mehaničke kontrole između 11.67-20.29%. Postojanost efekta kod tretiranih tkiva (23.80-25.49%) vidljiva je i nakon mikrotransplantacije matičnih stanica te u nekim slučajevima taj postotak je i duplo veći od kontrola i mehaničkih kontrola (slika 26B). Također, sličan efekt je vidljiv i nakon implantacije endotelne stanice; kontrolna tkiva (11.72-13.69%), mehanička kontrola (13.00-15.21%) i tretirano tkivo

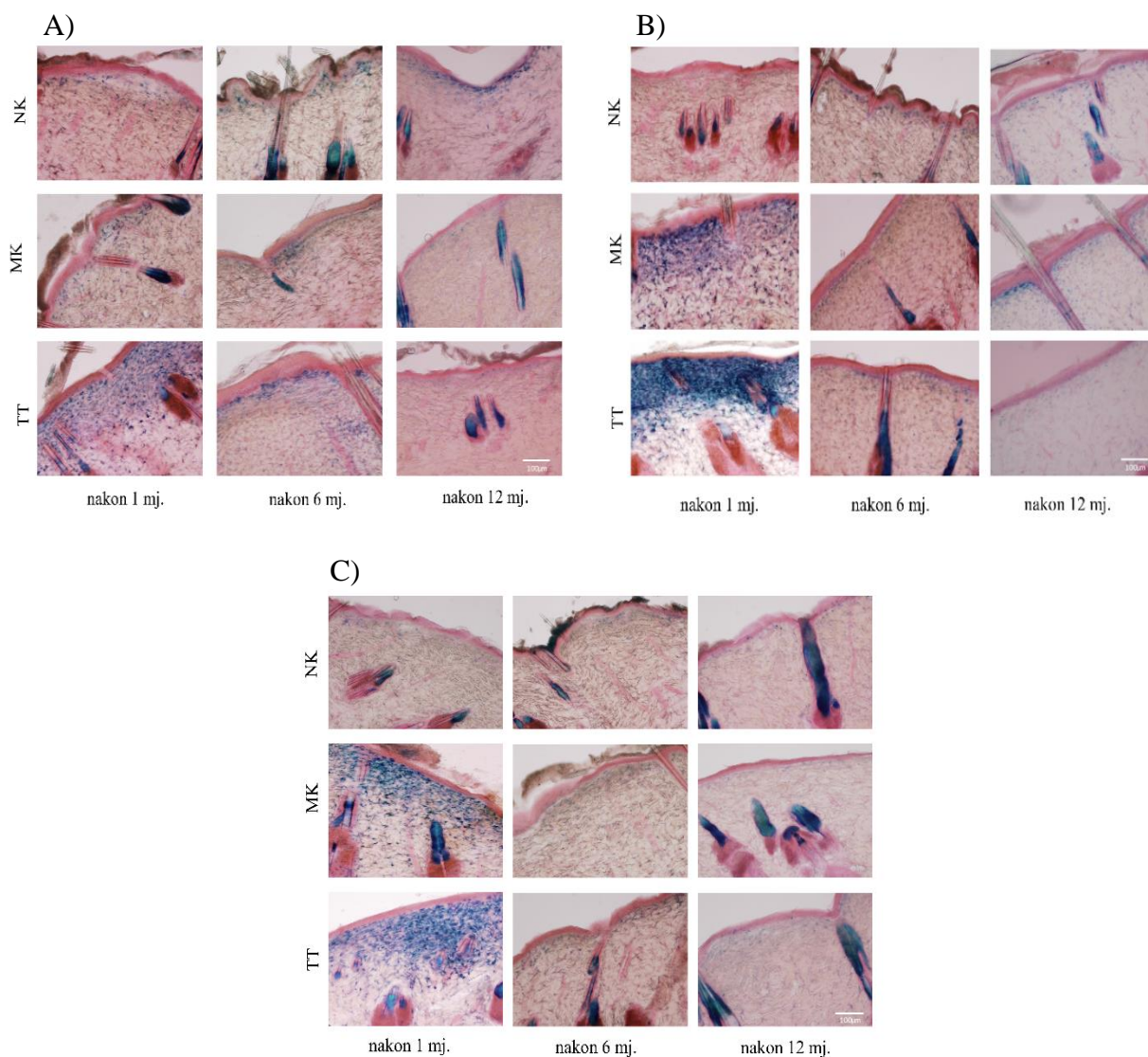
(20.26-25.84%) (slika 26C). Dobiveni rezultati pokazuju da svaki od ovih tipova stanica nakon implantacije mijenjaju tkivni mikrokoliš, lokalno neutraliziraju sekretorni fenotip starih stanica i posljedično obnavljaju vitalnost matičnih stanica.

#### **4.1.11. Tretman mladim stanicama dugoročno smanjuje broj SA- $\beta$ -Gal pozitivnih stanica**

Kao i u prethodnim eksperimentima, pratio se biomarker za SA- $\beta$ -Gal. Za analize su korišteni uzorci pohranjeni u O.C.T. mediju rezani su na debljinu od 60  $\mu$ m 1, 6 i 12 mjeseci nakon mikrotransplantacije fibroblasta, matičnih i endotelnih stanica (slika 27).

Iz dobivenih rezultata razvidno je da je kod tretiranih tkiva i mehaničkih kontrola došlo do značajnog povećanja SA- $\beta$ -Gal mjesec dana nakon uzorkovanja, pogotovo kod tkiva tretiranih matičnim i endotelnim stanicama. Međutim, taj efekt skoro potpuno nestaje nakon 6 i 12 mjeseci kada pada ispod razine kontrole netretiranog tkiva (slika 27). To objašnjavamo kao posljedicu zacjeljivanja rana pri čemu je pojačano plavo obojenje u početku posljedica nakupljanja makrofaga u tkivu koji se s vremenom povlače nakon što je trauma sanirana (uklonjeno oštećeno tkivo, uklonjeni tretmanom unešeni mikroorganizmi, uspostavljena nova kapilarna mreža, restauriran izvanstanični matriks i dr.). Osim toga kada se adenovirusom transduciraju stanice i prenese se u životinju dolazi i do aktivacije imunskog odgovora na Ad5 proteine koji se ekspremiraju, a ujedno će se aktivirati imunski odgovor na fluorescentni marker protein (Muruve, 2004). Iz toga razloga nakon mjesec dana nakon implantacije je vidljiva prisutnost makrofaga koji sudjeluju u imuno odgovoru. Makrofagi igraju središnju ulogu u svim fazama zacjeljivanja rana i upravljaju procesom zacjeljivanja rana. Imaju mnoge funkcije u poticanju i rješavanju upala, uklanjanju apoptotičkih stanica i potpori staničnoj proliferaciji i obnavljanju tkiva nakon ozljede (Hall i sur., 2017). Stoga kada je koža u potpunosti zacijelila plavo obojenje se smanjilo ispod razine odgovarajuće kontrole u sve tri transplantacije.



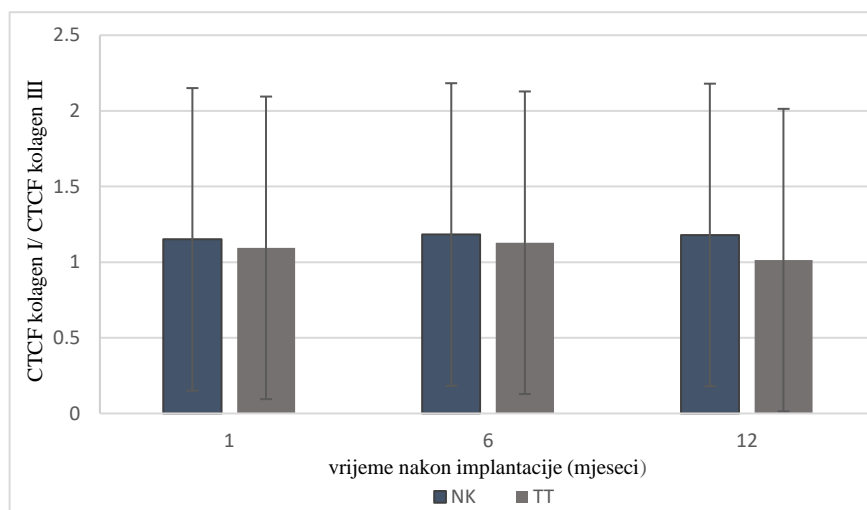
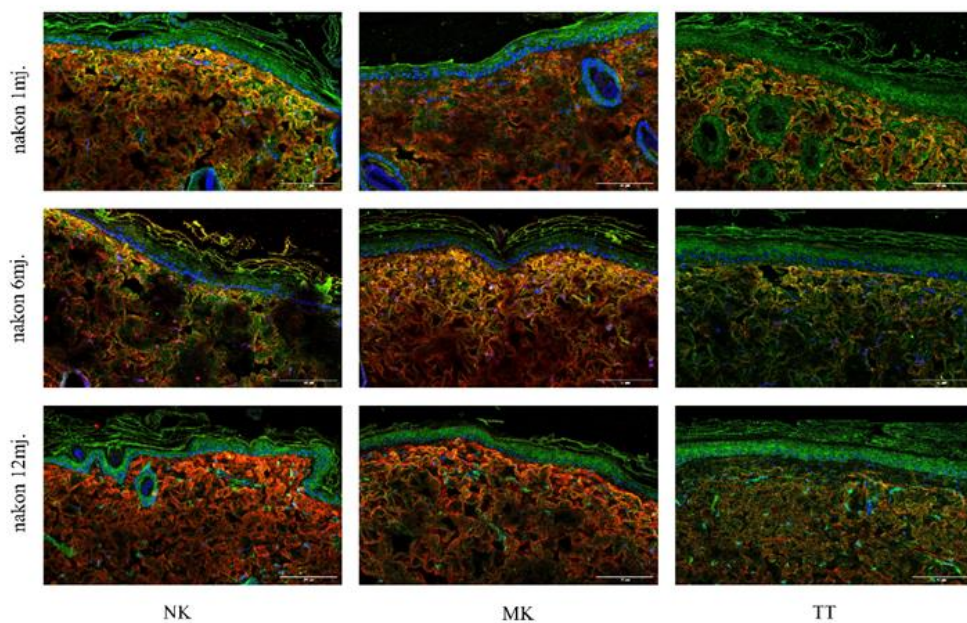


**Slika 27.** SA- $\beta$ -Gal analiza kože štakora 1, 6, 12 mjeseci nakon implantacije: A) fibroblasta, B) matičnih ili C) endotelnih stanica. Prikazano je netretirano tkivo (NK), mehanički tretirano tkivo (MK) i tkivo u koje su implantirane mlade stanice (TT; fibroblasti, endotelne ili matične stanice) metodom mikrotransplantacije. Slike prikazuju različite uzorke kože s leđa jednog reprezentativnog štakora za pojedinu skupinu. Snimljeno mikroskopom AX70 (Olympus), povećanje 20X.

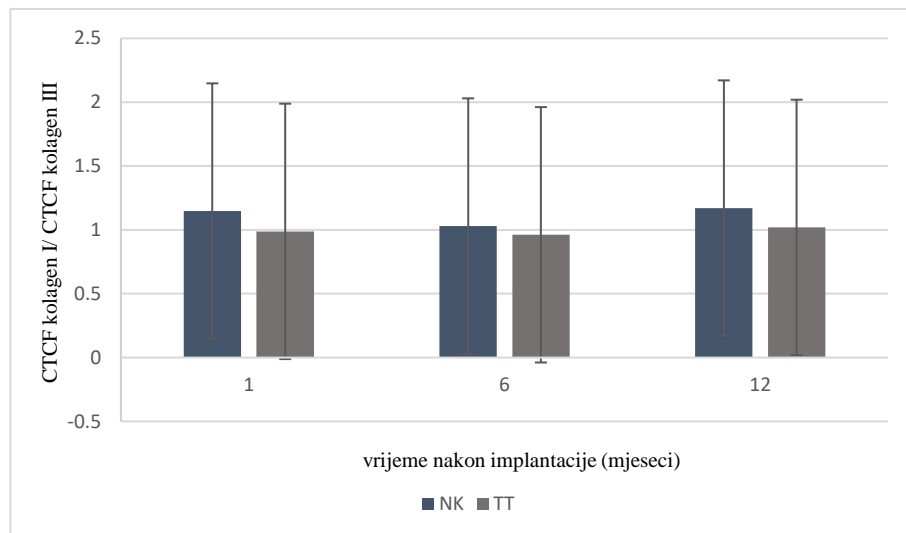
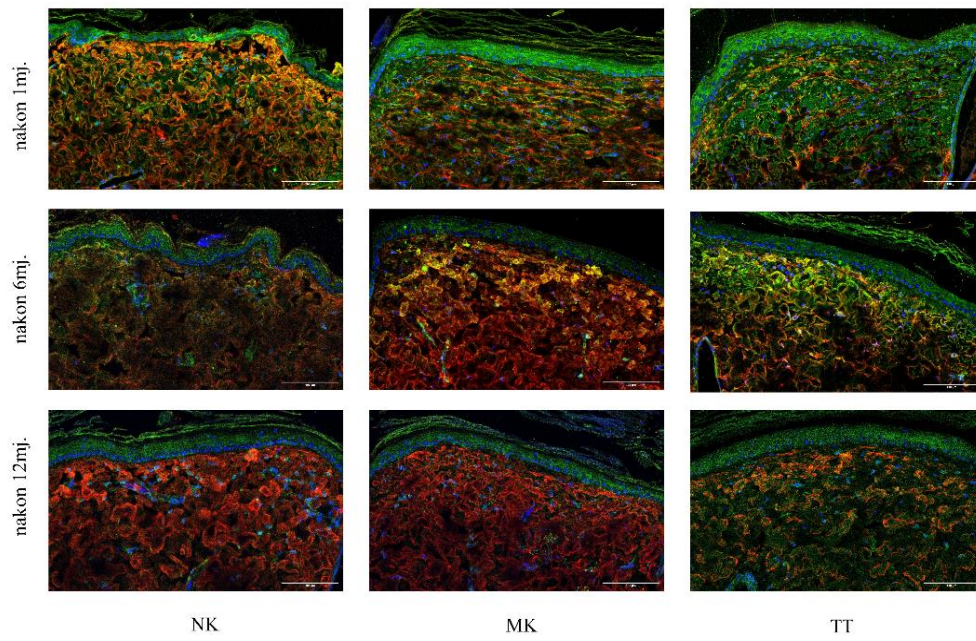
#### 4.1.12. Mikrotransplantacije fibroblasta, matičnih ili endotelnih stanica obnovlja matriks kolagena I i III

Kao što je opisano i u poglavlju 4.1.4, za analizu ultrastrukture kože pratili smo distribuciju kolagena I i kolagena III nakon implantacije fibroblasta, endotelnih i matičnih mladih stanica nakon 1, 6 i 12 mjeseci. Također, mjereno je intenzitet imunofluorescencije za kolagen I i kolagen III pomoću ImageJ programa te su signali analizirani korištenje CTCF metode (detaljnije objašnjeno u 4.1.4 poglavlju). Analiza je obavljena na pet polja 100 x 100  $\mu\text{m}$  kod svakog prereza, a svaka skupina se sastojala 3 do 4 životinje. Rezultati su prikazani kao omjer kolagena I i kolagena III.

