

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij
Molekularne bioznanosti**

Lucia Nanić

**UTJECAJ ANTIOKSIDANSA RESVERATROLA I
MELATONINA TE MLADIH TRANSPLANTIRANIH
FIBROBLASTA NA PROMJENU TKIVNE HOMEOSTAZE I
REGENERACIJU U STARENJU ŠTAKORA**

Doktorska disertacija

Osijek, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković

Doktorska disertacija

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

UTJECAJ ANTIOKSIDANSA RESVERATROLA I MELATONINA TE MLADIH TRANSPLANTIRANIH FIBROBLASTA NA PROMJENU TKIVNE HOMEOSTAZE I REGENERACIJU U STARENJU ŠTAKORA

Lucia Nanić

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

Mentor: prof. dr. sc. Ivica Rubelj

Starenje bez iznimke zahvaća cijelu ljudsku populaciju i glavni je faktor rizika za pojavu brojnih patoloških stanja koja dovode do nastanka bolesti. Stare stanice, osim gubitkom sposobnosti dioba, svojim metabolizmom štetno utječu na okolno tkivo. Na taj način narušavaju normalne funkcije susjednih zdravih stanica induciranjem njihove senescencije, a istovremeno stvaraju okolinu koja potiče proonkogeni rast. U ovom istraživanju, korištenjem štakora kao animalnog modela, ispitala sam kako na starenje djeluju sistemski tretman antioksidansima te lokalna promjena omjera mladih i starih stanica u tkivu, s ciljem usporavanja, odnosno reprogramiranja dinamike starenja. Dobiveni rezultati pokazuju kako dugotrajan tretman resveratrolom značajno usporava brzinu skraćivanja telomera u jetri ženki, međutim u ostalim tkivima ženki i svim tkivima mužjaka nije zapažen značajan učinak. Tretman melatoninom nije pokazao značajan utjecaj na dinamiku starenja u analiziranim tkivima. Lokalna promjena omjera mladih i starih stanica u tkivu starih štakora dovela je do smanjenja sekretornog fenotipa starih stanica, promjene homeostaze starog tkiva i posljedično do revitalizacije niše matičnih stanica što je u konačnici dovelo i do regeneracije kože.

Broj stranica: 82

Broj slika: 26

Broj tablica: 3

Broj literaturnih navoda: 148

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: melatonin, resveratrol, telomere, stanična senescencija, SASP

Datum obrane: 20.12.2018.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. prof. dr. sc. Andreja Ambriović Ristov
2. prof. dr. sc. Đurđica Ugarković
3. prof. dr. sc. Višnja Besendorfer
4. dr.sc. Davorka Breljak

Disertacija je pohranjena u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute**

PhD thesis

University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of Molecular biosciences

Scientific Area: Natural sciences

Scientific Field: Biology

INFLUENCE OF RESVERATROL AND MELATONIN ANTIOXIDANTS AND YOUNG TRANSPLANTED FIBROBLASTS ON TISSUE HOMEOSTASIS CHANGES AND TISSUE REGENERATION IN RAT AGING

Lucia Nanić

Laboratory for Molecular and Cellular Biology, Department of Molecular Biology, Ruđer Bošković
Institute, Bijenička 54, 10000 Zagreb, Croatia

Supervisor: prof. Ivica Rubelj, PhD

Aging inevitably affects the entire human population and it is the major risk factor for the emergence of numerous pathological conditions leading to the onset of disease. Old cells, apart from losing their ability for further divisions, have detrimental effects on surrounding tissues. Thus, aging cells distort the normal functions of neighbouring healthy cells by inducing their senescence, while at the same time creating an environment that promotes pro-oncogenic growth. In this study on rat animal model, I investigated how systemic treatment with antioxidants and local changes in the ratio of young and old cells in tissue affect aging with the aim of slowing or reprogramming aging dynamics. The obtained results show that long-term resveratrol treatment significantly decreases telomere attrition in liver of female rats, however, in other female tissues and all investigated male tissues no significant effect has been observed. Melatonin treatment did not show significant effect regarding dynamics of aging in the analyzed tissues. Local changes in ratio of young and old cells in old rat tissues decreased secretory phenotype of senescent cells and changed old tissue homeostasis, which consequently led to revitalization of stem cells and ultimately led to skin regeneration.

Number of pages: 82

Number of figures: 26

Number of tables: 3

Number of references: 148

Original in: Croatian

Key words: melatonin, resveratrol, telomeres, cellular senescence, SASP

Date of the thesis defense: December 20, 2018

Reviewers:

1. prof. Andreja Ambriović Ristov, PhD
2. prof. Đurđica Ugarković, PhD
3. prof. Višnja Besendorfer, PhD
4. Davorka Breljak, PhD

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

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 „Starosno-ovisna ekspresija membranskih prijenosnika u štakora“ (IP-11-2013-1481).

Veliko hvala

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

Nikolini i Nini na podršci i pomoći kad god mi je bila potrebna te velikom prijateljstvu,

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

1. UVOD.....	1
1.1. Starenje.....	2
1.2. Stanična senescencija.....	3
1.2.1. Karakteristike senescentnih stanica.....	5
1.2.2. Uloge senescencije.....	7
1.2.3. Utjecaj senescentnih stanica na okolno tkivo.....	9
1.3. Povezanost telomera, mitohondrija i starenja.....	11
1.4. Antioksidansi.....	13
1.4.1. Melatonin.....	13
1.4.2. Resveratrol.....	14
1.5. Koža – model za istraživanje tkivne homeostaze u starenju i regeneraciji.....	15
1.5.1. Epidermis.....	15
1.5.2. Dermis.....	15
1.6. Strategije za uklanjanje senescentnih stanica iz organizma.....	17
1.7. Ciljevi istraživanja.....	19
2. MATERIJALI I METODE.....	20
2.1. Materijali.....	21
2.1.1. Osnovne kemikalije.....	21
2.1.2. Kompleti.....	21
2.1.3. Enzimi, proteini, protutijela i nukleotidi.....	21
2.1.4. Hranjiva podloga za uzgoj stanica.....	22
2.1.5. Organizmi.....	22
2.1.5.1. Animalni modeli.....	22
2.1.5.2. Primarne stanične kulture.....	22
2.2. Metode.....	23
2.2.1. Tretman štakora Wistar antioksidansima.....	23
2.2.2. Prikupljanje i pohrana uzoraka.....	23
2.2.3. Izdvajanje genomske DNA iz uzoraka jetre i bubrega.....	23
2.2.4. Hibridizacija po Southern-u.....	24
2.2.4.1. Obilježavanje telomerne sonde lančanom reakcijom polimerazom bez kalupa ..	24
2.2.4.2. Metoda TRF (engl. <i>Terminal Restriction Fragment</i>).....	25
2.2.4.3. Elektroforeza PFGE (engl. <i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>).....	25
2.2.4.4. Kapilarni prijenos DNA s gela na membranu i hibridizacija s DNA sondom obilježenom digoksigeninom.....	25
2.2.4.5. Detekcija telomernih signala i analiza duljine telomera.....	26
2.2.5. Uspostava primarne kulture stanica kože štakora.....	27

2.2.6. Uzgoj stanica u kulturi.....	27
2.2.7. Obilježavanje stanica bojom Dil.....	27
2.2.8. Mikro-transplantacija stanica kože štakora	28
2.2.9. Uzorkovanje i priprema preparata kože	30
2.2.9.1. Uklapanje tkiva u parafin.....	30
2.2.9.2. Smrzavanje tkiva.....	30
2.2.10. Analiza uzoraka	31
2.2.10.1. Analiza uspješnosti implantacije stanica u kožu štakora	31
2.2.10.2. Hematoksilin eozin bojanje (H&E)	31
2.2.10.3. Imunohistokemijska i imunofluorescencijska analiza tkiva	32
2.2.11. Statistička obrada rezultata	33
3. REZULTATI.....	34
3.1. Analiza utjecaja dugotrajnog tretmana antioksidansima na dinamiku starenja	35
3.1.1. Analiza duljine telomera jednogodišnjih mužjaka	36
3.1.2. Analiza duljine telomera dvogodišnjih mužjaka	37
3.1.3. Analiza duljine telomera jednogodišnjih ženki	38
3.1.4. Analiza duljine telomera dvogodišnjih ženki	39
3.2. Intervencija u tkivnu homeostazu mikro-transplantacijom mladih stanica kože	40
3.2.1. Optimizacija metode mikro-transplantacija	40
3.2.2. Implantacija mladih stanica u kožu starih štakora.....	44
3.2.3. Histološka analiza utjecaja mladih stanica na homeostazu kože starog štakora.....	45
3.2.4. Analiza proliferacijskog statusa kože	48
3.2.5. Analiza ultrastrukture kože	52
4. RASPRAVA	55
5. ZAKLJUČCI.....	62
6. LITERATURA	65
7. SAŽETAK	76
8. SUMMARY	78
9. ŽIVOTOPIS.....	80

1. UVOD

1.1. Starenje

Starenje je složen biološki proces koji je rezultat postupnog slabljenja funkcija na staničnoj razini te na razini cijelog organizma, a u konačnici dovodi do smrti. U posljednje vrijeme sve se više uviđa važnost utjecaja starenja na društvo budući da životni vijek postaje sve duži, a posljedica ovog kompleksnog fenomena je razvoj mnogih kroničnih bolesti, od kojih su tumori, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti te dijabetes najučestaliji. Starenje je gotovo univerzalna pojava među svim eukariotskim organizmima i rezultat je više različitih mehanizama koji ga kontroliraju (Höhn i sur. 2016).

Prvi su na staničnoj razini opisali starenje Hayflick i Moorhead. Oni su pokazali da ljudske diploidne stanice imaju ograničen broj staničnih dioba te su tako pobili dotad uvriježeno mišljenje da stanice višestaničnih organizama imaju sposobnost neograničenog dijeljenja u kulturi (Hayflick i Moorhead, 1961). Stanice koje su dosegnule krajnji limit dioba, tzv. *Hayflickov limit*, morfološki i biokemijski se mijenjaju, ireverzibilno im se zaustavlja stanični ciklus u G₁ fazi i taj proces se naziva stanična senescencija (Reddel, 2000; Shay i Wright, 2000). Molekularna osnova stanične senescencije otkrivena je tek desetljećima kasnije. Olovnikov je 1971. godine povezo telomere i staničnu senescenciju u svojoj *Teoriji marginotomije* u kojoj predlaže skraćivanje telomera uslijed nepotpune replikacije krajeva kromosoma kao unutarnji mehanizam koji broji stanične diobe (Olovnikov, 1971, 1973). Predloženi mehanizam eksperimentalno je potvrđen tek 1990.-tih godina. Tada su Harley i sur. (1990) pokazali da se duljina telomerne DNA ljudskih fibroblasta skraćuje kao posljedica dioba stanica *in vitro*. Nekoliko godina kasnije je pokazano da indukcija ekspresije telomeraze, enzima koji ima sposobnost produljivanja telomera, sprječava skraćivanje telomera za vrijeme staničnih dioba uslijed čega ne dolazi do indukcije stanične senescencije *in vitro* (Bodnar i sur. 1998). Ovaj eksperiment je pokazao da je duljina telomera limitirajući faktor stanične senescencije i time ima ključnu ulogu u tom procesu.

Daljnja istraživanja pokazala su da staničnu senescenciju induciraju kritično kratke telomere koje pokreću trajnu aktivaciju odgovora stanice na oštećenje DNA (engl. DNA damage response, DDR) i time dovode do permanentnog zastoja staničnog ciklusa (d'Adda di Fagagna i sur. 2003). Budući da diobe u ovom stanju više nisu moguće, stanice pa time tkiva i organi gube sposobnost regeneracije.

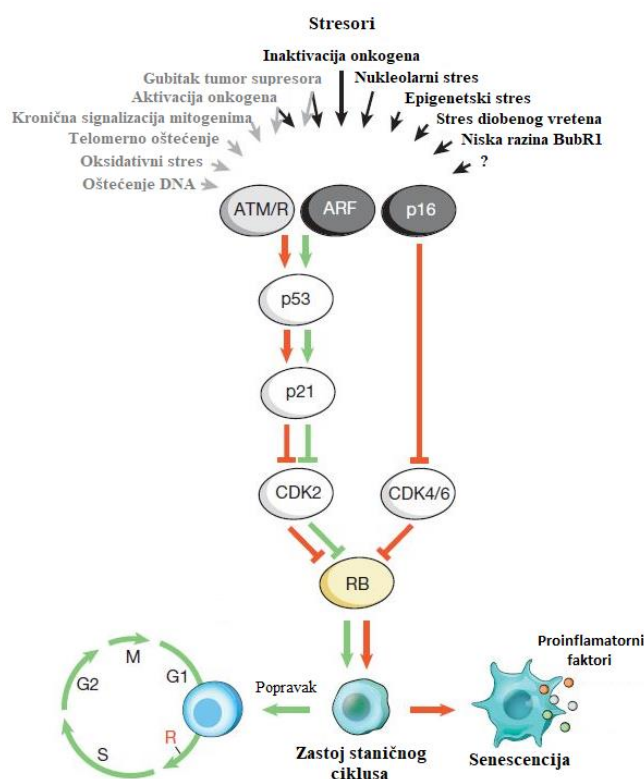
1.2. Stanična senescencija

Dva su oblika stanične senescencije; replikativno starenje uzrokovano postepenim skraćivanjem telomera te stresom inducirano prerano starenje koje je često povezano s ubrzanim skraćivanjem telomera. Stresom inducirana stanična senescencija može nastati uslijed oštećenja DNA (von Zglinicki i sur. 2005), oksidativnog stresa (von Zglinicki i sur. 1995) ili djelovanja onkogeni (Serrano i sur. 1997), te ona nastaje naglo, unutar nekoliko dana. Samo jedna nefunkcionalna telomera je dovoljna za indukciju stanične senescencije (Hemann i sur. 2001). Iznimno je značajno i istraživanje koje je ukazalo na razliku ova dva mehanizma tako da će ekspresija telomeraze u stanicama ostarjelim replikativnim starenjem omogućiti daljnje diobe, dok u stanicama ostarjelim zbog vanjskih utjecaja neće imati nikakvog učinka (Vaziri i Benchimol, 1998).

Stanična senescencija je dugo vremena smatrana mehanizmom koji štiti organizam od neograničenog rasta oštećenih stanica (Bodnar i sur. 1998; Hayflick i Moorhead, 1961) i razvoja tumora (Serrano i sur. 1997). Novija istraživanja su pokazala da uloga senescencije nije samo supresija tumora već je prepoznata njezina uloga u kompleksnim biološkim procesima embrionalnog razvoja (Muñoz-Espín i sur. 2013; Storer i sur. 2013), zacjeljivanju rana (Jun i Lau, 2010), popravku tkivnih oštećenja (Krizhanovsky i sur. 2008) i starenju organizma (Baker i sur. 2011, 2013).

Brojni unutarnji i vanjski stresori mogu aktivirati staničnu senescenciju pokretanjem različitih signalnih kaskada u stanici, ali svi u konačnici aktiviraju jedan ili čak oba puta starenja; p53 put (p53-p21-pRb) i pRB put (p16-pRb). Glavni medijator p53 puta je protein p21 čija je pojačana ekspresija posredstvom p53 odgovorna za zastoj staničnog ciklusa (Sherr i Roberts, 1999). Protein p21 inhibira ciklinE/Cdk2 kompleks čime sprječava fosforilaciju proteina pRb i normalno odvijanje staničnog ciklusa. Kod puta starenja p16-pRb, protein p16^{INK4a} kao inhibitor kompleksa ciklinD/Cdk4,6 također sprječava fosforilaciju pRb-a (Lowe i Sherr, 2003). Primarno se inducira u različitim stresnim situacijama i jako je aktivan u starim stanicama (Alcorta i sur. 1996; Palmero i sur. 1997). Put starenja p53-p21-pRb je reverzibilan i može se obrnuti inaktivacijom p53, dok je put p16-pRb ireverzibilan jer pRb uspostavlja represivan heterokromatin na mjestima koja sadržavaju ciljane gene E2F i druge gene koji promoviraju rast. Stoga se smatra da je aktivacija pRb putem p16^{INK4a} dodatni sigurnosni mehanizam koji je vrlo značajan u ljudskim stanicama (Beauséjour i sur. 2003; Narita i sur. 2003).

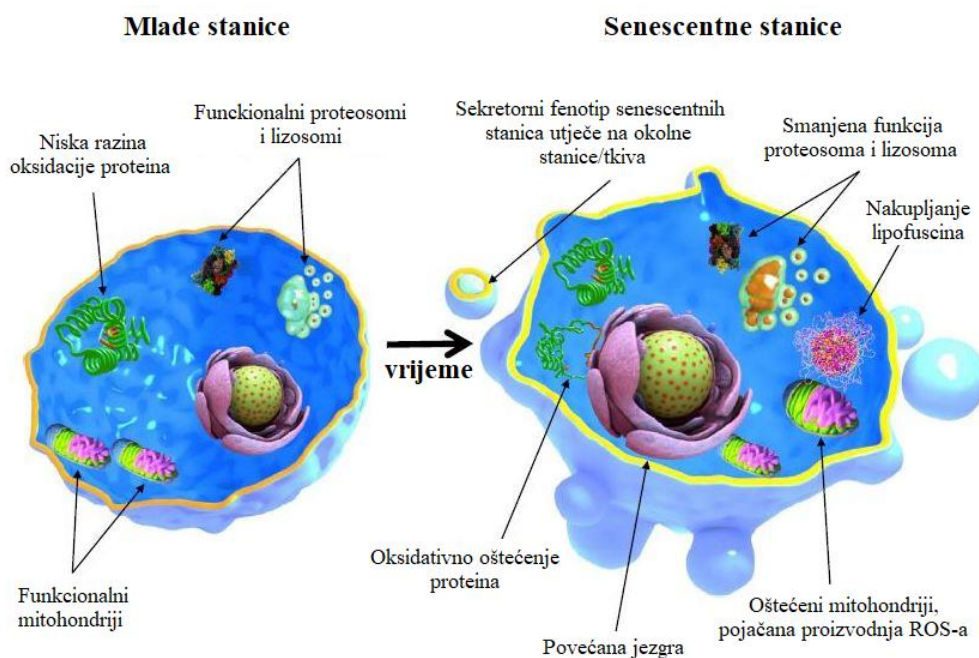
Osim oštećenja telomera, i nekoliko drugih stresora povezanih s razvojem tumora je pokazalo da induciraju senescenciju *in vitro* (slika 1). U tu skupinu spadaju DNA lezije koje sadrže nepopravljive dvolančane lomove (Sedelnikova i sur. 2004) i reaktivne kisikove vrste (ROS) (von Zglinicki, 2002), a svima navedenima je zajedničko da aktiviraju odgovor na oštećenje DNA (engl. DNA damage response, DDR). Pritom kinaze ATM i ATR zaustavljaju stanični ciklus stabilizacijom proteina p53 i transkripcijskom aktivacijom p21, inhibitora ciklin-ovisnih kinaza (d'Adda di Fagagna, 2008). Kronična signalizacija mitogenima, aktivacija onkogeni i gubitak tumor supresora također dovode do aktivacije puta p53-p21-pRb ili p16-pRb i na taj način induciraju staničnu senescenciju (Aird i sur. 2013; Di Micco i sur. 2006; Moiseeva i sur. 2006; Shamma i sur. 2009). Istraživanja su pokazala da senescenciju induciraju i različiti epigenetički i nukleolarni stresovi te stres diobenog vretena, međutim oni još uvijek nisu detaljno istraženi (van Deursen, 2014).



Slika 1. Stresori koji induciraju senescenciju i signalni putevi njihovog djelovanja. U senescentnim stanicama induciran je inflamatorni transkriptom neovisno o tome koji je stres uzrokovao aktivaciju senescencije (preuzeto i prilagođeno iz van Deursen, 2014).

1.2.1. Karakteristike senescentnih stanica

Senescentne stanice ne umiru, već ostaju vijabilne i metabolički aktivne (Cristofalo i Pignolo, 1993; Matsumura i sur. 1979) te ispoljavaju mnoga obilježja po kojima se razlikuju od mladih stanica (slika 2). Stanicama se sa starenjem povećava volumen, postaju znatno proširene, a povećava im se i sadržaj proteina (De Cecco i sur. 2011). Također ih karakterizira povećanje jezgre i lizosoma te aktivnost lizosomalne β -galaktozidaze (tzv. SA- β -Gal) koja stare stanice specifično boji u plavo (Dimri i sur. 1995) i s pomoću koje je dokazana akumulacija starih stanica u organizmu. Osim u kulturi, ove promjene na stanicama zamijećene su i *in vivo* (Dimri i sur. 1995). Pored navedenih fenotipskih obilježja, dolazi i do pojačane ekspresije glavnih regulatora senescencije, proteina p53/p21 i p16^{INK4a} (Beauséjour i sur. 2003; Nielsen i sur. 1999). Tumor supresorski protein p16^{INK4a} se u posljednje vrijeme sve češće koristi kao marker senescentnih stanica budući da je njegova ekspresija niska ili ga uopće nije moguće detektirati u normalnim stanicama i tkivima, dok ga je jako prisutan i lako ga je detektirati u stanicama nakon indukcije senescencije različitim stresorima (Collins i Sedivy, 2003; Ohtani i sur. 2004). Istraživanja su također pokazala da ekspresija p16^{INK4a} u tkivima kralješnjaka stabilno raste sa starenjem (Ressler i sur. 2006; Waaijer i sur. 2012).



Slika 2. Stanične i molekularne karakteristike mladih i senescentnih stanica (preuzeto i prilagođeno iz Höhn i sur. 2016).

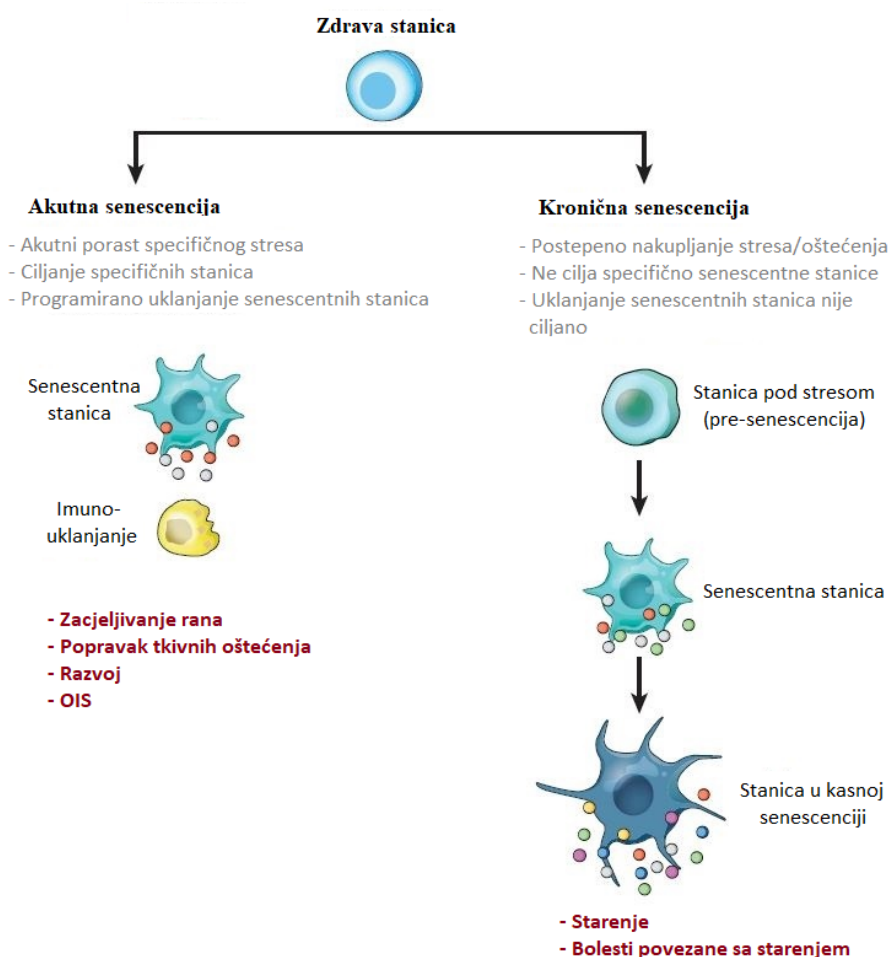
Neki stanični tipovi kod sisavaca pokazuju da nakon indukcije senescencije dolazi do jake kondenzacije kromatina u pojedinim regijama genoma u kojima se, između ostalog, nalaze geni bitni za proliferaciju stanica. Tim promjenama nastaju heterokromatinski fokusi senescentnih stanica (engl. Senescence-associated heterochromatin foci, SAHF), a smatra se da oni dodatno koče stanični ciklus senescentnih stanica (Narita i sur. 2006; Zhang i sur. 2007).

Remodeliranje kromatina uzrokovano senescencijom dovodi do značajnih transkripcijskih promjena na razini stanice (Zhang i sur. 2003) i do pojave još jedne, iznimno bitne karakteristike starih stanica, a to je sekretorni fenotip senescentnih stanica (engl. Senescence-associated secretory phenotype, SASP). SASP je jedno od ključnih obilježja koje razlikuje senescentne od stanica u mirovanju, terminalno diferenciranih ili drugih tipova neproliferirajućih stanica, a podrazumijeva pojačanu ekspresiju i sekreciju brojnih proinflammatoryh citokina i kemokina (IL-1, IL-6, IL-8), faktora rasta, komponenata izvanstaničnog matriksa (metaloproteinaze, serinske proteaze), fibronektina i reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta (ROS/RNS) koji zajedničkim djelovanjem mijenjaju strukturu i funkciju tkiva (Coppé i sur. 2008; Rodier i sur. 2009).

