

Karolina Piecyk

Mechanizmy adaptacji mitochondriów w pierwotnych fibroblastach ludzkich we wczesnych etapach starzenia; efekt daidzeiny

Rozprawa doktorska wykonana w Pracowni Metabolizmu Komórki Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN oraz w Pracowni Elektroanalizy i Elektrokatalizy Chemicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego

> Promotor I: Prof. dr hab. Joanna Szczepanowska Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

> > **Promotor II: Prof. dr hab. Paweł J. Kulesza** Wydział Chemii, Uniwersytetu Warszawskiego

Warszawa, 2023

Niniejsza rozprawa doktorska powstała dzięki finansowaniu interdyscyplinarnych studiów doktoranckich TRI-BIO-CHEM. Projekt "Od chemii do bioinnowacji dla lepszego życia - interdyscyplinarne studia doktoranckie TRI-BIO-CHEM" realizowany przez trzy jednostki partnerskie (Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiego) Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego) w ramach Projektu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020, współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego, POWR.03.02.00-00-I007/16-00 (POWER 2014-2020).





European Funds Knowledge Education Development

Republic of Poland European Union European Social Fund



Pragnę serdecznie podziękować:

Promotorowi Prof. dr hab. Joannie Szczepanowskiej za poświęcony czas, wszystkie niezbędne wskazówki, pomoc naukową zarówno w planowaniu badań jak i podczas powstawania niniejszej pracy oraz przede wszystkim za ogromne zaangażowanie, codzienny optymizm oraz motywację do pracy

Opiekunowi naukowemu dr Dominice Malińskiej przede wszystkim za opiekę merytoryczną, wylane morze cierpliwości, tłumaczenia po stokroć tych samych aspektów oraz wszystkie cenne porady bez których niniejsza rozprawa by nie powstała

Promotorowi Prof. dr hab. Pawłowi Kuleszy oraz opiekunowi naukowemu dr hab. Iwonie Rutkowskiej za udostępnienie aparatury oraz konsultacje podczas pomiarów elektrochemicznych

Dr hab. Annie Bielak-Żmijewskiej, prof. Instytutu oraz **dr hab. Grażynie Mosieniak** za udostępnienie komórek, cenne konsultacje naukowe oraz pomoc w wykonywaniu testów β-GAL oraz BrdU

Natali Nowak oraz Arturowi Wolnemu za nieocenioną pomoc podczas pracy z mikroskopami konfokalnymi, jak również codzienne wsparcie

Dr Adrianowi i mgr Wisińskiej razem zaczynaliśmy i razem kończymy. *Lab partner has no end.*

Kolegom i Koleżankom z **Pracowni Bioenergetyki i Błon Biologicznych** a zwłaszcza **dr Karolinie Drabik** za bycie moim mentorem, gdy rozpoczęłam swoją podróż chemika w świecie biologa. Byłaś i jesteś nieocenionym wsparciem do dnia dzisiejszego. Dziękuję za wprowadzenie w świat biologii!

Koleżankom z **Pracowni Elektroanalizy i Elektrokatalizy Chemicznej** a zwłaszcza **dr Annie Wadas** za miłą atmosferę oraz pomoc w trakcie prowadzonych badań

Jednak szczególne podziękowania składam **Najbliższym.** Moim cudownym **Rodzicom Mamie Agnieszce** i **Tacie Krzysztofowi** oraz wspaniałemu **Narzeczonemu Marcinowi**, którzy wykazali się ogromną wiarą, wyrozumiałością i wsparciem w chwilach zwątpienia. Bez **Was** ta dysertacja by nie powstała.

Jeszcze raz ogromnie dziękuję Wszystkim.

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW I OZNACZEŃ	6
STRESZCZENIE	9
ABSTRACT	10
1.WSTĘP	11
1.1 Budowa i funkcje mitochondriów	11
1.2 Dynamiczna natura mitochondriów	12
1.2.1 Dynamika sieci mitochondrialnej	13
1.2.1.1 Fuzja i fragmentacja mitochondriów	13
1.2.2 Transport mitochondriów w komórce	15
1.2.3 Proces biogenezy mitochondriów	
1.2.4 Proces autofagii/mitofagii	17
1.3 Przyczyny i konsekwencje zaburzenia funkcjonowania mitochondriów	
1.3.1 Stres oksydacyjny i jego konsekwencje	22
1.4 Adaptacja funkcji mitochondriów do zmienionych warunków	
1.4.1 Zaburzenia funkcjonowania mitochondriów	
1.4.2 Starzenie komórkowe	
1.5 Fitoestrogeny	
1.5.1 Charakterystyka estrogenów	
1.5.2 Charakterystyka fitoestrogenów	30
1.5.2.1 Daidzeina	
2. CEL PRACY	
3. MATERIAŁY I METODY	
3.1 Odczynniki chemiczne	
3.2 Prowadzenie hodowli komórkowej oraz wyprowadzone z nich linie pochodne	
3.3 Proliferacja komórek	39
3.4 Oznaczenie masy mitochondrialnej	39
3.5 Pomiar potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej	40
3.6 Pomiar cytosolowego poziomu jonów Ca ²⁺	40
3.7 Oznaczenie poziomu reaktywnych form tlenu (RFT)	41
3.8 Analiza danych z laserowego cytometru skaningowego	
3.9 Test wbudowywania BrdU	
3.10 Oznaczanie aktywności SA-β – galaktozydazy (związanej ze starzeniem)	
3.11 Test karbonylacji białek (OXYBLOT)	44
3.12. Analiza morfologii sieci mitochondrialnej	44
3.12.1 Badanie morfologii sieci mitochondrialnej	47

3.12.2 Barwienie i mikroskopia konfokalna	47
3.13 Badanie szybkości puli odnowy mitochondriów – wiek mitochondriów	48
3.13.1 Metoda "MitoTimer"- wiek mitochondriów	48
3.13.2 Transfekcja i mikroskopia konfokalna	49
3.13.3 Analiza danych	50
3.14 Oznaczanie względnych ilości białek metodą Western Blot	50
3.14.1 Przygotowanie lizatów komórkowych	50
3.14.2 Oznaczanie stężenia białka metodą Bradford	51
3.14.3 Przygotowanie żeli poliakrylamidowych	51
3.14.4 Elektroforeza SDS – PAGE oraz transfer białek	51
3.14.5 Immunodetekcja	52
3.15 Woltamperometria cykliczna	54
3.16 Analiza statystyczna	57
4. WYNIKI	58
4.1. Dobór odpowiedniego modelu doświadczalnego	58
4.2 Charakterystyka badanych linii komórkowych	59
4.2.1 Proliferacja	59
4.2.2 Ocena intensywności podziałów komórkowych - test wbudowywania BrdU	60
4.2.3 Ocena liczby komórek o podwyższonym poziomie SA-β-GAL w populacji	61
4.3 Charakterystyka fizjologii mitochondriów	62
4.3.1 Potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej	62
4.3.2 Poziom Ca ²⁺ w komórce	62
4.3.3 Poziom reaktywnych form tlenu (RFT)	63
4.4 Poziom enzymów antyoksydacyjnych	64
4.5 Poziom uszkodzeń oksydacyjnych białek – karbonylacja białek	66
4.6 Morfologia komórki i sieci mitochondrialnej	67
4.6.1 Morfologia komórki i sieci mitochondrialnej	67
4.6.2 Architektura sieci mitochondrialnej	70
4.7 Biogeneza mitochondriów	73
4.7.1 Poziom białek zaangażowanych w proces biogenezy	73
4.7.2 Masa mitochondriów	74
4.8 Autofagia/mitofagia	75
4.8.1 Poziom białek zaangażowanych w proces autofagii/mitofagii	75
4.8.2 Szybkość odnowy puli mitochondriów	77
4.9 Charakterystyka elektrochemiczna daidzeiny	82
4.10 Charakterystyka badanych linii komórkowych – efekt daidzeiny	88
4.10.1 Dobór stężenia daidzeiny	88

4.10.2 Ocena intensywności podziałów komórkowych – test wbudowywania BrdU	91
4.10.3 Ocena liczby komórek o podwyższonym poziomie SA-β-GAL w populacji	91
4.11 Charakterystyka fizjologii mitochondriów – efekt daidzeiny	92
4.11.1 Potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej	92
4.11.2 Poziom jonów Ca ²⁺ w komórce	93
4.11.3 Poziom reaktywnych form tlenu (RFT) – efekt daidzeiny	93
4.11.4 Charakterystyka fizjologii mitochondriów – efekt daidzeiny TPP+	95
4.12 Poziom enzymów antyoksydacyjnych – efekt daidzeiny	98
4.13 Poziom uszkodzeń oksydacyjnych białek – efekt daidzeiny	102
4.14 Morfologia sieci mitochondrialnej – efekt daidzeiny	103
4.14.1 Architektura sieci mitochondrialnej	103
4.15 Biogeneza mitochondriów – efekt daidzeiny	107
4.15.1 Poziom białek zaangażowanych w proces biogenezy mitochondriów	108
4.15.2 Masa mitochondriów	111
4.16 Autofagia/mitofagia – efekt daidzeiny	111
4.16.1 Poziom białek zaangażowanych w proces autofagii/mitofagii	111
4.16.2 Szybkość odnowy puli mitochondriów	115
4.17 Właściwości estrogenowe – efekt daidzeiny	115
5. DYSKUSJA	121
5.1 Dobór i charakterystyka modelu badawczego	121
5.2 Charakterystyka mitochondriów we wczesnym okresie starzenia	123
5.3 Wpływ daidzeiny na funkcjonowanie mitochondriów	131
6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	136
7. BIBLIOGRAFIA	138
8. LISTA PUBLIKACJI NAUKOWYCH	149

WYKAZ SKRÓTÓW I OZNACZEŃ

BDE	energia dysocjacji wiązania
BrdU	5'-bromo-2'-deoksyurydyna
СССР	karbonylocyjanek-3-chlorofenylo-hydrazonu, protonofor
CM-H2DCFDA	ester acetylowy dioctanu 5-(i-6)-chlorometylo-2'7'
	dichlorodihydrofluoresceiny – sonda fluorescencyjna do pomiaru
	poziomu nadtlenku wodoru
Cu/ZnSOD	ang. copper-zinc superoxide dismutase; miedziowo-cynkowa
	dysmutaza ponadtlenkowa
D lub Dai	daidzeina
DMEM	ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium; pożywka płynna
DMSO	dimetylosulfotlenek
Drp1	ang. Dynamin-related protein 1; GTPaza odpowiedzialna za
	fragmentację mitochondriów
ER	ang. Endoplasmic reticulum; siateczka śródplazmatyczna
FBS	płodowa surowica bydlęca
GPx	ang. Glutathione peroxidasa; peroksydaza glutationowa
GRx	ang. Glutathione Reductase; reduktaza glutationowa
GSH	glutation
GSSG	disiarczek glutationu
H ₂ O ₂	nadtlenek wodoru
HAT	ang. Hydrogen atom transfer; przeniesienie atomu wodoru
IMM	ang. Inner Mitochondrial Membrane; błona wewnętrzna
	mitochondriów
IP	potencjał jonizacji
JC-1	jodek 5,5'6,6'-tetrachloro
	1,1',3,3'tetraetylobenzoimidazolokarbocyjanku – sonda
	fluorescencyjna do pomiaru potencjału wewnętrznej błony
	mitochondrialnej
LC3 (MAP1LC3)	ang. Microtubule associated proteins 1A/1B light chain; lekki
	łańcuch 3 białek związanych z mikrotubulami 1A/1B
L-Opa1	ang. Long optic atrophy I; długa izoforma białka Opal
MCU	ang. Mitochondrial calcium uniporter; mitochondrialny
7.500	uniporter wapniowy
Mff	ang. Mitochondrial fission factor; białko uczestniczące we
	tragmentacji mitochondriów
Mfn1/2	ang. <i>Mitofusin $\frac{1}{2}$</i> ; mitofuzyna $\frac{1}{2}$ – białko uczestniczące w fuzji
	zewnętrznej błony mitochondrialnej
Miro1/2	ang. <i>Mitochondrial Rho GTPase ½</i> ; białko kompleksu
	transportującego mitochondria

MitoSOX Red	ang. Mitochondrial superoxide indicator; sonda fluorescencyjna
	do pomiaru poziomu anionorodnika ponadtlenkowego
MitoTracker	ang. Benzoxazolium, 2-[3-[5,6-dichloro-1,3-bis[[4
Green FM	(chloromethyl) phenyl]methyl]-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-
	ylidene]-1-propenyl]-3-methyl-, chloride; benzoksazolium, 2-
	[3- [5,6-dichloro-1,3-bis [[4- (chlorometylo) fenylo] metylo] -
	1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-ilideno] -1-propenyl] -3-
	metylo, chlorek, znacznik fluorescencyjny do pomiaru masy
	mitochondriów
MnSOD	ang. manganese superoxide dismutase; manganowa dysmutaza
	ponadtlenkowa, izoforma mitochondrialna
mtDNA	mitochondrialne DNA
MWCNTs	ang. Multi-walled Carbon Nanotube; wielościenne nanorurki
	węglowe
nDNA	jądrowe DNA
nPt	ang. Platinum nanoparticles; nanocząstki platyny
Nrf1/2	ang. Nuclear respiratory factor 1/2; jądrowe czynniki
	transkrypcyjne
O2	anionorodnik ponadtlenkowy
ОН•	rodnik hydroksylowy
OMM	ang. Outer Mitochondrial Membrane; błona zewnętrzna
	mitochondriów
Ona1	ang <i>Optic atrophy protein 1</i> : GTPaza odpowiedzialna za fuzie
Opul	błony wewnetrznej mitochondrjów
n62/SOSTM1	ang Sequestosome I protein: sekwestosom 1/p62
	hyfor fosforonowy
PBS	
PGC-1	ang. Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1
	(α/β) ; koaktywator I (α/β) receptora γ aktywowanego przez
	proliferatory peroksysomow
PINK1	ang. PTEN-induced putative kinase 1; mitochondrialna kinaza
	serynowo-treoninowa
POLG	ang. <i>Polymerase gamma</i> ; mitochondrialna polimeraza γ
RFT	reaktywne formy tlenu
SA-β-GAL	ang. Senescence-Associated- <i>β</i> -galactozydaze: zwiazana ze
	starzeniem β-galaktozydaza
SASP	ang. Senescence-Associated Secretory Phenotype; fenoty
	sekrecyjny związany ze starzeniem
SDS	dodecylosiarczan sodu, detergent jonowy

