



INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ
Polskiej Akademii Nauk

**Właściwości przeciwstarzeniowe 4-N-furfurylocytozyny
w modelach komórkowym, drożdżowym i mysim**

mgr Paweł Pawelczak

Praca doktorska wykonana
w Pracowni Analiz Struktur Subkomórkowych IChB PAN w Poznaniu

Promotor: prof. dr hab. Eliza Wyszko

Promotor pomocniczy: dr Agnieszka Fedoruk-Wyszomirska

Poznań, 2024

*Serdecznie dziękuję wszystkim,
którzy przyczynili się do powstania tej pracy:*

*Pani promotor **prof. dr hab. Elizie Wyszko**
za interesujący temat badań, naukową opiekę oraz okazaną wyrozumiałość i życzliwość*

*Pani promotor pomocniczej **dr Agnieszce Fedoruk-Wyszomirskiej**
za przekazaną wiedzę, doświadczenie i cenne rady*

*Współpracownikom z Pracowni Analiz Struktur Subkomórkowych:
dr inż. Dorocie Gurdzie-Woźnej
za przekazaną wiedzę, wsparcie i (hekt)litry wypitej kawy w miłej atmosferze*

***pani dr hab. Małgorzacie Giel-Pietraszuk, prof. IChB PAN**
za ogrom analiz HPLC*

*Pracownikom Pracowni Modelowych Organizmów Ssaczych:
Dr. Łukaszowi Przybyłowi i mgr. inż. Dorocie Wronce
za poświęcony czas i nieocenioną pomoc merytoryczną i techniczną
przy doświadczeniach przeprowadzonych na zwierzętach*

Pracownikom Zwierzętarni WCZT UAM w Poznaniu

*Pozostałym współpracownikom z Instytutu, a w szczególności:
dr. Grzegorzowi Framskiemu
za syntezę bohaterki tej rozprawy – 4-N-furfurylocytozyny*

***Panu prof. dr. hab. Janowi Barciszewskiemu**
Dr inż. Marcie Orlickiej-Płockiej
Pani Iwonie Gawrońskiej
mgr Katarzynie Solce*

*W sposób szczególny dziękuję moim najbliższym:
rodzinie i przyjaciołom*

*Pracę tę dedykuję
dziadkom*

Badania zrealizowano ze środków:

NCN 2017/25/B/NZ7/02162

SPIS TREŚCI

Dorobek naukowy	9
Streszczenie	11
Abstract	12
Wykaz skrótów	13
1. Wprowadzenie	15
1.1. Proces starzenia	16
1.1.1. Cechy starzenia	16
1.1.1.1. Cechy pierwotne	17
1.1.1.2. Cechy antagonistyczne	18
1.1.1.3. Cechy integratywne	20
1.1.2. Typy starzenia komórkowego	22
1.1.2.1. Starzenie replikacyjne	22
1.1.2.2. Starzenie przyspieszone.....	23
1.1.3. Fizjologiczna rola starzenia komórkowego	24
1.1.4. Stres oksydacyjny a starzenie	25
1.2. Modele badawcze	26
1.2.1. Linie komórkowe	26
1.2.2. Drożdże	28
1.2.3. Mysz.....	30
1.3. Geroprotektory	32
1.3.1. Senomorfiki	32
1.3.2. Senolityki	33
1.4. 4-N-furfurylocytozyna	35
2. Cel pracy	36
3. Materiały i metody	37
3.1. 4-N-furfurylocytozyna	37
3.2. Model komórkowy	37
3.2.1. Linie komórkowe	37
3.2.2. Przechowywanie komórek	37
3.2.3. Analiza wpływu FC na starzenie replikacyjne	38
3.2.4. Ocena wpływu FC na komórki postarzone	38
3.2.5. Indukcja starzenia przyspieszonego.....	38
3.2.6. Test MTT	38

3.2.7.	Oznaczanie aktywności beta-galaktozydazy	39
3.2.7.1.	Metoda cytometryczna	39
3.2.7.2.	Metoda histochemiczna	39
3.2.8.	Analizy immunofluorescencyjne	40
3.2.9.	Oznaczanie poziomu RFT	40
3.2.10.	Analiza stresu mitochondrialnego za pomocą plazmidu pMitoTimer ..	40
3.2.10.1.	Hodowla bakterii	40
3.2.10.2.	Izolacja plazmidu	41
3.2.10.3.	Transfekcja komórek plazmidem i analiza cytometryczna	41
3.2.11.	Analiza potencjału błony mitochondrialnej	41
3.2.12.	Oznaczanie poziomu apoptozy i nekrozy	42
3.2.13.	Pomiar oddychania komórkowego	42
3.2.14.	Oznaczanie poziomu ATP w komórkach	42
3.2.15.	Western blot	43
3.2.16.	Analiza proteomiczna	44
3.3.	Model drożdżowy	45
3.3.1.	Drożdże <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45
3.3.2.	Pożywki hodowlane	45
3.3.3.	Hodowla drożdży	45
3.3.4.	Przechowywanie drożdży	46
3.3.5.	Analiza CLS	46
3.3.6.	Analiza kinetyki wzrostu drożdży	46
3.3.7.	Pomiary oddychania komórkowego	46
3.3.7.1.	Przygotowanie komórek	46
3.3.7.2.	Pomiar szybkości zużycia tlenu	47
3.3.7.3.	Pomiar stężenia białka	47
3.3.8.	Analiza właściwości antyoksydacyjnych FC	47
3.3.9.	Analiza zmian potencjału błony mitochondrialnej	48
3.3.10.	Wizualizacja i analiza mikroskopowa	49
3.3.11.	Analiza zmian ekspresji wybranych genów	50
3.4.	Model myszy	51
3.4.1.	Zwierzęta doświadczalne	51
3.4.2.	Hodowla zwierząt	51
3.4.3.	Podział na grupy i plan eksperymentu	51
3.4.4.	Testy behawioralne	52

3.4.4.1.	Test prętów statycznych (staticrod).....	52
3.4.4.2.	Test bieżni obrotowej (rotarod).....	52
3.4.4.3.	Test siły chwytu.....	53
3.4.4.4.	Test zlewkowy.....	53
3.4.4.5.	Test aktywności lokomotorycznej przy użyciu klatki ActiMot	53
3.4.5.	Analiza składu ciała.....	54
3.4.6.	Uśmiercanie zwierząt i pobranie tkanek.....	54
3.4.7.	Homogenizacja tkanek.....	55
3.4.8.	Oznaczanie obecności FC w mózgu	55
3.4.9.	Analiza parametrów biochemicznych krwi	55
3.4.10.	Oznaczanie markerów CD4/CD8.....	56
3.4.10.1.	Izolacja PBMC.....	56
3.4.10.2.	Znakowanie PBMC i analiza cytometryczna.....	57
3.5.	Analizy z wykorzystaniem PCR w czasie rzeczywistym	57
3.5.1.	Izolacja RNA	57
3.5.2.	Analiza ilościowa i jakościowa RNA	58
3.5.3.	Oczyszczanie RNA z zanieczyszczeń DNA.....	58
3.5.4.	Odwrotna transkrypcja.....	58
3.5.5.	Analiza zmian ekspresji genów oraz stosunku mtDNA:nDNA.....	59
3.5.6.	Startery zastosowane w analizach.....	60
3.6.	Izolacja DNA	60
3.7.	Hydroliza DNA	61
3.8.	Izolacja białka	62
3.9.	Pomiar stężenia białka metodą Bradforda.....	62
3.10.	Procedury z wykorzystaniem HPLC	62
3.10.1.	Oznaczanie zawartości 8-oksoguanozyny metodą HPLC-UV-ED.....	62
3.10.2.	Oznaczanie zawartości 5-mdC metodą HPLC-ESI/MS.....	63
3.11.	Oznaczanie poziomu karbonylacji białek.....	63
3.12.	Oznaczanie poziomu peroksydacji lipidów	64
3.13.	Analiza statystyczna	65
4.	Wyniki	66
4.1.	Model komórkowy	66
4.1.1.	Wpływ FC na rozwój starzenia replikacyjnego	66
4.1.2.	Wpływ FC na komórki postarzone	67
4.1.3.	Wpływ FC na funkcjonowanie mitochondriów.....	69

4.1.4.	Analiza Western blot białek mitochondrialnych	74
4.1.5.	Analiza zmian proteomicznych	75
4.1.6.	Właściwości antyoksydacyjne FC	77
4.1.7.	Wpływ FC na rozwój starzenia przyspieszonego	79
4.2.	Model drożdżowy.....	84
4.2.1.	Wpływ FC na wzrost i CLS drożdży	84
4.2.2.	Wpływ FC na aktywność mitochondriów	88
4.2.3.	Właściwości antyoksydacyjne FC	92
4.2.4.	Wpływ FC na poziom ekspresji wybranych genów	94
4.3.	Model myszy.....	96
4.3.1.	Wprowadzenie	96
4.3.2.	Analiza zmian masy i kompozycji składu ciała	98
4.3.3.	Ocena aktywności i funkcji lokomotorycznych badanych zwierząt.....	99
4.3.4.	Analiza zmian w parametrach biochemicznych krwi	102
4.3.5.	Analiza funkcji układu odpornościowego	103
4.3.6.	Wpływ FC i kinetyny na poziom markerów stresu oksydacyjnego	104
4.3.7.	Wpływ FC i kinetyny na poziom metylacji genomu	107
5.	Dyskusja	109
5.1.	Model komórkowy	109
5.2.	Model drożdżowy.....	112
5.3.	Model myszy.....	115
6.	Podsumowanie	119
7.	Bibliografia	120
8.	Spis rycin i tabel	136

Dorobek naukowy

Publikacje:

- *Antiaging Effect of 4-N-Furfurylcytosine in Yeast Model Manifests through Enhancement of Mitochondrial Activity and ROS Reduction*
Pawelczak P, Fedoruk-Wyszomirska A, Wyszko E.
Antioxidants **2022**, 11(5), 850.
- *Implications of Oxidative Stress in Glioblastoma Multiforme Following Treatment with Purine Derivatives*
Orlicka-Płocka M, Fedoruk-Wyszomirska A, Gurda-Woźna D, **Pawelczak P**, Krawczyk P, Giel-Pietraszuk M, Framski G, Ostrowski T, Wyszko E.
Antioxidants **2021**, 10(6), 950.

Udział w konferencjach międzynarodowych:

- Targeting Mitochondria, Berlin, 2023
Poster: *FC - ROS buster and the mitochondria rescuer*
Fedoruk-Wyszomirska A, **Pawelczak P**, Gurda-Woźna D, Giel-Pietraszuk M, Wyszko E.
- 10th Aging Research and Drug Discovery Meeting, Kopenhaga, 2023
Poster: *FC prolongs healthspan in mice*
Pawelczak P, Fedoruk-Wyszomirska A, Przybył Ł, Framski G, Gurda-Woźna D, Wyszko E.
- Redox Medicine, Paryż, 2023
Poster: *Antioxidant and mitoprotective properties of 4-N-furfurylcytosine in the human cell lines and budding yeasts*
Pawelczak P, Fedoruk-Wyszomirska A, Gurda-Woźna D, Giel-Pietraszuk M, Wyszko E.

Poster: *Effect of 4-N-furfurylcytosine on reactive oxygen species (ROS) homeostasis and tissue regeneration of planaria under stress conditions*
Fedoruk-Wyszomirska A, **Pawelczak P**, Osuch M, Wyszko E.
- “NeuroRNA” Conference, Poznań, 2022
Poster: *Oxidative stress implications in glioblastoma multiforme after purine derivatives treatment*
Fedoruk-Wyszomirska A, Orlicka-Płocka M, Gurda-Woźna D, **Pawelczak P**, Krawczyk P, Giel-Pietraszuk M, Framski G, Ostrowski T, Wyszko E.

Czynny udział w konferencjach krajowych:

- XVI Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, Toruń, 2023
Poster: *Właściwości przeciwstarzeniowe 4-N-furfurylocytozyny w modelu drożdżowym*
Pawelczak P, Fedoruk-Wyszomirska A, Wyszko E.
- XV Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL 2023 „Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju”, Lublin, 2023
Referat: *Aktywność biologiczna 4-N-furfurylocytozyny w modelu drożdżowym*
Pawelczak P, Fedoruk-Wyszomirska A, Wyszko E.

Streszczenie

Starzenie się jest powszechnym procesem znacząco wpływającym na jakość życia organizmów, prowadząc do stopniowej utraty sprawności i zwiększenia ryzyka rozwoju chorób związanych z wiekiem. Stale rosnąca populacja osób w podeszłym wieku, stanowi więc jedno z większych wyzwań współczesnego społeczeństwa, co podkreśliła Organizacja Narodów Zjednoczonych ogłaszając lata 2020-2030 Dekadą Zdrowego Starzenia.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było scharakteryzowanie właściwości przeciwstarzeniowych 4-N-furfurylocytozyny (FC), nowego związku będącego pochodną cytozyny z podstawionym furfurałem w pozycji N4. W tym celu zastosowano trzy uznane modele w badaniach nad starzeniem – prawidłowe ludzkie fibroblasty, jednokomórkowy organizm prosty, jakim są drożdże *Saccharomyces cerevisiae* oraz organizm złożony, czyli myszy *Mus musculus*.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że FC nie jest związkiem toksycznym i nie eliminuje komórek starzejących się, jednak mityguje cechy starzenia komórkowego, poprzez obniżenie poziomu uszkodzeń DNA i poziomu wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu, poprawę jakości mitochondriów i aktywację proteasomu. Pozwoliło to sklasyfikować FC jako związek o działaniu senomorficznym. Właściwości przeciwstarzeniowe potwierdzono w modelu drożdżowym, w przypadku którego zaobserwowano wydłużenie chronologicznej długości życia drożdży hodowanych w obecności FC, co związane było z zahamowaniem aktywności szlaku sygnałowego TORC1-Sch9 i modulacją metabolizmu komórkowego. Myszy suplementowane FC wykazywały wyższą sprawność lokomotoryczną oraz niższy poziom markerów stresu oksydacyjnego w tkankach, a ponadto odznaczały się niższym poziomem tkanki tłuszczowej, a wyższym masy mięśniowej, niż myszy kontrolne. Na tej podstawie stwierdzono, że FC poprawia ogólny stan zdrowia starych myszy, w szczególności wpływając na zahamowanie postępu sarkopenii.

Podsumowując, przedstawione badania stanowią pierwszy, szeroki opis aktywności biologicznej 4-N-furfurylocytozyny, ze szczególnym uwzględnieniem jej przeciwstarzeniowych właściwości, ukazujący potencjał aplikacyjny tego związku.

Abstract

The aging process is a widespread phenomenon that significantly impacts the quality of life in organisms, leading to a gradual decline in functionality and an increased susceptibility to age-related diseases. The continuously growing population of elderly individuals presents one of the most pressing challenges of modern society, as emphasized by the United Nations' designation of 2020-2030 as the Decade of Healthy Aging.

This doctoral dissertation aimed to characterize the anti-aging properties of a novel compound, 4-N-furfurylcytosine (FC), which is a cytosine derivative modified with furfural at the N4 position. For this purpose, three well-established models in aging research were used: normal human fibroblasts, the unicellular organism *Saccharomyces cerevisiae* (yeast), and the complex organism *Mus musculus* (mice).

Based on the obtained results, it was found that FC is not a toxic compound and does not eliminate senescent cells. However, it mitigates senescence phenotype by reducing levels of the DNA damage and intracellular reactive oxygen species, enhancing mitochondrial quality, and activating the proteasome. Consequently, FC was classified as a senomorphic compound. The anti-aging efficacy was corroborated in the yeast model, where an extension of the chronological lifespan of yeast grown in the presence of FC was observed. This extension was linked to the inhibition of the TORC1-Sch9 signalling pathway and modulation of cellular metabolism. Mice supplemented with FC exhibited heightened locomotor activity and lower levels of oxidative stress markers in tissues, as well as reduced adipose tissue and increased muscle mass compared to control mice. These results led to the conclusion that FC significantly enhances the overall health of aged mice, notably by impeding the progression of sarcopenia.

In summary, the presented studies constitute the first comprehensive description of the biological activity of 4-N-furfurylcytosine, with a particular focus on its anti-aging properties, demonstrating the potential application of this compound.

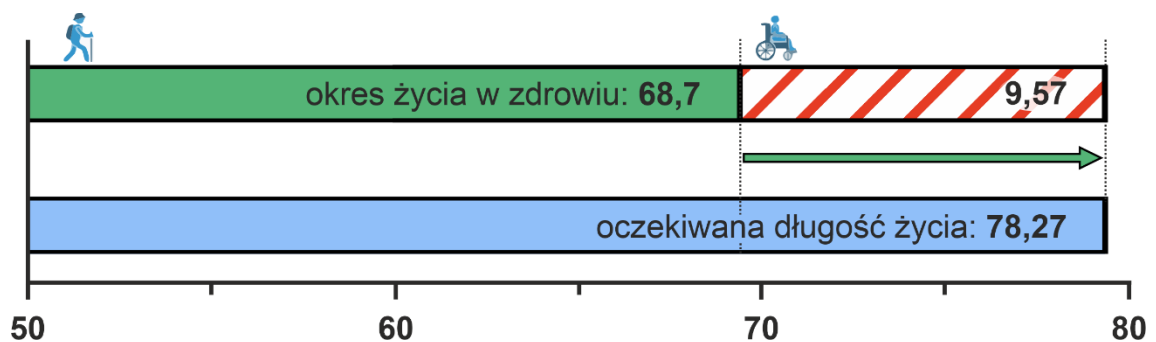
Wykaz skrótów

$\Delta\Psi_m$	potencjał błony mitochondrialnej
5-mdC	5-metylodeoksy cytozyna
8-oxodG	8-okso-2'-deoksyguanozyna
2D	dwuwymiarowa hodowla komórkowa in vitro
AGE	produkty zaawansowanej glikacji (ang. <i>Advanced Glycation End-products</i>)
CLS	chronologiczna długość życia (ang. <i>Chronological Lifespan</i>)
CR	restrykcja kaloryczna (ang. <i>calorie restriction</i>)
DDR	szlak odpowiedzi na uszkodzenia DNA (ang. <i>DNA-damage response pathway</i>)
DNA	kwasy deoksyrybonukleinowe
DNPH	2,4-dinitrofenylohydrazyna
FBS	plądowa surowica bydlęca (ang. <i>Fetal Bovine Serum</i>)
FC	4-N-furfurylocytozyna
FCCP	fenylohydrazon trójfluorometoksykarbonylo-cyjanku
FRTA	wolnorodnikowa teoria starzenia (ang. <i>Free Radical Theory of Aging</i>)
IGF1	insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (ang. <i>Insulin-like Growth Factor 1</i>)
MFRTA	mitochondrialna wolnorodnikowa teoria starzenia (ang. <i>Mitochondrial Free Radical Theory of Aging</i>)
mtDNA	mitochondrialny DNA
mTOR	kinaza mTOR, tj. ssaczy cel rapamycyny (ang. <i>mammalian target of rapamycin</i>)
nDNA	jądrowy DNA (ang. <i>nuclear DNA</i>)
NOX	oksydaza NADH (ang. <i>NADPH oxidase</i>)

OD	gęstość optyczna (ang. <i>Optical Density</i>)
ONZ	Organizacja Narodów Zjednoczonych
PCO	karbonylacja białek ang. <i>protein carbonyls</i>
PD	podwojenia populacji (ang. <i>population doublings</i>)
PBMC	komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (ang. <i>peripheral blood mononuclear cell</i>)
RFT	reaktywne formy tlenu
RLS	replikacyjna długość życia (ang. <i>Replicative Lifespan</i>)
rpm	obroty na minutę (ang. <i>revolutions per minute</i>)
ROX	oddychanie niemitochondrialne (ang. <i>residual oxygen consumption</i>)
SA-β-Gal	związana ze starzeniem β -galaktozydaza (ang. <i>senescence-associated β-galactosidase</i>)
SASP	fenotyp sekrecyjny związany ze starzeniem (ang. <i>senescence-associated secretory phenotype</i>)
SCFA	krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (ang. <i>short-chain fatty acids</i>)
SISP	starzenie przyspieszone (ang. <i>stress-induced premature senescence</i>)
SD	Odchylenie standardowe (ang. <i>standard deviation</i>)
SO	stres oksydacyjny
TBARS	substancje reagujące z kwasem tiobarbiturowym (ang. <i>thiobarbituric acid reactive substances</i>)
TBT	tributylocyna
TORC1	kompleks 1 kinazy Tor, tj. celu rapamycyny (ang. <i>target of rapamycin complex 1</i>)
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (ang. <i>World Health Organization</i>)
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopiranozyd

1. Wprowadzenie

Starzenie jest uniwersalnym procesem dotyczącym każdego żywego organizmu i związanym ze stopniową utratą sprawności i zdrowia, co obniża ogólną jakość życia, zwiększa ryzyko wystąpienia chorób związanych z wiekiem, a w ostateczności prowadzi do śmierci organizmu. Rozwój medycyny w ostatnich dziesięcioleciach doprowadził do znacznego wydłużenia średniej długości życia człowieka (ang. *lifespan*), jednak okres, w którym organizm pozostaje w dobrym zdrowiu (ang. *healthspan*), nie uległ proporcjonalnej poprawie [1]. W rezultacie, w stale rosnącej światowej populacji, coraz większy odsetek stanowią osoby w starszym wieku, wymagające opieki zdrowotnej. Według szacunków Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO), do 2050 roku liczba ludzi powyżej 60. roku życia podwoi się, stanowiąc ponad 20% ludzkości [1, 2]. Starzejące się społeczeństwa państw o wysokim przychodzie będą się więc mierzyć ze wzrostem liczby osób dotkniętych chorobami związanymi z wiekiem, takimi jak choroby sercowo-naczyniowe, nowotwory, cukrzyca, czy przewlekłe choroby układu oddechowego [3]. Dostrzegając wagę narastającego problemu, Organizacja Narodów Zjednoczonych (ONZ) w 2020 roku ogłosiła lata 2020-2030 Dekadą Zdrowego Starzenia (Rezolucja ONZ nr 75/131), podkreślając konieczność globalnych działań na rzecz poprawy jakości życia osób starszych.



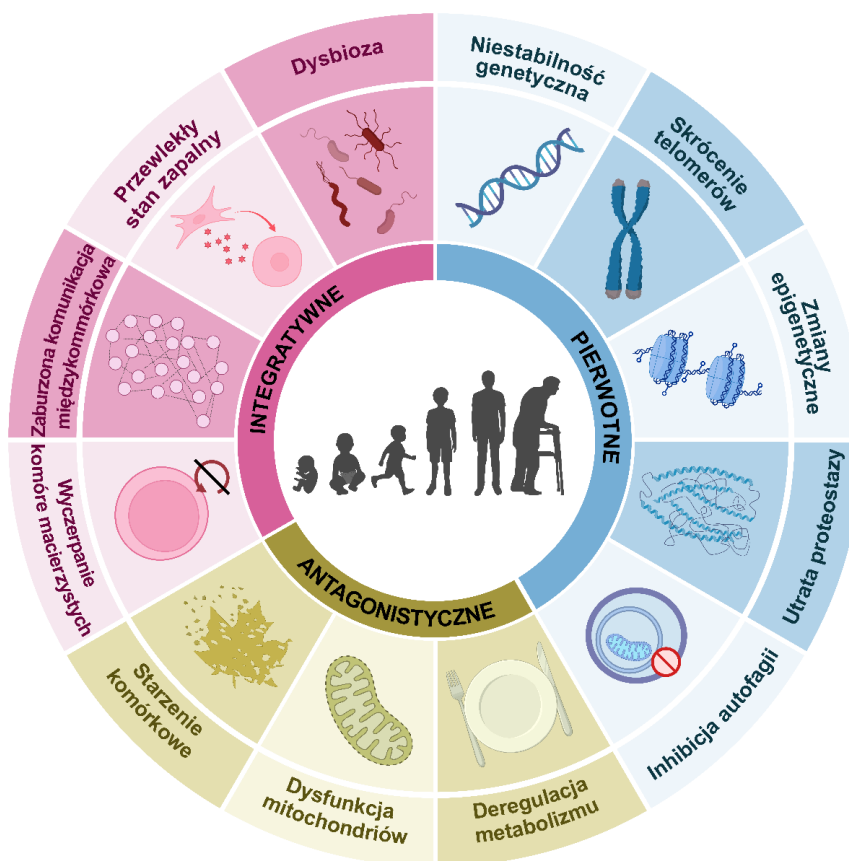
Rysunek 1. Całkowita długość życia a długość życia w zdrowiu. Oczekiwana całkowita długość życia człowieka wynosi 78,27 lat (niebieski słupek), a długość życia w zdrowiu 68,7 lat (zielony słupek). Blisko 10 ostatnich lat swojego życia, przeciętny człowiek spędza więc w złym zdrowiu (czerwono-biały słupek). Sporządzono na podstawie najnowszych danych WHO (2019) dla społeczeństwa polskiego z wykorzystaniem oprogramowania BioRender.com

1.1. Proces starzenia

Starzenie jest naturalnym i nieuniknionym procesem, w wyniku którego organizm stopniowo traci swoje rezerwy życiowe, co objawia się poprzez obniżenie zdolności fizycznych, funkcji narządów i ogólnego stanu zdrowia. Starzenie odznacza się charakterystycznymi cechami (rozdział 1.1.1.), do których należy starzenie komórkowe (ang. *senescence*). Na poziomie komórkowym związane jest z permanentnym stresem prowadzącym do wyczerpania możliwości podziałowych i regeneracyjnych. Mimo zahamowania cyklu, komórka pozostaje żywa, jednak dochodzi do znacznego spowolnienia metabolizmu i gromadzenia uszkodzeń wewnątrzkomórkowych. Wyróżnia się dwa rodzaje starzenia komórkowego – replikacyjne (rozdział 1.1.2.1.) oraz przyspieszone (rozdział 1.1.2.2.). Komórki starzejące się (ang. *senescent cells*) odznaczają się swoistym fenotypem i znacząco przyczyniają się do pogorszenia funkcjonowania całego organizmu.

1.1.1. Cechy starzenia

Starzenie to złożony proces, którego skutki można zaobserwować zarówno na poziomie molekularnym, jak i całego organizmu. Lata intensywnych badań znacząco pogłębiły wiedzę na temat mechanizmów starzenia, co zarazem pozwoliło lepiej poznać jego fenotyp. Problematiczne jednak stało się rozróżnienie, które procesy faktycznie kierują starzeniem, a które jedynie mu towarzyszą. Jako pierwsi próbę sklasyfikowania czynników przyczyniających się do rozwoju i fenotypowej manifestacji procesu starzenia podjęli się Carlos López-Otín i wsp. przyjmując, że każdy musi spełniać jednocześnie 3 warunki: pojawiać się w procesie naturalnego starzenia, przyspieszać starzenie, gdy jest indukowany oraz opóźniać ten proces, gdy jest hamowany w warunkach eksperymentalnych. Tym sposobem, w 2013 roku na łamach czasopisma *Cell* wymieniono 9 cech starzenia [4] 10 lat później, autorzy uzupełnili zaproponowaną listę do 12 cech i dokonali ich podziału na 3 kategorie: pierwotne, antagonistyczne i integratywne (rys. 2) [5].



Rysunek 2. Cechy starzenia. 12 cech starzenia wyróżnionych i podzielonych na 3 kategorie przez Carlosa López-Otína [5]. Schemat zaadaptowano z cytowanej publikacji z wykorzystaniem oprogramowania BioRender.com.

1.1.1.1. Cechy pierwotne

Do cech pierwotnych zaliczono te związane powstawaniem i akumulacją uszkodzeń wewnątrzkomórkowych. Obejmują one niestabilność genetyczną, skrócenie telomerów, zmiany epigenetyczne, utratę proteostazy i deregulację autofagii.

W trakcie życia, komórka stale narażona jest na uszkodzenia spowodowane zarówno warunkami środowiskowymi, jak i błędami, do których rutynowo dochodzi w trakcie normalnych procesów fizjologicznych [6]. Choć komórka dysponuje mechanizmami naprawczymi rozpoznającymi i usuwającymi pojawiające się uszkodzenia, okazują się one niewystarczające w obliczu ciągłego narażenia na czynniki zewnętrzne oraz spadku ich efektywności z wiekiem [7]. Prowadzi to do gromadzenia się uszkodzeń DNA, w tym mutacji spowodowanych m.in. błędami replikacji, pęknięć nici, pojawienia się modyfikowanych nukleozydów (głównie 8-okso-2'-deoksyguanozyna, 8-oxodG), nieprawidłowej segregacji chromosomów i innych zmian prowadzących do dezintegracji genomu [8]. Uszkodzenia DNA wpływają również na zmiany

epigenetyczne, prowadząc do demetylacji DNA i degradacji histonów, czego efektem jest rozluźnienie chromatyny [9]. Ponadto, globalna metylacja genomu z wiekiem spada (hipometylacja genomu), przy jednoczesnej hipermetylacji niektórych promotorów [10, 11], co zakłóca regulację transkryptomu [12]. W przypadku białek dochodzi do błędnego fałdowania, niepoprawnych modyfikacji potranslacyjnych i hydrolizy peptydów, co prowadzi do gromadzenia białek niefunkcjonalnych lub toksycznych i ich agregatów [13, 14]. To zaburzenie homeostazy białkowej, nazywane utratą proteostazy, prócz oczywistego zaburzenia funkcjonowania komórki, jest jedną z głównych cech neurodegeneracyjnych chorób związanych z wiekiem – chorób Parkinsona i Alzheimerera [15].

Jednym z mechanizmów obronnych komórki przed gromadzonymi uszkodzeniami jest proces autofagii, który również podlega deregulacji z wiekiem. Jest on kluczowym procesem degradacji i recyklingu komponentów komórkowych, umożliwiającym usuwanie dysfunkcyjnych organelli, agregatów białek, cytozolowego DNA i innych makromolekuł [16]. Liczne doniesienia wskazują, że inhibicja autofagii przyspiesza, a stymulacja opóźnia proces starzenia i poprawia jakość życia organizmu [17, 18]. Potwierdza to istotność efektywnego usuwania uszkodzeń i odnawiania przez komórkę, w celu zapobieżenia starzeniu.

1.1.1.2. Cechy antagonistyczne

Cechy antagonistyczne starzenia rozwijają się w następstwie nasilenia czynników pierwotnych. Należą do nich deregulacja odpowiedzi na składniki odżywcze, dysfunkcja mitochondriów i starzenie komórkowe.

Starzenie komórkowe

Starzenie komórkowe jest odpowiedzią komórki na gromadzące się uszkodzenia wewnętrzne. Choć początkowo jest mechanizmem ochronnym przeciwko rozwojowi nowotworów, z czasem przyczynia się do dysfunkcji tkanek. Komórka starzejąca się (ang. *senescent cell*) odznacza się m.in. aresztem cyklu komórkowego, obniżonym metabolizmem, inhibicją apoptozy oraz związanym ze starzeniem fenotypem sekrecyjnym (ang. *senescence associated secretory phenotype*, SASP). Typy starzenia komórkowego i mechanizm ich aktywacji omówiono w rozdziale 1.1.2.

Dysfunkcja mitochondriów

Dysfunkcja mitochondriów prowadzi do zmniejszonej produkcji energii i zwiększonej produkcji RFT, a stopniowe pogłębianie tego zjawiska obserwuje się wraz z wiekiem [19]. Do uszkodzeń mitochondriów przyczyniają się zarówno mutacje mitochondrialnego DNA (mtDNA), powstające głównie w wyniku błędów generowanych przez mitochondrialną polimerazę γ [20], jak również dysfunkcyjne białka, gromadzące się z powodu utraty proteostazy [21]. W konsekwencji prowadzi to do permeabilizacji błony mitochondrialnej i utraty potencjału błonowego ($\Delta\Psi_m$), wzmożonej produkcji RFT i uwalniania mtDNA do cytozolu, co aktywuje szlak cGAS–STING i ekspresję prozapalnych cytokin [22]. Deregulacji ulega również dynamika mitochondriów, kontrolowana przez procesy fizji (łączenia) i fuzji (podziałów), oraz proces usuwania uszkodzonych mitochondriów na drodze selektywnej autofagii (mitofagia) [23, 24]. Usuwanie dysfunkcyjnych mitochondriów opóźnia starzenie i poprawia jakość życia, co pokazano stymulując mitofagię w modelach badawczych [25–27].

Deregulacja metabolizmu

Metabolizm komórki kontrolowany jest przez szlaki sygnałowe w odpowiedzi na dostępność składników odżywczych. Centralną rolę w tym procesie odgrywa kinaza mTOR (tj. ssaczy cel rapamycyny, ang. *mammalian target of rapamycin*) współtworząca kompleks mTORC1. W przypadku wysokiej dostępności składników odżywczych w postaci aminokwasów i glukozy, szlak mTORC1 aktywuje procesy anaboliczne, a więc syntezę nukleotydów, lipidów i białek. W przypadku ich braku, szlak ten zostaje wyciszony, co wzmaga katabolizm komórkowy, głównie poprzez stymulację autofagii [28]. Podobnie do inhibicji szlaku dochodzi w warunkach stresu [29]. Jednakże, w komórkach starzejących się, mimo blokady cyklu komórkowego, obserwuje się zwiększoną aktywność szlaku mTORC1 [30]. Mechanizm stojący za tym zjawiskiem nie jest jasny, jednak przypuszcza się, że przyczyniają się do niego uszkodzenia wewnątrzkomórkowe oraz zmiany epigenetyczne prowadzące do zaburzeń detekcji składników odżywczych [31, 32]. Potwierdzają to obserwacje deregulacji szlaków sygnałowych zaangażowanych w nią, takich jak szlak insulina/IGF1 (insulinopodobny czynnik wzrostu, ang. *insulin like growth factor 1*) [33], czy AMPK (kinaza aktywowana przez adenozymonofosforan, AMP) [34]. Wyciszenie szlaku mTORC1 przez

zastosowanie restrykcji kalorycznej (CR, ang. *calorie restriction*) lub jego inhibitora, rapamycyny, wydłuża zarówno długość życia, jak i okres życia w zdrowiu w modelach eksperymentalnych [17, 35–37].

1.1.1.3. Cechy integratywne

Cechy integratywne starzenia odzwierciedlają skumulowane konsekwencje uszkodzeń wynikających z cech pierwotnych i antagonistycznych, prowadząc do funkcjonalnego upośledzenia organizmu. Zaliczono do nich wyczerpanie komórek macierzystych, zmiany w komunikacji międzykomórkowej, przewlekły stan zapalny oraz dysbiozę.

Wyczerpanie komórek macierzystych

Komórki macierzyste odgrywają centralną rolę w procesie regeneracji tkanek, przez zastępowanie zużytych lub uszkodzonych komórek. Są one unikalne ze względu na swoją zdolność do samoodnowy oraz potencjał do różnicowania się w różne typy komórek somatycznych. Jednakże z upływem czasu, ich zdolność do regeneracji i naprawy tkanek maleje, gdyż podlegają podobnym procesom starzenia, jak inne komórki organizmu [38, 39]. W sposób szczególny, komórki macierzyste dotknięte są zmianami związanymi z metabolizmem i odpowiedzią na stres oksydacyjny [40, 41].

Zmiany w komunikacji międzykomórkowej

Zaburzenia w komunikacji międzykomórkowej mają istotny wpływ na homeostazę i funkcjonowanie tkanek. W procesie starzenia dochodzi do deregulacji sygnałów sekrecyjnych, w tym wydzielania cytokin, chemokin, hormonów oraz innych cząsteczek sygnalizacyjnych, czego efektem jest zmniejszona zdolność do adaptacji do stresów środowiskowych, ograniczenie regeneracji tkanek oraz zwiększona podatność na choroby przewlekłe. Zmianom podlega również kompozycja macierzy międzykomórkowej, przede wszystkim na skutek gromadzenia się oksydacyjnych uszkodzeń białek (karbonylacji) znanych jako AGE (produkty zaawansowanej glikacji, ang. *advanced glycation end-products*) i nasilenia sieciowania cząsteczek kolagenu, co prowadzi do powstawania zwłóknień [42]. Najlepiej opisanym zespołem czynników, mających wpływ na komunikację międzykomórkową w starzeniu, jest SASP (zobacz dział „*przewlekły stan zapalny*”). Na istotność w procesie starzenia czynników cyrkulujących we krwi,

jednoznacznie wskazują badania eksperymentalne polegające na transfuzji krwi między młodym a starym dawcą. Zarówno krew od starego dawcy, indukuje starzenie u młodego donora, jak i krew od młodego dawcy, hamuje lub cofa skutki starzenia u starego donora [43–46].

Przewlekły stan zapalny

Przewlekły stan zapalny, nazywany też zapaleniem starczym (ang. *inflammaging*), to stan niskiego, ale utrzymującego się zapalenia, które może przyczyniać się do rozwoju wielu chorób związanych z wiekiem, takich jak choroby sercowo-naczyniowe, sarkopenia, osteoporoza, demencja, czy depresja, a również do nowotworzenia [47]. Rozwój zapalenia starczego jest związany z deregulacją systemu immunologicznego oraz fenotypem sekrecyjnym komórek starzejących się (SASP), którego istotą jest wydzielanie prozapalnych cytokin, takich jak interleukiny (np. IL-1, IL-6, IL-8), czynnik martwicy nowotworów (TNF- α), czynników wzrostu (np. transformujący czynnik wzrostu beta, TGF- β) czy proteaz [48]. SASP indukowany jest w wyniku niestabilności genomowej i przewlekłej aktywności szlaków DDR [49] i p38MAPK/NF- κ B [50] lub aktywacji inflamasomu NLRP3 na skutek wzmożonej produkcji RFT przez dysfunkcyjne mitochondria [51] i szlaku cGAS–STING w wyniku wycieku mtDNA do cytozolu [52]. Choć SASP może mieć pozytywny wpływ na funkcjonowanie organizmu (rozdział 1.1.4.), w dłuższej perspektywie pośredniczy w wystąpieniu przewlekłego stanu zapalnego oraz może stymulować wzrost i przeżycie komórek nowotworowych [53]. Ponadto, SASP przyspiesza również starzenie pozostałych komórek (efekt widza, ang. *bystander effect*), co nazywano starzeniem indukowanym starzeniem (ang. *senescence-induced senescence*) [54].

Dysbioza

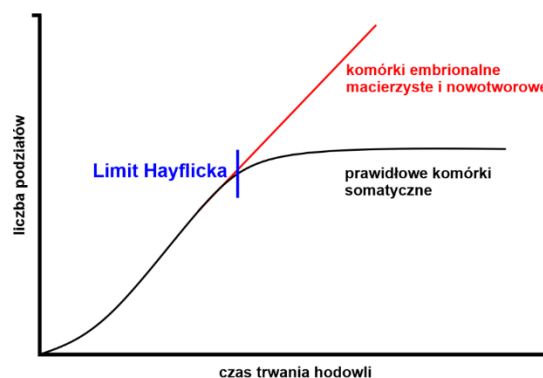
Dysbioza odnosi się do zaburzeń równowagi mikrobiologicznej w jelitach. Mikrobiota jelitowa, a więc ogół mikroorganizmów zasiedlających jelita, wspomaga organizm gospodarza biorąc udział w procesach związanych z wchłanianiem składników odżywczych, ochroną przed patogenami oraz syntezą metabolitów, takich jak np. witaminy czy krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (ang. *short-chain fatty acids*, SCFA) [55]. Stąd też mikrobiota ma wpływ na zdrowie, a dysbioza została powiązana z rozwojem wielu chorób, takich jak otyłość, cukrzyca typu 2, choroby sercowo-naczyniowe, a nawet choroby neurologiczne czy nowotwory [56]. Mikrobiota ustala się

na wczesnym etapie rozwoju osobniczego i przez większość życia pozostaje stabilna. W starzeniu natomiast obserwuje się zubożenie bioróżnorodności i liczebności pożytecznych bakterii jelitowych, jak np. bakterie z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, kosztem liczebności bakterii potencjalnie szkodliwych, a więc proces dysbiozy [57, 58]. Choć mikrobiota i zmiany w niej zachodzące są w dużej mierze cechą osobniczą, zaobserwowano wspólne wzorce jej metabolitów pojawiających się w osoczu, np. obecność 4-metylofenolu związana jest z osłabieniem organizmu, a pochodnych indolowych z dobrym zdrowiem [59, 60].

1.1.2. Typy starzenia komórkowego

1.1.2.1. Starzenie replikacyjne

Teorię skończonych możliwości replikacyjnych komórki zwierzęcej jako pierwszy postawił August Weismann w 1881 roku [61]. 80 lat później, eksperymentalnie potwierdzili ją Leonard Hayflick i Paul Moorhead, zauważając zatrzymanie podziałów prawidłowych, zróżnicowanych ssaczych komórek w hodowli *in vitro* (2D) [62, 63], tym samym obalając akceptowaną w ówczesnym czasie tezę Alexisa Carrel'a o nieśmiertelności komórek (tzw. błąd Carrel'a) [64, 65]. Od tego czasu, maksymalna liczba podziałów, do których zdolna jest komórka, znana jest jako limit Hayflicka (rys. 3), a jego wartość jest specyficzna dla danego typu komórek i organizmu, z którego pochodzą. Po osiągnięciu limitu Hayflicka, komórki wchodzi w fazę starzenia replikacyjnego (ang. *replicative senescence*) [66].



Rysunek 3. Starzenie replikacyjne komórek ssaczych. Prawidłowe komórki somatyczne po osiągnięciu określonej liczby podziałów (limit Hayflicka) rozwijają fenotyp starzeniowy. Limitowi Hayflicka nie podlegają komórki embrionalne, macierzyste i nowotworowe. Schemat zaadaptowano z [66].

Wyczerpanie możliwości podziałowych komórki zostało skorelowane ze stopniowym skracaniem telomerów. Telomery są tandemowymi powtórzeniami na końcach chromosomów, których zadaniem jest ich stabilizacja i ochrona przed działaniem nukleaz [67]. Na przełomie lat 80. i 90. XX wieku, zaobserwowano sukcesywne skracanie telomerów z każdym podziałem mitotycznym komórki [68]. Zjawisko to związane jest z tzw. problemem replikacji końca, polegającym na niemożliwości pełnej replikacji chromosomów przez polimerazę DNA [69]. W efekcie, po odbyciu określonej liczby podziałów, długość telomerów osiąga wartość krytyczną uniemożliwiającą dalszą ochronę końców chromosomu, co stanowi sygnał do zahamowania cyklu komórkowego [70, 71]. Areszt cyklu następuje w fazie G1 lub G2, co kontrolowane jest przez szlak sygnałowy p53/p21 i p16/pRb [72, 73]. Czynniki transkrypcyjny p53 jest jednym z ważniejszych supresorów transformacji nowotworowej. W odpowiedzi na skrócenie telomerów i uszkodzenia DNA [74], aktywuje ekspresję genów związanych z inhibicją proliferacji, w tym białka p21 [75], co indukuje starzenie. Aktywność szlaku p53/p21 nie jest jednak konieczna do utrzymania tego stanu i jego aktywność z czasem spada [76, 77]. Permanentne zatrzymanie cyklu jest utrzymywane przez szlak p16/pRb, aktywowany w odpowiedzi na stres komórkowy lub indukcję starzenia [78]. Starzeniu replikacyjnemu nie podlegają komórki embrionalne, macierzyste i nowotworowe, ze względu na ekspresję enzymu – telomerazy, zapobiegającemu skracaniu telomerów, co daje tym komórkom nieskończony potencjał replikacyjny [79].

1.1.2.2. Starzenie przyspieszone

Poza starzeniem replikacyjnym wynikającym ze skracania telomerów, obserwuje się również starzenie przyspieszone (ang. *stress-induced premature senescence*, SISP), indukowane przez inne czynniki stresogenne [80]. Choć komórki poddane starzeniu czy to replikacyjnemu, czy przyspieszonemu, odznaczają się tym samym fenotypem, początkowo sądzono, że oba procesy są odmiennymi i niezależnymi od siebie [81]. Z czasem wykazano jednak, że warunki stresowe przyspieszają skracanie telomerów [82, 83], a tym samym starzenie replikacyjne. W odróżnieniu jednak od starzenia

replikacyjnego, starzenie przyspieszone jest niezależne od długości telomerów [81, 84] i mogą mu ulegać komórki nowotworowe [85, 86].

W warunkach *in vivo* komórka stale narażona jest na stres wywołujący uszkodzenia wewnętrzne. Gdy jego natężenie zaczyna przekraczać możliwości naprawcze komórki, jednak nie przekracza wartości krytycznej, komórka obniża swoją aktywność metaboliczną przez areszt cyklu komórkowego i rozwinięcie fenotypu starzeniowego [87]. Podobnie jak w przypadku starzenia replikacyjnego, dzieje się to w następstwie aktywacji czynnika transkrypcyjnego p53 i ekspresji białka p21, tym razem jednak na skutek detekcji uszkodzeń DNA i aktywacji szlaku DDR (ang. *DNA damage response*), oraz ekspresji białka p16 w odpowiedzi na stres oksydacyjny [86, 88]. Białko p16 aktywuje supresor nowotworowy pRb, co z kolei prowadzi do trwałej inhibicji ekspresji genów odpowiedzialnych za progresję cyklu komórkowego [89]. Ponadto, aktywność szlaku p16/pRb stymuluje produkcję RFT, co z kolei stymuluje aktywność kinazy PKC δ promującej dalszą generację RFT. Podniesiony w ten sposób poziom RFT inhibuje cytokinę, stanowiąc dodatkową blokadę cyklu komórkowego [90]. Starzenie przyspieszone może być więc wywołane przez szerokie spektrum czynników wywołujących stres oksydacyjny i uszkodzenia DNA, takich jak np. takie jak nadtlenek wodoru (H₂O₂) [91], promieniowanie jonizujące lub ultrafioletowe (UV) [92, 93], cytokiny [94] czy chemioterapeutyki [80, 95].

1.1.3. Fizjologiczna rola starzenia komórkowego

Starzenie kojarzone jest głównie z jego negatywnymi konsekwencjami, jakimi są stopniowa utrata zdrowia i obniżenie jakości życia. Jednak proces ten odgrywa istotną fizjologiczną rolę w organizmie. Starzenie biologiczne jest bowiem związane z rozwojem embrionalnym [96], gojeniem ran [97] czy supresją nowotworzenia [98].

Starzenie komórkowe, jako zjawisko związane z zatrzymaniem cyklu komórkowego, w procesie rozwoju embrionalnego przyczynia się do regulacji wzrostu i różnicowania komórek, co ma kluczowe znaczenie w kształtowaniu struktur embrionalnych i zapobieganiu niekontrolowanemu podziału komórek. W tym przypadku starzenie indukowane jest przez aktywację białka p21 zależną od transformującego czynnika wzrostu beta (TGF- β). Podobnie, w procesie gojenia ran, starzenie komórkowe wspiera ograniczenie nadmiernej proliferacji komórek i proces przebudowy tkanki poprzez SASP

i zaangażowanie systemu immunologicznego, w celu usunięcia uszkodzeń [76, 99]. Z kolei w kontekście nowotworzenia, starzenie komórkowe ma dwojakie oblicze. Z jednej strony stanowi mechanizm zapobiegawczy rozprzestrzenianiu się uszkodzonych komórek, które mogłyby prowadzić do rozwoju nowotworów. Z drugiej strony, akumulacja komórek o fenotypie starzeniowym i przewlekła ekspozycja tkanki na czynniki składające się na SASP, może prowadzić do transformacji nowotworowej prawidłowych komórek [100]. Zajmując się problematyką starzenia, należy więc pamiętać zarówno o negatywnych, jak i pozytywnych jego konsekwencjach [101].