Svojim specifičnim fenotipom senescentne stanice uzrokuju kroničnu sterilnu upalu na razini tkiva i cijelog organizma (Freund i sur. 2010). Kronična sterilna upala je uzrok ili važan čimbenik gotovo svake bolesti povezane sa starenjem, uključujući, između ostalih, Alzheimerovu bolest, dijabetes, aterosklerozu, osteoartritis i tumore (Ferrucci i sur. 2004; Vasto i sur. 2007).

1.2.2. Uloge senescencije

Istraživanja su pokazala da je senescencija složen i evolucijski očuvan proces te da ima važnu ulogu u embrionalnom razvoju, zacjeljivanju rana, popravku tkivnih oštećenja, razvoju tumora i starenju (Baker i sur. 2011; Jun i Lau, 2010; Krizhanovsky i sur. 2008; Rajagopalan i Long, 2012). Prema kinetici indukcije i funkciji samog procesa, stanična senescencija se može podijeliti na akutnu i kroničnu senescenciju (slika 3).



Slika 3. Akutna i kronična senescencija. Model prema kojem se senescentne stanice dijele u dva razreda na temelju kinetike indukcije i funkcije procesa senescencije (preuzeto i prilagođeno iz van Deursen, 2014).

Indukcija senescencije u embrionalnom razvoju, zacjeljivanju tkiva i popravku tkivnih oštećenja je programirani proces potaknut specifičnim stimulansom koji cilja određeni tip stanica a naziva se akutna senescencija. Uklanjanje senescentnih stanica nastalih u ovim procesima je vrlo učinkovito i vremenski strogo kontrolirano (Jun i Lau, 2010; Krizhanovsky i sur. 2008; Storer i sur. 2013).

U kontekstu starenja i razvoja bolesti povezanih sa starenjem, stanice s vremenom akumuliraju molekularna oštećenja koja su posljedica utjecaja različitih stresova kao što su oštećenja DNA i skraćivanje duljine telomera, epigenetske promjene, agregacija proteina, disfunkcija jezgrine lamine i dr. (Childs i sur. 2015). S vremenom kod sve više takvih stanica dolazi do trajnog zastoja staničnog ciklusa i one ulaze u senescenciju koja se naziva kronična senescencija. Istraživanja su pokazala da kronična senescencija nije programirani proces i ne cilja specifične stanice kao što je to slučaj kod akutne senescencije (van Deursen, 2014).

Sa starenjem dolazi do akumulacije starih stanica u organizmu, unatoč proinflatornoj prirodi SASP-a kojom senescentne stanice mobiliziraju stanice urođene imunosti i sposobnosti imunološkog sustava da ih efikasno eliminira (Campisi, 2005; Kang i sur. 2011). Jedno od mogućih objašnjenja je da se sa starenjem, između ostalog, narušava i funkcija imunološkog sustava (McElhaney i Effros, 2009) što čini stariju populaciju podložniju različitim infekcijama, ali i onemogućava učinkovito uklanjanje senescentnih stanica iz organizma (Campisi, 2013). Također je moguće da se s vremenom povećava frekvencija nastanka senescentnih stanica zbog povećane stope oštećenja DNA, onkogenih mutacija i/ili nekih drugih čimbenika koji induciraju senescenciju (Campisi, 2013). Tome u prilog idu istraživanja koja su pokazala da se u starim tkivima kontinuirano nakupljaju stanice pozitivne za fokuse DNA oštećenja kakvi se pronalaze i u senescentnim stanicama (Hewitt i sur. 2012). Osim navedenog, također je moguće da neke komponente SASP-a omogućuju starim stanicama da izbjegnu prepoznavanje i eliminaciju od strane imunološkog sustava (Coppé i sur. 2010; Freund i sur. 2010).

1.2.3. Utjecaj senescentnih stanica na okolno tkivo

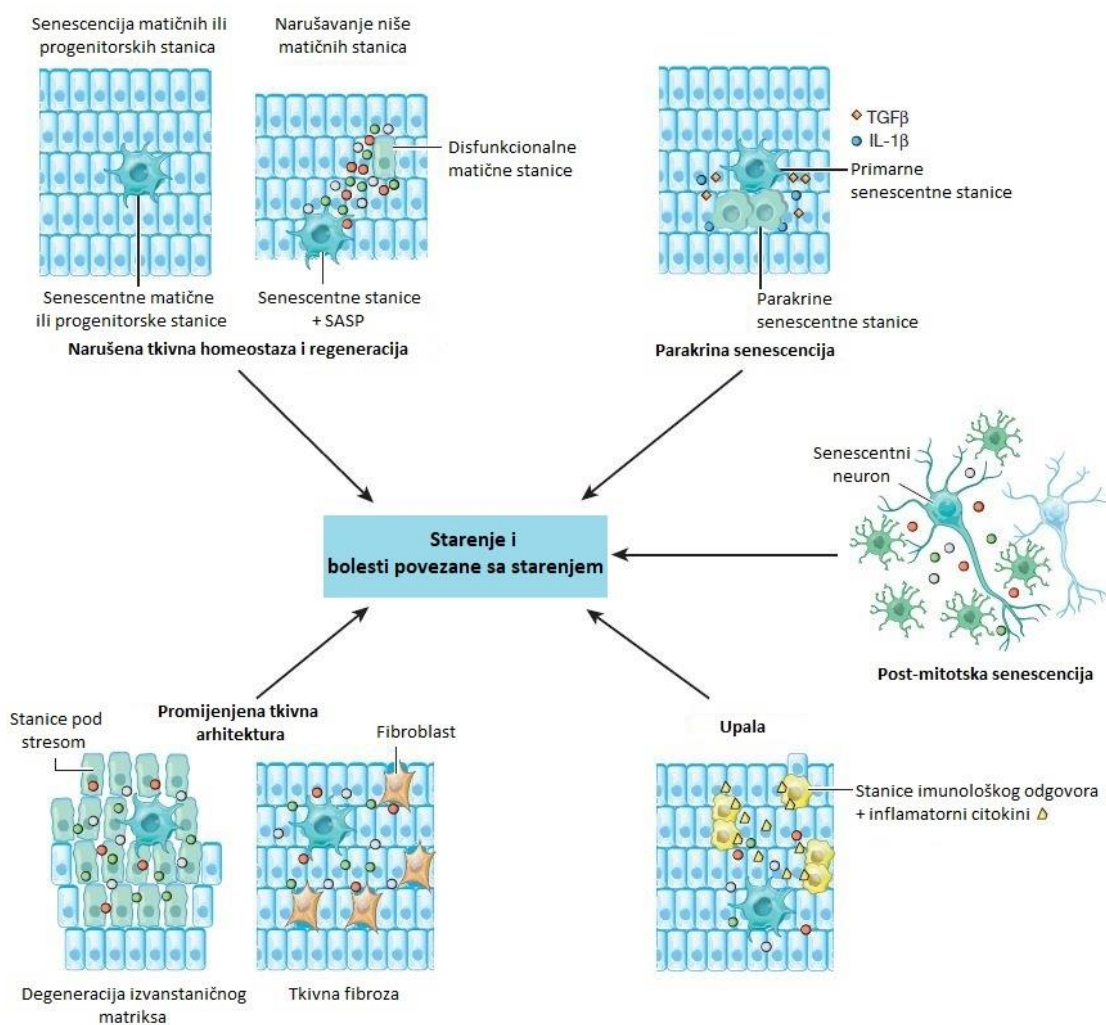
Dva su osnovna mehanizma (Krtolica i Campisi, 2002) kojima senescentne stanice narušavaju homeostazu i funkciju tkiva i organa:

- i) akumulacija starih stanica koja rezultira gubitkom regeneracije tkiva
- ii) smanjenje funkcije matičnih stanica pod utjecajem narušenog mikrookoliša.

Akumulacija starih stanica dovodi do tkivne disfunkcije. Ključnu ulogu u tom procesu imaju brojni faktori SASP-a (Campisi i sur. 2011). Stare stanice kronično luče različite proteaze koje dovode do promjene tkivne strukture i organizacije (slika 4) cijepanjem različitih membranskih receptora, signalnih liganada, proteina izvanstaničnog matriksa ili drugih komponenti tkivnog mikrookoliša (Coppé i sur. 2008). Interleukini IL-6 i IL-8, također komponente SASP-a, mogu inducirati tkivnu fibrozu u određenim epitelnim tkivima (Laberge i sur. 2012). Kronična sterilna upala razvija se s akumulacijom starih stanica (slika 4), karakterizirana je infiltracijom makrofaga i limfocita, fibrozom i staničnom smrću i uzrok je nastanka brojnih bolesti povezanih sa starenjem (Freund i sur. 2010; Xu i sur. 2015). Zajedničkim djelovanjem metaloproteinaza matriksa i proinflammatoryh komponenti SASP-a stvara se tkivni mikrookoliš koji potiče preživljavanje, proliferaciju i širenje neoplastičnih stanica i jedno je od mogućih objašnjenja povećane incidencije tumora kod starije populacije (Campisi, 2013). Uz sve navedeno, SASP također može pojačati tkivnu disfunkciju parakrinom senescencijom (slika 4), mehanizmom kojim stare stanice sekrecijom IL-1b, TGFb i određenih kemokinskih liganada induciraju senescentni fenotip u zdravim susjednim stanicama (Acosta i sur. 2013; Nelson i sur. 2012).

Drugi mehanizam odgovoran za starenje organizma je progresivno smanjenje aktivnosti matičnih stanica izazvano akumulacijom starih stanica u njihovom okolišu i promijenjenim svojstvima izvanstaničnog matriksa. Promjene koje se u tkivu odvijaju sa starenjem imaju štetan učinak na matične stanice te, bez obzira na stalnu prisutnost telomeraze u njima, mnoge matične i progenitorske stanice odraslog organizma ne mogu zadržati kontinuitet dioba (Chen, 2004; Geiger i Van Zant, 2002; Park i sur. 2004; Villa i sur. 2004). Gubitak funkcije matičnih stanica dokazan je u brojnim tkivima i eksperimentalnim sustavima (Flores i sur. 2006), a povezuje se s postupnom akumulacijom starih stanica i njihovim štetnim utjecajem širenja senescentnog fenotipa na susjedne stanice. Ovi događaji dovode do narušavanja funkcije matičnih stanica što

onemogućava pravilnu regeneraciju tkiva, a može doći i do iscrpljivanja zalihe matičnih stanica (Flores i sur. 2008; Tomás-Loba i sur. 2008). Tako npr. kod jako starih osoba samo mali broj matičnih stanica sudjeluje u stvaranju krvi (Holstege i sur. 2014). Sve navedene promjene dovode do razvoja simptoma starenja, pojave nestabilnih stanica i potencijalne indukcije karcinoma (Rudolph i sur. 1999; Wong i Collins, 2003).



Slika 4. Mehanizmi kojima stanična senescencija narušava homeostazu tkiva i organa (preuzeto i prilagođeno iz van Deursen, 2014).

1.3. Povezanost telomera, mitohondrija i starenja

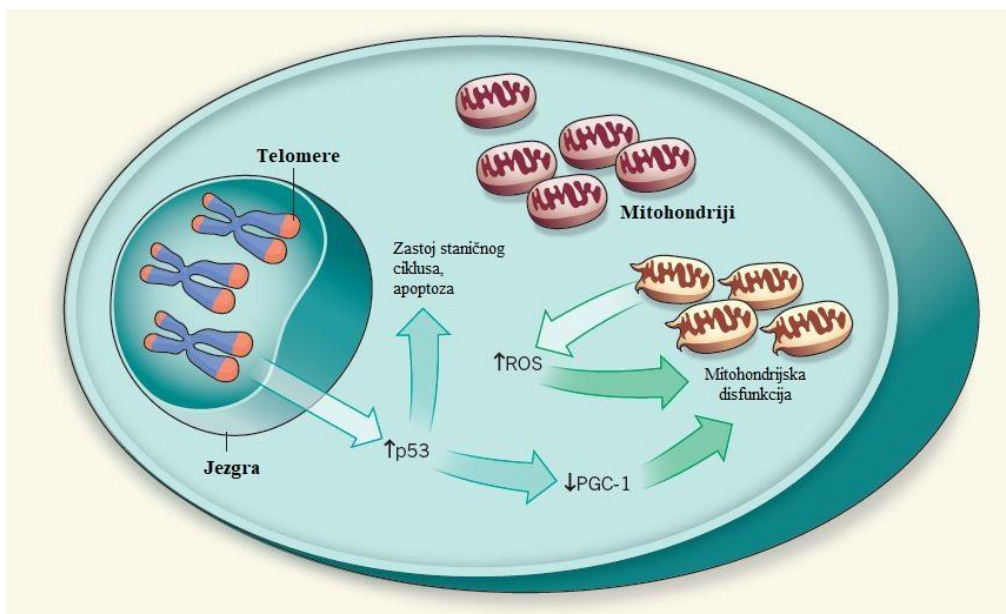
Utjecaji starenja na organizam su brojni, dovode do progresivnog narušavanja funkcija organa i u konačnici su pogubni za organizam. Od svih teorija koje su pokušale objasniti stanično starenje, danas su najprihvaćenije dvije; genetička teorija skraćivanja telomera, i teorija oštećenja slobodnim radikalima koji nastaju kao produkt metabolizma. Teorije opisuju događaje u dva stanična organela – jezgri i mitohondrijima, a veza između ta dva mehanizma do nedavno je bila nepoznata (Kelly, 2011).

Prema telomernoj teoriji starenja, progresivni gubitak funkcije telomera dovodi do kronične aktivacije proteina p53 koji zaustavlja stanični ciklus i inducira apoptozu (Karlseeder i sur. 1999). Iako je stanična replikacija glavni uzrok skraćivanja duljine telomera, i drugi faktori mogu utjecati na brzinu kojom se one skraćuju. Brojna istraživanja su pokazala da se telomere brže skraćuju kad su izložene blagom oksidativnom stresu što dovodi do smanjene replikativne sposobnosti stanica i fenotipa koji nalikuje replikativnoj senescenciji (Saretzki i sur. 2003; von Zglinicki, 2002; von Zglinicki i sur. 1995). Također je pokazano da je antioksidativni kapacitet stanice u korelaciji s njezinim replikacijskim potencijalom i brzinom skraćivanja telomera (Richter i von Zglinicki, 2007), što upućuje na direktnu povezanost brzine skraćivanja telomera i razine unutarstaničnog oksidativnog stresa.

Mitohondrijska teorija starenja predlaže da se mutacije progresivno nakupljaju u mitohondrijskoj DNA i s vremenom dolazi do disfunkcije mitohondrija (Balaban i sur. 2005; Wallace, 2005). Posljedice su posebno kobne za neproliferirajuće stanice u organima koji imaju minimalnu sposobnost regeneracije, kao što su srce i mozak. Istraživanja su također pokazala da se broj i aktivnost glavnih regulatora funkcije mitohondrija smanjuje sa starenjem što dodatno doprinosi mitohondrijskoj disfunkciji (Finley i Haigis, 2009).

Istraživanje koje su prije nekoliko godina proveli Sahin i sur. (2011) otkrilo je direktnu vezu između telomera, mitohondrija i produkcije reaktivnih kisikovih vrsta u organizmu te njihove zajedničke uloge u procesu starenja. Otprije je poznato da aktivacija proteina p53 inducirana kritično kratkim telomerama zaustavlja stanični ciklus (d'Adda di Fagnana i sur. 2003), a ovim istraživanjem otkriveno je da na taj način aktivirani p53 također smanjuje ekspresiju PGC1 α i β (slika 5). Budući da su PGC1 α i β glavni regulatori mitohondrijske fiziologije i metabolizma, smanjenje njihove ekspresije dovodi do slabljenja funkcije mitohondrija i posljedično do povećane proizvodnje ROS-a koji oštećuju mitohondrijsku DNA i

time dodatno narušavaju funkciju mitohondrija (Sahin i sur. 2011). Reaktivne kisikove vrste su normalni intermedijeri u biokemijskim reakcijama unutarstaničnih signalnih puteva. U niskim do umjerenim koncentracijama su blagotvorni kao ključni faktori u raznim fiziološkim procesima, dok visoke koncentracije ROS-a djeluju negativno i izazivaju oksidativni stres koji dovodi do ubrzanog skraćivanja telomera te je jedan od glavnih uzroka ubrzane senescencije (Colavitti i Finkel, 2005).

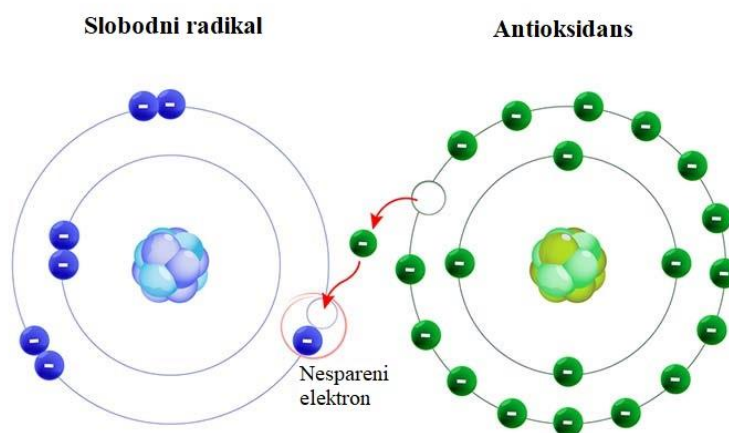


Slika 5. Jezgra, mitohondriji i senescencija. Kritično kratke telomere aktiviraju protein p53 koji zaustavlja stanični ciklus te smanjuje ekspresiju PGC1 α i β što dovodi do slabljenja funkcije mitohondrija i posljedično do povećane proizvodnje ROS-a (preuzeto i prilagođeno iz Kelly, 2011).

1.4. Antioksidansi

Radi prevencije oksidativnog stresa, organizam je opremljen antioksidativnim obrambenim sustavom koji čine endogene i egzogene obrambene molekule. Enzimatski antioksidansi, kao što su tiol peroksidaze, superoksid dismutaze i katalaze, i neenzimatski antioksidansi, kao što je glutation, dio su endogenog antioksidativnog obrambenog sustava organizma. Vanjski faktori se konzumiraju hranom a čine ih spojevi kao što su npr. vitamini, minerali, polifenoli i omega-3 masne kiseline (Höhn i sur. 2016).

Kao što je ranije navedeno, oksidativni stres ima znatan utjecaj na brzinu skraćivanja telomera, stoga se pretpostavlja da višak oksidansa može biti neutraliziran s antioksidansima (slika 6), spojevima koji mogu donirati elektrone i na taj način neutralizirati slobodne radikale u stanici (Sies, 1997).



Slika 6. Mehanizam djelovanja antioksidansa (preuzeto i prilagođeno s www.stylecraze.com).

1.4.1. Melatonin

Melatonin, indolamin koji se proizvodi u mnogim organima, uključujući i epifizu, prvotno je karakteriziran kao hormon uključen u regulaciju cirkadijalnog ritma fizioloških i neuroendokrinih funkcija (Reiter, 1993). Kasnija istraživanja pokazala su da melatonin i njegovi metabolički derivati imaju sposobnost neutralizacije slobodnih radikala što ih čini učinkovitim antioksidansima reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta (Reiter i sur. 2002; Tan i sur. 2007). Mehanizmi kojima melatonin štiti organizam od slobodnih radikala i oksidativnog stresa su neutralizacija slobodnih radikala, indukcija ekspresije enzimatskih antioksidansa, redukcija

aktivacije prooksidacijskih enzima i održavanje mitohondrijske homeostaze (Barlow-Walden i sur. 1995; Pablos i sur. 1998). Istraživanja su pokazala da melatonin svojim djelovanjem smanjuje oksidativno oštećenje lipida, proteina i DNA u različitim uvjetima u kojima se zna da nastaju toksični derivati kisika (Zhang i Zhang, 2014). Velika većina istraživanja pokazala je da melatonin ima antioksidativna svojstva, međutim, nekoliko istraživanja na staničnim kulturama pokazalo je da također može potaknuti stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta u nekim tumorskim, ali i normalnim stanicama (Albertini i sur. 2006; Büyükcavci i sur. 2006; Radogna i sur. 2009). Osim antioksidativnih, melatonin ima i protuupalna svojstva pri čemu modulira odgovor imunološkog sustava regulacijom proliferacije imunokompetentnih stanica (Demas i Nelson, 1998; Sze i sur. 1993) i sekrecijom imunoloških medijatora kao što su citokini (Carrillo-Vico i sur. 2006). Pokazano je da s vremenom razina melatonina u cirkulaciji pada te se smatra da je to jedan od uzroka brojnih zdravstvenih stanja povezanih sa starenjem (Arlt i Hewison, 2004).

1.4.2. Resveratrol

Resveratrol je biljni flavonoid koji aktivira protein SIRT1, regulator važnih metaboličkih i fizioloških procesa kao što su proizvodnja glukoze i inzulina, metabolizam masti i stanično preživljavanje (Baur i sur. 2006). Istraživanja su pokazala da resveratrol produžuje životni vijek evolucijski udaljenih vrsta, uključujući *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* i *Drosophila melanogaster* na način ovisan o Sir-2 (Howitz i sur. 2003; Viswanathan i sur. 2005; Wood i sur. 2004). Također je dokazano da ima antioksidativno i protuupalno djelovanje te pozitivan utjecaj na zdravlje sisavaca (Baur i sur. 2006; Vitseva i sur. 2005). Resveratrol odgađa senescenciju na staničnoj razini, usporava skraćivanje duljine telomera i povećava telomeraznu aktivnost kod glodavaca, međutim ne produljuje njihov životni vijek, niti životni vijek animalnog modela koji preuranjeno stari (Labbé i sur. 2011; da Luz i sur. 2012). Istraživanja su pokazala da kod ljudi resveratrol smanjuje oksidativni stres i ublažava upalu, smanjuje rizik od kardiovaskularnih bolesti i dijabetesa (Smoliga i sur. 2011).

1.5. Koža – model za istraživanje tkivne homeostaze u starenju i regeneraciji

Koža je najveći organ ljudskog tijela kojemu pruža zaštitu te ima osjetilnu i regulatornu ulogu (Blanpain i Fuchs, 2006). Starenje kože je multifaktorijalan proces upravljan različitim vanjskim i unutarnjim čimbenicima. Najvažniji vanjski faktori su UV zračenje, temperatura, vlaga i različiti mehanički utjecaji, dok su unutarnji faktori genetički te oni djeluju na staničnoj razini (McCullough i Kelly, 2006). Koža je kompleksan organ koji se sastoji od nekoliko odjeljaka koji imaju različite funkcije.

1.5.1. Epidermis

Vanjski sloj kože, epidermis, podijeljen je u 4 podsloja: bazalni, trnasti, zrnati i rožnati sloj. Prevladavajući tip stanica u epidermisu čine keratinociti (slika 7), a dermo-epidermalna bazalna membrana dijeli ga od dermisa. Sa starenjem dolazi do stanjivanja epidermisa uzrokovanog smanjenom proliferacijom i regenerativnim potencijalom bazalnih keratinocita i smanjenim brojem epidermalnih matičnih stanica (Wang i Dreesen, 2018). Istraživanja su pokazala da su matične stanice kože osjetljive na promjene koje se sa starenjem odvijaju u organizmu te da pritom pada njihov regenerativni potencijal (Doles i sur. 2012).

1.5.2. Dermis

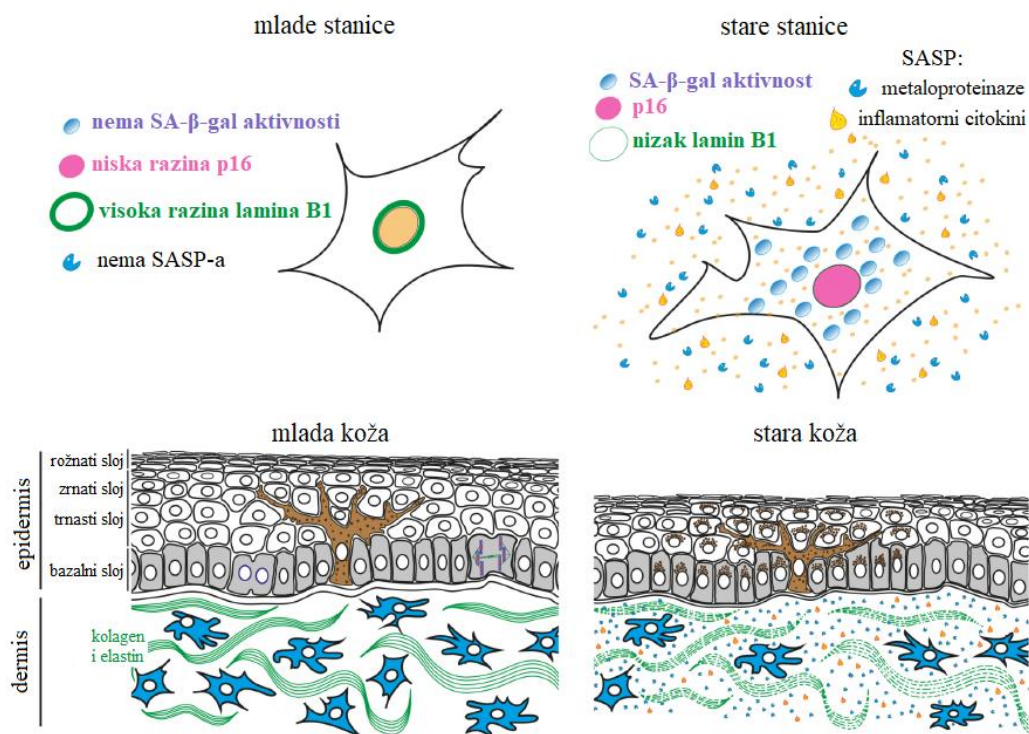
Dermis se većim dijelom sastoji od vezivnog tkiva, kolagena i elastina, u koji su uklopljeni dermalni fibroblasti (slika 7) i razne strukture kao što su žlijezde lojnice i znojnice, limfne žile, živci i korijen kose, odnosno dlake. Kolageni koži daju čvrstoću, dok elastinska vlakna doprinose njezinoj elastičnosti i rastezljivosti (Farage i sur. 2007). Istraživanja su pokazala da sa starenjem u koži nastupa generalna atrofija izvanstaničnog matriksa i dolazi do smanjenja broja fibroblasta koji su karakterizirani oslabljenom sposobnošću sinteze (Makrantonaki i Zouboulis, 2007; Varani i sur. 2001).