SDS-PAGE	elektroforeza wykonywana w żelu akrylamidowym w obecności SDS
SET	ang. Single electron transfer; transfer pojedynczego elektronu
SIPS	ang. <i>Stress-induced premature senescence;</i> indukowane stresem przyspieszone starzenie
SOD1/2	ang. <i>Superoxide dismutase ¹/₂</i> ; dysmutaza ponadtlenkowa ¹ / ₂
S-Opa1	ang. Short optic atrophy 1; krótka izoforma Opal
ТВН	wodoronadletnek t-butylu
TBS	wodny roztwór soli fizjologicznej (0,9% NaCl) buforowanej Tris
TBST	TBS z dodatkiem detergentu Tween 20
TEMED	N',N',N',N'-tetrametyloetylenodiamina
TFAM	ang. <i>Mitochondrial transcription factor A</i> ; mitochondrialny czynnik transkrypcyjny A
Trak1/2	ang. <i>Trafficking kinesin protein ½</i> ; białko kompleksu transportującego mitochondria
Tris	tris(hydroksymetylo)aminometan
Triton X-100	eter tert-oktylofenylowy glikolu polietylenowego, detergent niejonowy
Tween 20	ang. <i>Polyoxyethylenesorbitam monolaurate</i> ; monolaurynian polioksyetylenosorbitamu – detergent niejonowy
ΔΨ	potencjał elektryczny na wewnętrznej błonie mitochondrialnej

STRESZCZENIE

Mitochondria są wyspecjalizowanymi, wielofunkcyjnymi i dynamicznymi organellami, które są zaangażowane w wiele procesów zachodzących w komórce. Są głównym miejscem powstawania energii chemicznej (ATP) jak również powstawania reaktywnych form tlenu (RFT). Ze względu na szereg pełnionych funkcji odgrywają istotną rolę w przekazywaniu sygnału w obrębie komórki. Mitochondria w komórce jako pierwsze reagują na warunki stresowe, a jedną ze ścieżek sygnalizacyjnych, która pozwala na ich adaptację do warunków stresowych, jest mitochondrialna wsteczna kaskada sygnałowa czyli sygnalizacja mitochondria – jądro komórkowe – mitochondria. Proces adaptacji mitochondriów pozwala na utrzymanie komórki w dobrej kondycji.

Zaburzenia funkcjonowania mitochondriów zaobserwowano w wielu chorobach oraz w procesie starzenia komórkowego. Jednak wciąż brakuje badań dotyczących metabolizmu mitochondriów we wczesnym etapie starzenia. Dodatkowo poszukuje się związków naturalnych, które poprzez swoje właściwości mogą przyczynić się do opóźnienia procesu starzenia. Celem pracy jest zbadanie, jak **mitochondria** adaptują się **we wczesnym okresie starzenia indukowanego** (które było wywołane krótkotrwałym stresem oksydacyjnym przez wodoronadtlenek tert-butylu) i **replikacyjnego** (zależnego od skracania telomerów) w pierwotnej linii fibroblastów oraz zbadanie wpływu fitoestrogenu – **daidzeiny** na te procesy. Aby zrealizować ten cel, scharakteryzowano elementy prowadzące do adaptacji mitochondriów poprzez regulację wstecznej kaskady sygnałowej. Zbadano procesy dynamiki mitochondriów, takie jak: reorganizacja sieci, biogeneza mitochondriów i autofagia/mitofagia.

We wczesnych etapach starzenia, zarówno przyspieszonego i replikacyjnego, następuje indukcja wstecznej kaskady sygnałowej poprzez podniesiony poziom RFT w komórce. W odpowiedzi na stres spowodowany starzeniem adaptacja mitochondriów jest odmienna dla modelu starzenia indukowanego i replikacyjnego. Badania wpływu daidzeiny na proces starzenia wykazały, że ma ona pozytywny wpływ na funkcjonowanie mitochondriów w obu typach starzenia.

Wnikliwa analiza zaburzeń w funkcjonowaniu mitochondriów może okazać się atrakcyjną strategią, która pozwoli opóźnić starzenie oraz występowanie chorób związanych z wiekiem.

ABSTRACT

Mitochondria are specialized, multifunctional and dynamic organelles involved in many processes in the cell. They are the main place for the generation of chemical energy (ATP) as well as the formation of reactive oxygen species (ROS). Due to the wide range of performed functions, mitochondria play a key role in signal transduction in the cell. For instance, they are first to react to stress conditions, and one of the signalling pathways that enables them to adapt to those changes is the mitochondrial retrograde signalling cascade, i.e. the mitochondria– nucleus–mitochondria signalling. Such feedback signaling and mitochondrial adaptation allow to keep the cell in good condition.

Mitochondrial dysfunction has been observed in many diseases and in the process of cellular ageing. However, research on mitochondrial metabolism in early ageing is still lacking. In addition, natural compounds are sought that, through their properties, can contribute to delaying the aging process. The study aims to investigate how mitochondria adapt in the early stage of phase of induced (which was caused by short-term oxidative stress by tert-butyl hydroperoxide) and replicative (depending on telomere shortening) ageing in the primary line of fibroblasts and to investigate the influence of the phytoestrogen - daidzein on these processes. Therefore, the elements leading to mitochondrial adaptation through regulation of the retrograde signalling cascade were characterized and mitochondrial dynamics processes such as network reorganization, mitochondrial biogenesis and autophagy/mitophagy were investigated.

In the early stages of ageing, both accelerated and replicative, a reverse signalling cascade is induced by elevated levels of ROS in the cell. In response to stress caused by ageing, mitochondrial adaptation is disparate for the model of induced and replicative ageing. Studies on the effect of phytoestrogen daidzein on the ageing process have shown that it has a positive influence on the functioning of mitochondria in both types of ageing.

A complete and thorough analysis of mitochondrial dysfunction may become an attractive strategy to delay ageing and age-related diseases.

1.WSTĘP

1.1 Budowa i funkcje mitochondriów

Mitochondria to wyspecjalizowane organella, których główną funkcją jest konwertowanie energii w komórce. Organella te są złożone z dwóch błon białkowolipidowych, które otaczają macierz mitochondrialną, zaś pomiędzy nimi ukształtowała się przestrzeń międzybłonowa. Wewnętrzna błona jest pofałdowana, tworzy uwypuklenia zwane grzebieniami mitochondrialnym (łacina:*cristae*). W wewnętrznej błonie mitochondrialnej położone są kompleksy łańcucha oddechowego oraz syntaza ATP. W macierzy mitochondrialnej są między innymi enzymy cyklu Krebsa oraz DNA mitochondrialne (mtDNA) (McCarron i in., 2013). W mtDNA u ludzi znajduje się 37 genów: 13 genów kodujących białka będące podjednostkami kompleksów łańcucha oddechowego i syntazy ATP, 2 rRNA oraz 22 tRNA. Większość genów białek mitochondrialnych jest kodowana w jądrowym DNA (Friedman & Nunnari, 2014; Jeandard i in., 2019).



Ryc.1 *Budowa mitochondrium*. Zmodyfikowano na podstawie (Davis & Williams, 2012; Shibata i in., 2009).

Mitochondria pełnią wiele funkcji w komórce. Są zaangażowane w liczne procesy metaboliczne i odgrywają znaczącą rolę w sygnalizacji komórkowej. Najważniejszą funkcją jaką pełnią to synteza ATP z ADP wykorzystując energię z utleniania substratów cyklu Krebsa oraz kwasów tłuszczowych. Odgrywają też znaczącą rolę w homeostazie wapnia w komórce (buforując jony Ca²⁺) oraz są głównym miejscem w komórce powstawania reaktywnych form tlenu (RFT). Biorą udział w takich procesach jak: β -oksydacja kwasów tłuszczowych, cykl kwasów trójkarboksylowych, biosynteza hemu,

centrów żelazo-siarkowych oraz steroidów. Mitochondria są miejscem, gdzie zachodzi regulacja wewnętrznego szlaku apoptozy oraz proces termogenezy (Bhatti i in., 2017).



Ryc.2 Sieć mitochondrialna w komórce (fibroblast).

1.2 Dynamiczna natura mitochondriów

Mitochondria sa to dynamiczne organella tworzące mniej lub bardziej rozbudowaną sieć, która ulega nieustannej przebudowie. W zależności od typu komórki, jej etapu rozwoju i wieku, czynników środowiskowych, stanu chorobowego czy też tła genetycznego, ukształtowanie sieci mitochondrialnej jest różnorodne. Sieć mitochondrialna podlega ciągłym procesom: fuzji i fragmentacji oraz dynamicznym procesom jakimi są biogeneza mitochondriów oraz mitofagia. Dynamika mitochondriów jest odzwierciedleniem aktualnego stanu komórki, a aktywność procesów dynamicznych jest często związana z odpowiedzią na stres lub zmiany patofizjologiczne. Dlatego zachowanie właściwej równowagi między procesami fuzji i fragmentacji oraz balansu miedzy procesami biogenezy i mitofagii ma kluczowe znaczenie dla optymalnego funkcjonowania komórki i jej przeżycia (Adebayo i in., 2021; Chan, 2019; Meyer i in., 2017).



Ryc.3 Dynamiczne procesy świadczące o plastyczności mitochondriów.

1.2.1 Dynamika sieci mitochondrialnej

1.2.1.1 Fuzja i fragmentacja mitochondriów

Podczas procesu **fuzji** mitochondriów dochodzi do połączenia ze sobą sąsiadujących mitochondriów. Proces ten umożliwia wymianę mtDNA, białek, lipidów czy innych metabolitów między mitochondriami. Za fuzję zewnętrznej błony mitochondrialnej odpowiadają białka należące do grupy dużych GTPaz: zwane mitofuzynami (Mfn). Obie izoformy Mfn1 i 2 są zbudowane podobnie; na N-końcu znajduje się domena GTP-azowa, w środku białka są 2 domeny transbłonowe oraz na C-końcu znajduję się domena heptadowa HR2. Interakcja między dwoma białkami Mfn1 i 2 poprzez domenę HR2 powoduje uwięzienie przylegających mitochondriów przed późniejszą fuzją indukowaną hydrolizą GTP (H. Lee & Yoon, 2016; Y. J. Liu i in., 2020; Meyer i in., 2017).

Mfn 2 jest białkiem siateczki śródplazmatycznej, gdzie uczestniczy w połączeniu z mitochondriami umożliwiając wydajny wychwyt jonów Ca²⁺ przez mitochondria (de Brito & Scorrano, 2008). Mfn 1 ma kluczowe znaczenie dla fuzji mitochondriów, zaś Mfn 2 ze względu na niższą aktywność domeny GTP-azowej prawdopodobnie stabilizuje interakcje pomiędzy mitochondriami. Mutacje w genie kodującym Mfn 2 u ludzi powodują chorobę Charcot – Marie – Tooth typu II A oraz obwodową neuropatię czuciowo – ruchową (H. Chen i in., 2003; Meyer i in., 2017).

W proces fuzji wewnętrznej błony mitochondrialnej zaangażowane jest białko Opa 1 (ang. *Optic artrophy-1*). Białko to składa się z 8 izoform, które są produktami alternatywnego splicingu. Cięcie białka prowadzi do powstania długich form L-Opa 1 (ang. *Long – Opa1*), które mogą być rozszczepione proteolitycznie do krótkich form S-Opa1 (ang. *Short – Opa1*) przez proteazy OMA1 i YME1L. Formy długie promują fuzję, krótkie – fragmentację mitochondriów. Białko to uczestniczy także w kształtowaniu grzebieni mitochondrialnych (Adebayo i in., 2021; Y. J. Liu i in., 2020).



Ryc.4 Schemat procesów fuzji i fragmentacji mitochondriów zaangażowanych w dynamikę sieci mitochondrialnej. Zmodyfikowano na podstawie (A. W. Gao i in., 2014).

Proces **fragmentacji** mitochondriów powoduje oddzielenie fragmentów mitochondriów od sieci. Pofragmentowane mitochondria są transportowane wzdłuż cytoszkieletu mikrotubularnego do tych obszarów w komórce, gdzie jest zwiększone zapotrzebowanie na energię. Proces fragmentacji jest także niezbędny dla prawidłowego przebiegu mitofagii, procesu apoptozy czy mitozy i służy do tego by uszkodzone fragmenty sieci zostały oddzielone i usunięte od pozostałej sieci mitochondrialnej.

Jednym z głównych białek zaangażowanych we fragmentację sieci mitochondrialnej jest białko Drp 1 (ang. *Dynamin releted protein 1*) pochodzące z grupy o dużej masie cząsteczkowej GTPaz. Drp1 jest zbudowane z domeny GTPazowej, która znajduje się na N-końcu, domeny środkowej, domeny zmiennej i domeny efektorowej położonej na C- końcu. Istnieje wiele białek położonych na zewnętrznej błonie mitochondriów zaangażowanych w rekrutacje Drp1. Jednym z nich jest najwcześniej

wykyre białko Fis1 (ang. *Mitochondrial fission 1 protein*), białka Mff (ang. *Mitochondrial fission factor*) oraz MiD49/50 (ang. *Mitochondrial dynamics proteins 49/51 kDa*). Przy zwewnętrznej błonie mitochondrialnej następuje oligomeryzacja Drp1, co powoduje powstawanie i zaciskanie pierścienia wokół mitochondrium (J. E. Lee i in., 2016; Y. J. Liu i in., 2020). We fragemntację mitochondriów zaangażowane są również białka cytoszklietu - aktyna i motoryczne - miozyna oraz siateczka endoplazmatyczna.