1.1.4. Stres oksydacyjny a starzenie

W 1956 roku Denham Harman przedstawił wolnorodnikową teorię starzenia (ang. *free-radical theory of aging*, FRTA), zakładającą, że główną przyczyną starzenia jest nagromadzenie uszkodzeń wewnątrzkomórkowych w wyniku działania wolnych rodników, produkowanych w toku metabolizmu komórkowego [102]. Kilkanaście lat później teoria ta została zaktualizowana do mitochondrialnej wolnorodnikowej teorii starzenia (ang. *mitochondrial FRTA*, MFRTA) ze względu na fakt, że głównym źródłem wolnych rodników w komórce są mitochondria, produkujące RFT jako skutek uboczny fosforylacji oksydacyjnej [103, 104].

Choć teoria ta przez długi czas była dominującą i przez lata stanowiła główne wyjaśnienie procesu starzenia, rola stresu oksydacyjnego (SO) w procesie starzenia okazuje się bardziej skomplikowana niż sądzono. Nowsze badania wskazują na to, że stres oksydacyjny może nieść zarówno negatywne, jak i pozytywne konsekwencje dla funkcjonowania komórek. Zjawisko mitohormezy pokazuje, że łagodny i przejściowy stres mitochondrialny wywiera pozytywny wpływ na funkcjonowanie komórki, tkanek i całego organizmu [105]. Powszechnie znane i dobrze opisane interwencje przeciwstarzeniowe, takie jak aktywność fizyczna, restrykcja kaloryczna czy post przerywany indukują produkcję RFT przez mitochondria [106]. Podobne zjawisko obserwuje się w przypadku, stosowanej w leczeniu cukrzycy i uznawanej za przeciwstarzeniową, metforminy [107]. Liczne doniesienia o adaptacyjnym wpływie łagodnego stresu mitochondrialnego [108–110] mogą tłumaczyć niepowodzenia prób stosowania antyoksydantów *per se* w celu poprawy związanej z wiekiem utraty zdrowia [111]. Myszy z delecją genu mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej (*SOD2*) nie

wykazują przyspieszonego starzenia [112], a z nadekspresją genu cytoplazmatycznej dysmutazy ponadtlenkowej (*SOD1*) – opóźnionego starzenia [113].

W świetle powyższych doniesień stres oksydacyjny nie może być uznany za pierwotną przyczynę starzenia. Jednak bez wątplenia przewlekły SO przyczynia się do jego rozwoju i może wpływać na rozwój czynników prowadzących do starzenia, jak również jest przez rozwój tych czynników indukowany. Stres oksydacyjny przyspiesza proces komórkowego starzenia replikacyjnego oraz może indukować starzenie przyspieszone (rozdział 1.1.2). Niekorzystne warunki środowiskowe przyczyniają się do starzenia przez indukcję SO [114]. Z powodu związanej z wiekiem deregulacji mechanizmów naprawczych komórki, w tym procesu autofagii i aktywności proteasomu, starzeniu towarzyszy akumulacja markerów SO, takich jak produkt oksydacyjnych uszkodzeń DNA – 8-oksodeoksyguanozyny (8-oxodG) [115, 116], karbonylacja białek [117, 118] czy peroksydacja lipidów [119, 120].

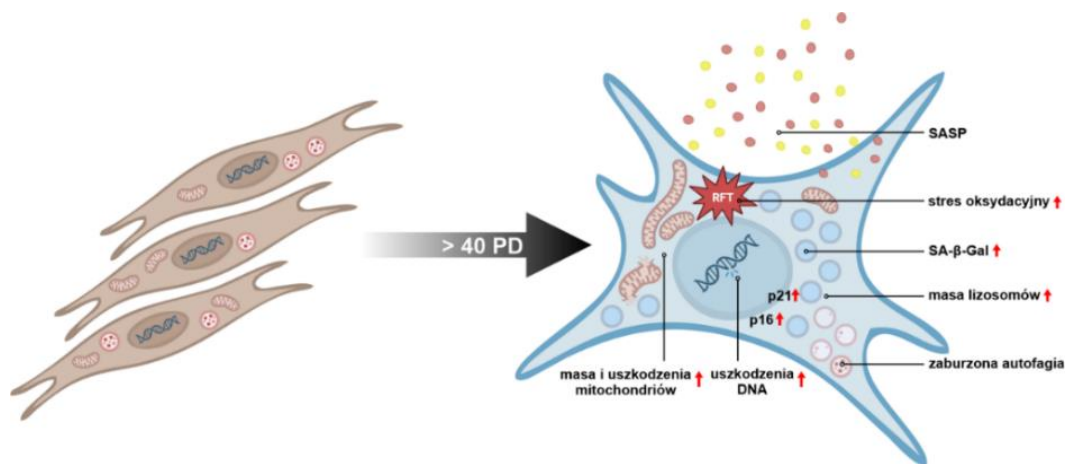
1.2. Modele badawcze

Starzenie jest procesem konserwatywnym, dotyczącym każdego żywego organizmu. Lata badań doprowadziły do zdefiniowania licznych modeli badawczych, od komórek do całych organizmów. Do najważniejszych należy zaliczyć drożdże *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe*, nicienie *Caenorhabditis elegans*, muszkę *Drosophila melanogaster* czy mysz *Mus musculus* [121, 122]. Modele badawcze zastosowane w niniejszej pracy, przedstawiono w kolejnych podrozdziałach tego opracowania.

1.2.1. Linie komórkowe

Hodowle komórkowe są powszechnie stosowane do badań *in vitro*. Pozwalają na lepsze poznanie procesów zachodzących w komórkach oraz mechanizmów chorób czy działania leków. Testy komórkowe stanowią filar badań podstawowych, pozwalając ocenić potencjał związku do dalszych badań na zwierzętach [123]. Ponieważ prawidłowe komórki w trakcie rutynowej hodowli ulegają starzeniu, dwuwymiarowe hodowle komórkowe (2D) znalazły zastosowanie w badaniach nad tym procesem. Po przebyciu liczby pasaży typowej dla danej linii, komórka rozwija fenotyp starzeniowy [124].

Starzenie indukowane jest również poprzez ekspozycję komórek na różnego rodzaju stres [125]. Do stosowanych czynników przyspieszających starzenie należą m.in. H_2O_2 [126], promieniowanie jonizujące lub UV [127], czy pożywka kondycjonowana po hodowli komórek starzejących się [128].



Rysunek 4. Starzenie ludzkich fibroblastów w hodowli 2D. Linia komórkowa MRC-5 wykazuje fenotyp starzeniowy po około 40 podwojeniach populacji (PD). Jego cechami charakterystycznymi są większy, spłaszczony i nieregularny kształt komórki, zwiększona masa lizosomów i mitochondriów, obecność białek p16 i p21 oraz aktywność β -galaktozydazy (SA- β -Gal). Zaburzony proces autofagii i, wzmożona produkcja reaktywnych form tlenu (RFT), prowadząca do stresu oksydacyjnego, przyczynia się do akumulacji uszkodzeń wewnątrzkomórkowych, w tym uszkodzeń DNA. Komórka zaczyna wydzielać prozapalne cytokiny, co nazwano fenotypem sekrecyjnym związanym ze starzeniem (SASP). Schemat powstał z wykorzystaniem oprogramowania BioRender.com.

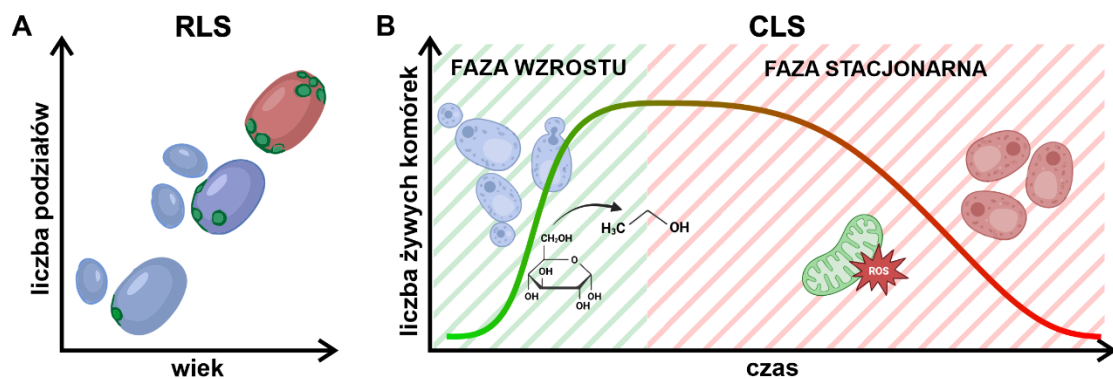
Starzejące się ludzkie fibroblasty charakteryzują się swoistym fenotypem (rys. 4). Pierwszym widocznym objawem jest zmiana morfologii komórek, które z cienkich i wydłużonych we wczesnych pasażach, w późnych prezentują się jako skrócone i rozplaszczone [129]. Na poziomie molekularnym, najbardziej powszechnym znacznikiem starzenia komórkowego jest aktywność związanej ze starzeniem beta-galaktozydazy (SA- β -Gal), enzymu zlokalizowanego w lizosomach, których masa również wzrasta ze starzeniem [130]. Choć znacznik ten jest najbardziej rozpowszechniony w badaniach, nie jest on w pełni specyficzny. Dlatego też, w celu precyzyjnej identyfikacji komórek starzejących się, stosuje się również inne markery, takie jak poziom zaangażowanych w areszt cyklu komórkowego białek p16 lub p21 (rozdział 1.1.2), czy czynników składających się na SASP (rozdział 1.1.1.3). Obserwuje się również akumulację uszkodzeń DNA, w tym pęknięć nici oraz oksydacji nukleozydów (najczęściej 8-oxodG). Komórki starzejące się odznaczają się również zwiększoną masą i poziomem uszkodzeń mitochondriów, co związane jest z zaburzoną autofagią i prowadzi do wzmożonej produkcji RFT [124].

Choć hodowla 2D pozwala śledzić proces starzenia *in vitro*, ma ograniczenia właściwe dla tego typu modelu. Należą do nich odmienna morfologia komórki, niż w warunkach natywnych, homogeniczność hodowli czy brak organizacji tkankowej. Ponadto, w hodowli 2D komórki są bardziej wrażliwe na zadane warunki eksperymentalne, w tym np. na działanie podawanych związków. Z tego względu wyniki uzyskiwane w modelu 2D często nie mają oczekiwanego przełożenia w badaniach *in vivo* [131].

1.2.2. Drożdże

Drożdże należą do najpopularniejszych organizmów modelowych w badaniach nad starzeniem. Ich szybki wzrost i łatwość hodowli, w pełni scharakteryzowany genom i łatwość manipulacji genetycznej sprawiają, że stanowią wygodny model do badania molekularnych podstaw procesu starzenia, a wiedza zdobyta w wyniku dziesiątek lat badań okazała się mieć nieoceniony wkład w zrozumienie starzenia się wyższych organizmów.

Gatunkiem najczęściej stosowanym w badaniach są drożdże pączkujące *Saccharomyces cerevisiae*. Wykazują one wszystkie wspomniane wcześniej cechy właściwe temu królestwu, a ponadto dzielą się w sposób asymetryczny, a więc komórka „matka” wytwarza mniejsze od siebie komórki potomne (pączki), co umożliwia śledzenie kolejnych podziałów [132]. Nowo powstałe komórki-pączki wolne są od większości uszkodzeń wewnętrznych gromadzonych w komórce „matce” [133]. Liczba pączków, jaką w ciągu życia może wytworzyć komórka „matka” jest ograniczona i wyraża replikacyjną długość życia (ang. *replicative lifespan*, RLS; rys. 5A). Uznaje się, że RLS stanowi model badania starzenia aktywnych mitotycznie komórek wyższych organizmów eukariotycznych [134]. Drugim modelem badania starzenia z wykorzystaniem drożdży jest chronologiczna długość życia (ang. *chronological lifespan*, CLS; rys. 5B), określająca w jednostkach czasu przeżywalność komórek w fazie stacjonarnej. Ten model uznaje się za odpowiadający postmitotycznym komórkom wyższych organizmów [135].



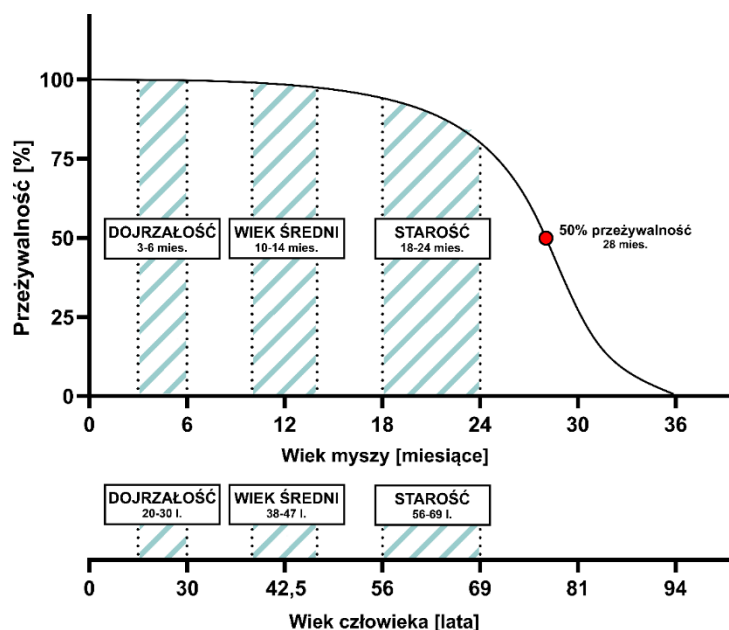
Rysunek 5. Modele starzenia drożdży. (A) Replikacyjna długość życia (RLS) wyrażana jest liczbą pączków wytworzonych przez komórkę w ciągu życia. Po każdym podziale na powierzchni komórki pozostaje bruzda (kolor zielony). (B) Chronologiczna długość życia (CLS) to czas, w którym nie dzielące się komórki drożdży pozostają żywe. W fazie wzrostu logarytmicznego (kolor zielony), drożdże intensywnie się dzielą i preferencyjnie przekształcają energię na drodze glikolizy i fermentacji alkoholowej nawet w obecności tlenu. Przechodząc w fazę stacjonarną (kolor czerwony), podziały komórkowe ustępują i następuje zmiana metabolizmu w kierunku fosforylacji oksydacyjnej. Schemat sporządzono z wykorzystaniem oprogramowania Biorender.com.

Choć oba modele są od siebie odmienne, dzielą cechy wspólne, jak chociażby zależność od dostępu do składników odżywczych oraz od aktywności kompleksu kinazy TOR i kinazy Sch9. Co istotne, mechanizmy te okazały się istotne w procesie starzenia organizmów wyższych [136, 137]. Zarówno restrykcja kaloryczna, jak i inhibicja szlaków sygnałowych związanych z odpowiedzią na obecność składników odżywczych, wydłuża CLS i RLS drożdży, co obserwuje się również w przypadku innych organizmów modelowych [136, 138]. Drożdże przyczyniły się do scharakteryzowania wielu związków o potencjale przeciwstarzeniowym, takich jak rapamycyna, resweratrol, metformina czy spermidyna, które wykazują obiecującą aktywność w innych modelach [139, 140]. W przypadku drożdży, wydłużenie życia związane jest najczęściej ze zwiększeniem aktywności i efektywności mitochondriów, obniżeniem poziomu RFT lub utrzymaniem stabilności genomowej [136, 141, 142].

Mimo zalet i praktycznej użyteczności drożdży w badaniach nad starzeniem, jako model posiada też swoje ograniczenia. Przede wszystkim jest to prosty, jednokomórkowy organizm o szczególnych cechach, obejmujących zarówno budowę, jak i fizjologię komórki. Obecność ściany komórkowej czy wakuoli, preferencyjne przekształcanie energii na drodze fermentacji mimo obecności tlenu, czy asymetryczny podział komórki pozwalający zachować komórki potomne od uszkodzeń przodków, sprawiają, że obserwowany efekt działania danego związku może być odmienny w komórkach drożdży i zwierząt [139].

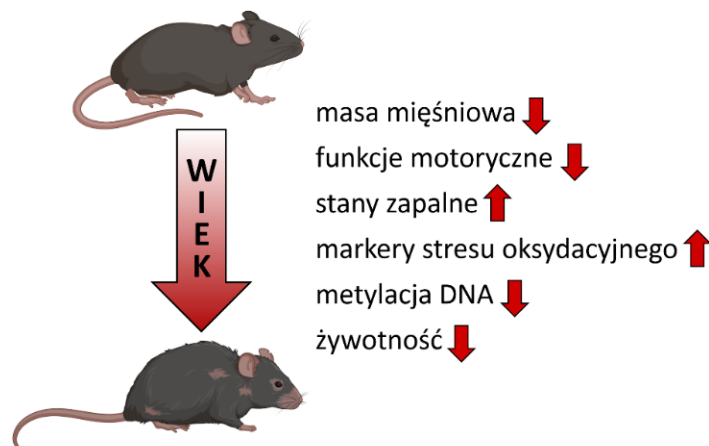
1.2.3. Mysz

Mysz domowa (*Mus musculus*) jest najważniejszym organizmem modelowym w badaniach nad chorobami i zdrowiem człowieka. Wysokie podobieństwo na poziomie fizjologicznym i genetycznym do człowieka, a przy tym niewielkie rozmiary i szybka reprodukcja, stanowią o przewadze myszy nad innymi organizmami modelowymi. Zważywszy na krótki czas życia, mysz zyskała dużą popularność również w badaniach nad starzeniem [143, 144].



Rysunek 6. Relacja wieku myszy i człowieka. Schemat zaadaptowano z [144].

Mysz charakteryzuje się około 30 razy krótszą długością życia niż człowiek, osiągając wiek uznawany za starczy w 18. miesiącu życia (rys. 6) [145, 146]. Zmiany fenotypowe obserwowane z wiekiem są u myszy i człowieka bardzo zbliżone [147], a za najważniejsze, z perspektywy jakości życia, należy uznać tożsamy mechanizm rozwoju sarkopenii i chorób neurodegeneracyjnych [148–151]. Zaawansowane wiekowo myszy charakteryzują się upośledzeniem funkcji motorycznych, co związane jest m.in. z utratą masy mięśniowej i degeneracją motoneuronów, czy rozwojem stanów zapalnych [152, 153], a na poziomie molekularnym, obserwowany jest wzrost markerów stresu oksydacyjnego i uszkodzeń DNA oraz spadek globalnego poziomu metylacji DNA (rys. 7) [154–158].



Rysunek 7. Oznaki starzenia myszy. Zaawansowane wiekowo myszy charakteryzują się upośledzeniem funkcji motorycznych, co związane jest m.in. z utratą masy mięśniowej i rozwojem stanów zapalnych. Na poziomie molekularnym, obserwowany jest wzrost poziomu markerów stresu oksydacyjnego oraz spadkiem globalnego poziomu metylacji DNA. Schemat sporządzono z wykorzystaniem oprogramowania BioRender.com.

Mysz w różnym stopniu nie tylko wykazuje wszystkie 12 cech starzenia zaproponowanych przez López-Otina (rozdział 1.1.1), ale też jako model przyczyniła się do ich poznania. Do badań wykorzystuje się zarówno myszy szczepu dzikiego, jak najpopularniejszy szczep wsobny C57BL/6J [143], jak również myszy transgeniczne uzyskiwane w celu poznania konkretnych aspektów procesu starzenia [159]. Należą do nich słynne myszy Bakera, na przykładzie których pokazano, że selektywne usuwanie komórek wykazujących ekspresję markera starzenia, białka p16, wydłuża życie i okres życia w zdrowiu [160]. Wiele innych interwencji przeciwstarzeniowych, jak restrykcja kaloryczna czy modulacja odczuwania składników odżywczych, zostało przetestowanych z wykorzystaniem myszy. W większości przypadków jednak wyniki uzyskano na jednym szczepie wsobnym, mogą więc odbiegać od naturalnych warunków [121, 161, 162].

1.3. Geroprotektory

Geroprotektory to działania i substancje, których celem jest zapobieganie, spowalnianie lub odwracanie procesów starzenia się, aby w efekcie wydłużyć całkowitą długość życia, a zwłaszcza długość życia w zdrowiu. Działania geroprotekcyjne obejmują więc również terapie zapobiegające lub opóźniające rozwój chorób związanych z wiekiem [163, 164]. Do geroprotektorów zalicza się między innymi senoterapeutyki, stanowiące nową klasę związków i produktów naturalnych, wywierających bezpośredni wpływ na proces starzenia komórkowego. Wyróżnia się dwie grupy senoterapeutyków: senolityki, selektywnie eliminujące komórki starzejące się, oraz senomorfiki, łagodzące szkodliwe cechy fenotypowe tych komórek [165].

1.3.1. Senomorfiki

Przeciwstarzeniowe właściwości senomorfików opierają się na modulowaniu szlaków sygnałowych odpowiedzialnych za rozwój procesu starzenia i jego negatywnych konsekwencji, którymi są SASP i RFT [166]. Zaliczane do tej grupy związki działają w zróżnicowany sposób, a więc działają albo jako inhibitory szlaków TOR, NF- κ B, lub JAK/STAT, albo jako aktywatory szlaków związanych z NRF2 lub sirtuinami (SIRT) [167]. Do najbardziej znanych przedstawicieli tej kategorii należy zaliczyć rapamycynę, resweratrol oraz metforminę.

Rapamycyna jest specyficznym inhibitorem kinazy TOR (rozdział 1.1.1.2), zaangażowanej we wzrost i proliferację komórki [168]. Jej przeciwstarzeniowe właściwości zostały stwierdzone na wielu modelach starzenia – u drożdży, muszki *D. melanogaster*, nicienia *C. elegans*, czy w komórkach ssaczy [169], a u człowieka okazała się skutecznym immunosupresorem stosowanym w transplantologii [170]. Zahamowanie szlaku TOR przez rapamycynę opóźnia starzenie komórek i ogranicza SASP, a ponadto ogranicza nowotworzenie indukowane przez komórki starzejące się [167, 171]. Ze względu na obiecujący potencjał rapamycyny wynikający z mechanizmu opartego o inhibicję konserwatywnej kinazy TOR, zainteresowaniem badawczym cieszą się zarówno jej syntetyczne analogi (tzw. rapalogi), jak i inne inhibitory szlaku TOR, a część z nich jest na etapie badań klinicznych [172–174].

Do związków senomoficznych zalicza się również niektóre flawonoidy, takie jak resweratrol obecny w owocach i w czerwonym winie, kemferol w liściach herbaty, czy apigenina w roślinach selerowatych [175]. Potencjał przeciwstarzeniowy przypisuje się im ze względu na właściwości antyoksydacyjne i przeciwzapalne [176]. Resweratrol, podobnie jak inne flawonoidy, aktywuje szlaki związane z SIRT1 i NRF2 i inhibuje prozapalny szlak NF- κ B [177]. Choć NF- κ B jest uznawany za główny regulator SASP [178], flawonoidy wykazują zróżnicowany wpływ na poziom prozapalnych cytokin. Resweratrol redukuje poziom IL-1 β , ale nie wpływa na poziom IL-6 czy TNF- α [179]. Z kolei apigenina ogranicza poziom IL-1 α , a kemferol IL-6, IL-8, czy IL-1 β [175].

Metformina jest związkiem rutynowo stosowanym w leczeniu cukrzycy typu 2, a przy tym wykazującym wysoki potencjał przeciwstarzeniowy [180]. W badaniach na nicieniach *C. elegans* i myszach wykazano, że wydłuża całkowitą długość życia i długość życia w zdrowiu starych osobników [181, 182]. Metformina redukuje SASP, zmniejszając poziom IL-1 β , IL-6, IL-8 czy CXCL5 przez inhibicję szlaku NF- κ B [183], oraz obniża poziom oddychania komórkowego poprzez inhibicję kompleksu I łańcucha oddechowego [184], przy jednoczesnym obniżeniu poziomu RFT i uszkodzeń DNA [185]. Ze względu na wysoce obiecujące właściwości, metformina jest przedmiotem badań klinicznych, jako potencjalny lek nowej generacji opóźniający rozwój chorób związanych ze starzeniem, takich jak nowotwory, choroby sercowo-naczyniowe czy choroba Alzheimera [186].

1.3.2. Senolityki

Związki selektywnie eliminujące komórki starzejące się indukując ich apoptozę, określono mianem senolityków [187]. Ponieważ akumulacja komórek starzejących się związana jest z wieloma chorobami związanymi z wiekiem, z senolitykami wiąże się duże nadzieje terapeutyczne [188]. Wyniki uzyskane na myszach wskazują, że usunięcie starzejących się komórek poprawia ogólne zdrowie starych myszy [189] oraz ogranicza neurodegenerację [190] i stany zapalne w mózgu [191] poprawiając zdolności poznawcze zwierząt. Choć wspomniane doniesienia są bardzo obiecujące, należy pamiętać o fizjologicznej roli komórek starzejących się (rozdział 1.1.3), których usunięcie może wiązać się z pogorszeniem funkcji organizmu. Efekt taki zaobserwowano w przypadku

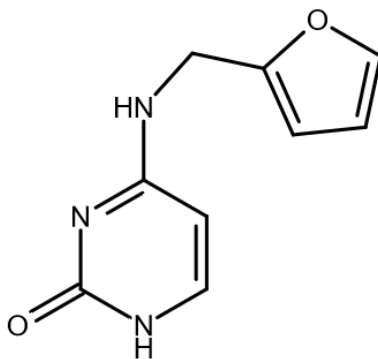
eliminacji starzejących się komórek beta trzustki, co doprowadziło do rozwoju cukrzycy typu 2 u myszy [192].

Podobnie jak w przypadku senomorfików, wśród senolityków wyróżnić można naturalne flawonoidy, takie jak kwercetyna czy fisetyna. W przypadku obu stwierdzono silne działanie antyoksydacyjne i przeciwzapalne, wynikające z wpływu na szlaki związane z NRF2 i NF- κ B [167]. Kwercetyna indukuje apoptozę w komórkach starzejących się poprzez szlaki PI3k/Akt i p53/p21, a jej działanie senolityczne zostało potwierdzone zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* [193]. Z kolei fisetyna, w zależności od typu komórki, wykazuje działanie senolityczne i senomorficzne, które również potwierdzono u myszy [194, 195]. Jednakże, zarówno kwercetyna, jak i fisetyna, są trudno rozpuszczalnymi w wodzie związkami o ograniczonej stabilności chemicznej i niskiej biodostępności, co ogranicza ich potencjalne zastosowania terapeutyczne [196, 197].

Odrębną grupę senolityków stanowią związki syntetyczne inhibujące konkretne szlaki sygnałowe związane ze starzeniem komórkowym. Należy do nich cytostatyk dasatynib, będący inhibitorem kinazy tyrozynowej i eliminujący komórki starzejące się przez redukcję poziomu antyapoptotycznego białka PAI-2 [193]. Wykazano, że kombinacja dasatynibu z kwercetyną poprawia jakość życia starzejących się myszy [198]. Innym przykładem są inhibitory białek Bcl-2, które pełnią rolę supresorów apoptozy w komórkach. Należy do nich navitoclax, indukujący apoptozę różnych typów starzejących się komórek. Związek ten opóźnił utratę pamięci osobników w mysim modelu choroby Alzheimerera [190].

1.4. 4-N-furfurylocytozyna

4-N-furfurylocytozyna (FC) jest nową pochodną cytozyny, która w pozycji 4N ma podstawiony furfural (rys. 8). Po raz pierwszy otrzymana została w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Jak dotąd, poza publikacją dotyczącą aktywności FC w modelu drożdżowym [199], nie została ona szerzej opisana w literaturze. Niniejsza praca stanowi więc pierwszą, obszerną charakterystykę FC w kontekście jej wpływu na rozwój starzenia, z wykorzystaniem różnych modeli badawczych.



Rysunek 8. Struktura chemiczna 4-N-furfurylocytozyny (FC).

2. Cel pracy

Celem pracy było poznanie właściwości przeciwstarzeniowych 4-N-furfurylocytyny (FC) w trzech modelach badawczych: ludzkich fibroblastach, drożdżach i myszach. FC jest analogiem cytozyny, zsyntetyzowanym w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu.

Osiągnięcie założonego celu było możliwe poprzez realizację następujących zadań badawczych:

1. Model komórkowy
 - a. Zbadanie wpływu FC na replikacyjny i przyspieszony model starzenia komórkowego.
 - b. Ocena wpływu FC na aktywność mitochondriów.
 - c. Analiza proteomiczna zmian w ludzkich komórkach eukariotycznych pod wpływem FC.
2. Model drożdżowy
 - a. Ocena wpływu FC na chronologiczną długość życia (CLS) drożdży.
 - b. Określenie wpływu FC na poziom oddychania tlenowego.
 - c. Analiza wpływu FC na ekspresję genów związanych z prostarzeniowym szlakiem sygnałowym TORC1/Sch9.
3. Model myszy
 - a. Suplementacja zaawansowanych wiekowo myszy C57BL/6J dwoma różnymi dawkami FC.
 - b. Ocena zdolności lokomotorycznych badanych osobników.
 - c. Analiza parametrów biochemicznych krwi.
 - d. Oznaczenie poziomu akumulacji markerów stresu oksydacyjnego w tkankach.

3. Materiały i metody

3.1. 4-N-furfurylocytozyna

4-N-furfurylocytozyna (FC) została zsyntetyzowana w Zakładzie Chemii Komponentów Kwasów Nukleinowych IChB PAN.

3.2. Model komórkowy

3.2.1. Linie komórkowe

MRC-5 (ATTC) – prawidłowe, nienowotworogenne fibroblasty wyprowadzone z tkanki płucnej. Stanowiły podstawę badań nad aktywnością biologiczną FC. Hodowlę prowadzono w pożywce EMEM (Corning).

HaCaT (ATTC) – prawidłowe, unieśmiertelnione keratynocyty człowieka. Posłużyły do oceny właściwości antyoksydacyjnych FC w wybranych eksperymentach. Hodowlę prowadzono w pożywce DMEM (Corning).

Hodowle komórkowe prowadzono w naczyniach hodowlanych do hodowli komórek przylegających (adherentnych) w odpowiedniej dla danej linii pożywce uzupełnionej 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS) i mieszaniną antybiotyków w stężeniu 1x (Corning), w inkubatorze utrzymującym standardowe warunki wzrostu (37°C, 5% CO₂, wilgotność względna 95%). Komórki pasażowano po osiągnięciu 80% zagęszczenia (konfluencji). W celu odklejenia komórek od naczynia hodowlanego, komórki przemywano buforem PBS, a następnie inkubowano z roztworem trypsyny (Gibco; 0,05% trypsyna, 0,53 mM EDTA) przez 5 min w 37°C (MRC-5) lub roztworem akutazy (Capricorn Scientific) przez 20 min w 37°C (HaCaT). Do otrzymanej zawiesiny komórek dodawano dwie objętości pożywki hodowlanej i wirowano przez 3 min przy 1000 rpm (obroty na minutę). Uzyskany osad komórek zawieszano w świeżej pożywce i wysiewano na nowe naczynia hodowlane.

3.2.2. Przechowywanie komórek

W celu długoterminowego przechowywania, komórki zawieszono w odpowiedniej pożywce z dodatkiem 20% FBS oraz 10% dimetylosulfotleneku (DMSO, ang. *dimethyl sulfoxide*) przenoszono do zakręcanej krioprobówki przeznaczonej do przechowywania w ciekłym azocie i umieszczano w -80°C w specjalnych pojemnikach do mrożenia materiału biologicznego zapewniających

spadek temperatury z szybkością 1-3°C/min. Po zamrożeniu próbki przenoszono do zbiornika z ciekłym azotem, celem dalszego przechowywania.

3.2.3. Analiza wpływu FC na starzenie replikacyjne

Aby ocenić wpływ FC na starzenie replikacyjne, komórki MRC-5 hodowano w obecności 1 mM FC, od 10 do 16 pasaży komórek. Po osiągnięciu konfluencji wynoszącej około 80%, komórki odklejano od naczynia hodowlanego i pozostawiano 1/4 populacji. Co drugi pasaż, rozpoczynając od pasażu 10, pozostałą część komórek wysiewano na płytki 6-dołkowe w liczbie 2×10^5 /dołek, w celu przeprowadzenia cytometrycznej analizy aktywności β -galaktozydazy (rozdział 3.2.7) i oznaczenia poziomu RFT (rozdział 3.2.9).

3.2.4. Ocena wpływu FC na komórki postarzone

W celu oceny wpływu FC na komórki postarzone, wielokrotnie pasażowane komórki MRC-5 (≥ 16 pasaży) wysiewano na płytki 6-dołkowe w liczbie $1,25 \times 10^5$ /dołek i hodowano z dodatkiem 1 mM FC przez 72 h. Następnie przeprowadzano wybrane testy opisane w kolejnych podrozdziałach.

3.2.5. Indukcja starzenia przyspieszonego

W celu indukcji starzenia przyspieszonego, młode komórki MRC-5 (≤ 8 pasaż) wysiewano na butelki hodowlane i po 48 h inkubowano z nadtlutkiem wodoru (H_2O_2) w stężeniu 150 lub 300 μM przez 4 h, po czym wymieniano pożywkę na świeżą. Proces powtarzano dwukrotnie, a następnie komórki odklejano od naczynia i wysiewano na płytki 6-dołkowe w liczbie $1,25 \times 10^5$, i inkubowano z 1 mM FC przez 72 h. W kolejnym etapie komórki zbierano i oznaczano poziom RFT (rozdział 3.2.9) oraz markerów starzenia - białka p16 (rozdział 3.2.8) i aktywności β -galaktozydazy (rozdział 3.2.7), uszkodzeń DNA - $\gamma H2AX$ (rozdział 3.2.8) i 8-oxodG (rozdział 3.10).

3.2.6. Test MTT

Ocenę żywotności komórek przeprowadzono przy użyciu kolorymetrycznego testu MTT. Komórki wysiewano na 96-dołkowe płytki w liczbie 5×10^4 na dołek, w kompletnej hodowlanej optymalnej dla danej linii i w obecności FC. Stosowano stężenia w zakresie 0,1-2 mM (ocena wpływu FC na żywotność komórek) lub 1 mM (ocena właściwości antyoksydacyjnych FC). Płytki inkubowano przez 48 h, co pozwalało

na osiągnięcie około 80% konfluencji komórek w dołkach kontrolnych. Następnie przeprowadzano test MTT w celu oceny wpływu FC na żywotność komórek. W przypadku analizy właściwości antyoksydacyjnych FC, komórki inkubowano z arseninem sodu (NaAsO_2 ; 1,25-500 μM) przez kolejne 24 h, po czym przeprowadzano test MTT. Na każdy warunek eksperymentalny przeznaczano 6 dołków. Test MTT przeprowadzano wg protokołu: komórki inkubowano w pożywce zawierającej z odczynnik MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenyloctetrazoliowy) w stężeniu 0,5 mg/ml przez 3 h w warunkach hodowlanych. Następnie usuwano pożywkę, a powstałe kryształy formazanu rozpuszczano w 100 μl DMSO. Intensywność zabarwienia powstałego roztworu mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali $\lambda 570$ nm, za pomocą czytnika płytek VICTOR Nivo 5S (PerkinElmer).

3.2.7. Oznaczanie aktywności beta-galaktozydazy

3.2.7.1. Metoda cytometryczna

Aktywność β -galaktozydazy w komórkach oznaczano za pomocą sondy fluorescencyjnej CellEvent™ Senescence Green (Invitrogen), zgodnie z zaleceniami producenta. W tym celu, komórki zbierano z dołków hodowlanych (płytki 6-dołkowe), przemywano 1% BSA w PBS i utrwalano w 2% roztworze paraformaldehydu (PFA) w PBS przez 10 min. W kolejnym etapie komórki przemywano 1% BSA w PBS, wirowano przy 1000 rpm przez 3 min i barwiono w 100 μl buforu (CellEvent™ Senescence Buffer, pH 6,0) z dodatkiem barwnika w rozcieńczeniu 1000x, przez 2 h w 37°C, w ciemności. Następnie komórki przemywano, zawieszano w 1% BSA w PBS i analizowano za pomocą cytometru FACSCalibur (BD).

3.2.7.2. Metoda histochemiczna

W celu mikroskopowej analizy aktywności β -galaktozydazy, komórki wysiewano na 10-dołkowe płytki ze szklanym dnem (CELLview, Greiner Bio-One) w liczbie 1×10^4 na dołek. Komórki barwiono wykorzystując zestaw odczynników Senescence Cells Histochemical Staining Kit (Sigma) przez 16 h, zgodnie z zaleceniami producenta, a następnie dwukrotnie przemywano buforem PBS i analizowano za pomocą mikroskopu Leica DMI 4000B w jasnym polu i przy użyciu oprogramowania LAS AF.

3.2.8. Analizy immunofluorescencyjne

Komórki zbierano z 6-dołkowych płytek wysianych w liczbie $1,25 \times 10^5$ na dołek, przemywano buforem DPBS i utrwalano 1 ml zimnego 100% metanolu i inkubowano w -20°C przez minimum 1 h. Komórki wirowano przy 1000 rpm przez 3 min i przemywano 1 ml zimnego 1% BSA w PBS, po czym permeabilizowano w 100 μl 0,5% Tritonu X-100 w PBS, przez 20 min na lodzie. Komórki przemywano 1 ml zimnego 1% BSA w PBS, odwirowywano i blokowano w 1% BSA w PBS przez 30 min. Następnie, komórki odwirowywano i inkubowano z pierwszorzędowym przeciwciałem monoklonalnym przeciwko γH2AX (1:400; Abclonal) lub p16 (1:200; Abclonal) w 1% roztworze BSA w PBS przez noc w 4°C . Komórki dwukrotnie przemywano 0,1% Tritonem X-100, odwirowywano i do osadów dodawano przeciwciało drugorzędowe AlexaFluor488 (1:1000; Sigma), a następnie inkubowano przez 45 min w 4°C . Komórki przemywano 0,1% Tritonem X-100 i analizowano za pomocą cytometru przepływowego FACSCalibur (BD).

3.2.9. Oznaczanie poziomu RFT

Poziom RFT w komórkach oznaczano za pomocą sondy fluorescencyjnej CellROX Deep Red (Invitrogen) i cytometrii przepływowej. W tym celu, komórki zbierano z dołków hodowlanych, przemywano buforem DPBS i barwiono w 100 μl buforu DPBS zawierającym 2,5 μM sondy CellROX Deep Red przez 30 min w 37°C , 5% CO_2 . Następnie komórki wirowano przy 1000 rpm przez 3 min, zawieszano w 500 μl buforu DPBS. Intensywność fluorescencji komórek analizowano za pomocą cytometru przepływowego FACSCalibur (BD).

3.2.10. Analiza stresu mitochondrialnego za pomocą plazmidu pMitoTimer

3.2.10.1. Hodowla bakterii

- *Skład pożywki LB*

1% baktepepton

0,5% ekstrakt drożdżowy

1% NaCl

1% agar (w przypadku pożywki stałej)

Składniki pożywki rozpuszczano w wodzie destylowanej i sterylizowano w 126°C , przez 11 minut, pod ciśnieniem 1,4 bar.

- *Wyprowadzanie hodowli*

Bakterie transformowane plazmidem pMitoTimer (Addgene, depoztor: Zhen Yan), posiewano z bloczków agarowych na płytki ze stałą pożywką LB z antybiotykiem selekcyjnym (kanamycyna, 50 µg/ml). Płytki inkubowano w 37°C przez 24 h.

3.2.10.2. Izolacja plazmidu

Pojedyncze kolonie bakteryjne przenoszono do 10 ml płynnej pożywki LB z antybiotykiem selekcyjnym (kanamycyna, 50 µg/ml) i wytrząsano z prędkością 200 rpm w 37°C przez noc. Następnie 1 ml inokulum z nocnej hodowli przenoszono do 150 ml pożywki LB z antybiotykiem selekcyjnym i wytrząsano z prędkością 200 rpm w 37°C przez 14-16 h. Kulturę wirowano przy 6000 × g przez 15 min w 4°C. Izolację plazmidowego DNA przeprowadzono wykorzystując zestaw odczynników Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) zgodnie z instrukcjami producenta. Stężenie otrzymanego DNA mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 260 nm za pomocą spektrofotometru NanoDrop 2000 UV/Vis.

3.2.10.3. Transfekcja komórek plazmidem i analiza cytometryczna

Komórki HaCaT, wysiane w liczbie 2×10^5 na płytki 12-dołkowe, transfekowano 1,6 µg plazmidu pMitoTimer, przy użyciu 3 µl odczynnika Lipofectamine 2000 (Invitrogen) zgodnie z instrukcją producenta. Po 6 h transfekcji pożywkę wymieniano na świeżą z dodatkiem 1 mM FC i inkubowano przez 16 h. Następnie w komórkach indukowano stres oksydacyjny poprzez 24-godziną ekspozycję komórek na arsenin sodu (NaAsO₂) w stężeniu końcowym 5 lub 10 µM. Poziom zielonej i czerwonej fluorescencji komórek analizowano za pomocą cytometru FACSCalibur. W celu wizualizacji mikroskopowej stosowano analogiczną procedurę.

3.2.11. Analiza potencjału błony mitochondrialnej

Potencjał błony mitochondrialnej w komórkach oznaczano za pomocą ratiometrycznej sondy JC-1 i cytometrii przepływowej. W tym celu, komórki zbierano z dołków hodowlanych, przemywano buforem DPBS i barwiono w 100 µl buforu DPBS z dodatkiem 2,5 µM sondy JC-1 przez 30 min w 37°C, 5% CO₂. Jako kontrolę pozytywną sygnału zielonej fluorescencji zastosowano komórki traktowane 3 µM FCCP. Wybarwione komórki przemywano i zawieszano w 500 µl buforu DPBS, a intensywność

fluorescencji komórek analizowano za pomocą cytometru przepływowego FACSCalibur (BD).

3.2.12. Oznaczanie poziomu apoptozy i nekrozy

Poziom apoptozy i nekrozy oznaczano cytometrycznie stosując podwójne barwienie z wykorzystaniem barwników 7-AAD (Invitrogen) i Aneksyna V-FITC (BD). Komórki zbierano z dołków hodowlanych, przemywano buforem DPBS i barwiono w 100 μ l buforu wiążącego (BD) zawierającego 1 μ g/ml 7-AAD i 1,1 μ g/ml Aneksyny V-FITC, przez 15 min w temperaturze pokojowej. Wyznakowane komórki analizowano za pomocą cytometru przepływowego FACSCalibur (BD).

3.2.13. Pomiar oddychania komórkowego

Komórki MRC-5 wysiewano na płytki przeznaczone do analizy komórek adherentnych (XFp Cell Culture Miniplates, Agilent) w liczbie $2,3 \times 10^3$ lub $1,75 \times 10^3$ i inkubowano przez odpowiednio 48 lub 72 h z 1 mM FC. W dniu eksperymentu pożywkę hodowlaną wymieniało na eksperymentalną (Seahorse XF Base medium, 10 mM glukoza, 1 mM pirogronian, 2 mM glutamina, pH 7,4) i inkubowano przez 1 h w 37°C bez CO₂. Następnie analizowano szybkość zużycia tlenu przez komórki za pomocą analizatora Seahorse XFp (Agilent). Funkcjonowanie mitochondriów oceniano poprzez zastosowanie: 1 μ M oligomycyny jako inhibitora syntazy ATP (stan 4), 0,75 μ M FCCP jako rozprężacza błony mitochondrialnej (stan U) oraz mieszaniny 2 μ M rotenonu i 2 μ M antymycyny A jako inhibitorów odpowiednio kompleksów I i III łańcucha oddechowego (stan ROX).

3.2.14. Oznaczanie poziomu ATP w komórkach

Komórki wysiewano na 6-dołkowe płytki w liczbie $1,25 \times 10^5$ na dołek i inkubowano w obecności 1 mM FC przez 48 lub 72 h w standardowych warunkach hodowlanych. Następnie komórki zbierano i przygotowywano lizaty metodą trzykrotnego cyklu zamrażania (-80°C/5 min) i rozmrażania (37°C/5 min). Stężenie ATP w supernatantach mierzono metodą luminescencyjną przy użyciu zestawu odczynników ATP Determination Kit (Thermo Fisher Scientific), zgodnie z zaleceniami producenta. Luminescencję mierzono przy długości fali 560 nm za pomocą czytnika płytek Synergy2 BioTek. Wyniki normalizowano do stężenia białka w supernatancie, oznaczonego metodą Bradforda (rozdział 3.9).

3.2.15. Western blot

Oznaczenie poziomu wybranych białek w postarzonych (≥ 16 pasaży) komórkach MRC-5 po inkubacji z 1 mM FC, przeprowadzono metodą hybrydyzacji western blot. W tym celu, całkowite białko izolowano za pomocą buforu M-PER (Mammalian Protein Extraction Reagent; Thermo Fisher Scientific) zgodnie z opisem producenta, w obecności inhibitorów proteaz cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche). Stężenie białka oznaczano jego stężenie metodą Bradforda (rozdział 3.9). Próby zawierające 30 μ g białka w końcowej objętości 20 μ l rozdzielano elektroforetycznie w gradientowym denaturującym żelu poliakrylamidowym 4-15% (SDS-PAGE, BioRad), w obecności markera masy cząsteczkowej białka (Precision Plus Protein Dual Color Standards, Bio-Rad), w buforze Tris-Glicyna. Przed nałożeniem na żel białko denaturowano przez ogrzewanie prób w 95°C przez 5 min w obecności buforu Laemmli'ego (BioRad), a następnie schładzano na lodzie. Rozdzielone białka przenoszono na membranę PVDF o średnicy porów 0,45 μ m (Amersham) metodą elektrotransferu półsuchego (1,3 A, 25 V, 10 min) w buforze Towbin (25 mM Tris, pH 7,5; 190 mM glicyna; 20% metanol) przy użyciu aparatu Trans-Blot Turbo (Bio-Rad Laboratories). Po zakończonym transferze, membranę przepłukiwano trzykrotnie przez 5 min w buforze TBS zawierającym 0,1% Tween 20 i blokowano w 3% roztworze odtłuszczonego mleka w proszku w 0,1% TBST przez 1 h. Następnie membranę inkubowano z pierwszorzędowym przeciwciałem przeciwko VDAC1 (1:1000), TOMM20 (1:5000), LC3 (1:1000), BECLIN1 (1:2000), p62 (1:1000), MFN2 (1:1000) lub NRF1 (1:1000) i GAPDH (1:2000) jako białkiem referencyjnym, w 3% roztworze odtłuszczonego mleka w proszku w 0,05% TBST w 4°C przez noc z mieszaniem. Następnie membranę płukano trzykrotnie przez 5 min w 0,1% TBST i inkubowano z przeciwciałem drugorzędowym (Cell Signaling Technology) sprzężonym z HRP (peroksydaza chrzanowa) w rozcieńczeniu 1:2000 przez 1 h w temperaturze pokojowej. Chemiluminescencyjną detekcję białek przeprowadzono za pomocą zestawu odczynników ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (Amersham) zgodnie z opisem producenta przy użyciu aparatu Azure c600 (Azure Biosystems).

3.2.16. Analiza proteomiczna

Postarzone komórki MRC-5 hodowano z 1 mM FC przez 72 h. Następnie komórki zbierano, przemywano 3-krotnie zimnym buforem PBS i zamrażano w ciekłym azocie. Niecelowana analiza proteomiczna została wykonana w Zakładzie Proteomiki Biomedycznej IChB PAN.