Kolagen je najzastupljeniji protein u ljudskom tijelu i osnovna strukturna komponenta dermisa, stoga promjene kolagena imaju ključnu ulogu u starenju kože (Baumann, 2007). Kolagenski snopovi su u mladoj koži pravilno organizirani i pružaju joj strukturnu čvrstoću i, u kombinaciji s elastinom, elastičnost. U staroj koži raste gustoća postojećih kolagenskih snopova

(Lavker i sur. 1987) pri čemu oni gube svoju rastezljivost, fragmentirani su, slabije topivi i narušena im je organizacija (Gniadecka i sur. 1994; Uitto, 1986). Detaljnom analizom kolagenskih snopova elektronskom mikroskopijom otkiveno je da u staroj koži pakiranje fibrila u snopovima nije čvrsto kao u mladoj koži već da dolazi do njihovog odmatanja (Lavker i sur. 1987). Također, sa starenjem se smanjuje sinteza kolagena (Shuster i sur. 1975) što dovodi do pomaka u ravnoteži između sinteze i degradacije kolagena (Varani i sur. 2006).

Koža je iznimno bogata elastinom koji se također znatno mijenja u procesu starenja. S vremenom dolazi do spontane i progresivne degradacije elastinskih vlakana u koži (Lavker i sur. 1987) te postojeći elastin progresivno kalcificira (Boss i Seegmiller, 1981).

Promjena mehaničkih svojstava kože je posljedica i razgradnje proteina postojećeg izvanstaničnog matriksa, uključujući kolagene tipa I, III, IV i VII, fibronektin, elastin i fibrilin, od strane enzima metaloproteinaza matriksa koje pojačano ekspimiraju stare stanice (Chakraborti i sur. 2003).

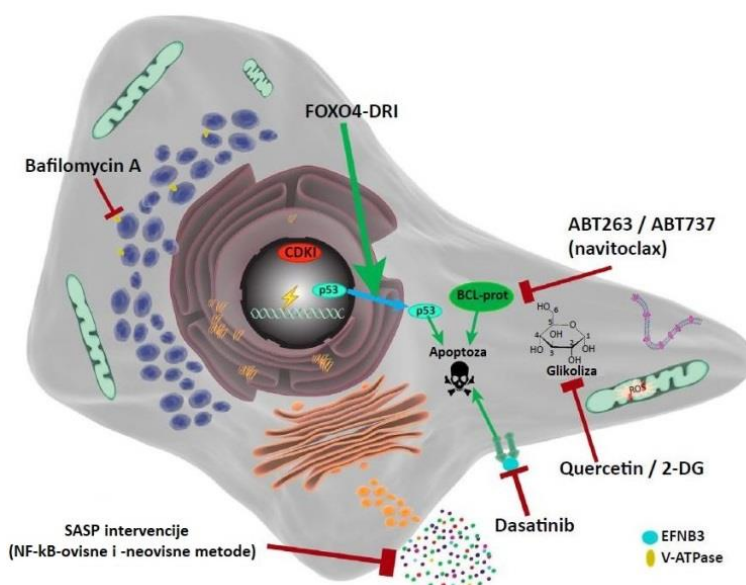


Slika 7. Shematski prikaz mlade i stare kože i promjena koje se sa starenjem odvijaju u koži (preuzeto i prilagođeno iz Wang i Dreesen, 2018).

1.6. Strategije za uklanjanje senescentnih stanica iz organizma

Stanična senescencija je uključena u brojne biološke procese, a zbog svoje uloge u razvoju tumora i starenja postala je važna terapijska meta. Strategije ciljanja starih stanica temelje se na brojnim karakteristikama koje stanice ispoljavaju nakon ulaska u senescenciju (slika 8). Posljednjih godina aktivno se razvijaju dva glavna pristupa za uklanjanje starih stanica iz organizma:

- i) specifična eliminacija senescentnih stanica
- ii) inhibicija SASP-a.



Slika 8. Strategije za uklanjanje senescentnih stanica iz organizma (preuzeto i prilagođeno iz Hernandez-Segura i sur. 2018)

Prvi pristup temelji se na identifikaciji senolitika, spojeva koji mogu ciljano inducirati apoptozu u senescentnim stanicama. Budući da je rezistencija na apoptozu jedna od glavnih značajki senescentnih stanica, mehanizmi koji omogućuju rezistenciju apoptoze su odabrane mete senolitika. U posljednjih nekoliko godina otkriveno je više spojeva koji specifično uklanjaju senescentne stanice te je time napravljen velik iskorak u borbi protiv starenja. Među otkrivene senolitike tako spadaju spojevi ABT263 (Chang i sur. 2016) i ABT737 (Yosef i sur. 2016) koji inhibiraju različite članove porodice antiapoptotskih proteina Bcl-2; FOXO4-DRI,

peptid koji spriječava interakciju FOXO4 s p53 i time omogućuje ekskluziju p53 iz jezgre koji onda inducira apoptozu (Baar i sur. 2017); koktel dasatiniba, protutumorskog lijeka i kvercetina, polifenola koji ima različite funkcije, uključujući inhibiciju kinaze Pi3K (Xu i sur. 2018). Navedenim istraživanjima pokazano je da je moguća borba protiv starenja, međutim, svi ovi spojevi mogu biti i toksični za organizam što može ograničiti njihovu primjenu kod ljudi. Također, bitno je naglasiti da senolitici ciljaju sve senescentne stanice i ne mogu razlikovati programiranu (akutnu) i štetnu (kroničnu) senescenciju (Hernandez-Segura i sur. 2018).

Drugi pristup temelji se na uklanjanju štetnog djelovanja SASP-a. Budući da je NF- κ B glavni pokretač SASP-a, direktna inhibicija njegovog djelovanja ili neutralizacija nekih članova njegovog metaboličkog puta je efikasan način kako bi se reducirala ekspresija proinflammatornih faktora senescentnih stanica (Soto-Gamez i Demaria, 2017). Tvari kao rapamicin, resveratrol i metformin su pokazale određenu sposobnost da reduciraju SASP. Najveće ograničenje inhibitora SASP-a je to što nisu specifični za senescentne stanice, a većina tih spojeva su protuupalni lijekovi i izrazito su toksični ako ih se dugo vremena uzima. Osim toga, umjereni SASP može u pojedinim situacijama imati i pozitivnu ulogu u organizmu, a većina trenutno poznatih modulatora SASP-a ne može razlikovati njegovu pozitivnu od štetne uloge u organizmu (Hernandez-Segura i sur. 2018).

1.7. Ciljevi istraživanja

Glavni cilj ovog istraživanja je analiza starenja i intervencija u taj proces na animalnom modelu štakora.

U prvom, sistemskom pristupu, cilj je istražiti utjecaj resveratrola i melatonina na starenje organizma. Korištenjem telomera kao biomarkera kumulativnog oksidativnog stresa i starenja pokazat ćemo poboljšava li se antioksidativni status organizma i smanjuje li se stresom inducirano starenje.

U drugom pristupu koji je lokalnog karaktera cilj je povećati udio mladih stanica u koži starog štakora kako bi se smanjio negativan utjecaj akumulacije starih stanica i njihovog sekretornog fenotipa na okolno tkivo te ispitati da li se promijenila tkivna homeostaza i revitaliziralo tretirano tkivo.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

2.1.1. Osnovne kemikalije

agaroza (Sigma), agaroza za gel-elektroforezu u pulsirajućem polju (Bio-Rad), blokirajući reagens (Roche), CDP-Star (Roche), etanol (Kemika), etidijev bromid (Roth), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (Kemika), fiksir za autoradiografske filmove (Fotokemika), izopropanol (Kemika), kalijev fericijanid ($K_3Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$) (Kemika), kalijev ferocijanid ($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$) (Kemika), kloridna kiselina (HCl) (Kemika), magnezijev klorid ($MgCl_2$) (Fluka), maleinska kiselina (Sigma), natrijev acetat (NaAc) (Kemika), natrijev citrat dihidrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) (Kemika), natrijev dodecilsulfat (SDS) (Sigma), natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4) (Kemika), natrijev hidroksid (NaOH) (Kemika), natrijev klorid (NaCl) (Kemika), razvijач za autoradiografske filmove (Fotokemika), rentgenski film (Roche), Tris-(hidroksimetil)-aminometan (Tris) (Sigma), Tween 20 (Promega)

2.1.2. Kompleti

Komplet za izolaciju ukupne DNA iz animalne krvi, tkiva i stanica: DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)

Komplet za pročišćavanje produkata lančane reakcije polimerazom: QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)

2.1.3. Enzimi, proteini, protutijela i nukleotidi

HinfI restrikcijska endonukleaza (Roche)

RsaI restrikcijska endonukleaza (Roche)

Taq DNA polimeraza (Fermentas)

DNA biljeg II, DIG-obilježen (Roche)

Proteinaza K (Qiagen)

Ribonukleaza A (Qiagen)

Tripsin (Sigma)

Glikogen (Invitrogen)

dNTP-ovi (Sigma)

Protu-DIG-AP konjugat (Roche)

Protu-Ki67 protutijelo (Abcam)

Protu-Collagen I protutijelo (Abcam)

Protu-Collagen III protutijelo (Abcam)

2.1.4. Hranjiva podloga za uzgoj stanica

Dulbecco modificirani minimalni medij (engl. Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM,) s 4500 mg/l glukoze, L-glutaminom, fenolnim crvenilom i 3,7 g/l NaHCO₃, obogaćen s 10% telećeg fetalnog seruma (engl. Fetal Bovine Serum, FBS)

2.1.5. Organizmi

2.1.5.1. Animalni modeli

Štakori Wistar – modelni soj štakora korišten za eksperimente dugotrajnog učinka antioksidansa melatonina i resveratrola na promjenu dinamike starenja. Pokusne skupine sastoje se od 4 životinje.

Štakori Fisher 344 – izogena linija štakora korištena za eksperimente heterotransplantacije stanica i promjenu udjela mladih i starih stanica u koži starih štakora. Pokusne skupine sastoje se od 3 životinje.

2.1.5.2. Primarne stanične kulture

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

2.2. Metode

2.2.1. Tretman štakora Wistar antioksidansima

Za ispitivanje dugotrajnog učinka antioksidansa melatonina i resveratrola na dinamiku starenja štakora Wistar, životinje su svakodnevno pile melatonin ili resveratrol *ad libitum*, otopljen u 0,1% vodenoj otopini etanola, u koncentraciji 10 mg/l što odgovara prosječnom dnevnom unosu od ~1 mg/kg tjelesne težine. Kontrolne životinje pile su 0,1% vodenu otopinu etanola. Životinje su nakon 3. mjeseca života svakodnevno tretirane melatoninom ili resveratrolom, u trajanju od 9 ili 21 mjesec. Sve pokusne skupine sastojale su se od 4 životinje.

2.2.2. Prikupljanje i pohrana uzoraka

Po završetku tretmana životinje su žrtvovane te su prikupljeni uzorci jetre i bubrega. Pri uzorkovanju su odvojena tri različita dijela bubrega te se kasnije svaki dio zasebno analizirao:

- i) kora bubrega
- ii) vanjski tračak vanjske srži bubrega
- iii) unutarnji tračak vanjske srži bubrega i unutarnja srž.

Uzorci su pohranjeni na -80°C za kasnije analize.

2.2.3. Izdvajanje genomske DNA iz uzoraka jetre i bubrega

Genomska DNA iz prikupljenih uzoraka jetre i bubrega izolirana je korištenjem kompleta za izolaciju ukupne DNA iz animalne krvi, tkiva i stanica (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen).

2.2.4. Hibridizacija po Southern-u

Hibridizacija po Southern-u omogućava identifikaciju specifičnog slijeda nukleotida u DNA pomoću hibridizacije sa specifično obilježenom sondom. Mjesto vezanja sonde pokazuje poziciju traženih DNA fragmenata.

2.2.4.1. Obilježavanje telomerne sonde lančanom reakcijom polimerazom bez kalupa

Telomerna DNA, korištena kao hibridizacijska sonda za dobivanje signala ukupnih telomernih duljina, obilježena je digoksinom u lančanoj reakciji polimerazom bez kalupa (engl. *non template PCR*). U ovoj metodi korištene su početnice specifične za telomerni slijed DNA:

tel4 (CCCTAA)₄

tel5 (TTAGGG)₄

Tablica 1. Sastav reakcijske smjese u lančanoj reakciji polimerazom, ukupnog volumena 50 μ l.

PCR smjesa	V (μ l)
Tel4 početnica (10 μ M)	2,8
Tel5 početnica (10 μ M)	2,8
10X Taq pufer	5
2 mM dNTP mix + dig-dUTP	10
25 mM MgCl ₂	8
Taq 0,5 U/ μ l	3
H ₂ O	18,4

Amplifikacija se odvijala prema sljedećem programu:

95°C 1 minuta	}	30 ciklusa
55°C 1 minuta i 40 sekundi		
72°C 1 minuta i 50 sekundi		
72°C 7 minuta		

2.2.4.2. Metoda TRF (engl. Terminal Restriction Fragment)

Metoda TRF korištena je za analizu duljine ukupnih telomera. Temelji se na cijepanju genomske DNA restriktivnim endonukleazama koje cijepaju često u genomu, a ne cijepaju telomernu DNA. Takve endonukleaze su *RsaI* i *HinfI* koje prepoznaju slijed od četiri nukleotida. Cijepana su 2 µg DNA s restriktivnim enzimima *RsaI* i *HinfI*, a inkubacija se odvijala na 37 °C preko noći. Nakon cijepanja, DNA je pretaložena i pripravljena za razdvajanje na gelu.

2.2.4.3. Elektroforeza PFGE (engl. Pulsed-Field Gel Electrophoresis)

Elektroforeza PFGE je metoda koja omogućuje razdvajanje dugačkih molekula DNA, a temelji se na periodičnoj izmjeni smjera električnog polja. Genomska DNA, pocijepana s restriktivnim enzimima *RsaI* i *HinfI* te pretaložena, nanešena je na 1%-tni agarozni gel u količini od 1,2 µg i razdvojena elektroforezom PFGE.

Tablica 2. Uvjeti elektroforeze PFGE.

1%-tni agarozni gel
0,5X TBE
6 V/cm
1-30 sekundi
120°
14°C
7 sati

2.2.4.4. Kapilarni prijenos DNA s gela na membranu i hibridizacija s DNA sandom obilježenom digoksigeninom

Nakon završetka elektroforeze slijedila je depurinacija gela u trajanju od 5 minuta u 0,25 M HCl. Potom je slijedila denaturacija 2 puta po 15 minuta u 0,5 M NaOH i 1,5 M NaCl i neutralizacija 2 puta po 15 minuta u 0,5 M Tris HCl-u pH 7,5 i 3 M NaCl. Gel je zatim kratko ispran u puferu 2X SSC (3 M NaCl, 0,3 M natrijev citrat), a prijenos DNA na membranu se

odvijao preko noći u 20X SSC. Ujutro je membrana kratko isprana u 2X SSC i zapečena 30 minuta na 120°C.

Membrana je stavljena u stakleni tubus te joj je dodana prehibridizacijska otopina (0,25 M Na₂HPO₄ pH 7,2, 1 mM EDTA, 20% SDS) zagrijana na ~60°C nakon čega je slijedila prehibridizacija 2 sata na 68°C. Zatim je slijedila hibridizacija preko noći na 68°C, u hibridizacijskoj otopini koja je sadržavala digoksigeninom obilježenu sondu koncentracije ~15 ng/ml. Sutradan je odstranjena hibridizacijska otopina i isprana nespecifično vezana sonda korištenjem pufera za predispiranje (20 mM Na₂HPO₄, 1 mM EDTA, 1% SDS) 3 puta po 20 minuta na 65°C. Membrana je zatim kratko isprana u kadici u puferu za ispiranje pH 8 (0,1 M maleinska kiselina, 3 M NaCl, 0,3% Tween 20) te je nakon toga inkubirana jedan sat u blokirajućem puferu (0,5% blokirajućeg reagensa u puferu za ispiranje) uz neprestano miješanje. Slijedila je inkubacija membrane s protu-DIG-AP konjugatom u blokirajućem puferu u omjeru 1:20 000, 30 minuta. Kasnije je u novoj kadici membrana isprana 5 puta po 10 minuta u puferu za ispiranje kako bi se ispralo nevezano protutitijelo te je inkubirana dva puta po 5 minuta u supstratnom puferu (0,1 M NaCl 0,1 M Tris HCl pH 9,5). U tamnoj komori je CDP-Star razrijeđen u supstratnom puferu u omjeru 1:100 i nanešen na membranu. Nakon desetominutne inkubacije, na membranu je stavljen rentgenski film i eksponiran je po potrebi (između 1 i 5 minuta). Film je razvijen uranjanjem u razvijlač do pojave signala, kratko je ispran u vodi i fiksiran u univerzalnom fiksiru. Film je ispran pod mlazom tekuće i destilirane vode i ostavljen da se suši na zraku.

2.2.4.5. Detekcija telomernih signala i analiza duljine telomera

Intenzitet telomernih signala na rentgenskom filmu denzitometrijski je analiziran računalnim programom *Image Master VDS Software*. Time je dobivena informacija koja pokazuje ovisnost optičke gustoće (OD) o molekulskoj masi ukupnih telomernih duljina u parovima baza. Dobiveni sirovi podaci su korišteni za izračun prosječne duljine telomera u svakom uzorku korištenjem formule $\sum(OD_i - \text{pozadina}) / \sum(OD_i - \text{pozadina} / L_i)$ pri čemu je OD_i kemiluminiscentni signal, a L_i duljina fragmenta TRF na poziciji i.

2.2.5. Uspostava primarne kulture stanica kože štakora

Kako bi se uspostavila primarna kultura stanica kože štakora Fisher 344, novorođene jedinke starosti do 5 dana, su žrtvovane te su prikupljeni kožni eksplantati. Enzimatskom desegregacijom u 0,25%-tnoj otopini tripsina eksplantati su razlagani 2 puta po 30 minuta u inkubatoru na 37°C uz stalno miješanje. Po završetku svake inkubacije, razloženi komadići kože u otopini tripsina su centrifugirani 5 minuta na 500 g, supernatant je odbačen, a talog je resuspendiran u Dulbecco modificiranom minimalnom mediju (DMEM) obogaćenom s 10% telećeg fetalnog seruma (FBS) uz dodatak antibiotika (2,5X Penicilin/Streptomycin/Amfotericin B). Suspenzija je prebačena u kultivacijsku bočicu te je pohranjena u inkubator na 37°C s 5% CO₂.

2.2.6. Uzgoj stanica u kulturi

Izolirane stanice kože novorođenih štakora su održavane i presađivane u mediju DMEM uz dodatak 10% FBS i antibiotika (2,5X Penicilin/Streptomycin/Amfotericin B). Stanice su presađivane u sterilnim uvjetima kad bi dosegle 90%-tnu konfluentnost. Prije presađivanja je stanicama odstranjen medij te su isprane fiziološkom otopinom (0,9%-tna otopina NaCl) i tripsinizirane u 0,25%-tnoj otopini tripsina 10 minuta na 37°C. Nakon odvajanja stanica od podloge, tripsinizacija je zaustavljena dodavanjem medija sa serumom čime se inhibira aktivnost tripsina. Nakon toga su stanice resuspendirane i brojane na elektronskom brojaču (*Coulter Counter*) kako bi se odredio njihov srednji ukupni broj. Za dugotrajnu pohranu su stanice resuspendirane u mediju za smrzavanje (FBS i 5% DMSO) i postupno zaleđene na -80°C te su nakon nekoliko dana premještene u spremnik s tekućim dušikom.

2.2.7. Obilježavanje stanica bojom DiI

Karbocijaninska boja DiI (1,1-dioktadecil-3,3,3,3-tetrametilindolkarbocijanin perklorat) korištena je za obilježavanje staničnih membrana u svrhu praćenja stanica implantiranih u kožu starih štakora. Boja DiI je fluorescentna boja koja se integrira u plazma-membrane i membrane staničnih organela ugradnjom svoja dva duga ugljikovodična lanca (18 ugljika) u lipidni dvosloj

membrane. Boja DiI ima ekscitacijski maksimum na valnoj duljini od 549 nm, a maksimalnu emisiju ima u narančasto-crvenom dijelu spektra na valnoj duljini od 565 nm.

Bojanje s DiI 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.

Odgovarajući broj stanica, potreban za daljnje eksperimente mikro-transplantacije, je resuspendiran u mediju sa serumom kojemu je dodana boja DiI u konačnoj koncentraciji od 5 μM te je inkubacija trajala 20 minuta na 37°C u mraku. Stanice su zatim istaložene 5 minuta na 500 g, supernatant je odbačen, a stanični talog je 3 puta ispran u mediju sa serumom. Nakon posljednjeg taloženja je stanicama dodan medij bez seruma tako da je ukupni volumen stanične suspenzije 100 ili 200 μl , ovisno o veličini polja u koji se implantiraju stanice te broju stanica koje će se transplantirati.

2.2.8. Mikro-transplantacija stanica kože štakora

Mikro-transplantacija je metoda difuzne implantacije stanica u tkivo kože u svrhu istraživanja dinamike regeneracije kože te istraživanja mogućnosti kliničke primjene, a razvijena je u Laboratoriju za molekularnu i staničnu biologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu.

Za mikro-transplantaciju stanica korišten je aparat za tetoviranje (iStar 3000) koji omogućuje precizno obilježavanje polja te polaganje stanica unutar obilježenih polja na leđima štakora (slika 9a).

Prije tretmana životinje su anestetizirane (75 mg/kg Ketamin i 7,5 mg/kg Ksilazin, intraperitonealno). Široki nastavak s 11 igala korišten je za mikro-transplantaciju štakorskih fibroblasta prethodno obilježenih s DiI u označena polja na leđima štakora (slika 9b). Cijela površina polja je prijeđena nekoliko puta horizontalnim i vertikalnim potezima kako bi se postigla ravnomjerna raspoređenost stanica. Prilikom optimizacije eksperimenta u različitom je broju tretmana variran broj mikro-transplantiranih stanica (2, 4, 6 ili 8 milijuna stanica) na polju površine 1 cm^2 . Uvjeti koji su dali najuspješnije rezultate tijekom optimizacije (8 milijuna stanica, 1 tretman) su kasnije korišteni u eksperimentima kojima se ispitivao utjecaj mladih stanica na homeostazu i regeneraciju starog tkiva kože. Štakori su nakon tretmana ostavljeni da im koža zacijeli barem 2 tjedna prije uzorkovanja.

a)



b)



Slika 9. Mikro-transplantacija stanica u kožu štakora. a) Precizno označena polja željene veličine na leđima štakora. b) Precizna i kontrolirana mikro-transplantacija stanica u kožu štakora.

2.2.9. Uzorkovanje i priprema preparata kože

Štakori su prije uzorkovanja anestetizirani (75 mg/kg Ketamin i 7,5 mg/kg Ksilazin, intraperitonealno). Sa svakog štakora su uzeta tri različita uzorka; netretirano tkivo (negativna kontrola; NK), mehanički tretirano tkivo (mehanička kontrola; MK) te tkivo tretirano mladim stanicama (TT). Tkivo kože je odstranjeno s leđa štakora izrezivanjem obilježenih polja koja su zatim podijeljena na manje dijelove kako bi se pohranila na različite načine, ovisno o potrebama kasnijih analiza. Dio uzoraka je fiksiran i uklopljen u parafin, dok je dio uzoraka odmah nakon eksplantacije brzo smrznut u tekućem dušiku i uklopljen u medij za smrzavanje O.C.T. (Optimal Cutting Temperature Compound, Sakura).

2.2.9.1. Uklapanje tkiva u parafin

Uzorci za uklapanje u parafin su isprani u fiziološkoj otopini, kratko osušeni na papiru i stavljeni u puferirani neutralni 10% formalin (10% NBF) na prekonoćnu fiksaciju na sobnoj temperaturi. Fiksacija omogućava stabilizaciju, odnosno križno povezivanje proteina u tkivu, čime se očuvaju morfološke strukture i molekularni sastav tkiva. Nakon fiksacije je slijedila dehidracija u uzlaznom nizu koncentracije etilnog alkohola (70% - 100%) čime se zamjenjuje voda u tkivu organskim otapalom. Zatim je slijedilo prosvjetljavanje u ksilenu kako bi se tkivo proželo otapalom za parafin i na kraju su uzorci uklopljeni u otopljeni parafin. Parafin prodire u stanice i sve međustanične prostore što rezultira otvrdnutim tkivom koje je spremno za rezanje i trajno je sačuvano za buduće analize.

2.2.9.2. Smrzavanje tkiva

Uzorci za smrzavanje su nakon eksplantacije isprani u fiziološkoj otopini, kratko osušeni na papiru te smrznuti u tekućem dušiku bez prethodne fiksacije. Uzorci su smrznuti u mediju za smrzavanje O.C.T. te se čuvaju na -80°C. Brzo smrzavanje je ključno kod ovakvog tipa pohrane uzoraka jer se na taj način izbjegava stvaranje kristala vode koji mogu razoriti tkivo.

2.2.10. Analiza uzoraka

Za daljnje analize uzorci su narezani i sakupljeni na predmetna stakalca. Tkiva uklopljena u parafin su rezana na mikrotomu na debljinu od 4 μm i čuvana na sobnoj temperaturi. Smrznuta tkiva su rezana na kriostatu na temperaturi od -25°C na debljinu od 7 μm te su do analize prerezi na predmetnim stakalcima čuvani na -80°C .