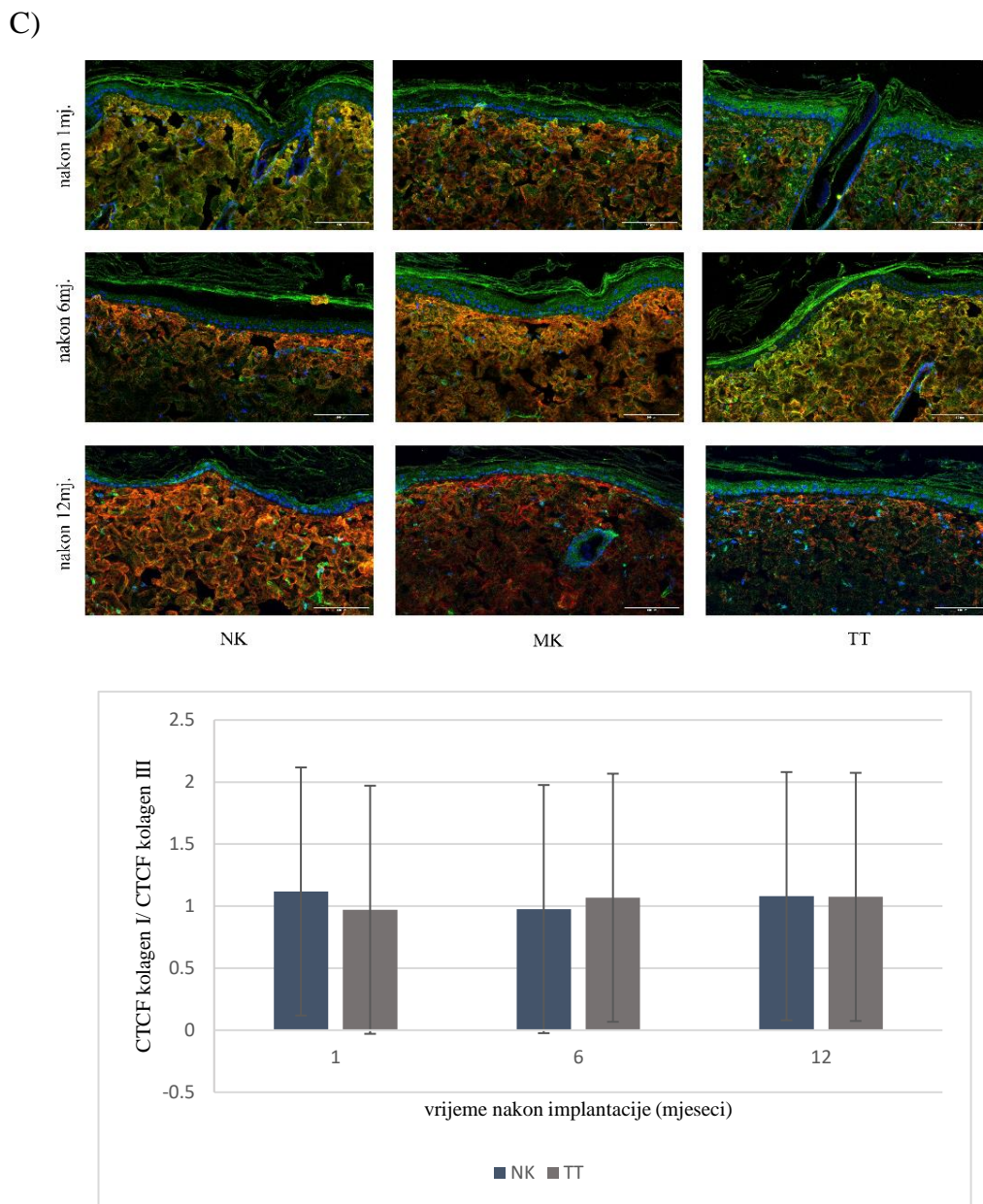
A)



B)







**Slika 28.** Reprezentativni primjer vizualizacije kolagena I i kolagena III 1, 6 i 12 mjeseci nakon mikrotransplantacije: A) fibroblasta i pripadajući graf omjera intenziteta fluorescencijskih signala za Col I/Col III, B) matičnih stanica i pripadajući graf omjera intenziteta fluorescencijskih signala za Col I/Col III, C) endotelnih stanica i pripadajući graf omjera intenziteta fluorescencijskih signala za Col I/Col III. Kolagen I (zeleno), kolagen III (crveno), preklapanje signala (žuto), jezgre stanica obojane su plavo (Hoechst). Snimljeno konfokalnim mikroskopom SP8 X (Leica), povećanje 20X. NK-netretirane kontrole; TT-tretirano tkivo mladim fibroblastima. N= 3-4 životinje po skupini.

Na slikama nakon implantacije fibroblasta, matičnih ili endotelnih stanica najznačajnija morfološka razlika između kontrolnih i mehanički tretiranih tkiva u odnosu na tretirana tkiva vidljiva je 1 mjesec nakon implantacije (slika 28). Vidljiva je veća zastupljenost kolagena I (zeleni signali) i osim toga njihova struktura se razlikuje od netretiranih tkiva gdje su kolageni puno tanji i pravilnije umreženi. Taj efekt vidljiv je nakon 6 i 12 mjeseci nakon implantacije, ali u nešto manjem postotku (slika 28). Grafički prikaz potvrđuje već opisan trend pada omjera intenziteta fluorescencije Col I/ Col III u tretiranim tkivima (poglavlje 4.1.4. Analiza ultrastrukture kože). Kod implantiranih fibroblasta taj trend se kreće između 4.24-5.22% 1 i 6 mjeseci nakon implantacije, a čak 14.4% 12 mjeseci nakon implantacije (slika 28A). I kod matičnih i endotelnih stanica vidljiv je taj trend koji je vrlo varijabilan i kod matičnih stanica se kreće između 6.8-13.6%, odnosno 0.93-13.4 posto kod endotelnih stanica (slika 28B,C).

## **5. RASPRAVA**

Za razliku od opće prihvaćenog mišljenja da je starenje uvjetovano ukupnim zbivanjima u organizmu i ujednačeno u svim tkivima i organima, jedna od glavnih spoznaja koja je očigledna iz rezultata ovog doktorskog rada jest da je starenje u prvom redu lokalnog karaktera, a glavni uzrok je akumulacija starih tj. senescentnih stanica koje narušavaju funkciju okolnog tkiva (Dimri i sur., 1995). Nakupljanje starih stanica je već prepoznato kao jedan od glavnih uzroka patofizioloških promjena kože koje se pojavljuju sa starenjem (Campisi 1996; 1997). Kako bi smanjili ili uklonili štetan utjecaja starih ili nefunkcionalnih stanica u tkivima, uveli smo tehniku za mikrotransplantaciju stanica u tkiva kojom možemo lokalno promijeniti stanični sastav kože, koristeći štakore Fisher 344 kao modelni organizam. Ova tehnika direktnog unošenja stanica u kožu *in vivo* se pokazala puno djelotvornija za razliku od drugih metoda poput npr. intradermalnih injekcija, elektroporacije, transepidermalne imunizacije (Peachman, Rao i Alving, 2003). Kako prilikom mikrotransplantacije uz dodatak novih i/ili revitaliziranih stanica dolazi do ozljede tkiva, za očekivati je da će nove stanice spremnije sudjelovati u zarastanju i uspostavi homeostaze nego endogene stare stanice koje ne sudjeluju u diobama (Funk i sur., 2000). U tom procesu će doći do djelomične obnove stanica u tkivu.

Mikrotransplantacija mladih stanica *in vivo* je uvedena i usavršena u Laboratoriju za staničnu i molekularnu biologiju na Institutu Ruđer Bošković. Fibroblasti izdvojeni iz kože mladih štakora nakon kratkog razdoblja uzgoja u kulturi mikrotransplantacijom se uspješno implantiraju u izogene odrasle jedinke štakora Fisher 344. Pokazano je da su kod najstarijih životinja stanice implantirane s velikom učinkovitošću u dorzalni dio kože, u određenim područjima uspješno je implantirano čak > 50% novih stanica obilježenih s DiI. Prosječno, oko 36% mladih stanica u tkivu su uspješno implantirano. Implantirane stanice su stabilno ugrađene te se uočavaju i deset mjeseci nakon tretmana (Nanić i sur., 2022). Također, osim na životinjama starim 24 mjeseca, željela sam utvrditi uspješnost mikrotransplantacije u ovisnosti o dobi životinje (6, 12, 18 i 24 mjeseca). Postotak/uspješnost implantacije progresivno raste s dobi životinje, prosječno od 26.4% stanica kod šestomjesečnih štakora do 32.4% kod 24 mjeseca starih životinja. Time sam pokazala da je ovaj postupak mikrotransplantacije pouzdan i reproducibilan te da je u svim dobnim skupinama došlo do uspješne implantacije. Nešto manji postotak implantiranih stanica kod mlađih životinja je posljedica toga što su stanice u mladom tkivu gušće po jedinici volumena te je i međustanični slobodan prostor manje dostupan. Međustanični prostor u mladom tkivu je različitog sastava i tvrdoće i razlikuje se od onih u starim tkivima koji je degradiran i neorganiziran (Limbert i sur.,

2019; Cole i sur., 2018; Blair i sur., 2020). Također, treba imati na umu da postoji fiziološko ograničenje broja stanica na određenoj površini tako da s porastom dobi životinja raste i postotak novoimplantiranih stanica, međutim u svim dobnim skupinama slična je konačna postignuta gustoća stanica u tkivu. Prednost ove metode je i to što omogućava izravan unos mladih stanica u sve slojeve kože te se stanice obilježene s DiI mogu pronaći čak i duboko ispod kapilarne mreže.

Brojna istraživanja pokazuju da se broj stanica u koži starenjem smanjuje (Gunin i sur., 2011; Khalid i sur., 2022) te da se međustanični razmak povećava što otežava međustaničnu interakciju i prijenos signala. Kako su fibroblasti glavne stanice koje sintetiziraju sve sastavnice izvanstaničnog matriksa, uključujući kolagene, elastine te proteoglikane (Cole i sur., 2018; Khalid i sur., 2022), smanjenjem njihovog broja se smanjuje i kapacitet zarastanja i obnavljanja kožnog tkiva sa starenjem. To je očigledno iz kontrolnih uzoraka netretirane kože predstavljenih u ovom radu što je u skladu s očekivanjem, a pokazuju statistički značajan progresivni pad broja stanica sa starenjem, što između 6 i 24 mjeseca starih životinja iznosi gotovo 50%. Tijekom izrade ove disertacije sam pokazala da je moguće preokrenuti ovaj proces što pokazuju histološke analize gdje je kod svih tretiranih tkiva došlo do značajnog povećanja ukupnog broja stanica te se ona i morfološki razlikuju od netretiranih kontrola. Stanice su gušće pakirane, a razmak između njih je znatno manji što je važno za bolje međustanične interakcije. Također, i izvanstanični matriks je histološki zbijeniji i sličan mladom tkivu. Treba istaknuti da je u svim skupinama kod tretiranih tkiva taj porast gustoće stanica dosegno svoju maksimalnu vrijedost od prosječno 30 stanica po  $100 \mu\text{m}^2$  preparata. To je otprilike maksimalna vrijednost gustoće stanica u tkivima najmlađih životinja i predstavlja fiziološki maksimum. Kod mehanički tretiranog tkiva također se vidi umjereni porast broja stanica u odnosu na netretirano tkivo što je posljedica procesa zacjeljivanja nakon mehaničke traume kad endogene stanice s diobenim potencijalom sudjeluju u zarastanju i otklanjanju ozljede.

Kod pokusa dugoročnog praćenja obnove kože nakon mikrotransplantacije mladih fibroblasta, endotelnih ili matičnih stanica sam također pokazala da je postupak uspješan i ponovljiv. Najznačajniji rezultat kod tretiranih tkiva je da je promjena stalna i 12 mjeseci nakon implantacije bilo kojih od korištenih stanica što je prema našim saznanjima najduži period praćenja stanica nakon implantacije. Unutar dobnih skupina, broj stanica između tretiranih tkiva u odnosu na kontrole i mehaničke kontrole je prosječno ~2-2.5 puta veći s velikom statističkom značajnošću. Kod mehanički tretiranih tkiva uočen je prethodno opisan učinak početnog povećanja broja stanica



u odnosu na netretirane kontrole, ali nakon 12-18 mjeseci se zamjećuje značajan pad broja stanica i pokazuje kako mehanički tretman tijekom vremena ubrzano gubi pozitivan efekt. U pokusima implantacije fibroblasta trend smanjenja broja stanica u mehaničkim kontrolama s vremenom je veći nego kod netretiranih kontrola što znači da kratkoročno mehanički tretman ima pozitivan efekt, ali s vremenom on će imati negativniji efekt u odnosu na netretirano tkivo s obzirom da se stanice gube ubrzanim tempom. To je posljedica iscrpljivanja diobenog potencijala stanica u tkivu koje uslijed dodatnih dioba u procesu zacjeljivanja brže dosegnu senescenciju tj. Hayflickov limit (Hayflick i Moorhead, 1961).

Najbolji dokaz da promjene mikrookoliša matičnih stanica imaju pozitivan učinak na pomlađivanje dermisa i epidermisa dolazi iz pokusa presađivanja kože s ljudskih donora na imunodeficientne miševе (Gilhar, Pillar i David, 1991). Transplantirani su presadci kože bedra zdravih starih i mladih donora. Prije transplantacije uočena je značajna razlika u debljini mladog i starog epidermisa, pri čemu je stari epidermis bio ~30% tanji. Nakon transplantacije, epidermis obje skupine pokazao je značajno povećanje debljine, a promjene u staroj koži iznosile su dramatičnih 142.5% dok je u mlađoj skupini ta vrijednost bila 18.8%. Također, nakon transplantacije je kod stare kože došlo do znatnog porasta gustoće kapilara (Gilhar, Pillar i David, 1991). Sve ove promjene pokazuju da je moguće značajno povećati obnovu stanica kože i njihov regenerativni potencijal promjenom staničnog mikrookoliša u dermisu.