Uzyskane dane poddano analizie statystycznej w celu zidentyfikowania białek różnicujących grupę traktowaną FC i kontrolną. Za białko różnicujące uznawano białko zidentyfikowane przez co najmniej 2 unikalne peptydy, zmienione w sposób istotny statystycznie ($p < 0,05$) i o co najmniej 20% względem porównywanych grup. Wytypowane białka analizowano za pomocą narzędzi bioinformatycznych. Ontologię genów w kontekście lokalizacji komórkowej (GO:CC, ang. *Gene Ontology:Cellular Component*) analizowano za pomocą narzędzia PANTHER-GO Slim osobno dla białek o podwyższonej i obniżonej ilości względem kontroli. Zaangażowanie różnicujących białek w szlaki komórkowe analizowano za pomocą narzędzia GeneCodis4 i bazy danych KEGG (ang. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Analizę głównych składowych (PCA) oraz wizualizację wyników wykonano w oprogramowaniu R 4.3.2 (The R Foundation for Statistical Computing), przy użyciu pakietów R dostępnych w repozytorium CRAN (The Comprehensive R Archive Network).

3.3. Model drożdżowy

3.3.1. Drożdże *Saccharomyces cerevisiae*

W badaniach wykorzystano drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, szczep BY4741 (MATa his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0).

3.3.2. Pożywki hodowlane

- *Skład pożywki YPD*

1% baktopenon

2% ekstrakt drożdżowy

2% glukoza

2% agar (w przypadku pożywki stałej)

Składniki pożywki rozpuszczano w wodzie destylowanej i sterylizowano w 126°C, przez 11 minut, pod ciśnieniem 1,4 bar.

- *Skład pożywki YPG*

1% baktopenon

2% ekstrakt drożdżowy

2% glicerol

2% agar (w przypadku pożywki stałej)

Składniki pożywki rozpuszczano w wodzie destylowanej i sterylizowano w 126°C, przez 11 minut, pod ciśnieniem 1,4 bar.

3.3.3. Hodowla drożdży

Hodowle wyprowadzano przez posiew komórek drożdży z banków glicerolowych na płytkę ze stałą pożywką YPD i inkubację przez 2 dni w 30°C. Następnie pojedynczą kolonię przenoszono do kolby Erlenmeyera (100 ml) zawierającej 20 ml płynnej pożywki YPD i hodowano w 30°C z wytrząsaniem (180 rpm), do osiągnięcia fazy stacjonarnej. Uzyskaną hodowlę przechowywano w temperaturze 4°C przez okres do 3 tygodni i wykorzystywano jako inokulum do zakładania hodowli eksperymentalnych. Wszystkie eksperymenty wykonywano w warunkach optymalnych, to znaczy w temperaturze 30°C z ciągłym wytrząsaniem (180 rpm). Wzrost hodowli monitorowano poprzez pomiar

gęstości optycznej przy długości fali 600 nm (OD_{600}) za pomocą spektrofotometru Eppendorf BioPhotometer 6131.

3.3.4. Przechowywanie drożdży

W celu przechowywania komórek, zawiesinę komórek drożdżowych hodowanych w płynnej pożywce YPD, mieszano w krioprobówkach ze sterylnym 30% roztworem glicerolu w stosunku 1:1 (o/o). Krioprobówki z materiałem zamrażano i przechowywano w -80°C .

3.3.5. Analiza CLS

Hodowlę rozpoczynano z inokulum w 50 ml pożywki YPD z dodatkiem FC w stężeniu końcowym 0,25, 0,5 lub 1 mM tak, by uzyskać wyjściową gęstość hodowli odpowiadającą $OD_{600} = 0,1$. W kolejnych dniach trwania eksperymentu, za pomocą cytometrii przepływowej, określano żywotność drożdży. W tym celu, rozpoczynając od 3 dnia, co drugi lub trzeci dzień, pobierano 100 μl zawiesiny komórek i odwirowywano przy $4000 \times g$ przez 5 min, następnie komórki przemywano dwukrotnie buforem DPBS, po czym inkubowano buforze DPBS zawierającym jodek propidyny (PI) w stężeniu końcowym 7,5 $\mu\text{g/ml}$ w 30°C przez 30 min w ciemności. Fluorescencję komórek analizowano za pomocą cytometru przepływowego FACSCalibur (BD), a uzyskane dane przy użyciu oprogramowania FlowJo (BD).

3.3.6. Analiza kinetyki wzrostu drożdży

W celu określenia wpływu FC na tempo wzrostu komórek drożdży, inokulum zaszczipiano na płynną pożywkę YPD i prowadzono hodowlę do osiągnięcia gęstości odpowiadającej $OD_{600} = 0,8$. Następnie, hodowlę rozcieńczano do gęstości odpowiadającej $OD_{600} = 0,1$ i dalej hodowano w obecności 0,25, 0,5 lub 1 mM FC. Krzywe wzrostu wykreślano poprzez kilkukrotne pomiary gęstości optycznej prowadzonych hodowli, aż do osiągnięcia fazy stacjonarnej.

3.3.7. Pomiary oddychania komórkowego

3.3.7.1. Przygotowanie komórek

Inokulum zaszczipiano na pożywkę YPD lub YPG i hodowano do osiągnięcia gęstości odpowiadającej $OD_{600} = 0,8$, po czym hodowlę przenoszono na świeżą pożywkę wzbogaconą o 1 mM FC i prowadzono całonocną hodowlę. Komórki zbierano przez

wirowanie przy $5000 \times g$ w 4°C przez 5 min, przemywano i zawieszano w buforze PBS. Mierzono gęstość otrzymanej zawiesiny. Komórki trzymano na lodzie.

3.3.7.2. Pomiar szybkości zużycia tlenu

Pomiar zużycia tlenu przez komórki drożdży prowadzono przy użyciu elektrody tlenowej Clarka (system Oxygraph+, Hansatech), w 1 ml odpowiedniej pożywki w termostatowanym naczyniu pomiarowym w temperaturze 30°C . Pomiaru właściwe poprzedzono kalibracją urządzenia z wykorzystaniem podsiarczynu sodu. Do naczynia pomiarowego podawano komórki w ilości odpowiadającej $\text{OD}_{600}/1\text{ml} = 1$ w przypadku pożywki YPG, bądź $\text{OD}_{600}/1\text{ml} = 4$ w przypadku pożywki YPD, i rozpoczynano rejestrację zużycia tlenu za pomocą oprogramowania Oxytrace+ (Hansatech). Po ustabilizowaniu oddychania podstawowego, do naczynia pomiarowego podawano kolejno $10 \mu\text{M}$ tributyllocyny (TBT; inhibitor syntazy ATP) oraz $3 \mu\text{M}$ FCCP (protonofor), w celu uzyskania odpowiednio stanu niefosforylującego (stan 4) i oddychania maksymalnego (stan U – ang. *uncoupled*; stan rozprężony). Prędkość zużycia tlenu w stanie fosforylującym (stan 3) obliczano jako różnicę pomiędzy stanem podstawowym, a stanem 4. Uzyskane wyniki normalizowano do 1 mg białka w próbie.

3.3.7.3. Pomiar stężenia białka

Bezpośrednio po pomiarze komórki zbierano, wirowano przy $5000 \times g$ w 4°C przez 5 min i przemywano buforem PBS. Osady zawieszano w roztworze zawierającym 100 U litykazy i 10 mM DTT i inkubowano w 30°C przez 30 min, a następnie lizowano przez trzykrotne zamrażanie w -80°C i rozmrażanie w 37°C . Uzyskane lizaty wirowano przy $8000 \times g$ w 4°C przez 5 min. Stężenie białka w supernatancie mierzono przy długości fali 280 nm za pomocą spektrofotometru NanoDrop 2000 UV/Vis.

3.3.8. Analiza właściwości antyoksydacyjnych FC

Analiza poziomu RFT

Drożdże hodowano w pożywce YPD lub YPG wzbogaconej o 0,25; 0,5 lub 1 mM FC przez noc. Następnie komórki odwirowywano przy $5000 \times g$ przez 5 min, przemywano dwukrotnie buforem DPBS, po czym inkubowano buforze DPBS zawierającym $10 \mu\text{M}$ diocjanu dihydrodichlorofluoresceiny ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$, ang. *2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate*) przez 30 min w ciemności. Poziom RFT w oparciu

o intensywność fluorescencji analizowano za pomocą cytometru przepływowego FACSCalibur, a uzyskane dane za pomocą oprogramowania FlowJo.

Analiza $\Delta\Psi_m$ w warunkach stresu oksydacyjnego

W celu oceny wpływu FC na mitochondria drożdży w warunkach indukowanego stresu oksydacyjnego, zastosowano dwa podejścia. W pierwszym (ochronne), drożdże hodowano w obecności 0,5 mM FC przez noc, a następnie traktowano nadtleniem wodoru (H_2O_2) w zakresie stężeń 1-10 mM przez 2 h. W drugim (regeneracyjne) podejściu, komórki traktowano H_2O_2 w zakresie stężeń 1-5 mM przez 2 h, a następnie komórki odwirowywano przy $5000 \times g$ przez 5 min, zawieszano w świeżej pożywce zawierającej 0,5 mM FC i inkubowano przez kolejną 1 h.

Komórki wirowano przy $5000 \times g$ przez 5 min, przemywano dwukrotnie buforem DPBS, po czym inkubowano w $30^\circ C$ w buforze DPBS zawierającym barwnik TMRE w stężeniu 180 nM przez 30 min w ciemności. Intensywność fluorescencji analizowano za pomocą cytometru przepływowego FACSCalibur i oprogramowania FlowJo.

Analiza żywotności w warunkach stresu oksydacyjnego

Analizę wpływu FC na żywotność komórek w warunkach indukowanego stresu oksydacyjnego badano przeprowadzając test przeżywalności na płytkach z pożywką stałą (ang. *spot assay*). W tym celu, drożdże hodowano w pożywce płynnej YPD lub YPG w obecności 1 mM FC przez noc, następnie mierzono gęstość optyczną hodowli, rozcieńczano do $OD_{600} = 1$ i indukowano stres oksydacyjny poprzez 2-godziną inkubację z 10 mM H_2O_2 . Następnie pobierano małą objętość zawiesiny komórkowej i dokonywano czterech kolejnych, 10-krotnych rozcieńczeń. Z każdego rozcieńczenia pobierano po 5 μl , nanoszono na płytkę z pożywką stałą YPD lub YPG, pozostawiano do wchłonięcia i inkubowano przez 2 dni w $30^\circ C$.

3.3.9. Analiza zmian potencjału błony mitochondrialnej

Drożdże hodowano w pożywce YPG, w obecności różnych stężeń FC w zakresie od 0,1 do 1 mM, przez noc. Następnie, komórki odwirowywano przy $5000 \times g$ przez 5 min, przemywano dwukrotnie buforem DPBS, po czym wybarwiano w 180 nM roztworze barwnika TMRE w DPBS, w $30^\circ C$ przez 30 min w ciemności. Potencjał błony mitochondrialnej analizowano na podstawie intensywności fluorescencji za pomocą cytometru przepływowego FACSCalibur i oprogramowania FlowJo.

3.3.10. Wizualizacja i analiza mikroskopowa

Analizy mikroskopowe przeprowadzono z wykorzystaniem laserowego mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP5 wyposażonego w laser światła białego (470-670 nm). Zdjęcia wykonywano przy użyciu obiektywu do imersji olejowej o powiększeniu 63x i aperturze 1,4 (HC PL APO 63x/1.4) oraz zastosowaniu 2- lub 2,7-krotnego powiększenia cyfrowego. Proces sekwencyjnego skanowania obrazu przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Leica LAS AF 2.7.3, natomiast analizę intensywności fluorescencji, wielkości komórek oraz dekonwolucję 3D zebranych obrazów za pomocą oprogramowania Leica LAS X 3.3.3. Wszystkie preparaty mikroskopowe przygotowywano w sposób analogiczny, tj. pobierano małą objętość zawiesiny komórkowej z hodowli, oddzielano od pożywki przez wirowanie ($10000 \times g/5 \text{ min}$) i przepłukiwano dwukrotnie roztworem DPBS (500 μl), a następnie w zależności od analizy przeprowadzono barwienia wykorzystując odpowiednie barwniki i sondy fluorescencyjne. Wyznakowane komórki drożdży umieszczano na szkiełkach podstawowych które uprzednio pokrywano roztworem konkanawaliny A w stężeniu 0,2 mg/ml. Konkanawalina A jest lektyną wiążącą reszty cukrowe obecne w ścianie komórkowej drożdży, co umożliwia ich skuteczne unieruchomienie na szkiełkach i poprawę jakości preparatów. Następnie, na tak przygotowane szkiełko, nanoszono 2-5 μl zawiesiny wybarwionych komórek, przykrywano szkiełkiem nakrywkowym, którego brzegi zabezpieczano przed wysuszeniem.

Analiza żywotności w dniu 14 CLS

W celu mikroskopowej analizy liczebności komórek żywych i martwych w 14 dniu analizy CLS, zastosowano podwójne barwienie barwnikiem Hoechst 33342 i jodkiem propidyny w stężeniach odpowiednio 10 $\mu\text{g/ml}$ i 7,5 $\mu\text{g/ml}$ przez 15 min w 30°C. Sekwencyjnie skanowane obrazy zbierano przy długości fali wzbudzenia/emisji 405/435-480 nm dla komórek żywych (Hoechst 33342, niebieski) oraz 543/585-640 nm dla komórek martwych (jodek propidyny, czerwony).

Analiza $\Delta\Psi_m$, obecności bruzd i wielkości komórek w dniu 14 CLS

Analizę $\Delta\Psi_m$ oraz zobrazowanie bruzd podziałowych w 14 dniu analizy CLS, wykonano stosując podwójne znakowanie barwnikiem TMRE w stężeniu 180 nM przez 30 min oraz koniugatem aglutyniny z zarodka pszenicy (WGA, ang. *wheat germ agglutinin*) z fluoroforem AlexaFluor 488 (Invitrogen, Waltham, MA, USA) w stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$ przez 45 min w 30°C. Bruzdy podziałowe drożdży zbudowane są z chityny bogatej w reszty N-acetyloglukozaminy, do której selektywnie wiąże się WGA. Sekwencyjnie skanowane obrazy zbierano przy długości fali wzbudzenia/emisji 488/500-560 nm dla fluorescencji zielonej (bruzdy) oraz 543/570-610 nm dla fluorescencji czerwonej ($\Delta\Psi_m$). Obrazy finalne składano z serii skanów optycznych wykonanych w osi Z (ang. *Z-stack*). Analizę intensywności fluorescencji i wielkości komórek, przeprowadzono przez manualne wyznaczenie regionów zainteresowania (ROI, ang. *region of interest*).

Analiza $\Delta\Psi_m$

W celu analizy zmian $\Delta\Psi_m$, po 24 h inkubacji w obecności FC, drożdże barwiono barwnikiem TMRE w stężeniu 180 nM przez 30 min w 30°C. Sekwencyjnie skanowane obrazy zbierano przy długości fali wzbudzenia/emisji 543/570-610 nm. Obrazy finalne składano z serii skanów optycznych wykonanych w osi Z. Analizę intensywności fluorescencji komórek przeprowadzono z zastosowaniem funkcji ROI.

3.3.11. Analiza zmian ekspresji wybranych genów

W celu analizy zmian w poziomie ekspresji genów *Ccs1*, *Ecl1*, *Fob1*, *Gtr1*, *Hap4*, *Rim15*, *Sch9* i *Sod2* we wczesnej fazie stacjonarnej, inokulum przeszczepiano na 25 ml płynnej pożywki YPD i hodowano przez ok. 8 godzin. Z uzyskanej hodowli pobierano 1 ml zawiesiny i przenoszono do 10 ml świeżej pożywki YPD zawierającej 0,5 lub 1 mM FC, i hodowano przez ok. 16 godzin. Następnie, pobierano po 2 ml hodowli i oddzielano komórki od pożywki przez wirowanie przy 4000 \times g przez 5 min. Osady natychmiast zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C do czasu izolacji. Przygotowanie prób, izolację RNA, odwrotną transkrypcję oraz PCR w czasie rzeczywistym, przeprowadzono jak opisano w rozdziale 3.5. Startery zastosowane w analizie przedstawiono w tabeli 2 (rozdział 3.5.6).

3.4. Model myszy

3.4.1. Zwierzęta doświadczalne

W doświadczeniach wykorzystano czarne myszy laboratoryjne (*Mus musculus*), samce szczepu wsobnego C57BL/6J, pozyskane z Charles River Laboratories (Francja). Pula myszy wykorzystanych w badaniach obejmowała 160 samców podzielonych na grupy ze względu na wiek eksperymentalny i podawany związek (tab. 1).

Wszystkie doświadczenia na zwierzętach wykonano zgodnie z procedurami zatwierdzonymi przez Lokalną Komisję Etyczną (LKE) w Poznaniu (zgoda nr 63/2018).

3.4.2. Hodowla zwierząt

Zwierzęta hodowano w Zwierzętarni Centrum Zaawansowanych Technologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, w pomieszczeniach bytowych o ściśle określonych, stałych warunkach, tj. temperaturze $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, wilgotności powietrza 55-60%, w cyklu dobowym z fazą aktywną (ciemną) między godziną 7:00 a 19:00. Zwierzęta trzymano po maksymalnie 5 osobników w wentylowanych klatkach o powierzchni 55 cm^2 , z nieograniczonym dostępem do wody pitnej i pożywienia (*ad libitum*).

3.4.3. Podział na grupy i plan eksperymentu

Myszy zostały podzielone na 4 grupy liczące po 30 osobników. Dwóm grupom podawano rozpuszczaną w czystej wodzie pitnej FC w dawkach: 0,05 mg/g masy ciała/dzień (grupa FC1) oraz 0,1 mg/g masy ciała/dzień (grupa FC2), a jednej kinetynę w dawce 0,0027 mg/g masy ciała/dzień. Odważoną ilość kinetyny rozpuszczano w 500 μl 99,5% kwasu octowego i dodawano do końcowej objętości czystej wody pitnej (1750 ml). Grupie kontrolnej podawano czystą wodę pitną. Ilość związków obliczano na podstawie średniej masy ciała wszystkich osobników w grupie. Wszystkie grupy zestawiono w tabeli 1. Podawanie związków z wodą pitną rozpoczęto w 14. miesiącu życia zwierząt (wiek średni) i kontynuowano do 20. miesiąca życia (wiek starczy, 6 miesięcy suplementacji związkami), wymieniając wodę ze związkami raz w tygodniu. Przez cały okres trwania eksperymentu monitorowano ilość wypijanej wody oraz co dwa tygodnie ważono zwierzęta. Po zakończeniu suplementacji, zwierzęta poddawano analizie składu ciała i testom behawioralnym, terminowano i pobierano tkanki do dalszych analiz.

Dodatkowe grupy kontrolne, liczące po 20 osobników, stanowiły myszy w wieku 6 i 12 miesięcy (grupy K6 i K12).

Tabela 1. Podział myszy na grypy eksperymentalne.

Grupa	Wiek [mies.]		Liczba osobników (N)	Średnia masa ciała [g]	Podawany związek	Dawka/dzień [mg/g]
	Rozpoczęcie	Zakończenie				
K/K20	14	20	30	34,62 ± 3,8	---	---
FC1	14	20	30	34,41 ± 2,2	FC	0,05
FC2	14	20	30	34,94 ± 2,0	FC	0,1
Kin	14	20	30	37,55 ± 2,3	Kinetyna	0,0026
K6	6	6	20	27,72 ± 1,5	---	---
K12	12	12	20	31,55 ± 1,8	---	---

3.4.4. Testy behawioralne

3.4.4.1. Test prętów statycznych (staticrod)

Test prętów statycznych (ang. *staticrod*) przeprowadzono wykorzystując system 4 drewnianych prętów o długości 60 cm i średnicy 35, 25, 21 i 17 mm, umieszczonych na specjalnej półce, 60 cm nad podłogą. Powierzchnia pod prętami zabezpieczona została materacem amortyzującym ewentualne upadki, a półka wyłożona ściółką jako elementem zachęcającym dla myszy. Zwierzę umieszczano na wolnym końcu pręta, w kierunku przeciwnym do celu (półki). Mierzono czas obrotu zwierzęcia oraz czas przejścia przez pręt do celu. Test przeprowadzano w dwóch następujących po sobie dniach. Pierwszy pręt (35 mm), traktowano jako treningowy i nie uwzględniano go w analizie.

3.4.4.2. Test bieżni obrotowej (rotarod)

Test bieżni obrotowej (ang. *rotarod*) przeprowadzono na aparacie Rotarod, umieszczając badanego osobnika na bieżni automatycznie obracanej, z płynnym przyspieszeniem od 4 do 40 rpm, zgodnie z ruchem obrotów. Przyspieszenie wprowadzano po około 10 s od momentu umieszczenia myszy na bieżni. Wykonywano pomiar czasu utrzymywania się zwierzęcia na bieżni, przy czym za wynik maksymalny uznawano 300 s. Test przeprowadzono w trzech podejściach, z zachowaniem min. 1 h przerwy na odpoczynek pomiędzy seriami, w trzech następujących po sobie dniach. Pierwsze dwa dni uznawano za dni treningowe, a do oceny koordynacji ruchowej i odporności na zmęczenie brano pod uwagę rezultaty z trzeciego dnia. Wyniki ze wszystkich trzech dni posłużyły do analizy zdolności uczenia się zwierzęcia.

3.4.4.3. Test siły chwytu

Siłę chwytu (ang. *grip strength*) myszy mierzono za pomocą urządzenia składającego się z metalowej, liczącej 5 szczebli drabinki, podłączonej do rejestratora siły działającej na drabinkę. Zwierzę chwytało w pobliżu nasady ogona, pozwalano na chwyt pierwszego szczebla, a następnie płynnym ruchem przeciągano przez kolejne szczeble drabinki. Rejestrowano siłę, z jaką zwierzę chwyciło poszczególne szczeble. Test wykonywano w 7 kolejnych powtórzeniach, dwa pierwsze traktując jako trening. Wyniki z pięciu kolejnych powtórzeń uśredniano i poddawano analizie.

3.4.4.4. Test zlewkowy

W celu oceny skłonności myszy do eksploracji, wykonywano test zlewkowy. W tym celu, mysz umieszczano w przezroczystej, szklanej zlewce o objętości 1 l i wymiarach około 11 × 14 cm, w miejscu wolnym od elementów mogących rozpraszac mysz. W trakcie 3 minut trwania testu, liczono liczbę ruchów pionowych myszy, podczas których mysz stoi wyłącznie na tylnych kończynach, a przednimi opiera się o ścianę zlewki.

3.4.4.5. Test aktywności lokomotorycznej przy użyciu klatki ActiMot

Ocenę aktywności lokomotorycznej w trzech wymiarach (oś X-Y-Z) przeprowadzono przy użyciu klatki ActiMot (TSE Systems Inc.). Pojedyncze zwierzę umieszczano w klatce i przez kolejne 24 godziny rejestrowano aktywność lokomotoryczną oraz eksplorację terenu za pomocą wbudowanej w klatkę trójwymiarowej siatki czujników opartych o światło podczerwone, umożliwiającej wykrywanie ruchów poziomych (przebyty dystans, szybkość) i pionowych (eksploracja) z wysoką rozdzielczością przestrzenną i czasową. Na podstawie zebranych danych analizowano aktywność zwierzęcia za dnia i w nocy.

3.4.5. Analiza składu ciała

Analizie składu ciała poddano 10 losowo wybranych osobników z każdej grupy eksperymentalnej przy użyciu analizatora laboratoryjnego Bruker MiniSpec LF 90 II działającego w oparciu o technologię rezonansu magnetycznego TD-NMR (NMR w domenie czasu). Badanie przeprowadzono we współpracy z prof. dr hab. Agatą Chmurzyńską z Katedry Żywienia Człowieka i Dietetyki Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Przeprowadzona analiza pozwoliła na określenie masy tkanki tłuszczowej oraz mięśniowej badanych osobników. Ponadto, dane posłużyły do wyznaczenia stosunku masy mięśniowej [mg] do całkowitej masy ciała [g].

3.4.6. Uśmiercanie zwierząt i pobranie tkanek

Myszy uśmiercano poprzez podanie środka znieczulającego – izofluranu w dawce powyżej 5%. Po uśpieniu zwierzęcia sprawdzano brak odruchów testem refleksu kończyn, świadczący o stanie głębokiej anestezji, a następnie otwierano powłoki ciała od strony brzusznej, pobierano krew przezsercowo oraz mocz bezpośrednio z pęcherza. W celu dalszej izolacji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC, ang. *peripheral blood mononuclear cell*), krew z części osobników pobierano do probówek z heparyną sodową (BD) jako antykoagulantem. Krew pobraną od pozostałych osobników przenoszono do probówek typu Eppendorf i pozostawano na godzinę w celu naturalnej koagulacji, następnie wirowano przez 10 min przy 3000 rpm, a uzyskaną surowicę zachowywano do analiz biochemicznych. W kolejnym etapie pobierano organy: mózg, serce, wątrobę, nerki, śledzionę oraz fragment mięśnia szkieletowego kończyny dolnej (łydka). W przypadku części osobników przeprowadzono selektywną dysekcję mózgu w celu wyodrębnienia kory mózgowej, prążkowiec, hipokampu, międzymózgowia i mózdzku. Pobrane organy i tkanki natychmiast mrożono w ciekłym azocie, a następnie przechowywano w -80°C do czasu dalszych analiz.

3.4.7. Homogenizacja tkanek

Fragmenty głęboko mrożonej tkanki homogenizowano przy użyciu homogenizatora kulowego TissueLyser II (QIAGEN), w wymrożonych w -80°C adaptorach, przeprowadzając dwa cykle homogenizacji z częstotliwością 30 Hz przez 30 s. Procedurę przeprowadzano utrzymując stan głębokiego zamrożenia tkanki. Sproszkowane tkanki przechowywano w -80°C do dalszych analiz.

3.4.8. Oznaczanie obecności FC w mózgu

Niewielką ilość zhomogenizowanej tkanki (około 50 mg; rozdział 3.4.7) pobierano do probówki typu eppendorf i sonikowano na lodzie w 60% metanolu, w 3 cyklach po 15 s, przy 75% amplitudzie drgań fal dźwiękowych za pomocą urządzenia Vibra-Cell™ (Sonics & Materials, Inc.), zachowując 1 min przerwy między cyklami. Następnie wirowano przy $10000 \times g$ przez 5 min w 4°C , supernatant przenoszono do nowej probówki i osuszano za pomocą urządzenia Eppendorf 5301 Vacufuge Concentrator. Analizę obecności FC w uzyskanych osadach przeprowadzano za pomocą wysokorozdzielczej spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) w Pracowni NRM Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN.

3.4.9. Analiza parametrów biochemicznych krwi

Uzyskaną surowicę krwi poddawano analizie biochemicznej, w celu oznaczenia stężenia glukozy, kreatyniny, cholesterolu całkowitego oraz lipoprotein o wysokiej (HDL) i niskiej (LDL) gęstości. Oznaczenia zostały wykonane w laboratorium analitycznym Zwierzętarni Centrum Zaawansowanych Technologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

3.4.10. Oznaczenie markerów CD4/CD8

3.4.10.1. Izolacja PBMC

Izolację PBMC przeprowadzano wg protokołu:

- krew pobraną do probówek z heparyną sodową (około 1 ml) rozcieńczano w stosunku 1:1 z buforem DPBS i mieszano przez łagodne odwracanie probówki
- na dno 5 ml probówki typu Eppendorf pipetowano 3 ml odczynnika Histopaque-1077 (Sigma) tak, by uniknąć zbędnego kontaktu ze ścianką probówki
- rozcieńczoną krew (około 2 ml) ostrożnie наносono na odczynnik Histopaque-1077 tak, by uniknąć mieszania się warstw
- wirowano przy $350 \times g$ przez 30 min w temperaturze pokojowej, z wyłączoną opcją hamowania rotora, w celu rozdzielenia składników krwi
- zbierano osocze (górną warstwę) i przechowywano w -80°C do dalszych analiz
- ostrożnie zbierano zawierającą PBMC interfazę tak, by nie pobrać odczynnika Histopaque znajdującego się poniżej
- dodawano 3 ml buforu DPBS i wirowano przy $350 \times g$ przez 8 min
- supernatant odrzucano, a osad komórkowy przemywano 3 ml DPBS, wirowano przy $350 \times g$ przez 8 min
- supernatant odrzucano, a osad komórkowy przemywano 3 ml DPBS, wirowano przy $100 \times g$ przez 10 min
- oczyszczone komórki PBMC niezwłocznie znakowano immunofluorescencjnie w celu analizy cytometrycznej

3.4.10.2. Znakowanie PBMC i analiza cytometryczna

Subpopulacje limfocytów z wyizolowanych PBMC oznaczano za pomocą cytometrii przepływowej. Zastosowano przeciwciała skierowane przeciwko powierzchniowym antygenom różnicowania komórkowego (CD, ang. *cluster of differentiation*), w celu oznaczenia całkowitej populacji limfocytów T (komórki CD3+) oraz populacji limfocytów T pomocniczych (CD3+/CD4+) i cytotoksycznych (CD3+/CD8+). Znakowanie PBMC wykonywano bezpośrednio po izolacji. Komórki dwukrotnie przemywano 200 μ l buforu Gabi (BD), a następnie barwiono w 50 μ l buforu z dodatkiem 0,5 μ l odczynnika Fc Block™ (BD) oraz przeciwciał w odpowiednim rozcieńczeniu: CD3-FITC (1:10), CD4-APC (1:20) i CD8-PerCP (1:100) przez 30 min na lodzie. Następnie komórki wirowano przy $300 \times g$ w $4^{\circ}C$ przez 5 min i analizowano za pomocą cytometru przepływowego FACSCallibur (BD).

3.5. Analizy z wykorzystaniem PCR w czasie rzeczywistym

3.5.1. Izolacja RNA

Izolację RNA z drożdży przeprowadzano w sposób następujący: bezpośrednio przed izolacją, w celu strawienia ściany komórkowej drożdży, osady zawieszano w roztworze zawierającym 100 U litykazy i 10 mM DTT, i inkubowano w $30^{\circ}C$ przez 30 min. Uzyskane sferoplasty wirowano przy $3000 \times g$ przez 5 min w $4^{\circ}C$, a następnie lizowano w obecności 1 ml odczynnika Extrazol (Blirt) przy jednoczesnym, kilkukrotnym pipetowaniu. Inkubowano przez 5 min w temperaturze pokojowej.

Następnie izolowano RNA wg standardowego protokołu:

- Do lizatów dodawano 200 μ l chloroformu, energicznie wytrząsano i inkubowano przez ok. 3 min w temperaturze pokojowej
- Wirowano przy $12000 \times g$ przez 15 min w $4^{\circ}C$, w celu separacji faz
- Górną fazę wodną zbierano, przenoszono do nowych probówek i wytrącano z niej RNA poprzez dodanie 500 μ l izopropanolu. Próby inkubowano przez 10 min na lodzie
- Wirowano przy $12000 \times g$ przez 10 min w $4^{\circ}C$
- Supernatant odrzucano, osady przemywano 1 ml zimnego 75% etanolu
- Wirowano przy $7500 \times g$ przez 5 min w $4^{\circ}C$
- Supernatant odrzucano, osady suszono i rozpuszczano w ddH₂O

3.5.2. Analiza ilościowa i jakościowa RNA

Stężenie uzyskanego roztworu RNA mierzono przy długości fali 260 nm za pomocą spektrofotometru NanoDrop 2000 UV/Vis. Jakość preparatów oceniano poprzez rozdział elektroforetyczny w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem odczynnika SybrTM Safe DNA gel stain (Sigma). Do kieszonek nakładano 1 µg RNA w objętości 10 µl wody wolnej od nukleaz i dodatkiem 2 µl bufor obciążającego 6x (A&A Biotechnology). Rozdział prowadzono w buforze TBE, przy natężeniu 75 mA i napięciu 300 V przez 30 min. Jakość RNA oceniano przy użyciu aparatu Azure c600 (Azure Biosystems).

3.5.3. Oczyszczanie RNA z zanieczyszczeń DNA

Uzyskane preparaty RNA oczyszczano z pozostałości DNA poprzez trawienie DNazą I przy pomocy zestawu DNA-free DNA Removal Kit (Invitrogen), według protokołu:

- Przygotowywano próby RNA o stężeniu 5 µg na 49 µl
- Dodawano 5,5 µl buforu do DNazy oraz 1 µl DNazy I. Próby inkubowano przez 25 min w 37°C
- DNazę inaktywowano poprzez dodanie 5,5 µl DNase inactivation reagent i inkubowano przez 3 min w temperaturze pokojowej
- Wirowano przy 10000 × g przez 1,5 min
- Supernatant, zawierający RNA, przenoszono do świeżej próbówki

3.5.4. Odwrotna transkrypcja

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono przy użyciu zestawu odczynników Transcriptor First-Strand cDNA Synthesis Kit (Roche). W tym celu, z oczyszczonego materiału RNA pobierano objętość odpowiadającą 500 ng RNA i przeprowadzano reakcję z wykorzystaniem starterów w postaci losowych sekwencji heksamerowych, zgodnie z zaleceniami producenta. Uzyskany cDNA (ang. *complementary DNA*) wykorzystywano jako matrycę w dalszej analizie PCR w czasie rzeczywistym (rozdział 3.5.5).

3.5.5. Analiza zmian ekspresji genów oraz stosunku mtDNA:nDNA

Wpływ FC na zmiany ekspresji wybranych genów oraz stosunek mitochondrialnego DNA (mtDNA) do jądrowego DNA (nDNA) analizowano metodą łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR) przy użyciu termocyklera LightCycler 480 II (Roche), sond fluorescencyjnych UPL (UPL Probes, Roche) i zestawu odczynników LightCycler 480 probe master (Roche) na 96-dołkowych płytkach. Startery specyficzne dla każdego genu zaprojektowano za pomocą oprogramowania ProbeFinder (Roche) i zostały przedstawione w Tabeli 2. Mieszanki reakcyjne przygotowywano zgodnie z zaleceniami producenta. Reakcje przeprowadzano w następujących warunkach:

Temperatura	Czas	Liczba cykli
94°C	10 min	1
94°C	0:15 min	45
60°C	0:30 min	
72°C	0:15 min	
40°C	2 min	1

Względny poziom zmiany ekspresji badanych genów obliczano przy użyciu oprogramowania Roche LightCycler 480 Software i normalizowano względem genów referencyjnych (tab. 2). Krzywe wzorcowe uzyskano przez amplifikację serii dwukrotnych rozcieńczeń cDNA.

Stosunek mtDNA:nDNA w komórkach inkubowanych z FC i kontrolnych, obliczano na podstawie wartości Ct wg wzoru:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{komórki inkubowane z FC}) - \Delta Ct(\text{komórki kontrolne})$$

Gdzie:

$$\Delta Ct = Ct(mtDNA) - Ct(nDNA)$$

3.5.6. Startery zastosowane w analizach

Tabela 2. Lista starterów używanych do analizy PCR w czasie rzeczywistym.

Model komórkowy			
Gen	Starter przedni (5'-3')	Starter wsteczny (5'-3')	UPL
COX1 (mtDNA)	CGCATGAGCTGGAGTCCTAG	CAAATGCATGGGCTGTGACG	20
ND2 (mtDNA)	TAAACTCCAGCACCACGACC	CAAAAAGCCGGTTAGCGGG	55
HK2 (nDNA)	TGGTGTTAGGAAAGTCGCC	CCACAGGCATCATGGTCCC	76
Model drożdżowy			
Gen	Starter przedni (5'-3')	Starter wsteczny (5'-3')	UPL
CCS1	TGAACCACCCAGAAAACGA	GCAATGACTCCAGAAATGAG	69
ECL1	AATAAGTTATATTGCTCCGAAGATTGT	TTTTATGCAAGTGGGATAATAATTCT	161
FOB1	CGAAACGTAAACCTGTGCAA	CTCTCTTAGTCTCAAACCTGGCATT	85
GTR1	AAGATGGATCTTGTTCAGTTGGA	CAGGTTTTTCATCATGATTGG	17
HAP4	TCAGGATGAAAGCGCTGATT	AGCCAAAGTGATTTCTGAACCT	9
RIM15	TTCCCTCCTTGATATTCTCG	TCGAATTGTGGGATTGCT	63
SCH9	TTGGGATCTCACTCGGAATTA	GGATACAGTCTAACTTGGCCTAAGAA	44
SOD2	AAACCACTGTCTATTCTGGGAAA	CTCGTCGATTGCCTTTC	36
ACT1*	TTCCAGATGGTCAAGTCATCA	AAACAGAAGGATGGAACAAAGC	45
ALG9*	CAAGAGCATGCTTAGGCTTTTT	CCCGGATTAACAATTGGAA	27
TAF10*	GAGGAGATTCTAGAGATGATGGACA	AGTCTATTACTGCATCGGGAATG	63
TFC1*	CTCAAATGCCATAGAGGAGGA	TGGCGCCATTATCATCAA	9
UBC6*	AGGCTCACAAGAGATTGACGA	GGGCGAGCAAGAATATATGG	31

*Geny referencyjne

3.6. Izolacja DNA

- Skład buforu lizującego:

100 mM NaCl

10 mM EDTA

0,5% SDS

20 mM Tris-HCl (pH 7,4)

Przygotowanie materiału:

- Linie komórkowe: Komórki lizowano bezpośrednio na dołkach hodowlanych w 600 µl buforu lizującego z dodatkiem proteinazy K (0,3 mg/ml) przez 1 h w 55°C.

- Tkanki mysie: Niewielką ilość zhomogenizowanej tkanki (około 10 mg; rozdział 3.4.7) pobierano do probówki typu eppendorf i poddawano lizie w 600 μ l buforu lizującego z dodatkiem proteinazy K (0,3 mg/ml) przez 3 h w 55°C.

Protokół izolacji:

- Lizaty inkubowano w 95°C przez 5 min w celu inaktywacji proteinazy K.
- Usuwano RNA poprzez inkubację z RNazą A o stężeniu końcowym 50 μ g/ml w 37°C przez 30 min.
- Białka strącano za pomocą 300 μ l 7,5 M octanu amonu i wirowano przy 15000 \times g przez 15 min.
- W celu wytrącania DNA, do supernatantu dodawano 630 μ l izopropanolu i wirowano przy 15000 \times g przez 15 min.
- Uzyskany osad DNA przemywano 1 ml zimnego 70% etanolu i wirowano przy 15000 \times g przez 10 min w 4°C.
- Osad suszono i rozpuszczano w H₂O.

3.7. Hydroliza DNA

Hydrolizę DNA przeprowadzano wg protokołu:

- DNA rozpuszczano w 200 μ l buforu reakcyjnego (40 mM octan sodu; 0,1 mM ZnCl₂; pH 5,3) i dodawano 10 μ l roztworu nukleazy P1 (3 μ g/ μ l).
- Inkubowano przez 3 h w 37°C.
- Dodawano 30 μ l 1 M Tris-HCl, pH 8,0 i 5 μ l roztworu 1,5 U fosfatazy alkalicznej
- Inkubowano przez 1 h w 37°C.
- Hydrolizat DNA filtrowano przy użyciu filtrów o punkcie odcięcia 10 kDa (Amicon®, Merck).

3.8. Izolacja białka

Izolację białka z tkanki mięśni szkieletowych myszy przeprowadzano według schematu:

- Niewielką ilość zhomogenizowanej tkanki (ok. 30 mg) zawieszano w 1 ml buforu PBS
- Próby sonikowano na lodzie w 3 cyklach po 15 s, przy 75% amplitudzie drgań fal dźwiękowych za pomocą urządzenia Vibra-Cell™ (Sonics & Materials, Inc.), zachowując 1 min przerwy między cyklami
- Wirowano przy $12000 \times g$, w $4^{\circ}C$ przez 10 min
- Stężenie białka w supernatancie mierzono metodą Bradforda (rozdział 3.9)

3.9. Pomiar stężenia białka metodą Bradforda

Na 96-dołkową płytkę nanoszono 5 μ l próbki, a następnie dodawano 250 μ l odczynnika Bradforda. Całość inkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej i mierzono absorbancję przy długości fali $\lambda 595$ nm, za pomocą czytnika płytek VICTOR Nivo 5S (PerkinElmer). Stężenie białka odczytywano na podstawie krzywej wzorcowej, otrzymanej stosując rozcieńczenia roztworu BSA w zakresie 30-2000 μ g/ml.

3.10. Procedury z wykorzystaniem HPLC

3.10.1. Oznaczanie zawartości 8-oksoguanozyny metodą HPLC-UV-ED

Zawartość 8-oxodG w hydrolizatach DNA oznaczano metodą HPLC-UV z detekcją elektrochemiczną (1260 Diode Array Detector oraz Coulochem III Electrochemical Detector, ESA, Inc.). Rozdział hydrolizatów przeprowadzano na kolumnie Poroshell-120 (EC-C18 2,7 μ m) w roztworze octan amonu (50 mM, pH 5,3)/metanol w stosunku 93:7 (o/o). Detekcję guanozyny (dG) przeprowadzano przy długości fali 260 nm, z kolei 8-oxodG oznaczano przy następujących ustawieniach detektora elektrochemicznego: +130 mV dla detektora 1 (elektroda przesiewowa) oraz +350 mV dla detektora 2 (elektroda pomiarowa) oraz czułości 100 nA/V. Całkowitą zawartość 8-oxodG w genomie obliczano stosując wzór opisany w publikacji [200].

3.10.2. Oznaczanie zawartości 5-mdC metodą HPLC-ESI/MS

Zawartość 5-mdC w hydrolizatach DNA oznaczano metodą HPLC-UV z detekcją masową (6120 Quadrapole LC/MS, Agilent). Rozdział hydrolizatów przeprowadzano na kolumnie Poroshell-120 w temperaturze 37°C w roztworze 0,1% kwasu mrówkowego/metanolu w stosunku 95:5 (o/o). W procesie obserwacji MS wykorzystano źródło ESI, analizator masy pułapki jonowej z kwadrupolem. Procentową zawartość 5-mdC w genomie obliczano stosując wzór $5\text{-mdC} [\%] = (5\text{-mdC/dG}) \times 100$.

3.11. Oznaczanie poziomu karbonylacji białek

Poziom karbonylacji białek (PCO, ang. *protein carbonyls*) w próbach oznaczano metodą kolorymetryczną z wykorzystaniem 2,4-dinitrofenylohydrazyny (DNPH, 10 mM w 2 N HCl), według protokołu [201]:

- W celu usunięcia kwasów nukleinowych, do prób białka o stężeniu 1 mg/ml dodawano streptomycynę w stężeniu końcowym 1% i inkubowano przez 15 min. Wirowano przy $15000 \times g$ przez 5 min w 4°C.
- Do 500 μ l próby dodawano 100 μ l 10 mM DNPH i inkubowano 1 h z wytrząsaniem (300 rpm).
- Dodawano 600 μ l zimnego 20% kwasu trichlorooctowego (TCA) i inkubowano 10 min na lodzie.
- Wirowano przy $10000 \times g$ przez 5 min w 4°C.
- Osad przemywano 1 ml 10% TCA, wirowano przy $10000 \times g$ przez 5 min w 4°C.
- Osad przemywano 1 ml roztworu etanol:octan etylu (1:1), wirowano przy $10000 \times g$ przez 5 min w 4°C.
- Powtarzano przemywanie osadu roztworami TCA i etanol:octan etylu.
- Osad osuszano przy pomocy pompy próżniowej i rozpuszczano w 500 μ l 6 M chlorowodoru guanidyny.
- Po 200 μ l próby nakładano na płytkę 96-dołkową w dwóch powtórzeniach. Pozostałą część rozcieńczano podwójnie i mierzono stężenie białka metodą Bradforda (rozdział 3.9).

- Absorbancję odczytywano przy długości fali $\lambda 366$ nm za pomocą czytnika płytek VICTOR Nivo 5S (PerkinElmer).
- Stężenie PCO obliczano ze wzoru:

$$\text{PCO} \left[\frac{\text{nmol}}{\text{mg białka}} \right] = \frac{[10^6 \times (\frac{\text{Abs}_{366\text{nm}}}{22000 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}})]}{\text{białko} \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right]}$$

3.12. Oznaczanie poziomu peroksydacji lipidów

Poziom peroksydacji lipidów w próbach moczu, osocza krwi i mięśni określano poprzez kolorymetryczne oznaczanie stężenia substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS), wg protokołu:

Przygotowanie materiału:

- Mocz: próby rozcieńczano 100-krotnie wodą destylowaną i wirowano przy $12000 \times g$. Stężenie TBARS oznaczano w supernatancie.
- Osocze krwi: do oznaczeń pobierano 100 μl osocza w dwóch powtórzeniach.
- Tkanka mięśniowa: około 20 mg zhomogenizowanej tkanki zawieszano w 250 μl buforu lizującego (rozdział 3.6) z dodatkiem 1 mM DTT. Próby sonikowano na lodzie w 2 cyklach po 15 sek., przy 75% amplitudzie drgań fal dźwiękowych za pomocą urządzenia Vibra-Cell™ (Sonics & Materials, Inc.), zachowując 1 min przerwy między cyklami. Następnie wirowano przy $12000 \times g$, w 4°C przez 10 min. Pobierano 10 μl supernatantu do oznaczenia stężenia białka oraz 100 μl do analizy stężenia TBARS, w dwóch powtórzeniach.

Kolorymetryczne oznaczenie stężenia TBARS:

- Do 100 μl próbki dodawano 100 μl 20% kwasu trichlorooctowego (TCA) i inkubowano przez 15 min na lodzie.
- Próby wirowano przy $10000 \times g$ przez 15 min w 4°C .
- 200 μl supernatantu przenoszono do świeżej probówki i dodawano 100 μl 1% kwasu tiobarbiturowego (TBA).
- Inkubowano w 95°C przez 20 min.

- Próby chłodzono na lodzie. Po 150 μ l przenoszono na płytkę 96-dołkową w dwóch powtórzeniach.
- Odczytywano absorbancję przy długości fali λ 532 nm za pomocą czytnika płytek VICTOR Nivo 5S (PerkinElmer).
- Stężenie TBARS odczytywano względem krzywej standardowej sporządzonej z rozcieńczeń 1,1,3,3-tetrametoksypropanu (MDA).
- W przypadku prób osocza krwi ekstraktów z mięśni, wynik normalizowano do 1 mg białka.
-

3.13. Analiza statystyczna

Większość analiz statystycznych zebranych danych przeprowadzono za pomocą programu GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software). Analizę statystyczną danych proteomicznych przeprowadzono za pomocą programu R 4.3.2 (The R Foundation for Statistical Computing). W pierwszym kroku przeprowadzono analizę statystyczną opisową, w celu uzyskania wartości średniej, mediany i odchylenia standardowego (SD, ang. *standard deviation*). Zgodność rozkładu analizowanych zmiennych z rozkładem normalnym testowano za pomocą testu Shapiro-Wilka. Homogeniczność wariancji oceniano za pomocą testu Browna-Forsythea. W zależności od liczby porównywanych grup oraz spełnionych założeń (liczność prób, normalność rozkładu, homogeniczność wariancji), przeprowadzano odpowiednie testy porównawcze pomiędzy grupami. W celu porównania średnich pomiędzy dwoma grupami o rozkładzie normalnym i homogenicznej wariancji stosowano test t-Studenta dla prób niezależnych. W przypadku trzech lub więcej grup stosowano analizę wariancji (ANOVA). W przypadku otrzymania istotnej wartości współczynnika F , przeprowadzano testy post-hoc: do porównania średnich pomiędzy wszystkimi parami w badaniu stosowano test Tukeya (homogeniczność wariancji) lub T2 Tamhane'a (heterogeniczność wariancji); do porównania średnich grup badanych względem grupy kontrolnej stosowano test Dunnetta (homogeniczność wariancji) lub test T3 Dunnetta (heterogeniczność wariancji). Dla każdego testu statystycznego, za istotne uznawano wartości $p < 0,05$.