2.2.10.1. Analiza uspješnosti implantacije stanica u kožu štakora

Kako bismo analizirali uspješnost implantacije stanica u eksperimentima optimizacije, koristili smo prereze smrznutih tkiva koje smo bojali s bojom Hoechst 33342, 20 minuta na sobnoj temperaturi. Hoechst boji nukleinske kiseline te ekscitiran UV svjetlošću emitira u plavom spektru u rasponu od 460 – 490 nm kad je vezan za dvolančanu DNA. Implantirane stanice su prije mikro-transplantacije obilježene s DiI, bojom koja se ugrađuje u stanične membrane. Boja DiI ima ekscitacijski maksimum na valnoj duljini od 549 nm, a maksimalnu emisiju ima u crvenom dijelu spektra na valnoj duljini od 565 nm te nam je omogućila raspoznavanje i praćenje implantiranih stanica. Pripremljeni preparati su pretraživani i snimani konfokalnim mikroskopom TCS SP8 X (Leica) i uređajem ImageXpress Micro XLS (Molecular Devices).

2.2.10.2. Hematoksilin eozin bojanje (H&E)

Bojanje parafinskih prereza bojama hematoksilin i eozin je jedno od osnovnih histoloških bojanja, a omogućuje raspoznavanje različitih tkiva i praćenje strukturnih promjena. Hematoksilin je tamne plavo-ljubičaste boje i boja nukleinske kiseline. Eozin je ružičaste boje i nespecifično boja proteine. Na tkivnim prerezima obojanim s H&E vide se plave jezgre, dok su citoplazma i izvanstanični matriks u različitim nijansama ružičaste.

Parafinskim prerezima je prije bojanja H&E uklonjen parafin prvo grijanjem na 60°C , a zatim uranjanjem u ksilen što omogućava izmjenu parafina otapalom. Zatim su uzorci rehidrirani u silaznom nizu koncentracije etilnog alkohola (100% - 30%) te vodom, bojani s hematoksilinom 10 minuta na sobnoj temperaturi, isprani vodom iz slavine pa bojani eozinom 5 minuta. Obojani prerezi su zatim dehidrirani u uzlaznom nizu koncentracije etilnog alkohola (30% - 100%) i

uklopljeni u mediju za uklapanje (Eukitt). Preparati su pregledani i snimljeni fluorescencijskim mikroskopom AX70 (Olympus).

2.2.10.3. Imunohistokemijska i imunofluorescencijska analiza tkiva

Imunofluorescencija je tehnika koja omogućava vizualizaciju specifičnog proteina ili antigena u stanicama ili tkivnim prerezima vezanjem specifičnog protutijela kemijski konjugiranog s fluorescentnom bojom.

Parafinskim prerezima je uklonjen parafin grijanjem na 60°C, a zatim uranjanjem u ksilen što omogućava izmjenu parafina otapalom. Zatim su uzorci rehidrirani u silaznom nizu koncentracije etilnog alkohola (100%, 80%, 30%) te vodom. Slijedilo je razotkrivanje antigena pomoću topline (uređaj nalik autoklavu) u 10 mM citratnom puferu pH 6 (Dako) te ispiranje u PBS-u. Uzorci su zatim inkubirani u 10% -tnom normalnom serumu vrste u kojoj je sekundarno protutijelo proizvedeno (kunić, miš) i 1% BSA (engl. Bovine Serum Albumin) u PBS-u 1 sat na sobnoj temperaturi. Slijedila je inkubacija s primarnim protutijelom (u koncentraciji koju predlaže proizvođač) u 1% -tnom BSA u PBS-u preko noći na 4 °C. Sutradan su prerezi tri puta 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 1 sat na sobnoj temperaturi u mraku. Uzorci su zatim obojani s bojom Hoechst 33342, isprani u PBS-u i vodi i uklopljeni u mediju za uklapanje (Permafluor, Thermo Scientific). Kombinacije i razrijeđenja primarnih i sekundarnih protutijela koja su korištena za analizu prikazana su u tablici 3.

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

Primarna protutijela	Razrijeđenja
Rabbit Anti-Ki67, Abcam	5 µg/ml
Rabbit Anti-Collagen I, Abcam	5 µg/ml
Mouse Anti-Collagen III, Abcam	1:600
Sekundarna protutijela	Razrijeđenja
Anti-Rabbit IgG (Alexa Fluor 488), Abcam	1:500
Anti-Mouse IgG (Alexa Fluor 647), Abcam	1:500

Za ove analize korišteno je indirektno imunofluorescencijsko bojenje kod kojeg sekundarno protutijelo konjugirano s fluorokromom prepoznaje primarno protutijelo. Obilježeni uzorci su pretraživani i snimani konfokalnim mikroskopom LSM 700 (Zeiss).

2.2.11. Statistička obrada rezultata

Rezultati su statistički obrađeni u programu Statistica 10 (Dell Software). Normalnost distribucije analiziranih rezultata određena je testovima Kolmogorov-Smirnov i Shapiro-Wilk koji testiraju nultu hipotezu koja kaže da su podaci normalno distribuirani. Kao statistički značajna razlika korištena je vrijednost $P < 0,05$. Normalnost distribucije također je određena ispitivanjem z-vrijednosti za asimetričnost i zaobljenost distribucije (engl. skewness i kurtosis) koje dobijemo tako da vrijednosti asimetričnosti i zaobljenosti podijelimo sa njihovom standardnom greškom. Ako su z-vrijednosti bile unutar $\pm 1,96$ distribucija podataka je smatrana normalnom te su razlike proučavanih promjena analizirane dvosmjernim nezavisnim t-testom. Podaci su na grafičkim prikazima izraženi kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija.

3. REZULTATI

3.1. Analiza utjecaja dugotrajnog tretmana antioksidansima na dinamiku starenja

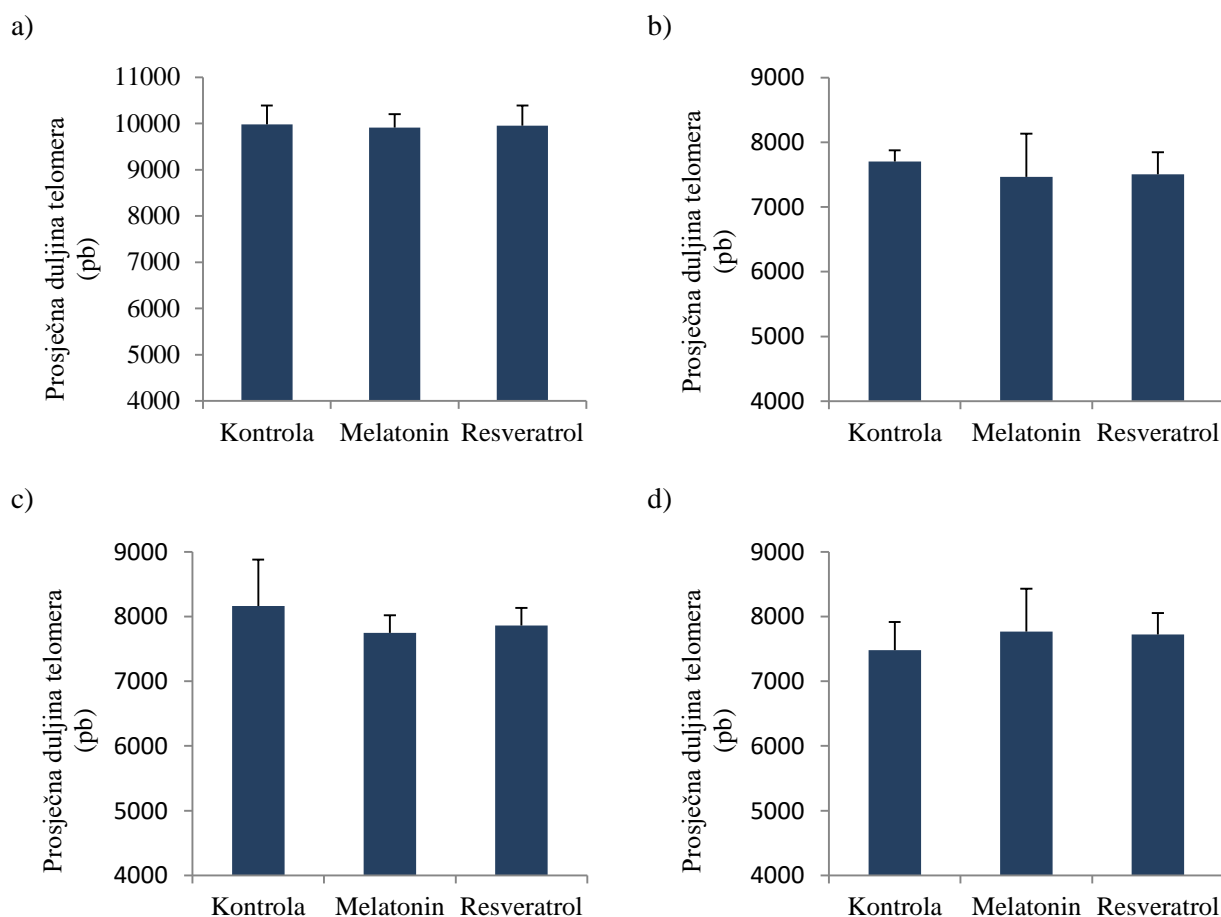
Istraživanja su potvrdila direktnu vezu između telomera, mitohondrija i produkcije reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u organizmu te njihove zajedničke uloge u procesu starenja. Aktivacija proteina p53 inducirana kritično kratkim telomerama zaustavlja stanični ciklus te smanjuje ekspresiju PGC1 α i β što dovodi do slabljenja funkcije mitohondrija i posljedično do povećane proizvodnje ROS-a (Sahin i sur. 2011). ROS su normalni intermedijeri u biokemijskim reakcijama unutarstaničnih signalnih puteva. U niskim do umjerenim koncentracijama su blagotvorni kao ključni faktori u raznim fiziološkim procesima, dok visoke koncentracije ROS-a djeluju negativno i izazivaju oksidativni stres koji dovodi do ubrzanog skraćivanja telomera te je jedan od glavnih uzroka ubrzanog starenja (Colavitti i Finkel, 2005).

Kako bi se održala optimalna ravnoteža ROS-a u stanicama, aerobni organizmi koriste antioksidanse. Istraživanja su pokazala da hormon melatonin ima potencijalno antioksidativno i protuupalno djelovanje što upućuje da jedan od uzroka brojnih zdravstvenih stanja povezanih sa starenjem može biti i smanjena razina melatonina u cirkulaciji (Carrillo-Vico i sur. 2013). Također, za biljni flavonoid resveratrol koji aktivira SIRT1, protein koji regulira važne metaboličke i fiziološke procese pokazano je da ima antioksidativno i protuupalno djelovanje te pozitivan utjecaj na zdravlje sisavaca (Baur i sur. 2006).

Za analizu utjecaja dugotrajnog tretmana antioksidansima na dinamiku starenja koristila sam modelni soj štakora Wistar iz kolonije uspostavljene na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu. Svaka analizirana skupina sastojala se od 4 životinje. Resveratrol i melatonin, otopljene u etanolu, životinje su dobivale svakodnevno u vodi u koncentraciji 10 mg/l što odgovara prosječnom dnevnom unosu od ~1 mg/kg tjelesne težine. Kontrolne životinje pile su otapalo (0,1% vodena otopina etanola). Životinje su tretirane antioksidansima u trajanju 9 ili 21 mjesec. Po završetku tretmana životinje su žrtvovane, a iz prikupljenih uzoraka jetre i različitih dijelova bubrega izolirala sam genomsku DNA koju sam koristila za mjerenje duljine telomera. Korištenjem telomera kao biomarkera kumulativnog oksidativnog stresa i starenja (von Zglinicki i Martin-Ruiz, 2005) analizirala sam promjene antioksidativnog statusa organizma i pratila dolazi li do smanjenja stresom inducirano starenja.

3.1.1. Analiza duljine telomera jednogodišnjih mužjaka

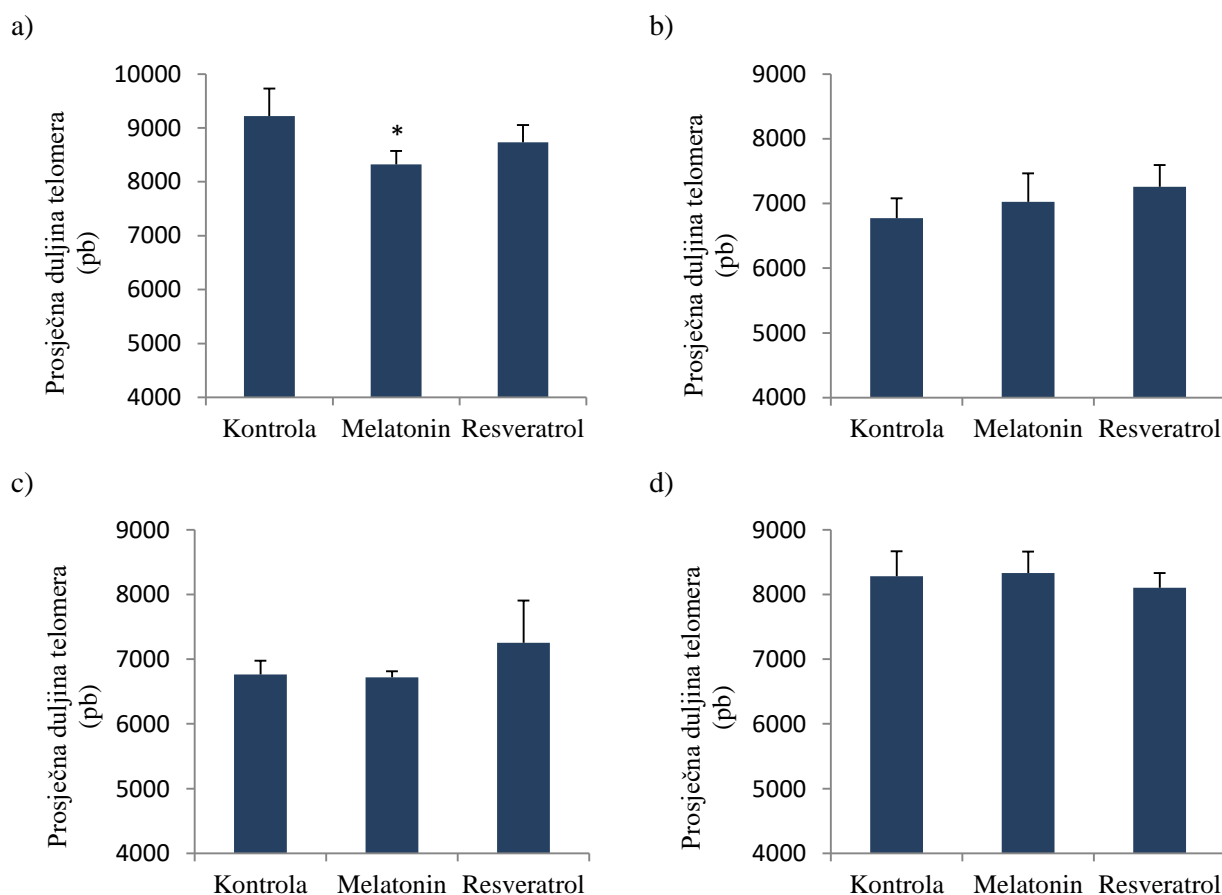
Analiza duljine telomera jednogodišnjih mužjaka nakon 9-mjesečnog tretmana melatoninom ili resveratrolom pokazala je blagotvoran utjecaj antioksidansa na duljinu telomera samo u uzorcima unutarnjeg tračka vanjske srži i unutarnjoj srži bubrega (slika 10d), međutim te razlike ne pokazuju statističku značajnost u odnosu na telomere kontrolnih životinja koje su pile otapalo. Tretman antioksidansima u jetri nije imao nikakav utjecaj na usporavanje skraćivanja duljine telomera (slika 10a), dok u kori bubrega i vanjskom tračku vanjske srži bubrega tretirane životinje čak pokazuju nižu prosječnu duljinu telomera u odnosu na kontrole (slika 10b,c), međutim te razlike nisu statistički značajne.



Slika 10. Prosječna duljina telomera u tkivima jetre i bubrega jednogodišnjih mužjaka štakora Wistar nakon 9-mjesečnog tretmana antioksidansima melatoninom i resveratrolom. Prosječna duljina telomera u a) jetri, b) kori bubrega, c) vanjskom tračku vanjske srži bubrega, d) unutarnjem tračku vanjske srži bubrega i unutarnjoj srži. Prikazane su srednje vrijednosti prosječne duljine telomera \pm SD, N=4.

3.1.2. Analiza duljine telomera dvogodišnjih mužjaka

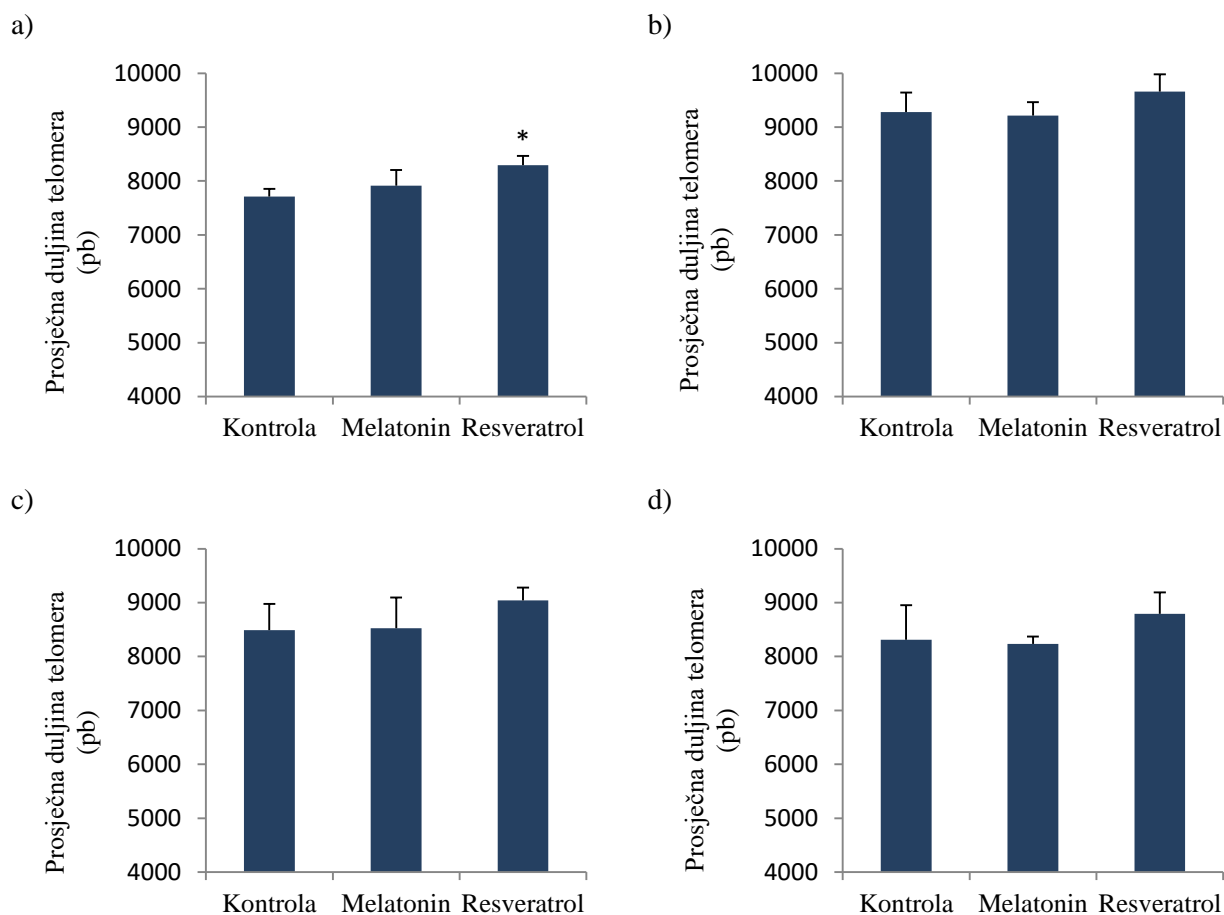
Nakon 21-mjesečnog tretmana antioksidansima, prikupljena tkiva jetre i bubrega dvogodišnjih mužjaka pokazuju drugačiji uzorak u odnosu na rezultate nakon 9-mjesečnog tretmana. Prosječna duljina telomera u jetri tretiranih životinja je niža u odnosu na kontrolne životinje, a ovakva razlika u duljini telomera nakon tretmana melatoninom je čak statistički značajna (slika 11a). U uzorcima kore bubrega (slika 11b) duljina telomera nakon tretmana antioksidansima pokazuje blago usporavanje skraćivanja u odnosu na kontrole. U uzorcima vanjskog tračka vanjske srži bubrega (slika 11c) je samo resveratrol uzrokovao zamjetno usporavanje skraćivanja telomera, dok u uzorcima unutarnjeg tračka vanjske srži bubrega i unutarnjoj srži tretiranih životinja nema značajnih promjena u odnosu na kontrole (slika 11d).



Slika 11. Prosječna duljina telomera u tkivima jetre i bubrega dvogodišnjih mužjaka štakora Wistar nakon 21-mjesečnog tretmana antioksidansima melatoninom i resveratrolom. Prosječna duljina telomera u a) jetri, b) kori bubrega, c) vanjskom tračku vanjske srži bubrega, d) unutarnjem tračku vanjske srži bubrega i unutarnjoj srži. Prikazane su srednje vrijednosti prosječne duljine telomera \pm SD, N=4.

3.1.3. Analiza duljine telomera jednogodišnjih ženki

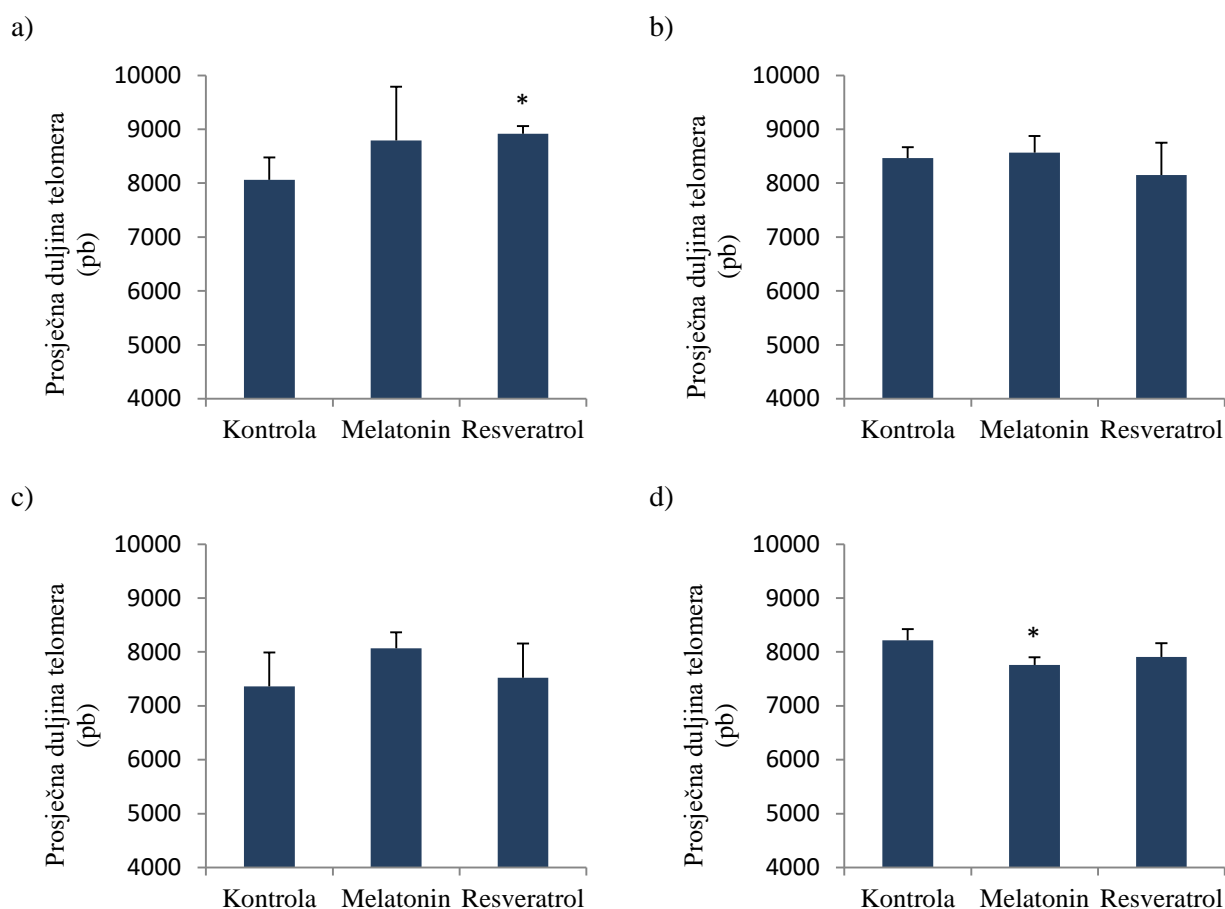
Analizom uzoraka jednogodišnjih ženki nakon 9-mjesečnog tretmana antioksidansima otkriveno je da melatonin nije imao utjecaj na usporavanje skraćivanja telomera niti u jednom analiziranom organu (slika 12). Za razliku od melatonina, resveratrol pokazuje utjecaj na oksidacijski status tretiranih ženki pa su duljine telomera u svim analiziranim organima nakon tretmana resveratrolom zamjetno dulje u odnosu na kontrole. Razlika je posebno vidljiva u jetri gdje pokazuje statističku značajnost (slika 12a, $P < 0,05$).