1.2.2 Transport mitochondriów w komórce

Transport mitochondriów pozwala na dotarcie do odpowiednich przedziałów komórkowych (zwłaszcza tam gdzie zapotrzebowanie na energię jest największe). Ponieważ mitochondria biorą udział w sygnalizacji komórkowej, apoptozie oraz w wielu szlakach biosyntezy, więc ich rozmieszczenie w komórce jest także bardzo ważne. Za transport mitochondriów odpowiedzialny jest kompleks transportujący, który składa się z białek motorycznych oraz białek adaptorowych (Kruppa & Buss, 2021). Najwięcej badań odnośnie transportu mitochondriów zostało wykonanych w komórce nerwowej, ze względu na to, że stanowi dogodny model, gdzie mitochondria mają długą drogę do aby dotrzeć do synapsy. W komórkach spolaryzowanych ruch pokonannia. mitochondriów odbywa się w dwóch kierunkach. Białkami motorycznymi są kinezyna i dyneina. Kinezyna jest białkiem, które uczestniczy w ruchu postępowym (ang. Anterograde), czyli w kierunku plus końca mikrotubul, zaś dyneina uczestniczy w ruchu wstecznym (ang. Retrograde), czyli w kierunku minus końca mikrotubul. Jednymi z najlepiej przebanych białek adaptorowych są białka Miro1/2 oraz Trak1/2. Białko Miro uczestniczy w ruchu zależnym zarówno od kinezyny jak i dyneiny. W swojej budowie posiada domenę transbłonową poprzez którą zakotwiczone jest w błonie zewnętrznej mitochondrium oraz posiada 2 domeny EF-hand, po związaniu jonów wapnia zmienia się konfromacja Miro i ruch mitochondriów zostaje wstrzymany. Z kolej cytoplazmatyczne białko Trak oddziałuje bezpośrednio z białkiem Miro. Forma Trak1 oddziałuje zarówno z kinezyną jak i dyneiną, zaś Trak2 oddziałuje jedynie z dyneiną (Drabik, 2016). W ruchu postępowym mitochondria są rozprowadzane i dostarczane w odpowiednie przedziały komórkowe, natomiast w ruchu wstecznym dysfunkcyjne mitochondria są kierowane do okolic okołojądrowych komórki, gdzie ulegają mitofagii.



Ryc.5 *Białka zaangażowane w transport mitochondriów w komórce*. Zmodyfikowano na podstawie (MacAskill & Kittler, 2010).

1.2.3 Proces biogenezy mitochondriów

Biogeneza mitochondriów jest złożonym procesem, w którym nowe mitochondria powstają w wyniku wzrostu i podziału wcześniej już istniejących organelli. Czynniki transkrypcyjne oraz ich koaktywatory regulują syntezę białek mitochondrialnych oraz lipidów błonowych (P. A. Li i in., 2017; Popov, 2020).

Koaktywator PGC-1a (ang. [PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor)y coactivator- 1α]) indukuje biogenezę mitochondriów przez aktywację czynników transkrypcyjnych, takich jak NRF1 i NRF2 (ang. Nuclear respiratory factor¹/₂) (Jornayvaz & Shulman, 2010). Zarówno NRF1 jak i NRF2 regulują ekspresję genów białek mitochondrialnych, wiążąc się zregionami promotora genów jądrowych łańcucha kodujących podjednostki kompleksów oddechowego i ATPazy mitochondrialnej. Reguluja ekspresję genów zaangażowanych w syntezę hemu i innych białek mitochondrialnych. NRF2 kontroluje także ekspresję genów enzymów antyoksydacyjnych (Itoh i in., 2015; Uittenbogaard & Chiaramello, 2014). Oba czynniki transkrypcyje NRF1 i NRF2 zaangażowane są w ekspresję białka TFAM (ang. Mitochondrial transcription factor A) czynnika transkrypcyjnego kluczowego dla regulacji transkrypcji i replikacji mtDNA. Proces transkrypcji mtDNA wymaga obecności 3 białek: polimerazy RNA (ang. Mitochondrial DNA-dependent RNA polymerase, POLRMT), TFAM i TFB2M (ang. Mitochondrial transcription specificity factor), który jest odpowiedzialny za interakcje TFAM-POLMRT, zaś w proces replikacji mtDNA zaangażowana jest mitochondrialna polimeraza γ (ang. *Mitochondrial DNA polymerase gamma, POLG*). Aktywność oraz obecność TFAM są kluczowe w bezpośredniej regulacji liczby kopii mtDNA oraz dla innych funkcji genomu mitochondrialnego (Picca & Lezza, 2015).

Biogeneza mitochondriów jest ściśle regulowana przez wiele szlaków sygnałowych w odpowiedzi na różne bodźce środowiskowe i metaboliczne, takie jak np.: dostępność tlenu, poziom jonów wapnia, stosunek AMP/ATP czy NAD+/NADH, temperatura czy hormony. Jednym ze szlaków, który reguluje biogenezę jest szlak zależny od AMPK (kinazy zależnej od AMP), który reguluje wewnątrzkomórkowy metabolizm energetyczny w odpowiedzi na dostępność substratów energetycznych. AMPK aktywuje biogenezę mitochondriów poprzez stymulację SIRT1 lub hamowanie fosfodiesterazy cAMP. Innym szlakiem biogenezy jest szlak zależny od SIRT1, która jest z kolei aktywatorem PGC-1α. Szlak NO, w którym NO wytwarzany przez eNOS aktywuje cyklazę guanylową, zwiększając ilość obecnego cGMP, który przekazuje sygnał do jądra poprzez nieznany mechanizm, prowadząc w konsekwencji do indukcji transkrypcji genu PGC-1α i biogenezy mitochondriów (Jornayvaz & Shulman, 2010). Poniżej przedstawiono schemat (Ryc.6) ścieżek aktywacji wraz z aktywatorami procesu biogenezy (P. A. Li i in., 2017).



Ryc.6 *Ścieżki oraz aktywatory procesu biogenezy*. Zmodyfikowano na podstawie (P. A. Li i in., 2017).

1.2.4 Proces autofagii/mitofagii

Autofagia jest ważnym procesem komórkowym, odpowiada nie tylko za śmierć komórki, ale też za jej przeżycie. W tym procesie kontrolowane jest usuwanie uszkodzonych fragmentów komórki, zużytych organelli komórkowcych takich jak

mitochondria, siateczka śródplazmatyczna i peroksysomy, czy też zagregowanych biomolekuł. Autofagia służy także eliminowaniu patogenów wewnątrzkomórkowych (J. Zhang, 2013). Znane są 3 typy autofagii:

- Makro-autofagia, która polega na dostarczeniu substratów przeznaczonych do usunięcia do lizosomu za pośrednictwem autofagosomu, czyli pęcherzyku z podwójną warstwą lipidową. Ten łączy się z lizosomem, tworząc autolizosom.
- Mikro-autofagia, która polega na bezpośrednim wychwyceniu przez lizosom komponentów przeznachonych do degradacji, poprzez inwaginację błony lizosomalnej
- Autofagia za pośrednictwem białek opiekuńczych (chaperonów), podczas której docelowe białka są przemieszczane przez błonę lizosomalną w kompleksie z białkami opiekuńczymi (takimi jak Hsc-70), które są rozpoznawane przez lizosomalny receptor błonowy związany z lizosomalnym białkiem błonowym 2A (LAMP-2A), prowadząc do ich rozwinięcia i degradacji (Glick i in., 2010).

Mitofagia jest selektywną formą autofagii, która popularnie nazywana jest mechanizmem kontroli jakości mitochondriów, umożliwiającym degradację uszkodzonych i zbędnych mitochondriów. Proces ten jest konieczny do utrzymania puli funkcjonalnych mitochondriów. Mitofagia nasila się szczególnie w warunkach stresowych dla komórki (np. stres oksydacyjny, niedotlenienie, spadek potencjału energetycznego mitochondriów czy nagromadzenia nie sfałdowanych białek). Dysfunkcyje w obrębie mitofagii obserwowane są w wielu procesach patalogicznych np. w chorobach neurodegeneracyjnych, sercowo-naczyniowych oraz w chorobach nowotworowych (G. Chen i in., 2020).

Najlepiej scharakteryzowanym szlakiem mitofagii jest tzw. szlak PINK1/Parkin zależny. Parkin jest białkiem cytozolowym, ligaza ubikwityny E3, a PINK1 jest mitochondrialną kinazą białkową. W zdrowych spolaryzowanych mitochondriach białko PINK1 lokalizuje się w wenętrznej błonie mitochondrialnej. W przypadku niespolaryzowanych mitochondriów (spadek $\Delta \Psi$) PINK1 pozostaje na zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Tak zlokalizowany PINK1 jest sygnałem dla Parkin, które z cytozolu jest rekrutowane do mitochondriów. Dokładna ścieżka przebiegu mitofagii jest następująca. Tranporst PINK1 przez wewnętrzną błonę mitochondrialną za pośrednictwem translokazy TIM ściśle zależy od $\Delta \Psi$. Depolaryzacja mitochondriów zaburza ten transport i PINK1 tworzy wtedy kompleks z translokazą TOM. Białko PINK1 ulega autofosforylacji, co powoduje rekrutacje białka Parkin do zewnętrznej błony mitochondrialnej i jego fosforylację. Aktywne białko Parkin katalizuje przyłączenie reszt ubikwitynowych do białek znajdujących się w zewnętrznej błonie mitochondrialnej takich jak VDAC, TOM, Mfn i FIS1 (białka odpowiedzialne za fuzję mitochondriów, które zmodyfikowane poprzez ubikwitynację sa nieaktywne i nie tworzą pierścienia z ER). Następuje również rekrutacja białka Drp1, które uczestniczy w procesie fragmentacji mitochondriów (zaciskanie charakterystycznego pierścienia wokół fragmentu sieci przeznaczonych do oddzielenia), a tym samym ułatwia tworzenie autofagosomu i degradację (Yoo & Jung, b.d.).



Ryc.7 *Schemat usuwania mitochondriów ścieżką PINK1/Parkin*. Zmodyfikowano na podstawie (Dorn, 2019).

Białkiem, które jest zaangażowane zarówno w proces autofagii jak i mitofagii jest białko LC3 (ang. *Microtubule associated proteins 1A/1B light chain*). LC3 występuje w 2 formach: w formie cytozolowej (LC3-I) oraz lipidowej związanej z błoną fagoforu (LC3-II). Cytoplazmatyczna forma białka LC3 jest w formie nieaktywnej. Pod wpływem impulsu stymulującego do autofagii dochodzi do cięcia proteolicznego tego białka. Cytosolowa postać LC3 tworzy koniugat LC3 z fosfatydyloetanoloaminą (LC3-II), który jest rekrutowany do błon autofagosomalnych. Te z kolei łączą się z lizosomami, tworząc autolizosomy, a składniki wewnątrz autofagosomów są rozkładane przez hydrolazy lizosomalne. W tym samym czasie LC3-II w świetle autolizosomu ulega degradacji. Zatem stosunek formy LC3-II do LC3-I odzwierciedla aktywność autofagiczną (Tanida i in., 2008).



W komórkach ssaków do zakotwiczenia białka LC3 w błonie izolującej przyłącza się białko p62 zwane też sekwestromu 1/SQSTM1, które białkiem iest białkiem adaptorowym autofagii. Białko to pełni także wiele funkcji – głównie sygnałowych w komórce, ale potrafi też zaznaczać wszystkie składniki komórki przeznaczone do utylizacji. Uważa się, że p62 zaznacza uszkodzone mitochondria, a jego działanie właczone jest w ścieżkę mitofagii tzw. PINK1/Parkin zależną, i jest ono modulatorem tego procesu. Białko p62 rozpoznaje białka ubikwitynowane za pośrednictwem mitochondriów, formowanie autofagosomu inicjuje poprzez rekrutację LC3. Fosforylacja Parkin (przez PINK1) też promuje łączenie p62 do LC3. Pokazano, że Parkin też łączy się bezpośrednio do ubikwitowanego p62 powodując jego degradację. Dlatego sugeruje się, że Parkin i p62 są kluczowym komponentem w mitofagii i funkcjonalnie są bardzo ze sobą powiązane (Memme i in., 2021).

Białko Beklina 1 odgrywa ważna rolę w indukcji autofagii i jest często stosowana jako marker do monitorowania tego procesu, uczestniczy w tworzeniu omegasomu (Aryal i in., 2014). Beklina częścią kompleksu 1 jest kinazy 3fosfatydyloinozytolu (kinaza PI3) klasy III, który indukuje autofagie. Pierwszym spośród coraz większej liczby zidentyfikowanych białek oddziałujących Beklin jest białko Z 1 przeciwapoptotyczne Bcl-2. Dysocjacja Beklin 1 od Bcl-2 jest niezbędna dla jej aktywności autofagicznej, a Bcl-2 hamuje autofagie tylko wtedy, gdy jest obecna w retikulum endoplazmatycznym (ER) (Driscoll & Abdel Malek, 2015).

Dlatego należy podkreślić, że proces mitofagii jest synergistycznie regulowany z procesem biogenezy mitochondriów, oba te procesy oddziałują na siebie.

Ryc.8 *Schemat procesu autofagii/mitofagii*. Zmodyfikowano na podstawie (Stetler i in., 2013).

1.3 Przyczyny i konsekwencje zaburzenia funkcjonowania mitochondriów

Utrzymanie zdrowej puli mitochondriów ma ogromne znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania komórki. Należy jednak podkreślić fakt, że wszystkie organizmy żywe są narażone na działanie czynników zewnętrznych oraz wewnętrznych, które mogą indukować stres komórkowy. Na schemacie zostały przedstawione przykłady czynników (stresorów), które mogą wywołać stres mitochondrialny. W odpowiedzi na zmiany fizjologiczne czy warunki stresowe, mitochondria wykształciły i rozwinęły wiele systemów kontroli jakości, aby utrzymać odpowiednią pulę funkcjonalnych mitochondriów. Pozwala to komórce zaadaptować się do nowo panujących warunków oraz sprostać wymaganiom energetycznym komórki. Mechanizmy te maja na celu usuniecie dysfunkcyjnych mitochondriów autofagii/mitofagii przez proces oraz odnowienie puli tych organellipoprzez syntezę białek i lipidów w procesie biogenezy (Memme i in., 2021; Onishi i in., 2021). Zrównoważony proces fuzji i fragmentacji mitochondriów umożliwia także kontrolę jakości mitochondriów w obrębie komórki (Yapa i in., 2021).