4. Wyniki

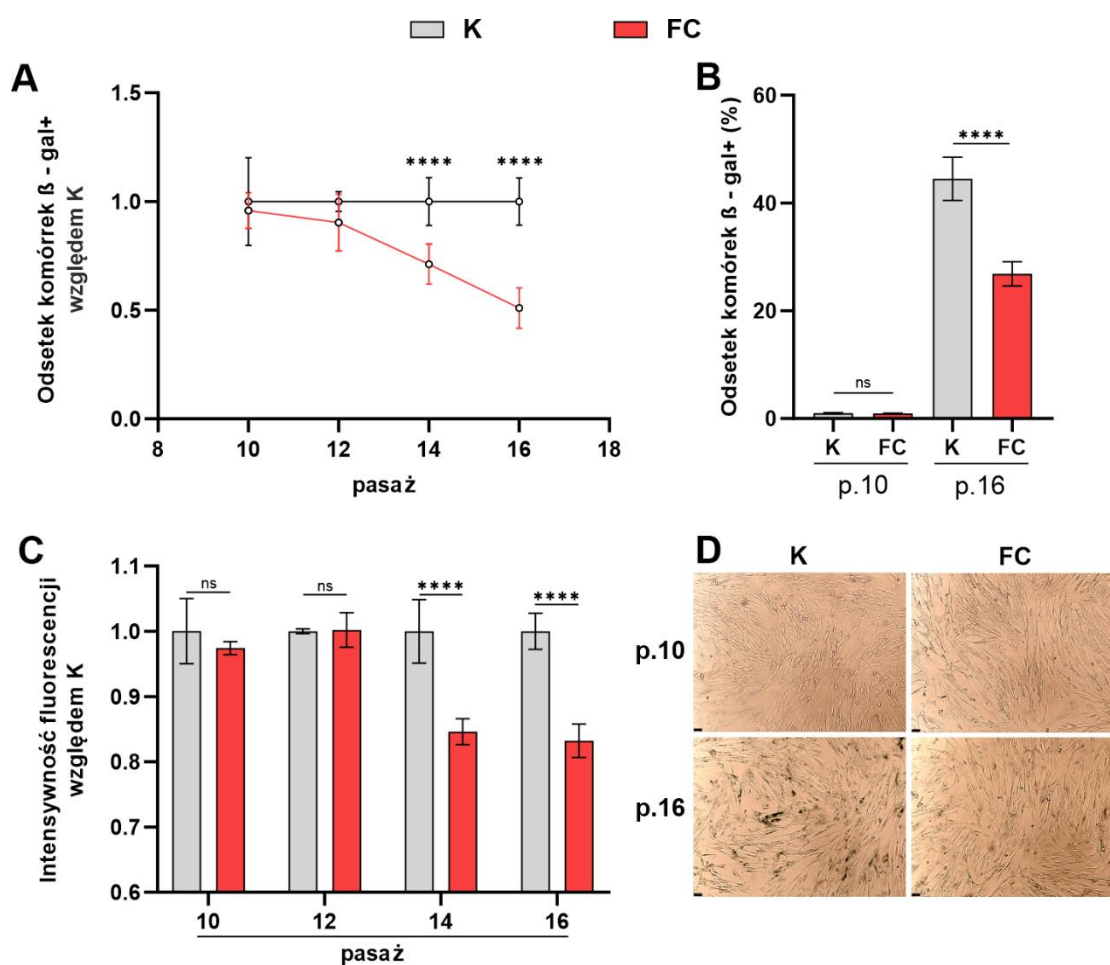
4.1. Model komórkowy

4.1.1. Wpływ FC na rozwój starzenia replikacyjnego

Przeciwstarzeniowe właściwości FC badano wykorzystując komórki MRC-5, które jako prawidłowa linia ludzkich fibroblastów, ulegają starzeniu replikacyjnemu. W celu oceny wpływu FC na rozwój starzenia replikacyjnego, od 10. do 16. pasażu, komórki hodowano w obecności 1 mM FC, co drugi pasaż oznaczając poziom aktywności β -galaktozydazy oraz wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu (RFT).

Aktywacja β -galaktozydazy jest najpowszechniej stosowanym markerem starzenia. Jej aktywność oznacza się wykorzystując substraty złożone z reszt β -galaktozydowych, których hydroliza skutkuje powstaniem barwnego produktu. Jak pokazano na rysunku 9A, analiza cytometryczna (sonda CellEvent Senescence, Invitrogen) pokazała, że FC ograniczyła odsetek komórek wykazujących aktywność β -galaktozydazy (β -gal+) w kolejnych pasażach. Po 16. pasażu, w warunkach kontrolnych odsetek komórek β -gal+ wynosił około 45%, podczas gdy w obecności FC około 27% (rys. 9B). Obserwowany efekt został potwierdzony badaniem histochemicznym, z wykorzystaniem substratu 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopiranozydu (X-gal). Na rysunku 9D przedstawiono obrazy mikroskopowe, z widoczną zmniejszoną ilością niebieskiego sygnału w przypadku komórek po 16. pasażu i hodowanych w obecności FC względem kontroli nietraktowanej, co wskazuje na niższą aktywność β -galaktozydazy.

Jednocześnie zaobserwowano spadek poziomu wewnątrzkomórkowych RFT. Analizę przeprowadzono za pomocą cytometrii przepływowej z wykorzystaniem sondy CellROX, emitującej silną fluorescencję na skutek utlenienia pod wpływem RFT. Jak pokazano na rysunku 9C, w komórkach hodowanych z FC, zarówno w pasażu 14., jak i 16., obserwowano istotnie niższą intensywność fluorescencji w porównaniu do kontroli (~20% różnicy), co świadczy o obniżeniu poziomu RFT pod wpływem FC.

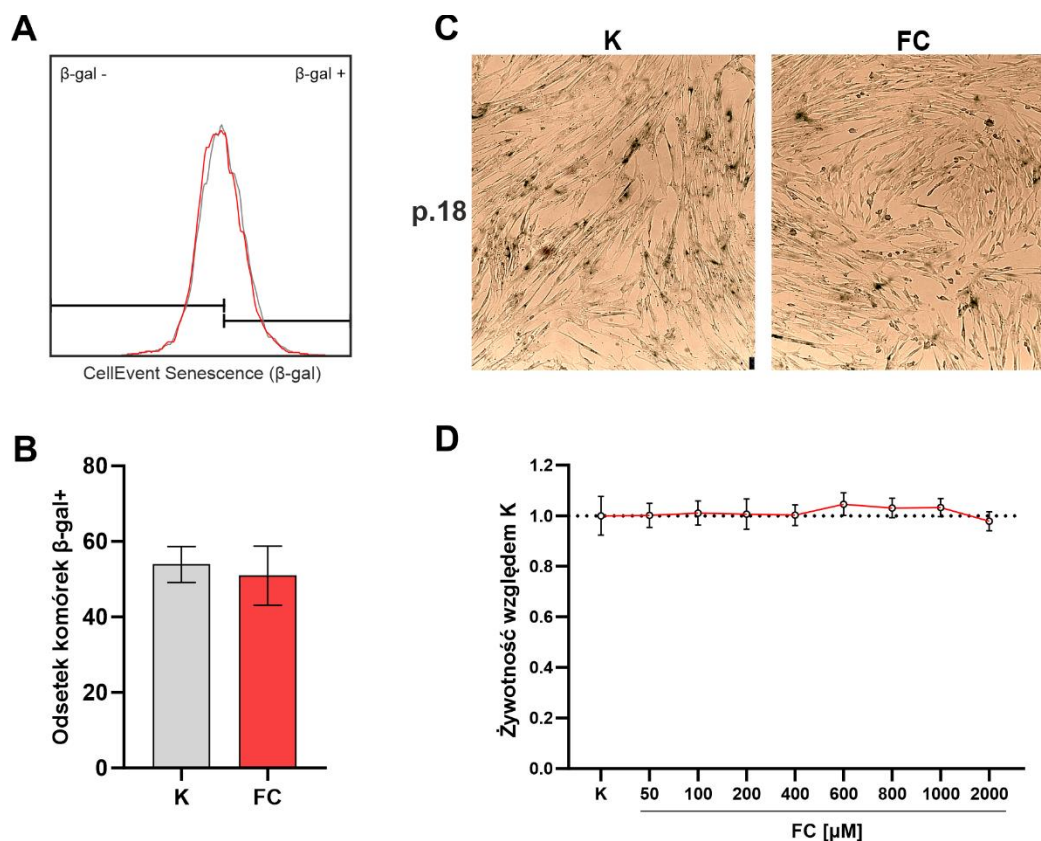


Rysunek 9. Ocena wpływu FC na proces starzenia replikacyjnego fibroblastów. (A-B) Cytometryczna analiza aktywności β -galaktozydazy w komórkach MRC-5. Wykres zmian odsetka komórek pozytywnych wobec β -galaktozydazy (β -gal+) po kolejnych pasażach komórek względem kontroli (A) oraz odsetek komórek β -gal+ w momencie rozpoczęcia i zakończenia eksperymentu (B). (C) Cytometryczna analiza poziomu wewnątrzkomórkowych RFT po kolejnych pasażach komórek. (D) Histochemiczna analiza aktywności β -galaktozydazy na początku i końcu eksperymentu. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SD z trzech powtórzeń biologicznych. Kolorem szarym oznaczono kontrolę (K), a kolorem czerwonym komórki hodowane z FC. Istotność statystyczna względem kontroli: ns – brak istotności, (****) $p < 0.0001$.

4.1.2. Wpływ FC na komórki postarzone

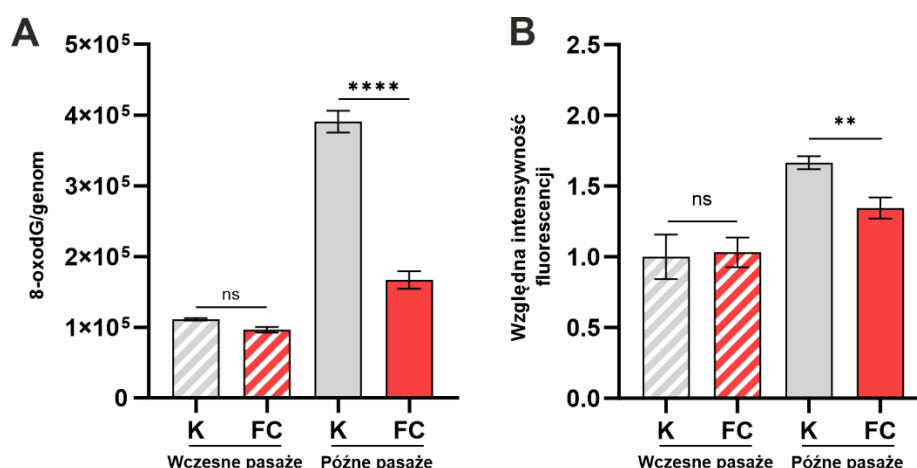
Zmniejszenie odsetka komórek starzejących się może być związane właściwościami senolitycznymi związku, a więc z ich selektywnym usuwaniem, bądź senomorficznymi, ograniczającymi fenotyp starzeniowy i jego rozprzestrzenianie na inne komórki. W celu ustalenia charakteru działania FC, przeprowadzono eksperymenty na postarzonych komórkach MRC-5, inkubowanych w standardowych warunkach i w obecności 1 mM FC przez 72 h. Komórki do 10. pasażu uznano za młode, z kolei po 16. pasażu za postarzone.

Jak pokazano na rysunku 10, 72 h inkubacja z 1 mM FC nie ograniczyła liczby komórek β -gal⁺ w późnych pasażach zarówno w teście cytometrycznym (rys. 10A-B), jak i histochemicznym (rys. 10C). Nie zauważono również wpływu związku na żywotność postarzonych komórek w teście MTT (rys. 10D).



Rysunek 10. Wpływ FC na aktywność β -galaktozydazy i żywotność komórek postarzonych. (A-B) Cytometryczna analiza wpływu FC na aktywności β -galaktozydazy w postarzonych (>p.16) komórkach MRC-5. Reprezentatywny histogram (A) oraz średni odsetek komórek β -gal⁺ (B). (C) Histochemiczna analiza aktywności β -galaktozydazy w komórkach po 18. pasażu. (D) Analiza wpływu FC na żywotność komórek postarzonych w teście MTT. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SD z trzech eksperymentów. Kolorem szarym oznaczono kontrolę, a kolorem czerwonym komórki inkubowane z FC. Brak istotności statystycznej względem kontroli.

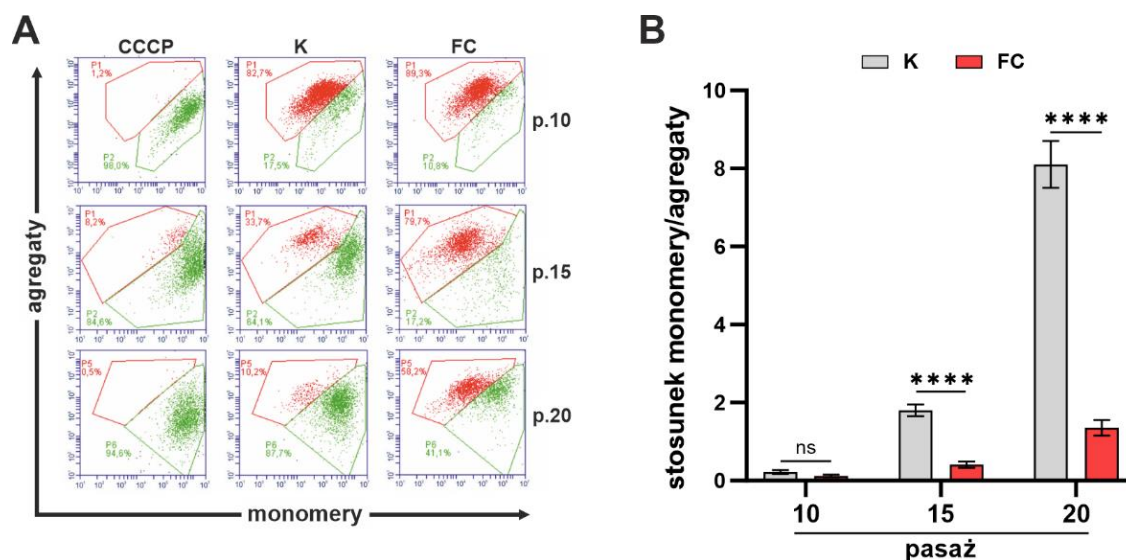
W następnym kroku zbadano, czy FC wpływa na stres oksydacyjny i uszkodzenia DNA, co należy do cech starzenia. Jak pokazano na rysunku 11A, inkubacja z FC ograniczyła ponad dwukrotnie akumulację markera oksydacyjnych uszkodzeń DNA, jakim jest 8-oxodG, w komórkach postarzonych. Również poziom fosforylowanego histonu H2AX (γ H2AX) uległ redukcji o około 20% (rys. 11B), co świadczy o niższym poziomie nagromadzenia pęknięć DNA. W obu przypadkach, efekt nie był widoczny w komórkach młodych.



Rysunek 11. Wpływ FC na poziom uszkodzeń DNA w komórkach. (A) Analiza poziomu 8-oksodeoksyguanozyny (8-oxodG) wykonana za pomocą HPLC. (B) Cytometryczna analiza poziomu histonu γ -H2AX. Wyniki przedstawione jako średnia \pm SD z trzech eksperymentów. Istotność statystyczna względem kontroli: (ns) – brak istotności, (****) $p < 0.0001$.

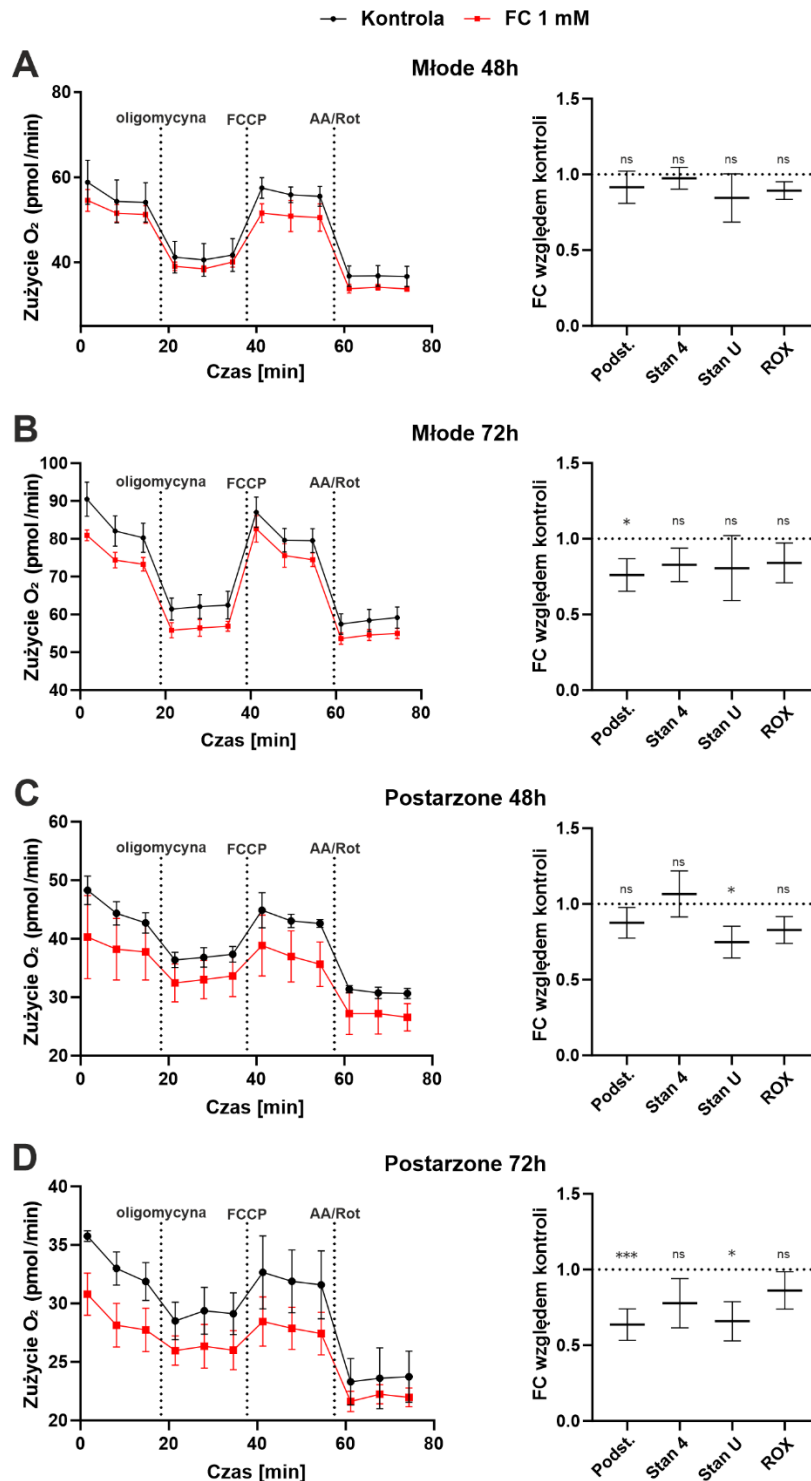
4.1.3. Wpływ FC na funkcjonowanie mitochondriów

Wraz z wiekiem obserwuje się postępującą dysfunkcję mitochondriów, co jest jedną z antagonistycznych cech starzenia. Związana jest ona m.in. z utratą potencjału błony mitochondrialnej ($\Delta\Psi_m$), co skutkuje obniżoną wydajnością energetyczną oraz może być sygnałem do apoptozy lub wzmożonej produkcji RFT. Związane ze starzeniem zmiany potencjału błony mitochondrialnej w komórkach MRC-5 i wpływ FC na to zjawisko, monitorowano wykorzystując ratiometryczną sondę JC-1 i cytometrię przepływową. Sonda JC-1 lokuje się w mitochondriach komórek w sposób zależny od potencjału, formując emitujące czerwoną fluorescencję agregaty w mitochondriach o wysokim $\Delta\Psi_m$. W przypadku mitochondriów o niskim $\Delta\Psi_m$, JC-1 pozostaje w formie monomeru i emituje zieloną fluorescencję. Zaobserwowano, że komórki młode (pasaż 10.) odznaczają się niskim stosunkiem monomerów do agregatów ($< 0,2$), z kolei w komórkach postarzonych (pasaże 15. i 20.) wartość tego stosunku kilkukrotnie wzrasta, co wskazuje na postępującą depolaryzację błony mitochondrialnej (rys. 12). Inkubacja z 1 mM FC znacząco ograniczyła to zjawisko, istotnie redukując wartość stosunku monomerów do agregatów w komórkach w późnych pasażach.



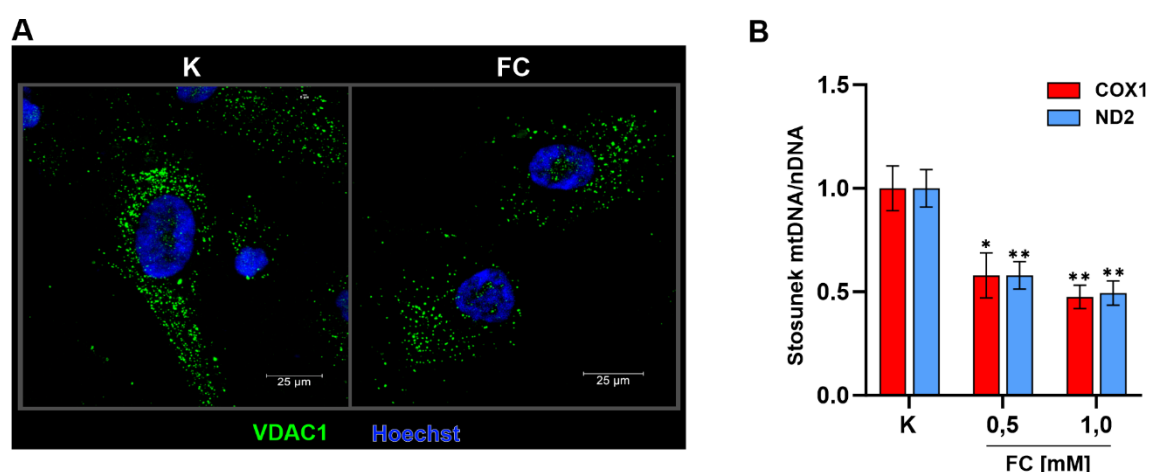
Rysunek 12. Analiza wpływu FC na potencjał błony mitochondrialnej komórek MRC-5. Zmiany potencjału błony mitochondrialnej oceniano za pomocą sondy JC-1 i cytometrii przepływowej. (A) Reprezentatywne wykresy dwuwymiarowe przedstawiające rozkład monomerów (zielone punkty) oraz agregatów (czerwone punkty) w komórkach po 10., 15. lub 20. pasażu. Protonofor CCCP zastosowano jako kontrolę pozytywną. (B) Stosunek monomerów do agregatów po poszczególnych pasażach w kontroli (szare słupki) oraz po inkubacji z FC (czerwone słupki). Dane przedstawione jako średnia \pm SD z trzech eksperymentów. Istotność statystyczna względem kontroli: (ns) – brak istotności, (****) $p < 0,0001$.

W następnym etapie badano wpływ FC na oddychanie komórkowe. W tym celu, młode oraz postarzone komórki MRC-5 hodowano przez 48 lub 72 h w obecności 1 mM FC i rejestrowano poziom zużycia tlenu za pomocą analizatora Seahorse. Zastosowanie stresorów mitochondrialnych – oligomycyny, FCCP oraz mieszaniny antymycyny A i rotenonu, pozwoliło na ocenę poziomu odpowiednio: przecieku elektronów (stan 4), oddychania maksymalnego (stan U) oraz niemitochondrialnego zużycia tlenu (ROX, ang. *residual oxygen consumption*). Wykazano, że FC obniża poziom zużycia tlenu przez komórki w sposób zależny od czasu inkubacji i wieku komórek (rys. 13). W przypadku młodych komórek, nie zaobserwowano zmian po 48 h inkubacji (rys. 13A), zauważono jednak obniżenie poziomu oddychania podstawowego po 72 h inkubacji z FC, o około 20% względem kontroli (rys. 13B). Z kolei w przypadku postarzonych komórek, po 48 h inkubacji z FC odnotowano istotne, około 20% obniżenie wartości oddychania maksymalnego względem kontroli (rys. 13C), które po 72 h wynosiło już około 35%, podobnie jak wartość oddychania podstawowego (rys. 13D). Mimo braku istotności statystycznej, zaobserwowano również trend obniżenia wartości pozostałych parametrów oddechowych, co sugeruje zmniejszenie aktywności metabolicznej komórek.



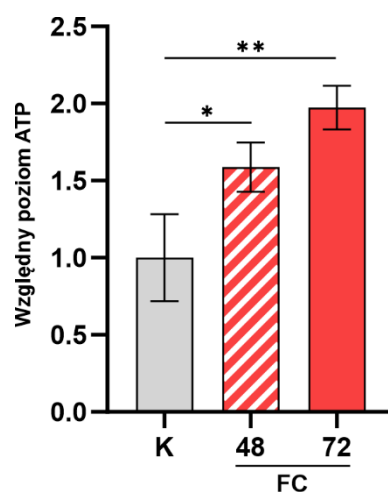
Rysunek 13. Analiza wpływu FC na oddychanie komórkowe. Pomiar oddychania komórkowego fibroblastów MRC-5 wykonano za pomocą urządzenia Seahorse. Młode komórki (pasaż < 10) inkubowane przez 48 (A) i 72 (B) h z FC oraz postarzone (pasaż > 16) inkubowane przez 48 (C) i 72 (D) h z FC. Na lewych panelach przedstawiono uzyskane wykresy zużycia tlenu. Kolorem czarnym zaznaczono kontrole, a kolorem czerwonym FC. Na prawych panelach przedstawiono zmianę wartości poszczególnych stanów oddechowych po inkubacji z FC względem kontroli. AA/Rot – antymycyna A i rotenon. Podst. – oddychanie podstawowe. ROX – oddychanie niemitochondrialne. Istotność statystyczna względem kontroli: (ns) – brak istotności, (*) $p < 0,05$, (***) $p < 0,001$.

W związku z obserwowanym obniżonym poziomem oddychania komórek pod wpływem FC, w następnej kolejności zbadano zawartość mitochondriów w komórkach po 72 h inkubacji ze związkami. W tym celu wykonano analizę masy mitochondriów, wykorzystując immunofluorescencyjne znakowanie białka VDAC1 i wizualizację mikroskopową oraz analizę liczby kopii mitochondrialnego (mtDNA) względem jądrowego DNA (nDNA) przy użyciu PCR w czasie rzeczywistym (qPCR). VDAC1 jest białkiem tworzącym główny kanał zewnętrznej błony mitochondrialnej, co umożliwia precyzyjną wizualizację mitochondriów w komórkach. Jak pokazano na rysunku 14A, sygnał zielonej fluorescencji, pochodzący od wyznakowanego białka VDAC1, jest wyraźnie niższy w próbie inkubowanej z FC, co może świadczyć o mniejszej masie mitochondriów niż w kontroli. Analizę qPCR przeprowadzono stosując jako matrycę DNA, który wyizolowano z postarzonych komórek inkubowanych z FC i kontroli. Amplifikowano fragmenty genów podjednostki 1 oksydazy cytochromu c (*COX1*) oraz podjednostki 2 dehydrogenazy NADH 2 (*ND2*), kodowanych przez mtDNA, i określano ich zawartość w stosunku do genu heksokinazy 2 (*HK2*), kodowanego przez nDNA. W przypadku komórek inkubowanych z FC, zaobserwowano blisko dwukrotny spadek stosunku mtDNA do nDNA względem kontroli, co świadczy o zredukowanej liczbie kopii mitochondrialnego DNA w tych komórkach. Zatem, w przypadku obu analiz zaobserwowano spadek poziomu markerów, mogących świadczyć o liczbie mitochondriów w komórkach.



Rysunek 14. Wpływ FC na zawartość mitochondriów w postarzonych fibroblastach. (A) Analiza zawartości mitochondriów na podstawie immunofluorescencyjnego znakowania mitochondrialnego białka VDAC1 (kolor zielony) w komórkach postarzonych traktowanych FC i w kontroli (K). Jądra komórkowe wybarwiono za pomocą Hoechst (kolor niebieski). (B) Stosunek kopii mitochondrialnego (mtDNA) do jądrowego DNA (nDNA) w komórce określono metodą qPCR. Zastosowano dwa geny mitochondrialne, *COX1* i *ND2*, oraz jądrowy *HK2*. Wyniki przedstawiono względem kontroli nietraktowanej (K) jako średnią \pm SD z trzech eksperymentów. Istotność statystyczna względem kontroli: (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$.

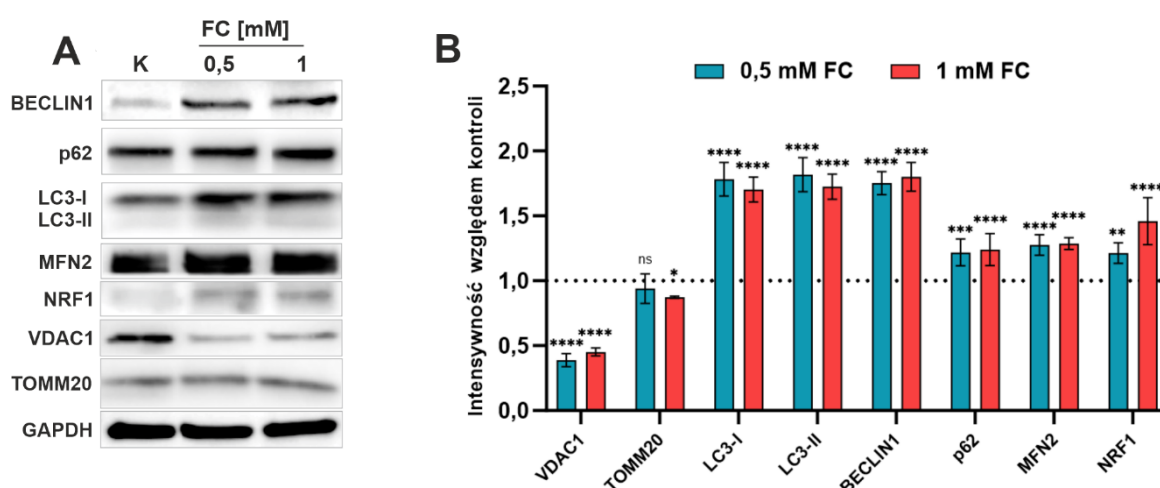
Spadek poziomu oddychania komórkowego oraz liczby mitochondriów może prowadzić do upośledzenia bioenergetyki komórek. Z tego względu, przeprowadzono analizę poziomu ATP w komórkach, po inkubacji przez 48 lub 72h z 1 mM FC. Oznaczenie przeprowadzono metodą luminescencyjną wykorzystując komercyjnie dostępny zestaw odczynników (Thermo Fisher Scientific). Jak pokazano na rysunku 15, komórki inkubowane z FC, odznaczały się istotnie wyższym poziomem ATP niż komórki kontrolne. W przypadku 48 h inkubacji zaobserwowano wzrost o około 60%, a w przypadku 72 h ekspozycji o około 90%, względem kontroli. Wyniki wskazują więc, że mimo redukcji liczby mitochondriów i poziomu oddychania komórkowego, nie doszło do obniżenia stężenia ATP w komórkach.



Rysunek 15. Analiza wpływu FC na poziom ATP w komórkach. Komórki inkubowano z FC przez 48 (czerwono-biały słupek) lub 72 h (czerwony słupek) z 1 mM FC. Poziom ATP oznaczano metodą luminescencyjną. Wyniki przedstawiono względem kontroli nietraktowanej (K, szary słupek) jako średnią \pm SD z trzech eksperymentów. Istotność statystyczna względem kontroli: (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (****) $p < 0.001$, (*****) $p < 0.0001$.

4.1.4. Analiza Western blot białek mitochondrialnych

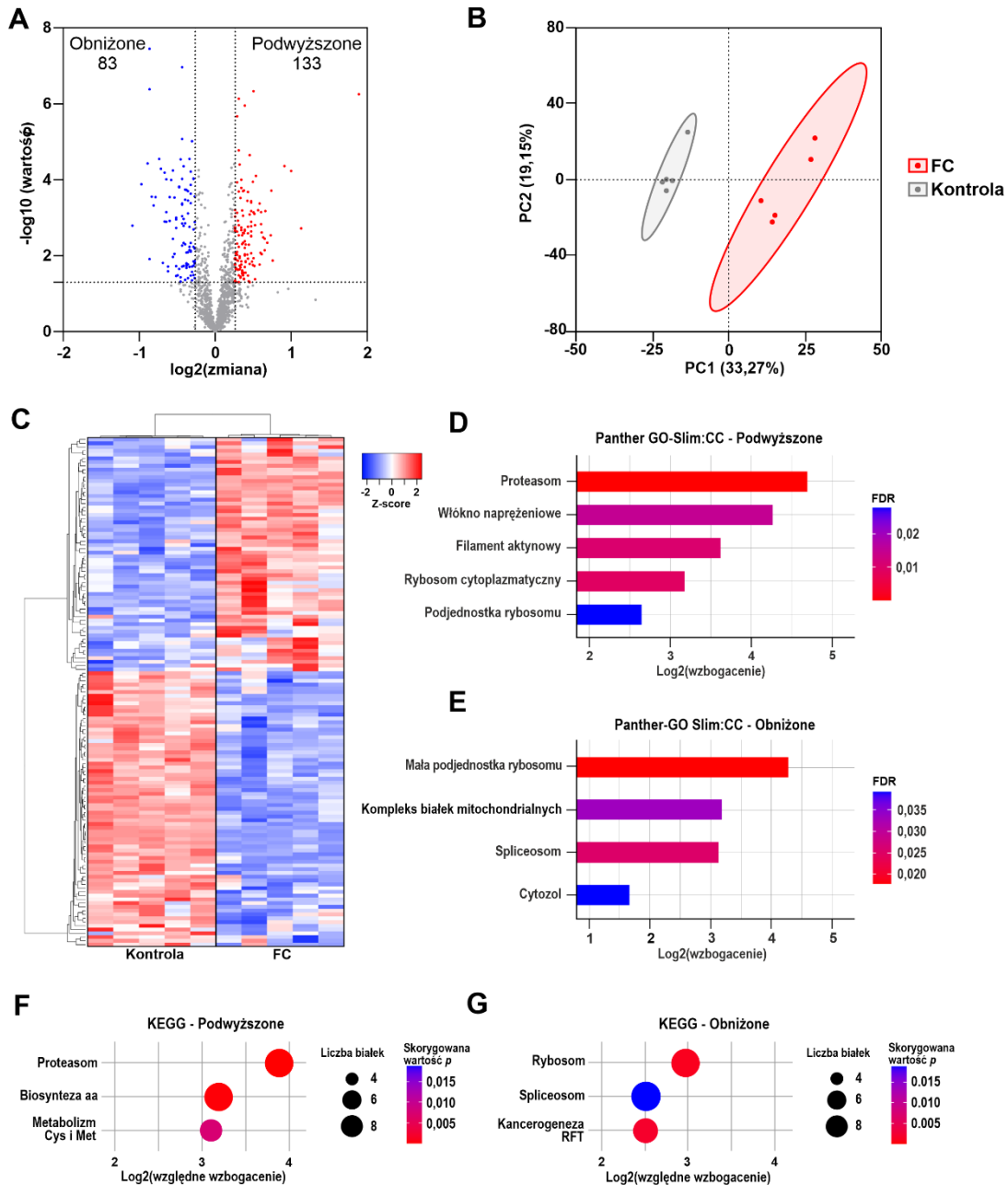
Ze względu na obserwowany wpływ FC na obniżenie poziomu oddychania komórkowego i zawartości mitochondriów w komórkach, przeprowadzono analizę poziomu wybranych białek zaangażowanych w homeostazę mitochondriów za pomocą metody Western blot. Oznaczono poziom głównych białek zewnętrznej błony mitochondrialnej (VDAC1, TOMM20), oraz białek zaangażowanych w procesy autofagii, w tym mitofagii (LC3, BECLIN1, p62) i dynamiki mitochondriów (MFN2, NRF1), w komórkach inkubowanych z 0,5 i 1 mM FC. Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku 16. Zgodnie w poprzednich eksperymentach, zaobserwowano obniżenie poziomu białka VDAC1 o ponad 50% oraz białka TOMM20 o prawie 20% w przypadku 1 mM FC względem kontroli, co sugeruje obniżenie masy mitochondriów. Ponadto odnotowano wzrost poziomu białek zaangażowanych w mitofagię, a więc LC3-I i LC3-II o około 80%, BECLIN1 o około 75% i p62 o około 25%, przy jednoczesnym, około 45%, wzroście poziomu białka NRF1, zaangażowanego w biogenezę mitochondriów. Wzrost o około 30% odnotowano również w przypadku zaangażowanego w fuzję mitochondriów białka MFN2. Uzyskane wyniki wskazują więc na aktywację procesu mitofagi, co może być związane z degradacją dysfunkcyjnych mitochondriów.



Rysunek 16. Analiza Western blot wpływu FC na poziom wybranych białek. (A) Reprezentatywny Western blot (B) Analiza densytometryczna. Wynik normalizowano do referencyjnego białka GAPDH. Średnia \pm SD z dwóch eksperymentów. Poziom białek VDAC1, TOMM20, LC3, BECLIN1, p62, MFN2 i NRF2, oznaczano po inkubacji postarzonej komórek z 0.5 (niebieskie) lub 1 mM FC (czerwone słupki). Istotność statystyczna względem kontroli: (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$

4.1.5. Analiza zmian proteomicznych

W celu poznania wpływu FC na proteom komórek, postarzone komórki MRC-5 inkubowano z 1 mM FC przez 72 h, a następnie wykonano niecelowaną analizę proteomiczną. Uzyskane dane poddano różnicowej analizie ilościowej, uznając za białka różnicujące te, w przypadku których została stwierdzona istotna statystycznie (wartość $p \leq 0,05$), minimum 1,2-krotna różnica ilościowa. Jak przedstawiono na rysunku 17A, analiza dostarczyła danych dotyczących 1307 białek (wszystkie punkty), wśród których zidentyfikowano 216 białek różnicujących, w tym 83 białka o obniżonej (niebieskie punkty) i 133 białka o podwyższonej akumulacji (czerwone punkty) względem kontroli. Różnice pomiędzy badanymi grupami dodatkowo zobrazowano przeprowadzając analizę głównych składowych (ang. PCA, *principal component analysis*). Jak pokazano na rysunku 17B, zaobserwowano wyraźny rozdział pomiędzy próbkami kontrolnymi (kolor szary) i traktowanymi FC (kolor czerwony). Na rysunku 17C przedstawiono wizualizację białek różnicujących w formie mapy cieplnej (ang. *heatmap*). Następnie białka różnicujące poddano analizie bioinformatycznej, w celu określenia ich lokalizacji komórkowej i szlaków komórkowych, w które są zaangażowane. Na rysunku 17D-E, przedstawiono wszystkie istotnie statystycznie wyniki analizy lokalizacji komórkowej, wykonanej za pomocą narzędzia Panther GO - Slim. Stwierdzono, że białka o podwyższonej akumulacji (rys. 17D), to białka związane z kompleksem proteasomu, włóknem naprężeniowym, filamentami aktynowymi i rybosomami. Z kolei białka o obniżonej akumulacji (rys. 17E), to białka związane z rybosomami, mitochondriami, spliceosomem i z cytozolem. Analizę szlaków komórkowych wykonano za pomocą narzędzia GeneCodis4 z wykorzystaniem bazy danych KEGG (ang. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Na rysunku 17F-G przedstawiono wyniki o skorygowanej wartości $p \leq 0,02$, z pominięciem jednostek chorobowych (choroba Parkinsona czy Huntingtona). W przypadku białek o podwyższonej akumulacji (rys. 17F) zaobserwowano wzbogacenie szlaku związanego z aktywnością proteasomu oraz metabolizmem aminokwasów, a w przypadku białek o obniżonej akumulacji (rys 17G), szlaków związanych z ekspresją genów (rybosom i spliceosom) oraz kancerogenezą związaną z reaktywnymi formami tlenu.

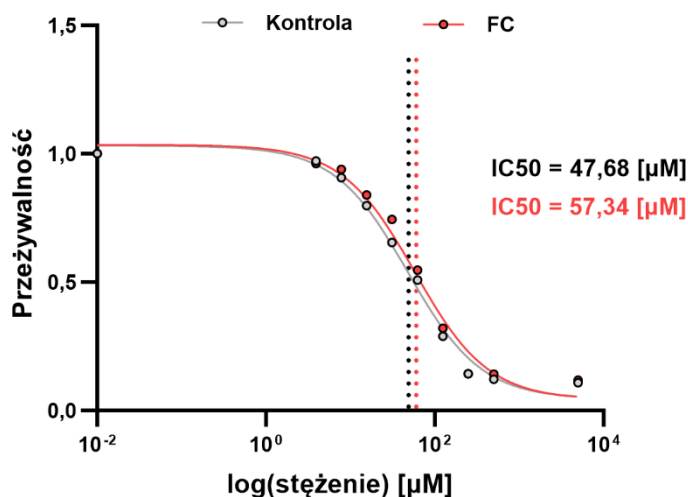


Rysunek 17. Analiza wpływu FC na zmiany w proteomie postarzonych komórek MRC-5. (A) Wykres typu volcano-plot przedstawiający wyniki różnicowej analizy ilościowej zidentyfikowanych białek. Kolorem szarym zaznaczono białka o niezminionej akumulacji, kolorem niebieskim białka o obniżonej, a czerwonym o podwyższonej akumulacji względem kontroli. Za istotnie różnicujące uznawano białka, w przypadku których zmiana wynosiła minimum 20%. (B) Analiza głównych składowych. Kolorem szarym zaznaczono kontrole, a kolorem czerwonym komórki traktowane FC. PC1 – składowa 1, PC2 – składowa 2. (C) Mapa cieplna z dendrogramami przedstawiająca białka o istotnie zmienionej akumulacji w próbach kontrolnych i traktowanych FC. Kolorem niebieskim zaznaczono białka o obniżonej, a czerwonym o podwyższonej akumulacji. (D-E) Analiza ontologii genów (GO) w kontekście lokalizacji komórkowej (CC), wykonana dla różnicujących białek za pomocą narzędzia Panther-GO Slim. Wynik dla białek o podwyższonej (D) i obniżonej (E) akumulacji względem kontroli. (F-G) Analiza szlaków sygnałowych, w które zaangażowane są różnicujące białka o podwyższonej (F) i obniżonej (G) akumulacji względem kontroli.

4.1.6. Właściwości antyoksydacyjne FC

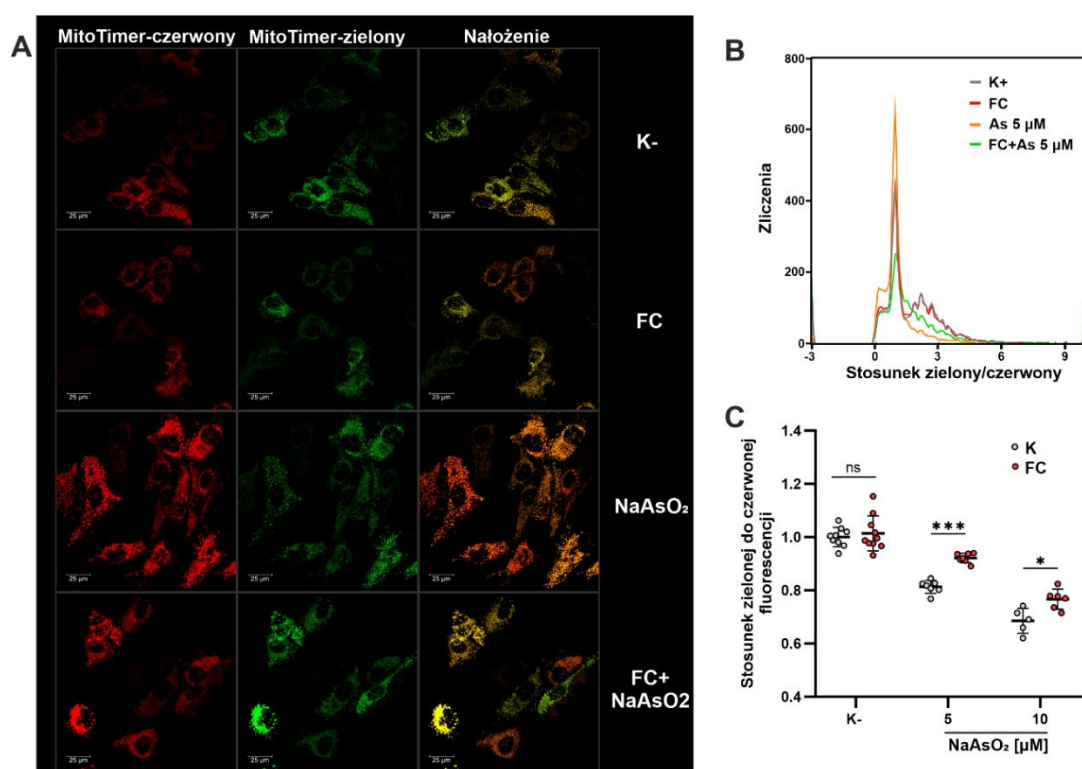
Właściwości antyoksydacyjne FC badano wykorzystując linię komórkową keratynocytów człowieka HaCaT. Jest to linia nieśmiertelna i z tego względu nie nadaje się do badań nad starzeniem, jednak została zastosowana w badaniach nad właściwościami antyoksydacyjnymi związku ze względu na łatwość hodowli i szybkie tempo wzrostu.

Komórki HaCaT inkubowano przez 24 h w obecności 1 mM FC, a następnie indukowano stres oksydacyjny (SO) arseninem sodu (NaAsO_2). Arsenin sodu jest toksycznym związkiem, indukującym gwałtowną produkcję RFT przez mitochondria oraz aktywację oksydaz NADPH (NOX) [202]. Wpływ FC na przeżywalność w warunkach SO badano za pomocą testu MTT. Jak pokazano (rys. 18), uprzednia inkubacja z 1 mM FC istotnie zwiększyła przeżywalność komórek, zwiększając średnie stężenie NaAsO_2 , przy którym żywotność zostaje zahamowana o 50% względem warunków nie stresowych (IC_{50}), z $47,68 \pm 0,71 \mu\text{M}$ do $57,34 \pm 1,31 \mu\text{M}$ NaAsO_2 .



Rysunek 18. Wpływ FC na stres oksydacyjny indukowany arseninem sodu w komórkach HaCaT. (A) Test przeżywalności MTT. Komórki inkubowano przez 24 h z 1 mM FC, a następnie traktowano NaAsO_2 przez kolejne 24 h. Kolorem szarym zaznaczono kontrolę, a kolorem czerwonym komórki inkubowane z FC.

Następnie sprawdzono wpływ FC i NaAsO₂ na stres mitochondrialny. W tym celu, komórki transfekowano wektorem pMitoTimer, kodującym fluorescencyjne białko lokalizujące się w mitochondrium. Nowo zsyntetyzowane białko emituje zielony sygnał, który pod wpływem utlenienia nieodwracalnie przesuwa się w kierunku czerwonego, co umożliwia ocenę poziomu uszkodzeń mitochondriów [203]. Komórki po transfekcji inkubowano z 1 mM FC przez 16 h, a następnie inkubowano z 5 lub 10 μM NaAsO₂ przez kolejne 24 h. W wyniku analizy mikroskopowej (rys. 19A) zaobserwowano wyraźne zwiększenie intensywności czerwonej fluorescencji na skutek inkubacji z NaAsO₂, co świadczy o akumulacji uszkodzeń mitochondrialnych na skutek indukcji SO, przy czym efekt ten był obniżony w przypadku komórek uprzednio inkubowanych z FC. Podobny wynik uzyskano w analizie cytometrycznej (rys. 19B-C), w której odnotowano istotnie wyższy stosunek fluorescencji zielonej do czerwonej, co świadczy o niższym poziomie uszkodzeń mitochondriów w komórkach uprzednio inkubowanych z FC. Wyniki wskazują na ochronny wpływ FC na mitochondria komórek w warunkach indukowanego SO.