Slika 12. Prosječna duljina telomera u tkivima jetre i bubrega jednogodišnjih ženki štakora Wistar nakon 9-mjesečnog tretmana antioksidansima melatoninom i resveratrolom. Prosječna duljina telomera u a) jetri, b) kori bubrega, c) vanjskom tračku vanjske srži bubrega, d) unutarnjem tračku vanjske srži bubrega i unutarnjoj srži. Prikazane su srednje vrijednosti prosječne duljine telomera \pm SD, N=4.

3.1.4. Analiza duljine telomera dvogodišnjih ženki

U uzorcima dvogodišnjih ženki, prikupljenim nakon 21-mjesečnog tretmana melatoninom i resveratrolom, blagotvorno djelovanje na usporavanje skraćivanja duljine telomera pokazuju samo resveratrol u jetri (slika 13a, $P < 0,05$) i melatonin u vanjskom tračku vanjske srži bubrega (slika 13c). Djelovanje resveratrola u jetri ženki pokazuje statistički značajnu razliku što je u skladu s prethodnim rezultatima prikupljenim nakon 9-mjesečnog tretmana. U ostalim tkivima (slika 13b, c) nema vidljivog pozitivnog učinka na razini telomera, čak je u nekim slučajevima duljina telomera nakon tretmana nešto kraća u odnosu na kontrolnu skupinu.



Slika 13. Prosječna duljina telomera u tkivima jetre i bubrega dvogodišnjih ženki štakora Wistar nakon 21-mjesečnog tretmana antioksidansima melatoninom i resveratrolom. Prosječna duljina telomera u a) jetri, b) kori bubrega, c) vanjskom tračku vanjske srži bubrega, d) unutarnjem tračku vanjske srži bubrega i unutarnjoj srži. Prikazane su srednje vrijednosti prosječne duljine telomera \pm SD, N=4.

3.2. Intervencija u tkivnu homeostazu mikro-transplantacijom mladih stanica kože

Koža je najčešće korišten model u istraživanju procesa starenja i uklanjanju posljedica starenja budući da prekriva površinu cijelog tijela i na njoj se najviše manifestiraju promjene uzrokovane starenjem. Tijekom vremena se javlja povećana rigidnost, smanjena rastezljivost i elastičnost kože (Martini i sur. 2011; McCallion i Li Wan Po, 1993) što, između ostalog, rezultira i povećanom naboranošću i učestalijim mikro rascjepima kože. Zbog smanjenog broja mladih fibroblasta, u ostarjeloj koži dolazi do smanjene sinteze kolagena i elastina, postojeći elastin progresivno kalcificira i razgrađuje se, a snopovi kolagena gube organiziranu strukturu (Boss i Seegmiller, 1981; Duncan i Leffell, 1997). Uz to, promjena mehaničkih svojstava kože je posljedica i razgradnje proteina postojećeg izvanstaničnog matriksa uključujući kolagene tipa I, III, IV i VII, fibronektin, elastin i fibrilin od strane enzima metaloproteinaza matriksa (MMP) koje izlučuju stare stanice (Chakraborti i sur. 2003; El-Domyati i sur. 2002; Sherratt, 2009; Sherratt i sur. 2010).

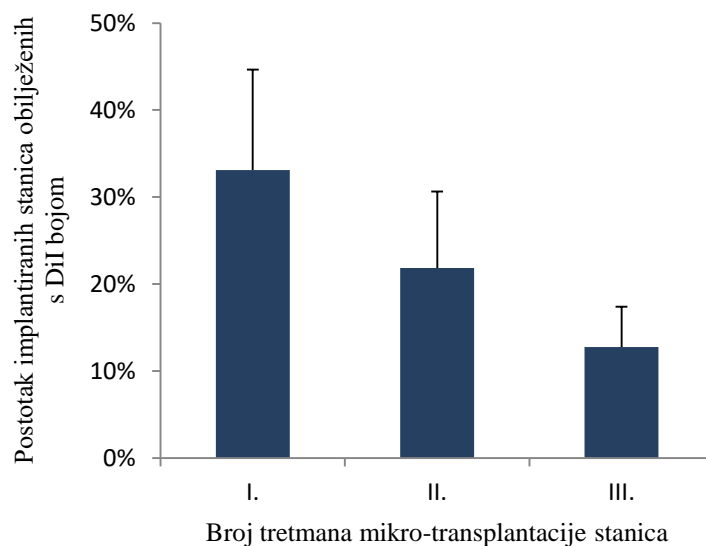
Model prema kojemu je akumulacija starih stanica jedan od glavnih uzroka patofizioloških promjena kože koje se pojavljuju sa starenjem (Campisi, 1996, 1997) možemo provjeriti na način da ciljano promijenimo omjer starih odnosno mladih stanica u dermisu. To bi se postiglo povećanjem udjela mladih stanica transplantacijom u kožu *in situ*. U tu svrhu koristila sam metodu difuzne implantacije stanica u tkivo, mikro-transplantaciju, koja omogućava promjenu sastava stanica kože. Kao modelni organizam koristila sam izogenu liniju štakora Fisher 344.

3.2.1. Optimizacija metode mikro-transplantacija

Kako bih optimizirala metodu mikro-transplantacije, koristila sam heterotransplantaciju mladih stanica izoliranih iz kože novorođenih štakora izogene linije Fischer 344 u odrasle jedinke. Stanice izolirane na ovaj način moguće je uzgojiti u broju dovoljnom za optimizaciju eksperimenta. Stanice kože mladih izogenih jedinki štakora potrebnih 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 što je uspješno učinjeno.

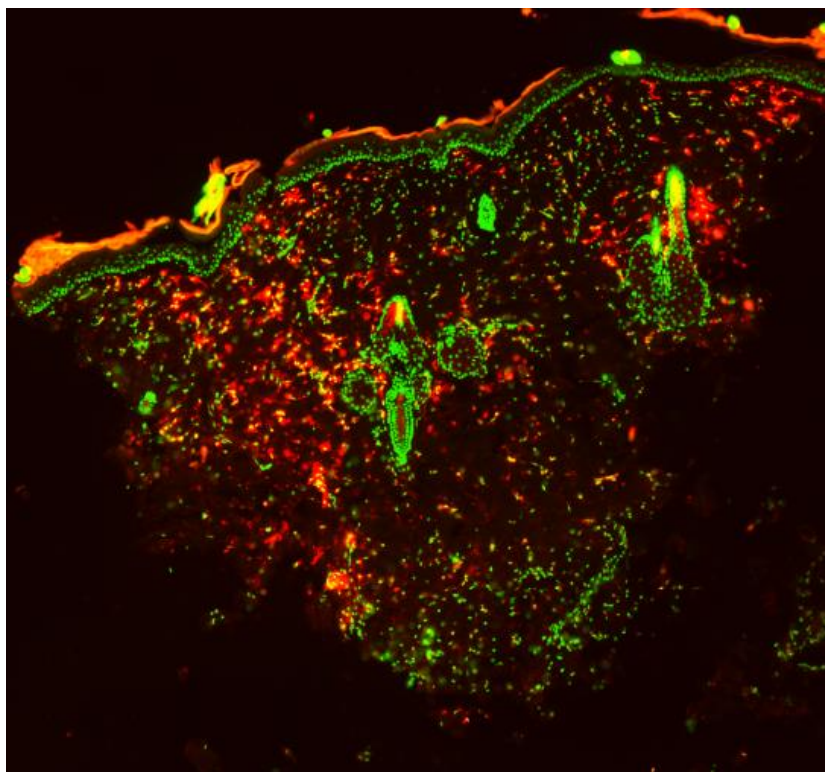
Idući korak ovog istraživanja bilo je određivanje optimalnog broja i gustoće stanica za difuznu implantaciju kako bi se postigao što veći postotak novih stanica u koži štakora. Izolirane

stanice kože mladih izogenih jedinki štakora označila sam biomarkerom DiI kako bih ih u kasnijim analizama mogla razlikovati od endogenih stanica. Stanice obilježene u kulturi sam mikro-transplantacijom implantirala u kožu štakora, varirajući broj i gustoću s ciljem optimizacije metode. Eksperiment je proveden na štakorima starim godinu dana kojima je implantirano 2, 4, 6 ili 8 milijuna stanica u jednom, dva ili tri ponavljajuća tretmana na područje kože površine 1 cm². Jedan do dva mjeseca nakon tretmana prikupila sam uzorke tkiva za kvantitativnu analizu gustoće implantiranih stanica. Analiza je pokazala da se većim brojem tretmana istog područja ne povećava proporcionalno postotak implantiranih stanica (slika 14). Također je pokazano da je najuspješnija implantacija novih stanica postignuta nakon samo jednog tretmana mikro-transplantacije 8 milijuna stanica u kožu štakora pri čemu je implantirano 14-50,6% stanica ovisno o analiziranom prerezu, a u prosjeku 33,1% (slika 15). Stanice obilježene s DiI nalaze se u svim slojevima kože čak i duboko ispod kapilarne mreže.

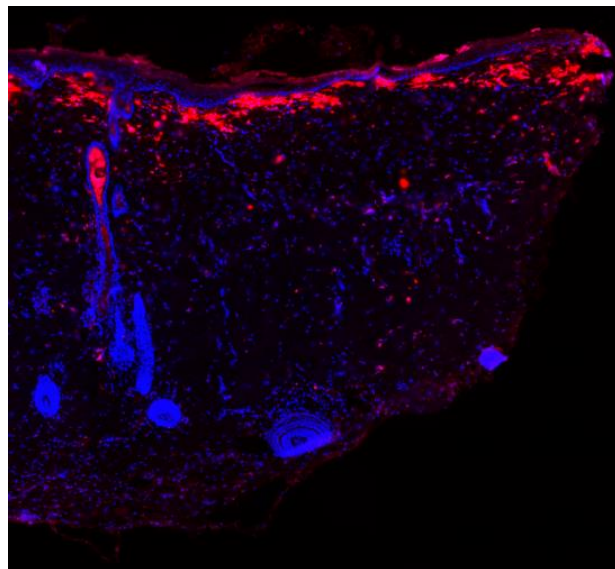


Slika 14. Uspješnost implantacije stanica u kožu štakora nakon 1-3 tretmana mikro-transplantacije 8 milijuna stanica; postotak novoimplantiranih stanica pada s povećanjem broja tretmana.

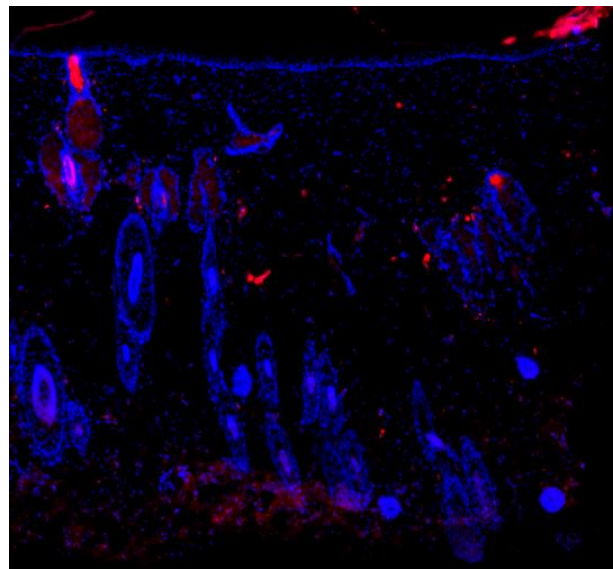
a)



b)



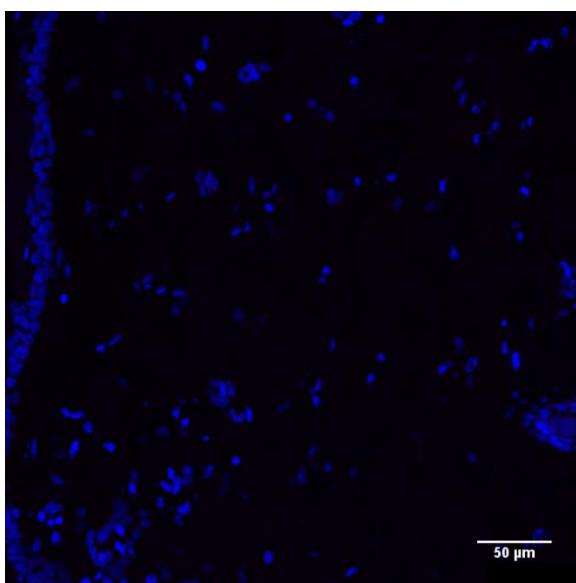
c)



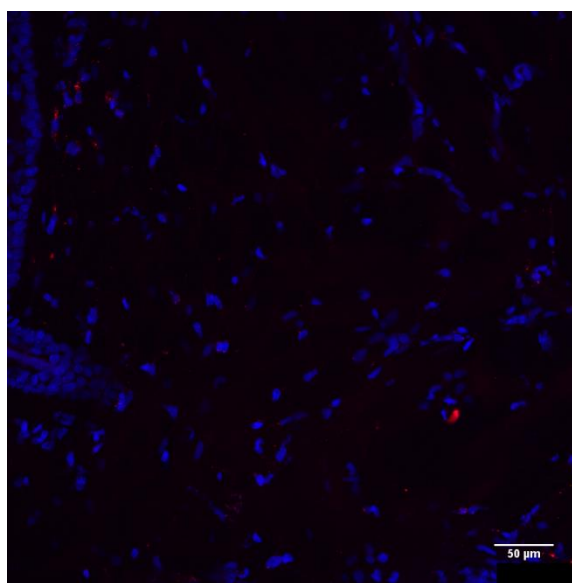
Slika 15. Uspješnost implantacije stanica u kožu štakora nakon 1-3 tretmana mikro-transplantacije. a) Prerez kože nakon jednog tretmana mikro-transplantacije 8 milijuna stanica, jezgre stanica obojane su zeleno, a stanične membrane implantiranih stanica crveno. Prerez kože nakon dva b) i tri c) tretmana mikro-transplantacije 8 milijuna stanica, jezgre stanica obojane su plavo, a stanične membrane implantiranih stanica crveno. Tkiva su prikupljena 1-2 mjeseca nakon implantacije stanica. Snimljeno uređajem ImageXpress Micro XLS (Molecular Devices).

Kako bih provjerila stabilnost implantiranih stanica u tkivu štakora kojima je jednim tretmanom implantirano 8 milijuna stanica, prikupila sam uzorke kože i nakon 10 mjeseci. Dobiveni rezultati pokazuju da su implantirane stanice i nakon dužeg vremenskog perioda stabilne i vijabilne u koži, međutim ne u istom postotku kao i nakon prvog uzorkovanja (slika 16). To se može objasniti osobinom DiI fluorescentne boje koja se sa svakom diobom ravnomjerno raspoređuje na stanice kćeri pri čemu intenzitet boje pada za 50% te gubitkom stanica iz tkiva uzrokovanog procesom starenja.

a)



b)



Slika 16. Provjera stabilnosti reimplantiranih stanica 10 mjeseci nakon jednokratne mikro-transplantacije 8 milijuna stanica. a) Kontrolni uzorak bez implantiranih stanica, b) uzorak kože u koju su implantirane stanice; jezgre stanica obojane su plavo, a stanične membrane implantiranih stanica crveno. Snimljeno konfokalnim mikroskopom TCS SP8 X (Leica).

3.2.2. Implantacija mladih stanica u kožu starih štakora

S obzirom na prethodno opisane rezultate, u daljnjem eksperimentalnom radu koristila sam jedan tretman mikro-transplantacije pri kojem sam implantirala 8 milijuna mladih stanica u polje kože površine 1 cm² budući da su se takvi uvjeti pokazali najuspješnijima u eksperimentima optimizacije. Za analizu promjene mikrookoliša u staroj koži pod utjecajem mladih stanica nakon implantacije, za eksperimente sam koristila štakore stare 21 i 24 mjeseca. To su životinje u dubokoj starosti budući da maksimalni životni vijek jedinki ove linije iznosi do ~30 mjeseci. Svakom štakoru sam u jedno označeno polje na leđima mikro-transplantacijom implantirala stanice, a u drugo označeno polje sam aplicirala medij bez stanica što mi je služilo kao kontrola mehaničkog tretmana kože. Za analize sam također uzimala i uzorak netretirane kože. U danima neposredno nakon tretmana pratila sam promjene koje su se odvijale na koži prilikom zarastanja. Primijetila sam da na polju u koje su aplicirane mlade stanice dolazi do obnove kože te odvajanja njezinog površinskog sloja (slika 17a), što nije bio slučaj na polju koje je bilo samo mehanički tretirano (slika 17b). Samo praćenje vanjskih promjena kože za vrijeme zacjeljivanja upućivalo je da mlade stanice implantirane u kožu starog štakora mijenjaju njezinu homeostazu te da ta promjena nije uzrokovana mehaničkim oštećenjem i samim procesom zacjeljivanja.

a)



b)

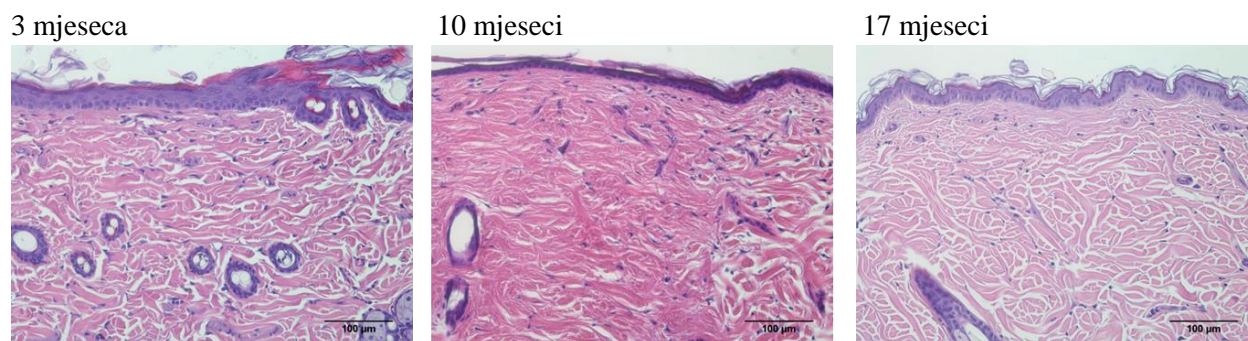


Slika 17. Praćenje promjena na koži nakon tretmana mikro-transplantacije. a) Na lijevom označenom polju na koži štakora nakon mikro-transplantacije stanica dolazi do obnove kože i odvajanja površinskog sloja. b) Na desnom kontrolnom polju, gdje je tehnikom mikro-transplantacije apliciran samo medij bez stanica, nema vidljivih sličnih promjena.

3.2.3. Histološka analiza utjecaja mladih stanica na homeostazu kože starog štakora

Nakon uspješne mikro-transplantacije mladih stanica u kožu starih štakora (21-24 mjeseca), prikupila sam uzorke tkiva netretirane kože (NK), mehanički tretirane kože (MK) te kože u koju su implantirane mlade stanice (TT). Također sam prikupila uzorke štakora starih 3, 10 i 17 mjeseci s ciljem praćenja promjena koje se u koži odvijaju sa starenjem. Prikupljena tkiva fiksirana su i uklopljena u parafin te sam ih rezala na mikrotomu, a dobivene prereze kože bojala sam histološkim bojama hematoksilin i eozin.

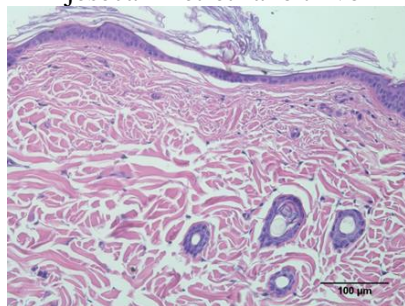
Histološka analiza prereza kože štakora starih 3, 10 i 17 mjeseci pokazala je da se dermis kontinuirano mijenja u procesu starenja organizma (slika 18). Upečatljive promjene vidljive histološkom analizom su značajan pad broja stanica (slika 20) te posljedično rast prosječne međusobne udaljenosti stanica u dermisu štakora (slika 21).



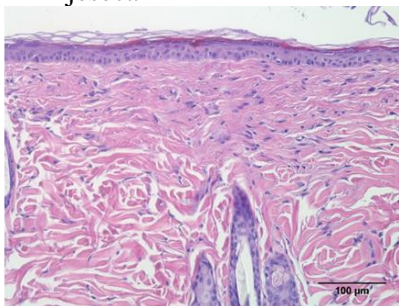
Slika 18. Histološka analiza kože štakora starih 3, 10 i 17 mjeseci. Hematoksilin/eozin bojanje. Snimljeno mikroskopom AX70 (Olympus), povećanje 20X.

Daljnja analiza prereza pokazala je da je došlo do promjene homeostaze u koži starih štakora u koju sam implantirala mlade stanice, na što su upućivale promjene zapažene na koži tijekom zarastanja (slika 19). Iz dobivenih prereza jasno je vidljivo kako je u dermisu tretiranog tkiva značajno povećan broj stanica koje su puno gušće pakirane te je izvanstanični matriks kompaktan. Kod mehanički tretiranog tkiva također se vidi promjena u broju stanica s obzirom na netretirano tkivo, ali u puno manjem opsegu nego u tretiranom tkivu. To se može objasniti samim procesom zacijeljivanja nakon mehaničkog tretmana gdje mlade stanice već prisutne u koži imaju prednost prilikom dioba pred endogenim starim stanicama. U kontrolnim uzorcima netretiranog tkiva vidljiv je mnogo manji broj stanica koje su veće te rahlo pakiran izvanstanični matriks.

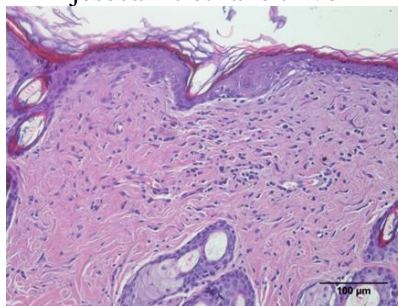
24 mjeseca – netretirano tkivo



24 mjeseca – mehanička kontrola



24 mjeseca – tretirano tkivo

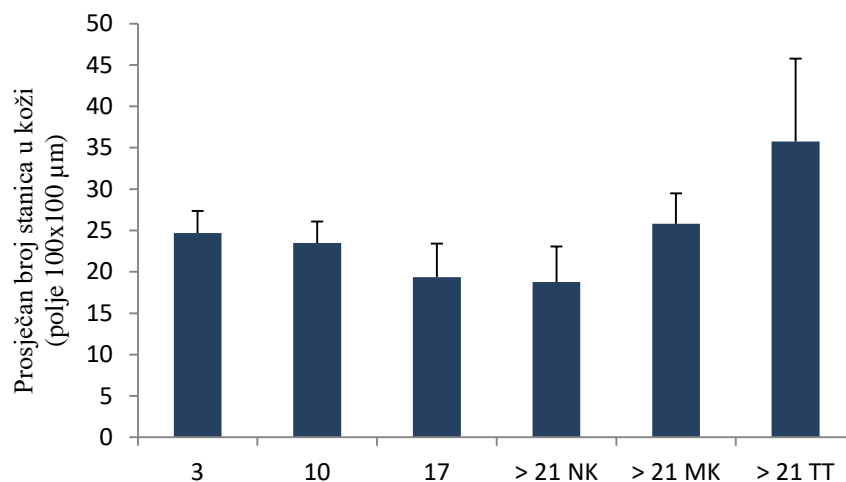


Slika 19. Histološka analiza kože štakora starog 24 mjeseca. Prikazano je netretirano tkivo, mehanički tretirano tkivo i tkivo u koje su implantirane mlade stanice metodom mikro-transplantacije. Slike prikazuju različite uzorke kože s leđa jednog štakora. Hematoksilin/eozin bojanje. Snimljeno mikroskopom AX70 (Olympus), povećanje 20X.

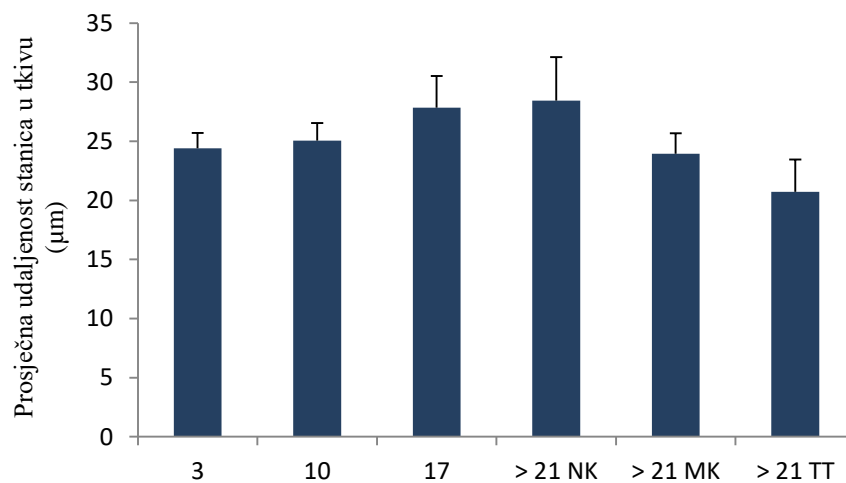
Kako bih kvantitativno analizirala uočene promjene u broju stanica u različitim uzorcima, brojila sam stanice u poljima veličine $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$. Brojila sam 4 polja po prerezu, a za svaku životinju obrađena su 3 prereza. Svaka skupina sastojala se od tri životinje. Iz dobivenih podataka izračunala sam prosječan broj stanica za analizirano polje svake skupine životinja (slika 20). Dobiveni rezultati pokazuju da sa starenjem prosječan broj stanica na polju površine $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ pada s prosječno 25 stanica kod tromjesečnih životinja na 18 stanica kod životinja starih 21-24 mjeseca. Iznimno je zanimljiv rezultat koji pokazuje da nakon tretmana mikro-transplantacije, prosječan broj stanica u analiziranom polju raste na 35, što je značajno više u odnosu na tkivo štakora starih 3 mjeseca. Kod mehanički tretiranog tkiva također se vidi promjena u broju stanica s obzirom na netretirano tkivo, ali u puno manjoj mjeri nego u tretiranom tkivu.