Kako sam uspješno implantirala značajan postotak mladih stanica i povećala ukupan broj stanica u tretiranim tkivima, za očekivati je da je, slično gore opisanom pokusu presađivanja kože, došlo do pozitivne promjene tkivne homeostaze što može dovesti do reverzije procesa starenja. Stoga sam pratila proliferacijsku aktivnost matičnih stanica epidermisa u tretiranim tkivima imunoflorescencijski s Ki67 protutijelom. Dobiveni rezultati analize kontrolnih tkiva potvrđuju da sa starenjem kontinuirano pada proliferacijski potencijal epidermalnih matičnih stanica na bazalnoj membrani za gotovo 50% kod 24 mjeseca starih životinja u odnosu na 6 mjeseci stare životinje. Također, pokazali smo da se metodom mikrotransplantacije mogu uspješno revitalizirati matične stanice stare kože čija se diobena aktivnost kod 24 mjeseca starih životinja drastično poveća te čak premašuje 6 mjesečne kontrole. Tako je u ovim eksperimentima, kroz dugoročno praćenje stanja proliferacije matičnih stanica epidermisa, kod tretiranih tkiva nakon mjesec dana proliferacijska aktivnost značajno povećana u odnosu na netretirane kontrole i mehaničke kontrole te iznosi prosječno ~25.48%. Ova pojačana proliferacijska aktivnost je prisutna i nakon 12 mjeseci od

implantacije. To je snažan dokaz da je proces starenja lokalnog karaktera te da se lokalnom promjenom tkivne homeostaze može dugoročno promijeniti i mikrookoliš matičnih stanica i inhibirati negativan utjecaj senescentnih stanica kao što je i pokazano u literaturi transplantacijom tkivnih presađaka (Gilhar, Pillar i David, 1991; Conboy i sur., 2005; Stanley i sur., 2012). Slični rezultati promjene staničnog mikrookoliša su pokazani i na primjeru diferencijacije Leydigovih stanica koje su primarni izvor testosterona kod muškaraca, kad se matične stanice mogu ponovo pokrenuti na njihovu proizvodnju nakon djelovanja etan dimetansulfonata (Stanley i sur., 2012). Ovi rezultati jasno pokazuju snažan utjecaj novo-implantiranih mladih stanica na homeostazu tkiva u dermisu i promjenu mikrookoliša niše matičnih stanica. Kod eksperimenata implantacije matičnih stanica statistički najznačajnija promjena je kod starijih životinja u tretiranom tkivu (12 mjeseci nakon implantacije) zbog toga što starenjem prirodno dolazi do smanjenja proliferacijske aktivnosti kao što sam pokazala u kontrolnim tkivima. Očigledno, proliferacijska aktivnost u tkivima ima maksimalan limit iznad kojeg nije moguće dodatno stimulirati aktivnost matičnih stanica kao što možemo vidjeti kod mlađih životinja u tretiranom tkivu gdje, unatoč povećanju aktivnosti u odnosu na kontrole i mehaničke kontrole ta promjena nije statistički značajna.

Kao specifični biomarkeri starenja do sada su korišteni p16<sup>INK4a</sup> (Krishnamurthy i sur., 2004; Ohtani i sur., 2004), aktivnost SA- $\beta$ -gal kod pH6 (Dimri i sur., 1995; Debacq-Chainiaux i sur., 2009) i komponente SASP-a, ali i kontinuirana prisutnost odgovora na oštećenje DNA, povišenje p21 i p53. (Yang i Hu, 2005; Pospelova i sur., 2009; Gu i Kitamura, 2012). Budući da se manifestacija mnogih od ovih obilježja povećava s godinama, bilo je razumno zaključiti da nastaju kao posljedica nakupljanja senescentnih stanica. Međutim, novija istraživanja pokazuju da i neke druge vrste stanica mogu imati sličan efekt. Specifično, otkriveno je da senescentne stanice *in vivo* mogu privući kombinaciju različitih imunoloških stanica koje sudjeluju u njihovom uklanjanju. Pri tome najveći dio tih imunocita čini subpopulacija makrofaga, koji eksprimiraju visoku razinu p16<sup>INK4a</sup> te SA- $\beta$ -gal aktivnost (pH 6), oponašajući tako najtipičnija obilježja senescentnih stanica. Kako bi to potvrdili, adipozno tkivo starog miša je testirano na SA- $\beta$ -Gal aktivnost i nakon toga tretirano s klodronatom koji specifično uklanja fagocite. Kao rezultat toga došlo je do smanjenja prisutnosti markera SA- $\beta$ -Gal odnosno smanjenja obojenja (Hall i sur., 2017). Dobiveni rezultati analize mikrotransplantacija u kožu štakora različite dobi te dugoročnog praćenja fibroblasta, endotelnih i matičnih mladih stanica nakon mikrotransplantacije, pokazuju pojačanu SA- $\beta$ -Gal aktivnost u prvim mjesec dana kod tretiranih i mehanički tretiranih tkiva. Nakon 6 mjeseci, isti

uzorci tkiva pokazuju značajno smanjenje SA- $\beta$ -Gal aktivnosti, tako da ona pada ispod početnih vrijednosti netretiranog tkiva i često je nezamjetna. Taj efekt objašnjavamo početnim povećanjem broja i aktivnosti makrofaga nakon implantacije kad dolazi do njihove migracije na mjesto traume i sudjelovanja u sanaciji oštećenja tkiva. Nakon 6 mjeseci, kad je proces zarastanja završen, dolazi do potpunog zacjeljivanja tkiva i nestanka makrofaga u tretiranim tkivima i mehaničkim kontrolama.

Kao posljedica starenja i smanjenog broja fibroblasta u staroj koži dolazi i do promjena u izvanstaničnom matriksu, u prvom redu u strukturi kolagena i elastina (Tobin, 2017; Xiong i sur., 2017; Limbert i sur., 2019; Mathew-Steiner, Roy i Sen, 2021). Ovdje opisani rezultati pokazuju da su u koži najzastupljeniji kolageni I i III kod tretiranih tkiva u starim životinjama tanji i pravilnije organizirani, dok kod netretiranih kontrola vidimo da njihovi kolageni pokazuju neuređenu, raspršenu strukturu sukladno ranijim opažanjima (Uitto, 1986; Lavker, Zheng i Dong, 1987; Gniadecka i sur., 1994). Najznačajnija promjena u morfologiji kolagenskih vlakana je zapažena kod 24 mjeseca starih životinja gdje tretirano tkivo, u usporedbi s pripadajućim kontrolama, izgleda poput kože mladih životinja. Puno jači intenziteti signala imunofluorescencije kolagena I i III kod kontrola odnosno njihovi omjeri ukazuju da je došlo do promjene njihove organizacije pri čemu zauzimaju veću površinu, jer je gustoća stanica u starom dermisu znatno manja. Kod dugoročnog praćenja nakon mikrotransplantacije fibroblasta, matičnih ili endotelnih stanica naglašeni su gore opisani rezultati gdje je najznačajnija promjena u morfologiji kolagena I i III vidljiva nakon mjesec dana. 6 i 12 mjeseci nakon tretmana ta promjena kod tretiranih tkiva je i dalje prisutna iako je vidljivo smanjene uređenosti strukture kolagena, ali i dalje bolje nego kod netretiranih kontrola i mehanički tretiranih tkiva.

Dosadašnja istraživanja promjena genske ekspresije između mlade i stare kože se većinom zasnivaju na određivanju slijeda RNA u pojedinačnim stanicama (scRNA, *single-cell RNA sequencing*). Zou i suradnici (Zou i sur., 2021) su sekvencirali uzorke kože kapaka mladih, sredovječnih i starih osoba te identificirali na tisuće DEG-ova specifičnih za svaki stanični tip (bazalne stanice; stanice folikula dlake; melanociti, endotelne stanice; fibroblasti; Langerhansove stanice) i njihovu promjenu u rasporedu kao posljedicu starenja te istaknuli molekularne promjene koje su u osnovi starenja ljudske kože. Analiza obogaćivanja GO otkrila je da su pozitivno regulirani geni uglavnom povezani sa signalnim putem posredovanim citokinima i apoptotskim signalnim putem te da su geni regulirani starenjem uglavnom povezani s proliferacijom epitelnih

stanica i organizacijom izvanstaničnog matriksa (Zou i sur., 2021). Kako bih vidjela sveukupni profil promjene u ekspresiji gena u koži koja se događa starenjem, sekvencirala sam RNA iz tkiva kože. Profili genske ekspresije se značajno razlikuju unutar različitih skupina, gdje je najznačajnija razlika u ekspresiji gena vidljiva kod 24-mjesečnih tretiranih tkiva u odnosu na kontrole (24 mjeseca) gdje je, kad se oduzme utjecaj mehaničkog tretmana, uočena razlika u 999 pojačano eksprimiranih i 206 smanjeno eksprimiranih gena. Ističu se brojni kolageni pojačano eksprimirani u tretiranom tkivu što potvrđuju i rezultati dobiveni imunofluorencijom za kolagen I i III kao i brojni radovi koji pokazuju da starenjem dolazi do smanjene sinteze (Tobin, 2017; Limbert i sur., 2019). Također, zanimljiva je usporedba mehaničkog tretmana (6 mjeseci) u odnosu na kontrolu (6 mjeseci) gdje je samo jedan gen promijenjen (*Cxcl2*). *Cxcl2* spada u grupu kemokina s proupalnom funkcijom te je uključen u mnoge imunološke reakcije uključujući zacjeljivanje rana (Palomino i Marti, 2015). To je očekivano s obzirom na činjenicu da smo kod mehanički tretiranog tkivo uzrokovali oštećenje tkiva iglama za mikrotransplataciju.

Starenjem dolazi i do smanjenja debljine epidermisa i izravnavanja dermalno-epidermalnog spoja kao posljedica smanjene proliferacije keratinocita (Thuringer i Katzberg, 1959; H. Baker i Blair 1968; Gilchrest, Blog i Szabo, 1979; West, 1994). Pokusi presađivanja ostarjelog ljudskog epidermisa na imunodeficientne miševe doveli su do poništavanja promjena nastalih kao posljedica starenja, uključujući smanjeni indeks proliferacije i ponovnu pojavu zakrivljenog dermalno-epidermalnog spoja (Gilhar, Pillar i David, 1991; Gilhar i sur., 1994; Gilhar, Pillar i Etzioni 1995). Naši pokusi su pokazali kako je došlo do ponovne aktivacije epidermalnih matičnih stanica i samim time do pojačane proliferacije keratinocita. Iz dobivenih rezultata metode sekvenciranja RNA vidljiva je pojačana ekspresija brojnih keratina u tretiranom tkivu starih životinja. Ovdje opisani rezultati pokazuju da je nakon mikrotransplatacije mladih fibroblasta došlo do pojačane aktivnosti proliferacije epidermalnih matičnih stanica u tretiranim tkivima, koje diferenciraju u keratinocite, stanice odgovorne za sintezu keratina.

Ukupno gledajući, u ovoj disertaciji sam pokazala da se transplantacijom mladih stanica u staro tkivo, u ovom slučaju kožu, može značajno utjecati na starenje istih i to na svim razinama, počevši od stanica i ekstracelularnog matriksa, stanične signalizacije, regeneracije, genske ekspresije itd. te da su te promjene stabilne i kroz duže vremensko razdoblje.

## **6. ZAKLJUČCI**

U ovom sam istraživanju testirala hipotezu da je nakupljanje senescentnih stanica jedan od glavnih uzroka patofizioloških promjena u tkivima i organima koje se javljaju starenjem. Pokazala sam da se proces starenja može lokalno preokrenuti u dermisu starih štakora uvođenjem mladih stanica, što je rezultiralo značajnim povećanjem ukupnog broja stanica i zbijenim kolagenskim matriksom za razliku od netretirane kože istih životinja. U prosjeku, broj stanica u tretiranom starom tkivu čak premašuje broj stanica u tkivima šestomjesečnih životinja. U svim pokusima, mehanički tretirano tkivo pokazuje umjerena poboljšanja. U usporedbi s njim, stara tkiva tretirana mladim stanicama pokazuju promjene u izvanstaničnom prijenosu signala, poboljšanu regeneraciju i pomlađivanje što se uvelike može specifično pripisati implantiranim mladim stanicama. Učinci na matične stanice, povećanje stanične gustoće i dugoročnog utjecaja na tkivo kontinuirano rastu s povećanom dobi štakora.

Na temelju ovdje iznesenih rezultata možemo izvući nekoliko zaključaka:

- I. Pokazala sam da sa starenjem pada broj fibroblasta u koži štakora i proliferacijski status epidermalnih matičnih stanica u bazalnom sloju epidermisa te da kolagenski snopovi pokazuju neuređenu, raspršenu strukturu.
- II. Mikrotransplantacijski tretman prikladan je za implantaciju mladih stanica u kožu štakora pri čemu je uspješnost implantacije najveća kod najstarijih životinja i iznosi ~32%.
- III. Nakon mikrotransplantacije broj stanica u tretiranom starom tkivu i proliferacijska aktivnost matičnih stanica statistički značajno premašuje kontrolna tkiva, a kolagenski snopovi su tanji i pravilnije organizirani te izgledom potpuno nalikuju onima kod mladih životinja.
- IV. Pokazana je promjena u genskoj ekspresiji tretiranih tkiva u odnosu na kontrole i mehaničke kontrole, a ističe se pojačana ekspresija brojnih kolagena, keratina i gena vezanih za proliferaciju stanica.
- V. Ako se uvedu u značajnom broju, mlade stanice mogu promijeniti homeostazu tkiva u staroj koži i lokalno preokrenuti proces starenja pokazujući ubranu regeneraciju i pomlađivanje. Relativno smanjenje senescentnih stanica u starom tkivu smanjuje sekretorni fenotip senescentnih stanica.

VI. Učinci pomlađivanja traju najmanje 12 mjeseci, što je bilo najduže razdoblje našeg praćenja nakon tretmana.

U ovoj disertaciji se jasno ističe veliki potencijal metode mikrotransplantacije za daljnja eksperimentalna istraživanja, predstavljenih pozitivnih učinaka na pomlađivanje tkiva, ali i tretman raznih kožnih bolesti u kliničkoj primjeni. Time su zajamčena buduća opsežna istraživanja starenja kože, potencijala kliničke primjene kao i daljnji razvoj ove metode.