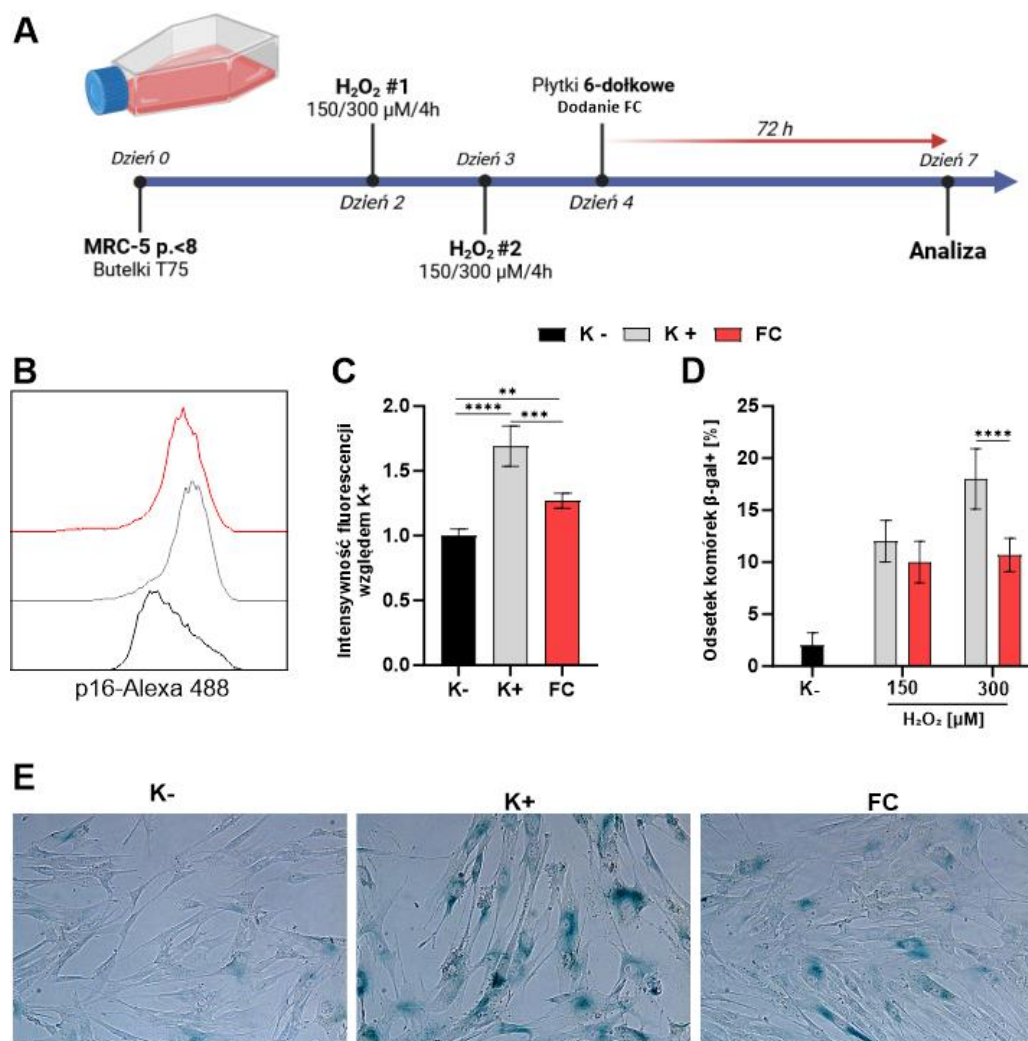


Rysunek 19. Wpływ FC na stres mitochondrialny indukowany arseninem sodu. (A) Analiza mikroskopowa komórek HaCaT transfekowanych wektorem kodującym mitochondrialne białko pMitoTimer, którego fluorescencja zmienia się z zielonej na czerwoną pod wpływem RFT. Połączone obrazy przedstawiono na prawych panelach. (B) Rozkład stosunku zielonej do czerwonej fluorescencji w analizie cytometrycznej. (C) Średni stosunek zielonej do czerwonej fluorescencji względem kontroli nietraktowanej (K-). Kolorem szarym oznaczono kontrole, kolorem czerwonym komórki inkubowane z FC. Istotność statystyczna względem kontroli: (*) $p < 0,05$, (***) $p < 0,001$.

4.1.7. Wpływ FC na rozwój starzenia przyspieszonego

W związku z obserwowanym wpływem FC na poziom wewnątrzkomórkowych RFT, jako czynnik stresogenny indukujący starzenie przyspieszone wybrano nadtlenek wodoru (H_2O_2). Indukcję starzenia przeprowadzano dwukrotnie inkubując młode komórki MRC-5 z nadtlenkiem wodoru ($150 \mu M$ lub $300 \mu M$) przez 4 h, a następnie pozostawiano przez 72 h standardowych warunkach wzrostu i z dodatkiem 1 mM FC. Schemat procedury przedstawionego na rysunku 20A.

Rozwój starzenia przyspieszonego oceniano pomocą cytometrii przepływowej oraz barwienia histochemicznego, oznaczając aktywność β -galaktozydazy. Zarówno w analizie cytometrycznej (rys. 20D), jak i mikroskopowej (rys. 20E), zaobserwowano istotny wzrost odsetka komórek β -gal+ w warunkach indukowanego stresu oksydacyjnego, o ponad 6 razy w przypadku $150 \mu M$ i o ponad 9 razy w przypadku $300 \mu M H_2O_2$, w porównaniu z warunkami kontrolnymi. Efekt ten był zredukowany przez FC, przy czym w sposób istotny ($p < 0,05$), o ponad 40%, przy wyższym z zastosowanych stężeń H_2O_2 ($300 \mu M$). Aby potwierdzić uzyskany wynik, oznaczono poziom innego markera starzenia, jakim jest białko p16. W tym celu zastosowano $300 \mu M$ stężenie H_2O_2 i immunofluorescencyjną analizę przy użyciu cytometrii przepływowej. Jak pokazano na rysunku 20B-C, poziom białka p16 na skutek działania stresora (H_2O_2) był wyższy o około 70% niż w przypadku kontroli nietraktowanej (K-), a inkubacja z FC obniżyła tę wartość o około 25%. Uzyskane wyniki wskazują, że zastosowane podejście wywołało proces starzenia przyspieszonego, i że został on ograniczony na skutek działania FC.



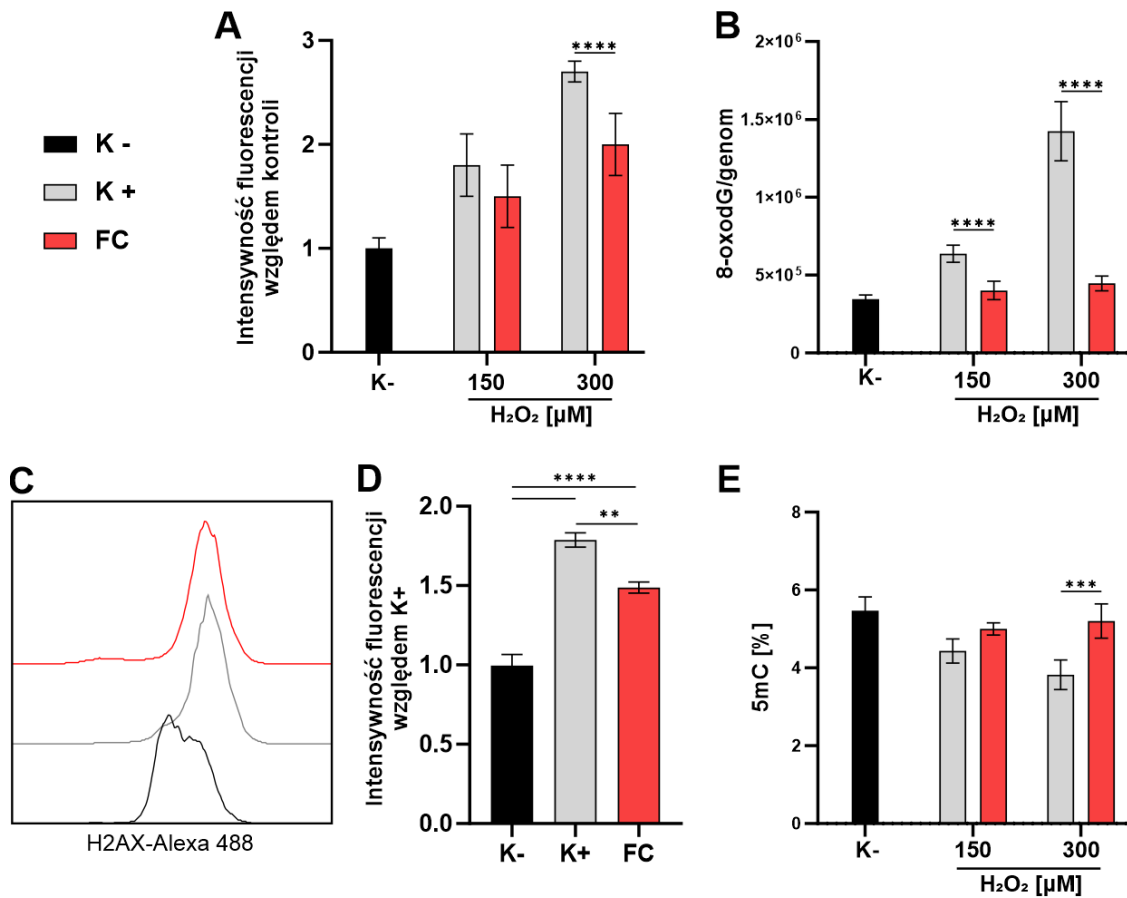
Rysunek 20. Ocena komórkowego modelu starzenia przyspieszonego na podstawie wybranych markerów starzenia. (A) Schemat przedstawiający zastosowaną procedurę indukcji starzenia przyspieszonego. (B-C) Cytometryczna analiza poziomu białka p16. Reprezentatywny histogram (B) oraz średnia \pm SD intensywność fluorescencji z trzech eksperymentów (C). (D-E) Aktywność β -galaktozydazy oznaczona za pomocą cytometrii przepływowej (D) oraz analizy histochemicznej (E). Kontrolę nietraktowaną (K-) oznaczono kolorem czarnym, kontrolę pozytywną szarym (K+), a próby traktowane FC czerwonym (FC). Istotność statystyczna względem kontroli: (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$, (****) $p < 0,0001$. Brak gwiazdki oznacza brak istotności.

W następnej kolejności przeprowadzono analizę innych cech związanych ze starzeniem oraz stresem oksydacyjnym (SO) (rys. 21). Wewnątrzkomórkowy poziom RFT określono za pomocą cytometrii przepływowej i fluorescencyjnej sondy CellROX. Zaobserwowano zależny od stężenia wzrost poziomu fluorescencji w próbach traktowanych H₂O₂ w stosunku do kontroli nietraktowanej (K-), co świadczy o wyższym poziomie RFT w tych próbach. Zastosowanie FC wpłynęło na redukcję RFT o około 15% w przypadku 150 μM i o około 25% w przypadku 300 μM H₂O₂, a efekt istotny statystycznie obserwowano ponownie przy wyższym stężeniu H₂O₂ (rys. 21A).

Podwyższony poziom RFT może prowadzić do stresu oksydacyjnego i gromadzenia uszkodzeń wewnątrzkomórkowych, w tym uszkodzeń DNA. Głównym markerem oksydacyjnych uszkodzeń DNA jest 8-oksodeoksyguanozyna (8-oxodG). Z kolei podwójne pęknięcia nici DNA (DSB) stanowią jedną z podstawowych przyczyn indukcji starzenia, a ich powstawanie może być wzmożone przez SO. Pojawienie się DSB w jądrze komórkowym wywołuje fosforylację histonu H2AX w pozycji Ser139 (γ H2AX), co uruchamia proces DDR.

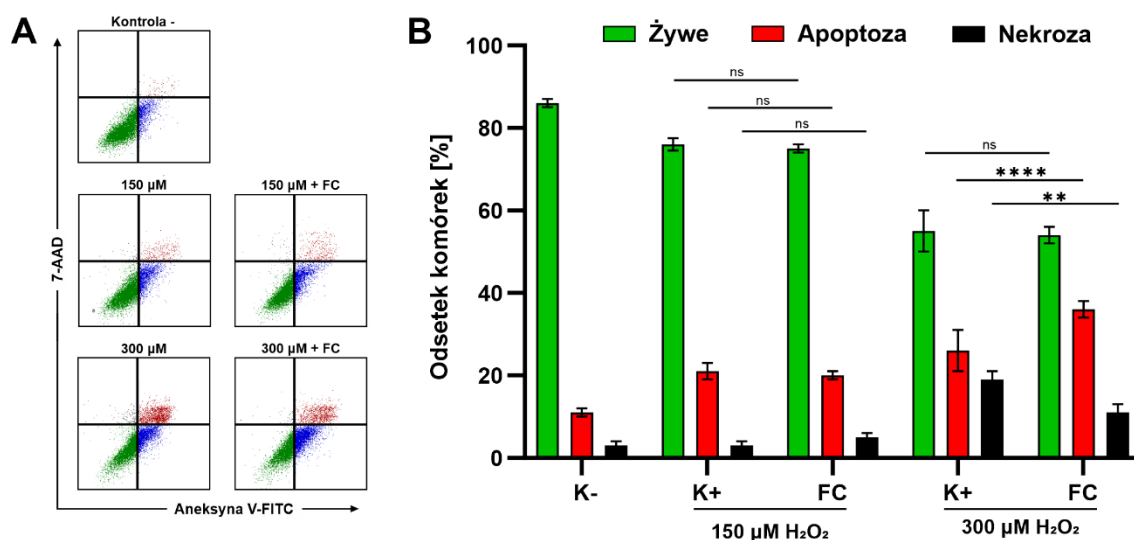
W celu określenia wpływu oksydacyjnych uszkodzeń DNA, za pomocą wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC) oznaczono poziom 8-oxodG, z kolei poziom DSB w badanych próbach stosując immunofluorescencyjne znakowanie γ H2AX. Jak pokazano na rysunku 21B, zaobserwowano znaczny, niemal 2 lub 4 krotny wzrost poziomu 8-oxodG w próbach traktowanych odpowiednio 150 lub 300 μ M H₂O₂, względem kontroli nietraktowanej (K-). Zastosowanie FC znacząco ograniczyło to zjawisko (rys. 21B). Co warto odnotować, liczba 8-oxoG w próbach traktowanych FC została zredukowana do poziomu kontroli nietraktowanej H₂O₂. Ograniczenie uszkodzeń DNA zaobserwowano również w badaniu γ H2AX. Jak pokazano na rysunku 21C-D, sygnał fluorescencji względem kontroli nietraktowanej wzrósł o 80% w przypadku komórek traktowanych wyłącznie H₂O₂, a po zastosowaniu FC jedynie o niecałe 50%, co oznacza ograniczenie powstawania DSB dzięki FC.

Kolejną cechą związaną ze starzeniem jest spadek globalnej metylacji genomu. W celu obserwacji tego zjawiska, oznaczono poziom 5-metylodeoksytozyny (5-mdC) za pomocą HPLC (rys. 21E). Zauważono, że poziom 5-mdC faktycznie spadał w modelu przyspieszonego starzenia komórkowego, z poziomu około 5,5% w przypadku komórek kontrolnych, do około 4,5% w przypadku komórek traktowanych 150 μ M i niecałych 4% w przypadku komórek traktowanych 300 μ M H₂O₂. Komórki inkubowane z FC odznaczały się poziomem metylacji wynoszącym powyżej 5%, co świadczy o ograniczeniu procesu demetylacji zachodzącego podczas starzenia przyspieszonego.



Rysunek 21. Analiza wpływu FC na cechy związane ze starzeniem w komórkowym modelu starzenia przyspieszonego. (A) Poziom wewnątrzkomórkowych RFT względem K- oznaczony za pomocą cytometrii przepływowej. (B) Analiza poziomu 8-oksodeoksyguanozyny (8-oxodG) wykonana za pomocą HPLC. (C-D) Immunofluorescencyjna analiza poziomu γ H2AX. Reprezentatywny histogram (C) oraz średni poziom intensywności fluorescencji względem K- (D). (E) Poziom globalnej metylacji genomu oznaczony za pomocą HPLC. Kontrolę nietraktowaną (K-) oznaczono kolorem czarnym, kontrolę pozytywną szarym (K+), a próby traktowane FC czerwonym (FC). Istotność statystyczna względem kontroli (test t-Studenta): (***) $p < 0,01$, (****) $p < 0,001$, (*****) $p < 0,0001$. Brak gwiazdki oznacza brak istotności.

Następnie przeprowadzono analizę żywotności komórek. W tym celu wykorzystano barwnik 7-AAD, który wybarwia jądra komórek martwych na czerwono, oraz aneksynę V skoniugowaną z FITC (Aneksyna V-FITC), barwiącą komórki apoptotyczne na zielono. Aneksyna V wykorzystywana jest do detekcji apoptozy ze względu na fakt, że wiąże się ona z fosfatydyloseryną prezentowaną na powierzchni błony komórkowej podczas apoptozy. Wyniki analizy przedstawiono na rysunku 22. Żywotność komórek traktowanych H_2O_2 była znacząco niższa, niż komórek nietraktowanych (K-). W przypadku komórek, w których indukowano starzenie zauważono, że po inkubacji z FC, wzrasta odsetek komórek apoptotycznych, a spada odsetek komórek nekrotycznych. Obserwowany wzrost tego odsetka może wynikać z faktu, że komórki starzejące się odznaczają się zahamowaną apoptozą, a w przypadku FC obserwowano mniejszy odsetek komórek starzejących się w całej populacji.



Rysunek 22. Ocena żywotności komórek poddanych starzeniu przyspieszonemu. (A) Wynik cytometrycznej analizy apoptozy i nekrozy komórek traktowanych H_2O_2 i FC przy użyciu podwójnego barwienia 7-AAD oraz aneksyna V-FITC. (B) Średni odsetek komórek żywych (zielony), apoptotycznych (czerwony) oraz nekrotycznych (czarny słupek). Dane przedstawiono jako średnią \pm SD trzech niezależnych eksperymentów. Istotność statystyczna względem kontroli: (ns) brak istotności, (*) $p < 0,05$, (***) $p < 0,001$, (****) $p < 0,0001$.

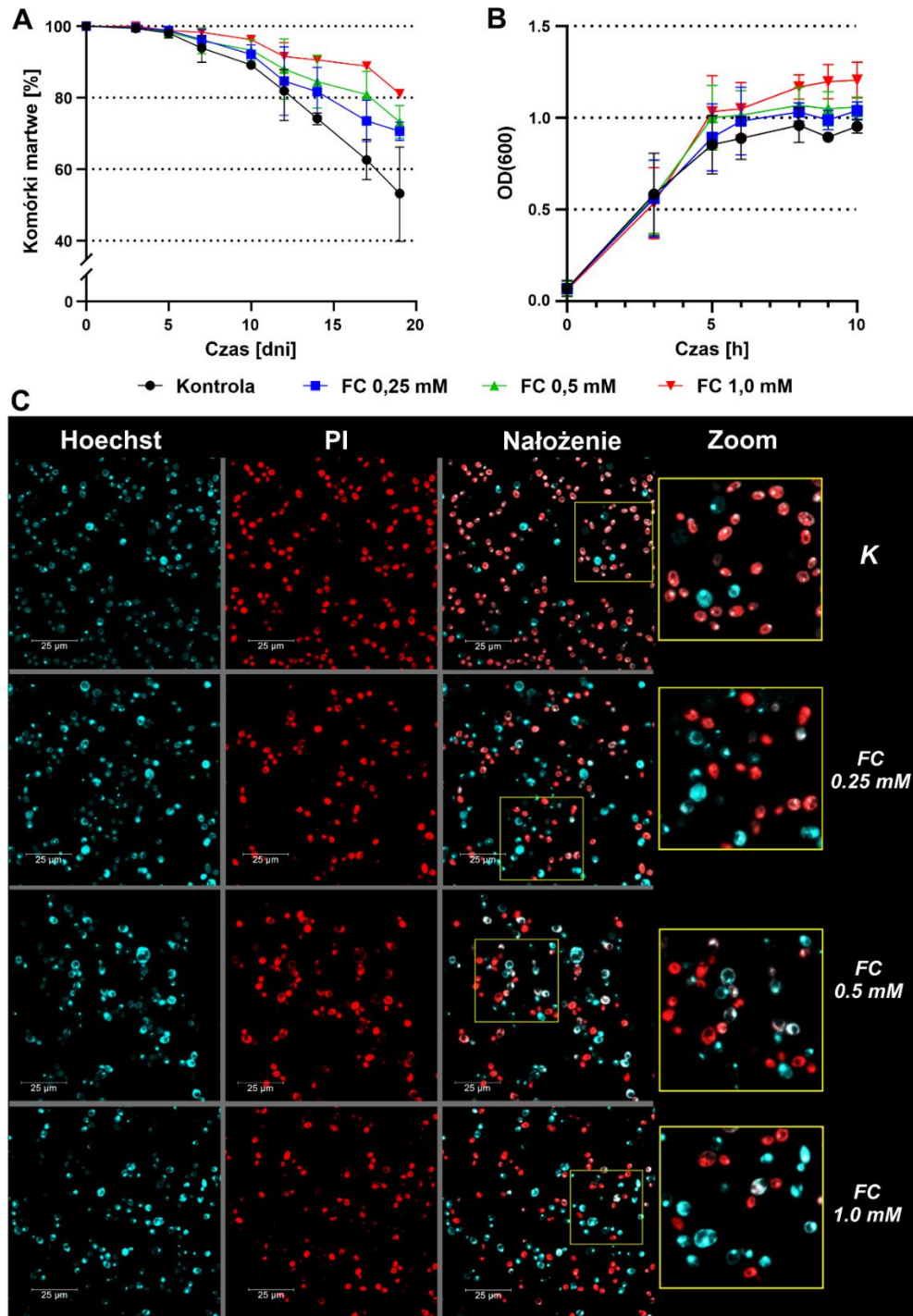
Podsumowując, na skutek działania FC, zauważono zahamowanie procesu starzenia przyspieszonego indukowanego stresem oksydacyjnym oraz związanych z nim negatywnych dla komórki konsekwencji. Może to wskazywać na potencjalne właściwości senomorficzne związku.

4.2. Model drożdżowy

4.2.1. Wpływ FC na wzrost i CLS drożdży

Wpływ FC na żywotność drożdży badano z wykorzystaniem dzikiego szczepu drożdży *S. cerevisiae* - BY4741, poprzez analizę chronologicznej długości życia (CLS) oraz kinetyki wzrostu. W tym celu, wykorzystano barwienie jodkiem propidyny (PI) i analizę komórek za pomocą cytometrii przepływowej. PI jest barwnikiem, który interkaluje do DNA komórek o uszkodzonej błonie, wykazując czerwoną fluorescencję. Zatem, komórki wybarwione uznawano za martwe, a niewybarwione za żywe. Wykazano (rys. 23A), że suplementacja FC wydłuża CLS drożdży, a efekt ten jest zależny od dawki. Istotne statystycznie różnice w żywotności drożdży względem kontroli zaobserwowano w 12, 14 i 17 dniu analizy, w przypadku odpowiednio 1, 0,5 i 0,25 mM FC (tab. 3). W obrębie grup eksperymentalnych, zauważono istotne różnice jedynie między drożdżami hodowanymi w obecności 0,25 oraz 1,0 mM FC w dniach 17 i 19. W ostatnim dniu analizy (dzień 19) zaobserwowano ponad 50% większą liczbę żywych komórek drożdży hodowanych w obecności 1 mM FC, niż w przypadku kontroli.

Wydłużenie CLS może być spowodowane inhibicją wzrostu drożdży, co prowadzi zarówno do opóźnionego rozpoczęcia fazy stacjonarnej, jak i przedłużenia dostępności składników odżywczych. W celu zbadania wpływu FC na kinetykę wzrostu drożdży, przeprowadzono pomiary gęstości optycznej (OD_{600}) hodowli w fazie logarytmicznego wzrostu, w takich samych warunkach, jak w analizie CLS. Uzyskane wyniki wskazują, że FC nie hamuje wzrostu drożdży w przypadku żadnego z zastosowanych stężeń, a może go delikatnie zwiększać (rys. 23B). Różnice jednak nie są istotne statystycznie.



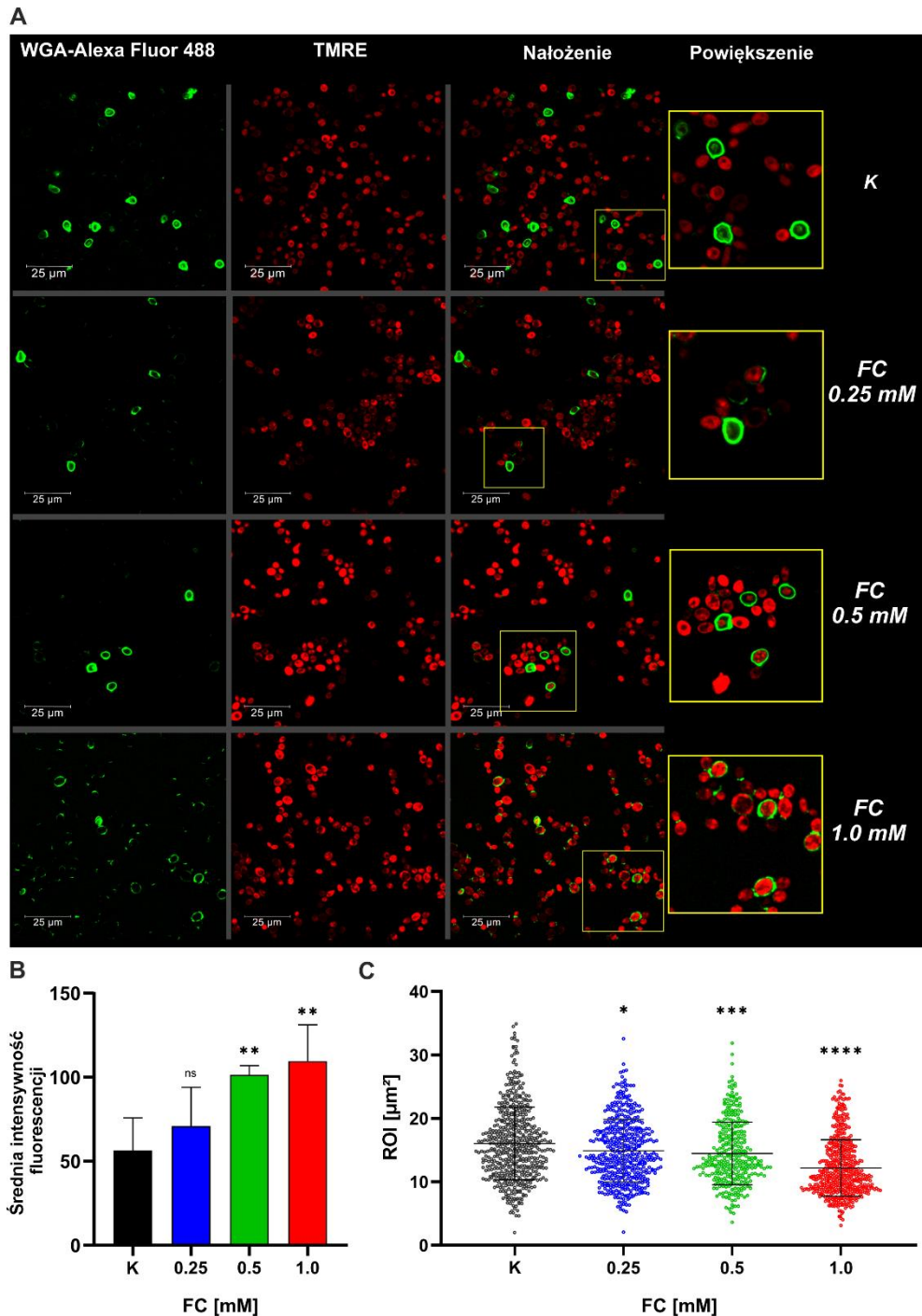
Rysunek 23. Analiza wpływu FC na CLS i kinetykę wzrostu drożdży. (A) CLS drożdży w obecności 0,25 (niebieski ■), 0,5 (zielony ▲) lub 1 (czerwony ▼) mM FC, oraz kontroli (czarny ●), badano za pomocą cytometrii przepływowej barwienia PI. Za żywe uznawano komórki niewybarwione. Dane przedstawiono jako średni procent komórek niewybarwionych w całej analizowanej populacji (10000 komórek) \pm SD z trzech niezależnych eksperymentów. (B) Kinetyka wzrostu drożdży w fazie logarytmicznego wzrostu określona na podstawie pomiarów OD_{600} . Dane przedstawiono jako średnią \pm SD z trzech niezależnych eksperymentów. (C) Mikroskopowa wizualizacja komórek w 14 dniu CLS z wykorzystaniem barwienia Hoechst 33342 i PI. Fluorescencja niebieska (wzbudzenie/emisja: 405/435-480 nm) i czerwona (wzbudzenie/emisja: 543/585-640 nm) odpowiada odpowiednio żywym i martwym komórkom. Połączone obrazy przedstawiono na prawych panelach.

Tabela 3. Wpływ FC na CLS drożdży. Średni odsetek ([%], \pm SD) komórek żywych w analizowanej populacji (10000 komórek) w kolejnych dniach CLS. Dane pochodzą z trzech niezależnych eksperymentów. Istotność statystyczna względem kontroli: (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (****) $p < 0,0001$.

Dzień	FC [mM]			
	Kontrola	0,25	0,5	1,0
3	99,4 \pm 0,001	99,6 \pm 0,007	99,7 \pm 0,002	100,0 \pm 0,000
5	98,1 \pm 1,285	98,8 \pm 0,957	98,4 \pm 1,603	98,8 \pm 1,341
7	93,9 \pm 3,893	96,3 \pm 2,813	95,9 \pm 3,553	98,3 \pm 1,192
10	92,1 \pm 2,616	92,1 \pm 2,616	93,3 \pm 2,951	96,2 \pm 1,259
12	81,9 \pm 6,879	84,6 \pm 9,620	88,0 \pm 8,443	91,5 \pm 3,888*
14	74,1 \pm 1,401	81,7 \pm 6,798	84,5 \pm 7,386*	90,5 \pm 1,050****
17	62,6 \pm 6,130	73,5 \pm 5,770**	80,8 \pm 6,503****	88,8 \pm 0,656****
19	53,1 \pm 14,623	70,6 \pm 2,512****	73,2 \pm 4,595****	81,1 \pm 0,403****

W 14. dniu CLS zaobserwowano istotne różnice dla dwóch najwyższych stężeń FC (1 i 0,5 mM) oraz pozytywny trend dla najniższego stosowanego stężenia (0,25 mM), w porównaniu z kontrolą. Dlatego, wybrano ten dzień do analizy mikroskopowej. W tym celu zastosowano podwójnie barwienie barwnikiem Hoechst 33342 i PI (rys. 23C). Podczas gdy PI może przeniknąć tylko do komórek przepuszczalnych (czerwona fluorescencja), Hoechst wiąże się z DNA (niebieska fluorescencja) niezależnie od stanu błony komórkowej. Dlatego komórki wykazujące czerwoną fluorescencję uważane są za martwe, a niebieską - za żywe. Zaobserwowano więcej komórek zabarwionych na niebiesko i mniej zabarwionych na czerwono w próbkach traktowanych FC, a efekt ten zależy od stężenia. Wskazuje to na wyższą niż w kontroli żywotność komórek traktowanych FC, co jest zbieżne z danymi cytometrycznymi.

W celu dalszej mikroskopowej analizy komórek w 14. dniu CLS, zastosowano barwniki TMRE oraz koniugat WGA-Alexa Fluor 488. TMRE to kationowy barwnik, który kieruje się do aktywnych mitochondriów, gdzie gromadzi się proporcjonalnie do potencjału błony mitochondrialnej ($\Delta\Psi_m$), emitując czerwoną fluorescencję. WGA to lektyna, która wiąże się z resztami N-acetylo-glukozaminy, będącymi głównym składnikiem bruzd podziałowych drożdży *S. cerevisiae*. Zatem, WGA-Alexa Fluor 488 barwi bruzdy podziałowe na zielono. Jak pokazano na rysunku 24A-B, w grupach traktowanych 1 i 0,5 mM FC zaobserwowano wyższą intensywność fluorescencji TMRE, wskazującą na wyższy $\Delta\Psi_m$ w porównaniu do kontroli. Co więcej, w obecności FC zauważono, że najstarsze replikacyjnie komórki w populacji (komórki z całkowicie zabarwioną ścianą komórkową przez WGA), wykazują intensywny sygnał TMRE, co sugeruje ich aktywność metaboliczną. Efekt ten był bardziej widoczny wraz ze wzrostem stężeń FC i nie obserwowany w warunkach kontrolnych.



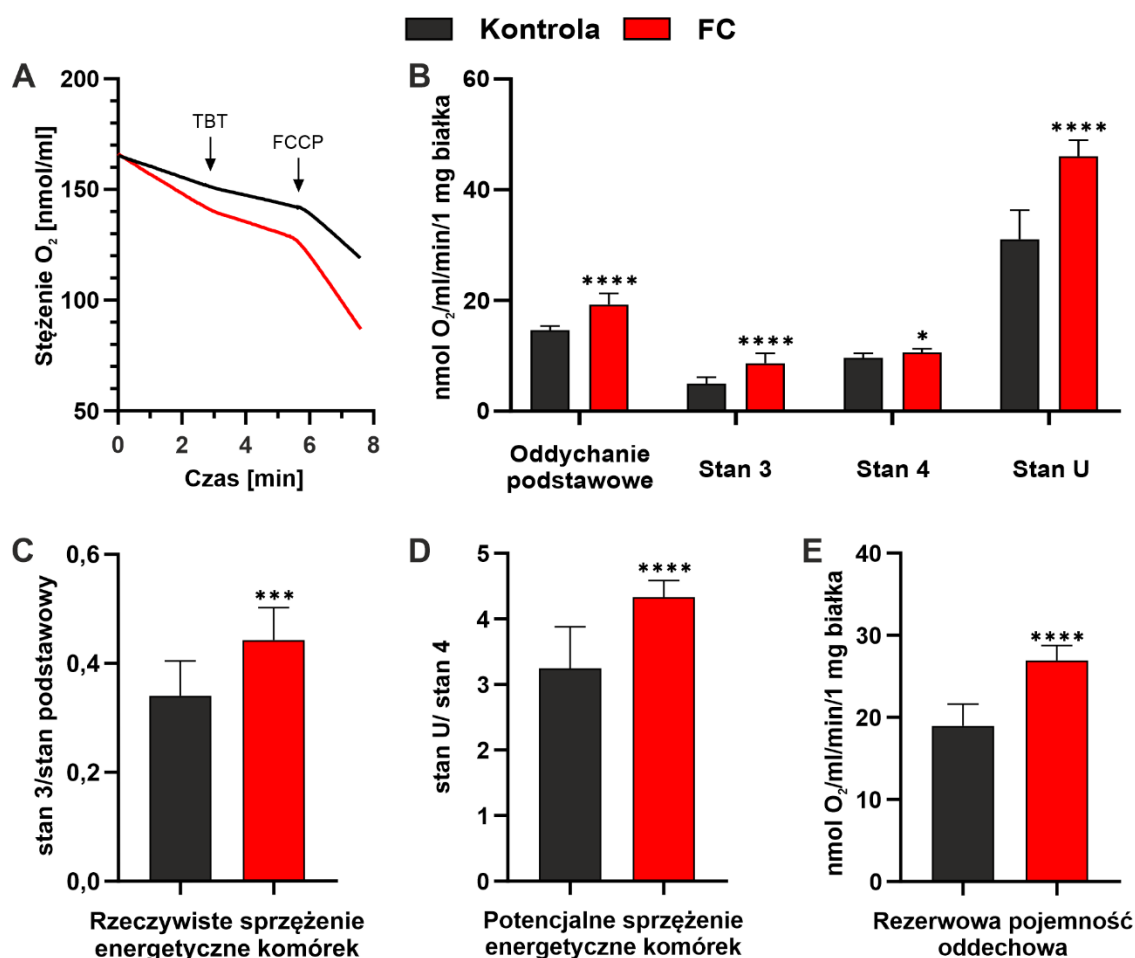
Rysunek 24. Potencjał błony mitochondrialnej i wielkość komórek drożdży w 14 dniu CLS. (A) Analiza mikroskopowa $\Delta\Psi_m$ i obecności bruzd podziałowych. Intensywność czerwonej fluorescencji (TMRE) zwiększa się wraz ze wzrostem $\Delta\Psi_m$. Kolorem zielonym (WGA-Alexa Fluor 488) wybarwione zostały bruzdy podziałowe. (B) Średnia intensywność fluorescencji TMRE przedstawiono jako średnią \pm SD z trzech niezależnych eksperymentów. (C) Wielkość komórek obliczona za pomocą funkcji ROI. Liczba komórek dla każdego z warunków: K = 544; 0,25 mM FC = 485; 0,5 mM FC = 342; 1,0 mM FC = 541. Istotność statystyczna względem kontroli: (ns) brak istotności, (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,001$, (***) $p < 0,001$, (****) $p < 0,0001$.

Następnie, została oszacowana wielkość drożdży, poprzez oznaczanie obszarów zajmowanych przez każdą komórkę na obrazach mikroskopowych, za pomocą funkcji ROI (rys. 24C). Zaobserwowano, że rozmiar komórek zmniejsza się wraz ze wzrostem stężenia FC. Średni obszar zajmowany przez komórki kontrolne wynosił około $16 \mu\text{m}^2$, podczas gdy komórek hodowanych w obecności 1 mM FC wynosił $12,18 \mu\text{m}^2$, co wskazuje na redukcję wielkości komórek o około 25%. W przypadku drożdży hodowanych w obecności $0,25$ i $0,5 \text{ mM}$ FC, różnica w porównaniu z kontrolą wynosiła około 10%. Podsumowując, w dniu 14 CLS, komórki drożdży traktowane FC wykazywały wyższy $\Delta\Psi_m$ niż kontrola, a efekt FC był zależny od dawki. W hodowlach traktowanych FC, najstarsze replikacyjnie komórki zachowywały aktywne mitochondria, podczas gdy w kontroli komórki te nie wykazywały aktywności mitochondrialnej. Wyniki te sugerują, że wzrost żywotności drożdży dzięki FC jest związany z jego pozytywnym wpływem na aktywność mitochondrialną.

4.2.2. Wpływ FC na aktywność mitochondriów

W kolejnym kroku zbadano status bioenergetyczny nienaruszonych komórek drożdżowych, używając systemu Oxygraph+. Do tej analizy wybrano najefektywniejsze stężenie FC z poprzedniego eksperymentu (1 mM) i zastosowano te same warunki hodowli. Analizę przeprowadzono we wczesnej fazie stacjonarnej wzrostu. Rysunek 25A przedstawia reprezentatywne zapisy pomiarów zużycia tlenu, które posłużyły do dalszych obliczeń parametrów oddechowych.

Podstawowe parametry oddechowe wskazują na wyraźnie wyższą aktywność oddechową drożdży hodowanych w obecności FC, niż w warunkach kontrolnych (rys. 25B). Znaczący wzrost podstawowego oddychania (o około 30%) był spowodowany głównie ponad 70% wzrostem poziomu stanu 3 (zużycie tlenu związane z syntezą ATP w mitochondriach), podczas gdy stan 4 (zużycie tlenu spowodowane przeciekaniem protonów przez błonę mitochondrialną) wzrósł tylko o 10%. Zaobserwowano również wzrost wartości stanu U (oddychanie maksymalne) o prawie 50%. Oznacza to, że w komórkach traktowanych FC podstawowe oddychanie stanowiło około 41% maksymalnego oddychania, podczas gdy w kontroli było to około 48%.

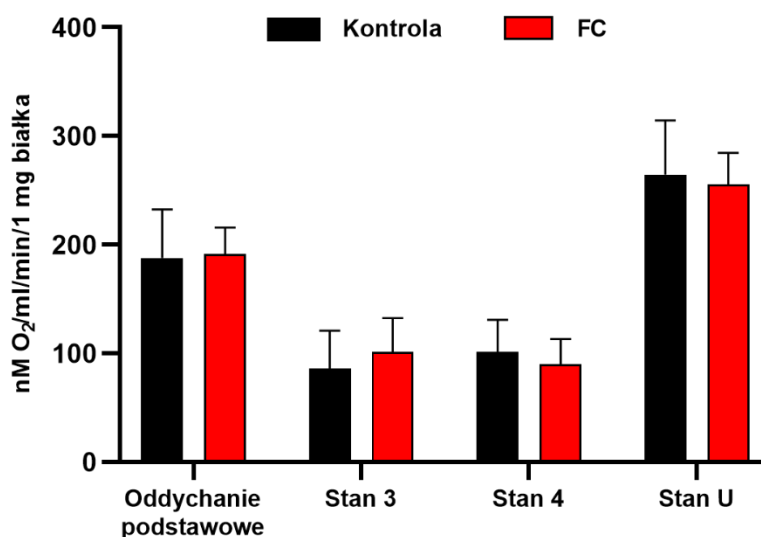


Rysunek 25. Analiza wpływu FC na parametry bioenergetyczne komórek drożdży w pożywce YPD. (A) Przykładowy zapis pomiaru szybkości zużycia tlenu. (B) Stany oddechowe obliczone dla drożdży hodowanych w warunkach kontrolnych (czarne słupki) oraz obecności FC (czerwone słupki), na podstawie wykonanych pomiarów. (C-E) Parametry pośrednie obliczone na podstawie wartości stanów oddechowych. Dane przedstawiono jako średnią \pm SD trzech niezależnych eksperymentów. Istotność statystyczna względem kontroli: (ns) brak istotności, (*) $p < 0,05$, (***) $p < 0,001$, (****) $p < 0,0001$.

Jak przedstawiono na rysunku 25C-E, istotnemu zwiększeniu uległy również parametry pośrednie. Stosunek stanu 3 do oddychania podstawowego, wyrażający rzeczywiste sprzężenie energetyczne komórek, jest większy o około 30%, co oznacza, że dochodzi do wzmożonej syntezy ATP w mitochondriach. Podobną zmianę zaobserwowano w przypadku potencjalnego sprzężenia energetycznego komórek, wyrażonego przez stosunek stanu U do stanu 4. Ponad 40% wzrost zauważono w przypadku rezerwowej pojemności oddechowej. Powyższe wyniki sugerują, że obecność FC wymusiło zmianę metabolizmu w kierunku fosforylacji oksydacyjnej i wyraźnego wzmocnienia aktywności mitochondriów w komórkach drożdżowych.

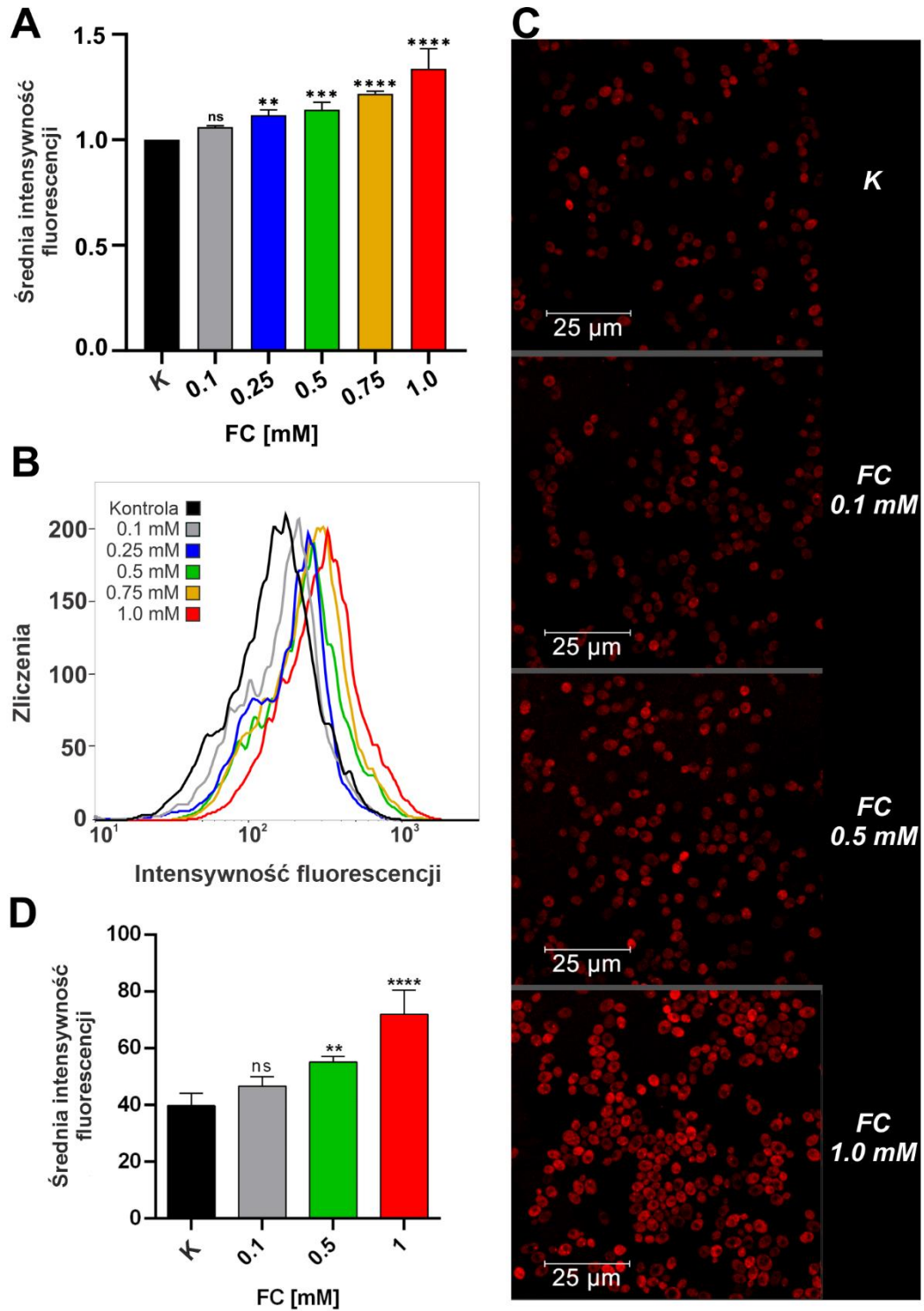
W obecności glukozy, drożdże *S. cerevisiae*, preferencyjnie przetwarzają energię na drodze fermentacji alkoholowej. Przejście na fosforylację oksydacyjną zachodzi, gdy zasoby glukozy w środowisku zostaną wyczerpane, a związki nie ulegające fermentacji, takie jak etanol, mleczan lub glicerol, zaczynają pełnić rolę źródła węgla [204, 205]. Wykorzystując to zjawisko, wykonano analizę wpływu FC na mitochondria drożdży w warunkach sprzyjających metabolizmowi oksydacyjnemu, zastępując glukozę w pożywce glicerolem.