Osim na razini dermisa, vidljive su i značajne promjene na razini epidermisa. U epidermisu tretiranog tkiva je također veći broj stanica i deblji je nego u kontrolnim prerezima (slika 19).

Histološka analiza utjecaja mladih stanica na mikrookoliš kože starog štakora potvrdila je da smo uspješno promijenili omjer starih i mladih stanica.



Slika 20. Promjena broja stanica u koži štakora sa starenjem (životinje stare 3, 10, 17 i >21 mjesec) te nakon mehaničkog tretmana i implantacije mladih stanica u kožu starih štakora (>21 mjesec). N=3 životinje po skupini.



Slika 21. Prosječna udaljenost stanica u tkivu štakora u μm. Prikazane su udaljenosti stanica kod štakora starih 3, 10, 17 i >21 mjesec te nakon mehaničkog tretmana i implantacije mladih stanica u kožu starih štakora (>21 mjesec). N=3 životinje po skupini.

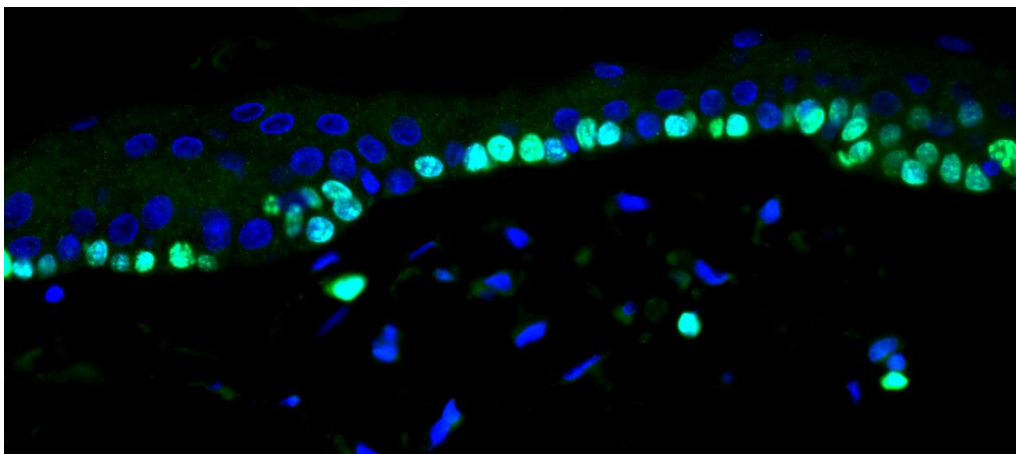
3.2.4. Analiza proliferacijskog statusa kože

Za starenje organizma odgovorno je i progresivno smanjenje aktivnosti matičnih stanica (Flores i sur. 2006) uzrokovano akumulacijom starih stanica u njihovom mikrookolišu. Stare stanice putem SASP-a parakrino induciraju senescenciju čime se narušava funkcija matičnih stanica i smanjuje njihova regenerativna sposobnost, a može doći i do iscrpljivanja zalihe matičnih stanica (Flores i sur. 2008; Holstege i sur. 2014; Tomás-Loba i sur. 2008). To sve također dovodi do razvoja simptoma starenja, pojave nestabilnih stanica te potencijalne indukcije neoplazija (Wong i Collins, 2003).

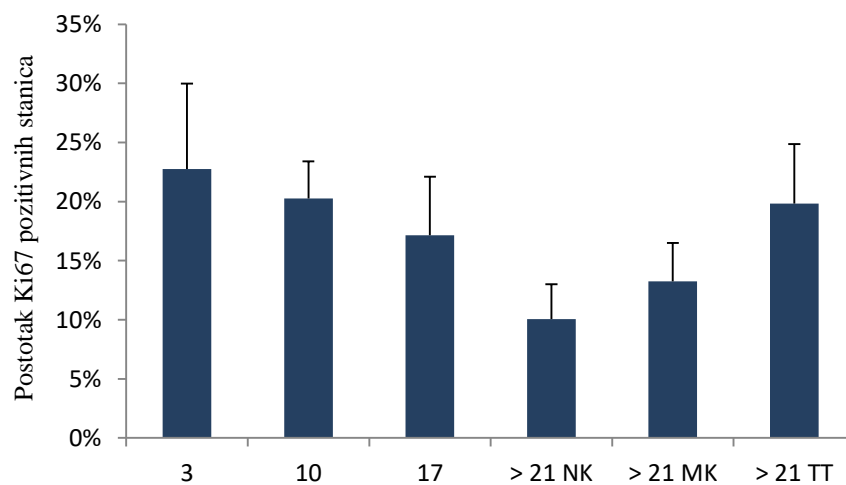
Matične stanice kože smještene su u bazalnom sloju epidermisa odakle omogućuju obnavljanje kože tijekom cijelog života te također sudjeluju u regeneraciji epidermisa nakon ozljede (Blanpain i Fuchs, 2006). Istraživanja su pokazala da su matične stanice kože osjetljive na promjene koje se sa starenjem odvijaju u organizmu te da pritom pada njihov regenerativni potencijal. Time se narušava homeostaza kože potrebna za kontinuirano obnavljanje tkiva (Doles i sur. 2012). Nedavna istraživanja pokazuju da je moguće ostarjele matične stanice koje imaju smanjeni potencijal proliferacije pomladiti kroz određene promjene u njihovom sistemskom okolišu (Stanley i sur. 2012).

Budući da je prethodna histološka analiza kože pokazala da sam uspješno implantirala mlade stanice u kožu starih štakora te da je došlo do značajnog povećanja broja i gustoće stanica u tretiranoj u odnosu na netretiranu kožu, pretpostavila sam da su mlade stanice utjecale na mikrookoliš u koji su implantirane. Kako bih ispitala je li promjena mikrookoliša imala pozitivan utjecaj na proliferacijski status stanica kože, koristila sam protutijelo Ki67. Ekspresija proteina Ki67 strogo je povezana sa staničnom proliferacijom te je protein prisutan u svim aktivnim fazama staničnog ciklusa (G_1 , S, G_2 , M), dok je u mirujućim stanicama (G_0) u potpunosti odsutan što ga čini izvrsnim proliferacijskim markerom (Scholzen i Gerdes, 2000).

Opsežna analiza prikupljenih tkiva pokazala je da je glavnina signala Ki67 analiziranih tkiva smještena u epidermisu, točnije u bazalnom sloju epidermisa koji je niša epidermalnih matičnih stanica (slika 22). Za daljnju analizu uočenih promjena, brojila sam Ki67 pozitivne stanice epidermisa te izračunavala njihov postotak u odnosu na ukupan broj stanica u epidermisu. Za kvantitativnu analizu sam koristila 3 do 5 tkivnih prereza svakog štakora, a svaku skupinu činile su tri životinje.



Slika 22. Ki67 pozitivne stanice (zeleno) epidermisa smještene su u bazalnom sloju koji je niša epidermalnih matičnih stanica. Snimljeno mikroskopom AX70 (Olympus), povećanje 40X.

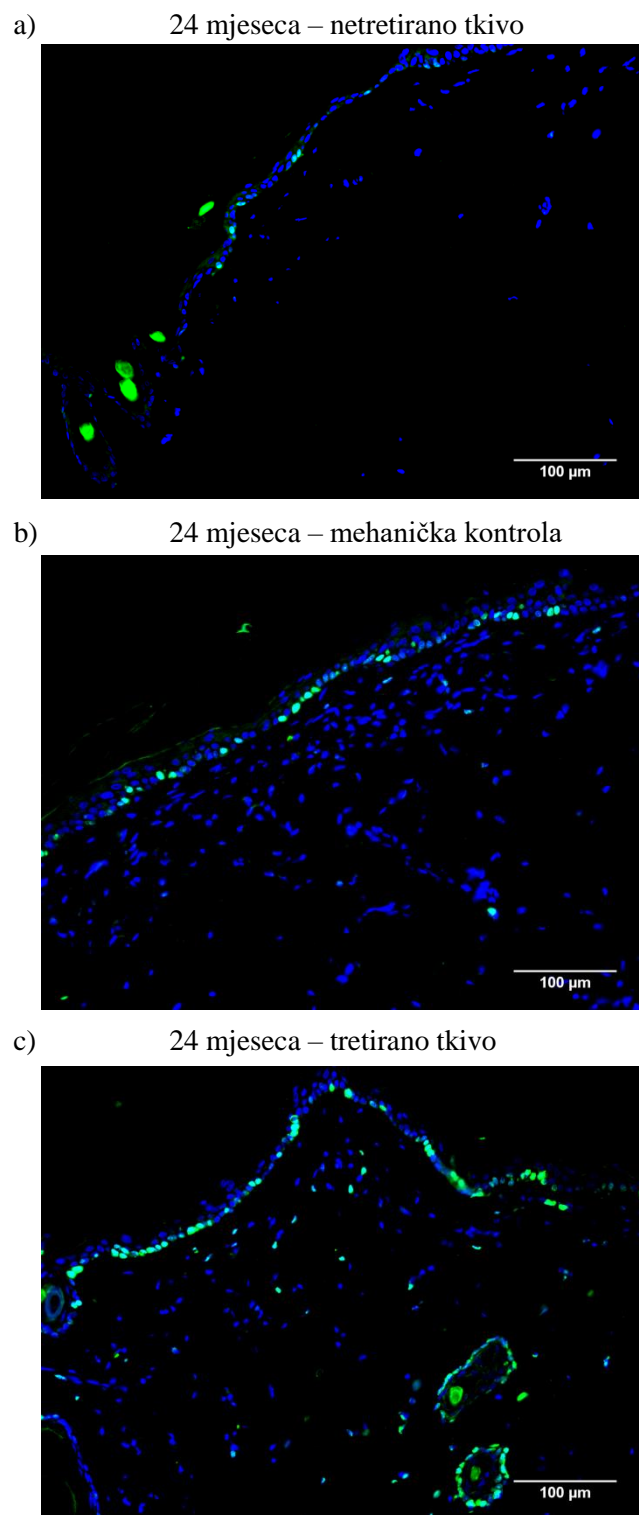


Slika 23. Postotak Ki67 pozitivnih stanica u bazalnom sloju epidermisa kod štakora starih 3, 10, 17 i >21 mjesec te nakon mehaničkog tretmana i implantacije mladih stanica u kožu starih štakora (>21 mjesec). N=3 životinje po skupini.

Provedena analiza pokazuje kako se proliferacijski status matičnih stanica kože mijenja sa starenjem (slika 23). Koža tromjesečnih životinja pokazuje u prosjeku 23% Ki67 pozitivnih stanica u epidermisu. Sa starenjem proliferacijski status kontinuirano pada te u epidermisu starih životinja (21-24 mjeseca) iznosi u prosjeku 10%. Dobiveni rezultati idu u prilog hipotezi da je implantacijom mladih stanica u kožu starog štakora smanjen sekretorni fenotip starih stanica te da implantirane mlade stanice blagotvorno utječu na nišu matičnih stanica. To je vidljivo iz proliferacijskog statusa mladim stanicama tretiranog tkiva koji se s prosječno 20% Ki67 pozitivnih stanica svrstao na razinu životinja starih između 3 i 10 mjeseci te je dvostruko veći od statusa netretiranog tkiva istih životinja (slika 23). Mehanički tretman također popravlja proliferacijski status tkiva, ali samo za 3% u odnosu na netretirano tkivo, a može se objasniti kao posljedica procesa zacjeljivanja.

Osim u epidermisu, vidljive su i razlike u proliferacijskom statusu stanica u dermisu. Fibroblasti koji čine dermis su također proliferacijski aktivniji u koži u koju su implementirane mlade stanice u odnosu na staro netretirano tkivo (slika 24).

Svi dosadašnji rezultati govore u prilog da je stara koža u koju su implantirane mlade stanice sličnija mladoj koži tromjesečnih štakora nego netretiranim tkivima uzorkovanih s istih starih štakora. Analizom proliferacijskog statusa potvrdila sam hipotezu da mlade stanice mijenjaju mikrookoliš u koji su implantirane, neutraliziraju sekretorni fenotip starih stanica i posljedično obnavljaju vitalnost matičnih stanica.



Slika 24. Proliferacijski status stanica u koži štakora praćen je markerom Ki67 (zeleno). Prikazan je proliferacijski status u a) netretiranoj koži starog štakora, b) mehanički tretiranoj koži te c) koži u koju su implantirane mlade stanice. Slike prikazuju različite uzorke kože s leđa istog štakora starog 24 mjeseca. Snimljeno mikroskopom AX70 (Olympus), povećanje 20X.

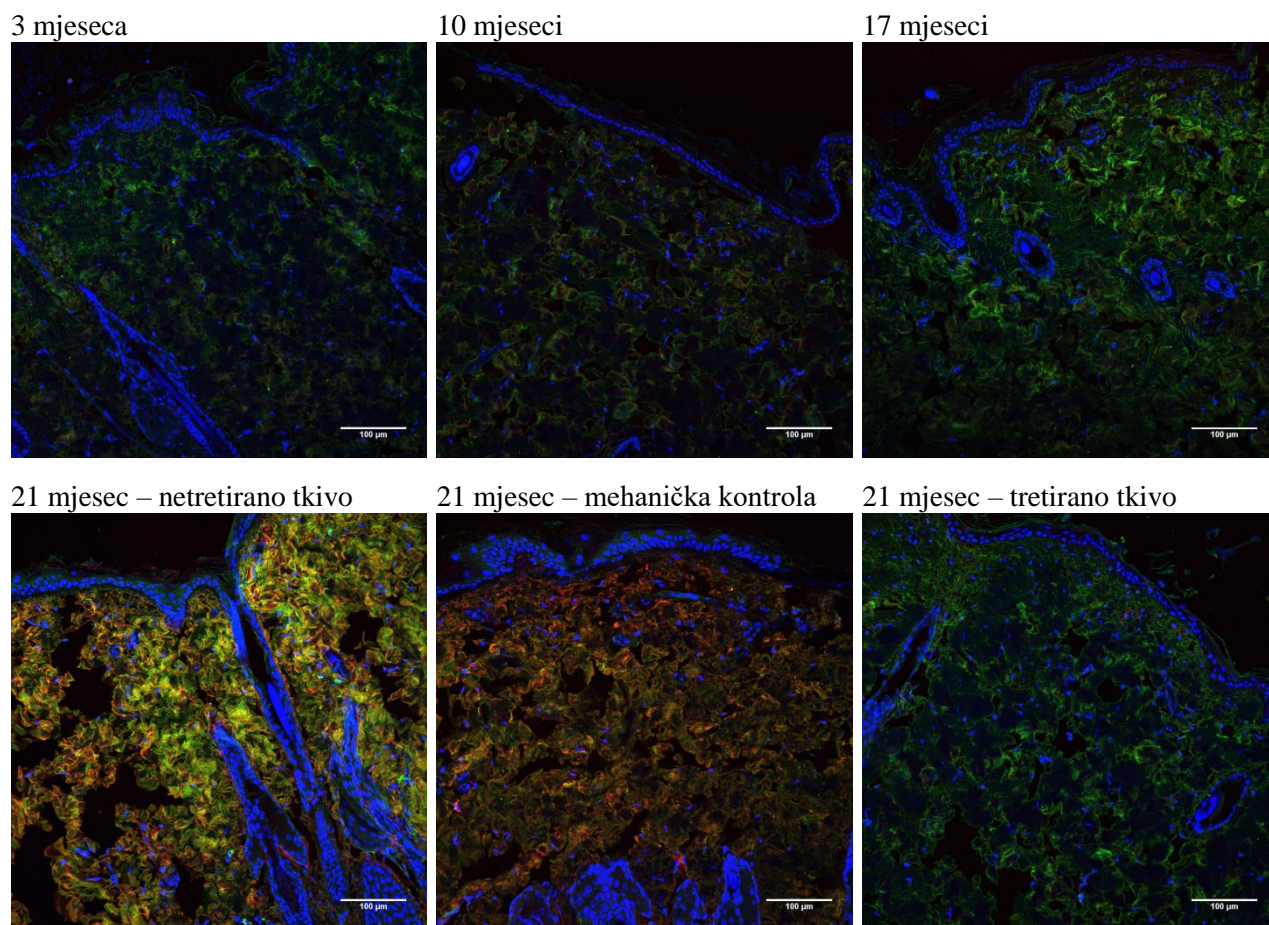
3.2.5. Analiza ultrastrukture kože

Dermis se pretežno sastoji od vezivnog tkiva koje čine kolageni i elastini sintetizirani od strane fibroblasta. Sa starenjem dolazi do smanjenja broja fibroblasta u dermisu i do pada njihove sposobnosti sinteze raznih kolagena te s vremenom dolazi do opće atrofije izvanstaničnog matriksa (Gunin i sur. 2011; Makrantonaki i Zouboulis, 2007; Varani i sur. 2001). Kolagen je najzastupljeniji protein u ljudskom tijelu i osnovna strukturna komponenta dermisa, stoga promjene kolagena imaju ključnu ulogu u starenju kože (Baumann, 2007). Kolagenski snopovi su u mladoj koži pravilno organizirani i pružaju joj strukturnu čvrstoću i, u kombinaciji s elastinom, elastičnost. U staroj koži raste gustoća kolagenskih snopova (Lavker i sur. 1987), međutim oni gube svoju rastezljivost, fragmentirani su, slabije topivi i narušena im je organizacija (Gniadecka i sur. 1994; Uitto, 1986). Detaljnom analizom kolagenskih snopova elektronskom mikroskopijom otkiveno je da u staroj koži pakiranje fibrila u snopovima nije čvrsto kao u mladoj koži već da dolazi do njihovog odmatanja (Lavker i sur. 1987). Promjena mehaničkih svojstava kože je posljedica i razgradnje proteina postojećeg izvanstaničnog matriksa od strane enzima metaloproteinaza matriksa (MMP) koje pojačano eksprimiraju stare stanice (Chakraborti i sur. 2003).

Budući da su prethodne analize pokazale da je nakon tretmana mikro-transplantacije povećan broj fibroblasta u dermisu kože starih štakora, pretpostavila sam da će implantirane mlade stanice svojom sposobnošću sinteze komponenata izvanstaničnog matriksa utjecati na promjenu ultrastrukture kože. Kako bih provjerila tu pretpostavku, prereze uzoraka kože štakora rastuće starosti i uzoraka kože nakon mehaničkog tretmana i tretmana mladim stanicama analizirala sam korištenjem protutijela za kolagen I i kolagen III koji su najzastupljeniji kolageni u koži. Kolagen I čini 80%, a kolagen III čini 15% ukupnih dermalnih kolagena (Tobin, 2017).

Na slici 25 prikazane su uočene promjene u ultrastrukтури dermisa koje se događaju sa starenjem. Prezezi kože štakora starih 3, 10 i 17 mjeseci pokazuju slabiji intenzitet imunofluorescencijskih signala za oba kolagena, u usporedbi sa štakorima starijima od 21 mjesec. Kolageni mlađih životinja su tanji i pravilnije su organizirani u snopove dok kod starih životinja kolagenski snopovi pokazuju neuređenu, raspršenu strukturu što odgovara podacima iz literature (Gniadecka i sur. 1994; Lavker i sur. 1987; Uitto, 1986). Puno jači intenzitet imunofluorescencijskih signala kolagena u koži starih štakora vjerojatno je posljedica njihove promijenjene organizacije, odnosno raspršenosti samih snopova koji uz to zauzimaju i veću

površinu budući da je broj stanica u starom dermisu značajno manji. Najupečatljiviju promjenu pokazuje tkivo starog štakora nakon tretmana mikro-transplantacije koje uopće ne nalikuje netretiranom starom tkivu već izgledom kolagenskih snopova potpuno nalikuje koži mladih životinja. Bitno je naglasiti da slike netretiranog, mehanički tretiranog tkiva i tkiva s implantiranim mladim stanicama prikazuju uzorke kože prikupljene s leđa istog štakora starosti 21 mjesec.



Slika 25. Kolagen I (zeleno) i kolagen III (crveno) u koži štakora različite starosti te u koži 21 mjesec starog štakora nakon mehaničkog tretmana i implantacije mladih stanica. Snimljeno konfokalnim mikroskopom LSM 700 (Zeiss).

Kako bih usporedila uočene razlike u uzorku imunofluorescencijskih signala analiziranih tkiva, koristila sam metodu izračunavanja CTCF (engl. Corrected Total Cell Fluorescence). Očitavanja fluorescencijskog signala su provedena korištenjem programa ImageJ (NIH) koji služi za obradu i analizu prikaza dobivenih mikroskopijom. CTCF metodom izračunava se totalna fluorescencija analiziranog polja prema formuli:

$$CTCF = IG - (P \times F)$$

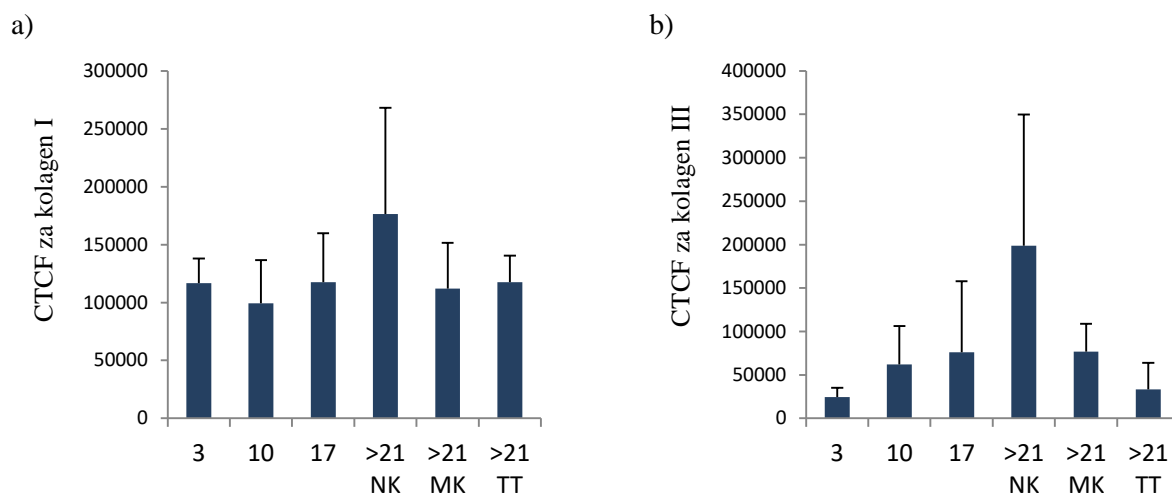
IG - integrirana gustoća

P - površina analiziranog polja

F - srednja vrijednost pozadinske fluorescencije

Vrijednost integrirane gustoće (engl. Integrated density) predstavlja zbroj vrijednosti piksela analiziranog polja te se ispravlja za pozadinsku fluorescenciju kako bi se dobilo precizno očitavanje fluorescencijskog signala. Analiza je provedena na tri polja svakog prereza, a za svaku životinju obrađena su 3 prereza. Svaka skupina sastojala se od tri životinje.

Dobiveni rezultati potvrđuju razlike vidljive na slikama. Intenzitet fluorescencije i za kolagen I (slika 26a) i za kolagen III (slika 26b) pokazuje da stara koža nakon tretmana mladim stanicama ima uzorak fluorescencije kao mlada koža. Suprotno tome, stara koža pokazuje puno jači intenzitet fluorescencije u odnosu na ostale uzorke.



Slika 26. Intenzitet fluorescencijskog signala za a) kolagen I i b) kolagen III u koži štakora različite starosti te u koži starih štakora nakon mehaničkog tretmana i implantacije mladih stanica. N=3 životinje po skupini.

4. RASPRAVA

Primarni cilj ovog rada bio je sistemska intervencija antioksidansima u proces starenja štakora i lokalna intervencija s mladim stanicama u kožu starih životinja.

Ranija istraživanja su pokazala da oksidativni stres ima znatan utjecaj na brzinu skraćivanja telomera (Sies, 1997), stoga se nastoji višak oksidansa neutralizirati s raznim antioksidansima. Štakore Wistar tretirali smo antioksidansima melatoninom i resveratrolom kroz period od 9 ili 21 mjesec. Korištenjem telomera kao biomarkera kumulativnog oksidativnog stresa i starenja (von Zglinicki i Martin-Ruiz, 2005) ispitala sam poboljšava li se antioksidativni status organizma i smanjuje li se stresom inducirano starenje kod štakora koji su dugotrajno tretirani antioksidansima.

Brojna istraživanja su pokazala da melatonin ima antioksidativna (Reiter i sur. 2002; Tan i sur. 2007) i protuupalna svojstva (Demas i Nelson, 1998; Sze i sur. 1993). Melatonin također ublažava različite komplikacije uzrokovane metaboličkim sindromom, kao što je prekomjerna proizvodnja inzulina, inzulinska rezistencija, povišen krvni tlak, hiperglikemija i prekomjerna težina, što je pokazano na zdravim štakorima i štakorima s dijabetesom koji su bili na prehrani bogatoj fruktozom (Agil i sur. 2012; Cardinali i sur. 2013; Kitagawa i sur. 2012; Leibowitz i sur. 2008). Nedavnim istraživanjima na miševima pokazano je da dugotrajan tretman melatoninom odgađa starenje jajnika i smanjuje mitohondrijski oksidativni stres u jajnicima te također dovodi do usporenog skraćivanja njihovih telomera. Za razliku od jajnika kod miša, ovo istraživanje je pokazalo da dugotrajan tretman melatoninom nema značajan utjecaj na usporavanje skraćivanja duljine telomera u jetri i bubrezima tretiranih mužjaka i ženki štakora. U nekim tkivima postoje male razlike u korist melatonina, međutim one nisu statistički značajne. Primjeri takvih razlika kod mužjaka su sporije skraćivanje telomera u unutarnjem tračku vanjske srži i unutarnjoj srži bubrega nakon 9-mjesečnog tretmana i kori bubrega nakon 21-mjesečnog tretmana. Kod ženki je primjetan efekt u jetri i u vanjskom tračku vanjske srži bubrega tek nakon 21-mjesečnog tretmana, dok nakon 9-mjesečnog tretmana nisu vidljive nikakve razlike niti u jednom analiziranom tkivu. Suprotno očekivanom, nakon 21-mjesečnog tretmana melatoninom, u jetri mužjaka te u unutarnjem tračku vanjske srži i unutarnjoj srži bubrega ženki duljina telomera je niža u odnosu na kontrolne životinje i čak pokazuje statistički značajnu razliku.