## **7. LITERATURA**



1. Acosta, Juan Carlos, Ana Banito, Torsten Wuestefeld, Athena Georgilis, Peggy Janich, Jennifer P. Morton, Dimitris Athineos, i sur., 2013. "A Complex Secretory Program Orchestrated by the Inflammasome Controls Paracrine Senescence." *Nature Cell Biology* 15 (8): 978–90. <https://doi.org/10.1038/ncb2784>.
2. Alcorta, D. A., Y. Xiong, D. Phelps, G. Hannon, D. Beach, and J. C. Barrett. 1996. "Involvement of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor P16 (INK4a) in Replicative Senescence of Normal Human Fibroblasts." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (24): 13742–47. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13742>.
3. Aubert, Geraldine, and Peter M. Lansdorp. 2008. "Telomeres and Aging." *Physiological Reviews* 88 (2): 557–79. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2007>.
4. Baar, Marjolein P., Renata M. C. Brandt, Diana A. Putavet, Julian D. D. Klein, Kasper W. J. Derks, Benjamin R. M. Bourgeois, Sarah Stryeck, i sur., 2017. "Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging." *Cell* 169 (1): 132–147.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.031>.
5. Baker, Darren J., Karthik B. Jeganathan, J. Douglas Cameron, Michael Thompson, Subhash Juneja, Alena Kopecka, Rajiv Kumar, i sur., 2004. "BubR1 Insufficiency Causes Early Onset of Aging-Associated Phenotypes and Infertility in Mice." *Nature Genetics* 36 (7): 744–49. <https://doi.org/10.1038/ng1382>.
6. Baker, Darren J., Tobias Wijshake, Tamar Tchkonina, Nathan K. LeBrasseur, Bennett G. Childs, Bart van de Sluis, James L. Kirkland, and Jan M. van Deursen. 2011. "Clearance of P16Ink4a-Positive Senescent Cells Delays Ageing-Associated Disorders." *Nature* 479 (7372): 232–36. <https://doi.org/10.1038/nature10600>.
7. Baker, H., and C. P. Blair. 1968. "Cell Replacement in the Human Stratum Corneum in Old Age." *The British Journal of Dermatology* 80 (6): 367–72. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1968.tb12322.x>.
8. Bártová, Eva, Soňa Legartová, Miroslav Dunder, and Jana Suchánková. 2019. "A Role of the 53BP1 Protein in Genome Protection: Structural and Functional Characteristics of 53BP1-Dependent DNA Repair." *Aging (Albany NY)* 11 (8): 2488–2511. <https://doi.org/10.18632/aging.101917>.
9. Barzilai, Nir, Jill P. Crandall, Stephen B. Kritchevsky, and Mark A. Espeland. 2016. "Metformin as a Tool to Target Aging." *Cell Metabolism* 23 (6): 1060–65. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.05.011>.
10. Basisty, Nathan, Abhijit Kale, Ok Hee Jeon, Chisaka Kuehnemann, Therese Payne, Chirag Rao, Anja Holtz, i sur., 2020. "A Proteomic Atlas of Senescence-Associated Secretomes for Aging Biomarker Development." *PLoS Biology* 18 (1): e3000599. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000599>.
11. Beauséjour, Christian M., Ana Krtolica, Francesco Galimi, Masashi Narita, Scott W. Lowe, Paul Yaswen, and Judith Campisi. 2003. "Reversal of Human Cellular Senescence: Roles of the P53 and P16 Pathways." *The EMBO Journal* 22 (16): 4212–22. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg417>.
12. Bellon, Marcia, and Christophe Nicot. 2008. "Regulation of Telomerase and Telomeres: Human Tumor Viruses Take Control." *Journal of the National Cancer Institute* 100 (2): 98–108. <https://doi.org/10.1093/jnci/djm269>.
13. Bernadotte, Alexandra, Victor M. Mikhelson, and Irina M. Spivak. 2016. "Markers of Cellular Senescence. Telomere Shortening as a Marker of Cellular Senescence." *Aging* 8 (1): 3–11. <https://doi.org/10.18632/aging.100871>.

14. Bernardes de Jesus, Bruno, Elsa Vera, Kerstin Schneeberger, Agueda M Tejera, Eduard Ayuso, Fatima Bosch, and Maria A Blasco. 2012. "Telomerase Gene Therapy in Adult and Old Mice Delays Aging and Increases Longevity without Increasing Cancer." *EMBO Molecular Medicine* 4 (8): 691–704. <https://doi.org/10.1002/emmm.201200245>.
15. Blair, Michael J., Jake D. Jones, Alan E. Woessner, and Kyle P. Quinn. 2020. "Skin Structure–Function Relationships and the Wound Healing Response to Intrinsic Aging." *Advances in Wound Care* 9 (3): 127–43. <https://doi.org/10.1089/wound.2019.1021>.
16. Bonifant, Hilary, and Samantha Holloway. 2019. "A Review of the Effects of Ageing on Skin Integrity and Wound Healing." *British Journal of Community Nursing* 24 (Sup3): S28–33. <https://doi.org/10.12968/bjcn.2019.24.Sup3.S28>.
17. Bonté, Frédéric, Dorothée Girard, Jean-Christophe Archambault, and Alexis Desmoulière. 2019. "Skin Changes During Ageing." *Sub-Cellular Biochemistry* 91: 249–80. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-3681-2\\_10](https://doi.org/10.1007/978-981-13-3681-2_10).
18. Boumendil, Charlene, Priya Hari, Karl C. F. Olsen, Juan Carlos Acosta, and Wendy A. Bickmore. 2019. "Nuclear Pore Density Controls Heterochromatin Reorganization during Senescence." *Genes & Development* 33 (3–4): 144–49. <https://doi.org/10.1101/gad.321117.118>.
19. Brack, Andrew S., Michael J. Conboy, Sudeep Roy, Mark Lee, Calvin J. Kuo, Charles Keller, and Thomas A. Rando. 2007. "Increased Wnt Signaling during Aging Alters Muscle Stem Cell Fate and Increases Fibrosis." *Science (New York, N.Y.)* 317 (5839): 807–10. <https://doi.org/10.1126/science.1144090>.
20. Bragulla, Hermann H, and Dominique G Homberger. 2009. "Structure and Functions of Keratin Proteins in Simple, Stratified, Keratinized and Cornified Epithelia." *Journal of Anatomy* 214 (4): 516–59. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01066.x>.
21. Bruno, Samantha, Andrea Ghelli Luserna di Rorà, Roberta Napolitano, Simona Soverini, Giovanni Martinelli, and Giorgia Simonetti. 2022. "CDC20 in and out of Mitosis: A Prognostic Factor and Therapeutic Target in Hematological Malignancies." *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 41 (1): 159. <https://doi.org/10.1186/s13046-022-02363-9>.
22. Bukhari, Syed Nasir Abbas, Nur Liyana Roswandi, Muhammad Waqas, Haroon Habib, Fahad Hussain, Shahzeb Khan, Muhammad Sohail, Nor Amlizan Ramli, Hnin Ei Thu, and Zahid Hussain. 2018. "Hyaluronic Acid, a Promising Skin Rejuvenating Biomedicine: A Review of Recent Updates and Pre-Clinical and Clinical Investigations on Cosmetic and Nutricosmetic Effects." *International Journal of Biological Macromolecules* 120 (Pt B): 1682–95. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.188>.
23. Burton, Dominick G. A., and Valery Krizhanovsky. 2014. "Physiological and Pathological Consequences of Cellular Senescence." *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 71 (22): 4373–86. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1691-3>.
24. Button, Lucy, Bryony Rogers, Emily Thomas, Alice Bradfield, Rafah Alnafakh, Josephine Drury, and Dharani K. Hapangama. 2022. "Telomere and Telomerase-Associated Proteins in Endometrial Carcinogenesis and Cancer-Associated Survival." *International Journal of Molecular Sciences* 23 (2): 626. <https://doi.org/10.3390/ijms23020626>.
25. Campbell, Jared M., Susan M. Bellman, Matthew D. Stephenson, and Karolina Lisy. 2017. "Metformin Reduces All-Cause Mortality and Diseases of Ageing Independent of Its Effect on Diabetes Control: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Ageing Research Reviews* 40 (November): 31–44. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.08.003>.

26. Campisi, J. 1996. "Replicative Senescence: An Old Lives' Tale?" *Cell* 84 (4): 497–500. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81023-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81023-5).
27. Campisi, J. 1997. "The Biology of Replicative Senescence." *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 33 (5): 703–9. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(96\)00058-5](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(96)00058-5).
28. Chang, Jianhui, Yingying Wang, Lijian Shao, Remi-Martin Laberge, Marco Demaria, Judith Campisi, Krishnamurthy Janakiraman, i sur., 2016. "Clearance of Senescent Cells by ABT263 Rejuvenates Aged Hematopoietic Stem Cells in Mice." *Nature Medicine* 22 (1): 78–83. <https://doi.org/10.1038/nm.4010>.
29. Chen, Jichun. 2004. "Senescence and Functional Failure in Hematopoietic Stem Cells." *Experimental Hematology* 32 (11): 1025–32. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2004.08.001>.
30. Childs, Bennett G., Darren J. Baker, James L. Kirkland, Judith Campisi, and Jan M. van Deursen. 2014. "Senescence and Apoptosis: Dueling or Complementary Cell Fates?" *EMBO Reports* 15 (11): 1139–53. <https://doi.org/10.15252/embr.201439245>.
31. Childs, Bennett G., Martina Gluscevic, Darren J. Baker, Remi-Martin Laberge, Dan Marquess, Jamie Dananberg, and Jan M. van Deursen. 2017. "Senescent Cells: An Emerging Target for Diseases of Ageing." *Nature Reviews. Drug Discovery* 16 (10): 718–35. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.116>.
32. Christensen, Kaare, Gabriele Doblhammer, Roland Rau, and James W. Vaupel. 2009. "Ageing Populations: The Challenges Ahead." *Lancet (London, England)* 374 (9696): 1196–1208. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61460-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61460-4).
33. Cohen, Stanley, Eric Hurd, John Cush, Michael Schiff, Michael E. Weinblatt, Larry W. Moreland, Joel Kremer, Moraye B. Bear, William J. Rich, and Dorothy McCabe. 2002. "Treatment of Rheumatoid Arthritis with Anakinra, a Recombinant Human Interleukin-1 Receptor Antagonist, in Combination with Methotrexate: Results of a Twenty-Four-Week, Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial." *Arthritis and Rheumatism* 46 (3): 614–24. <https://doi.org/10.1002/art.10141>.
34. Cole, Megan A., Taihao Quan, John J. Voorhees, and Gary J. Fisher. 2018. "Extracellular Matrix Regulation of Fibroblast Function: Redefining Our Perspective on Skin Aging." *Journal of Cell Communication and Signaling* 12 (1): 35–43. <https://doi.org/10.1007/s12079-018-0459-1>.
35. Collins, Kathleen, and James R. Mitchell. 2002. "Telomerase in the Human Organism." *Oncogene* 21 (4): 564–79. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205083>.
36. Conboy, Irina M., Michael J. Conboy, Amy J. Wagers, Eric R. Girma, Irving L. Weissman, and Thomas A. Rando. 2005. "Rejuvenation of Aged Progenitor Cells by Exposure to a Young Systemic Environment." *Nature* 433 (7027): 760–64. <https://doi.org/10.1038/nature03260>.
37. Coppé, Jean-Philippe, Pierre-Yves Desprez, Ana Krtolica, and Judith Campisi. 2010. "The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression." *Annual Review of Pathology* 5: 99–118. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102144>.
38. Coppé, Jean-Philippe, Christopher K Patil, Francis Rodier, Yu Sun, Denise P Muñoz, Joshua Goldstein, Peter S Nelson, Pierre-Yves Desprez, and Judith Campisi. 2008. "Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the P53 Tumor Suppressor." *PLoS Biology* 6 (12): e301. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060301>.
39. Courtois-Cox, S., S. L. Jones, and K. Cichowski. 2008. "Many Roads Lead to Oncogene-Induced Senescence." *Oncogene* 27 (20): 2801–9. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210950>.

40. Cursiefen, Claus, Lu Chen, Leonardo P. Borges, David Jackson, Jingtai Cao, Czeslaw Radziejewski, Patricia A. D'Amore, M. Reza Dana, Stanley J. Wiegand, and J. Wayne Streilein. 2004. "VEGF-A Stimulates Lymphangiogenesis and Hemangiogenesis in Inflammatory Neovascularization via Macrophage Recruitment." *Journal of Clinical Investigation* 113 (7): 1040–50. <https://doi.org/10.1172/JCI200420465>.
41. De Cecco, Marco, Jessie Jeyapalan, Xiaoi Zhao, Mimi Tamamori-Adachi, and John M. Sedivy. 2011. "Nuclear Protein Accumulation in Cellular Senescence and Organismal Aging Revealed with a Novel Single-Cell Resolution Fluorescence Microscopy Assay." *Aging (Albany NY)* 3 (10): 955–67.
42. Debaq-Chainiaux, Florence, Jorge D. Erusalimsky, Judith Campisi, and Olivier Toussaint. 2009. "Protocols to Detect Senescence-Associated Beta-Galactosidase (SA-Betagal) Activity, a Biomarker of Senescent Cells in Culture and in Vivo." *Nature Protocols* 4 (12): 1798–1806. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.191>.
43. Demaria, Marco, Naoko Ohtani, Sameh A. Youssef, Francis Rodier, Wendy Toussaint, James R. Mitchell, Remi-Martin Laberge, i sur., 2014. "An Essential Role for Senescent Cells in Optimal Wound Healing through Secretion of PDGF-AA." *Developmental Cell* 31 (6): 722–33. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.11.012>.
44. Deursen, Jan M. van. 2014. "The Role of Senescent Cells in Ageing." *Nature* 509 (7501): 439–46. <https://doi.org/10.1038/nature13193>.
45. Di Micco, Raffaella, Marzia Fumagalli, Angelo Cicalese, Sara Piccinin, Patrizia Gasparini, Chiara Luise, Catherine Schurra, i sur., 2006. "Oncogene-Induced Senescence Is a DNA Damage Response Triggered by DNA Hyper-Replication." *Nature* 444 (7119): 638–42. <https://doi.org/10.1038/nature05327>.
46. Di Micco, Raffaella, Valery Krizhanovsky, Darren Baker, and Fabrizio d'Adda di Fagagna. 2021. "Cellular Senescence in Ageing: From Mechanisms to Therapeutic Opportunities." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 22 (2): 75–95. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00314-w>.
47. Di Micco, Raffaella, Gabriele Sulli, Miryana Dobrova, Michalis Liontos, Oronza A. Botrugno, Gaetano Gargiulo, Roberto dal Zuffo, i sur., 2011. "Interplay between Oncogene-Induced DNA Damage Response and Heterochromatin in Senescence and Cancer." *Nature Cell Biology* 13 (3): 292–302. <https://doi.org/10.1038/ncb2170>.
48. Di Paolo, Caitlin T., Eleftherios P. Diamandis, and Ioannis Prassas. 2021. "The Role of Kallikreins in Inflammatory Skin Disorders and Their Potential as Therapeutic Targets." *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 58 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1080/10408363.2020.1775171>.
49. Dimri, G P, X Lee, G Basile, M Acosta, G Scott, C Roskelley, E E Medrano, M Linskens, I Rubelj, and O Pereira-Smith. 1995. "A Biomarker That Identifies Senescent Human Cells in Culture and in Aging Skin in Vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (20): 9363–67.
50. Diril, M. Kasim, Chandrahas Koumar Ratnacaram, V. C. Padmakumar, Tiehua Du, Martin Wasser, Vincenzo Coppola, Lino Tessarollo, and Philipp Kaldis. 2012. "Cyclin-Dependent Kinase 1 (Cdk1) Is Essential for Cell Division and Suppression of DNA Re-Replication but Not for Liver Regeneration." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (10): 3826–31. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115201109>.
51. Dulić, V., G. E. Beney, G. Frebourg, L. F. Drullinger, and G. H. Stein. 2000. "Uncoupling between Phenotypic Senescence and Cell Cycle Arrest in Aging P21-Deficient Fibroblasts."