Przeprowadzono analizę zużycia tlenu przez komórki drożdży na pożywce zawierającej glicerol (YPG), w sposób analogiczny do eksperymentu przeprowadzonego z pożywką YPD. Nie zaobserwowano jednak żadnego istotnego wpływu FC na parametry bioenergetyczne komórek hodowanych w tych warunkach (rys. 26).



Rysunek 26. Analiza wpływu FC na parametry bioenergetyczne komórek drożdży w pożywce YPG. Stany oddechowe obliczone dla drożdży hodowanych w warunkach kontrolnych (czarne słupki) oraz obecności FC (czerwone słupki). Dane przedstawiono jako średnią \pm SD trzech niezależnych eksperymentów. Nie odnotowano zmian istotnych statystycznie.

Zauważono jednak istotny, zależny od stężenia FC, wzrost $\Delta\Psi_m$ względem kontroli, o czym świadczy wyższa intensywność fluorescencji barwnika TMRE w analizach zarówno cytometrycznych, jak i mikroskopowych (rys. 27). W przypadku 1 mM FC, wzrost ten wyniósł około 35%.



Rysunek 27. Analiza zmian $\Delta\Psi_m$ w komórkach drożdży pod wpływem FC. (A,B) Wyniki analizy cytometrycznej przedstawiono jako średnią \pm SD z trzech niezależnych eksperymentów (A) oraz reprezentacyjny histogram (B). (C,D) Analiza mikroskopowa przedstawiona jako reprezentatywne obrazy (C) oraz średnia \pm SD z trzech niezależnych eksperymentów (D). Istotność statystyczna względem kontroli: (ns) brak istotności, (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$, (****) $p < 0,0001$.

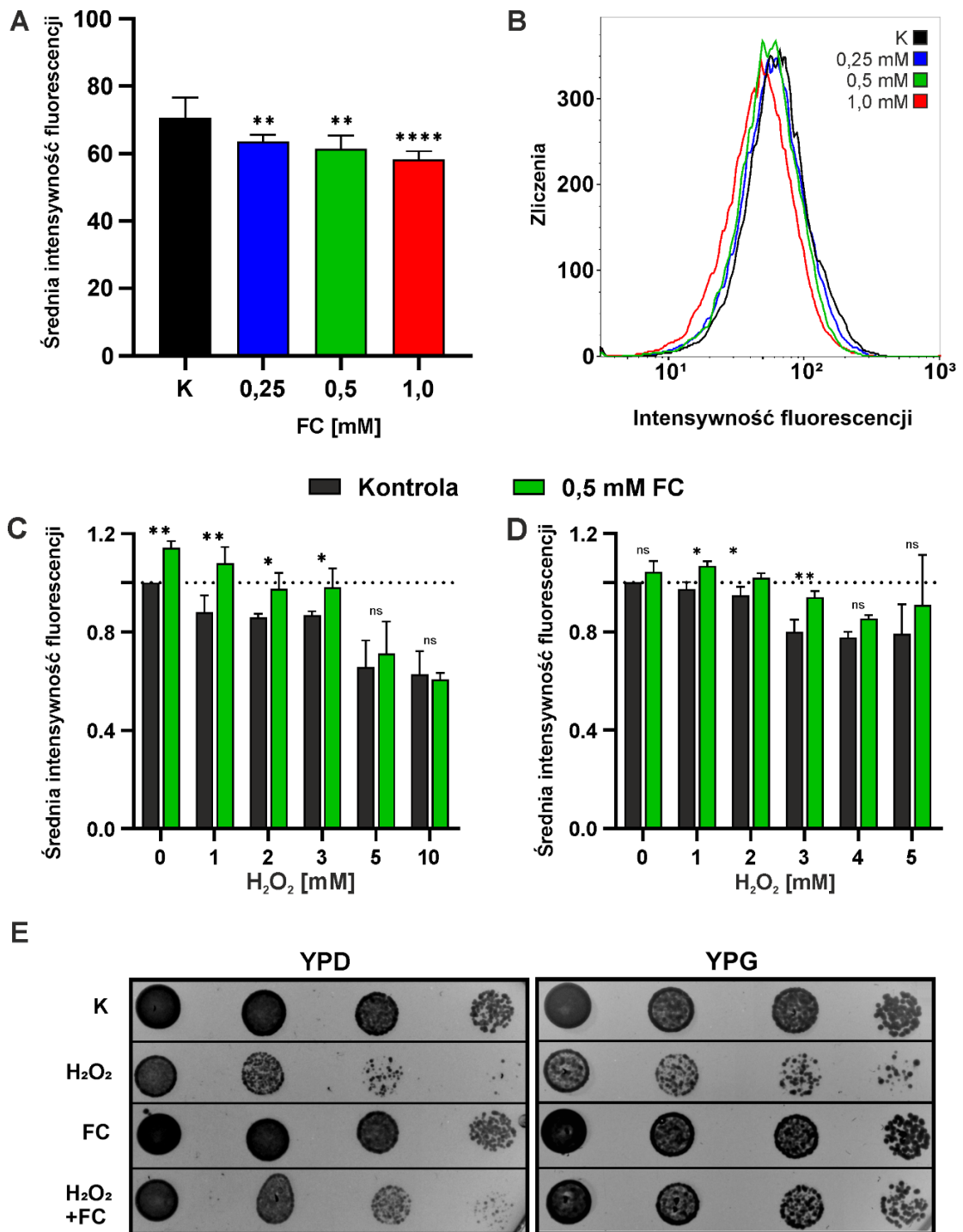
4.2.3. Właściwości antyoksydacyjne FC

Metabolizm tlenowy prowadzi do generowania RFT, głównie w postaci anionorodnika ponadtlenkowego (O^{2-}), jako produktu ubocznego oddychania, czyniąc tym samym mitochondria jednym z głównych źródeł RFT [206]. Akumulacja RFT przyczynia się do powstawania uszkodzeń mitochondrialnych i komórkowych, promując zarówno replikacyjne, jak i chronologiczne starzenie się drożdży [207]. Jednakże, poprawne działanie łańcucha oddechowego zapobiega niekontrolowanemu wyciekowi protonów, a tym samym redukuje produkcję RFT [208, 209]. Innym źródłem RFT w drożdżach jest aktywność oksydaz NADPH, które produkują O^{2-} , nadtlenek wodoru (H_2O_2) oraz rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$) podczas fermentacji [205].

Aby określić wpływ FC na poziom RFT, drożdże hodowano w obecności 0,25, 0,5 lub 1 mM FC i przeprowadzono analizę za pomocą cytometrii przepływowej i barwnika H_2DCFDA . Sonda ta, na skutek reakcji z RFT emituje zieloną fluorescencję. Wykazano, że FC w sposób zależny od dawki zmniejsza poziom RFT w komórkach drożdżowych, co zaobserwowano jako spadek intensywności fluorescencji do 20% w przypadku komórek traktowanych 1 mM FC, w porównaniu z kontrolą (rys. 28A-B).

Następnie, za pomocą cytometrii przepływowej i barwnika TMRE, oceniono wpływ FC na potencjał błony mitochondrialnej w warunkach stresu oksydacyjnego (SO) indukowanego H_2O_2 . W tym celu zastosowano dwa podejścia. W podejściu ochronnym, drożdże hodowano przez noc w obecności 0,5 mM FC, a następnie inkubowano z dodatkiem H_2O_2 przez 2 godziny. Z kolei w podejściu regeneracyjnym, drożdże inkubowano z H_2O_2 przez 2 godziny, a następnie z FC przez kolejną godzinę. Wykazano, że w zakresie stężeń 1-3 mM H_2O_2 , drożdże hodowane w obecności FC, wykazują $\Delta\Psi_m$ na poziomie wyższym niż kontrola i zbliżonym do kontroli niestresowanej. Obserwowany efekt ma charakter zarówno ochronny (rys. 28C) jak i regeneracyjny (rys. 28D). W przypadku wyższych stężeń H_2O_2 (powyżej 3 mM), efekt nie był obserwowany.

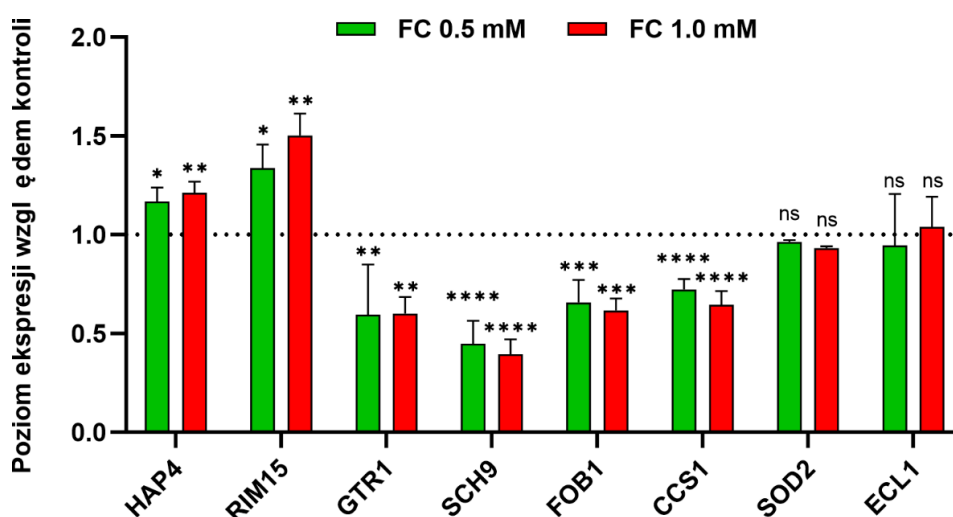
Na końcu przeprowadzono analizę żywotności drożdży hodowanych w warunkach indukowanego SO, polegającą na obserwacji wzrostu kolonii na szalce z pożywką stałą YPD lub YPG (rys. 28E). Zaobserwowano, że w warunkach SO, drożdże hodowane w obecności FC wykazują wyższą żywotność, niż kontrola.



Rysunek 28. Analiza właściwości antyoksydacyjnych FC w modelu drożdżowym. (A-B) Cytometryczna analiza wpływu FC na poziom RFT. Dane przedstawiono jako średnią \pm SD z trzech niezależnych eksperymentów (A), oraz reprezentacyjny histogram (B). (C-D) Cytometryczna analiza wpływu FC na $\Delta\Psi_m$. Podejście ochronne (C) oraz regeneracyjne (D). (E) Analiza żywotności drożdży hodowanych w warunkach indukowanego stresu oksydacyjnego. Istotność statystyczna względem kontroli: (ns) brak istotności, (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (****) $p < 0,0001$

4.2.4. Wpływ FC na poziom ekspresji wybranych genów

W ostatnim etapie zbadano wpływ FC na poziom ekspresji wybranych genów przy użyciu metody PCR w czasie rzeczywistym (rys. 29; tabela 4). Wybrano geny zaangażowane w odpowiedź na dostępność składników odżywczych i drożdżowy szlak TORC1 (*Gtr1*, *Sch9*, *Rim15*), odpowiedź przeciwko stresowi oksydacyjnemu (*Sod2* i *Ccs1*), aktywację oddychania mitochondrialnego (*Hap4*), proces replikacji (*Fob1*) oraz wydłużanie chronologicznej długości życia (*Ecl1*).



Rysunek 29. Analiza wpływu FC na poziom ekspresji wybranych genów u drożdży. Dane dla warunków eksperymentalnych względem kontroli przedstawiono jako średnią \pm SD z trzech niezależnych eksperymentów. Istotność statystyczna względem kontroli: (ns) brak istotności, (*) $p < 0,01$, (**) $p < 0,001$, (***) $p < 0,0001$.

Zauważono różnorodny wpływ FC na poziom ekspresji genów związanych z obroną antyoksydacyjną. Ekspresja genu kodującego mitochondrialną dysmutazę nadadtlenkową (*Sod2*) pozostała niezmienną, pomimo zwiększonej aktywności oddychania komórkowego. Natomiast poziom ekspresji genu, kodującego białko opiekuńcze dla dysmutazy nadadtlenkowej SOD1 (*Ccs1*), został zredukowany o ponad 25%. Białko *Ccs1* jest konieczne dla aktywności cytoplazmatycznej dysmutazy *Sod1*, która prócz neutralizacji RFT, jest zaangażowana w zależną od glukozy represję oddychania tlenowego [30,31]. Podobnie, zaobserwowano redukcję ekspresji dwóch genów (*Gtr1*, *Sch9*) zaangażowanych w szlak TORC1, promujący metabolizm fermentacyjny i szybki wzrost komórek w odpowiedzi na dostępność glukozy. Gen *Gtr1*

jest zaangażowany w aktywację TORC1, a gen *Sch9* koduje bezpośrednio zależną od niego kinazę. Zmniejszenie ekspresji obu tych genów sugeruje zahamowanie szlaku TORC1 pod wpływem FC. Potwierdza to również zaobserwowany wzrost inhibowanej przez TORC1 ekspresji genu *Rim15*, odgrywającego kluczową rolę dostosowaniu drożdży do warunków ograniczonej dostępności składników odżywczych. Wzrost poziomu ekspresji zaobserwowano również w przypadku genu *Hap4*, który aktywuje metabolizm mitochondrialny poprzez kontrolę ekspresji genów zaangażowanych w fosforylację oksydacyjną. Znaczącemu zmniejszeniu (około 40%) uległa ekspresja genu *Fob1*. Gen ten, uznawany za gen długowieczności, zaangażowany jest w generowanie pozachromosomowych kolistych cząsteczek rDNA (ang. *extrachromosomal rDNA circles*, ERCs). Akumulacja ERC w komórkach drożdżowych jest uznawana za znak starzenia się. Natomiast nie zaobserwowano żadnych zmian w przypadku ekspresji genu *Ecl1* (ang. *extender of the chronological lifespan*).

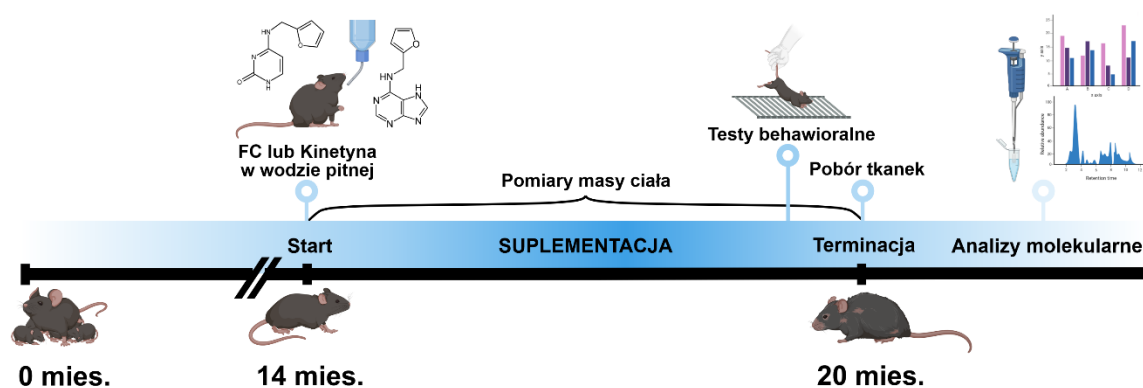
Tabela 4. Zestawienie zmian w poziomie ekspresji genów u drożdży pod wpływem FC.

Znaczenie komórkowe	Gen	Zmiana ekspresji	Funkcja produktu
Ochrona antyoksydacyjna	<i>Ccs1</i>	↓↓	Białko opiekuńcze dla SOD1, konieczne dla aktywności SOD1
	<i>Sod2</i>	Brak zmian	Dysmutaza ponadtlenkowa 2, zlokalizowana w mitochondriach
Odpowiedź na składniki odżywcze i szlak TORC1	<i>Gtr1</i>	↓↓↓	GTPaza odpowiedzialna za aktywację szlaku TORC1
	<i>Sch9</i>	↓↓↓	Kinaza bezpośrednio zależna od TORC1
	<i>Rim15</i>	↑↑	Kinaza zaangażowana w adaptację drożdży do warunków niedoboru składników odżywczych
Replikacja	<i>Fob1</i>	↓↓	Białko zaangażowane w blokadę replikacji w rejonie rDNA
Oddychanie komórkowe	<i>Hap4</i>	↑	Aktywacja ekspresji genów związanych z oddychaniem
Nieznana	<i>Ecl1</i>	Brak zmian	Związek z wydłużoną CLS drożdży

4.3. Model myszy

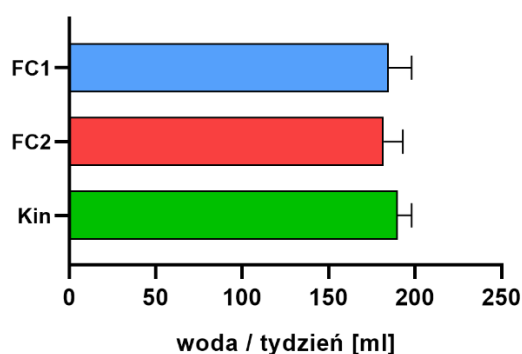
4.3.1. Wprowadzenie

Rozpoczynając od 14 miesiąca życia, przez 6 kolejnych miesięcy, myszom podawano FC (grupy FC1 i FC2) lub kinetynę (grupa Kin) w postaci rozpuszczonej w wodzie pitnej. Grupie kontrolnej (K/K20) podawano czystą wodę pitną. Schemat eksperymentu przedstawiono na rysunku 30. Osobne grupy, stanowiące kontrolę dla zmian zachodzących z wiekiem w części eksperymentów, złożone były z myszy 6- i 12-miesięcznych (grupy K6 i K12).



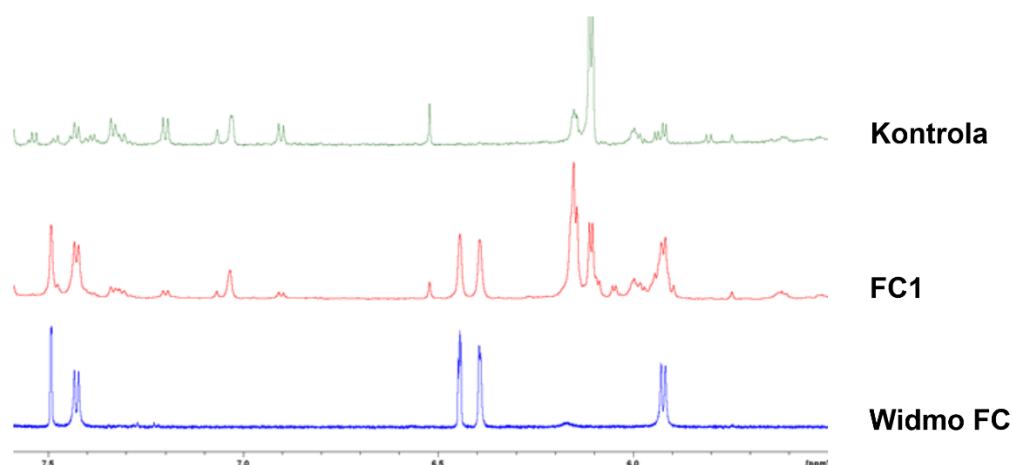
Rysunek 30. Plan eksperymentu z udziałem myszy.

Ze względu na sposób podawania związków, przy każdorazowej wymianie płynów, monitorowano ich wypitą objętość. Jak pokazano na rysunku 31, tygodniowa objętość płynów, wypijanych przez osobniki przebywające w jednej klatce hodowlanej, wynosiła średnio ok. 185 ml, co stanowiło ok. 74% przygotowanej dawki. Objętość płynu wypijanego przez osobniki nie różniła się pomiędzy grupami eksperymentalnymi.



Rysunek 31. Średnia objętość płynów wypijanych tygodniowo przez myszy C57BL/6J. Wykres przedstawia średnią \pm SD objętość płynu, którą każdego tygodnia wypijała grupa myszy (5 osobników) przebywających w jednej klatce hodowlanej i należącej do danej grupy eksperymentalnej. Brak istotności statystycznej.

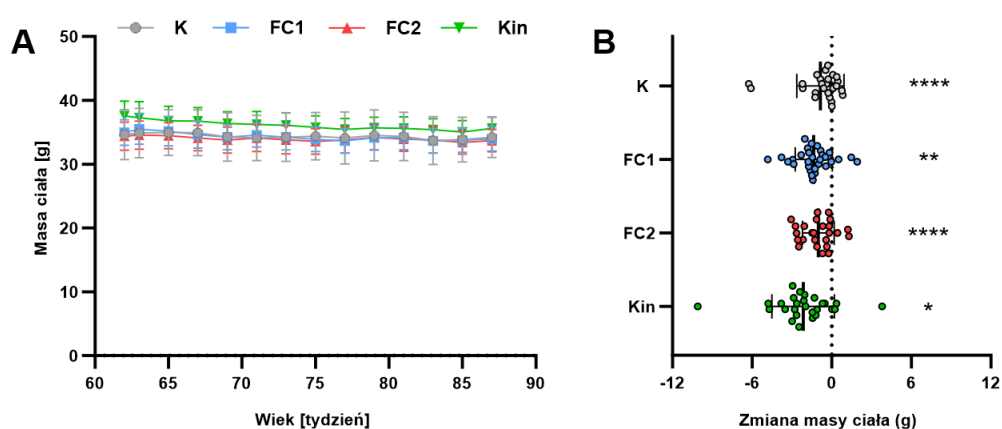
W celu zbadania, czy FC pokonuje barierę krew-mózg, przygotowano ekstrakty z mózgu myszy suplementowanych FC oraz kontrolnych, a następnie przeprowadzono oznaczanie za pomocą wysokorozdzielczej spektroskopii NMR. Jak pokazano na rysunku 32, w zarejestrowanych widmach uzyskanych z ekstraktów mózgow myszy suplementowanych FC (widmo środkowe, kolor czerwony), zidentyfikowano charakterystyczne dla FC sygnały (widmo dolne, kolor niebieski), nieobecne w ekstraktach uzyskanych z mózgow myszy kontrolnych (widmo górne, kolor zielony). Uzyskany wynik wskazuje więc, że FC obecne jest w mózgu suplementowanych zwierząt, a więc pokonuje barierę krew-mózg.



Rysunek 32. Analiza obecności FC w mózgu. Reprezentatywne widma analizy NMR przeprowadzone z ekstraktów mózgu myszy kontrolnej (kolor zielony) i suplementowanej FC (kolor czerwony). Widmo charakterystyczne dla FC przedstawiono kolorem niebieskim.

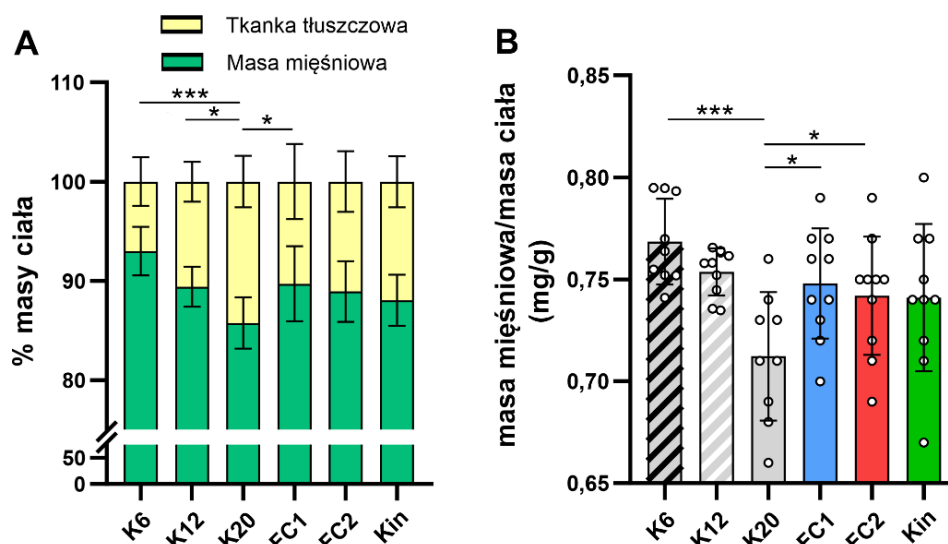
4.3.2. Analiza zmian masy i kompozycji składu ciała

Przez cały okres trwania eksperymentu, myszy były regularnie ważone. Zmiany średniej masy ciała osobników należących do poszczególnych grup przedstawiono na rysunku 33. Średnia masa ciała osobników we wszystkich grupach spadła w trakcie trwania eksperymentu (rys. 33B). Różnica pomiędzy wartością początkową, a końcową wynosiła 0,85; 1,36; 1 i 2,1 g dla grup odpowiednio K, FC1, FC2 i Kin. Nie odnotowano jednak istotnych statystycznie zmian w tempie utraty masy ciała pomiędzy poszczególnymi grupami (rys. 33A)



Rysunek 33. Wykres zmian masy ciała myszy biorących udział w eksperymencie. (A) Zmiany średniej masy ciała osobników należących do grup eksperymentalnych. (B) Zmiana średniej masy ciała myszy pomiędzy początkiem a końcem eksperymentu. oznaczone kolorami: K – szary; FC1 – niebieski; FC2 – czerwony; Kin – zielony. Istotność statystyczna: (*) $p < 0,05$, () $p < 0,01$, (****) $p < 0,0001$.**

Istotne statystycznie różnice pomiędzy grupami odnotowano jednak w przypadku kompozycji składu ciała (rys. 34A). Analizę przeprowadzono po zakończeniu suplementacji, na dziesięciu losowo wybranych osobnikach z każdej grupy badawczej, oraz dla 6- i 12-miesięcznych (K6 i K12) myszy jako odniesienia co do kierunku zmian zachodzących z wiekiem. Osobniki należące do grupy FC1 odznaczały się niższą zawartością tkanki tłuszczowej, a wyższą tkanki mięśniowej, niż grupa kontrolna (K20). Co ciekawe, wartości te były zbliżone do grupy K12, co może sugerować spowolnienie zmiany zachodzącej z wiekiem. Podobny trend zaobserwowano w przypadku grupy FC2, jednak ze względu na rozrzut wyników w grupie, nie stwierdzono istotności statystycznej.



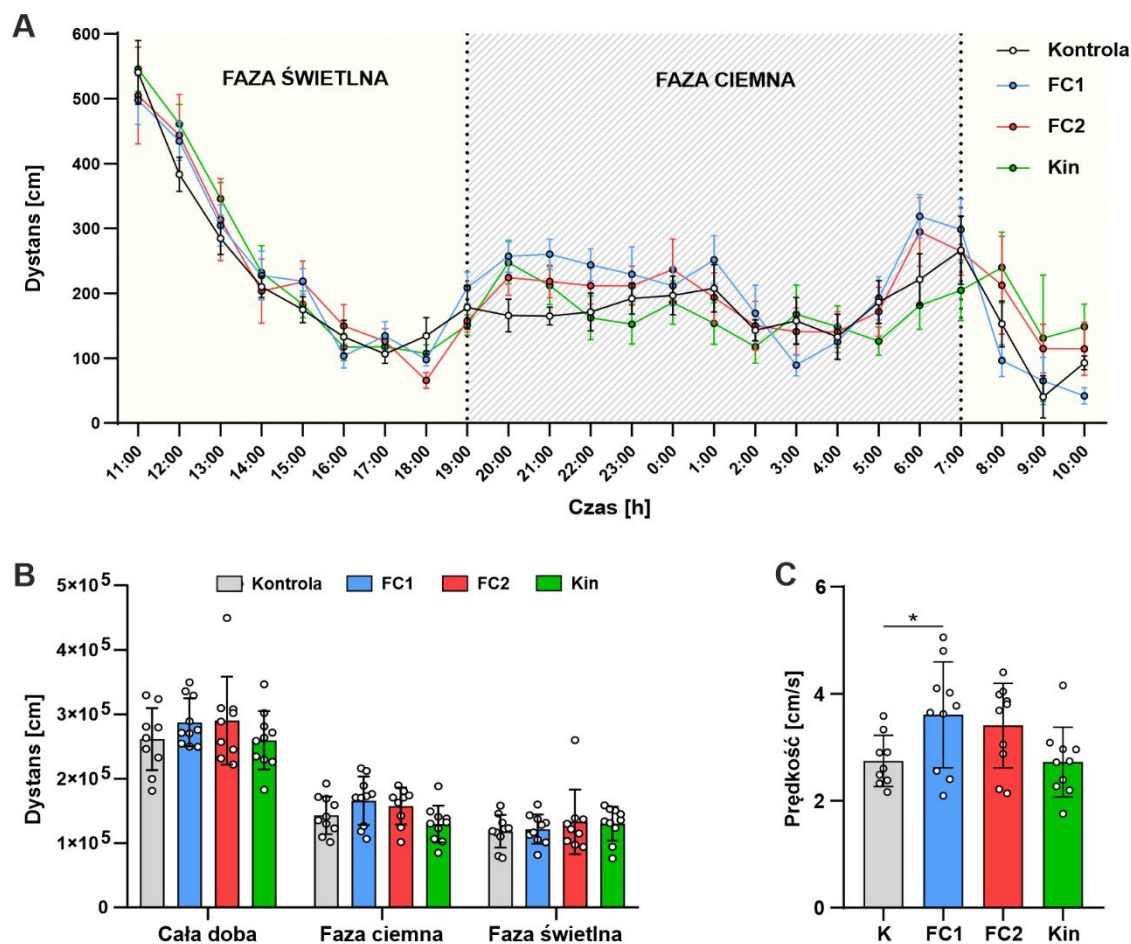
Rysunek 34. Analiza składu ciała myszy. (A) Wyrażona w procentach zawartość tkanki tłuszczowej (żółty słupek) oraz masy mięśniowej (zielony słupek) (B) Stosunek masy mięśniowej (mg) do masy ciała (g). Wyniki przedstawione jako średnia \pm SD, N = 20 na grupę. Istotność statystyczna względem K20: (*) $p < 0,05$, (***) $p < 0,001$.

Na podstawie uzyskanych wyników analizy składu ciała, obliczono stosunek masy mięśniowej do całkowitej masy ciała (rys. 34B), którego niższe wartości mogą świadczyć o sarkopenii [210, 211]. Faktycznie, zaobserwowano, że z wiekiem wartość tego stosunku spada, o czym świadczą różnice pomiędzy grupami K6, K12 i K20. Myszy z grup FC1, FC2 oraz Kin odznaczały się wyższą wartością tego parametru, niż myszy kontrolne (K20), zbliżając się do wartości uzyskanej dla myszy 12-miesięcznych (K12). Otrzymane wyniki mogą świadczyć o zahamowaniu związanej z wiekiem utraty siły mięśniowej.

4.3.3. Ocena aktywności i funkcji lokomotorycznych badanych zwierząt

Starzenie związane jest ze stopniową utratą siły sprawności ruchowej, co związane jest m.in. z postępującą sarkopenią [212, 213]. W celu oceny funkcji lokomotorycznych zwierząt, po 6 miesiącach podawania związków, przeprowadzono serię testów behawioralnych, obejmującą monitoring aktywności dobowej, test prętów statycznych, bieżni obrotowej i siły chwytu oraz test zlewkowy.

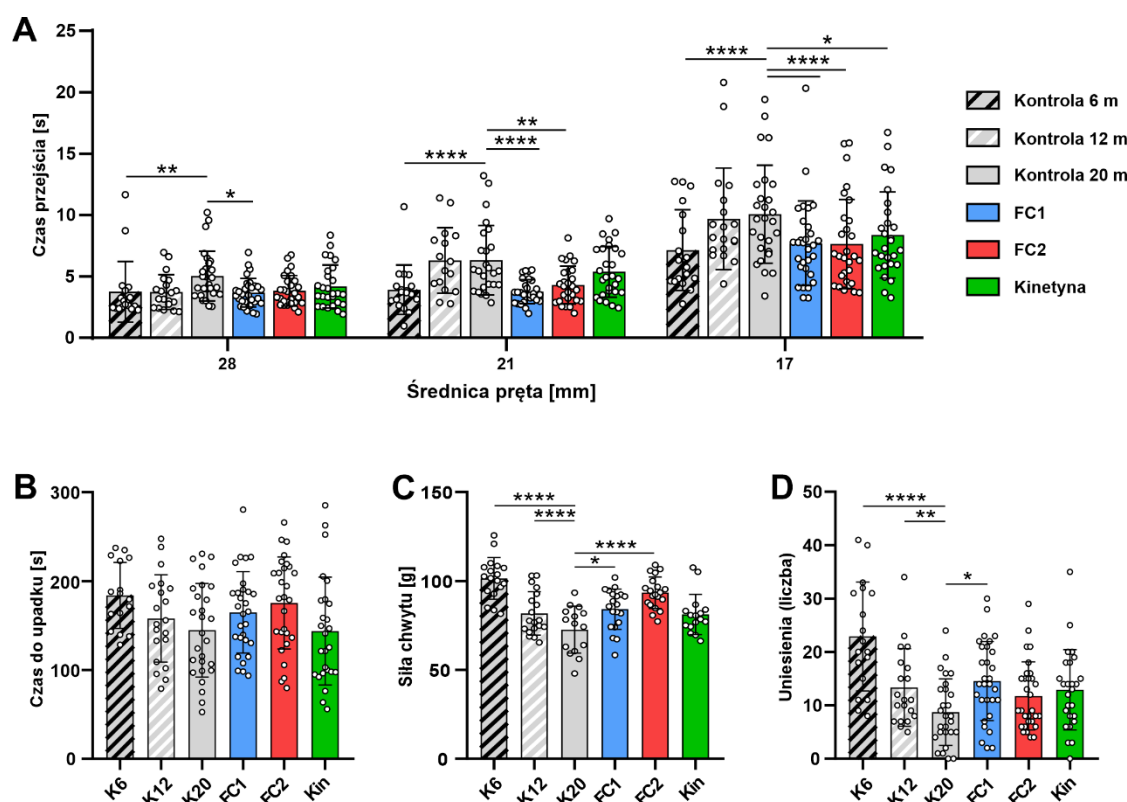
Monitoring aktywności dobowej myszy przeprowadzono korzystając z klatki ActiMot. Zwierzę umieszczano w klatce, a następnie rejestrowano jego aktywność lokomotoryczną przez 24 h. Średni dystans, jaki w poszczególnych godzinach pomiaru przebywały osobniki należące do danej grupy, przedstawiono na rysunku 35A.



Rysunek 35. Analiza dobowej aktywności myszy z wykorzystaniem systemu ActiMot. (A) Średni dystans przebyty przez osobniki należące do danej grupy w kolejnych godzinach eksperymentu. (B) Średni dystans przebyty przez osobniki w trakcie całej doby oraz w fazie ciemnej i jasnej. (C) Średnia prędkość, z którą poruszały się myszy w fazie ciemnej. Wyniki przedstawione jako średnia \pm SD, $N = 10$ (na grupę). Istotność statystyczna względem K: (*) $p < 0,05$. Brak gwiazdek świadczy o braku istotności.

W pierwszych godzinach obserwowano wysoką, lecz malejącą aktywność ruchową we wszystkich grupach, co z pewnością miało związek z adaptacją myszy do nowego otoczenia. W fazie świetlnej, która u gryzoni jest fazą spoczynku, nie zaobserwowano żadnych różnic pomiędzy grupami. Wzrost aktywności zaobserwowano w fazie ciemnej. Myszy zarówno z grupy FC1, jak i FC2, pokonywały w tej fazie większy dystans oraz poruszały się z większą średnią prędkością (rys. 35B-C). Jednakże, istotność statystyczną stwierdzono jedynie w przypadku średniej prędkości poruszania się myszy z grupy FC1, w porównaniu z grupą kontrolną.

Wyniki pozostałych testów behawioralnych, a więc testów prętów statycznych, bieżni obrotowej, siły chwytu oraz zlewkowego, przedstawiono na rysunku 36. Zgodnie z oczekiwaniami zauważono, że osobniki z kontrolnych grup starszych, uzyskały gorsze wyniki od osobników młodszych. Z kolei myszy stare, którym podawano FC, osiągały istotnie lepsze wyniki od myszy kontrolnych w tym samym wieku (K20), tj. w krótszym czasie przechodziły po pręcie (rys. 36A) oraz odznaczały się większą siłą chwytu (rys. 36C). W przypadku testu prętów obrotowych, odnotowano odwrócenie obserwowanego z wiekiem trendu skrócenia czasu utrzymywania się na pręcie, jednak uzyskane różnice średnich wyników nie są istotne statystycznie (rys. 36B). W teście zlewkowym, w którym na podstawie liczby uniesień na tylne kończyny, oceniano chęć poznawania otoczenia przez zwierzę zaobserwowano, że myszy z grupy FC1 unosiły się większą liczbą razy w ciągu trwania eksperymentu, niż myszy kontrolne (rys. 36D). Myszy suplementowane kinetyną również uzyskiwały lepsze średnie wyniki niż myszy kontrolne (K20), jednak istotne statystycznie różnice odnotowano jedynie w przypadku czasu przejścia przez pręt o średnicy 17 mm w teście prętów statycznych.

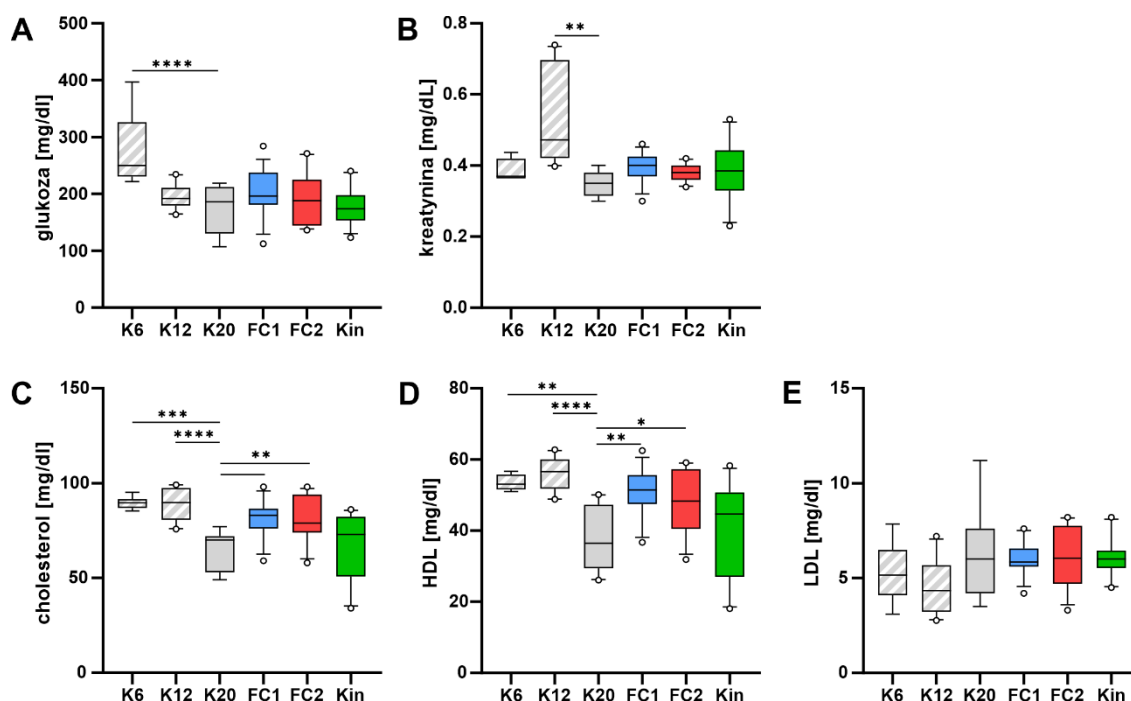


Rysunek 36. Wyniki testów behawioralnych myszy. (A) Test prętów statycznych (staticrod). (B) Test bieżni obrotowej (rotarod) (C) Siła chwytu (D) Test zlewkowy. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SD, $N \geq 20$ na grupę. Istotność statystyczna względem K20: (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$, (****) $p < 0,0001$.

Wyniki testów behawioralnych pokazały, że FC korzystnie wpływa na poprawę funkcji poznawczych i lokomotorycznych u starych osobników (20 miesięcy) suplementowanych badanym związkiem w porównaniu do grypy zwierząt kontrolnych, będących w tym samym wieku. Należy podkreślić, że w obu grupach zwierząt przyjmujących FC sprawność fizyczna i funkcje poznawcze przewyższały lub utrzymywały się na poziomie wyników osiągniętych przez nietraktowane 12-miesięczne osobniki. W grupie zwierząt suplementowanych kinetyną również zaobserwowano poprawę ogólnego stanu psychofizycznego zwierząt, jednak osiągnięte wyniki testów behawioralnych były na niższym poziomie, w porównaniu do myszy przyjmujących FC.

4.3.4. Analiza zmian w parametrach biochemicznych krwi

Po zakończonych eksperymentach, z krwi pobranej przy uśmiercaniu zwierząt oddzielano surowicę, w celu oznaczenia parametrów biochemicznych krwi, takich jak poziom glukozy, kreatyniny, cholesterolu całkowitego oraz lipoprotein o wysokiej (HDL) i niskiej gęstości (LDL).

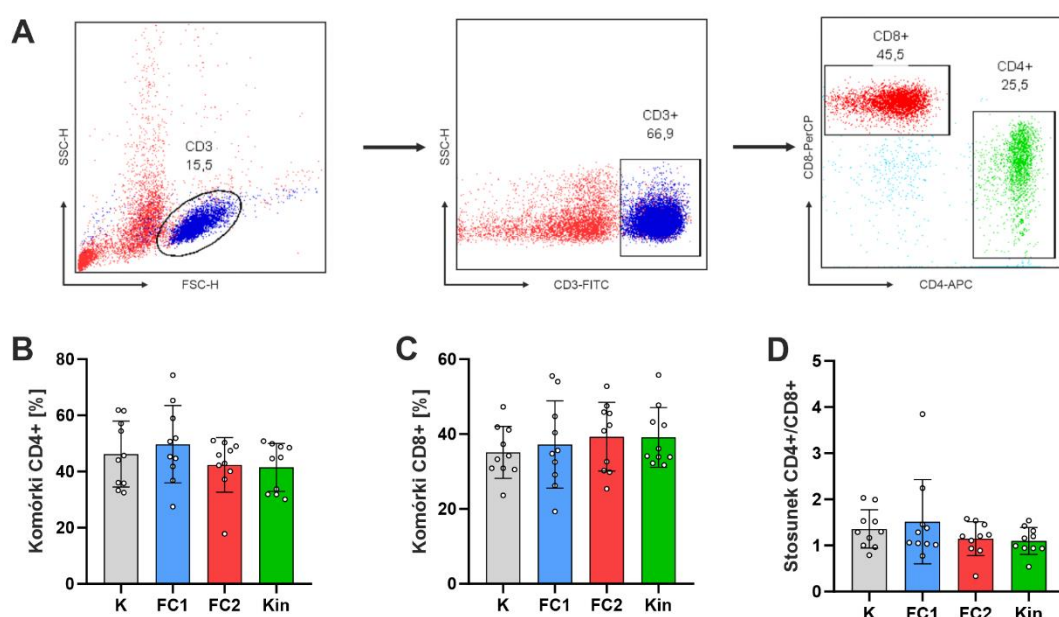


Rysunek 37. Badanie parametrów biochemicznych krwi. W badaniu oznaczono poziom (A) glukozy, (B) kreatyniny, (C) całkowitego cholesterolu, (D) HDL i (E) LDL we krwi myszy. Wyniki przedstawione jako średnia \pm SD, $N \geq 10$ na grupę. Istotność statystyczna względem K20: (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$, (****) $p < 0,0001$.

Pomiędzy poszczególnymi grupami eksperymentalnymi, w przypadku myszy starych, nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w poziomie glukozy (rys. 37A) i kreatyniny (rys. 37B). Natomiast u zwierząt przyjmujących FC odnotowano wyższy poziom cholesterolu całkowitego (rys. 37C) oraz HDL (rys. 37D), przy niezmiennym poziomie LDL (rys. 37E), w porównaniu do osobników kontrolnych będących w tym samym wieku. Należy podkreślić, że wyniki oznaczenia u osobników suplementowanych FC były zbliżone do tych uzyskanych dla młodszych, 12-miesięcznych osobników kontrolnych. W odniesieniu do starych myszy kontrolnych, nie odnotowano istotnych różnic w przypadku osobników suplementowanych kinetyną.

4.3.5. Analiza funkcji układu odpornościowego

Analiza cytometryczna markerów CD3, CD4 i CD8 jest standardową metodą identyfikacji limfocytów T pomocniczych oraz cytotoksycznych (rys. 38A). Prawidłowy stosunek limfocytów T pomocniczych do cytotoksycznych w zdrowej populacji myszy wynosi około 2, przy czym z wiekiem obserwuje się spadek tej wartości [214].



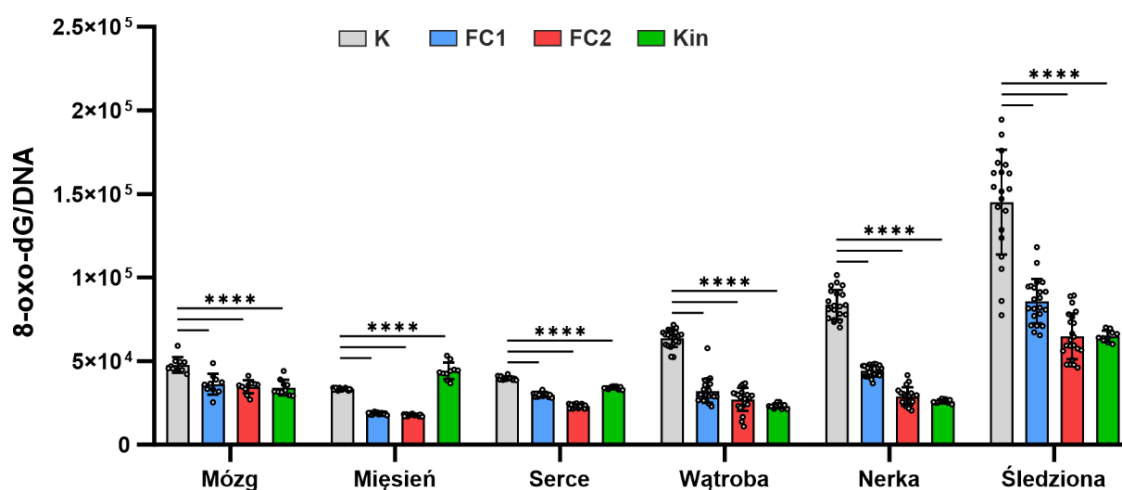
Rysunek 38. Cytometryczna analiza komórek jądrzastych krwi myszy. (A) Schemat przeprowadzonej analizy. Limfocyty T z wyizolowanych PBMC identyfikowano na podstawie markera CD3, a następnie, spośród komórek CD3+, wyróżniano limfocyty T pomocnicze (CD4+) oraz cytotoksyczne (CD8+). (B) Średni odsetek limfocytów T pomocniczych w populacji limfocytów T. (C) Średni odsetek limfocytów T cytotoksycznych w populacji limfocytów T. (D) Średni stosunek limfocytów T pomocniczych do cytotoksycznych. Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD, N = 10 na grupę. Brak istotności statystycznej.

Zaobserwowano, że we krwi badanych myszy, w populacji komórek CD3+, średni odsetek komórek CD4+ wynosi około 45%, z kolei komórek CD8+ około 37% (rys. 38B-C). Wartości te są zbliżone dla każdej z badanych grup. Również stosunek jednych komórek do drugich jest podobny i wynosi >1 w każdej z grup (rys. 38D). Uzyskane wyniki sugerują więc brak wpływu badanych związków na ten aspekt układu odpornościowego.