Iz literature je poznato da resveratrol produžuje životni vijek evolucijski udaljenih vrsta, uključujući *S. cerevisiae*, *C. elegans* i *D. melanogaster* (Howitz i sur. 2003; Viswanathan i sur. 2005; Wood i sur. 2004). Također je dokazano da ima antioksidativno i protuupalno djelovanje

te pozitivan utjecaj na zdravlje sisavaca (Baur i sur. 2006; Vitseva i sur. 2005). Resveratrol odgađa senescenciju na staničnoj razini, usporava skraćivanje duljine telomera i pojačava aktivnost telomeraze u glodavaca na visokokalorijskoj prehrani (Baur i sur. 2006), ali ne produžuje životni vijek zdravih glodavaca niti animalnih modela koji preuranjeno stare (Labbé i sur. 2011; da Luz i sur. 2012). Ovo istraživanje pokazalo je da resveratrol statistički značajno usporava skraćivanje telomera u jetri tretiranih jednogodišnjih i dvogodišnjih ženki. Također su vidljive razlike i u svim ostalim analiziranim tkivima jednogodišnjih ženki, međutim te razlike ne pokazuju statističku značajnost. U analiziranim tkivima dvogodišnjih ženki, osim u jetri, ne primjećuje se pozitivan efekt, te su u kori bubrega i unutarnjem tračku vanjske srži bubrega i unutarnjoj srži telomere čak nešto kraće u odnosu na telomere kontrolnih životinja. U analiziranim tkivima jednogodišnjih mužjaka blagi pozitivan efekt tretmana resveratrolom vidljiv je u unutarnjem tračku vanjske srži bubrega i unutarnjoj srži, dok u jetri nema vidljivog efekta, a u kori bubrega i vanjskom tračku vanjske srži bubrega telomere su kraće u odnosu na kontrolnu DNA. Uzorci dvogodišnjih mužjaka pokazuju blagi pozitivan utjecaj resveratrola na usporavanje skraćivanja duljine telomera u kori bubrega i vanjskom tračku vanjske srži bubrega dok u ostalim tkivima nema pozitivnog efekta. Utjecaj resveratrola na duljinu telomera u tkivima mužjaka ne pokazuje statistički značajne razlike niti u jednom navedenom slučaju.

Brojna istraživanja upućuju na blagotvorno djelovanje melatonina i resveratrola na zdravlje sisavaca. Međutim, nisam pronašla niti jedno istraživanje koje ukazuje da djelovanje antioksidansa utječe na produljenje životnog vijeka zdravih sisavaca. Ovo istraživanje je u skladu s navedenim, budući da praćenjem duljine telomera zdravih štakora Wistar tretiranih kroz 9 ili 21 mjesec melatoninom ili resveratrolom u većini analiziranih tkiva nije pronađen značajan utjecaj na usporavanje skraćivanja duljine njihovih telomera, međutim vidljivi su blagi pozitivni učinci. Budući da oba korištena antioksidansa imaju prepoznatu ulogu u ublažavanju posljedica metaboličkog sindroma, smatram da je njihovo djelovanje blagotvorno za svaki organizam, ali ključnu ulogu u produljenju životnog vijeka ima samo kod životinja s narušenim metabolizmom. Navedeno je u skladu s istraživanjem koje su proveli Baur i sur. (2006), a kojim su pokazali da resveratrol produžuje život miševima na visokokalorijskoj prehrani i dovodi ga na razinu zdravih miševa koji su bili na normalnoj prehrani.

Također, u današnje vrijeme dostupno je mnogo antioksidansa, pa tako i resveratrol i melatonin, u obliku različitih dodataka prehrani koji su značajno zastupljeni na tržištu i u širokoj

su upotrebi. Međutim, za razliku od lijekova, dodaci prehrani ne moraju proći stroga klinička testiranja pa je tako utjecaj antioksidativnih dodataka prehrani na zdravlje ljudi nedovoljno istražen te se postavlja pitanje imaju li uopće pozitivan učinak na zdravlje ljudi i je li opravdano umjetno podešavati ravnotežu između slobodnih radikala i antioksidansa u našim stanicama. Jedini način da se odgovori na to pitanje je daljnje istraživanje i širenje našeg znanja o pozitivnim i negativnim učincima dodataka prehrani na zdravlje ljudi. Tome u prilog idu i rezultati ovog istraživanja čiji je značaj u rasvjetljavanju djelovanja melatonina i resveratrola, a pokazuju da u većini analiziranih tkiva nije pronađen značajan utjecaj ispitivanih antioksidansa na usporavanje skraćivanja duljine telomera.

U ovom radu sam također razvila metodu difuzne implantacije stanica u tkivo, mikro-transplantaciju, kako bih ciljano promijenila omjer starih, odnosno mladih stanica u dermisu. Time sam testirala hipotezu starenja prema kojoj je akumulacija starih stanica jedan od glavnih uzroka patofizioloških promjena kože koje se pojavljuju sa starenjem (Campisi, 1996, 1997). Kao modelni organizam koristila sam izogenu liniju štakora Fisher 344.

Tehnika mikro-transplantacije već ranije je uspješno upotrebljena u eksperimentima *in vivo* prijenosa gena u kožu i rane (Eriksson i sur. 1998) te je pokazana veća efikasnost ove metode u usporedbi s prijenosom gena pojedinačnim injekcijama, elektroporacijom i putem čestica zlata (Peachman i sur. 2003). U našem laboratoriju ta je metoda modificirana i unaprijeđena za mikro-transplantaciju stanica *in vivo*.

Prvi korak za uspješnu implantaciju mladih stanica *in vivo* bila je optimizacija same metode mikro-transplantacije kako bi se odredio optimalan broj i gustoća te broj tretmana potrebnih za postizanje što većeg postotka novih stanica u koži. Za izvedbu eksperimenta koristila sam aparat za tetoviranje kojim je bio moguć unos relativno velikog broja stanica u polje željene površine zahvaljujući mehanizmu oscilirajućih mikroigala koje frekvencijom od oko 130 uboda u sekundi prodiru u tkivo. Kako bih dodatno povećala uspješnost mikro-transplantacije, koristila sam iglu s 11 vrhova. Budući da je linija štakora Fisher 344 izogena linija, mogla sam koristiti heterotransplantaciju mladih stanica iz kože novorođenih štakora, obilježenih fluorescentnim markerom DiI, u kožu odraslih jedinki. Rezultati su pokazali da je najuspješnija implantacija novih stanica postignuta nakon samo jednog tretmana mikro-transplantacije 8 milijuna stanica u polje kože površine 1 cm² pri čemu je implantirano 14-50,6%

stanica, ovisno o analiziranom prerezu, a u prosjeku 33,1%. Stanice obilježene s DiI nalaze se u svim slojevima kože čak i duboko ispod kapilarne mreže. Time su potvrđene ranije pokazane prednosti ove metode kao što je zaobilazanje barijere koju čine keratinociti i zaobilazanje hidrofobnog sloja epiderme te direktan unos u željeni sloj kože (Peachman i sur. 2003).

Rezultati su također pokazali da je sam postupak mikro-transplantacije pouzdan i reproducibilan te da se samo jednim tretmanom postiže najbolja uspješnost implantacije, a da nakon dva ili tri tretmana pada postotak implantiranih stanica u tkivu. Implantacija stanica u kožu podrazumijeva mehanički unos stanica u tkivo posredovan ulazom igala u dermis, a pritom nastaju i mehanička oštećenja kože što uzrokuje aktivaciju imunološkog sustava s ciljem popravka tkivnog oštećenja. Moguće objašnjenje prethodno spomenutog fenomena je da se prvim tretmanom mlade stanice novorođenih štakora spremno implantiraju u kožu odraslih štakora budući da su agilnije i kompetitivnije u diobama i zacijeljivanju u odnosu na endogene stanice kože jednogodišnjih štakora koji su korišteni u eksperimentima optimizacije. U svojoj implantaciji mlade stanice su agilnije od postojeće subpopulacije senescentnih stanica kože i učinkovitije sudjeluju u regeneraciji tkiva nakon mehaničkog oštećenja te nisu meta imunološkog odgovora. Nadalje, implantirane mlade stanice obnavljaju tkivni mikrookoliš i razvijaju svoju mrežu vezivnog tkiva te revitaliziraju tkivnu homeostazu. Uspješna implantacija novih stanica u daljnjim tretmanima je otežana jer su mlade stanice prihvaćene u prvom tretmanu vitalne i efikasno sudjeluju u zarastanju te ne ostavljaju puno prostora za daljnje implantacije. Svakim tretmanom dolazi do mehaničkog oštećivanja tkiva što stimulira stanice na bržu proliferaciju kako bi oštećenje zacijelilo. Iz prethodnih istraživanja poznato je da se DiI tijekom diobe ravnomjerno raspoređuje na stanice kćeri pa njezina koncentracija u membranama stanica svakom diobom pada (Ragnarson i sur. 1992). To je ujedno i razlog pada intenziteta fluorescencije DiI u većini implantiranih stanica u tkivu sa svakim sljedećim tretmanom.

Nakon uspješne optimizacije, daljnji eksperimenti provedeni su na štakorima starim 21-24 mjeseca. Već prvi znak da mlade stanice implantirane u kožu starog štakora mijenjaju njezinu homeostazu te da ta promjena nije uzrokovana mehaničkim oštećenjem i samim procesom zacijeljivanja bile su promjene uočene u danima neposredno nakon tretmana mikro-transplantacije. Već tada je bilo moguće primijetiti da na polju u koje su implantirane mlade stanice dolazi do brže obnove kože te odvajanja krastastog površinskog sloja (slika 17), što nije bio slučaj na polju koje je bilo samo mehanički tretirano.

Opsežna histološka analiza kože štakora različite dobi pokazala je da se dermis kontinuirano mijenja u procesu starenja. Kvantitativnom analizom dobivenih rezultata pokazala sam da s vremenom pada broj fibroblasta u dermisu, što je u skladu s prethodnim istraživanjima (Gunin i sur. 2011). Histološkom analizom kože starih štakora pokazala sam da je u dermisu tkiva tretiranog mladim stanicama značajno povećan broj stanica, koje su puno gušće pakirane te je izvanstanični matriks koji ih okružuje kompaktan, što nije slučaj u netretiranom tkivu. Broj stanica tretiranog tkiva čak premašuje broj stanica u tkivima tromjesečnih životinja. Kod mehanički tretiranog tkiva također se vidi promjena u broju stanica s obzirom na netretirano tkivo, ali u puno manjem opsegu nego u tretiranom tkivu. To se može objasniti samim procesom zacijeljivanja nakon mehaničkog tretmana gdje mlade stanice već prisutne u koži imaju veći diobeni potencijal u odnosu na senescentne stanice koje su inferiorne u tim procesima. Uočene promjene pokazale su da sam korištenjem metode mikro-transplantacije uspješno promijenila omjer starih, odnosno mladih stanica u dermisu što je dovelo do promjene homeostaze u tretiranoj koži starih štakora.

Ranija istraživanja pokazala su da su matične stanice kože osjetljive na promjene koje se sa starenjem odvijaju u organizmu te da pritom pada njihov regenerativni potencijal (Doles i sur. 2012). U skladu s tim, analizom proliferacijskog statusa stanica kože štakora rastuće dobi potvrdila sam da sa starenjem kontinuirano pada proliferacijski status epidermalnih matičnih stanica u bazalnom sloju epidermisa. Nakon transplantacije mladih stanica u kožu starih životinja u značajnom postotku (~33%) pokazala sam da se proliferacijski status matičnih stanica na bazalnoj membrani značajno povećao te je s prosječno 20% Ki67 pozitivnih stanica na razini životinja starih između 3 i 10 mjeseci te je dvostruko veći od statusa netretiranog tkiva istih životinja. Time sam pokazala da mlade stanice u koži starog štakora utječu na tkivnu homeostazu i bitno mijenjaju sekretorni fenotip karakterističan za staro tkivo što rezultira revitalizacijom matičnih stanica na bazalnoj membrani. Tome u prilog idu i nedavna istraživanja koja su pokazala da je moguće ostarjele matične stanice koje imaju smanjeni potencijal proliferacije pomladiti kroz određene promjene u njihovom sistemskom okolišu (Stanley i sur. 2012).

Osim smanjenja broja fibroblasta, sa starenjem dolazi i do pada njihove sposobnosti sinteze kolagena te posljedično do opće atrofije izvanstaničnog matriksa (Gunin i sur. 2011; Makrantonaki i Zouboulis, 2007; Varani i sur. 2001). Ovim istraživanjem potvrdila sam da su kolageni mlađih životinja tanji i pravilnije organizirani, dok kod starih životinja kolagenski

snopovi pokazuju neuređenu, raspršenu strukturu što odgovara podacima iz literature (Gniadecka i sur. 1994; Lavker i sur. 1987; Uitto, 1986). Puno jači intenzitet imunofluorescencijskih signala kolagena u koži starih štakora vjerojatno je posljedica njihove promijenjene organizacije, odnosno raspršenosti samih snopova koji uz to zauzimaju i veću površinu budući da je broj stanica u starom dermisu značajno manji. Najvažniju promjenu pokazuje tkivo starog štakora nakon tretmana mikro-transplantacije koje ne nalikuje netretiranom starom tkivu, već izgledom kolagenskih snopova potpuno nalikuje koži mladih životinja.

Svi navedeni rezultati govore u prilog tome da je stara koža u koju su implantirane mlade stanice sličnija mladoj koži tromjesečnih štakora nego netretiranim tkivima uzorkovanim s istih starih štakora. Na temelju dobivenih rezultata predlažem sljedeći scenarij zbivanja. (i) Tretman mikro-transplantacije omogućava implantaciju mladih stanica u staru kožu, u okolinu narušenu sekretornim fenotipom senescentnih stanica koje u tkivu uzrokuju kroničnu sterilnu upalu. (ii) Implantacija stanica u kožu podrazumijeva mehanički unos stanica u tkivo, a pritom nastaju i mehanička oštećenja kože što aktivira procese zacjeljivanja uključujući i aktivaciju imunološkog sustava. U toj situaciji mlade stanice, koje su agilnije i ne ispoljavaju SASP, se spremno implantiraju u kožu, dok su stare stanice uklonjene. (iii) Uklanjanje starih stanica je posljedica njihove slabije kompeticije u odnosu na mlade stanice iz razloga što se ne mogu dijeliti, loše se povezuju sa okolnim stanicama dok znatan dio njihovog sekretornog fenotipa čine proinflammatorni proteini koji ih obilježavaju za uklanjanje od strane stanica imunološkog odgovora. (iv) Mlade stanice koje su se implantirale u staru kožu mijenjaju tkivnu homeostazu sličniju mladom tkivu inhibirajući štetno djelovanje senescentnog fenotipa starih stanica i time dovode do regeneracije kože.

Ovim istraživanjem potvrdila sam hipotezu da mlade stanice mijenjaju homeostazu tkiva u koji su implantirane, neutraliziraju sekretorni fenotip starih stanica i posljedično revitaliziraju nišu matičnih stanica što u konačnici dovodi do regeneracije kože.

5. ZAKLJUČCI

1. Dugotrajan tretman melatoninom nije pokazao značajan utjecaj na usporavanje skraćivanja duljine telomera kod mužjaka i ženki štakora Wistar; samo u pojedinim tkivima pokazuje blagi pozitivan efekt.
2. Dugotrajan tretman resveratrolom pokazao je pozitivan utjecaj na usporavanje skraćivanja duljine telomera u jetri ženki nakon 9 i 21-mjesečnog tretmana dok u ostalim tkivima mužjaka i ženki pokazuje samo blagi pozitivan efekt.
3. Optimizacija metode mikro-transplantacija pokazala je najveću uspješnost implantacije mladih stanica u kožu štakora kod jednokratnog tretmana s 8 milijuna stanica na površini od 1 cm². S ponavljanjem tretmana mikro-transplantacije pada efikasnost implantacije mladih stanica.
4. Uspješnost implantacije kreće se od 14 do 50,6% stanica, ovisno o analiziranom prerezu, a u prosjeku iznosi 33,1%. Implantirane stanice nalaze se u svim slojevima kože, čak i duboko ispod kapilarne mreže.
5. Histološka analiza potvrdila je da sa starenjem pada broj fibroblasta u koži štakora, međutim nakon mikro-transplantacije broj stanica u tretiranom starom tkivu premašuje broj stanica u tkivima tromjesečnih životinja.
6. Sa starenjem kontinuirano pada proliferacijski status epidermalnih matičnih stanica u bazalnom sloju epidermisa. Implantacija značajnog postotka (~33%) mladih stanica u kožu 21-24 mj. starih životinja pokazala je da se proliferacijski status matičnih stanica na bazalnoj membrani značajno povećao te je s prosječno 20% Ki67 pozitivnih stanica na razini životinja starih između 3 i 10 mjeseci te je dvostruko veći od statusa netretiranog tkiva istih životinja.
7. Ovo istraživanje potvrđuje da su kolageni mlađih životinja tanji i pravilnije organizirani u tkivu, dok kod starih životinja kolagenski snopovi pokazuju neuređenu, raspršenu strukturu. Koža starog štakora nakon implantacije mladih stanica ne nalikuje netretiranom starom tkivu, već izgledom kolagenskih snopova potpuno nalikuje koži mladih životinja.

8. Analize provedene na tkivima starih štakora nakon tretmana mikro-transplantacije pokazuju da mlade implantirane stanice mijenjaju homeostazu tkiva u koje su implantirane, neutraliziraju sekretorni fenotip starih stanica i posljedično revitaliziraju nišu matičnih stanica što u konačnici dovodi do regeneracije kože.

6. LITERATURA

1. Acosta, J.C., Banito, A., Wuestefeld, T., Georgilis, A., Janich, P., Morton, J.P., Athineos, D., Kang, T.-W., Lasitschka, F., Andrulis, M., et al. (2013). A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat. Cell Biol.* *15*, 978–990.
2. Agil, A., Rosado, I., Ruiz, R., Figueroa, A., Zen, N., and Fernández-Vázquez, G. (2012). Melatonin improves glucose homeostasis in young Zucker diabetic fatty rats. *J. Pineal Res.* *52*, 203–210.
3. Aird, K.M., Zhang, G., Li, H., Tu, Z., Bitler, B.G., Garipov, A., Wu, H., Wei, Z., Wagner, S.N., Herlyn, M., et al. (2013). Suppression of nucleotide metabolism underlies the establishment and maintenance of oncogene-induced senescence. *Cell Rep* *3*, 1252–1265.
4. Albertini, M.C., Radogna, F., Accorsi, A., Uguccioni, F., Paternoster, L., Cerella, C., De Nicola, M., D'Alessio, M., Bergamaschi, A., Magrini, A., et al. (2006). Intracellular prooxidant activity of melatonin deprives U937 cells of reduced glutathione without affecting glutathione peroxidase activity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1091*, 10–16.
5. Alcorta, D.A., Xiong, Y., Phelps, D., Hannon, G., Beach, D., and Barrett, J.C. (1996). Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *93*, 13742–13747.
6. Arlt, W., and Hewison, M. (2004). Hormones and immune function: implications of aging. *Aging Cell* *3*, 209–216.
7. Baar, M.P., Brandt, R.M.C., Putavet, D.A., Klein, J.D.D., Derks, K.W.J., Bourgeois, B.R.M., Stryeck, S., Rijksen, Y., van Willigenburg, H., Feijtel, D.A., et al. (2017). Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell* *169*, 132-147.e16.
8. Baker, D.J., Wijshake, T., Tchkonja, T., LeBrasseur, N.K., Childs, B.G., van de Sluis, B., Kirkland, J.L., and van Deursen, J.M. (2011). Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* *479*, 232–236.
9. Baker, D.J., Dawlaty, M.M., Wijshake, T., Jeganathan, K.B., Malureanu, L., van Ree, J.H., Crespo-Diaz, R., Reyes, S., Seaburg, L., Shapiro, V., et al. (2013). Increased expression of BubR1 protects against aneuploidy and cancer and extends healthy lifespan. *Nat. Cell Biol.* *15*, 96–102.
10. Balaban, R.S., Nemoto, S., and Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* *120*, 483–495.
11. Barlow-Walden, L.R., Reiter, R.J., Abe, M., Pablos, M., Menendez-Pelaez, A., Chen, L.D., and Poeggeler, B. (1995). Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem. Int.* *26*, 497–502.
12. Baumann, L. (2007). Skin ageing and its treatment. *J. Pathol.* *211*, 241–251.
13. Baur, J.A., Pearson, K.J., Price, N.L., Jamieson, H.A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V.V., Allard, J.S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., et al. (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* *444*, 337–342.

14. Beauséjour, C.M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S.W., Yaswen, P., and Campisi, J. (2003). Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.* 22, 4212–4222.
15. Blanpain, C., and Fuchs, E. (2006). Epidermal stem cells of the skin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 339–373.
16. Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S., and Wright, W.E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279, 349–352.
17. Boss, G.R., and Seegmiller, J.E. (1981). Age-related physiological changes and their clinical significance. *West. J. Med.* 135, 434–440.
18. Büyükavci, M., Ozdemir, O., Buck, S., Stout, M., Ravindranath, Y., and Savaşan, S. (2006). Melatonin cytotoxicity in human leukemia cells: relation with its pro-oxidant effect. *Fundam Clin Pharmacol* 20, 73–79.
19. Campisi, J. (1996). Replicative senescence: an old lives' tale? *Cell* 84, 497–500.
20. Campisi, J. (1997). The biology of replicative senescence. *Eur. J. Cancer* 33, 703–709.
21. Campisi, J. (2005). Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120, 513–522.
22. Campisi, J. (2013). Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 685–705.
23. Campisi, J., Andersen, J.K., Kapahi, P., and Melov, S. (2011). Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease? *Semin. Cancer Biol.* 21, 354–359.
24. Cardinali, D.P., Scacchi Bernasconi, P.A., Reynoso, R., Reyes Toso, C.F., and Scacchi, P. (2013). Melatonin May Curtail the Metabolic Syndrome: Studies on Initial and Fully Established Fructose-Induced Metabolic Syndrome in Rats. *Int J Mol Sci* 14, 2502–2514.
25. Carrillo-Vico, A., Reiter, R.J., Lardone, P.J., Herrera, J.L., Fernández-Montesinos, R., Guerrero, J.M., and Pozo, D. (2006). The modulatory role of melatonin on immune responsiveness. *Curr Opin Investig Drugs* 7, 423–431.
26. Carrillo-Vico, A., Lardone, P.J., Álvarez-Sánchez, N., Rodríguez-Rodríguez, A., and Guerrero, J.M. (2013). Melatonin: Buffering the Immune System. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 8638–8683.
27. Chakraborti, S., Mandal, M., Das, S., Mandal, A., and Chakraborti, T. (2003). Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol. Cell. Biochem.* 253, 269–285.
28. Chang, J., Wang, Y., Shao, L., Laberge, R.-M., Demaria, M., Campisi, J., Janakiraman, K., Sharpless, N.E., Ding, S., Feng, W., et al. (2016). Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med* 22, 78–83.
29. Chen, J. (2004). Senescence and functional failure in hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.* 32, 1025–1032.
30. Childs, B.G., Durik, M., Baker, D.J., and van Deursen, J.M. (2015). Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med* 21, 1424–1435.

31. Colavitti, R., and Finkel, T. (2005). Reactive Oxygen Species as Mediators of Cellular Senescence. *IUBMB Life* 57, 277–281.
32. Collins, C.J., and Sedivy, J.M. (2003). Involvement of the INK4a/Arf gene locus in senescence. *Aging Cell* 2, 145–150.
33. Coppé, J.-P., Patil, C.K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D.P., Goldstein, J., Nelson, P.S., Desprez, P.-Y., and Campisi, J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* 6, 2853–2868.
34. Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., and Campisi, J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* 5, 99–118.
35. Cristofalo, V.J., and Pignolo, R.J. (1993). Replicative senescence of human fibroblast-like cells in culture. *Physiol. Rev.* 73, 617–638.
36. De Cecco, M., Jeyapalan, J., Zhao, X., Tamamori-Adachi, M., and Sedivy, J.M. (2011). Nuclear protein accumulation in cellular senescence and organismal aging revealed with a novel single-cell resolution fluorescence microscopy assay. *Aging (Albany NY)* 3, 955–967.
37. Demas, G.E., and Nelson, R.J. (1998). Exogenous melatonin enhances cell-mediated, but not humoral, immune function in adult male deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *J. Biol. Rhythms* 13, 245–252.
38. van Deursen, J.M. (2014). The role of senescent cells in ageing. *Nature* 509, 439–446.
39. Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre', M., Nuciforo, P.G., Bensimon, A., et al. (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 444, 638–642.
40. Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., and Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 9363–9367.
41. Doles, J., Storer, M., Cozzuto, L., Roma, G., and Keyes, W.M. (2012). Age-associated inflammation inhibits epidermal stem cell function. *Genes Dev.* 26, 2144–2153.
42. Duncan, K.O., and Leffell, D.J. (1997). Preoperative assessment of the elderly patient. *Dermatol Clin* 15, 583–593.
43. El-Domyati, M., Attia, S., Saleh, F., Brown, D., Birk, D.E., Gasparro, F., Ahmad, H., and Uitto, J. (2002). Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Exp. Dermatol.* 11, 398–405.
44. Eriksson, E., Yao, F., Svensjö, T., Winkler, T., Slama, J., Macklin, M.D., Andree, C., McGregor, M., Hinshaw, V., and Swain, W.F. (1998). In vivo gene transfer to skin and wound by microseeding. *J. Surg. Res.* 78, 85–91.
45. d'Adda di Fagagna, F. (2008). Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat. Rev. Cancer* 8, 512–522.