Ryc.9 Schemat przedstawiający czynniki stresorowe mające wpływ na funkcjonowanie mitochondriów.

1.3.1 Stres oksydacyjny i jego konsekwencje

Jedną z konsekwencji zaburzenia funkcjonowania mitochondriów jest stres oksydacyjny. Uważa się, że mitochondria są głównym miejscem powstawania RFT w komórce. Termin ten określa nie tylko reaktywne pochodne tlenu, ale także azotu czy siarki, chociaż obecnie w literaturze występują one pod nazwami: reaktywne formy azotu - ang .Reactive Nitrogen Species (RNS) i reaktywne formy siarki – ang. Reactive Sulfue Species (RSS). RFT powstają również wewnątrzkomórkowo w różnych przedziałach i poprzez wiele mechanizmów. Do RFT należą np.: tlen singletowy (O₂), anionorodnik ponadtlenkowy (O_2^{-}) , nadtlenek wodoru (H_2O_2) , tlenek azotu (NO^{+}) , rodnik hydroksylowy (OH[•]) i jon hydroksylowy (OH⁻). W komórkach eukariotycznych ważnym miejscem powstawania RFT jest łańcuch oddechowy. Podczas transportu elektronu przez łańcuch, którego ostatecznym etapem jest czteroelektronowa redukcja cząteczki tlenu do cząsteczki wody, w niektórych centrach redoks łańcucha może dojść do tzw. "wycieku" elektronów. Podczas jednoelektronowej redukcji tlenu powstaje wysoce reaktywny anionorodnik ponadtlenkowy (O_2^{\bullet}) , który znajduje się zarówno w przestrzeni międzybłonowej jak i macierzy mitochondrialnej. Rodnik O2[•] może ulec dalszym przekształceniom np. w wyniku reakcji dysmutacji do H₂O₂ oraz O₂. Z kolei powstały nadtlenek wodoru może ulec reakcji Fentona, która prowadzi do powstania rodnika hydroksylowego (•OH) oraz anionu wodorotlenowego (OH⁻) (Turrens, 2003).



Ryc.10 *Schemat budowy i działania łańcucha transportu elektronów oraz syntazy ATP i translokazy ATP/ADP*. Zmodyfikowano na podstawie (Lewis i in., 2019).

W usuwanie szkodliwych RFT jest zaangażowany system obrony antyoksydacyjnej. W skład tego systemu wchodzą enzymy w tym rodzina metaloenzymów zwanych dysmutazami ponadtlenkowymy (SOD), które przekształcają anionorodnik ponadtlenkowy do nadtlenku wodoru. Rozkład nadtlenku wodoru odbywa się dzięki aktywności katalazy (CAT) oraz peroksydazy glutationowej (GPx). Katalizowanej przez GPx redukcji H₂O₂ do wody towarzyszy utlenianie glutationu (GSH) do disiarczku glutationu (GSSG). Zredukowana forma glutationu jest następnie odtwarzana przez reduktazą glutationową (GRx) (Kudryavtseva i in., 2016).



Ryc.11 *Schemat działania enzymów antyoksydacyjnych*. Zmodyfikowano na podstawie (Garrel i in., 2010).

W przypadku prawidłowo funkcjonujących komórek istnieje równowaga pomiędzy tworzeniem a usuwaniem RFT. W odpowiednim stężeniu RFT odgrywają istotną rolę w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Brak równowagi między tworzeniem a usuwaniem RFT powoduje nagromadzenia RFT, co może skutkować powstawaniem uszkodzeń oksydacyjnych białek, lipidów, polisacharydów czy kwasów nukleinowych, a w konsekwencji zaburzeniami licznych procesów wewnątrzkomórkowych. Uszkodzenia oksydacyjne nici DNA zarówno mtDNA jak i nDNA mogą powodować mutacje i przyczyniać się do powstawania chorób, a są wywołane przede wszystkim przez bezpośrednie działanie rodnika hydroksylowego (OH*) z nukleotydami DNA oraz na skutek wprowadzania uszkodzonego nukleotydu do DNA w procesie replikacji (Turrens, 2003).

1.4 Adaptacja funkcji mitochondriów do zmienionych warunków

Mitochondria indukują w komórce wiele ścieżek sygnałowych, w odpowiedzi na warunki stresowe. Jedną z tych ścieżek, która odpowiada za adaptację mitochondriów jest tzw. wsteczna kaskada sygnałowa (ang. *Mitochondrial retrograde pathway*). Mitochondrialna wsteczna kaskada sygnałowa, czyli sygnalizacja mitochondria – jądro komórkowe – mitochondria (ang. *Retrograde signaling*), pozwala na przekazanie z mitochondriów do jądra komórkowego informacji o stanie mitochondriów i ich ewentualnych defektach. W odpowiedzi na ten sygnał, w jądrze uruchamiana jest ekspresja genów mających na celu dostosowanie mitochondriów do obecnie panujących warunków w komórce, w następstwie czego modernizowana jest m.in. sieć mitochondrialna, biogeneza i mitofagia. Sygnalizacja ta jest dodatkowo ważna ze

względu na konieczność koordynacji ekspresji białek mitochondrialnych kodowanych przez genom jądrowy oraz przez genom mitochondrialny.



Mitochondrialna wsteczna kaskada sygnałowa

Ryc.12 Schemat przedstawiający działanie wstecznej kaskady sygnałowej.

W przekazywaniu sygnału z mitochondrium do jądra komórkowego zaangażowane są takie elementy jak np. RFT, poziom ADP/ATP, NADP, poziom Ca²⁺ a przede wszystkim $\Delta\Psi$ (który jest pierwszym czynnikiem sygnałowym). W odpowiedź ścieżki jądro komórkowe – mitochondria następuje reorganizacja się mitochondrialnej, zmiana aktywacji procesu biogenezy czy mitofagii, czyli adaptacja mitochondrium do zmiany warunków.

1.4.1 Zaburzenia funkcjonowania mitochondriów

Nieprawidłowe funkcjonowanie mitochondriów występuje w **chorobach mitochondrialnych**, neurodegeneracyjnych, sercowo-naczyniowych, metabolicznych a także w **starzeniu**. To, jak ważne dla komórki i całego organizmu są prawidłowo funkcjonujące mitochondria widać na przykładzie chorób genetycznych wywołanych mutacjami w genach białek mitochondrialnych.

Choroby mitochondrialne są grupą zaburzeń genetycznych, które charakteryzują się defektami fosforylacji oksydacyjnej: łańcucha oddechowego i syntazy ATP, w skutek mutacji w genach nDNA i mtDNA (Gorman i in., 2016). Choroby te dają różne objawy,

ale przede wszystkim rzutują na pracę układu nerwowego oraz mięśniowego. Ustalenie diagnozy dla chorób mitochondrialnych jest trudne, ponieważ mitochondria znajdują się pod podwójną kontrolą genetyczną – kodowane są zarówno przez genomy jądrowe jak i mitochondrialne (Ng i in., 2021). Większość ze znanych terapii tylko łagodzi objawy choroby (Bartnik i in., 2018).

Zaburzenia funkcjonowaniu mitochondriów cech W sa iedna Z charakterystycznych dla starzenia. Starzeniu się organizmu towarzyszy postępująca utrata funkcji komórkowych oraz degradacja wielu tkanek (X. Gao i in., 2022). Mitochondria odgrywają zasadniczą rolę w rozwoju chorób związanych ze starzeniem się, takich jak choroby neurodegeneracyjne czy sercowo-naczyniowe (Amorim i in., 2022). Najczęściej spotykanymi chorobami neurodegeneracyjnymi, w których znaleziono zmienione funkcjonowanie mitochondriów są: choroba Parkinsona (PD), choroba Alzheimera (AD), choroba Huntingtona (HD), ataksja Friedreicha (FRDA) i stwardnienie zanikowe boczne (ALS). Stres oksydacyjny może inicjować uszkodzenia oksydacyjne wielu białek i komponentów komórkowych, a nawet przyczyniać się do tworzenia kaskady prowadzącej do śmierci komórek. Dlatego poznanie działania mitochondriów w różnych warunkach stresowych wydaje się być podstawą do uznania ich za dobry cel terapeutyczny (Y. Wu i in., 2019).

1.4.2 Starzenie komórkowe

Starzenie komórkowe jest definiowane, jako złożony proces podczas którego zostaje zatrzymany cykl komórkowy na skutek uszkodzeń lub stresu. Starzenie komórkowe jest także przyczyną starzenia organizmu oraz występowania chorób związanych z wiekiem. Można wyróżnić starzenie replikacyjne, które jest zależne od skracania telomerów podczas procesu replikacji DNA oraz starzenie przyspieszone, które postępuje niezależnie od skracania telomerów, na skutek działania stresu oksydacyjnego, uszkodzeń DNA czy innych czynników/związków (Alster & Korwek, 2014).

Starzenie jest związane z pogorszeniem funkcji fizjologicznych i integralności komórek i tkanek, co prowadzi do zwiększonej podatności na niektóre choroby związane z wiekiem np.: cukrzyca, miażdżyca, niewydolność serca, nadciśnienie, zaćma, choroby neurodegeneracyjne. Obecnie nie ma jednej konkretnej zdefiniowanej teorii starzenia. Można wyróżnić mitochondrialną teorię starzenia, która głosi że wraz z wiekiem produkcja ATP zmniejsza się, zwiększa się poziom RFT i powstaje więcej uszkodzeń, mitochondria są mniej efektywne, a tym samym zapotrzebowanie energetyczne komórek nie jest zaspokojone, co prowadzi do ich dysfunkcji. Istnieje także teoria uszkodzenia somatycznego DNA (ang. *Somatic DNA Damage Theory*), która postuluje, że uszkodzenia DNA zachodzą w sposób ciągły w komórkach żywych organizmów. Większość tych uszkodzeń jest naprawiana, jednak nie wszystkie z powodu niedoskonałości mechanizmów naprawczych DNA. Prowadzi to do mutacji genetycznych kumulujących się wraz z wiekiem, powodując dysfunkcję komórek. Jak

również zaproponowana przez Johan Bjorksten w 1942 r. teoria sieciowania (ang.*Cross-linking theory*). Zgodnie z nią z wiekiem następuje nagromadzenie zagregowanych białek, co uszkadza komórki i tkanki (Jin, 2010).

W swojej pracy skupiłam się na teorii opracowanej przez D. Harmana. Denham Harman, jako jeden z pierwszych zaproponował mitochondrialną wolnorodnikową teorię starzenia się (ang. *Mitochondrial Free Radical Theory of Aging, MFRTA*), w której główną rolę odgrywały mitochondria, jako źródła wolnych rodników. Teoria ta postuluje, że starzenie się wynika z nagromadzenia szkodliwych skutków działania wolnych rodników wywołanych przez RFT. Zgodnie z tą teorią w starzejących się komórkach i tkankach, często wykrywa się zwiększoną produkcję RFT w mitochondriach oraz zwiększoną zawartość 8-oksy-dG (nukleozydu 8-oksy-2'-deoksyguanozyny) w mtDNA (Cui i in., 2012). Błędy w procesie replikacji mtDNA i niedostateczna skuteczność mechanizmów naprawczych mtDNA mogą powodować akumulację mutacji, co prowadzi do dysfunkcji mitochondriów, takich jak zmniejszona aktywność łańcucha oddechowego czy nadmierne powstawanie RFT. Ponadto agregowane czy nieprawidłowo sfałdowane białka przyczyniają się również do zaburzeń neurodegeneracyjnych i procesu starzenia się (Sas i in., 2018).

Jednymi z poważniejszych uszkodzeń DNA są te, które prowadzą do uszkodzenia lub rozerwania podwójnej nici DNA (ang. *Double-Strand Breaks*, *DSB*). W konsekwencji w komórce może dojść do zahamowania proliferacji poprzez aktywację białka p53, które jest czynnikiem transkrypcyjnym odpowiedzialnym za mechanizm naprawy DNA, któremu zwykle towarzyszy ekspresja białka p21 – inhibitora cyklu komórkowego. W róznych typach komórek uszkodzenia DNA również mogą wywołać ekspresję białka p16, który także jest inhibitorem cyklu komórkowego (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007).



Ryc.13 Schemat przedstawiający zdarzenia zachodzące w mitochondriach według "Mitochondrialnej teorii starzenia".

Badania procesu starzenia wykazały, że wiele cech jest charakterystycznych dla tego procesu. Najczęściej wykorzystywane markery starzenia zostały przestawione na Ryc.14.



Ryc.14 *Schamat przedstawiający charakterystyczne znaczniki komórek starych*. Zmodyfikowano na podstawie (Sikora i in., 2018).

Jedną z cech starzejących się komórek jest zmiana ich morfologii. Komórki stare sa wieksze i bardziej płaskie niż komórki młode. Zwieksza sie masa lizosomów w komórkach, co jest widoczne jako wzrost ziarnistości komórek. Występują zmiany w cytoszkielecie, głównie reorganizacji ulegają filamenty aktynowe, tubulinowe oraz wimentynowe. W komórkach starych dochodzi do zahamowania proliferacji na skutek wzrostu poziomu białek p53, p21 i p16, z czego dwa ostatnie są inhibitorami cyklu komórkowego. Dodatkowo w komórkach starych zmienia się funkcjonowanie mitochondriów, co skutkuje zwiększoną produkcją RFT. Zwiększa się również poziom uszkodzeń DNA (mutacje w nDNA i mtDNA) oraz aktywność enzymu β-galaktozydazy związanej ze starzeniem (ang. Senescence-Associated- β -galactozydaze, SA- β -GAL). W komórkach obniża się też poziom laminy B1, co powoduje występowanie skupisk chromatyny w cytoplazmie. Pojawia się zwiększona aktywność wydzielnicza zwana fenotypem sekrecyjnym związanym ze starzeniem (ang. Senescence-Associated Secretory Phenotype, SASP). Fenotyp sekrecyjny pojawia się, gdy dochodzi do trwałej aktywacji szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA, w konsekwencji komórki stare wydzielają na zewnątrz czynniki wzrostu, cytokiny czy proteazy (Alster & Korwek, 2014).