4.3.6. Wpływ FC i kinetyny na poziom markerów stresu oksydacyjnego

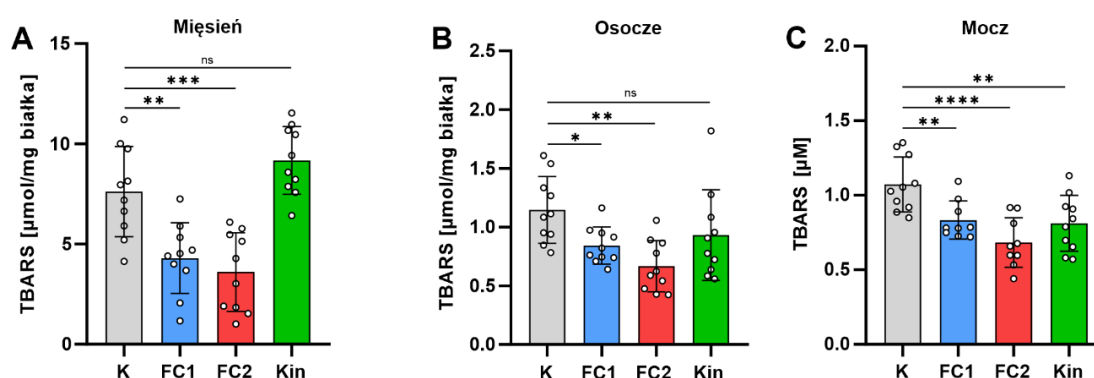
W procesie starzenia dochodzi do akumulacji uszkodzeń związanych z RFT, co wynika nie tylko z ich wzmożonej produkcji, lecz także z upośledzenia mechanizmów naprawczych. Do głównych markerów stresu oksydacyjnego należą oksydacyjne uszkodzenia DNA (głównie 8-oxodG), lipidów (peroksydacja lipidów) i białek (karbonylacja białek).

Poziom oksydacyjnych uszkodzeń kwasów nukleinowych określano oznaczając zawartość 8-oxodG w DNA izolowanym z tkanek mysich za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku 39. Zaobserwowano, że u myszy suplementowanych FC, poziom 8-oxodG we wszystkich tkankach, a więc mózgu, mięśni szkieletowych, serca, wątroby, nerki i śledziony, jest znacząco niższy niż w grupie kontrolnej, co świadczy o obniżeniu stresu oksydacyjnego pod wpływem badanych związków. Najsilniejszy efekt stwierdzono w próbach pochodzących z mięśni, wątroby i nerek, gdzie zaobserwowano ponad dwukrotnie niższą zawartość 8-oxodG, niż w grupie kontrolnej. W przypadku osobników suplementowanych kinetyną również stwierdzono znacząco niższy poziom 8-oxodG niż w kontroli, za wyjątkiem prób pochodzących z mięśni szkieletowych, gdzie odnotowano istotnie wyższą zawartość 8-oxodG.



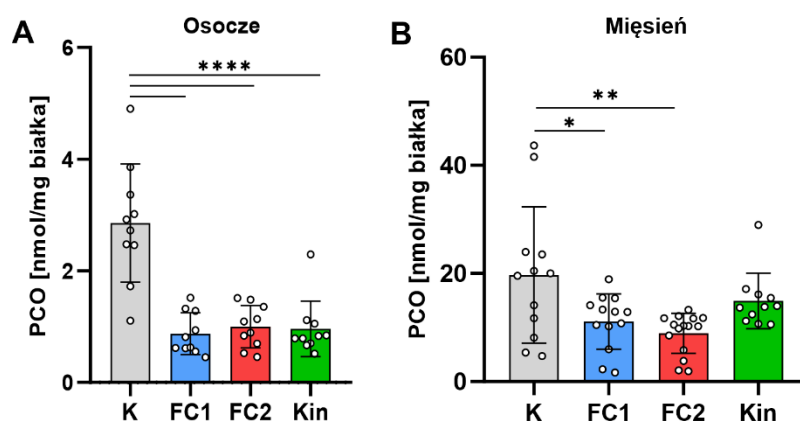
Rysunek 39. Wpływ FC i kinetyny na poziom 8-oxodG w tkankach mysich. Poziom 8-oxodG w DNA izolowanym z tkanek mózgu, mięśni szkieletowych, serca, wątroby, nerki oraz śledziony oznaczano za pomocą HPLC. Kolorem szarym zaznaczono kontrolę, niebieskim FC1, czerwonym FC2, a zielonym kinetynę. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SD, $N = 10$ (mózg), oraz $N \geq 20$ (pozostałe tkanki). Istotności statystyczna względem kontroli: (****) $p < 0,0001$.

Poziom peroksydacji lipidów w próbkach moczu, osocza i mięśni szkieletowych oznaczano metodą opierającą się na kolorymetrycznym pomiarze stężenia substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS, ang. *thiobarbituric acid reactive substances*), do których należą peroksydowane lipidy. Wyniki analizy przedstawiono na rysunku 40. Zaobserwowano, że w moczu, osoczu oraz lizatach mięśni szkieletowych myszy suplementowanych FC, stężenie TBARS jest istotnie niższe niż w u myszy kontrolnych, co świadczy o niższym poziomie peroksydacji lipidów u tych osobników, a obserwowany efekt jest zależny od podawanej dawki. Największą różnicę odnotowano w przypadku mięśni, gdzie stwierdzono niemal dwukrotnie niższe stężenie TBARS, niż u zwierząt kontrolnych. W przypadku myszy suplementowanych kinetyną, obniżenie stężenia TBARS względem grupy kontrolnych stwierdzono w próbach moczu, nie zaobserwowano jednak zmian w osoczu oraz lizatach mięśni szkieletowych. Uzyskane wyniki są więc tożsame z tymi uzyskanymi dla 8-oxodG i sugerują obniżenie stresu oksydacyjnego pod wpływem FC oraz niejednoznaczny efekt w przypadku kinetyny.



Rysunek 40. Wpływ FC na poziom peroksydacji lipidów u myszy. Oksydacyjne uszkodzenia lipidów (peroksydacja) oznaczano metodą kolorymetryczną z wykorzystaniem kwasu tiobarbiturowego (TBARS) w tkance mięśniowej (A), w osoczu krwi (B) oraz moczu (C). Kontrole oznaczono kolorem szarym, FC1 niebieskim, FC2 czerwonym, a kinetynę zielonym. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SD, $N = 10$. Istotność statystyczna względem kontroli: (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (****) $p < 0,0001$.

Poziom karbonylacji białek (PCO, ang. *protein carbonyls*) w surowicy krwi oraz mięśniach szkieletowych myszy oznaczano kolorymetryczną metodą z wykorzystaniem 2,4-dinitrofenylohydrazyny (DNPH). Metoda ta opiera się na reakcji DNPH z grupami karbonyłowymi obecnymi w oksydacyjnie uszkodzonych białkach. Jak pokazano na rysunku 41A, zaobserwowano wyraźnie niższe stężenie PCO w próbach osocza pochodzących od osobników suplementowanych FC lub kinetyną, w odniesieniu do osobników kontrolnych. Wpływ FC na stężenie PCO był silny niezależnie od podawanej dawki. W próbach pochodzących z mięśni szkieletowych (rys. 41B), podobnie jak w przypadku uszkodzeń DNA i peroksydacji lipidów, istotnie niższe wartości względem kontroli odnotowano w grupach traktowanych FC, natomiast nie stwierdzono istotnych różnic w przypadku grupy suplementowanej kinetyną, mimo silnego efektu w próbach osocza tych osobników.

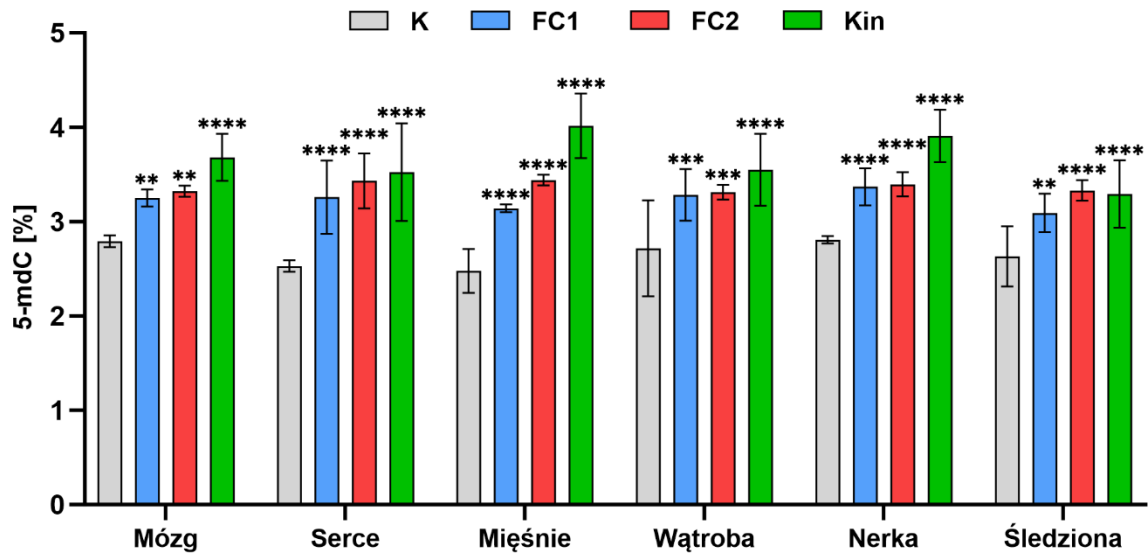


Rysunek 41. Wpływ FC i kinetyny na poziom karbonylacji białek u myszy. Oksydacyjne uszkodzenia białek (karbonylacja, PCO) oznaczano metodą kolorymetryczną z wykorzystaniem DNPH w osoczu krwi (A) oraz tkance mięśniowej (B). Kontrole oznaczono kolorem szarym, FC1 niebieskim, FC2 czerwonym, a kinetynę zielonym. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SD, $N = 10$. Istotność statystyczna względem kontroli: (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (****) $p < 0,0001$.

Podsumowując, myszy suplementowane FC odznaczały się istotnie obniżonym poziomem wszystkich analizowanych markerów stresu oksydacyjnego w całym ustroju. Wpływ FC był silny w przypadku obu zastosowanych dawek związku. Z kolei w przypadku kinetyny, mimo obniżenia markerów SO w większości organów, nie odnotowano obniżenia w mięśniach szkieletowych. Co ciekawe, u myszy suplementowanych kinetyną zaobserwowano zwiększoną zawartość 8-oxodG w mięśniach w porównaniu do grupy kontrolnej.

4.3.7. Wpływ FC i kinetyny na poziom metylacji genomu

Wiedząc, że poziom globalnej metylacji DNA z wiekiem spada, postanowiono określić procentowy udział 5-metylodeokscytosyny (5-mdC) w DNA izolowanym z tkanek myszy (rys. 42). Stwierdzono, że w przypadku myszy kontrolnych, poziom 5-mdC w zależności od tkanki, mieścił się w zakresie 2,5 a 2,8%. Z kolei w przypadku myszy suplementowanych FC, wartości te były istotnie wyższe, wynosząc średnio od 3,1 do 3,4%. Silniejszy efekt zaobserwowano u myszy przyjmujących kinetynę, u których w każdej tkance, za wyjątkiem śledziony, poziom 5-mdC wynosił od 3,5 do 4%.



Rysunek 42. Wpływ FC i kinetyny na zmiany epigenetyczne w tkankach myszy. Poziom 5-mdC oznaczano w DNA izolowanym z mózgu, serca, mięśni, wątroby, nerki i śledziony myszy. Kontrole oznaczono kolorem szarym, FC1 niebieskim, FC2 czerwonym, a kinetynę zielonym. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SD, $N = 10$. Istotność statystyczna względem kontroli: (***) $p < 0,001$, (****) $p < 0,0001$.

5. Dyskusja

5.1. Model komórkowy

Wyniki wstępne, na których opierał się cały projekt, wskazywały, że suplementacja 4-N-furfurylocytozyną (FC) komórek „starych”, rozumianych jako komórki po wielu pasażach, wpływa na zwiększenie proliferacji, obniżony poziom reaktywnych form tlenu (RFT), czy ograniczenie spadku potencjału błony mitochondrialnej ($\Delta\Psi_m$) względem komórek niesuplementowanych, a efektu tego nie obserwowano w przypadku „młodych” komórek. Jednakże, obserwowana poprawa dobrostanu komórek, niekoniecznie musiała wynikać z właściwości przeciwstarzeniowych związku. Fundamentalnym zadaniem było więc ustalenie, czy FC faktycznie wpływa na proces starzenia biologicznego. W tym celu jako model wybrano komórki MRC-5, które jako prawidłowa linia ludzkich fibroblastów, stanowią dobry model w badaniach podstawowych nad starzeniem. Przeprowadzono szereg doświadczeń mających na celu określenie wpływu FC na rozwój procesu starzenia, na komórki starzejące się oraz na funkcje biologiczne komórki, ze szczególnym uwzględnieniem aktywności mitochondriów oraz stresu oksydacyjnego.

W niniejszej pracy oznaczano uznane markery starzenia komórkowego, czyli aktywność β -galaktozydazy oraz poziom białka p16 [215]. Uzyskane wyniki wskazują, że FC ogranicza akumulację komórek starzejących się w długotrwałej hodowli (rys. 9), co nie jest jednak związane z eliminacją komórek starzejących się (rys. 10), lecz raczej z hamowaniem rozwoju procesu starzenia poprzez ograniczenie stresu komórkowego (rys. 9B, 11). Na podstawie tych obserwacji wykluczono więc senolityczne działanie związku, przypisując mu właściwości senomorficzne. Twierdzenie to dodatkowo potwierdzono, obserwując zahamowanie starzenia przyspieszonego (SISP) indukowanego nadtleniem wodoru (rys. 20). Ten sposób indukcji starzenia jest znany i często stosowany w badaniach, gdyż H_2O_2 , wywołując silny stres oksydacyjny (SO), prowadzi do akumulacji uszkodzeń wewnątrzkomórkowych dotyczących głównie DNA, a w następstwie do indukcji starzenia [91, 216–218]. Literatura wskazuje, że zastosowanie antyoksydantów hamuje SISP wywołany przez H_2O_2 , jednak jedynie w przypadku pierwotnego stresu, tj. uprzedniej inkubacji komórek z antyoksydantem [219]. W niniejszej pracy, FC podawano po dwukrotnej inkubacji komórek z H_2O_2 ,

a więc obserwowano wpływ związku na stres wtórny. Uzyskane wyniki wskazujące na zahamowanie SISP, nie mogą być więc zasługą jedynie właściwości antyoksydacyjnych FC, choć faktycznie związek takie właściwości wykazuje (rys. 18-19). Co istotne, prócz ograniczenia odsetka komórek starzejących się, zaobserwowano również zmniejszenie poziomu uszkodzeń DNA (rys. 21), co jest jedną z pierwotnych cech starzenia.

Wiedząc, że FC wykazuje działanie senomorficzne, w następnych krokach podjęto się analiz wpływu FC na funkcjonowanie komórek postarzonych. Wiadomo, że starzejące się fibroblasty ludzkie odznaczają się zwiększonym poziomem RFT oraz akumulacją markerów stresu oksydacyjnego, takich jak uszkodzenia DNA i białek [220, 221]. Jednym z głównych źródeł RFT w komórkach starzejących się są dysfunkcyjne mitochondria, nieefektywne w produkcji ATP. Starzejące się komórki odznaczają się zwiększoną masą mitochondriów i poziomem zużycia tlenu, przy proporcjonalnie wyższej zawartości mitochondriów o niższym $\Delta\Psi_m$, niż komórki młode, co pokazano m.in. na prawidłowych fibroblastach izolowanych z ludzkiej skóry [166, 222–224]. W tej pracy wykazano, że FC odwraca wspomniane cechy fenotypu komórek starzejących się. Dotyczy to zarówno uszkodzeń DNA (rys. 11), jak i utraty $\Delta\Psi_m$ (rys. 12) w tych komórkach. Odnotowano również zależne od czasu inkubacji ograniczenie poziomu oddychania komórkowego (rys. 13), co związane jest z obniżeniem zawartości mitochondriów w komórkach (rys. 14). Zważywszy, że po inkubacji z FC, starzejące się komórki odznaczają się zwiększonym $\Delta\Psi_m$ oraz zawartością ATP (rys. 15), FC zdaje się stymulować usuwanie dysfunkcyjnych mitochondriów (mitofagię) lub hamować mitogenezę, jednocześnie wpływając na poprawę ich efektywności. Dane literaturowe wskazują, że oba procesy, to znaczy zarówno upośledzona mitofagia, jak i nadaktywna mitogeneza, mogą przyczyniać się do rozwoju starzenia [225]. Ponadto zostało wykazane, że mitochondria są niezbędne w rozwoju fenotypu typowego dla komórek starzejących się, w tym dla SASP [226]. Zgodnie z tymi doniesieniami, grupa kierowana przez João Passosa pokazała, że kompletne usunięcie mitochondriów z komórek starzejących się hamuje SASP, nie odwracając jednak aresztu cyklu komórkowego [227]. Mając na uwadze istotną rolę mitochondriów w wielu procesach komórkowych, rozwiązanie to wydaje się być zbyt radykalne, aby wprowadzić je w praktykę kliniczną. Ukazuje jednak warty uwagi mechanizm, pozbawiający komórki starzejące się szkodliwego fenotypu, przy zachowaniu ich roli w supresji nowotworowej [225]. Podążając tym kierunkiem, aktywacja mitofagii wydaje się być interesującym podejściem

terapeutycznym. Faktycznie doniesienia literaturowe wykazują, że aktywacja mitofagii przez urolitynę A, zapobiega starzeniu przyspieszonemu, które indukowano czy to za pomocą H_2O_2 , czy też za pomocą promieniowania [228, 229]. Podobnie, bogate w polifenole ekstrakty zielonej herbaty, wykazują właściwości przeciwstarzeniowe poprzez indukcję mitofagii [230]. Proces ten pobudza również restrykcja kaloryczna (CR), której przeciwstarzeniowe działanie jest dobrze udokumentowane. CR, polegająca na zmniejszeniu stężenia glukozy w pożywce, ogranicza starzenie replikacyjne ludzkich fibroblastów [231], w tym komórek MRC-5 [232]. Nadmiar glukozy z kolei, przyspiesza starzenie replikacyjne przez aktywację szlaku mTOR1 i wzrost poziomu RFT [233]. W przypadku CR, obserwuje się wzrost poziomu białek związanych z autofagią i mitofagią, takich jak LC3-II, p62 czy NRF1 [234], co zaobserwowano również w tej pracy pod wpływem FC (rys. 16).

W celu głębszego zrozumienia procesów zachodzących w komórkach na skutek inkubacji z FC, przeprowadzono analizę zmian proteomicznych. Analiza tego typu dostarcza dane dotyczące jakościowych i ilościowych zmian w profilu białkowym w komórkach, co umożliwia identyfikację szlaków sygnałowych i kompartmentów komórki dotkniętych działaniem związku [235]. Przeprowadzona analiza wykazała zmniejszoną ilość białek mitochondrialnych (rys. 17E) oraz zwiększoną ilość białek proteasomu (rys. 17D), a zwiększoną aktywność proteasomu wykazała również analiza szlaków sygnałowych (rys. 17F). Biorąc pod uwagę wyniki diskutowane wcześniej można postawić tezę, że zaobserwowane zmiany świadczą o aktywacji mechanizmów naprawczych komórki, dotyczących głównie degradacji dysfunkcyjnych mitochondriów. W rzeczywistości, dysfunkcja mitochondriów związana jest z agregacją białek [20, 236], a proces mitofagii wymaga aktywności proteasomu [237, 238]. Co istotne, utrata proteostazy, będąca m.in. skutkiem spadku aktywności proteasomu [239], jest jedną z pierwotnych cech starzenia.

Przeprowadzone badania potwierdziły, że FC wykazuje właściwości przeciwstarzeniowe *in vitro*. Inkubacja komórek z FC mityguje objawy cech pierwotnych i antagonistycznych starzenia, takich jak niestabilność genomowa, utrata proteostazy i sprawnej autofagii, dysfunkcja mitochondriów, czy wreszcie starzenie komórkowe. Tak szeroki wpływ związku na cechy charakterystyczne dla starzenia daje solidne podstawy by przypuszczać, że obserwowane działanie senomorficzne może okazać się skuteczne również na poziomie organizmalnym.

5.2. Model drożdżowy

Jako drugi model badawczy zastosowano drożdże *Saccharomyces cerevisiae*. Choć drożdże odznaczają się odmiennym od ssaków metabolizmem, stanowią uznany model w badaniach nad starzeniem, ze względu na zachowane konserwatywne szlaki starzeniowe i odpowiedzi na stres. Przeprowadzono szereg eksperymentów w celu oceny właściwości FC potencjalnie przeciwdziałających starzeniu wykorzystując szczep BY4741. W pierwszym kroku oceniono wpływ FC na chronologiczną długość życia (CLS) drożdży w bogatej w składniki odżywcze pożywce YPD. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazały, że FC wydłuża żywotność drożdży (rys. 23A, tab. 3). Ponadto stwierdzono, że żadne z zastosowanych stężeń (0,25-1 mM), nie wykazuje toksyczności ani nie hamuje wzrostu komórek drożdży (rys. 23B). Podobny efekt obserwuje się w przypadku restrykcji kalorycznej (CR) lub ekstraktów z *Rhodiola rosea*, których zastosowanie wydłuża CLS, nie wpływając na kinetykę wzrostu drożdży. Z kolei inhibitor szlaku TORC1, rapamycyna, wydłuża CLS jednocześnie hamując wzrost komórek w fazie logarytmicznej [240, 241].

Dane literaturowe wskazują na ścisłe powiązanie procesu starzenia z mitochondriami i zmianami metabolicznymi. Zmniejszenie poziomu oddychania tlenowego u drożdży prowadzi do wzrostu poziomu RFT i skraca CLS [242, 243], a interwencje przeciwdziałające starzeniu, takie jak CR czy suplementacja różnymi związkami, działają poprzez zapobieganie dysfunkcji mitochondriów i gromadzeniu RFT [140, 244–246]. Ponadto, zarówno rapamycyna, jak i CR, zwiększają tempo konsumpcji tlenu przez komórki drożdży oraz ekspresję genów związanych z metabolizmem mitochondrialnym [241, 245, 247]. Uzyskane dane eksperymentalne wskazują, że FC zapobiega utracie potencjału błony mitochondrialnej ($\Delta\Psi_m$) w komórkach drożdży podczas starzenia się (rys. 24A-B) i zwiększa tempo oddychania (rys. 25), przy jednoczesnym obniżeniu poziomu RFT (rys. 28A-B). Wyniki te są zgodne z badaniami Barrosa, który wykazał, że wyższa aktywność mitochondriów zmniejsza produkcję RFT i wydłuża długość życia u *S. cerevisiae* [248]. Zebrane dane pozwalają przypuszczać, że FC może działać poprzez naśladowanie efektów CR.

CR jest jedyną interwencją przeciwstarzeniową, która wydłuża zarówno długość życia, jak i okres życia w zdrowiu w wielu organizmach modelowych, od drożdży po myszy. Jednak ponieważ utrzymanie surowego reżimu dietetycznego przez całe życie jest niemal niemożliwe, obiecującym rozwiązaniem wydają się związki naśladujące efekty CR [17, 249]. W przypadku drożdży, CR hamuje szlaki sygnałowe TORC1 oraz Ras2 i indukuje przekierowanie metabolizmu w kierunku oddychania tlenowego [250]. Szlak TORC1-Sch9 jest kluczowym regulatorem CLS u drożdży. Gdy jest aktywny, hamuje kinazę białkową Rim15, odpowiedzialną za odpowiedź komórki na różnego typu stres środowiskowy, taki jak szok cieplny, stres oksydacyjny (SO) czy niedostępność składników odżywczych [138, 251].

Aby sprawdzić wpływ FC na aktywność szlaku TORC1-Sch9, analizie poddano poziom ekspresji wybranych genów z nim związanych (rys. 29, tab. 4). Stwierdzono zmniejszoną ekspresję genu *Sch9*, co potwierdza przypuszczenia o ograniczeniu aktywności szlaku TORC1-Sch9. Dostępne dane literaturowe wskazują, że delecja genu *Sch9* zwiększa oddychanie, obniża poziom ROS i przedłuża CLS u drożdży [252]. Ponadto, drożdżowe mutanty $\Delta sch9$ są mniejsze niż komórki typu dzikiego (WT) [253, 254], co również zostało zaobserwowane w przypadku drożdży WT w warunkach CR [255, 256], oraz w niniejszym badaniu, w przypadku komórek hodowanych w obecności FC (rys. 24C). Zaobserwowano również obniżenie ekspresji genu *Gtr1* pod wpływem FC. Białko Gtr1 jest podjednostką kompleksu TORC1, odpowiedzialną za jego aktywację w odpowiedzi na obecność składników odżywczych [257]. Flawonoid korylina, otrzymywany z *Psoralea corylifolia*, ogranicza aktywność TORC1 przez wiązanie z Gtr1, co skutkuje wydłużeniem replikacyjnej długości życia drożdży. Warto wspomnieć, że przeciwstarzeniowe działanie koryliny, zostało stwierdzone również u myszy [258]. Obniżony pod wpływem FC poziom ekspresji genu *Gtr1* dodatkowo potwierdza ograniczoną aktywność szlaku TORC1-Sch9. Zgodnie ze wspomnianym wcześniej związkiem między szlakiem TORC1-Sch9 a kinazą białkową Rim15, stwierdzono również zwiększoną ekspresję genu *Rim15*. Aktywacja Rim15, ze względu na zaangażowanie w odpowiedź na stres oraz procesy makroautofagii, odgrywa kluczową rolę w przedłużaniu CLS w warunkach CR lub u mutantów $\Delta sch9$ [253, 259, 260]. Zaskakującym mógłby więc być fakt, że nie zaobserwowano zwiększonej ekspresji genów związanych z obroną antyoksydacyjną, takich jak *Sod2* i *Ccs1*. Jednakże, wynik ten jest zgodny z doniesieniami wskazującymi na brak zmian [261] lub obniżenie [262,

263] ekspresji genów związanych z usuwaniem RFT w warunkach CR. Jednoczesne zmniejszenie ekspresji *Sod2* i *Ccs1* oraz poziomu RFT w cytoplazmie (Rys. 28A-B), może również wyjaśniać fakt, że TORC1 hamuje aktywność mitochondriów faworyzując fermentację alkoholową. Zmniejszone zużycie tlenu przez łańcuch oddechowy zwiększa dostępność tlenu wewnątrzkomórkowego, co prowadzi do zwiększenia generacji RFT [264, 265]. Faktycznie, przeprowadzone eksperymenty wskazują na zwiększony poziom oddychania tlenowego (rys. 25), oraz wyższą ekspresję genu *Hap4* u drożdży hodowanych z FC. Czynniki transkrypcyjny Hap4 pełni rolę aktywatora oddychania mitochondrialnego u drożdży i jego zwiększony poziom obserwuje się w warunkach CR [261]. Co ciekawe, niedawne badania wykazały, że zwiększona ekspresja genu *Hap4* ogranicza akumulację pozachromosomowych kolistych rDNA (ERCs), a efekt ten wzmacnia delecja genu *Fob1* [266], którego obniżenie również zaobserwowano jako skutek działania FC. Należy zaznaczyć, że akumulacja ERCs w komórkach, jako objaw niestabilności genomowej, uważana jest za jedno z charakterystycznych zjawisk starzenia drożdży [267].

Ze względu na zaobserwowany wpływ FC na poziom RFT i $\Delta\Psi_m$, przeprowadzono dodatkowe eksperymenty mające na celu ocenę właściwości antyoksydacyjnych związku. Wiadomo, że akumulacja RFT przyczynia się do powstawania uszkodzeń mitochondrialnych i komórkowych, promując zarówno replikacyjne, jak i chronologiczne starzenie się drożdży [207]. W tej pracy, jako induktor SO, zastosowano nadtlenek wodoru (H_2O_2), a jako marker kondycji mitochondriów uznano $\Delta\Psi_m$. Zaobserwowane utrzymanie wysokiego $\Delta\Psi_m$ przez komórki hodowane z FC w warunkach SO, wskazuje na właściwości antyoksydacyjne i mitoprotekcyjne związku (rys. 28C-D), co dodatkowo potwierdzają wyniki przeżywalności drożdży (rys. 28E).

Przeprowadzone badania miały na celu zbadanie właściwości przeciwstarzeniowych FC w modelu drożdżowym. Wyniki pokazały, że badany związek istotnie wydłuża CLS drożdży, co związane jest ze zwiększonym poziomem oddychania i $\Delta\Psi_m$ oraz jego utrzymaniem w trakcie życia oraz zmniejszonymi poziomem RFT i aktywnością szlaku TORC1-Sch9. Obserwowane więc zmiany fenotypowe i zmiany w ekspresji wybranych genów wskazują, że działanie FC naśladuje warunki CR. Fakt, że CR jest interwencją przeciwstarzeniową skuteczną u różnych gatunków, czyni FC obiecującym związkiem o potencjalnej skuteczności także u organizmów wyższych.

5.3. Model myszy

Eksperymenty przeprowadzone z wykorzystaniem ludzkich linii komórkowych oraz drożdży wykazały, że FC istotnie wykazuje właściwości przeciwstarzeniowe, a uzyskane wyniki pozwalały przypuszczać, że związek ma potencjał terapeutyczny. Koniecznym pozostało więc jego potwierdzenie na organizmie wyższym. Jako model wybrano mysz domową, będącą niezwykle popularnym modelem w badaniach naukowych.

Licząca 120 osobników kohorta myszy złożona była z samców, u których obserwuje się z jednej strony gwałtowniejsze, a z drugiej mniej zróżnicowane międzyosobniczo zmiany związane z wiekiem, niż u samic [268, 269]. Zwierzęta podzielono na grupy po 30 osobników, co uznawane jest za dobrą praktykę w badaniach nad starzeniem z wykorzystaniem szczepu C57BL/6J [270]. Tak skonstruowane grupy pozwoliły na uzyskanie wiarygodnych wyników o odpowiedniej mocy statystycznej.

Ze względu na stwierdzony brak toksyczności FC, zdecydowano się na suplementację związkiem rozpuszczonym w wodzie pitnej, nieprzerwanie dostępnej dla zwierząt. Podawanie związków w sposób ciągły w wodzie pitnej lub pokarmie było z powodzeniem stosowane dotychczas w innych badaniach nad właściwościami przeciwstarzeniowymi różnych związków prowadzonych na myszach [181, 258, 271, 272]. Suplementację FC rozpoczęto w wieku uznawanym za wiek średni (14 mies.), a zakończono po 6 miesiącach, w wieku uznawanym za wiek starczy (20 mies.) [145], co umożliwiło ocenę wpływu badanego związku na opóźnienie starzenia. Zastosowane podejście pozwoliło na ciągłą podaż FC, bez zbędnego narażania zwierząt na stres, choć kosztem precyzyjnej kontroli pobieranej przez zwierzę dawki. W celu przybliżonego oszacowania przyjmowanej ilości związku, przez cały czas trwania eksperymentu monitorowano tygodniowy pobór płynów przez myszy z każdej z grup eksperymentalnych. Na tej podstawie stwierdzono, że rozpuszczone związki nie miały wpływu na ilość płynów wypijanych przez zwierzęta, nie odnotowano też żadnych symptomów odwodnienia, a osobniki przyjmowały średnio około 75% założonej dawki (rys. 31). W badaniach *post mortem* stwierdzono obecność FC w mózgu (rys. 32), czym wykazano, że związek pokonuje barierę krew-mózg.

Utrzymanie prawidłowych funkcji życiowych i zdrowia to główne obszary zainteresowań w badaniach nad długowiecznością [273]. Wraz z wiekiem, tak u człowieka, jak i u myszy, dochodzi do stopniowej utraty zdolności ruchowych i umysłowych. U myszy C57BL/6J początek obniżania funkcji lokomotorycznych obserwuje się już w późnym wieku dojrzałym, z kolei pogorszenie funkcji poznawczych następuje głównie w wieku starczym [274]. W tej pracy, mając na celu ocenę sprawności ruchowej zwierząt, przeprowadzono szereg testów behawioralnych, obejmujących test siły chwytu oraz badające możliwości koordynacyjno-ruchowe testy prętów statycznych i obrotowych (rys. 36A-C). W każdym z przeprowadzonych testów, 20-miesięczne myszy suplementowane FC osiągały lepsze wyniki, niż myszy kontrolne w tym samym wieku, zbliżając się do rezultatów uzyskiwanych przez młodsze osobniki kontrolne, będące w wieku średnim (12 miesięcy). Zważywszy na fakt, że postępująca z wiekiem utrata siły mięśni i sprawności ruchowej, związana jest z degeneracją mięśni i motoneuronów [153], można przypuszczać, że FC spowolniła ten proces. Faktycznie, analiza kompozycji składu ciała myszy wykazała, że osobniki, które przyjmowały FC, odznaczały się zwiększonym stosunkiem masy mięśniowej do całkowitej masy ciała oraz zmniejszonym odsetkiem tkanki tłuszczowej, względem myszy kontrolnych (rys. 34), co może świadczyć o hamowaniu postępującej sarkopenii [210, 211]. Tezę tę wspiera również fakt, że w tkankach mięśni myszy suplementowanych FC, stwierdzono niższy poziom wszystkich analizowanych markerów stresu oksydacyjnego, tj. 8-oxodG, karbonylacji białek oraz peroksydacji lipidów (rys. 39-41), podczas gdy w przypadku sarkopenii obserwuje się akumulację każdego z wymienionych markerów [154, 156, 157].

Jedną z cech charakterystycznych starzenia, jest akumulacja oksydacyjnych uszkodzeń makrocząsteczek w komórkach organizmu [275]. W przypadku myszy suplementowanych FC zaobserwowano obniżenie markerów stresu oksydacyjnego w każdej z analizowanych tkanek (rys. 39-41), co świadczy o obniżeniu stresu oksydacyjnego w całym ustroju. Co interesujące, w przypadku myszy suplementowanych kinetyną, stwierdzono ich obniżenie w większości badanych tkanek, za wyjątkiem mięśni szkieletowych. Antyoksydacyjne działanie kinetyny jest znane i opisane w literaturze [276]. Jednak w przeprowadzonym badaniu, nie zaobserwowano takiego działania w przypadku mięśni szkieletowych. Za wyjątkiem testu prętów statycznych, nie

stwierdzono również poprawy wyników w testach behawioralnych. Zebrane wyniki wskazują więc, że kinetyna nie wpływa na zahamowanie postępu sarkopenii.

Analiza parametrów biochemicznych krwi wykazała, że myszy suplementowane FC odznaczały się zwiększonym poziomem całkowitego cholesterolu i lipoproteiny o wysokiej gęstości (HDL), względem 20-miesięcznej grupy kontrolnej (rys. 37). Z danych literaturowych wiadomo, że zbyt niski poziom cholesterolu wpływa niekorzystnie na pamięć i koncentrację oraz inne funkcje organizmu, gdyż jest on istotnym składnikiem błon komórkowych, bierze udział w wytwarzaniu hormonów, witaminy D, kwasów żółciowych oraz w prawidłowym funkcjonowaniu mózgu [277]. Ponadto HDL zapobiega odkładaniu się w ścianach tętnic związków tłuszczowych przyczyniających się do miażdżycy i chorób układu sercowo-naczyniowego [278], stąd też niski poziom HDL jest silnym czynnikiem ryzyka u osób starszych [279]. Wyniki oznaczenia, wskazujące na zbliżony poziom cholesterolu całkowitego i HDL u starych osobników suplementowanych FC i u 12-miesięcznych osobników kontrolnych, wskazują na poprawę ogólnego stanu fizjologicznego starych zwierząt, które przyjmowały FC.

Z wiekiem specyficznym zmianom ulega również epigenom organizmu. Na podstawie zmian metylacji cytozyn w określonych fragmentach genomu, zaproponowano różne „zegary epigenetyczne”, mające określać biologiczny wiek osobnika [11]. Oprócz zmian lokalnych, obserwuje się również zmiany globalne, polegające na hipometylacji genomu, przy jednoczesnej hipermetylacji regionów promotorowych [280]. W niniejszej pracy wykazano, że poziom globalnej metylacji w tkankach zwierząt suplementowanych FC lub kinetyną, jest wyższy niż w przypadku myszy kontrolnych w tym samym wieku (rys. 42). Co istotne, zmiany epigenetyczne należą do pierwotnych cech starzenia.

Zebrane wyniki pokazały, że długoterminowa suplementacja myszy FC od wieku średniego, poprawia stan tych zwierząt w wieku starym, co przejawia się zarówno poprzez zwiększoną sprawność fizyczną zwierząt, jak również poprzez zahamowaną degenerację mięśni i ograniczoną akumulację markerów stresu oksydacyjnego. Co ważne, nie odnotowano żadnych wyraźnych skutków ubocznych stosowania FC. Obserwowane efekty z pewnością wynikają z, wykazanych na modelu 2D (rozdział 5.1), właściwości senomorficznych związków. Dane literaturowe wskazują, że związki celujące w komórki starzejące się, faktycznie opóźniają starzenie u myszy. Zostało to pokazane

w eksperymentach, w których wydłużenie czasu życia w zdrowiu osiągnięto nie tylko poprzez selektywną eliminację komórek starzejących się z organizmu myszy [160, 189, 281], lecz także poprzez łagodzenie fenotypu tych komórek [282]. Suplementacja rapamycyną wydłuża czas życia oraz poprawia funkcje lokomotoryczne starych myszy, którym podawano związek od młodości lub wieku średniego [283, 284]. Podobny efekt zaobserwowano w przypadku długotrwałej podaży metforminy [181]. Zarówno rapamycyna, jak i metformina, są związkami o potwierdzonym działaniu senomorficznym, z którymi wiąże się nadzieje terapeutyczne. Biorąc pod uwagę zgromadzone dane, FC wydaje się być związkiem o wysokim potencjale przeciwstarzeniowym.

6. Podsumowanie

Niniejsza praca stanowi pierwszy obszerny opis aktywności biologicznej 4-N-furfurylocytozyny (FC). W pracy przedstawiono właściwości przeciwstarzeniowe związku, uzyskując obiecujące efekty w każdym z trzech zastosowanych modeli badawczych. Na podstawie uzyskanych wyników, stwierdzono, że FC:

- Wydłuża chronologiczną długość życia drożdży, poprzez ograniczenie aktywności szlaku TORC1/Sch9, co skutkuje aktywacją metabolizmu mitochondrialnego.
- Wykazuje właściwości senomorficzne, ograniczając rozwój starzenia komórkowego w modelu 2D, co odbywa się poprzez redukcję poziomu uszkodzeń DNA, stresu oksydacyjnego i aktywację proteasomu.
- Ogranicza poziom oddychania komórkowego w modelu 2D poprzez redukcję mitochondriów o zdepolaryzowanej błonie mitochondrialnej, co nie przekłada się na zmniejszoną żywotność komórek lub obniżony poziom ATP.
- W zakresie zastosowanych nie jest toksyczna dla zwierząt oraz pokonuje barierę krew-mózg.
- Ogranicza poziom markerów oksydacyjnych uszkodzeń DNA, lipidów i białek, we wszystkich analizowanych tkankach mysich.
- Opóźnia związaną z wiekiem utratę funkcji lokomotorycznych starych myszy oraz zwiększa stosunek masy mięśniowej do całkowitej masy ciała, co sugeruje spowolnienie sarkopenię.

Ponadto odnotowano, że:

- Mimo obserwowanego wspólnego efektu działania związku (opóźnienie starzenia), można zaobserwować odmienne mechanizmy (zwiększenie poziomu oddychania u drożdży, a zmniejszenie w przypadku modelu 2D).

W pracy zrealizowano wszystkie cele założone na początku projektu.

7. Bibliografia

1. Garmany A, Yamada S, Terzic A. Longevity leap: mind the healthspan gap. *Npj Regen Med.* 2021;6:57.
2. Aging in unity. *Nat Aging.* 2021;1:1–1.
3. Bennett JE, Stevens GA, Mathers CD, Bonita R, Rehm J, Kruk ME, et al. NCD Countdown 2030: worldwide trends in non-communicable disease mortality and progress towards Sustainable Development Goal target 3.4. *The Lancet.* 2018;392:1072–88.
4. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell.* 2013;153:1194–217.
5. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell.* 2023;186:243–78.
6. Ayres JS. The biology of physiological health. *Cell.* 2020;181:250–69.
7. Vijg J, Suh Y. Genome instability and aging. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:645–68.
8. Vijg J, Dong X. Pathogenic Mechanisms of Somatic Mutation and Genome Mosaicism in Aging. *Cell.* 2020;182:12–23.
9. Siametis A, Niotis G, Garinis GA. DNA Damage and the Aging Epigenome. *J Invest Dermatol.* 2021;141:961–7.
10. Jung M, Pfeifer GP. Aging and DNA methylation. *BMC Biol.* 2015;13:7.
11. Salameh Y, Bejaoui Y, El Hajj N. DNA Methylation Biomarkers in Aging and Age-Related Diseases. *Front Genet.* 2020;11.
12. Hauer MH, Seeber A, Singh V, Thierry R, Sack R, Amitai A, et al. Histone degradation in response to DNA damage enhances chromatin dynamics and recombination rates. *Nat Struct Mol Biol.* 2017;24:99–107.
13. Taylor RC, Dillin A. Aging as an Event of Proteostasis Collapse. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3:a004440.
14. Klaipe CL, Jayaraj GG, Hartl FU. Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. *J Cell Biol.* 2017;217:51–63.
15. Hipp MS, Kasturi P, Hartl FU. The proteostasis network and its decline in ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20:421–35.
16. Aman Y, Schmauck-Medina T, Hansen M, Morimoto RI, Simon AK, Bjedov I, et al. Autophagy in healthy aging and disease. *Nat Aging.* 2021;1:634–50.
17. Madeo F, Carmona-Gutierrez D, Hofer SJ, Kroemer G. Caloric Restriction Mimetics against Age-Associated Disease: Targets, Mechanisms, and Therapeutic Potential. *Cell Metab.* 2019;29:592–610.
18. Menendez JA, Joven J, Aragonès G, Barrajón-Catalán E, Beltrán-Debón R, Borrás-Linares I, et al. Xenohormetic and anti-aging activity of secoiridoid polyphenols present in extra virgin olive oil. *Cell Cycle.* 2013;12:555–78.
19. Wang Y, Hekimi S. Mitochondrial dysfunction and longevity in animals: Untangling the knot. *Science.* 2015;350:1204–7.

20. Kauppila TES, Kauppila JHK, Larsson N-G. Mammalian Mitochondria and Aging: An Update. *Cell Metab.* 2017;25:57–71.
21. Moehle EA, Shen K, Dillin A. Mitochondrial proteostasis in the context of cellular and organismal health and aging. *J Biol Chem.* 2019;294:5396–407.
22. Kim J, Kim H-S, Chung JH. Molecular mechanisms of mitochondrial DNA release and activation of the cGAS-STING pathway. *Exp Mol Med.* 2023;55:510–9.
23. Ikeda Y, Sciarretta S, Nagarajan N, Rubattu S, Volpe M, Frati G, et al. New Insights into the Role of Mitochondrial Dynamics and Autophagy during Oxidative Stress and Aging in the Heart. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:210934.
24. Sebastián D, Palacín M, Zorzano A. Mitochondrial Dynamics: Coupling Mitochondrial Fitness with Healthy Aging. *Trends Mol Med.* 2017;23:201–15.
25. Bakula D, Scheibye-Knudsen M. MitophAging: Mitophagy in Aging and Disease. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8.
26. Chen G, Kroemer G, Kepp O. Mitophagy: An Emerging Role in Aging and Age-Associated Diseases. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:200.
27. Palikaras K, Lionaki E, Tavernarakis N. Coordination of mitophagy and mitochondrial biogenesis during ageing in *C. elegans*. *Nature.* 2015;521:525–8.
28. Kim J, Guan K-L. mTOR as a central hub of nutrient signalling and cell growth. *Nat Cell Biol.* 2019;21:63–71.
29. Su K-H, Dai C. mTORC1 senses stresses: Coupling stress to proteostasis. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol.* 2017;39:10.1002/bies.201600268.
30. Fernandes SA, Demetriades C. The Multifaceted Role of Nutrient Sensing and mTORC1 Signaling in Physiology and Aging. *Front Aging.* 2021;2.
31. Carroll B, Nelson G, Rabanal-Ruiz Y, Kucheryavenko O, Dunhill-Turner NA, Chesterman CC, et al. Persistent mTORC1 signaling in cell senescence results from defects in amino acid and growth factor sensing. *J Cell Biol.* 2017;216:1949–57.
32. Kabacik S, Lowe D, Fransen L, Leonard M, Ang S-L, Whiteman C, et al. The relationship between epigenetic age and the hallmarks of aging in human cells. *Nat Aging.* 2022;2:484–93.
33. Vitale G, Pellegrino G, Vollery M, Hofland LJ. ROLE of IGF-1 System in the Modulation of Longevity: Controversies and New Insights From a Centenarians' Perspective. *Front Endocrinol.* 2019;10.
34. Salminen A, Kaarniranta K. AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network. *Ageing Res Rev.* 2012;11:230–41.
35. Sharp ZD, Strong R. Rapamycin, the only drug that has been consistently demonstrated to increase mammalian longevity. An update. *Exp Gerontol.* 2023;176:112166.
36. Spadaro O, Youm Y, Shchukina I, Ryu S, Sidorov S, Ravussin A, et al. Caloric restriction in humans reveals immunometabolic regulators of health span. *Science.* 2022;375:671–7.
37. Acosta-Rodríguez V, Rijo-Ferreira F, Izumo M, Xu P, Wight-Carter M, Green CB, et al. Circadian alignment of early onset caloric restriction promotes longevity in male C57BL/6J mice. *Science.* 2022;376:1192–202.
38. Mi L, Hu J, Li N, Gao J, Huo R, Peng X, et al. The Mechanism of Stem Cell Aging. *Stem Cell Rev Rep.* 2022;18:1281–93.