- Molecular and Cellular Biology* 20 (18): 6741–54. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.18.6741-6754.2000>.
52. Emery, P., E. Keystone, H. P. Tony, A. Cantagrel, R. van Vollenhoven, A. Sanchez, E. Alecock, J. Lee, and J. Kremer. 2008. “IL-6 Receptor Inhibition with Tocilizumab Improves Treatment Outcomes in Patients with Rheumatoid Arthritis Refractory to Anti-Tumour Necrosis Factor Biologicals: Results from a 24-Week Multicentre Randomised Placebo-Controlled Trial.” *Annals of the Rheumatic Diseases* 67 (11): 1516–23. <https://doi.org/10.1136/ard.2008.092932>.
  53. Eren, Mesut, Amanda E. Boe, Sheila B. Murphy, Aaron T. Place, Varun Nagpal, Luisa Morales-Nebreda, Daniela Urich, i sur., 2014. “PAI-1-Regulated Extracellular Proteolysis Governs Senescence and Survival in Klotho Mice.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (19): 7090–95. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321942111>.
  54. Fagagna, Fabrizio d’Adda di, Philip M. Reaper, Lorena Clay-Farrace, Heike Fiegler, Philippa Carr, Thomas Von Zglinicki, Gabriele Saretzki, Nigel P. Carter, and Stephen P. Jackson. 2003. “A DNA Damage Checkpoint Response in Telomere-Initiated Senescence.” *Nature* 426 (6963): 194–98. <https://doi.org/10.1038/nature02118>.
  55. Faggioli, Francesca, Tao Wang, Jan Vijg, and Cristina Montagna. 2012. “Chromosome-Specific Accumulation of Aneuploidy in the Aging Mouse Brain.” *Human Molecular Genetics* 21 (24): 5246–53. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds375>.
  56. Fenske, N. A., and C. W. Lober. 1986. “Structural and Functional Changes of Normal Aging Skin.” *Journal of the American Academy of Dermatology* 15 (4 Pt 1): 571–85. [https://doi.org/10.1016/s0190-9622\(86\)70208-9](https://doi.org/10.1016/s0190-9622(86)70208-9).
  57. Flores, Ignacio, Andres Canela, Elsa Vera, Agueda Tejera, George Cotsarelis, and María A. Blasco. 2008. “The Longest Telomeres: A General Signature of Adult Stem Cell Compartments.” *Genes & Development* 22 (5): 654–67. <https://doi.org/10.1101/gad.451008>.
  58. Fontana, Luigi, Brian K. Kennedy, Valter D. Longo, Douglas Seals, and Simon Melov. 2014. “Medical Research: Treat Ageing.” *Nature* 511 (7510): 405–7. <https://doi.org/10.1038/511405a>.
  59. Franceschi, C., M. Bonafè, S. Valensin, F. Olivieri, M. De Luca, E. Ottaviani, and G. De Benedictis. 2000. “Inflamm-Aging. An Evolutionary Perspective on Immunosenescence.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 908 (June): 244–54. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x>.
  60. Franco, Ana Catarina, Célia Aveleira, and Cláudia Cavadas. 2022. “Skin Senescence: Mechanisms and Impact on Whole-Body Aging.” *Trends in Molecular Medicine* 28 (2): 97–109. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2021.12.003>.
  61. Freund, Adam, Arturo V. Orjalo, Pierre-Yves Desprez, and Judith Campisi. 2010. “Inflammatory Networks during Cellular Senescence: Causes and Consequences.” *Trends in Molecular Medicine* 16 (5): 238–46. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.03.003>.
  62. Fumagalli, Marzia, Francesca Rossiello, Chiara Mondello, and Fabrizio d’Adda di Fagagna. 2014. “Stable Cellular Senescence Is Associated with Persistent DDR Activation.” *PLoS ONE* 9 (10): e110969. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110969>.
  63. Funk, W. D., C. K. Wang, D. N. Shelton, C. B. Harley, G. D. Pagon, and W. K. Hoeffler. 2000. “Telomerase Expression Restores Dermal Integrity to in Vitro-Aged Fibroblasts in a Reconstituted Skin Model.” *Experimental Cell Research* 258 (2): 270–78. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.4945>.

64. Gambarotta, Giovanna, Federica Fregnan, Sara Gnani, and Isabelle Perroteau. 2013. "Chapter Nine - Neuregulin 1 Role in Schwann Cell Regulation and Potential Applications to Promote Peripheral Nerve Regeneration." In *International Review of Neurobiology*, edited by Stefano Geuna, Isabelle Perroteau, Pierluigi Tos, and Bruno Battiston, 108:223–56. Tissue Engineering of the Peripheral Nerve: Stem Cells and Regeneration Promoting Factors. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410499-0.00009-5>.
65. Garinis, George A., Gijsbertus T. J. van der Horst, Jan Vijg, and Jan H. J. Hoeijmakers. 2008. "DNA Damage and Ageing: New-Age Ideas for an Age-Old Problem." *Nature Cell Biology* 10 (11): 1241–47. <https://doi.org/10.1038/ncb1108-1241>.
66. Gilchrist, B. A., F. B. Blog, and G. Szabo. 1979. "Effects of Aging and Chronic Sun Exposure on Melanocytes in Human Skin." *The Journal of Investigative Dermatology* 73 (2): 141–43. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12581580>.
67. Gilhar, A., S. Ish-Shalom, T. Pillar, A. Etzioni, and M. Silbermann. 1994. "Effect of Antiinsulin-like Growth Factor 1 on Epidermal Proliferation of Human Skin Transplanted onto Nude Mice Treated with Growth Hormone." *Endocrinology* 134 (1): 229–32. <https://doi.org/10.1210/endo.134.1.8275938>.
68. Gilhar, A., T. Pillar, and M. David. 1991. "Aged versus Young Skin before and after Transplantation onto Nude Mice." *The British Journal of Dermatology* 124 (2): 168–71. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1991.tb00427.x>.
69. Gilhar, A., T. Pillar, and A. Etzioni. 1995. "Possible Role of Cytokines in Cellular Proliferation of the Skin Transplanted onto Nude Mice." *Archives of Dermatology* 131 (1): 38–42.
70. Gniadecka, M., R. Gniadecki, J. Serup, and J. Søndergaard. 1994. "Ultrasound Structure and Digital Image Analysis of the Subepidermal Low Echogenic Band in Aged Human Skin: Diurnal Changes and Interindividual Variability." *The Journal of Investigative Dermatology* 102 (3): 362–65. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12371796>.
71. Greider, Carol W., and Elizabeth H. Blackburn. 1989. "A Telomeric Sequence in the RNA of Tetrahymena Telomerase Required for Telomere Repeat Synthesis." *Nature* 337 (6205): 331–37. <https://doi.org/10.1038/337331a0>.
72. Gu, Liubao, and Masanori Kitamura. 2012. "Sensitive Detection and Monitoring of Senescence-Associated Secretory Phenotype by SASP-RAP Assay." *PloS One* 7 (12): e52305. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052305>.
73. Guerra, Carmen, Nieves Mijimolle, Alma Dhawahir, Pierre Dubus, Marta Barradas, Manuel Serrano, Victoria Campuzano, and Mariano Barbacid. 2003. "Tumor Induction by an Endogenous K-Ras Oncogene Is Highly Dependent on Cellular Context." *Cancer Cell* 4 (2): 111–20. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(03\)00191-0](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(03)00191-0).
74. Gunin, G., N. K. Kornilova, V. V. Petrov, and O. V. Vasilyeva. 2011. "Age Changes in the Number and Proliferation of Fibroblasts in the Human Skin." *Advances in Gerontology* 1 (4): 299–303. <https://doi.org/10.1134/S2079057011040059>.
75. Guo, Xiaolan, Yibin Deng, Yahong Lin, Wilfredo Cosme-Blanco, Suzanne Chan, Hua He, Guohua Yuan, Eric J Brown, and Sandy Chang. 2007. "Dysfunctional Telomeres Activate an ATM-ATR-Dependent DNA Damage Response to Suppress Tumorigenesis." *The EMBO Journal* 26 (22): 4709–19. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601893>.
76. Hall, Brandon M., Vitaly Balan, Anatoli S. Gleiberman, Evguenia Strom, Peter Krasnov, Lauren P. Virtuoso, Elena Rydkina, et al., 2017. "P16(Ink4a) and Senescence-Associated  $\beta$ -Galactosidase Can Be Induced in Macrophages as Part of a Reversible Response to Physiological Stimuli." *Aging* 9 (8): 1867–84. <https://doi.org/10.18632/aging.101268>.

77. Hamsanathan, Shruthi, and Aditi U. Gurkar. 2022. "Lipids as Regulators of Cellular Senescence." *Frontiers in Physiology* 13: 796850. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.796850>.
78. Harley, C. B., A. B. Futcher, and C. W. Greider. 1990. "Telomeres Shorten during Ageing of Human Fibroblasts." *Nature* 345 (6274): 458–60. <https://doi.org/10.1038/345458a0>.
79. Harley, Calvin B. 2002. "Telomerase Is Not an Oncogene." *Oncogene* 21 (4): 494–502. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205076>.
80. Hayflick, L., and P. S. Moorhead. 1961. "The Serial Cultivation of Human Diploid Cell Strains." *Experimental Cell Research* 25 (December): 585–621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6).
81. Hemann, M. T., M. A. Strong, L. Y. Hao, and C. W. Greider. 2001. "The Shortest Telomere, Not Average Telomere Length, Is Critical for Cell Viability and Chromosome Stability." *Cell* 107 (1): 67–77. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00504-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00504-9).
82. Herbig, Utz, Wendy A. Jobling, Benjamin P. C. Chen, David J. Chen, and John M. Sedivy. 2004. "Telomere Shortening Triggers Senescence of Human Cells through a Pathway Involving ATM, P53, and P21(CIP1), but Not P16(INK4a)." *Molecular Cell* 14 (4): 501–13. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(04\)00256-4](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(04)00256-4).
83. Hernandez-Segura, Alejandra, Jamil Nehme, and Marco Demaria. 2018. "Hallmarks of Cellular Senescence." *Trends in Cell Biology* 28 (6): 436–53. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.001>.
84. Herranz, Nicolás, Suchira Gallage, Massimiliano Mellone, Torsten Wuestefeld, Sabrina Klotz, Christopher J. Hanley, Selina Raguz, i sur., 2015. "MTOR Regulates MAPKAPK2 Translation to Control the Senescence-Associated Secretory Phenotype." *Nature Cell Biology* 17 (9): 1205–17. <https://doi.org/10.1038/ncb3225>.
85. Hickson, LaTonya J., Larissa G. P. Langhi Prata, Shane A. Bobart, Tamara K. Evans, Nino Giorgadze, Shahrukh K. Hashmi, Sandra M. Herrmann, i sur., 2019. "Senolytics Decrease Senescent Cells in Humans: Preliminary Report from a Clinical Trial of Dasatinib plus Quercetin in Individuals with Diabetic Kidney Disease." *EBioMedicine* 47 (September): 446–56. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.08.069>.
86. Hoffman, Hal M., Martin L. Throne, N. J. Amar, Mohamed Sebai, Alan J. Kivitz, Arthur Kavanaugh, Steven P. Weinstein, i sur., 2008. "Efficacy and Safety of Riloncept (Interleukin-1 Trap) in Patients with Cryopyrin-Associated Periodic Syndromes: Results from Two Sequential Placebo-Controlled Studies." *Arthritis and Rheumatism* 58 (8): 2443–52. <https://doi.org/10.1002/art.23687>.
87. Hubackova, Sona, Eliska Davidova, Katerina Rohlenova, Jan Stursa, Lukas Werner, Ladislav Andera, LanFeng Dong, i sur., 2019. "Selective Elimination of Senescent Cells by Mitochondrial Targeting Is Regulated by ANT2." *Cell Death and Differentiation* 26 (2): 276–90. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0118-3>.
88. Huggins, Christopher J., Radek Malik, Sook Lee, Jacqueline Salotti, Sara Thomas, Nancy Martin, Octavio A. Quiñones, i sur., 2013. "C/EBP $\gamma$  Suppresses Senescence and Inflammatory Gene Expression by Heterodimerizing with C/EBP $\beta$ ." *Molecular and Cellular Biology* 33 (16): 3242–58. <https://doi.org/10.1128/MCB.01674-12>.
89. Jares, Pedro, Anne Donaldson, and J. Julian Blow. 2000. "The Cdc7/Dbf4 Protein Kinase: Target of the S Phase Checkpoint?" *EMBO Reports* 1 (4): 319–22. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvd076>.
90. Jeon, Ok Hee, Chaekyu Kim, Remi-Martin Laberge, Marco Demaria, Sona Rathod, Alain P. Vasserot, Jae Wook Chung, i sur., 2017. "Local Clearance of Senescent Cells Attenuates the