Poza szeregiem negatywnych skutków starzenia komórkowego, jakimi są głównie choroby występujące wraz z wiekiem, starzenie komórkowe ma też korzystny wpływ na wiele procesów:

- pozwala na prawidłowe kształtowanie narządów w procesie organogenezy,
- ochrona przed nowotworzeniem, czyli komórka, w której występują mutacje czy uszkodzenia DNA starzeje się, jednocześnie nie ulega podziałom i nie przekazuje zmutowanego materiału genetycznego kolejnym komórkom,
- proces regeneracji tkanek zostaje zachowany (Muñoz-Espín i in., 2013).

Mimo wielu lat badań wciąż poszukiwane są strategie, które pozwolą opóźnić proces starzenia komórkowego. Najczęściej poszukuje się nowych środków/substancji, które mogłyby selektywnie eliminować komórki stare. Takie substancje nazywane są senolitykami. Do nich należą np.: kwercetyna czy fisetyna. Atrakcyjną strategią pozwalającą na opóźnienie starzenia staje się celowanie w sirtuiny – białka, które spowolniają procesy starzenia i obumierania komórek (Grabowska i in., 2017).

Wiadomo, że mitochondria, ze względu na swoją rolę pełnioną w komórce, odgrywają także ogromną rolę w procesie starzenia komórkowego. Na tle ostatnich doniesień okazuje się, że to suma błędów podczas procesu replikacji mtDNA w czasie rozwoju jest główną przyczyną starzenia, (a nie tylko wzrost mutacji mtDNA spowodowany akumulacją uszkodzeń np. przez RFT) (Bratic & Larsson, 2013).Warto podkreślić, że mutacje mtDNA także promują fenotypy starzenia. Lecz wciąż dokładne przyczyny starzenia się są słabo poznane. Oczywiście mitochondria regulują wiele różnych szlaków zarówno tych metabolicznych jak i sygnalizacyjnych, a wraz z wiekiem ich funkcjonowanie pogarsza się (Shigenaga i in., 1994). Obserwowana jest wzmożona produkcja RFT oraz zaburzenia funkcjonowania łańcucha oddechowego. Ponadto szereg procesów, w tym proces biogenezy mitochondriów jest regulowany także przez hormony np. estrogeny (ang. *Estrogen related receptor, ERR*), których z wiekiem spada poziom. ERR jest koaktywatorem ekspresji czynników tranksrypcyjnych np.: NRF (Bratic & Larsson, 2013; Fernández-Vizarra i in., 2008). Dlatego w badaniach w niniejszej pracy szczególnie skupiono się na funkcji mitochondriów w starzejących się fibroblastach.

1.5 Fitoestrogeny

Fitoestrogeny są to związki organiczne, których główną biologiczną funkcją jest ochrona roślin przed stresem i/lub działanie jako część mechanizmu obronnego. Fitoestrogeny budową przypominają estrogeny, dzięki czemu wykazują aktywność estrogenową.

1.5.1 Charakterystyka estrogenów

Estrogeny należą do grupy hormonów steroidowych, które wydzielane są głównie z jajników oraz nadnerczy. Znane są, jako sterydy C18, ponieważ ich podstawowa struktura składa się z 18 atomów węgla (C18H24O2). Zbudowane są z jednego pierścienia benzenowego, fenolowej grupy hydroksylowej i grupy ketonowej (estron) lub jednej (17 β -estradiol), dwóch (estriol) lub trzech (estetrol) grup hydroksylowych (Ryc.15). Są to małe lipofilowe substancje, które poprzez wpływ na ekspresję odpowiednich genów, regulują wiele funkcji komórek i tkanek. Estrogeny wiążą się z receptorami estrogenowymi (ERR α lub ERR β). Receptor estrogenowy związany z estrogenem tworzy dimer i wiąże się z elementami odpowiedzi estrogenowej (ang. *Estrogen response elements, ERE*) na genomie, regulując w ten sposób transkrypcję genów zależnych od estrogenu (Fuentes & Silveyra, 2019; Ikeda i in., 2019; Simpkins i in., 2008). Istnieje także receptor 1, *GPER1*), który jest genetycznie i strukturalnie niezwiązany z ERR α i ERR β (Vrtačnik i in., 2014).



Ryc.15 *Struktury chemiczne endogennych estrogenów*. Estron (E1; pomarańczowy), estradiol (E2; niebieski), estriol (E3; zielony) i estretrol (E4; żółty) Zmodyfikowano na podstawie (Fuentes & Silveyra, 2019).

Obecność ER α/β wykazano w mitochondriach. Genom mitochondrialny zawiera sekwencje DNA, które przypominają połowę palindromicznej jądrowej sekwencji ERE. ER α oraz ER β bezpośrednio wiążą się z mtDNA poprzez mitochondrialne ERE, a ich oddziaływanie wzrasta wraz ze wzrostem stężenia estrogenów (Rettberg i in., 2014). Estrogeny w stężeniach fizjologicznych (poprzez aktywację ER α) biorą udział np. w neuroprotekcji (Dubal, 2001). Estrogeny mogą wpływać na funkcję mitochondriów poprzez zwiększenie ekspresji genów niektórych białek łańcucha oddechowego (cytochrom c, podjednostki w kompleksie IV–COX7RP). Wynika to z obecności ERE w promotorze tych genów, ale także z koordynacji transkrypcji mtDNA poprzez jądrowe czynniki transkrypcyjne, które są regulowane przez estrogeny (Chmielewska i in., 2017; Torrens-Mas i in., 2020).

Wiele zmian hormonalnych jest związanych ze starzeniem się np. menopauza u kobiet. Estrogeny pełnią różne i ważne funkcje np.: w tkance kostnej, w mózgu, w mięśniach szkieletowych, tkance tłuszczowej, okrężnicy, układzie naczyniowym i skórze. Utrata estrogenów podczas starzenia się ma szkodliwy wpływ na te tkanki, co powoduje osteoporoze czy też zwiększone ryzyko chorób sercowo – naczyniowych (Thornton, 2013). Estrogeny wykazują działanie ochronne, co zostało potwierdzone przez grupę Bottai i in. Użycie 17β-estradiolu (E2) może chronić komórki skóry (HDF) przed uszkodzeniami oksydacyjnymi wywołanymi przez H₂O₂, a w unieśmiertelnionych keratynocytach (HaCaT) E2 zwiększa syntezę prokolagenu-I (Bottai i in., 2012; Wilkinson & Hardman, 2017). Wiadomo, że u kobiet we wczesnym okresie pomenopauzalnym elastyczność skóry zmiejsza się, a stostowanie estrogenów zwiększa ilość i pogrubia włókna sprężyste (Thornton, 2013). W warunkach stresu oksydacyjnego indukowanego związki podobne do estrogenów są w stanie chronić przed uszkodzeniem oksydacyjnym. Uważa się, że właściwości cytoprotekcyjne mogą być zależne od właściwości przeciwutleniających i struktury fenolowej estradiolu (Richardson i in., 2011).

1.5.2 Charakterystyka fitoestrogenów

Fitoestrogeny potrafią działać poprzez interakcję z receptorami estrogenowymi, jak również są w stanie wywierać swoje działanie w sposób niezależny od ERR. Fitoestrogeny wykazują działanie przeciwutleniające oraz przeciwzapalne. Dzięki tym właściwościom mogą wpływać na prawidłowe funkcjonowanie narządów a tym samym ingerować w molekularne podłoże chorób (Torrens-Mas i in., 2020).



Ryc.16 *Struktura molekularna najbardziej powszechnych fitoestrogenów*. Zmodyfikowano na podstawie (Sirotkin & Harrath, 2014)

Są obecne w owocach, warzywach i produktach pełnoziarnistych. Głównymi grupami fitoestrogenów, obecnych w naszej diecie oraz suplementach, są izoflawony,

prenyflawonoidy, kumestany i lignany. Izoflawony znajdują się w roślinach strączkowych przede wszystkim w soi. Flawonoidy 8-prenylowe są powszechne w warzywach, chmielu i piwie. Głównym źródłem lignanów jest siemię lniane, z kolei kumestany są znacznie obecne w koniczynie i kiełkach soi (Rietjens i in., 2017; Sirotkin & Harrath, 2014).

Fitoestrogeny są metabolizowane przez bakterie jelitowe, wchłaniane, krążą w osoczu i wydalane są wraz z moczem. Jednak warto podkreślić, że jest to proces zróżnicowany międzyosobniczo. Flawonoidy naturalnie występują w formach glikozydowych i tak są wchłaniane, natomiast glikozydy izoflawonoidów muszą być hydrolizowane do aglikonów przez β-glukozydazy jelitowe (głównie powstają ekwol oraz O-desmetyloangolenina). Absorpcja tych związków zachodzi poprzez wychwyt przez enterocyty. Izoflawonoidy są szybko wchłaniane, ze znacznym wzrostem poziomu w osoczu po 15-30 minutach od zażycia i szczytem między 3 a 7 godziną po spożyciu. Po wchłonięciu aglikony izoflawonoidów podlegają dalszym procesom: glukuronidacji i siarczanowania w górnym odcinku jelita cienkiego (Branca & Lorenzetti, 2005).

Fitoestrogeny oprócz zdolności wiązania się z receptorami estrogenowymi mogą też wykazywać działanie bez pośrednictwa estrogenów np. mogą aktywować receptory serotoninergiczne, mogą reagować z wolnymi rodnikami, mogą uczestniczyć w modyfikacja histonów, mogą indukować metylację DNA, jak również mogą mieć wpływ na ekspresja RNA czy inne wewnatrzkomórkowe regulatory cyklu komórkowego. To właśnie dzięki tym zdolnościom wiązania się z różnymi cząsteczkami moga być działanie: przeciwutleniajace, wielofunkcyjne i wykazują antyproliferacyjne, antymutagenne i antyangiogenne, a zatem promują przeżywalność komórek młodych opóźniając proces starzenia się organizmu człowieka (Sirotkin & Harrath, 2014). Fitoestrogeny są ważnym składnikiem diet azjatyckich (15-50 mg dnia w porównaniu z <2 mg w krajach zachodnich). Badania wykazały korelacje między wysokim spożyciem soi i izoflawonów a zmniejszeniem objawów menopauzy, osteoporozy, zmniejszoną resorpcja kości, poprawa uczenia się i zmniejszeniem ryzyka raka prostaty, okreżnicy i piersi (Mayo i in., 2019).

Poza szeregiem działań przeciwutleniających, przeciwnowotworowych, przeciwzapalnych czy probiotycznych należy również podkreślić, że niektóre fitoestrogeny - polifenole roślinne zawierające ugrupowania katecholowe i/lub pirogalolowe w pewnych warunkach mogą wykazywać właściwości **prooksydacyjne** (Quideau i in., 2011). W konsekwencji roślinne polifenole katecholowe (i pirogalolowe) mogą indukować pękanie nici DNA (w obecności ${}^{3}O_{2}$ i związków żelaza lub miedzi, przede wszystkim jonów miedzi(II), ze względu na ich niższy standardowy potencjał redukcyjny: Cu²⁺/Cu⁺ = 0,15 V w porównaniu z Fe^{3+/}Fe²⁺= 0,77 V).



Ryc.17 *Proponowany mechanizm prooksydacyjny uszkodzenia DNA za pośrednictwem miedzi (II) przez katecholowe (lub pirogalolowe) roślinne polifenole*. Zmodyfikowano na podstawie (Quideau i in., 2011)

1.5.2.1 Daidzeina

Daidziena (7-hydroksy-3-(4-hydroksyfenylo)-4H-1-benzopiran-4-on), jest fitoestrogenem, który głównie występuje w nasionach soi. Ten naturalnie występujący związek zaliczany jest do grupy modulatorów receptorów estrogenowych, które są zdolne do wywierania estrogenopodobnego działania (Filipović i in., 2010). W roślinach izoflawony występują głównie (>80%) w postaci glikokoniugatów, w przypadku daidzeiny jest to daidzyna (ang. *daidzin*). Glikozydy wykazują zarówno niską aktywność estrogenową jak i są trudno wchłanialne w jelitach, więc aby stały się one biodostępne muszą zostać zhydrolizowane do aglikonów. W przypadku daidzyny odpowiadającym aglikonem jest daidzeina. Na podstawie spożycia soi nie można przewidzieć ilości aglikonów w osoczu, gdyż zarówno czynniki wewnętrze (np. mikroflora jelitowa) oraz zewnętrzne (np. źródło izoflawonoidów) wpływają na ich dostępność (Mayo i in., 2019). Szlak metabolizmu daidzeiny przez mikroflorę jelitową przedstawiono na Ryc.18.



Ryc.18 *Metabolizm glikozydu daidzeiny przez mikroflorę jelitową człowieka oraz szlak biosynezy ekwolu*. Zmodyfikowana na podstawie (Mayo i in., 2019).

Ekwol jest jednym z najbardziej stabilnych i łatwo wchłanialnych metabolitów daidzieny. Jest związkiem fenolowym, który jest także czynny optycznie (posiada asymetryczny atom węgla w pozycji C3 dający początek enancjomerom R i S). Jego budowa jest odpowiedzialna za jego fizjologiczną aktywność. Wykazuje on działanie antyandrogenne poprzez wiązanie i sekwestrację 5α-dihydrotestosteronu oraz silne działanie przeciwutleniające. Jednak warto podkreślić, że nie u wszystkich osobników ekwol jest tworzony pośrednio. W tym przypadku daidzeina jest przekształcana w O-desmetyloangolensynę (O-DMA), czyli metabolit bez aktywności estrogenowej. Przyczyną wytwarzania tych dwóch różnych metabolitów daidzeiny są różnice w składzie gatunkowym mikroflory jelitowej oraz na zdolnośc mogą mieć wpływ czynniki środowiskowe (Mayo i in., 2019).