39. Liu B, Qu J, Zhang W, Izpisua Belmonte JC, Liu G-H. A stem cell aging framework, from mechanisms to interventions. *Cell Rep.* 2022;41:111451.
40. Goodell MA, Rando TA. Stem cells and healthy aging. *Science.* 2015;350:1199–204.
41. Shyh-Chang N, Daley GQ, Cantley LC. Stem cell metabolism in tissue development and aging. *Development.* 2013;140:2535–47.
42. Selman M, Pardo A. Fibroageing: An ageing pathological feature driven by dysregulated extracellular matrix-cell mechanobiology. *Ageing Res Rev.* 2021;70:101393.
43. Mehdipour M, Skinner C, Wong N, Lieb M, Liu C, Etienne J, et al. Rejuvenation of three germ layers tissues by exchanging old blood plasma with saline-albumin. *Aging.* 2020;12:8790–819.
44. Rebo J, Mehdipour M, Gathwala R, Causey K, Liu Y, Conboy MJ, et al. A single heterochronic blood exchange reveals rapid inhibition of multiple tissues by old blood. *Nat Commun.* 2016;7:13363.
45. Ma S, Wang S, Ye Y, Ren J, Chen R, Li W, et al. Heterochronic parabiosis induces stem cell revitalization and systemic rejuvenation across aged tissues. *Cell Stem Cell.* 2022;29:990-1005.e10.
46. Rando TA, Jones DL. Regeneration, Rejuvenation, and Replacement: Turning Back the Clock on Tissue Aging. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2021;13:a040907.
47. Ferrucci L, Fabbri E. Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15:505–22.
48. Childs BG, Gluscevic M, Baker DJ, Laberge R-M, Marquess D, Dananberg J, et al. Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nat Rev Drug Discov.* 2017;16:718–35.
49. Rodier F, Coppé J-P, Patil CK, Hoeijmakers WAM, Muñoz DP, Raza SR, et al. Persistent DNA damage signaling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol.* 2009;11:973–9.
50. Freund A, Patil CK, Campisi J. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J.* 2011;30:1536–48.
51. Harijith A, Ebenezer DL, Natarajan V. Reactive oxygen species at the crossroads of inflammasome and inflammation. *Front Physiol.* 2014;5:352.
52. Victorelli S, Salmonowicz H, Chapman J, Martini H, Vizioli MG, Riley JS, et al. Apoptotic stress causes mtDNA release during senescence and drives the SASP. *Nature.* 2023;622:627–36.
53. Lopes-Paciencia S, Saint-Germain E, Rowell M-C, Ruiz AF, Kalegari P, Ferbeyre G. The senescence-associated secretory phenotype and its regulation. *Cytokine.* 2019;117:15–22.
54. Ohtani N. The roles and mechanisms of senescence-associated secretory phenotype (SASP): can it be controlled by senolysis? *Inflamm Regen.* 2022;42:11.
55. Strasser B, Wolters M, Weyh C, Krüger K, Ticinesi A. The Effects of Lifestyle and Diet on Gut Microbiota Composition, Inflammation and Muscle Performance in Our Aging Society. *Nutrients.* 2021;13:2045.
56. Zmora N, Soffer E, Elinav E. Transforming medicine with the microbiome. *Sci Transl Med.* 2019;11:eaaw1815.
57. Ni Y, Yang X, Zheng L, Wang Z, Wu L, Jiang J, et al. Lactobacillus and Bifidobacterium Improves Physiological Function and Cognitive Ability in Aged Mice by the Regulation of Gut Microbiota. *Mol Nutr Food Res.* 2019;63:e1900603.
58. Ghosh TS, Shanahan F, O'Toole PW. The gut microbiome as a modulator of healthy ageing. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2022;19:565–84.

59. Krishnan S, Ding Y, Saedi N, Choi M, Sridharan GV, Sherr DH, et al. Gut Microbiota-Derived Tryptophan Metabolites Modulate Inflammatory Response in Hepatocytes and Macrophages. *Cell Rep.* 2018;23:1099–111.
60. Zhang X, Zhong H, Li Y, Shi Z, Ren H, Zhang Z, et al. Sex- and age-related trajectories of the adult human gut microbiota shared across populations of different ethnicities. *Nat Aging.* 2021;1:87–100.
61. Weismann A, Poulton EB Sir, Schönland S, Shipley AE (Arthur E Sir). *Essays upon heredity and kindred biological problems*, by Dr. August Weismann. Ed. by Edward B. Poulton, Selmar Schönland, and Arthur E. Shipley. Authorised translation. 2d ed. Oxford: Clarendon Press; 1891.
62. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961;25:585–621.
63. L H. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1965;37.
64. Carrel A, Ebeling AH. Age and multiplication of fibroblasts. *J Exp Med.* 1921;34:599–623.
65. Witkowski JA. Dr. Carrel's immortal cells. *Med Hist.* 1980;24:129–42.
66. Sosińska P, Mikuła-Pietrasik J, Książek K. Molekularne podstawy komórkowego starzenia: fenomen Hayflicka 50 lat później. *Postępy Hig Med Dośw.* 2016;70:231–42.
67. Broccoli D. Function, replication and structure of the mammalian telomere. *Cytotechnology.* 2004;45:3–12.
68. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature.* 1990;345:458–60.
69. Watson JD. Origin of Concatemeric T7DNA. *Nature New Biol.* 1972;239:197–201.
70. Allsopp RC, Harley CB. Evidence for a critical telomere length in senescent human fibroblasts. *Exp Cell Res.* 1995;219:130–6.
71. Serrano AL, Andrés V. Telomeres and Cardiovascular Disease. *Circ Res.* 2004;94:575–84.
72. Casenghi M, Mangiacasale R, Tuynder M, Caillet-Fauquet P, Elhajouji A, Lavia P, et al. p53-Independent Apoptosis and p53-Dependent Block of DNA Rereplication Following Mitotic Spindle Inhibition in Human Cells. *Exp Cell Res.* 1999;250:339–50.
73. Kumari R, Jat P. Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9.
74. Tutton S, Lieberman PM. A role for p53 in telomere protection. *Mol Cell Oncol.* 2017;4.
75. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.* 1993;75:817–25.
76. He S, Sharpless NE. Senescence in Health and Disease. *Cell.* 2017;169:1000–11.
77. Song S, Lam EW-F, Tchkonja T, Kirkland JL, Sun Y. Senescent Cells: Emerging Targets for Human Aging and Age-Related Diseases. *Trends Biochem Sci.* 2020;45:578–92.
78. Muss HB, Smitherman A, Wood WA, Nyrop K, Tuchman S, Randhawa PK, et al. p16 a biomarker of aging and tolerance for cancer therapy. *Transl Cancer Res.* 2020;9.
79. Feng J, Funk DW, Wang S-S, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu C-P, et al. The RNA Component of Human Telomerase. *Science.* 1995;269:1236–41.

80. von Zglinicki T, Wan T, Miwa S. Senescence in Post-Mitotic Cells: A Driver of Aging? *Antioxid Redox Signal.* 2021;34:308–23.
81. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12855956/>. Accessed 23 Oct 2023.
82. T von Z, G S, J L, F d'Adda di F, Sp J. Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech Ageing Dev.* 2005;126.
83. Lin J, Epel E. Stress and telomere shortening: Insights from cellular mechanisms. *Ageing Res Rev.* 2022;73:101507.
84. de Magalhães JP, Chainiaux F, Remacle J, Toussaint O. Stress-induced premature senescence in BJ and hTERT-BJ1 human foreskin fibroblasts. *FEBS Lett.* 2002;523:157–62.
85. Qin S, Schulte BA, Wang GY. Role of senescence induction in cancer treatment. *World J Clin Oncol.* 2018;9:180–7.
86. Debacq-Chainiaux F, Ben Ameer R, Bauwens E, Dumortier E, Toutfaire M, Toussaint O. Stress-Induced (Premature) Senescence. In: Rattan SIS, Hayflick L, editors. *Cellular Ageing and Replicative Senescence.* Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 243–62.
87. Toussaint O, Remacle J, Dierick J-F, Pascal T, Fripiat C, Zdanov S, et al. From the Hayflick mosaic to the mosaics of ageing. Role of stress-induced premature senescence in human ageing. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002;34:1415–29.
88. Mas-Bargues C, Viña-Almunia J, Inglés M, Sanz-Ros J, Gambini J, Ibáñez-Cabellos JS, et al. Role of p16INK4a and BMI-1 in oxidative stress-induced premature senescence in human dental pulp stem cells. *Redox Biol.* 2017;12:690–8.
89. Fischer M, Müller GA. Cell cycle transcription control: DREAM/MuvB and RB-E2F complexes. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2017;52:638–62.
90. Takahashi A, Ohtani N, Yamakoshi K, Iida S-I, Tahara H, Nakayama K, et al. Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence. *Nat Cell Biol.* 2006;8:1291–7.
91. Waters DW, Blokland KEC, Pathinayake PS, Wei L, Schuliga M, Jaffar J, et al. STAT3 Regulates the Onset of Oxidant-induced Senescence in Lung Fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2019;61:61–73.
92. Wang Y, Boerma M, Zhou D. Ionizing Radiation-Induced Endothelial Cell Senescence and Cardiovascular Diseases. *Radiat Res.* 2016;186:153–61.
93. Moon K-C, Yang J-P, Lee J-S, Jeong S-H, Dhong E-S, Han S-K. Effects of Ultraviolet Irradiation on Cellular Senescence in Keratinocytes Versus Fibroblasts. *J Craniofac Surg.* 2019;30:270–5.
94. Kojima H, Inoue T, Kunimoto H, Nakajima K. IL-6-STAT3 signaling and premature senescence. *JAK-STAT.* 2013;2:e25763.
95. Glück S, Guey B, Gulen MF, Wolter K, Kang T-W, Schmacke NA, et al. Innate immune sensing of cytosolic chromatin fragments through cGAS promotes senescence. *Nat Cell Biol.* 2017;19:1061–70.
96. Muñoz-Espín D, Cañamero M, Maraver A, Gómez-López G, Contreras J, Murillo-Cuesta S, et al. Programmed Cell Senescence during Mammalian Embryonic Development. *Cell.* 2013;155:1104–18.
97. M D, N O, Sa Y, F R, W T, Jr M, et al. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell.* 2014;31.
98. Schmitt CA, Fridman JS, Yang M, Lee S, Baranov E, Hoffman RM, et al. A Senescence Program Controlled by p53 and p16INK4a Contributes to the Outcome of Cancer Therapy. *Cell.* 2002;109:335–46.

99. Rhinn M, Ritschka B, Keyes WM. Cellular senescence in development, regeneration and disease. *Development*. 2019;146:dev151837.
100. Schmitt CA, Wang B, Demaria M. Senescence and cancer — role and therapeutic opportunities. *Nat Rev Clin Oncol*. 2022;19:619–36.
101. Davan-Wetton CSA, Pessolano E, Perretti M, Montero-Melendez T. Senescence under appraisal: hopes and challenges revisited. *Cell Mol Life Sci*. 2021;78:3333–54.
102. Harman D. Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *J Gerontol*. 1956;11:298–300.
103. Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson JE. Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol*. 1980;15:575–91.
104. Harman D. The Biologic Clock: The Mitochondria? *J Am Geriatr Soc*. 1972;20:145–7.
105. Tapia PC. Sublethal mitochondrial stress with an attendant stoichiometric augmentation of reactive oxygen species may precipitate many of the beneficial alterations in cellular physiology produced by caloric restriction, intermittent fasting, exercise and dietary phytonutrients: “Mitohormesis” for health and vitality. *Med Hypotheses*. 2006;66:832–43.
106. Ristow M, Zarse K. How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). *Exp Gerontol*. 2010;45:410–8.
107. Piskovatska V, Storey KB, Vaiserman AM, Lushchak O. The Use of Metformin to Increase the Human Healthspan. In: Guest PC, editor. *Reviews on New Drug Targets in Age-Related Disorders*. Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 319–32.
108. Sivandzade F, Prasad S, Bhalerao A, Cucullo L. NRF2 and NF- κ B interplay in cerebrovascular and neurodegenerative disorders: Molecular mechanisms and possible therapeutic approaches. *Redox Biol*. 2019;21:101059.
109. Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol*. 2015;6:524–51.
110. Thijssen DHJ, Redington A, George KP, Hopman MTE, Jones H. Association of Exercise Preconditioning With Immediate Cardioprotection: A Review. *JAMA Cardiol*. 2018;3:169–76.
111. Ristow M. Unraveling the Truth About Antioxidants: Mitohormesis explains ROS-induced health benefits. *Nat Med*. 2014;20:709–11.
112. Van Remmen H, Ikeno Y, Hamilton M, Pahlavani M, Wolf N, Thorpe SR, et al. Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiol Genomics*. 2003;16:29–37.
113. Ubiquitous overexpression of CuZn superoxide dismutase does not extend life span in mice. *J Gerontol Ser A*. 2000;55:B5–9.
114. Scieszka D, Bolt AM, McCormick MA, Brigman JL, Campen MJ. Aging, longevity, and the role of environmental stressors: a focus on wildfire smoke and air quality. *Front Toxicol*. 2023;5.
115. Yu T, Slone J, Liu W, Barnes R, Opresko PL, Wark L, et al. Premature aging is associated with higher levels of 8-oxoguanine and increased DNA damage in the Polg mutator mouse. *Aging Cell*. 2022;21:e13669.
116. Zhang X, Li L. The Significance of 8-oxoGsn in Aging-Related Diseases. *Aging Dis*. 2020;11:1329–38.

117. König J, Jung T, Grune T. Protein Carbonylation in Aging and Senescence. In: Protein Carbonylation. John Wiley & Sons, Ltd; 2017. p. 272–90.
118. Gonos ES, Kapetanou M, Sereikaite J, Bartosz G, Naparło K, Grzesik M, et al. Origin and pathophysiology of protein carbonylation, nitration and chlorination in age-related brain diseases and aging. *Aging*. 2018;10:868–901.
119. Mutlu AS, Duffy J, Wang MC. Lipid metabolism and lipid signals in aging and longevity. *Dev Cell*. 2021;56:1394–407.
120. Ali J, Aziz MdA, Rashid MdMO, Basher MA, Islam MS. Propagation of age-related diseases due to the changes of lipid peroxide and antioxidant levels in elderly people: A narrative review. *Health Sci Rep*. 2022;5:e650.
121. Holtze S, Gorshkova E, Braude S, Cellerino A, Dammann P, Hildebrandt TB, et al. Alternative Animal Models of Aging Research. *Front Mol Biosci*. 2021;8.
122. Brunet A. Old and new models for the study of human ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21:491–3.
123. Kitaeva KV, Rutland CS, Rizvanov AA, Solovyeva VV. Cell Culture Based in vitro Test Systems for Anticancer Drug Screening. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8.
124. González-Gualda E, Baker AG, Fruk L, Muñoz-Espín D. A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo. *FEBS J*. 2021;288:56–80.
125. Mohamad Kamal NS, Safuan S, Shamsuddin S, Foroozandeh P. Aging of the cells: Insight into cellular senescence and detection Methods. *Eur J Cell Biol*. 2020;99:151108.
126. Gerasymchuk M, Robinson GI, Kovalchuk O, Kovalchuk I. Modeling of the Senescence-Associated Phenotype in Human Skin Fibroblasts. *Int J Mol Sci*. 2022;23:7124.
127. Hernandez-Segura A, Brandenburg S, Demaria M. Induction and Validation of Cellular Senescence in Primary Human Cells. *J Vis Exp JoVE*. 2018;:57782.
128. Yu X, Quan J, Chen S, Yang X, Huang S, Yang G, et al. A protocol for rapid construction of senescent cells. *Front Integr Neurosci*. 2022;16.
129. Mitsui Y, Schneider EL. Relationship between cell replication and volume in senescent human diploid fibroblasts. *Mech Ageing Dev*. 1976;5:45–56.
130. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*. 2000;113 (Pt 20):3613–22.
131. Jensen C, Teng Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Front Mol Biosci*. 2020;7.
132. He C, Zhou C, Kennedy BK. The yeast replicative aging model. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018;1864 9 Pt A:2690–6.
133. Smith J, Wright J, Schneider BL. A budding yeast’s perspective on aging: The shape I’m in. *Exp Biol Med*. 2015;240:701–10.
134. Sinclair DA. Studying the Replicative Life Span of Yeast Cells. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2013;1048:49–63.
135. Longo VD, Fabrizio P. Chronological Aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Subcell Biochem*. 2012;57:101.

136. Kaerberlein M. Lessons on longevity from budding yeast. *Nature*. 2010;464:513–9.
137. Caligaris M, Sampaio-Marques B, Hatakeyama R, Pillet B, Ludovico P, De Virgilio C, et al. The Yeast Protein Kinase Sch9 Functions as a Central Nutrient-Responsive Hub That Calibrates Metabolic and Stress-Related Responses. *J Fungi Basel Switz*. 2023;9:787.
138. Mirisola MG, Longo VD. Yeast Chronological Lifespan: Longevity Regulatory Genes and Mechanisms. *Cells*. 2022;11:1714.
139. Zimmermann A, Hofer S, Pendl T, Kainz K, Madeo F, Carmona-Gutierrez D. Yeast as a tool to identify anti-aging compounds. *FEMS Yeast Res*. 2018;18:foy020.
140. Yalcin G, Lee C-K. Recent studies on anti-aging compounds with *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism. *Transl Med Aging*. 2019;3:109–15.
141. Sun Y, Yu R, Guo H-B, Qin H, Dang W. A quantitative yeast aging proteomics analysis reveals novel aging regulators. *GeroScience*. 2021;43:2573–93.
142. Dahiya R, Mohammad T, Alajmi MF, Rehman MdT, Hasan GM, Hussain A, et al. Insights into the Conserved Regulatory Mechanisms of Human and Yeast Aging. *Biomolecules*. 2020;10:882.
143. Mitchell SJ, Scheibye-Knudsen M, Longo DL, de Cabo R. Animal models of aging research: implications for human aging and age-related diseases. *Annu Rev Anim Biosci*. 2015;3:283–303.
144. Kenyon CJ. The genetics of ageing. *Nature*. 2010;464:504–12.
145. Flurkey K, Curren JM, Harrison DE. Mouse Models in Aging Research. In: Fox JG, Davisson MT, Quimby FW, Barthold SW, Newcomer CE, Smith AL, editors. *The Mouse in Biomedical Research (Second Edition)*. Second Edition. Burlington: Academic Press; 2007. p. 637–72.
146. Dutta S, Sengupta P. Men and mice: Relating their ages. *Life Sci*. 2016;152:244–8.
147. Xie K, Ehninger D. Ageing-associated phenotypes in mice. *Mech Ageing Dev*. 2023;214:111852.
148. Xie W, He M, Yu D, Wu Y, Wang X, Lv S, et al. Mouse models of sarcopenia: classification and evaluation. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2021;12:538–54.
149. Baek K-W, Jung Y-K, Park JS, Kim J-S, Hah Y-S, Kim S-J, et al. Two Types of Mouse Models for Sarcopenia Research: Senescence Acceleration and Genetic Modification Models. *J Bone Metab*. 2021;28:179–91.
150. Heng Y, Eggen BJJ, Boddeke EWGM, Kooistra SM. Mouse models of central nervous system ageing. *Drug Discov Today Dis Models*. 2017;25–26:21–34.
151. Gamage R, Rossetti I, Niedermayer G, Münch G, Buskila Y, Gyengesi E. Chronic neuroinflammation during aging leads to cholinergic neurodegeneration in the mouse medial septum. *J Neuroinflammation*. 2023;20:235.
152. Liang Z, Zhang T, Liu H, Li Z, Peng L, Wang C, et al. Inflammaging: The ground for sarcopenia? *Exp Gerontol*. 2022;168:111931.
153. Uchitomi R, Hatazawa Y, Senoo N, Yoshioka K, Fujita M, Shimizu T, et al. Metabolomic Analysis of Skeletal Muscle in Aged Mice. *Sci Rep*. 2019;9:10425.
154. Yilmaz D, Mathavan N, Wehrle E, Kuhn GA, Müller R. Mouse models of accelerated aging in musculoskeletal research for assessing frailty, sarcopenia, and osteoporosis – A review. *Ageing Res Rev*. 2024;93:102118.
155. Shcherbakov D, Nigri M, Akbergenov R, Brilkova M, Mantovani M, Petit PI, et al. Premature aging in mice with error-prone protein synthesis. *Sci Adv*. 2022;8:eabl9051.

156. Barreiro E. Role of Protein Carbonylation in Skeletal Muscle Mass Loss Associated with Chronic Conditions. *Proteomes*. 2016;4:18.
157. Maldonado E, Morales-Pison S, Urbina F, Solari A. Aging Hallmarks and the Role of Oxidative Stress. *Antioxid Basel Switz*. 2023;12:651.
158. Arvanitaki ES, Stratigi K, Garinis GA. DNA damage, inflammation and aging: Insights from mice. *Front Aging*. 2022;3:973781.
159. Folgueras AR, Freitas-Rodríguez S, Velasco G, López-Otín C. Mouse Models to Disentangle the Hallmarks of Human Aging. *Circ Res*. 2018;123:905–24.
160. Baker DJ, Childs BG, Durik M, Wijers ME, Sieben CJ, Zhong J, et al. Naturally occurring p16Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*. 2016;530:184–9.
161. Köks S, Dogan S, Tuna BG, González-Navarro H, Potter P, Vandenbroucke RE. Mouse models of ageing and their relevance to disease. *Mech Ageing Dev*. 2016;160:41–53.
162. Vanhooren V, Libert C. The mouse as a model organism in aging research: Usefulness, pitfalls and possibilities. *Ageing Res Rev*. 2013;12:8–21.
163. Moskalev A, Chernyagina E, Kudryavtseva A, Shaposhnikov M. Geroprotectors: A Unified Concept and Screening Approaches. *Ageing Dis*. 2017;8:354–63.
164. Moskalev A, Chernyagina E, de Magalhães JP, Barardo D, Thoppil H, Shaposhnikov M, et al. Geroprotectors.org: a new, structured and curated database of current therapeutic interventions in aging and age-related disease. *Ageing*. 2015;7:616–28.
165. Nehlin JO. Senolytic and senomorphic interventions to defy senescence-associated mitochondrial dysfunction. In: Çakatay U, Atayik MC, editors. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. Academic Press; 2023. p. 217–47.
166. Correia-Melo C, Passos JF. Mitochondria: Are they causal players in cellular senescence? *Biochim Biophys Acta*. 2015;1847:1373–9.
167. Lagoumtzi SM, Chondrogianni N. Senolytics and senomorphics: Natural and synthetic therapeutics in the treatment of aging and chronic diseases. *Free Radic Biol Med*. 2021;171:169–90.
168. Ballou LM, Lin RZ. Rapamycin and mTOR kinase inhibitors. *J Chem Biol*. 2008;1:27–36.
169. Sharp ZD, Strong R. The Role of mTOR Signaling in Controlling Mammalian Life Span: What a Fungicide Teaches Us About Longevity. *J Gerontol Ser A*. 2010;65A:580–9.
170. Ali ES, Mitra K, Akter S, Ramproshad S, Mondal B, Khan IN, et al. Recent advances and limitations of mTOR inhibitors in the treatment of cancer. *Cancer Cell Int*. 2022;22:284.
171. Laberge R-M, Sun Y, Orjalo AV, Patil CK, Freund A, Zhou L, et al. MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nat Cell Biol*. 2015;17:1049–61.
172. Mannick JB, Lamming DW. Targeting the biology of aging with mTOR inhibitors. *Nat Aging*. 2023;3:642–60.
173. Fu W, Wu G. Targeting mTOR for Anti-Aging and Anti-Cancer Therapy. *Molecules*. 2023;28:3157.
174. Chrienova Z, Rysanek D, Oleksak P, Stary D, Bajda M, Reinis M, et al. Discovery of small molecule mechanistic target of rapamycin inhibitors as anti-aging and anti-cancer therapeutics. *Front Aging Neurosci*. 2022;14.

175. Fan X, Fan Z, Yang Z, Huang T, Tong Y, Yang D, et al. Flavonoids—Natural Gifts to Promote Health and Longevity. *Int J Mol Sci.* 2022;23:2176.
176. Zhou D-D, Luo M, Huang S-Y, Saimaiti A, Shang A, Gan R-Y, et al. Effects and Mechanisms of Resveratrol on Aging and Age-Related Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2021;2021:9932218.
177. Sarubbo F, Esteban S, Miralles A, Moranta D. Effects of Resveratrol and other Polyphenols on Sirt1: Relevance to Brain Function During Aging. *Curr Neuropharmacol.* 2018;16:126–36.
178. Chien Y, Scuoppo C, Wang X, Fang X, Balgley B, Bolden JE, et al. Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- κ B promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev.* 2011;25:2125–36.
179. Hu H-C, Lei Y-H, Zhang W-H, Luo X-Q. Antioxidant and Anti-inflammatory Properties of Resveratrol in Diabetic Nephropathy: A Systematic Review and Meta-analysis of Animal Studies. *Front Pharmacol.* 2022;13.
180. Barzilai N, Crandall JP, Kritchevsky SB, Espeland MA. Metformin as a Tool to Target Aging. *Cell Metab.* 2016;23:1060–5.
181. Martin-Montalvo A, Mercken EM, Mitchell SJ, Palacios HH, Mote PL, Scheibye-Knudsen M, et al. Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nat Commun.* 2013;4:2192.
182. Cabreiro F, Au C, Leung K-Y, Vergara-Irigaray N, Cochemé HM, Noori T, et al. Metformin retards aging in *C. elegans* by altering microbial folate and methionine metabolism. *Cell.* 2013;153:228–39.
183. Moiseeva O, Deschênes-Simard X, St-Germain E, Igelmann S, Huot G, Cadar AE, et al. Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF- κ B activation. *Aging Cell.* 2013;12:489–98.
184. Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J.* 2000;348 Pt 3:607–14.
185. Algire C, Moiseeva O, Deschênes-Simard X, Amrein L, Petruccioli L, Birman E, et al. Metformin Reduces Endogenous Reactive Oxygen Species and Associated DNA Damage. *Cancer Prev Res (Phila Pa).* 2012;5:536–43.
186. Padki MM, Stambler I. Targeting Aging with Metformin (TAME). In: Gu D, Dupre ME, editors. *Encyclopedia of Gerontology and Population Aging.* Cham: Springer International Publishing; 2021. p. 4908–10.
187. Kirkland JL, Tchkonja T. Senolytic drugs: from discovery to translation. *J Intern Med.* 2020;288:518–36.
188. Borghesan M, Hoogaars WMH, Varela-Eirin M, Talma N, Demaria M. A Senescence-Centric View of Aging: Implications for Longevity and Disease. *Trends Cell Biol.* 2020;30:777–91.
189. Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature.* 2011;479:232–6.
190. Bussian TJ, Aziz A, Meyer CF, Swenson BL, van Deursen JM, Baker DJ. Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature.* 2018;562:578–82.
191. Ogrodnik M, Evans SA, Fielder E, Victorelli S, Kruger P, Salmonowicz H, et al. Whole-body senescent cell clearance alleviates age-related brain inflammation and cognitive impairment in mice. *Aging Cell.* 2021;20:e13296.
192. Helman A, Klochendler A, Azazmeh N, Gabai Y, Horwitz E, Anzi S, et al. p16(Ink4a)-induced senescence of pancreatic beta cells enhances insulin secretion. *Nat Med.* 2016;22:412–20.

193. Zhu Y, Tchkonina T, Pirtskhalava T, Gower AC, Ding H, Giorgadze N, et al. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell*. 2015;14:644.
194. Zhu Y, Doornebal EJ, Pirtskhalava T, Giorgadze N, Wentworth M, Fuhrmann-Stroissnigg H, et al. New agents that target senescent cells: the flavone, fisetin, and the BCL-XL inhibitors, A1331852 and A1155463. *Aging*. 2017;9:955–63.
195. Yousefzadeh MJ, Zhu Y, McGowan SJ, Angelini L, Fuhrmann-Stroissnigg H, Xu M, et al. Fisetin is a senotherapeutic that extends health and lifespan. *EBioMedicine*. 2018;36:18–28.
196. Wang W, Sun C, Mao L, Ma P, Liu F, Yang J, et al. The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends Food Sci Technol*. 2016;56:21–38.
197. Gryniewicz G, Demchuk OM. New Perspectives for Fisetin. *Front Chem*. 2019;7.
198. Xu M, Pirtskhalava T, Farr JN, Weigand BM, Palmer AK, Weivoda MM, et al. Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med*. 2018;24:1246–56.
199. Pawelczak P, Fedoruk-Wyszomirska A, Wyszko E. Antiaging Effect of 4-N-Furfurylcytosine in Yeast Model Manifests through Enhancement of Mitochondrial Activity and ROS Reduction. *Antioxidants*. 2022;11:850.
200. Barciszewska A-M, Giel-Pietraszuk M, Perrigue PM, Naskręt-Barciszewska M. Total DNA Methylation Changes Reflect Random Oxidative DNA Damage in Gliomas. *Cells*. 2019;8:1065.
201. Colombo G, Clerici M, Garavaglia ME, Giustarini D, Rossi R, Milzani A, et al. A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2016;1019:178–90.
202. Li Y-N, Xi M-M, Guo Y, Hai C-X, Yang W-L, Qin X-J. NADPH oxidase-mitochondria axis-derived ROS mediate arsenite-induced HIF-1 α stabilization by inhibiting prolyl hydroxylases activity. *Toxicol Lett*. 2014;224:165–74.
203. Laker RC, Xu P, Ryall KA, Sujkowski A, Kenwood BM, Chain KH, et al. A Novel MitoTimer Reporter Gene for Mitochondrial Content, Structure, Stress, and Damage in Vivo. *J Biol Chem*. 2014;289:12005–15.
204. Gasmi N, Jacques P-E, Klimova N, Guo X, Ricciardi A, Robert F, et al. The switch from fermentation to respiration in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by the Ert1 transcriptional activator/repressor. *Genetics*. 2014;198:547–60.
205. Rosenfeld E, Beauvoit B, Blondin B, Salmon J-M. Oxygen consumption by anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* under enological conditions: effect on fermentation kinetics. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69:113–21.
206. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 2009;417 Pt 1:1–13.
207. Farrugia G, Balzan R. Oxidative Stress and Programmed Cell Death in Yeast. *Front Oncol*. 2012;2:64.
208. Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J*. 2011;435 Pt 2:297–312.
209. Zorova LD, Popkov VA, Plotnikov EY, Silachev DN, Pevzner IB, Jankauskas SS, et al. Mitochondrial membrane potential. *Anal Biochem*. 2018;552:50–9.
210. Swaminathan A, Fokin A, Venckūnas T, Degens H. Methionine restriction plus overload improves skeletal muscle and metabolic health in old mice on a high fat diet. *Sci Rep*. 2021;11:1260.
211. Shimizu R, Tando Y, Yokoyama A, Yanagimachi M. Skeletal Muscle Mass Ratio as an Index for Sarcopenia in Patients With Type 2 Diabetes. *Top Clin Nutr*. 2019;34:209.

212. Shoji H, Takao K, Hattori S, Miyakawa T. Age-related changes in behavior in C57BL/6J mice from young adulthood to middle age. *Mol Brain*. 2016;9:11.
213. Shoji H, Miyakawa T. Age-related behavioral changes from young to old age in male mice of a C57BL/6J strain maintained under a genetic stability program. *Neuropsychopharmacol Rep*. 2019;39:100–18.
214. Xie J, Zhang J, Wu H, Tang X, Liu J, Cheng G, et al. The influences of age on T lymphocyte subsets in C57BL/6 mice. *Saudi J Biol Sci*. 2017;24:108–13.
215. McHugh D, Gil J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J Cell Biol*. 2018;217:65–77.
216. Toussaint O, Medrano EE, von Zglinicki T. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol*. 2000;35:927–45.
217. Chen J-H, Ozanne SE, Hales CN. Methods of Cellular Senescence Induction Using Oxidative Stress. In: Tollefsbol TO, editor. *Biological Aging: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2007. p. 179–89.
218. Duan J, Duan J, Zhang Z, Tong T. Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H₂O₂ involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37:1407–20.
219. Pieńkowska N, Bartosz G, Pichla M, Grzesik-Pietrasiewicz M, Gruchala M, Sadowska-Bartosz I. Effect of antioxidants on the H₂O₂-induced premature senescence of human fibroblasts. *Aging*. 2020;12:1910–27.
220. Sitte N, Merker K, Von Zglinicki T, Grune T, Davies KJ. Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part I--effects of proliferative senescence. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2000;14:2495–502.
221. Chen Q, Fischer A, Reagan JD, Yan LJ, Ames BN. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:4337–41.
222. Kim JY, Atanassov I, Dethloff F, Kroczeck L, Langer T. Time-resolved proteomic analyses of senescence highlight metabolic rewiring of mitochondria. *Life Sci Alliance*. 2023;6.
223. Hutter E, Renner K, Pfister G, Stöckl P, Jansen-Dürr P, Gnaiger E. Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts. *Biochem J*. 2004;380 Pt 3:919–28.
224. Passos JF, Nelson G, Wang C, Richter T, Simillion C, Proctor CJ, et al. Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Mol Syst Biol*. 2010;6:347.
225. Chapman J, Fielder E, Passos JF. Mitochondrial dysfunction and cell senescence: deciphering a complex relationship. *FEBS Lett*. 2019;593:1566–79.
226. Birch J, Passos JF. Targeting the SASP to combat ageing: Mitochondria as possible intracellular allies? *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol*. 2017;39.
227. Correia-Melo C, Marques FD, Anderson R, Hewitt G, Hewitt R, Cole J, et al. Mitochondria are required for pro-ageing features of the senescent phenotype. *EMBO J*. 2016;35:724–42.
228. Cho SI, Jo E-R, Song H. Urolithin A attenuates auditory cell senescence by activating mitophagy. *Sci Rep*. 2022;12:7704.

229. Cinat D, Souza ALD, Soto-Gamez A, Jellema-de Bruin AL, Coppes RP, Barazzuol L. Mitophagy induction improves salivary gland stem/progenitor cell function by reducing senescence after irradiation. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol*. 2023;190:110028.
230. Auguste S, Yan B, Guo M. Induction of mitophagy by green tea extracts and tea polyphenols: A potential anti-aging mechanism of tea. *Food Biosci*. 2023;55:102983.
231. Jin J, Zhang T. Effects of glucose restriction on replicative senescence of human diploid fibroblasts IMR-90. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. 2013;31:718–27.
232. Li Y, Tollefsbol TO. p16INK4a Suppression by Glucose Restriction Contributes to Human Cellular Lifespan Extension through SIRT1-Mediated Epigenetic and Genetic Mechanisms. *PLOS ONE*. 2011;6:e17421.
233. Blazer S, Khankin E, Segev Y, Ofir R, Yalon-Hacohen M, Kra-Oz Z, et al. High glucose-induced replicative senescence: point of no return and effect of telomerase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;296:93–101.
234. Wen J, Pan T, Li H, Fan H, Liu J, Cai Z, et al. Role of mitophagy in the hallmarks of aging. *J Biomed Res*. 2023;37:1.
235. KhalKhal E, Rezaei-Tavirani M, Rostamii-Nejad M. Pharmaceutical Advances and Proteomics Researches. *Iran J Pharm Res IJPR*. 2019;18:51–67.
236. Cuanalo-Contreras K, Schulz J, Mukherjee A, Park K-W, Armijo E, Soto C. Extensive accumulation of misfolded protein aggregates during natural aging and senescence. *Front Aging Neurosci*. 2023;14.
237. Lima T, Li TY, Mottis A, Auwerx J. Pleiotropic effects of mitochondria in aging. *Nat Aging*. 2022;2:199–213.
238. Lechado-Terradas A, Schepers S, Zittlau KI, Sharma K, Ok O, Fitzgerald JC, et al. Parkin-dependent mitophagy occurs via proteasome-dependent steps sequentially targeting separate mitochondrial sub-compartments for autophagy. *Autophagy Rep*. 2022;1:576–602.
239. Hegde AN, Duke LM, Timm LE, Nobles H. The Proteasome and Ageing. *Subcell Biochem*. 2023;102:99–112.
240. Bayliak MM, Lushchak VI. The golden root, *Rhodiola rosea*, prolongs lifespan but decreases oxidative stress resistance in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm*. 2011;18:1262–8.
241. Choi K-M, Hong S-J, van Deursen JM, Kim S, Kim KH, Lee C-K. Caloric Restriction and Rapamycin Differentially Alter Energy Metabolism in Yeast. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2017;73:29–38.
242. Yi D-G, Hong S, Huh W-K. Mitochondrial dysfunction reduces yeast replicative lifespan by elevating RAS-dependent ROS production by the ER-localized NADPH oxidase Yno1. *PloS One*. 2018;13:e0198619.
243. Aerts AM, Zabrocki P, Govaert G, Mathys J, Carmona-Gutierrez D, Madeo F, et al. Mitochondrial dysfunction leads to reduced chronological lifespan and increased apoptosis in yeast. *FEBS Lett*. 2009;583:113–7.
244. Anderson RM, Weindruch R. Metabolic reprogramming, caloric restriction and aging. *Trends Endocrinol Metab TEM*. 2010;21:134–41.
245. Feng Z, Hanson RW, Berger NA, Trubitsyn A. Reprogramming of energy metabolism as a driver of aging. *Oncotarget*. 2016;7:15410–20.

246. Tungmunnithum D, Drouet S, Hano C. Flavonoids from Sacred Lotus Stamen Extract Slows Chronological Aging in Yeast Model by Reducing Oxidative Stress and Maintaining Cellular Metabolism. *Cells*. 2022;11:599.
247. Akbari M, Kirkwood TBL, Bohr VA. Mitochondria in the signaling pathways that control longevity and health span. *Ageing Res Rev*. 2019;54:100940.
248. Barros MH, Bandy B, Tahara EB, Kowaltowski AJ. Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 2004;279:49883–8.
249. Hofer SJ, Davinelli S, Bergmann M, Scapagnini G, Madeo F. Caloric Restriction Mimetics in Nutrition and Clinical Trials. *Front Nutr*. 2021;8:717343.
250. Ocampo A, Liu J, Schroeder EA, Shadel GS, Barrientos A. Mitochondrial respiratory thresholds regulate yeast chronological life span and its extension by caloric restriction. *Cell Metab*. 2012;16:55–67.
251. Sunthonkun P, Palajai R, Somboon P, Suan CL, Ungsurangsri M, Soontorngun N. Life-span extension by pigmented rice bran in the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci Rep*. 2019;9:18061.
252. Lavoie H, Whiteway M. Increased Respiration in the *sch9Δ* Mutant Is Required for Increasing Chronological Life Span but Not Replicative Life Span. *Eukaryot Cell*. 2008;7:1127–35.
253. Wei M, Fabrizio P, Hu J, Ge H, Cheng C, Li L, et al. Life span extension by calorie restriction depends on Rim15 and transcription factors downstream of Ras/PKA, Tor, and Sch9. *PLoS Genet*. 2008;4:e13.
254. Gonzalez S, Rallis C. The TOR Signaling Pathway in Spatial and Temporal Control of Cell Size and Growth. *Front Cell Dev Biol*. 2017;5.
255. Maslanka R, Kwolek-Mirek M, Zadrag-Tecza R. Consequences of calorie restriction and calorie excess for the physiological parameters of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells. *FEMS Yeast Res*. 2017;17.
256. Maslanka R, Zadrag-Tecza R, Kwolek-Mirek M. Linkage between Carbon Metabolism, Redox Status and Cellular Physiology in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Devoid of SOD1 or SOD2 Gene. *Genes*. 2020;11:780.
257. Molinet J, Salinas F, Guillamón JM, Martínez C. GTR1 Affects Nitrogen Consumption and TORC1 Activity in *Saccharomyces cerevisiae* Under Fermentation Conditions. *Front Genet*. 2020;11.
258. Wang T-H, Tseng W-C, Leu Y-L, Chen C-Y, Lee W-C, Chi Y-C, et al. The flavonoid corylin exhibits lifespan extension properties in mouse. *Nat Commun*. 2022;13:1238.
259. Jung PP, Zhang Z, Paczia N, Jaeger C, Ignac T, May P, et al. Natural variation of chronological aging in the *Saccharomyces cerevisiae* species reveals diet-dependent mechanisms of life span control. *Npj Aging Mech Dis*. 2018;4:1–11.
260. Wu E, Lian Y, Zhao S, Li Y, Xiang L, Qi J. Involvement of the Sch9/Rim15/Msn2 signaling pathway in the anti-aging activity of dendrobine from *Dendrobium nobile* Lindl. via modification of oxidative stress and autophagy. *Chin Med*. 2023;18:111.
261. Lin S-J, Kaeberlein M, Andalis AA, Sturtz LA, Defossez P-A, Culotta VC, et al. Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature*. 2002;418:344–8.
262. Capó X, Martorell M, Ferrer MD, Sureda A, Pons V, Domingo JC, et al. Calorie Restriction Improves Physical Performance and Modulates the Antioxidant and Inflammatory Responses to Acute Exercise. *Nutrients*. 2020;12:930.

263. Wang D, Wu M, Li S, Gao Q, Zeng Q. Artemisinin mimics calorie restriction to extend yeast lifespan via a dual-phase mode: a conclusion drawn from global transcriptome profiling. *Sci China Life Sci.* 2015;58:451–65.
264. Perrone GG, Tan S-X, Dawes IW. Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 2008;1783:1354–68.
265. Schieke SM, Finkel T. TOR and aging: less is more. *Cell Metab.* 2007;5:233–5.
266. Li Y, Jiang Y, Paxman J, O’Laughlin R, Klepin S, Zhu Y, et al. A programmable fate decision landscape underlies single-cell aging in yeast. *Science.* 2020;369:325–9.
267. Defossez PA, Prusty R, Kaeberlein M, Lin SJ, Ferrigno P, Silver PA, et al. Elimination of replication block protein Fob1 extends the life span of yeast mother cells. *Mol Cell.* 1999;3:447–55.
268. Tran T, Mach J, Gemikonakli G, Wu H, Allore H, Howlett SE, et al. Male-Female Differences in the Effects of Age on Performance Measures Recorded for 23 Hours in Mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2021;76:2141–6.
269. Baumann CW, Kwak D, Thompson LV. Sex-specific components of frailty in C57BL/6 mice. *Aging.* 2019;11:5206–14.
270. Ackert-Bicknell CL, Anderson L, Sheehan S, Hill WG, Chang B, Churchill GA, et al. Aging Research Using Mouse Models. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2015;5:95–133.
271. Tavallaie M, Voshtani R, Deng X, Qiao Y, Jiang F, Collman JP, et al. Moderation of mitochondrial respiration mitigates metabolic syndrome of aging. *Proc Natl Acad Sci.* 2020;117:9840–50.
272. Asadi Shahmirzadi A, Edgar D, Liao C-Y, Hsu Y-M, Lucanic M, Asadi Shahmirzadi A, et al. Alpha-Ketoglutarate, an Endogenous Metabolite, Extends Lifespan and Compresses Morbidity in Aging Mice. *Cell Metab.* 2020;32:447-456.e6.
273. Newman JC, Milman S, Hashmi SK, Austad SN, Kirkland JL, Halter JB, et al. Strategies and Challenges in Clinical Trials Targeting Human Aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2016;71:1424–34.
274. Yanai S, Endo S. Functional Aging in Male C57BL/6J Mice Across the Life-Span: A Systematic Behavioral Analysis of Motor, Emotional, and Memory Function to Define an Aging Phenotype. *Front Aging Neurosci.* 2021;13.
275. Iakovou E, Kourti M. A Comprehensive Overview of the Complex Role of Oxidative Stress in Aging, The Contributing Environmental Stressors and Emerging Antioxidant Therapeutic Interventions. *Front Aging Neurosci.* 2022;14.
276. Kadlecová A, Maková B, Artal-Sanz M, Strnad M, Voller J. The plant hormone kinetin in disease therapy and healthy aging. *Ageing Res Rev.* 2019;55:100958.
277. Zampelas A, Magriplis E. New Insights into Cholesterol Functions: A Friend or an Enemy? *Nutrients.* 2019;11:1645.
278. Mineo C, Shaul PW. Novel Biological Functions of HDL Cholesterol. *Circ Res.* 2012;111:1079–90.
279. Walter M. Interrelationships Among HDL Metabolism, Aging, and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:1244–50.
280. Wang K, Liu H, Hu Q, Wang L, Liu J, Zheng Z, et al. Epigenetic regulation of aging: implications for interventions of aging and diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7:1–22.
281. Cai Y, Zhou H, Zhu Y, Sun Q, Ji Y, Xue A, et al. Elimination of senescent cells by β -galactosidase-targeted prodrug attenuates inflammation and restores physical function in aged mice. *Cell Res.* 2020;30:574–89.

282. Zhang L, Pitcher LE, Prahalad V, Niedernhofer LJ, Robbins PD. Targeting cellular senescence with senotherapeutics: senolytics and senomorphics. *FEBS J.* 2023;290:1362–83.
283. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature.* 2009;460:392–5.
284. Bitto A, Ito TK, Pineda VV, LeTexier NJ, Huang HZ, Sutlief E, et al. Transient rapamycin treatment can increase lifespan and healthspan in middle-aged mice. *eLife.* 2016;5:e16351.

8. Spis rycin i tabel

Rysunek 1. Całkowita długość życia a długość życia w zdrowiu.	15
Rysunek 2. Cechy starzenia.	17
Rysunek 3. Starzenie replikacyjne komórek ssaczy.	22
Rysunek 4. Starzenie ludzkich fibroblastów w hodowli 2D.	27
Rysunek 5. Modele starzenia drożdży.	29
Rysunek 6. Relacja wieku myszy i człowieka.	30
Rysunek 7. Oznaki starzenia myszy.	31
Rysunek 8. Struktura chemiczna 4-N-furfurylocytozyny (FC).	35
Rysunek 9. Ocena wpływu FC na proces starzenia replikacyjnego fibroblastów.	67
Rysunek 10. Wpływ FC na aktywność β -galaktozydazy i żywotność komórek postarzonych.	68
Rysunek 11. Wpływ FC na poziom uszkodzeń DNA w komórkach.	69
Rysunek 12. Analiza wpływu FC na potencjał błony mitochondrialnej komórek MRC-5.	70
Rysunek 13. Analiza wpływu FC na oddychanie komórkowe.	71
Rysunek 14. Wpływ FC zawartość mitochondriów w postarzonych fibroblastach.	72
Rysunek 15. Analiza wpływu FC na poziom ATP w komórkach.	73
Rysunek 16. Analiza Western blot wpływu FC na poziom wybranych białek.	74
Rysunek 17. Analiza wpływu FC na zmiany proteomice postarzonych komórek MRC-5.	76
Rysunek 18. Wpływ FC na stres oksydacyjny indukowany arseninem sodu w komórkach HaCaT.	77
Rysunek 19. Wpływ FC na stres mitochondrialny indukowany arseninem sodu.	78
Rysunek 20. Ocena komórkowego modelu starzenia przyspieszonego na podstawie wybranych markerów starzenia.	80
Rysunek 21. Analiza wpływu FC na cechy związane ze starzeniem w komórkowym modelu starzenia przyspieszonego.	82
Rysunek 22. Ocena żywotności komórek poddanych starzeniu przyspieszonemu.	83
Rysunek 23. Analiza wpływu FC na CLS i kinetykę wzrostu drożdży.	85
Rysunek 24. Potencjał błony mitochondrialnej i wielkość komórek drożdży w 14 dniu CLS.	87
Rysunek 25. Analiza wpływu FC na parametry bioenergetyczne komórek drożdży w pożywce YPD.	89
Rysunek 26. Analiza wpływu FC na parametry bioenergetyczne komórek drożdży w pożywce YPG.	90
Rysunek 27. Analiza zmian $\Delta\Psi_m$ w komórkach drożdży pod wpływem FC.	91
Rysunek 28. Analiza właściwości antyoksydacyjnych FC w modelu drożdżowym.	93
Rysunek 29. Analiza wpływu FC na poziom ekspresji wybranych genów u drożdży.	94
Rysunek 30. Plan eksperymentu z udziałem myszy.	96
Rysunek 31. Średnia objętość wody wypijanej tygodniowo przez myszy C57BL/6J.	96
Rysunek 32. Analiza obecności FC w mózgu.	97
Rysunek 33. Wykres zmian masy ciała myszy biorących udział w eksperymencie.	98
Rysunek 34. Analiza składu ciała myszy.	99
Rysunek 35. Analiza dobowej aktywności myszy z wykorzystaniem systemu ActiMot.	100
Rysunek 36. Wyniki testów behawioralnych myszy.	101
Rysunek 37. Badanie parametrów biochemicznych krwi.	102
Rysunek 38. Cytometryczna analiza komórek jądraztych krwi myszy.	103
Rysunek 39. Wpływ FC i kinetyny na poziom 8-oxodG w tkankach mysich.	105
Rysunek 40. Wpływ FC na poziom peroksydacji lipidów u myszy.	106
Rysunek 41. Wpływ FC i kinetyny na poziom karbonylacji białek u myszy.	107
Rysunek 42. Wpływ FC i kinetyny na zmiany epigenetyczne w tkankach myszy.	108
Tabela 1. Podział myszy na grypy eksperymentalne.	52
Tabela 2. Lista starterów używanych do analizy PCR w czasie rzeczywistym.	60
Tabela 3. Wpływ FC na CLS drożdży.	86
Tabela 4. Zestawienie zmian w poziomie ekspresji genów u drożdży pod wpływem FC.	95