- Development of Post-Traumatic Osteoarthritis and Creates a pro-Regenerative Environment.” *Nature Medicine* 23 (6): 775–81. <https://doi.org/10.1038/nm.4324>.
91. Jiang, X. R., G. Jimenez, E. Chang, M. Frolkis, B. Kusler, M. Sage, M. Beeche, i sur., 1999. “Telomerase Expression in Human Somatic Cells Does Not Induce Changes Associated with a Transformed Phenotype.” *Nature Genetics* 21 (1): 111–14. <https://doi.org/10.1038/5056>.
  92. Justice, Jamie N., Anoop M. Nambiar, Tamar Tchkonja, Nathan K. LeBrasseur, Rodolfo Pascual, Shahrukh K. Hashmi, Larissa Prata, i sur., 2019. “Senolytics in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Results from a First-in-Human, Open-Label, Pilot Study.” *EBioMedicine* 40 (February): 554–63. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.12.052>.
  93. Kang, Hyun Tae, Joon Tae Park, Kobong Choi, Yongsub Kim, Hyo Jei Claudia Choi, Chul Won Jung, Young-Sam Lee, and Sang Chul Park. 2017. “Chemical Screening Identifies ATM as a Target for Alleviating Senescence.” *Nature Chemical Biology* 13 (6): 616–23. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2342>.
  94. Kang, Tae-Won, Tetyana Yevsa, Norman Woller, Lisa Hoenicke, Torsten Wuestefeld, Daniel Dauch, Anja Hohmeyer, i sur., 2011. “Senescence Surveillance of Pre-Malignant Hepatocytes Limits Liver Cancer Development.” *Nature* 479 (7374): 547–51. <https://doi.org/10.1038/nature10599>.
  95. Karkera, Jayaprakash, Hannes Steiner, Weimin Li, Viktor Skradski, Patrizia L. Moser, Sabine Riethdorf, Manjula Reddy, i sur., 2011. “The Anti-Interleukin-6 Antibody Siltuximab down-Regulates Genes Implicated in Tumorigenesis in Prostate Cancer Patients from a Phase I Study.” *The Prostate* 71 (13): 1455–65. <https://doi.org/10.1002/pros.21362>.
  96. Khalid, Kamarul Ariffin, Ahmad Faris Mohd Nawawi, Nuraqilah Zulkifli, Md Abul Barkat, and Hazrina Hadi. 2022. “Aging and Wound Healing of the Skin: A Review of Clinical and Pathophysiological Hallmarks.” *Life (Basel, Switzerland)* 12 (12): 2142. <https://doi.org/10.3390/life12122142>.
  97. Khalil, Roula, Mona Diab-Assaf, and Jean-Marc Lemaitre. 2023. “Emerging Therapeutic Approaches to Target the Dark Side of Senescent Cells: New Hopes to Treat Aging as a Disease and to Delay Age-Related Pathologies.” *Cells* 12 (6): 915. <https://doi.org/10.3390/cells12060915>.
  98. Khan, Sadiya S., Sanjiv J. Shah, Ekaterina Klyachko, Abigail S. Baldrige, Mesut Eren, Aaron T. Place, Abraham Aviv, i sur., 2017. “A Null Mutation in SERPINE1 Protects against Biological Aging in Humans.” *Science Advances* 3 (11): eaao1617. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aao1617>.
  99. Kim, Jin Cheol, Tae Jun Park, and Hee Young Kang. 2022. “Skin-Aging Pigmentation: Who Is the Real Enemy?” *Cells* 11 (16): 2541. <https://doi.org/10.3390/cells11162541>.
  100. Kirschner, Kristina, Shamith A. Samarajiva, Jonathan M. Cairns, Suraj Menon, Pedro A. Pérez-Mancera, Kosuke Tomimatsu, Camino Bermejo-Rodriguez, i sur., 2015. “Phenotype Specific Analyses Reveal Distinct Regulatory Mechanism for Chronically Activated P53.” *PLoS Genetics* 11 (3): e1005053. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005053>.
  101. Klareskog, Lars, Désirée van der Heijde, Julien P de Jager, Andrew Gough, Joachim Kalden, Michel Malaise, Emilio Martín Mola, i sur., 2004. “Therapeutic Effect of the Combination of Etanercept and Methotrexate Compared with Each Treatment Alone in Patients with Rheumatoid Arthritis: Double-Blind Randomised Controlled Trial.” *The Lancet* 363 (9410): 675–81. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)15640-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15640-7).
  102. Krishnamurthy, Janakiraman, Chad Torrice, Matthew R. Ramsey, Grigoriy I. Kovalev, Khalid Al-Regaiey, Lishan Su, and Norman E. Sharpless. 2004. “Ink4a/Arf Expression Is a



- Biomarker of Aging.” *The Journal of Clinical Investigation* 114 (9): 1299–1307. <https://doi.org/10.1172/JCI22475>.
103. Krtolica, Ana, Nick Larocque, Olga Genbacev, Dusko Ilic, Jean-Philippe Coppe, Christopher K. Patil, Tamara Zdravkovic, Michael McMaster, Judith Campisi, and Susan J. Fisher. 2011. “GRO $\alpha$  Regulates Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal or Adoption of a Neuronal Fate.” *Differentiation; Research in Biological Diversity* 81 (4): 222–32. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2011.01.001>.
  104. Kuemmerle-Deschner, Jasmin B., Eduardo Ramos, Norbert Blank, Joachim Roesler, Sandra D. Felix, Thomas Jung, Kirstin Stricker, i sur., 2011. “Canakinumab (ACZ885, a Fully Human IgG1 Anti-IL-1 $\beta$  MAb) Induces Sustained Remission in Pediatric Patients with Cryopyrin-Associated Periodic Syndrome (CAPS).” *Arthritis Research & Therapy* 13 (1): R34. <https://doi.org/10.1186/ar3266>.
  105. Laberge, Remi-Martin, Lili Zhou, Melissa R. Sarantos, Francis Rodier, Adam Freund, Peter L. J. de Keizer, Su Liu, i sur., 2012. “Glucocorticoids Suppress Selected Components of the Senescence-Associated Secretory Phenotype.” *Aging Cell* 11 (4): 569–78. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00818.x>.
  106. Lange, Titia de. 2005. “Shelterin: The Protein Complex That Shapes and Safeguards Human Telomeres.” *Genes & Development* 19 (18): 2100–2110. <https://doi.org/10.1101/gad.1346005>.
  107. Langton, A. K., M. J. Sherratt, C. E. M. Griffiths, and R. E. B. Watson. 2010. “A New Wrinkle on Old Skin: The Role of Elastic Fibres in Skin Ageing.” *International Journal of Cosmetic Science* 32 (5): 330–39. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2010.00574.x>.
  108. Lavker, R. M., P. S. Zheng, and G. Dong. 1987. “Aged Skin: A Study by Light, Transmission Electron, and Scanning Electron Microscopy.” *The Journal of Investigative Dermatology* 88 (3 Suppl): 44s–51s. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12468934>.
  109. Lee, Cody S., Elliot S. Bishop, Ruyi Zhang, Xinyi Yu, Evan M. Farina, Shujuan Yan, Chen Zhao, i sur., 2017. “Adenovirus-Mediated Gene Delivery: Potential Applications for Gene and Cell-Based Therapies in the New Era of Personalized Medicine.” *Genes & Diseases* 4 (2): 43–63. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2017.04.001>.
  110. Lee, Dong Hun, Jang-Hee Oh, and Jin Ho Chung. 2016. “Glycosaminoglycan and Proteoglycan in Skin Aging.” *Journal of Dermatological Science* 83 (3): 174–81. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2016.05.016>.
  111. Levy, M. Z., R. C. Allsopp, A. B. Futcher, C. W. Greider, and C. B. Harley. 1992. “Telomere End-Replication Problem and Cell Aging.” *Journal of Molecular Biology* 225 (4): 951–60. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90096-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90096-3).
  112. Li, Ping, Libin Zhou, Ting Zhao, Xiongxiang Liu, Pengcheng Zhang, Yan Liu, Xiaogang Zheng, and Qiang Li. 2017. “Caspase-9: Structure, Mechanisms and Clinical Application.” *Oncotarget* 8 (14): 23996–8. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15098>.
  113. Li, Wen, Yonghan He, Rongping Zhang, Guangrong Zheng, and Daohong Zhou. 2019. “The Curcumin Analog EF24 Is a Novel Senolytic Agent.” *Aging (Albany NY)* 11 (2): 771–82. <https://doi.org/10.18632/aging.101787>.
  114. Li, Yanran, Qiyuan Yang, Dongjie Cai, Hongrui Guo, Jing Fang, Hengmin Cui, Liping Gou, Junliang Deng, Zhisheng Wang, and Zhicai Zuo. 2021. “Resistin, a Novel Host Defense Peptide of Innate Immunity.” *Frontiers in Immunology* 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.699807>.
  115. Lim, Hyun, Haeil Park, and Hyun Pyo Kim. 2015. “Effects of Flavonoids on Senescence-Associated Secretory Phenotype Formation from Bleomycin-Induced Senescence in BJ

- Fibroblasts.” *Biochemical Pharmacology* 96 (4): 337–48. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.06.013>.
116. Limbert, Georges, Marc A. Masen, Damien Pond, Helen K. Graham, Michael J. Sherratt, Rikeen Jobanputra, and Andrew McBride. 2019. “Biotribology of the Ageing Skin—Why We Should Care.” *Biotribology* 17 (March): 75–90. <https://doi.org/10.1016/j.biotri.2019.03.001>.
  117. Liu, J. P. 1999. “Studies of the Molecular Mechanisms in the Regulation of Telomerase Activity.” *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13 (15): 2091–2104. <https://doi.org/10.1096/fasebj.13.15.2091>.
  118. Liu, Su, Harpreet Uppal, Marco Demaria, Pierre-Yves Desprez, Judith Campisi, and Pankaj Kapahi. 2015. “Simvastatin Suppresses Breast Cancer Cell Proliferation Induced by Senescent Cells.” *Scientific Reports* 5 (1): 17895. <https://doi.org/10.1038/srep17895>.
  119. Lopes-Paciencia, Stéphane, Emmanuelle Saint-Germain, Marie-Camille Rowell, Ana Fernández Ruiz, Paloma Kalegari, and Gerardo Ferbeyre. 2019. “The Senescence-Associated Secretory Phenotype and Its Regulation.” *Cytokine* 117 (May): 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.01.013>.
  120. Malaquin, Nicolas, Aurélie Martinez, and Francis Rodier. 2016. “Keeping the Senescence Secretome under Control: Molecular Reins on the Senescence-Associated Secretory Phenotype.” *Experimental Gerontology* 82 (September): 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.05.010>.
  121. Martin-Montalvo, Alejandro, Evi M. Mercken, Sarah J. Mitchell, Hector H. Palacios, Patricia L. Mote, Morten Scheibye-Knudsen, Ana P. Gomes, et al., 2013. “Metformin Improves Healthspan and Lifespan in Mice.” *Nature Communications* 4: 2192. <https://doi.org/10.1038/ncomms3192>.
  122. Maruthur, Nisa M., Eva Tseng, Susan Hutfless, Lisa M. Wilson, Catalina Suarez-Cuervo, Zackary Berger, Yue Chu, Emmanuel Iyoha, Jodi B. Segal, and Shari Bolen. 2016. “Diabetes Medications as Monotherapy or Metformin-Based Combination Therapy for Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis.” *Annals of Internal Medicine* 164 (11): 740–51. <https://doi.org/10.7326/M15-2650>.
  123. Mathew-Steiner, Shomita S., Sashwati Roy, and Chandan K. Sen. 2021. “Collagen in Wound Healing.” *Bioengineering (Basel, Switzerland)* 8 (5): 63. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8050063>.
  124. Mittereder, N., K. L. March, and B. C. Trapnell. 1996. “Evaluation of the Concentration and Bioactivity of Adenovirus Vectors for Gene Therapy.” *Journal of Virology* 70 (11): 7498–7509. <https://doi.org/10.1128/JVI.70.11.7498-7509.1996>.
  125. Moiseeva, Olga, Xavier Deschênes-Simard, Emmanuelle St-Germain, Sebastian Igelmann, Geneviève Huot, Alexandra E. Cadar, Véronique Bourdeau, Michael N. Pollak, and Gerardo Ferbeyre. 2013. “Metformin Inhibits the Senescence-Associated Secretory Phenotype by Interfering with IKK/NF- $\kappa$ B Activation.” *Aging Cell* 12 (3): 489–98. <https://doi.org/10.1111/accel.12075>.
  126. Morales, C. P., S. E. Holt, M. Ouellette, K. J. Kaur, Y. Yan, K. S. Wilson, M. A. White, W. E. Wright, and J. W. Shay. 1999. “Absence of Cancer-Associated Changes in Human Fibroblasts Immortalized with Telomerase.” *Nature Genetics* 21 (1): 115–18. <https://doi.org/10.1038/5063>.
  127. Moyzis, R. K., J. M. Buckingham, L. S. Cram, M. Dani, L. L. Deaven, M. D. Jones, J. Meyne, R. L. Ratliff, and J. R. Wu. 1988. “A Highly Conserved Repetitive DNA Sequence, (TTAGGG) $_n$ , Present at the Telomeres of Human Chromosomes.” *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (18): 6622–26. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.18.6622>.
128. Muñoz-Espín, Daniel, Marta Cañamero, Antonio Maraver, Gonzalo Gómez-López, Julio Contreras, Silvia Murillo-Cuesta, Alfonso Rodríguez-Baeza, i sur., 2013. “Programmed Cell Senescence during Mammalian Embryonic Development.” *Cell* 155 (5): 1104–18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.019>.
  129. Muñoz-Espín, Daniel, and Manuel Serrano. 2014. “Cellular Senescence: From Physiology to Pathology.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15 (7): 482–96. <https://doi.org/10.1038/nrm3823>.
  130. Muruve, Daniel A. 2004. “The Innate Immune Response to Adenovirus Vectors.” *Human Gene Therapy* 15 (12): 1157–66. <https://doi.org/10.1089/hum.2004.15.1157>.
  131. Nanić, Lucia, Andrea Cedilak, Nikolina Škrobot Vidaček, Florian Gruber, Miljenko Huzak, Michael Bader, and Ivica Rubelj. 2022. “In Vivo Skin Regeneration and Wound Healing Using Cell Micro-Transplantation.” *Pharmaceutics* 14 (9): 1955. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091955>.
  132. Narzt, Marie-Sophie, Vera Pils, Christopher Kreamlehner, Ionela-Mariana Nagelreiter, Markus Schosserer, Emilia Bessonova, Alina Bayer, i sur., 2021. “Epilipidomics of Senescent Dermal Fibroblasts Identify Lysophosphatidylcholines as Pleiotropic Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) Factors.” *The Journal of Investigative Dermatology* 141 (4S): 993–1006.e15. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.11.020>.
  133. Naylor, Elizabeth C., Rachel E. B. Watson, and Michael J. Sherratt. 2011. “Molecular Aspects of Skin Ageing.” *Maturitas* 69 (3): 249–56. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2011.04.011>.
  134. Nelson, Glyn, James Wordsworth, Chunfang Wang, Diana Jurk, Conor Lawless, Carmen Martin-Ruiz, and Thomas von Zglinicki. 2012. “A Senescent Cell Bystander Effect: Senescence-Induced Senescence.” *Aging Cell* 11 (2): 345–49. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00795.x>.
  135. Nikolich-Zugich, Janko. 2008. “Ageing and Life-Long Maintenance of T-Cell Subsets in the Face of Latent Persistent Infections.” *Nature Reviews. Immunology* 8 (7): 512–22. <https://doi.org/10.1038/nri2318>.
  136. Noren Hooten, Nicole, Alejandro Martin-Montalvo, Douglas F. Dluzen, Yongqing Zhang, Michel Bernier, Alan B. Zonderman, Kevin G. Becker, Myriam Gorospe, Rafael de Cabo, and Michele K. Evans. 2016. “Metformin-Mediated Increase in DICER1 Regulates MicroRNA Expression and Cellular Senescence.” *Aging Cell* 15 (3): 572–81. <https://doi.org/10.1111/accel.12469>.
  137. Ogoshi, Machiko, Thuy Le, Jerry W. Shay, and R. Stan Taylor. 1998. “In Situ Hybridization Analysis of the Expression of Human Telomerase RNA in Normal and Pathologic Conditions of the Skin.” *Journal of Investigative Dermatology* 110 (5): 818–23. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1998.00180.x>.
  138. Ohtani, Naoko, Kimi Yamakoshi, Akiko Takahashi, and Eiji Hara. 2004. “The P16INK4a-RB Pathway: Molecular Link between Cellular Senescence and Tumor Suppression.” *The Journal of Medical Investigation: JMI* 51 (3–4): 146–53. <https://doi.org/10.2152/jmi.51.146>.
  139. Orjalo, Arturo V., Dipa Bhaumik, Bridget K. Gengler, Gary K. Scott, and Judith Campisi. 2009. “Cell Surface-Bound IL-1alpha Is an Upstream Regulator of the Senescence-Associated IL-6/IL-8 Cytokine Network.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (40): 17031–36. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905299106>.