Ponieważ daidzeina jest związkiem należącym do grupy izoflawonoidów, często przekształcana jest przez bakterie jelitowe w substancje takie jak 3'-OH-daidzeina i 6'-OH-daidzeina, jak również jej nieprzekształcona postać wykazuje silny charakter przeciwutleniający (Singh i in., 2023). Jednym z głównych mechanizmów działania polifenoli jest jednoetapowy mechanizm **HAT** (ang. *Hydrogen atom transfer, HAT*). Mechanizm ten polega na bezpośrednim przeniesieniu atomu wodoru z cząsteczki przeciwutleniacza na cząsteczkę rodnika. Inny mechanizm to **SET** (ang. *Single electron transfer, SET*), który zakłada przeniesienie elektronu z reszty hydroksylowej związku fenolowego na reagujący znim rodnik, w wyniku tej reakcji powstaje kationorodnik fenoksylowy. W obu przypadkach produktami reakcji są rodniki fenoksylowe, które

mogą ulegać dalszym reakcjom (jednak stanowią mniejsze zagrożenie dla komórki) (Quideau i in., 2011).

HAT R^{\bullet} + ArOH \longrightarrow RH + ArO[•] **BDE SET** R^{\bullet} + ArOH \longrightarrow R^{-} + ArOH^{•+} IP

Ryc.19 *Mechanizmy działania polifenoli*. Transfer atomu wodoru (HAT) i transfer pojedynczego elektronu (SET). Energia dysocjacji (BDE) i potencjał jonizacji (IP) fenolu to dwa podstawowe parametry fizykochemiczne, które można wykorzystać odpowiednio do określenia potencjalnej skuteczności każdego procesu (Quideau i in., 2011).

Spożywanie izoflawonów (w tym daidzeiny) może przynosić korzyści zdrowotne i zmniejszać ryzyko niektórych chorób związanych z wiekiem, w tym osteoporozy, chorób układu krążenia i czy pewnych typów nowotworów, a także zmniejszać objawy związane z menopauzą (Alshehri i in., 2021). Jednak wciąż istnieje wiele obaw, które dotyczą możliwego, zwiększonego ryzyka zachorowania na raka po ekspozycji na izoflawony. Opierając się w dużej mierze na badaniach, które wykazały, że w niektórych przypadkach genisteina lub genistyna w dawce na poziomie 750 mg/kg diety może mieć działanie rakotwórcze (Rietjens i in., 2013).

Kolejną cechą starzenia jest spadek funkcji poznawczych oraz zaburzona percepcja. Hernandez i Schneider przetestowali także współdzianie PhytoSERM (mieszaninę składającą się z genisteiny, **daidzeiny** i ekwolu) przez 12 tygodni u kobiet w okresie około menopauzalnym (45-60 lat). Okazało się, że w odpowiednich stężeniach substacje te powodowały zmniejszenie objawów menopauzy i poprawę funkcji poznawczych (Alshehri i in., 2021; Hernandez i in., 2018). Również wykazano, że genisteina, **daidzeina** i glicyteina w odpowiednich stężeniach mogą doprowadzić do retencji wapnia w osteoporozie (Pawlowski i in., 2015).

2. CEL PRACY

Mitochondria to organella dynamiczne, które mogą adaptować się do zmieniających się wymagań energetycznych komórki. Zwykle w proces adaptacji mitochondriów jest zaangażowana ścieżka sygnalizacyjna **mitochondria – jądro komórkowe – mitochondria** tzw. wsteczna kaskada sygnałowa. Ze starzeniem komórkowym wynikającym ze stopniowego skracania telomerów w trakcie kolejnych podziałów komórkowych (starzenie replikacyjne) wiąże się występowanie w komórce przewlekłego stresu. Procesy starzenia komórkowego mogą być indukowane i przyspieszone przez zewnętrzne stresory, takie jak oksydanty czy czynniki uszkadzające DNA (starzenie indukowane).

Głównym celem pracy było zbadanie, jak **mitochondria adaptują się na drodze wstecznej kaskady sygnałowej we wczesnym okresie starzenia** indukowanego i replikacyjnego, w pierwotnych fibroblastach oraz zbadanie wpływu fitoestrogenu – **daidzeiny** na te procesy.

Do realizacji celu wytyczono następujące zadania:

- 1. Charakterystyka fizjologii mitochondriów we wczesnym okresie starzenia indukowanego i replikacyjnego;
- 2. Zbadanie dynamicznych procesów prowadzących do adaptacji mitochondriów na drodze wstecznej kaskady sygnałowej;
 - a) Morfologii sieci mitochondrialnej
 - b) Biogenezy mitochondriów
 - c) Autofagii/mitofagii mitochondriów
- Zbadanie, czy fitoestrogen daidzeina ma wpływ na funkcjonowanie mitochondriów we wczesnym okresie starzenia;
 - a) Charakterystyka daidzeiny (o właściwościach antyoksydacyjnych i estrogenowych)
 - b) Wpływ daidzeiny na dynamikę mitochondriów



Ryc.20 Graficzne przedstawienie celu pracy.
3. MATERIAŁY I METODY

3.1 Odczynniki chemiczne

Odczynnik	Producent	
Akrylamid	Bio-Rad	
Albumina z surowicy	Gibco, Life Technologies	
bydlęcej		
Alexa Fluor 488 [™] phalloidin/falloidyna	Thermo Scientific	
Antymycyna	Sigma-Aldrich	
APS	Bio-Rad	
Bolt MES SDS	Thermo Scientific	
Bolt MOPS SDS	Thermo Scientific	
Bolt 4-12% Bis-Tris	Invitrogen	
plus gels – żele gradientowe		
Bradford	Bio-Rad	
СССР	Sigma Aldrich	
CM-H2DCFDA	Thermo Scientific	
Daidzeina	Abcam	
DMSO	Sigma Aldrich	
DsRed2-Mito	Clonetech	
Etanol	РОСН	
Fluo4-AM	Molecular Probes	
Glicerol	Sigma-Aldrich	
Glicyna	BioShop	
Glukoza	Gibco, Life Technologies	
Glutaminian	Sigma-Aldrich	
Hoechst	Thermo Scientific	
Inhibitory proteaz	Sigma-Aldrich	
Inhibitory fosfataz	Sigma-Aldrich	
Izopropanol	РОСН	
JC-1	Molecular Probes	
Jonomycyna	Sigma-Aldrich	
Kanamycyna	Sigma-Aldrich	
Kwas chlorowodorowy	РОСН	
Live Imaging Medium	Thermo Scientific	
Marker białkowy Novex	Thermo Scientific	
Sharp Pre-stained Protein Standard		
Marker białkowy PageRuler Plus	Thermo Scientific	
Prestained Protein Ladder, 10 – 250 kDa		
Metanol	Chempur	

MitoRed	Sigma-Aldrich
MitoSOX	Molecular Probes
Mitotimer	Addgene
MitoTracker Green FM	Molecular Probes
Mounting medium	Sigma-Aldrich
Chlorek sodu	BioShop
Nadtlenek wodoru	VWR
Odyssay Blocking Buffer	Li-Cor
Opti-MEM pożywka	Thermo Scientific
OxyBlot [™] Protein Oxidation Detection	Millipore
Kit	
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
PBS (sól fizjologiczna buforowana	IITD Wrocław
fosforanami)	
Penicylina i streptomycyna	Sigma
Płodowa surowica	Gibco, Life Technologies
bydlęca (FBS)	
Pożywka hodowlana	PAN Biotech
DMEM (glukoza 4,5 g/L) bez	
pirogronianu	
RIPA (bufor do lizy komórek)	Sigma-Aldrich
SDS	Sigma-Aldrich
TEMED	Sigma-Aldrich
TransfeX	ATCC
Tris-HCl	BioShop
Triton-X	Sigma-Aldrich
Trypsyna	Invitrogen
Tween-20	Sigma-Aldrich
Wodoronadtlenek tert-butylu (TBH)	Sigma- Aldrich
β-merkaptoetanol	Sigma-Aldrich

3.2 Prowadzenie hodowli komórkowej oraz wyprowadzone z nich linie pochodne

W badaniach wykorzystywano pierwotne fibroblasty ludzkie pochodzące z banku komórek ATCC (PCS-201-012). Komórki hodowano w temperaturze 37°C w warunkach 95% wilgotności oraz 5% obecności CO_2 na podłożu hodowlanym DMEM zawierającym glukozę w stężeniu 4,5 g/L oraz L-glutaminę o stężeniu 4 mM. Dodatkowo pożywkę uzupełniano 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS), penicyliną 100 j/ml i streptomycyną 100 µg/ml.

Pasażowanie komórek rozpoczynano przepłukiwaniem ich w PBS. Następnie fibroblasty inkubowano z 0,05% roztworem trypsyny (Invitrogen). Po odklejeniu się komórek od podłoża trypsynę inaktywowano dodając pożywkę hodowlaną. Taką zawiesinę wirowano przez 3,5 min przy 200 x g. Powstały supernatant usuwano, a osad komórek zawieszano w nowej porcji pożywki hodowlanej przygotowując do dalszej hodowli.

W badaniach zastosowano trzy grupy doświadczalne:

- Grupa I –komórki na wczesnych pasażach. Są to komórki pochodzące z hodowli pomiędzy piątym a dziesiątym pasażem.
- Grupa II komórki na wczesnych pasażach poddane stresowi oksydacyjnemu. Stanowią ją komórki pochodzące z hodowli pomiędzy piątym a dziesiątym pasażem, które inkubowano z wodoronadtlenkiem tert-butylu (TBH) w stężeniu 100 μM przez 30 min w temperaturze 37°C.
- Grupa III komórki na późnych pasażach. Stanowią ją komórki pochodzące z hodowli pomiędzy osiemnastym a dwudziestym piątym pasażem (schemat 1).

Tak przygotowane komórki traktowano daidzeiną w stężeniu 0,1 nM i 0,5 nM przez 24 godziny.

W celach porównawczych część doświadczeń wykonywano również na komórkach z pasażu pięćdziesiąt dwa i pięćdziesiąt trzy. Komórki te pochodziły od zdrowego pacjenta w wieku ok. 30 lat i zostały użyczone przez *Pracownię Molekularnych Podstaw Starzenia* IBD PAN. Wszystkie doświadczenia przeprowadzano co najmniej trzykrotnie.



Schemat 1. Grupy doświadczalne zastosowane w badaniach.

3.3 Proliferacja komórek

Fibroblasty wysiewano na płytki 24-dołkowe w gęstości 12 tys komórek/dołek. Po upływie odpowiednio 24, 48, 72 i 96 godzin komórki odklejano od podłoża, zawieszano w 500 µl pożywki i liczono przy wykorzystaniu komory Neubauera. Następnie na podstawie otrzymanych wyników wyznaczano krzywą proliferacji, po czym z wartości znajdujących się na liniowym fragmencie krzywej obliczano czas podwojenia populacji zgodnie z poniższym równaniem:

$$CPP = \frac{\log(2) * dt}{\log(N) - \log(N_0)}$$

Gdzie:

CPP – czas podwojenia populacji

dt - czas hodowli w godzinach

N - liczba komórek po czasie hodowli dt

No-liczba komórek na początku hodowli

3.4 Oznaczenie masy mitochondrialnej

Do określenia masy mitochondriów wykorzystywano sondę fluorescencyjną Mitotracker Green FM. Sonda ta bez względu na wartość potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej akumuluje się w żywych komórkach, gdzie wiąże kowalencyjnie z białkami mitochondrialnymi reagując z wolnymi grupami tiolowymi reszt cysteiny (Presley i in., 2003).

Komórki wysiewano na płytki 24-dołkowe w gęstości 20 tys komórek/dołek. Po 48 godzinach usuwano podłoże hodowlane, a komórki przepłukiwano roztworem PBS. Fibroblasty inkubowano z sondą Mitotracker Green FM (200 nM) zawieszoną w PBS z Ca²⁺ i Mg²⁺ uzupełnionym glukozą (4,5g/L) przez 20 minut, w 37°C w ciemności. Następnie komórki przepłukiwano trzykrotnie roztworem PBS. Pomiary prowadzono w PBS z Ca²⁺ i Mg²⁺ uzupełnionym glukozą (4,5g/L). Intensywność fluorescencji mierzono z wykorzystaniem laserowego cytometru skaningowego iCys (CompuCyte Inc., Cambridge, MA, USA. Wzbudzenie sondy przy długości fali: 488 nm, emisja przy długości fali: 530/30 nm).

3.5 Pomiar potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej

Pomiaru potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej dokonywano za pomocą sondy JC-1 (jodek 5,5',6,6'-tetrachloro 1,1',3,3'tetraetylobenzoimidazolokarbocyjanku) (Cossarizza i in., 1993). Sonda ta jest lipofilowym kationem, którego pobieranie do wnętrza mitochondriów jest zależne od potencjału w poprzek wewnętrznej błony. Sonda w postaci monomeru po wzbudzeniu światłem o długości fali 488 nm emituje zielone światło o długości fali 525 nm. Natomiast w organellach o wysokim potencjale elektrycznym błony, barwnik JC-1 tworzy agregaty, co skutkuje przesunięciem emisji fluorescencji w kierunku czerwonego światła o długości fali 590 nm (Smiley i in., 1991).

Komórki wysiewano na płytki 24-dołkowe w gęstości 20 tys komórek/dołek. Po 48 godzinach usuwano podłoże hodowlane, a komórki przepłukiwano roztworem PBS. Fibroblasty inkubowano z sondą JC-1 (2 μ M) zawieszoną w PBS z Ca²⁺ i Mg²⁺ uzupełnionym glukozą (4,5g/L) przez 30 minut w ciemności w 37°C. Następnie komórki przepłukiwano trzykrotnie roztworem PBS. Pomiary prowadzono w PBS z Ca²⁺ i Mg²⁺ uzupełnionym glukozą (4,5g/L). Intensywność fluorescencji zmierzono przy użyciu laserowego cytometru skaningowego iCys (CompuCyte Inc., Cambridge, MA, USA. Wzbudzenie 488nm emisja: 530/30 i 580/30nm). W celu sprawdzenia prawidłowego funkcjonowania sondy w każdym doświadczeniu wykonywano próbę kontrolną, inkubując komórki z sondą JC-1 oraz 5 μ M protonoforem CCCP, prowadzącym do obniżenia potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej.