46. d'Adda di Fagagna, F., Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P., and Jackson, S.P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426, 194–198.
47. Farage, M.A., Miller, K.W., Elsner, P., and Maibach, H.I. (2007). Structural characteristics of the aging skin: a review. *Cutan Ocul Toxicol* 26, 343–357.
48. Ferrucci, L., Ble, A., Bandinelli, S., Lauretani, F., Suthers, K., and Guralnik, J.M. (2004). A flame burning within. *Aging Clin Exp Res* 16, 240–243.
49. Finley, L.W.S., and Haigis, M.C. (2009). The coordination of nuclear and mitochondrial communication during aging and calorie restriction. *Ageing Res. Rev.* 8, 173–188.
50. Flores, I., Evan, G., and Blasco, M.A. (2006). Genetic Analysis of Myc and Telomerase Interactions In Vivo. *Mol Cell Biol* 26, 6130–6138.
51. Flores, I., Canela, A., Vera, E., Tejera, A., Cotsarelis, G., and Blasco, M.A. (2008). The longest telomeres: a general signature of adult stem cell compartments. *Genes Dev.* 22, 654–667.
52. Freund, A., Orjalo, A.V., Desprez, P.-Y., and Campisi, J. (2010). Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med* 16, 238–246.
53. Geiger, H., and Van Zant, G. (2002). The aging of lympho-hematopoietic stem cells. *Nat. Immunol.* 3, 329–333.
54. Gniadecka, M., Gniadecki, R., Serup, J., and Søndergaard, J. (1994). Ultrasound structure and digital image analysis of the subepidermal low echogenic band in aged human skin: diurnal changes and interindividual variability. *J. Invest. Dermatol.* 102, 362–365.
55. Gunin, A.G., Kornilova, N.K., Vasilieva, O.V., and Petrov, V.V. (2011). Age-Related Changes in Proliferation, the Numbers of Mast Cells, Eosinophils, and cd45-Positive Cells in Human Dermis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 66A, 385–392.
56. Harley, C.B., Futcher, A.B., and Greider, C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458–460.
57. Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25, 585–621.
58. Hemann, M.T., Strong, M.A., Hao, L.Y., and Greider, C.W. (2001). The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell* 107, 67–77.
59. Hernandez-Segura, A., Nehme, J., and Demaria, M. (2018). Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol.* 28, 436–453.
60. Hewitt, G., Jurk, D., Marques, F.D.M., Correia-Melo, C., Hardy, T., Gackowska, A., Anderson, R., Taschuk, M., Mann, J., and Passos, J.F. (2012). Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence. *Nat Commun* 3, 708.
61. Höhn, A., Weber, D., Jung, T., Ott, C., Hugo, M., Kochlik, B., Kehm, R., König, J., Grune, T., and Castro, J.P. (2016). Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. *Redox Biol* 11, 482–501.

62. Holstege, H., Pfeiffer, W., Sie, D., Hulsman, M., Nicholas, T.J., Lee, C.C., Ross, T., Lin, J., Miller, M.A., Ylstra, B., et al. (2014). Somatic mutations found in the healthy blood compartment of a 115-yr-old woman demonstrate oligoclonal hematopoiesis. *Genome Res* 24, 733–742.
63. Howitz, K.T., Bitterman, K.J., Cohen, H.Y., Lamming, D.W., Lavu, S., Wood, J.G., Zipkin, R.E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L.-L., et al. (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425, 191–196.
64. Jun, J.-I., and Lau, L.F. (2010). The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nat. Cell Biol.* 12, 676–685.
65. Kang, T.-W., Yevsa, T., Woller, N., Hoenicke, L., Wuestefeld, T., Dauch, D., Hohmeyer, A., Gereke, M., Rudalska, R., Potapova, A., et al. (2011). Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* 479, 547–551.
66. Karlseder, J., Broccoli, D., Dai, Y., Hardy, S., and de Lange, T. (1999). p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* 283, 1321–1325.
67. Kelly, D.P. (2011). Cell biology: Ageing theories unified. *Nature* 470, 342–343.
68. Kitagawa, A., Ohta, Y., and Ohashi, K. (2012). Melatonin improves metabolic syndrome induced by high fructose intake in rats. *J. Pineal Res.* 52, 403–413.
69. Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R.A., Hearn, S., Simon, J., Miething, C., Yee, H., Zender, L., and Lowe, S.W. (2008). Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* 134, 657–667.
70. Krtolica, A., and Campisi, J. (2002). Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 1401–1414.
71. Labbé, A., Garand, C., Cogger, V.C., Paquet, E.R., Desbiens, M., Le Couteur, D.G., and Lebel, M. (2011). Resveratrol improves insulin resistance hyperglycemia and hepatosteatosis but not hypertriglyceridemia, inflammation, and life span in a mouse model for Werner syndrome. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 66, 264–278.
72. Laberge, R.-M., Awad, P., Campisi, J., and Desprez, P.-Y. (2012). Epithelial-mesenchymal transition induced by senescent fibroblasts. *Cancer Microenviron* 5, 39–44.
73. Lavker, R.M., Zheng, P.S., and Dong, G. (1987). Aged skin: a study by light, transmission electron, and scanning electron microscopy. *J. Invest. Dermatol.* 88, 44s-51s.
74. Leibowitz, A., Peleg, E., Sharabi, Y., Shabtai, Z., Shamiss, A., and Grossman, E. (2008). The role of melatonin in the pathogenesis of hypertension in rats with metabolic syndrome. *Am. J. Hypertens.* 21, 348–351.
75. Lowe, S.W., and Sherr, C.J. (2003). Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 77–83.
76. da Luz, P.L., Tanaka, L., Brum, P.C., Dourado, P.M.M., Favarato, D., Krieger, J.E., and Laurindo, F.R.M. (2012). Red wine and equivalent oral pharmacological doses of resveratrol delay vascular aging but do not extend life span in rats. *Atherosclerosis* 224, 136–142.

77. Makrantonaki, E., and Zouboulis, C.C. (2007). William J. Cunliffe Scientific Awards. Characteristics and pathomechanisms of endogenously aged skin. *Dermatology (Basel)* 214, 352–360.
78. Martini, F.H., Nath, J.L., and Bartholomew, E.F. (2011). *Fundamentals of Anatomy & Physiology* (San Francisco: Benjamin Cummings).
79. Matsumura, T., Zerrudo, Z., and Hayflick, L. (1979). Senescent human diploid cells in culture: survival, DNA synthesis and morphology. *J Gerontol* 34, 328–334.
80. McCallion, R., and Li Wan Po, A. (1993). Dry and photo-aged skin: manifestations and management. *J Clin Pharm Ther* 18, 15–32.
81. McCullough, J.L., and Kelly, K.M. (2006). Prevention and treatment of skin aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1067, 323–331.
82. McElhaney, J.E., and Effros, R.B. (2009). Immunosenescence: what does it mean to health outcomes in older adults? *Curr. Opin. Immunol.* 21, 418–424.
83. Moiseeva, O., Mallette, F.A., Mukhopadhyay, U.K., Moores, A., and Ferbeyre, G. (2006). DNA damage signaling and p53-dependent senescence after prolonged beta-interferon stimulation. *Mol. Biol. Cell* 17, 1583–1592.
84. Muñoz-Espín, D., Cañamero, M., Maraver, A., Gómez-López, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., Rodríguez-Baeza, A., Varela-Nieto, I., Ruberte, J., Collado, M., et al. (2013). Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell* 155, 1104–1118.
85. Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113, 703–716.
86. Narita, M., Narita, M., Krizhanovskiy, V., Nunez, S., Chicas, A., Hearn, S.A., Myers, M.P., and Lowe, S.W. (2006). A novel role for high-mobility group a proteins in cellular senescence and heterochromatin formation. *Cell* 126, 503–514.
87. Nelson, G., Wordsworth, J., Wang, C., Jurk, D., Lawless, C., Martin-Ruiz, C., and von Zglinicki, T. (2012). A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence. *Aging Cell* 11, 345–349.
88. Nielsen, G.P., Stemmer-Rachamimov, A.O., Shaw, J., Roy, J.E., Koh, J., and Louis, D.N. (1999). Immunohistochemical survey of p16INK4A expression in normal human adult and infant tissues. *Lab. Invest.* 79, 1137–1143.
89. Ohtani, N., Yamakoshi, K., Takahashi, A., and Hara, E. (2004). The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *J. Med. Invest.* 51, 146–153.
90. Olovnikov, A.M. (1971). [Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides]. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 201, 1496–1499.
91. Olovnikov, A.M. (1973). A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J. Theor. Biol.* 41, 181–190.

92. Pablos, M.I., Reiter, R.J., Ortiz, G.G., Guerrero, J.M., Agapito, M.T., Chuang, J.I., and Sewerynek, E. (1998). Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light. *Neurochem. Int.* *32*, 69–75.
93. Palmero, I., McConnell, B., Parry, D., Brookes, S., Hara, E., Bates, S., Jat, P., and Peters, G. (1997). Accumulation of p16INK4a in mouse fibroblasts as a function of replicative senescence and not of retinoblastoma gene status. *Oncogene* *15*, 495–503.
94. Park, I.-K., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2004). Bmi1, stem cells, and senescence regulation. *J. Clin. Invest.* *113*, 175–179.
95. Peachman, K.K., Rao, M., and Alving, C.R. (2003). Immunization with DNA through the skin. *Methods* *31*, 232–242.
96. Radogna, F., Paternoster, L., De Nicola, M., Cerella, C., Ammendola, S., Bedini, A., Tarzia, G., Aquilano, K., Ciriolo, M., and Ghibelli, L. (2009). Rapid and transient stimulation of intracellular reactive oxygen species by melatonin in normal and tumor leukocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *239*, 37–45.
97. Ragnarson, B., Bengtsson, L., and Hægerstrand, A. (1992). Labeling with fluorescent carbocyanine dyes of cultured endothelial and smooth muscle cells by growth in dye-containing medium. *Histochemistry* *97*, 329–333.
98. Rajagopalan, S., and Long, E.O. (2012). Cellular senescence induced by CD158d reprograms natural killer cells to promote vascular remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *109*, 20596–20601.
99. Reddel, R.R. (2000). The role of senescence and immortalization in carcinogenesis. *Carcinogenesis* *21*, 477–484.
100. Reiter, R.J. (1993). The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* *49*, 654–664.
101. Reiter, R.J., Tan, D., and Burkhardt, S. (2002). Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin. *Mech. Ageing Dev.* *123*, 1007–1019.
102. Ressler, S., Bartkova, J., Niederegger, H., Bartek, J., Scharffetter-Kochanek, K., Jansen-Dürr, P., and Wlaschek, M. (2006). p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell* *5*, 379–389.
103. Richter, T., and von Zglinicki, T. (2007). A continuous correlation between oxidative stress and telomere shortening in fibroblasts. *Exp. Gerontol.* *42*, 1039–1042.
104. Rodier, F., Coppé, J.-P., Patil, C.K., Hoeijmakers, W.A.M., Muñoz, D.P., Raza, S.R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A.R., and Campisi, J. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat. Cell Biol.* *11*, 973–979.
105. Rudolph, K.L., Chang, S., Lee, H.W., Blasco, M., Gottlieb, G.J., Greider, C., and DePinho, R.A. (1999). Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell* *96*, 701–712.

106. Sahin, E., Colla, S., Liesa, M., Moslehi, J., Müller, F.L., Guo, M., Cooper, M., Kotton, D., Fabian, A.J., Walkey, C., et al. (2011). Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature* 470, 359–365.
107. Saretzki, G., Murphy, M.P., and von Zglinicki, T. (2003). MitoQ counteracts telomere shortening and elongates lifespan of fibroblasts under mild oxidative stress. *Aging Cell* 2, 141–143.
108. Scholzen, T., and Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* 182, 311–322.
109. Sedelnikova, O.A., Horikawa, I., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., Bonner, W.M., and Barrett, J.C. (2004). Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* 6, 168–170.
110. Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593–602.
111. Shamma, A., Takegami, Y., Miki, T., Kitajima, S., Noda, M., Obara, T., Okamoto, T., and Takahashi, C. (2009). Rb Regulates DNA damage response and cellular senescence through E2F-dependent suppression of N-ras isoprenylation. *Cancer Cell* 15, 255–269.
112. Shay, J.W., and Wright, W.E. (2000). Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 72–76.
113. Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501–1512.
114. Sherratt, M.J. (2009). Tissue elasticity and the ageing elastic fibre. *Age (Dordr)* 31, 305–325.
115. Sherratt, M.J., Bayley, C.P., Reilly, S.M., Gibbs, N.K., Griffiths, C.E.M., and Watson, R.E.B. (2010). Low-dose ultraviolet radiation selectively degrades chromophore-rich extracellular matrix components. *J. Pathol.* 222, 32–40.
116. Shuster, S., Black, M.M., and McVitie, E. (1975). The influence of age and sex on skin thickness, skin collagen and density. *Br. J. Dermatol.* 93, 639–643.
117. Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82, 291–295.
118. Smoliga, J.M., Baur, J.A., and Hausenblas, H.A. (2011). Resveratrol and health--a comprehensive review of human clinical trials. *Mol Nutr Food Res* 55, 1129–1141.
119. Soto-Gamez, A., and Demaria, M. (2017). Therapeutic interventions for aging: the case of cellular senescence. *Drug Discov. Today* 22, 786–795.
120. Stanley, E., Lin, C.-Y., Jin, S., Liu, J., Sottas, C.M., Ge, R., Zirkin, B.R., and Chen, H. (2012). Identification, Proliferation, and Differentiation of Adult Leydig Stem Cells. *Endocrinology* 153, 5002–5010.
121. Storer, M., Mas, A., Robert-Moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, M.C., Di Giacomo, V., Yosef, R., Pilpel, N., Krizhanovsky, V., Sharpe, J., et al. (2013). Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell* 155, 1119–1130.

122. Sze, S.F., Liu, W.K., and Ng, T.B. (1993). Stimulation of murine splenocytes by melatonin and methoxytryptamine. *J. Neural Transmission* 94, 115–126.
123. Tan, D.-X., Manchester, L.C., Terron, M.P., Flores, L.J., and Reiter, R.J. (2007). One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J. Pineal Res.* 42, 28–42.
124. Tobin, D.J. (2017). Introduction to skin aging. *J Tissue Viability* 26, 37–46.
125. Tomás-Loba, A., Flores, I., Fernández-Marcos, P.J., Cayuela, M.L., Maraver, A., Tejera, A., Borrás, C., Matheu, A., Klatt, P., Flores, J.M., et al. (2008). Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice. *Cell* 135, 609–622.
126. Uitto, J. (1986). Connective tissue biochemistry of the aging dermis. Age-related alterations in collagen and elastin. *Dermatol Clin* 4, 433–446.
127. Varani, J., Spearman, D., Perone, P., Fligiel, S.E., Datta, S.C., Wang, Z.Q., Shao, Y., Kang, S., Fisher, G.J., and Voorhees, J.J. (2001). Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen in vitro. *Am. J. Pathol.* 158, 931–942.
128. Varani, J., Dame, M.K., Rittie, L., Fligiel, S.E.G., Kang, S., Fisher, G.J., and Voorhees, J.J. (2006). Decreased Collagen Production in Chronologically Aged Skin. *Am J Pathol* 168, 1861–1868.
129. Vasto, S., Candore, G., Balistreri, C.R., Caruso, M., Colonna-Romano, G., Grimaldi, M.P., Listi, F., Nuzzo, D., Lio, D., and Caruso, C. (2007). Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. *Mech. Ageing Dev.* 128, 83–91.
130. Vaziri, H., and Benchimol, S. (1998). Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr. Biol.* 8, 279–282.
131. Villa, A., Navarro-Galve, B., Bueno, C., Franco, S., Blasco, M.A., and Martinez-Serrano, A. (2004). Long-term molecular and cellular stability of human neural stem cell lines. *Exp. Cell Res.* 294, 559–570.
132. Viswanathan, M., Kim, S.K., Berdichevsky, A., and Guarente, L. (2005). A role for SIR-2.1 regulation of ER stress response genes in determining *C. elegans* life span. *Dev. Cell* 9, 605–615.
133. Vitseva, O., Varghese, S., Chakrabarti, S., Folts, J.D., and Freedman, J.E. (2005). Grape seed and skin extracts inhibit platelet function and release of reactive oxygen intermediates. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 46, 445–451.
134. Waaijer, M.E.C., Parish, W.E., Strongitharm, B.H., van Heemst, D., Slagboom, P.E., de Craen, A.J.M., Sedivy, J.M., Westendorp, R.G.J., Gunn, D.A., and Maier, A.B. (2012). The number of p16INK4a positive cells in human skin reflects biological age. *Aging Cell* 11, 722–725.
135. Wallace, D.C. (2005). A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu. Rev. Genet.* 39, 359–407.

136. Wang, A.S., and Dreesen, O. (2018). Biomarkers of Cellular Senescence and Skin Aging. *Front Genet* 9.
137. Wong, J.M.Y., and Collins, K. (2003). Telomere maintenance and disease. *Lancet* 362, 983–988.
138. Wood, J.G., Rogina, B., Lavu, S., Howitz, K., Helfand, S.L., Tatar, M., and Sinclair, D. (2004). Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* 430, 686–689.
139. Xu, M., Tchkonina, T., Ding, H., Ogrodnik, M., Lubbers, E.R., Pirtskhalava, T., White, T.A., Johnson, K.O., Stout, M.B., Mezera, V., et al. (2015). JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory phenotype and frailty in old age. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E6301–E6310.
140. Xu, M., Pirtskhalava, T., Farr, J.N., Weigand, B.M., Palmer, A.K., Weivoda, M.M., Inman, C.L., Ogrodnik, M.B., Hachfeld, C.M., Fraser, D.G., et al. (2018). Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat. Med.* 24, 1246–1256.
141. Yosef, R., Pilpel, N., Tokarsky-Amiel, R., Biran, A., Ovadya, Y., Cohen, S., Vadai, E., Dassa, L., Shahar, E., Condiotti, R., et al. (2016). Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat Commun* 7, 11190.
142. von Zglinicki, T. (2002). Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem. Sci.* 27, 339–344.
143. von Zglinicki, T., and Martin-Ruiz, C.M. (2005). Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases. *Curr. Mol. Med.* 5, 197–203.
144. von Zglinicki, T., Saretzki, G., Döcke, W., and Lotze, C. (1995). Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp. Cell Res.* 220, 186–193.
145. von Zglinicki, T., Saretzki, G., Ladhoff, J., d’Adda di Fagagna, F., and Jackson, S.P. (2005). Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech. Ageing Dev.* 126, 111–117.
146. Zhang, H.-M., and Zhang, Y. (2014). Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. *J. Pineal Res.* 57, 131–146.
147. Zhang, H., Pan, K.-H., and Cohen, S.N. (2003). Senescence-specific gene expression fingerprints reveal cell-type-dependent physical clustering of up-regulated chromosomal loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 3251–3256.
148. Zhang, R., Chen, W., and Adams, P.D. (2007). Molecular dissection of formation of senescence-associated heterochromatin foci. *Mol. Cell. Biol.* 27, 2343–2358.

7. SAŽETAK

Starenje bez iznimke zahvaća cijelu ljudsku populaciju i glavni je faktor rizika za pojavu brojnih patoloških stanja koja dovode do nastanka bolesti. U posljednjih nekoliko godina je ostvaren veliki napredak u razumijevanju procesa starenja, u osnovi kojega je stanično starenje. Stare stanice, osim gubitkom sposobnosti dioba, svojim metabolizmom štetno utječu na okolno tkivo. Na taj način narušavaju normalne funkcije susjednih zdravih stanica induciranjem njihove senescencije, a istovremeno stvaraju okolinu koja potiče proonkogeni rast. Razumijevanje tog procesa stvorilo je temelj za osmišljavanje različitih strategija borbe protiv starenja. U ovom istraživanju, korištenjem štakora kao animalnog modela, ispitala sam kako na starenje djeluju sistemski tretman antioksidansima te lokalna promjena omjera mladih i starih stanica u tkivu, s ciljem usporavanja, odnosno reprogramiranja dinamike starenja. Dobiveni rezultati pokazuju kako dugotrajan tretman resveratrolom značajno usporava brzinu skraćivanja telomera u jetri ženki, međutim u ostalim tkivima ženki i svim tkivima mužjaka nije zapažen značajan učinak. Tretman melatoninom nije pokazao značajan utjecaj na dinamiku starenja u analiziranim tkivima. Lokalna promjena omjera mladih i starih stanica u tkivu starih štakora dovela je do smanjenja sekretornog fenotipa starih stanica, promjene homeostaze starog tkiva i posljedično do revitalizacije niše matičnih stanica što je u konačnici dovelo i do regeneracije kože.

8. SUMMARY

Aging inevitably affects the entire human population and it is the major risk factor for the emergence of numerous pathological conditions leading to the onset of disease. Recently, great strides have been made in understanding the aging process at the level of cellular aging. Old cells, apart from losing their ability for further divisions, have detrimental effects on surrounding tissues. Thus, aging cells distort the normal functions of neighbouring healthy cells by inducing their senescence, while at the same time creating an environment that promotes pro-oncogenic growth. Understanding this process has created a foundation for the design of various anti-aging strategies. In this study on rat animal model, I investigated how systemic treatment with antioxidants and local changes in the ratio of young and old cells in tissue affect aging with the aim of slowing or reprogramming aging dynamics. The obtained results show that long-term resveratrol treatment significantly decreases telomere attrition in liver of female rats, however, in other female tissues and all investigated male tissues no significant effect has been observed. Melatonin treatment did not show significant effect regarding dynamics of aging in the analyzed tissues. Local changes in ratio of young and old cells in old rat tissues decreased secretory phenotype of senescent cells and changed old tissue homeostasis, which consequently led to revitalization of stem cells and ultimately led to skin regeneration.

9. ŽIVOTOPIS

Obrazovanje:

2006.-2013. Diplomirala sam na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, Biološki odsjek, smjer Molekularna biologija

Stručno usavršavanje:

listopad 2017. – siječanj 2018. Dobitnica sam „EMBO Short-Term Fellowship“ stipendije za studijski boravak u CD-Laboratory for the Biotechnology of Skin Aging pod vodstvom dr.sc. Floriana Grubera na Medicinskom sveučilištu u Beču s ciljem usvajanja novih tehnika i znanja te uspostave buduće suradnje.

siječanj 2015. – Zaposlena sam kao stručni suradnik, doktorand, na projektu „Starosno-ovisna ekspresija membranskih prijenosnika u štakora“ (IP-11-2013-1481) 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.

rujan 2013. – rujan 2014. Zaposlena sam kao stručni suradnik u sklopu programa stručnog osposobljavanja za rad bez zasnivanja radnog odnosa u Laboratoriju za molekularnu i staničnu biologiju, IRB pod vodstvom dr. sc. Mary Sopta.

ožujak 2013. – rujan 2013. Volontirala sam u Laboratoriju za molekularnu i staničnu biologiju, IRB pod vodstvom dr. sc. Mary Sopta.

veljača 2012. – veljača 2013. Izradila sam diplomski rad pod naslovom „Analiza utjecaja inaktivacije kvašćevog gena TAF14 na vezanje kompleksa INO80, SWI/SNF i RSC na dvolančane lomove u DNA“ pod mentorstvom dr.sc. Mary Sopta u Laboratoriju za molekularnu i staničnu biologiju, Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković.

Popis publikacija:

1. Gajski, G., Gerić, M., Vučić Lovrenčić, M., Božičević, S., Rubelj, I., **Nanić, L.**, Škrobot Vidaček, N., Bendix, L., Peraica, M., Rašić, D., Domijan, A.-M., Gluščić, V., Jurasović, J., Orct, T., Cvijetić Avdagić, S., Jurak, G., Bošnir, J., Garaj-Vrhovac, V. (2018) Analysis of health-related biomarkers between vegetarians and non-vegetarians: A multi-biomarker approach. *Journal of Functional Foods*. doi: 10.1016/j.jff.2018.07.054
2. Škara, L., Huđek, A., Smolković, B., Kazazić, S., Ravlić, S., **Nanić, L.**, Matovinović Osvatić, M., Jelčić, J., Rubelj, I., Bačun-Družina, V. (2017). Higher prevalence of FTO gene risk genotypes AA rs9939609, CC rs1421085 and GG rs17817449 and saliva containing *S. aureus* in obese women in Croatia. *Nutrition Research*. doi: 10.1016/j.nutres.2017.12.005
3. **Nanić, L.**, Škrobot Vidaček, N., Ravlić, S., Šatović, E., Huzak, M., Rubelj, I. (2017). Mutual interactions between telomere heterogeneity and cell culture growth dynamics shape stochasticity of cell aging. *Biogerontology*. doi: 10.1007/s10522-017-9736-2
4. Ravlić, S., Škrobot Vidaček, N. **Nanić, L.**, Laganović, M., Slade, N., Jelaković, B., Rubelj, I., (2017). Mechanisms of fetal epigenetics that determine telomere dynamics and health span in adulthood. *Mechanisms of Ageing and Development*. doi: 10.1016/j.mad.2017.08.014
5. Škrobot Vidaček, N., **Nanić, L.**, Ravlić, S., Sopta, M., Gerić, M., Gajski, G., Garaj-Vrhovac, V., Rubelj, I. (2017). Telomeres, Nutrition and Longevity – Can we really navigate our aging. *Journal of Gerontology: Biological Sciences*. doi: 10.1093/gerona/glx082
6. **Nanić, L.**, Ravlić, S., Rubelj, I. (2016). Extrachromosomal DNA in Genome (in)Stability – Role of Telomeres. *Croatica Chemica Acta*. doi:10.5562/cca2841