140. O'Sullivan, Roderick J., and Jan Karlseder. 2010. "Telomeres: Protecting Chromosomes against Genome Instability." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11 (3): 171–81. <https://doi.org/10.1038/nrm2848>.
141. Oubaha, Malika, Khalil Miloudi, Agnieszka Dejda, Vera Guber, Gaëlle Mawambo, Marie-Anne Germain, Guillaume Bourdel, i sur., 2016. "Senescence-Associated Secretory Phenotype Contributes to Pathological Angiogenesis in Retinopathy." *Science Translational Medicine* 8 (362): 362ra144. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf9440>.
142. Ovadya, Yossi, Tomer Landsberger, Hanna Leins, Ezra Vadai, Hilah Gal, Anat Biran, Reut Yosef, i sur., 2018. "Impaired Immune Surveillance Accelerates Accumulation of Senescent Cells and Aging." *Nature Communications* 9 (1): 5435. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07825-3>.
143. Özcan, Servet, Nicola Alessio, Mustafa B. Acar, Eda Mert, Fatih Omerli, Gianfranco Peluso, and Umberto Galderisi. 2016. "Unbiased Analysis of Senescence Associated Secretory Phenotype (SASP) to Identify Common Components Following Different Genotoxic Stresses." *Aging* 8 (7): 1316–29. <https://doi.org/10.18632/aging.100971>.
144. Palomino, Diana Carolina Torres, and Luciana Cavalheiro Marti. 2015. "Chemokines and Immunity." *Einstein* 13 (3): 469–73. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082015RB3438>.
145. Papakonstantinou, Eleni, Michael Roth, and George Karakiulakis. 2012. "Hyaluronic Acid: A Key Molecule in Skin Aging." *Dermato-Endocrinology* 4 (3): 253–58. <https://doi.org/10.4161/derm.21923>.
146. Park, In-Kyung, Sean J. Morrison, and Michael F. Clarke. 2004. "Bmi1, Stem Cells, and Senescence Regulation." *Journal of Clinical Investigation* 113 (2): 175–79. <https://doi.org/10.1172/JCI200420800>.
147. Parrinello, Simona, Jean-Philippe Coppe, Ana Krtolica, and Judith Campisi. 2005. "Stromal-Epithelial Interactions in Aging and Cancer: Senescent Fibroblasts Alter Epithelial Cell Differentiation." *Journal of Cell Science* 118 (Pt 3): 485–96. <https://doi.org/10.1242/jcs.01635>.
148. Peachman, Kristina K., Mangala Rao, and Carl R. Alving. 2003. "Immunization with DNA through the Skin." *Methods (San Diego, Calif.)* 31 (3): 232–42. [https://doi.org/10.1016/s1046-2023\(03\)00137-3](https://doi.org/10.1016/s1046-2023(03)00137-3).
149. Pospelova, Tatyana V., Zoya N. Demidenko, Elena I. Bukreeva, Valery A. Pospelov, Andrei V. Gudkov, and Mikhail V. Blagosklonny. 2009. "Pseudo-DNA Damage Response in Senescent Cells." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 8 (24): 4112–18. <https://doi.org/10.4161/cc.8.24.10215>.
150. Pricola, Katie L., Nastaran Z. Kuhn, Hana Haleem-Smith, Yingjie Song, and Rocky S. Tuan. 2009. "Interleukin-6 Maintains Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Stemness by an ERK1/2-Dependent Mechanism." *Journal of Cellular Biochemistry* 108 (3): 577–88. <https://doi.org/10.1002/jcb.22289>.
151. Rhee, Frits van, Raymond S. Wong, Nikhil Munshi, Jean-Francois Rossi, Xiao-Yan Ke, Alexander Fosså, David Simpson, i sur., 2014. "Siltuximab for Multicentric Castleman's Disease: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial." *The Lancet. Oncology* 15 (9): 966–74. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70319-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70319-5).
152. Rodier, Francis, Jean-Philippe Coppé, Christopher K. Patil, Wieteke A. M. Hoeijmakers, Denise P. Muñoz, Saba R. Raza, Adam Freund, Eric Campeau, Albert R. Davalos, and Judith Campisi. 2009. "Persistent DNA Damage Signalling Triggers Senescence-Associated Inflammatory Cytokine Secretion." *Nature Cell Biology* 11 (8): 973–79. <https://doi.org/10.1038/ncb1909>.

153. Roos, Carolyn M., Bin Zhang, Allyson K. Palmer, Mikolaj B. Ogrodnik, Tamar Pirtskhalava, Nassir M. Thalji, Michael Hagler, i sur., 2016. “Chronic Senolytic Treatment Alleviates Established Vasomotor Dysfunction in Aged or Atherosclerotic Mice.” *Aging Cell* 15 (5): 973–77. <https://doi.org/10.1111/accel.12458>.
154. Saretzki, Gabriele. 2010. “Cellular Senescence in the Development and Treatment of Cancer.” *Current Pharmaceutical Design* 16 (1): 79–100. <https://doi.org/10.2174/138161210789941874>.
155. Sarkisian, Christopher J., Blaine A. Keister, Douglas B. Stairs, Robert B. Boxer, Susan E. Moody, and Lewis A. Chodosh. 2007. “Dose-Dependent Oncogene-Induced Senescence in Vivo and Its Evasion during Mammary Tumorigenesis.” *Nature Cell Biology* 9 (5): 493–505. <https://doi.org/10.1038/ncb1567>.
156. Sati, Satish, Boyan Bonev, Quentin Szabo, Daniel Jost, Paul Bensadoun, Francois Serra, Vincent Loubiere, i sur., 2020. “4D Genome Rewiring during Oncogene-Induced and Replicative Senescence.” *Molecular Cell* 78 (3): 522–538.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.03.007>.
157. Schafer, Marissa J., Thomas A. White, Koji Iijima, Andrew J. Haak, Giovanni Ligresti, Elizabeth J. Atkinson, Ann L. Oberg, i sur., 2017. “Cellular Senescence Mediates Fibrotic Pulmonary Disease.” *Nature Communications* 8 (February): 14532. <https://doi.org/10.1038/ncomms14532>.
158. Serrano, M., A. W. Lin, M. E. McCurrach, D. Beach, and S. W. Lowe. 1997. “Oncogenic Ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of P53 and P16INK4a.” *Cell* 88 (5): 593–602. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81902-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81902-9).
159. Shay, J. W., and W. E. Wright. 2000. “Hayflick, His Limit, and Cellular Ageing.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 1 (1): 72–76. <https://doi.org/10.1038/35036093>.
160. Smogorzewska, Agata, and Titia de Lange. 2004. “Regulation of Telomerase by Telomeric Proteins.” *Annual Review of Biochemistry* 73: 177–208. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.071403.160049>.
161. Stanley, Erin, Chieh-Yin Lin, Shiyong Jin, June Liu, Chantal M. Sottas, Renshan Ge, Barry R. Zirkin, and Haolin Chen. 2012. “Identification, Proliferation, and Differentiation of Adult Leydig Stem Cells.” *Endocrinology* 153 (10): 5002–10. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1417>.
162. Storer, Mekayla, Alba Mas, Alexandre Robert-Moreno, Matteo Pecoraro, M. Carmen Ortells, Valeria Di Giacomo, Reut Yosef, i sur., 2013. “Senescence Is a Developmental Mechanism That Contributes to Embryonic Growth and Patterning.” *Cell* 155 (5): 1119–30. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.041>.
163. Swaney, Mary Hannah, and Lindsay R. Kalan. 2021. “Living in Your Skin: Microbes, Molecules, and Mechanisms.” *Infection and Immunity* 89 (4): e00695-20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00695-20>.
164. Taghavikhalilbad, Adeleh, Saba Adabi, Anne Clayton, Hadi Soltanizadeh, Darius Mehregan, and Mohammad R. N. Avanaki. 2017. “Semi-Automated Localization of Dermal Epidermal Junction in Optical Coherence Tomography Images of Skin.” *Applied Optics* 56 (11): 3116–21. <https://doi.org/10.1364/AO.56.003116>.
165. Thapa, Raj Kumar, Hanh Thuy Nguyen, Jee-Heon Jeong, Jae Ryong Kim, Han-Gon Choi, Chul Soon Yong, and Jong Oh Kim. 2017. “Progressive Slowdown/Prevention of Cellular Senescence by CD9-Targeted Delivery of Rapamycin Using Lactose-Wrapped Calcium Carbonate Nanoparticles.” *Scientific Reports* 7 (April): 43299. <https://doi.org/10.1038/srep43299>.

166. Thuringer, J. M., and A. A. Katzberg. 1959. "The Effect of Age on Mitosis in the Human Epidermis." *The Journal of Investigative Dermatology* 33 (August): 35–39. <https://doi.org/10.1038/jid.1959.119>.
167. Tilstra, Jeremy S., Andria R. Robinson, Jin Wang, Siobhán Q. Gregg, Cheryl L. Clauson, Daniel P. Reay, Luigi A. Nasto, i sur., 2012. "NF-KB Inhibition Delays DNA Damage-Induced Senescence and Aging in Mice." *The Journal of Clinical Investigation* 122 (7): 2601–12. <https://doi.org/10.1172/JCI45785>.
168. Tobin, Desmond J. 2017. "Introduction to Skin Aging." *Journal of Tissue Viability* 26 (1): 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.jtv.2016.03.002>.
169. Tomás-Loba, Antonia, Ignacio Flores, Pablo J. Fernández-Marcos, María L. Cayuela, Antonio Maraver, Agueda Tejera, Consuelo Borrás, i sur., 2008. "Telomerase Reverse Transcriptase Delays Aging in Cancer-Resistant Mice." *Cell* 135 (4): 609–22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.034>.
170. Uitto, J. 1986. "Connective Tissue Biochemistry of the Aging Dermis. Age-Related Alterations in Collagen and Elastin." *Dermatologic Clinics* 4 (3): 433–46.
171. Vacurova, Eliska, Jaroslava Trnovska, Petr Svoboda, Vojtech Skop, Vendula Novosadova, David Pajuelo Reguera, Silvia Petrezselyová, i sur., 2022. "Mitochondrially Targeted Tamoxifen Alleviates Markers of Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus in Mice." *Nature Communications* 13 (1): 1866. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29486-z>.
172. Villa, Ana, Beatriz Navarro-Galve, Carlos Bueno, Sonia Franco, María A. Blasco, and Alberto Martinez-Serrano. 2004. "Long-Term Molecular and Cellular Stability of Human Neural Stem Cell Lines." *Experimental Cell Research* 294 (2): 559–70. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2003.11.025>.
173. Wakita, Masahiro, Akiko Takahashi, Osamu Sano, Tze Mun Loo, Yoshinori Imai, Megumi Narukawa, Hidehisa Iwata, i sur., 2020. "A BET Family Protein Degradator Provokes Senolysis by Targeting NHEJ and Autophagy in Senescent Cells." *Nature Communications* 11 (1): 1935. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15719-6>.
174. Wal, Tanne van der, and Renée van Amerongen. 2020. "Walking the Tight Wire between Cell Adhesion and WNT Signalling: A Balancing Act for  $\beta$ -Catenin." *Open Biology* 10 (12): 200267. <https://doi.org/10.1098/rsob.200267>.
175. Wang, Wei, Jiang-Jiang Qin, Mehrdad Rajaei, Xin Li, Xiaoyi Yu, Courtney Hunt, and Ruiwen Zhang. 2020. "Targeting MDM2 for Novel Molecular Therapy: Beyond Oncology." *Medicinal Research Reviews* 40 (3): 856–80. <https://doi.org/10.1002/med.21637>.
176. Watanabe, Sugiko, Shimpei Kawamoto, Naoko Ohtani, and Eiji Hara. 2017. "Impact of Senescence-Associated Secretory Phenotype and Its Potential as a Therapeutic Target for Senescence-Associated Diseases." *Cancer Science* 108 (4): 563–69. <https://doi.org/10.1111/cas.13184>.
177. West, M. D. 1994. "The Cellular and Molecular Biology of Skin Aging." *Archives of Dermatology* 130 (1): 87–95.
178. Wiley, Christopher D., Nicholas Schaum, Fatouma Alimirah, Jose Alberto Lopez-Dominguez, Arturo V. Orjalo, Gary Scott, Pierre-Yves Desprez, Christopher Benz, Albert R. Davalos, and Judith Campisi. 2018. "Small-Molecule MDM2 Antagonists Attenuate the Senescence-Associated Secretory Phenotype." *Scientific Reports* 8 (1): 2410. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20000-4>.
179. Willems, Estelle, Matthias Dedobbeleer, Marina Digregorio, Arnaud Lombard, Paul Noel Lumapat, and Bernard Rogister. 2018. "The Functional Diversity of Aurora Kinases: A