3.6 Pomiar cytosolowego poziomu jonów Ca²⁺

Do pomiaru poziomu jonów Ca^{2+} w cytoplazmie komórek wykorzystywano sondę fluorescencyjną Fluo4-AM (Molecular Probes). Jest ona modyfikacją sondy Fluo3 – dwa atomy chloru zastąpiono dwoma atomami fluoru, dzięki czemu uzyskano zwiększoną absorbancję przy długości fali 488 nm. Barwnik w swojej budowie zawiera resztę acetometaksylową (AM). Dzięki niej przenika pasywnie przez błony komórkowe do cytoplazmy, gdzie następnie ulega deestryfikacji przez natywne enzymy komórkowe, przez co zostaje uwięziony wewnątrz komórki. Po związaniu jonów Ca^{2+} przez komponenty chelatujące, sonda wykazuje silną fluorescencję, której intensywność jest proporcjonalna do poziomu jonów Ca^{2+} w cytozolu (wzbudzenie przy długości fali 488 nm; emisja przy długości fali 530 nm) (Gee i in., 2000).

Komórki wysiewano na płytki 24-dołkowe w gęstości 20 tys komórek/dołek. Po 48 godzinach usuwano podłoże hodowlane, a komórki przepłukiwano roztworem PBS. Fibroblasty inkubowano z sondą Fluo4 – AM (2 μ M) zawieszoną w PBS z Ca²⁺ i Mg²⁺ uzupełnionym glukozą (4,5g/L) przez 30 minut, w 37°C w ciemności. Następnie komórki przepłukiwano trzykrotnie roztworem PBS. Pomiary prowadzono w PBS z Ca²⁺ i Mg²⁺ uzupełnionym glukozą (4,5g/L). Intensywność fluorescencji mierzono przy użyciu

laserowego cytometru skaningowego iCys (CompuCyte Inc., Cambridge, MA, USA.Wzbudzenie/emisja: 488 nm/530/30 nm.). W celu sprawdzenia prawidłowego funkcjonowania sondy, w każdym doświadczeniu wykonywano próbę kontrolną: komórki inkubowano z sondą Fluo4 – AM oraz 1 μ M jonomycyną, czyli jonoforem wapniowym powodującym wyraźny wzrost cytosolowego poziomu jonów Ca²⁺.

3.7 Oznaczenie poziomu reaktywnych form tlenu (RFT)

Do pomiaru poziomu reaktywnych form tlenu (RFT) wykorzystywano dwie sondy fluorescencyjne: CM – H₂DCFDA oraz MitoSOX Red. Sonda CM – H₂DCFDA jest pochodną H₂DCF (2'7'-dichlorodihydrofluoresceiny), którą poddano dodatkowym modyfikacjom jak: przekształcenie tego związku do estru (dioctan, DA) oraz wprowadzenie grup chlorometylowych (CM), w celu ułatwienia szybszego i pasywnego przenikania przez błony do cytoplazmy komórek oraz zahamowania wyciekaniu jego utlenionej formy z komórki. Wskaźnik dyfunduje przez błonę komórkową następnie zostaje przekształcony przez wewnątrzkomórkowe esterazy do formy CM - H₂DCF, która nie wykazuje właściwości fluorescencyjnych. Tak powstały związek jest utleniany przez RFT, wskutek czego powstaje produkt o silnej fluorescencji CM - DCF (długość fali wzbudzenia: 492-495 nm, długość fali emisji: 517-527 nm) (Forkink i in., 2010; Oparka i in., 2016). Stwierdzono, że natężenie fluorescencji CM - DCF jest wprost proporcjonalne do poziomu nadtlenku wodoru H₂O₂ w komórce, jednak wskaźnik może być utleniany także w sposób niezależny od nadtlenku wodoru, np.: poprzez reaktywne formy azotu (RFN) czy też anionorodnik ponadtlenkowy O₂⁻. Curtin i współpracownicy wykazali bardzo niskie powinowactwo do anionorodnika ponadtlenkowego (Curtin i in., 2002).

W celu określenia poziomu anionorodnika ponadtlenkowego w mitochondriach zastosowano sondę MitoSOX Red. Znacznik ten jest zmodyfikowaną formą dihydroetydyny (DHE), który posiada ładunek dodatni, dzięki czemu ulega selektywnej akumulacji w macierzy mitochondrialnej. Tam jest utleniany przez anionorodnik ponadtlenkowy a produkt tej reakcji po związaniu z kwasami nukleinowymi emituje fluorescencję (wzbudzenie przy długości fali: 488 nm, emisja przy długości fali: 580nm) (Mukhopadhyay i in., 2007).

Komórki wysiewano na płytki 24-dołkowe w gęstości 20 tys komórek/dołek. Po 48 godzinach usuwano podłoże hodowlane, a komórki przepłukiwano roztworem PBS. Fibroblasty inkubowano z sondą CM – H₂DCFDA (5 μ M) lub MitoSOX Red (5 μ M) zawieszoną w PBS z Ca²⁺ i Mg²⁺ uzupełnionym glukozą (4,5g/L) przez 30 minut, w 37°C w ciemności. Następnie komórki przepłukiwano trzykrotnie roztworem PBS. Pomiary prowadzono w PBS z Ca²⁺ i Mg²⁺ uzupełnionym glukozą (4,5g/L). Intensywność fluorescencji mierzono przy użyciu laserowego cytometru skaningowego iCys (CompuCyte Inc., Cambridge, MA, USA. Wzbudzenie przy długości fali: 488 nm, emisja przy długości fali: 530/30 nm dla CM – H₂DCFDA oraz emisja przy długości fali: 580/30

nm dla MitoSOX). W celu sprawdzenia prawidłowego funkcjonowania sond, w każdym z doświadczeń wykonywano próby kontrolne: komórki inkubowano z sondą CM – H_2DCFDA i 1 mM H_2O_2 , czyli substancją powodującą wzrost RFT lub z sondą MitoSOX RED i 2 µg/ml antymycyną A, czyli substancją powodującą podwyższenie poziomu anionorodnika ponadtlenkowego w mitochondriach wskutek hamowania przepływu elektronów przez kompleks III łańcucha oddechowego.

3.8 Analiza danych z laserowego cytometru skaningowego

Laserowy cytometr skaningowy (ang. *Laser scanning cytometer*, *LSC*) to urządzenie wykorzystujące mikroskop fluorescencyjny wraz ze zautomatyzowanym stolikiem oraz oprogramowaniem do analizy obrazu, które pozwala na automatyczny pomiar intensywności fluorescencji jednocześnie w dużej ilości adherentnych komórek. Do analizy obrazu wykorzystywano oprogramowanie iCys (CompuCyte Inc., Cambridge, MA, USA), w którym każdy zarejestrowany obraz podzielono na mniejsze obszary (fantomy), a następnie dla każdego fantomu określano intensywność fluorescencji. Następnie określano progi fluorescencji odpowiadającej sygnałowi, tłu i miejscom prześwietlonym i na ich podstawie wydzielano fragmenty obrazu odpowiadające analizowanym komórkom (Oparka i in., 2016).

3.9 Test wbudowywania BrdU

W celu oceny ilości komórek aktywnie proliferujących wykorzystywano test włączania 5'-bromo-2'-deoksyurydyny (BrdU). BrdU jest analogiem nukleozydu tymidyny, w związku z czym jest wbudowywany w fazie S cyklu komorowego do *de novo* zsyntetyzowanego DNA, jako substytut tymidyny. Przy użyciu techniki immunodetekcji wykrywano jądra komórkowe z wbudowanym BrdU, co pozwoliło określić liczbę aktywnie proliferujących fibroblastów (Mead & Lefebvre, 2014).

Komórki wysiewano na szkiełka o średnicy 12 mm na płytkach 24-dołkowych w gęstości 15 tys komórek/dołek i hodowano w standardowych warunkach. Po 48 godzinach, bez wymiany podłoża hodowlanego, dodawano BrdU tak, aby stężenie końcowe w dołku wynosiło 10 µM i inkubowano przez 20 godzin, w 37°C bez dostępu światła. Następnie fibroblasty przepłukiwano dwukrotnie roztworem PBS i utrwalano 70% zimnym etanolem, po czym tak przygotowany materiał przechowywano w -20°C przez 5 dni. Po tym czasie komórki poddawano barwieniu immunocytochemicznemu. Komórki przepłukiwano dwukrotnie buforem PBS zawierającym 0,5 % Triton X-100, a następnie inkubowano w 2 M HCl przez 30 minut. Po tym czasie komórki ponownie przepłukiwano dwukrotnie buforem PBS oraz inkubowano w 0,1 M roztworze boraksu przez 1 minutę. Następnie fibroblasty przepłukiwano dwukrotnie PBS i inkubowano w wilgotnej komorze przez 1,5 godziny z pierwszorzędowym przeciwciałem anty-BrdU

w buforze PBS zwierającym 0,5% Tween-20 i 1% BSA. Po upływie 1,5 godziny komórki przepłukano buforem PBS zawierającym 0,5% Tween-20 i ponownie inkubowano przez 1,5 godziny z drugorzędowym przeciwciałem. Po zakończeniu inkubacji fibroblasty przepłukiwano dwukrotnie w roztworze PBS zwierającym 0,5% Tween-20 i znakowano jądra komórkowe używając barwnika Hoechst 33342 (1:10000) przez 10 minut. Wybarwione komórki przepłukiwano trzykrotnie buforem PBS, a następnie przygotowywano preparaty mikroskopowe, poprzez przytwierdzenie szkiełek za pomocą odczynnika Dako Mounting Medium do szkiełka podstawowego. Komórki użyciu wizualizowano mikroskopu fluorescencyjnego Leica Dmi8. przy z zastosowaniem suchego obiektywu HCX PL FLUOTAR L 20x/0.40 DRY przy rozdzielczości zdjęcia 1392 x 1040 pikseli (wielkość pojedynczego piksela to 0,459 µm) i następujących parametrów:

- wizualizacja jądra komórkowego (Hoechst 33342): wzbudzenie: 325-375 nm, emisja 435- 485 nm, wzmocnienie kamery: 2,4, czas ekspozycji: 104 ms,

- wizualizacja jądra komórkowego z wbudowanym BrdU: wzbudzenie 450-490 nm, emisja 500-550 nm, wzmocnienie kamery: 10, czas ekspozycji: 800 ms,

3.10 Oznaczanie aktywności SA- β – galaktozydazy (związanej ze starzeniem)

 β – galaktozydaza (ang. *Senescence-associated \beta-galactosidase, SA-\beta-gal)* jest enzymem lizosomalnym, którego aktywność wzrasta w starzejących się komórkach. W związku z tym pomiar aktywności SA- β -gal jest wykorzystywany jako jeden z markerów starzenia komórkowego. W badanych fibroblastach do pomiaru aktywności SA- β -GAL użyto chromogennego substratu 5-bromo-4-chloro-3-indolilo- β -Dgalaktopiranozydu (X-gal), który w wyniku enzymatycznego przekształcenia przez β – galaktozydazę daje nierozpuszczalny w wodzie niebieski związek (Itahana i in., 2007).

Komórki wysiewano na szkiełka o średnicy 12 mm na płytkach 24-dołkowych w gęstości 13 tys komórek/dołek i hodowano w standardowych warunkach. Po 48 godzinach przepłukiwano dwukrotnie roztworem PBS i inkubowano w temperaturze pokojowej z roztworem utrwalającym (roztwór PBS zawierający 2% formaldehyd oraz 0,2% glutaraldehyd) przez 5 minut. W kolejnym etapie fibroblasty płukano dwukrotnie roztworem PBS i inkubowano roztworem barwiącym (1 mg/ml X-gal, 2,5 mM heksacyjanożelazian potasu, 2,5 mM żelazocyjanianiu potasu, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂ w buforze fosforanowym pH 6,0) przez 20 godzin, w 37°C bez dostępu światła i powietrza. Po zakończeniu inkubacji fibroblasty przepłukiwano dwukrotnie w roztworze PBS zwierającym 0,5% Tween-20 i znakowano jądra komórkowe używając barwnika Hoechst 33342 (1:10000) przez 10 minut. Wybarwione fibroblasty przepłukiwano trzykrotnie buforem PBS, a następnie przygotowywano preparaty mikroskopowe, poprzez przytwierdzenie szkiełek z komórkami do szkiełka

podstawowego za pomocą odczynnika Dako Mounting Medium. Komórki wizualizowano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego szerokiego pola Leica Dmi 6000 z wykorzystaniem kamery RGB DCF 295, z zastosowaniem suchego obiektywu N PLAN L 20.0x0.40 DRY, przy rozdzielczości zdjęcia 2048 x 1536 pikseli (wielkość pojedynczego piksela to 0,160 μm) i następujących parametrów:

- wizualizacja jądra komórkowego (Hoechst 33342): wzbudzenie: 325-375 nm, emisja
 435- 485 nm, wzmocnienie kamery: 4, czas ekspozycji: 500 ms,

- wizualizacja aktywności β – galaktozydazy z wykorzystaniem wiązki światła przechodzącego, wzmocnienie kamery: 2,6, czas ekspozycji: 5 ms

3.11 Test karbonylacji białek (OXYBLOT)

Do pomiaru poziomu uszkodzeń oksydacyjnych wykorzystywano zestaw OxyBlot[™] Protein Oxidation Detection Kit (Millipore). W zestawie zawarte są odczynniki, które pozwalają na immunodetekcję grup karbonylowych, będących markerem modyfikacji oksydacyjnych białek. Modyfikacja oksydacyjna białek zachodzi na skutek działania wolnych rodników oraz innych reaktywnych form tlenu. W wyniku utleniania reszt aminokwasowych powstają związki, które w swojej budowie posiadają grupę karbonylową (Nakamura & Goto, 1996).