- Comprehensive Review.” *Cell Division* 13 (1): 7. <https://doi.org/10.1186/s13008-018-0040-6>.
180. Witkiewicz, Agnieszka K., Karen E. Knudsen, Adam P. Dicker, and Erik S. Knudsen. 2011. “The Meaning of P16(Ink4a) Expression in Tumors: Functional Significance, Clinical Associations and Future Developments.” *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 10 (15): 2497–2503. <https://doi.org/10.4161/cc.10.15.16776>.
  181. Wold, William S.M., and Karoly Toth. 2013. “Adenovirus Vectors for Gene Therapy, Vaccination and Cancer Gene Therapy.” *Current Gene Therapy* 13 (6): 421–33.
  182. Wong, Richard, Stefan Geyer, Wolfgang Weninger, Jean-Claude Guimberteau, and Jason K. Wong. 2016. “The Dynamic Anatomy and Patterning of Skin.” *Experimental Dermatology* 25 (2): 92–98. <https://doi.org/10.1111/exd.12832>.
  183. Wright, W. E., M. A. Piatyszek, W. E. Rainey, W. Byrd, and J. W. Shay. 1996. “Telomerase Activity in Human Germline and Embryonic Tissues and Cells.” *Developmental Genetics* 18 (2): 173–79. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6408\(1996\)18:2<173::AID-DVG10>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6408(1996)18:2<173::AID-DVG10>3.0.CO;2-3).
  184. Wu, Peng, Hiroyuki Takai, and Titia de Lange. 2012. “Telomeric 3’ Overhangs Derive from Resection by Exo1 and Apollo and Fill-in by POT1b-Associated CST.” *Cell* 150 (1): 39–52. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.026>.
  185. Xiong, Zheng-Mei, Mike O’Donovan, Linlin Sun, Ji Young Choi, Margaret Ren, and Kan Cao. 2017. “Anti-Aging Potentials of Methylene Blue for Human Skin Longevity.” *Scientific Reports* 7 (1): 2475. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02419-3>.
  186. Xu, Ming, Tamar Pirtskhalava, Joshua N. Farr, Bettina M. Weigand, Allyson K. Palmer, Megan M. Weivoda, Christina L. Inman, i sur., 2018. “Senolytics Improve Physical Function and Increase Lifespan in Old Age.” *Nature Medicine* 24 (8): 1246–56. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0092-9>.
  187. Xue, Wen, Lars Zender, Cornelius Miething, Ross A. Dickins, Eva Hernando, Valery Krizhanovsky, Carlos Cordon-Cardo, and Scott W. Lowe. 2007. “Senescence and Tumour Clearance Is Triggered by P53 Restoration in Murine Liver Carcinomas.” *Nature* 445 (7128): 656–60. <https://doi.org/10.1038/nature05529>.
  188. Yang, Nae-Cherng, and Miao-Lin Hu. 2005. “The Limitations and Validities of Senescence Associated-Beta-Galactosidase Activity as an Aging Marker for Human Foreskin Fibroblast Hs68 Cells.” *Experimental Gerontology* 40 (10): 813–19. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.07.011>.
  189. Yosef, Reut, Noam Pilpel, Ronit Tokarsky-Amiel, Anat Biran, Yossi Ovadya, Snir Cohen, Ezra Vadai, i sur., 2016. “Directed Elimination of Senescent Cells by Inhibition of BCL-W and BCL-XL.” *Nature Communications* 7 (April): 11190. <https://doi.org/10.1038/ncomms11190>.
  190. Yousefzadeh, Matthew J., Yi Zhu, Sara J. McGowan, Luise Angelini, Heike Fuhrmann-Stroissnigg, Ming Xu, Yuan Yuan Ling, i sur., 2018. “Fisetin Is a Senotherapeutic That Extends Health and Lifespan.” *EBioMedicine* 36 (October): 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.09.015>.
  191. Zeng, Weihua, Alexander R. Ball, and Kyoko Yokomori. 2010. “HP1: Heterochromatin Binding Proteins Working the Genome.” *Epigenetics: Official Journal of the DNA Methylation Society* 5 (4): 287–92.
  192. Zhu, Yi, Ewald J. Doornebal, Tamar Pirtskhalava, Nino Giorgadze, Mark Wentworth, Heike Fuhrmann-Stroissnigg, Laura J. Niedernhofer, Paul D. Robbins, Tamara Tchkonja, and James L. Kirkland. 2017. “New Agents That Target Senescent Cells: The Flavone, Fisetin,

- and the BCL-XL Inhibitors, A1331852 and A1155463.” *Aging* 9 (3): 955–63. <https://doi.org/10.18632/aging.101202>.
193. Zhu, Yi, Tamara Tchkonina, Heike Fuhrmann-Stroissnigg, Haiming M. Dai, Yuanyuan Y. Ling, Michael B. Stout, Tamar Pirtskhalava, i sur., 2016. “Identification of a Novel Senolytic Agent, Navitoclax, Targeting the Bcl-2 Family of Anti-Apoptotic Factors.” *Aging Cell* 15 (3): 428–35. <https://doi.org/10.1111/accel.12445>.
194. Zhu, Yi, Tamara Tchkonina, Michael B. Stout, Nino Giorgadze, Libing Wang, Peter W. Li, Carrie J. Heppelmann, i sur., 2015. “Inflammation and the Depot-Specific Secretome of Human Preadipocytes.” *Obesity (Silver Spring, Md.)* 23 (5): 989–99. <https://doi.org/10.1002/oby.21053>.
195. Zou, Zhiran, Xiao Long, Qian Zhao, Yandong Zheng, Moshi Song, Shuai Ma, Yaobin Jing, i sur., 2021. “A Single-Cell Transcriptomic Atlas of Human Skin Aging.” *Developmental Cell* 56 (3): 383–397.e8. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.11.002>.



## **8. POPIS SLIKA I TABLICA**

## **Slike**

Slika 1. Mehanizmi pokretanja senescencije i signalni putevi njihovog djelovanja.

Slika 2. Morfološka i molekularna obilježja senescentnih stanica.

Slika 3. Glavni signalni putevi koji upravljaju SASP-om.

Slika 4. Pozitivne i negativne biološke uloge senescentnih stanica .

Slika 5. Mehanizmi kojima stanična senescencija narušava homeostazu tkiva i organa .

Slika 6. Građa kompleksa shelterin i telomerase.

Slika 7. Razlike između mlade i stare kože kao posljedica starenja kože.

Slika 8. Strategije za uklanjanje senescentnih stanica iz organizma pomoću senolitika .

Slika 9. Strategije za uklanjanje senescentnih stanica iz organizma pomoću senomorfa.

Slika 10. Uspješnost implantacije fibroblasta obilježenih DiI bojom u kožu štakora različite dobi.

Slika 11. Promjene u strukturi tretirane i netretirane kože praćeno hematoxylin-eosin bojanjem.

Slika 12. Utjecaj implantiranih mladih fibroblasta na nišu matičnih stanica.

Slika 13. Repräsentativni primjer vizualizacije kolagena I i kolagena III u koži 24 mjeseca starog štakora.

Slika 14. Omjer intenziteta fluorescencijskih signala za Col I/Col III u koži štakora različite starosti.

Slika 15. Učestalost formiranja 53BP1 fokusa i heterokromatinskih fokusa HP1- $\gamma$  praćena je imunoflorescencijskom analizom preparata za kontrole, mehaničke kontrole i tretirano tkivo kod 6 i 24 mjeseca starih životinja.

Slika 16. SA- $\beta$ -Gal analiza kože štakora starih 6, 12, 18 i 24 mjeseca.

Slika 17. Analiza PCA grupiranja uzoraka sekvenciranja RNA.

Slika 18. Toplinska mapa genske ekspresije u kontrolnim uzorcima, mehaničkoj kontroli i tretiranom tkivu kože štakora.

Slika 19. Vulkano prikaz relativne promjene ekspresije gena kod tretiranih tkiva u odnosu na kontrole (6 i 24 mjeseca stare životinje), odnosno na tretirano tkivo za različitu dob (6 i 24 mjeseca stare životinje).

Slika 20. Vulkano prikaz relativne promjene ekspresije gena kod mehaničke kontrole u odnosu na kontrole (6 i 24 mjeseca stare životinje), odnosno na mehaničke kontrole i kontrole za različitu dob (6 i 24 mjeseca stare životinje).

Slika 21. Vennovi dijagrami za 24 mjesecne tretirane životinje u odnosu na mehaničke kontrole.

- Slika 22. Analiza genske ontologije za gene sa: A) pojačanom i B) smanjenom promijenjenom ekspresijom u kategoriji Biološki procesi za 24 mjeseca tretirana tkiva u odnosu na kontrole.
- Slika 23. Endotelne stanice obilježene specifičnim antitijelom Anti CD-31 (crveno). Matične stanice obilježene Anti-Integrin alpha 6 (zeleno).
- Slika 24. Fibroblasti, endotelne i matične stanice inficirane adenovirusima koji nose reporter gen i gen za telomerazu, odnosno samo reporter gen.
- Slika 25. Dugoročno praćenje promjena u strukturi tretirane i netretirane kože hematoxylin-eosin bojanjem.
- Slika 26. Grafički prikazi postotka Ki67 pozitivnih stanica na bazalnoj membrani epidermisa 1, 6 i 12 mjeseci nakon implantacije.
- Slika 27. SA- $\beta$ -Gal analiza kože štakora 1, 6, 12 mjeseci nakon implantacije: A) fibroblasta, B) matičnih ili C) endotelnih stanica.
- Slika 28. Reprezentativni primjer vizualizacije kolagena I i kolagena III 1, 6 i 12 mjeseci nakon mikrotransplantacije.

## **Tablice**

Tablica 1. Popis osnovnih kemikalija

Tablica 2. Popis korištenih primarnih i sekundarnih protutijela za imunoflorescenciju na stanicamaparabioza

Tablica 3. Kombinacije i razrijeđenja primarnih i sekundarnih protutijela koja su korištena za imunoflorescenciju.

Tablica 4. Tablični prikaz odabranih bioloških procesa i gena koji pripadaju pojedinoj skupini značajne za proces pomlađivanja i regeneracije.

## **9. ŽIVOTOPIS**

## **Osobni podaci:**

Ime i prezime: Andrea Cedilak, mag.ing.mol.biotechn.

Adresa: IV. Luka 31, Zagreb, Hrvatska

Mob: (+385)996859212

E-mail: [andrea.cedilak93@gmail.com](mailto:andrea.cedilak93@gmail.com)

## **Obrazovanje:**

2016. – 2019. Diplomski studij Molekularne biotehnologije, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu

- Magistra inženjerka molekularne biotehnologije (mag. ing. biotechn.)

2012. – 2016. Preddiplomski studij Biotehnologije, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu

- Sveučilišna prvostupnica inženjerka biotehnologije (univ. bacc. ing. biotechn.)

## **Stručno usavršavanje:**

26.03.2023. – 08.04.2023. – posjet suradničkom laboratoriju u Berlinu pod vodstvom dr.sc. Michaela Badera na Max Delbrück Centru za Molekularnu medicinu s ciljem usvajanja novih tehnika i znanja.

13.06.2022. – 02.07.2022. – posjet suradničkom laboratoriju u Beču pod vodstvom dr.sc. Floriana Grubera na Medicinskom sveučilištu s ciljem usvajanja novih tehnika i znanja.

Svibanj 2019. – Zaposlena sam kao stručni suradnik, doktorand, na projektu „Reprogramiranje homeostaze i regeneracije kože uporabom nove tehnike mikrotransplantacije stanica (IP-01-2018)“ u sklopu programa Plan razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti Hrvatske zaklade za znanost, u Laboratoriju za molekularnu i staničnu biologiju, IRB, pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivice Rubelja.

Veljača 2018. – lipnja 2018. –Izradila sam diplomski rad pod naslovom „Detekcija i karakterizacija TRIM mobilnih elemenata u vrstama školjkaša Cerastoderma edule i Glycymeris glycymeris“ u

Laboratoriju za strukturu i funkciju heterokromatina, Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković.

### **Popis javnih prezentacija:**

15-16.9.2022. – 4th World aging and rejuvenation conference, Rim

- Pozvano predavanje- usmeno izlaganje, Reprogramming of skin aging by micro-transplantation of young fibroblasts

29.8-3.9.2022. – The 9th Annual Aging Research and Drug Discovery Meeting, Kopenhagen

- Poster izlaganje

19-20.5.2022. – Science and Us, Rijeka

- Poster izlaganje

20.-21.9.2021 – 3rd World aging and rejuvenation conference, Barcelona

- Pozvano predavanje- usmeno izlaganje, Reprogramming of skin homeostasis and regeneration using endothelial cells

### **Publikacije**

Šatović E, Luchetti A, Pasantes JJ, García-Souto D, Cedilak A, Mantovani B, Plohl M. Terminal-Repeat Retrotransposons in Miniature (TRIMs) in bivalves. *Sci Rep.* 2019, 9, 19962

Nanić L, Cedilak A, Vidaček NŠ, Gruber F, Huzak M, Bader M, Rubelj I. In Vivo Skin Regeneration and Wound Healing Using Cell Micro-Transplantation. *Pharmaceutics.* 2022; 14(9):1955.

Lučić D, Pavlović I, Brkljačić L, Bogdanović S, Farkaš V, Cedilak A, Nanić L, Rubelj I, Salopek-Sondi B. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Kale (*Brassica Oleracea* L. Var. *Acephala* DC.) and Wild Cabbage (*Brassica Incana* Ten.) Polyphenolic Extracts. *Molecules* 2023, 28, 1840.