Do lizatów komórkowych dodawano 12% SDS oraz 2,4- dinitrofenylohydrazynę (DNPH) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Po zakończeniu inkubacji dodawano roztwór neutralizujący oraz 5% β - merkaptoetanol. Tak przygotowane próbki poddawano elektroforezie na gradientowym żelu poliakrylamidowym, a następnie transferowi na błonę nitrocelulozową w celu detekcji powstałego 2,4-dinitrofenylohydrazonu (DNP) przez specyficzne przeciwciała. Jako kontrolę negatywną zastosowano próbki bez dodatku DNPH.

3.12. Analiza morfologii sieci mitochondrialnej

Analizy morfologii sieci mitochondrialnej dokonano przy użyciu narzędzi z programu ImageJ: *Analyze Particles* i *Analyze Skeleton*. Analiza poprzedzona była wydzieleniem mitochondriów z obrazu wyjściowego poprzez zastosowanie odpowiedniej wstępnej obróbki obrazu oraz progowania metodą Otsu, a następnie ustalono maskę przedstawiającą sieć mitochondrialną eliminując obiekty, które nie są z nią związane. Wtyczka *Analyze Particles* poprzez zliczenie i zmierzenie osobnych elementów tworzących sieć mitochondrialną pozwala na oszacowanie stopnia fragmentacji sieci mitochondrialnę j oraz morfologii jej poszczególnych elementów. Z kolei *Analyze Skeleton* umożliwia zmierzenie różnorodnych parametrów mitochondrialnej sieci tj. ilość

rozgałęzień mitochondrialnej sieci, średnia długość pojedynczej gałęzi sieci, ilość punktów końcowych sieci.

Kolejne etapy analizy morfologii sieci mitochondrialnej zilustrowane są na Ryc.3.1. Dla każdej linii komórkowej skwantyfikowano morfologię mitochondriów pochodzących z co najmniej 20 komórek.

A







D





Ryc.3.1 Schemat analizy morfologii mitochondriów. A) Przykład komórki fibroblastu.
B) Obraz "maski" sieci mitochondrialnej. C) Obraz przedstawiający podział na poszczególne elementy sieci mitochondrialnej z z zastosowaniem "wtyczki" Analyze Particles. D) Obraz szkieletu sieci mitochondrialnej. E) Schemat przedstawiający stany morfologii sieci mitochondrialnej z wykorzystaniem "wtyczki" Analyze Skeleton.

3.12.1 Badanie morfologii sieci mitochondrialnej

W celu analizy morfologii sieci mitochondrialnej, mitochondria w badanych komórkach wyznakowanyo fluorescencyjnym znacznikiem MitoRed – barwnikiem na bazie rodaminy, który akumuluje się w mitochondriach (wzbudzenie: 569 nm, emisja: 594 nm) (Horinouchi i in., 2011; Joanny i in., 2012). Następnie preparaty wizualizowano w mikroskopie konfokalnym i dokonywano ilościowej analizy uzyskanych obrazów.

3.12.2 Barwienie i mikroskopia konfokalna

Komórki wysiewano na szkiełka o średnicy 12 mm na płytkach 24-dołkowych w gęstości 12 tys komórek/dołek i hodowano w standardowych warunkach. Po 48 godzinach usuwano podłoże hodowlane z fibroblastów i inkubowano z MitoRed (200 nM) zawieszonym w pożywce przez 30 minut w 37°C bez dostępu światła. Następnie

komórki przepłukiwano trzykrotnie medium w celu usunięcia resztek znacznika oraz utrwalano przy użyciu 4% roztworu paraformaldehydu (NaCl (1,37 M), KCl (27 mM), Na₂HPO₄·7H₂O (43 mM), KH₂PO₄ (14 mM), pH 7,2) przez 15 min w temperaturze pokojowej. W kolejnym etapie dokonywano permeabilizacji błon przez 10 minut w buforze PBS/ Triton-X 0,5 %. Następnie płukano komórki trzykrotnie po 5 minut roztworem PBS/ Triton-X 0,1%, a blokowanie wykonano przy użyciu buforu PBS / Triton-X 0,1% / albumina (BSA) 2% przez 30 minut. Do wizualizacji filamentów aktynowych wykorzystano falloidynę znakowaną Alexa Fluor 488™ (1:150) firmy Invitrogen, w tym celu komórki inkubowano przez 60 minut w buforze PBS / Triton-X 0,1% / BSA 2%. Po trzykrotnym przepłukaniu roztworem PBS/ Triton-X 0,1%, fibroblasty inkubowano przez 10 minut z rozpuszczonym w pożywce hodowlanej barwnikiem Hoechst 33342 (1:10000), w celu wyznakowania jąder komórkowych. Wybarwione komórki przepłukiwano trzykrotnie PBS, a następnie przygotowywano preparaty mikroskopowe, poprzez przytwierdzenie szkiełek za pomocą odczynnika Dako Mounting Medium do szkiełka podstawowego. Komórki wizualizowano przy użyciu mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP8 zastosowaniem obiektywu olejowego HC PL APO CS2 63x/1.40 OIL, przy rozdzielczości zdjęcia 2048 x 2048 pikseli (wielkość pojedynczego piksela to 0,069 µm) i następujących parametrów:

-wizualizacja jądra komórkowego (Hoechst 33342): wzbudzenie/emisja: 405/ 429-482nm,

-wizualizacja filamentów aktynowych (Alexa Fluor 488™ falloidyna): wzbudzenie/emisja: 488/ 505-540 nm,

-wizualizacja mitochondriów (MitoRed): wzbudzenie/emisja: 569/ 577-636 nm,

Zdjęcia wykonywano z losowo wybranych pól, z przekrojem w osi Z (*Z-stack*) 0,289 μ m.

3.13 Badanie szybkości puli odnowy mitochondriów – wiek mitochondriów

3.13.1 Metoda "MitoTimer"- wiek mitochondriów

Do oceny "wieku" mitochondriów wykorzystano metodę MitoTimer. "MitoTimer" powstał na bazie białka DsRed (białko drFP583 – inaczej zwany Timer), które na końcu N posiada sekwencję kierującą do mitochondriów z ludzkiej podjednostki VIII oksydazy cytochromu c. MitoTimer jest białkiem fluorescencyjnym, które emituje zielone światło (wzbudzenie/emisja: 483/500 nm). Wraz z utlenianiem oraz dojrzewaniem tego białka (dehydrogenacja Tyr-67), dochodzi do nieodwracalnego przesunięcia emisji fluorescencji w kierunku barwy czerwonej (wzbudzenie/emisja: 558/583 nm). Cząsteczki MitoTimera przechodzą od zielonej fluorescencji do bardziej stabilnej konformacji emitującej czerwoną fluorescencję w ciągu 48 godzin. Szybkość odnowy puli mitochondriów w komórce, zależna od procesów biogenezy i mitofagii, wpływa na ilość białka MitoTimer, która zdoła uzyskać końcową konformację zanim ulegnie degradacji. Tym samym, stosunek zielonej do czerwonej fluorescencji białka MitoTimer odzwierciedla szybkość odnowy puli mitochondriów oraz ich wiek. Wykorzystany MitoTimer charakteryzuje się wysoką ekspresją w komórkach eukariotycznych, zredukowanym występowaniem agregatów oraz brakiem toksyczności w stosunku do komórek. Dodatkowo intensywność zielonej i czerwonej fluorescencji oczyszczonego białka Timer wykazuje niewrażliwość na zmiany pH w zakresie fizjologicznym, siłę jonową oraz zmiany poziomu reaktywnych form tlenu (Ferree i in., 2013; Gottlieb & Stotland, 2015; Hernandez i in., 2013; Trudeau i in., 2014).

3.13.2 Transfekcja i mikroskopia konfokalna

Komórki wysiewano na szkiełka o średnicy 12 mm na płytkach 24-dołkowych w gestości 10 tys komórek/dołek i hodowano w standardowych warunkach. Po 48 godzinach bez wymiany podłoża hodowlanego przeprowadzono transfekcje za pomoca odczynnika TransfeX (ATCC) oraz z wykorzystaniem białka MitoTimer. TransfeX jest kationowym związkiem, który zapewnia wysoką wydajność przy niskiej śmiertelności komórek poprzez efektywne wprowadzenie DNA plazmidu. Do przygotowania mieszaniny transfekcyjnej użyto odpowiednia ilość DNA (0,25 µg/dołek), która zawieszano w pożywce OptiMem, powstały roztwór mieszano, dodawano reagent TransfeX (DNA: TransfeX 1: 2) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Tak powstałą mieszaninę dodawano do pożywki hodowlanej komórek. Po 24 godzinach fibroblasty przepłukano trzykrotnie medium w celu usuniecia resztek znacznika oraz utrwalono przy użyciu 4% roztworu paraformaldehydu w roztworze PBS (NaCl (1,37 M), KCl (27 mM), Na₂HPO₄·7H₂O (43 mM), KH₂PO₄ (14 mM), pH 7,2). Komórki inkubowano z rozpuszczonym w pożywce hodowlanej barwnikiem Hoechst 33342 (1:10000), w celu wyznakowania jąder komórkowych. Wybarwione komórki przepłukiwano trzykrotnie PBS, a następnie przygotowywano preparaty mikroskopowe, poprzez przytwierdzenie szkiełek za pomocą odczynnika Dako Mounting Medium do szkiełka podstawowego. Komórki wizualizowano przy użyciu mikroskopu konfokalnego Zeiss Spinning Disc, zastosowaniem obiektywu olejowego 63x Oil PLN APO 63x/1.40 Oil, przy rozdzielczości zdjęcia 512 x 512 pikseli (wielkość pojedynczego piksela to 0,212 µm) i następujących parametrów:

-wizualizacja jądra komórkowego (Hoechst 33342): wzbudzenie/emisja: 353/465 nm,

-wizualizacja białka MitoTimer: wzbudzenie/emisja : 488/ 509 nm,

-wizualizacja dojrzewającego białka MitoTimer: wzbudzenie/emisja: 545/ 572 nm,

Zdjęcia wykonywano z losowo wybranych pól, z przekrojem w osi Z (*Z-stack*) w odstępach co 0,240 µm. Dla każdej linii komórkowej przeanalizowano minimum 60 komórek.

3.13.3 Analiza danych

Analizy wieku mitochondriów dokonano za pomocą programu ImageJ. Z obrazu wyjściowego przedstawiającego pojedynczą komórkę zarówno dla kanału zielonego jak i czerwonego wydzielono mitochondria – progowanie metodą Otsu. Następnie ustalono wspólną dla obu kanałów maskę przedstawiającą sieć mitochondrialną eliminując obiekty, które nie są z nią związane. Za pomocą uzyskanej maski z obrazów dla kanału zielonego i czerwonego wydzielano obszary zawierające mitochondria, określano dla nich intensywność fluorescencji, a następnie obliczano stosunek intensywności kanału zielonego do czerwonego (nowo powstałe białko MitoTimer/dojrzałe białko MitoTimer) dla danej komórki.

3.14 Oznaczanie względnych ilości białek metodą Western Blot

Metoda Western Blot jest jedną z najbardziej znanych i najczęściej stosowanych metod do rozdzielenia oraz identyfikacji białka. W tej technice można wyodrębnić trzy etapy. Pierwszym z nich jest rozdzielenie mieszaniny białek na podstawie masy cząsteczkowej, kolejnym przeniesienie białek na podłoże stałe, zaś ostatnim – znakowanie białek, w celu ich późniejszej wizualizacji (Towbin i in., 1979; P.-C. Yang & Mahmood, 2012).

3.14.1 Przygotowanie lizatów komórkowych

Komórki wysiewano na szalki o średnicy 10 cm w gęstości 450 tys komórek/szalkę i hodowano w standardowych warunkach. Po 48 godzinach przemywano roztworem PBS, następnie inkubowano z 0,05% trypsyną w celu odklejenia ich od podłoża. Po odklejeniu się komórek od podłoża trypsynę inaktywowano dodając pożywkę hodowlaną. Taką zawiesinę wirowano przez 3,5 minuty przy 200 x g. Powstały supernatant usuwano, a osad komórek zawieszano w 10 ml PBS (4°C), po czym ponownie wirowano przez 3,5 minuty przy 200 x g. Następnie usuwano supernatant a osad zawieszano w buforze lizującym RIPA (Sigma-Aldrich), uzupełnionym o koktajl inhibitorów fosfataz i proteaz (Sigma-Aldrich). Próbki inkubowano przez 30 minut na lodzie. Następnie komórki poddawano mechanicznej homogenizacji przy użyciu strzykawki z igłą iniekcyjną o średnicy 0,5 mm i wirowano 20 minut przy 16 000 x g w 4°C. Supernatant przenoszono do nowej probówki i oznaczano w nim stężenie białka metodą Bradford. Do otrzymanych lizatów dodawano odpowiednią ilość czterokrotnie stężonego buforu obciążającego (pH 6,8) o składzie: Tris–HCl (0,5 M), SDS (2,3%), merkaptoetanol (5%, v/v), glicerol (12,5%, v/v), błękit bromofenolowy (0,04%, m/v) i ogrzewano przez 5 minut w temperaturze 95°C, w celu denaturacji białek. Tak przygotowane lizaty przechowywano w temperaturze -20°C.

3.14.2 Oznaczanie stężenia białka metodą Bradford

Stężenie białka oznaczono metodą Bradford. Do kuwet zawierających 1 ml odczynnika Bradforda dodawano odpowiednią ilość mierzonego roztworu białka i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Następnie mierzono poziom absorbancji na spektrofotometrze Hitachi U-2900 przy długości fali 595 nm. Stężenie białka obliczano na podstawie krzywej wzorcowej przygotowanej w oparciu o rozcieńczenia standardowego roztworu albuminy z surowicy bydlęcej o znanym stężeniu (Bradford, 1976).

3.14.3 Przygotowanie żeli poliakrylamidowych

Do rozdziału elektroforetycznego białek stosowano żele poliakrylamidowe o składzie: Tris (375 mM, pH 8,6), SDS (0,1 %), glicerol (8%) i nadsiarczan amonu (APS, 0.025 %), N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina (TEMED, 0,1 %) i różnej procentowości akrylamidu (8%, 10%, 12%, 15%) w zależności od masy cząsteczkowej analizowanego białka.

W przypadku żelu zagęszczającego skład prezentował się następująco: Tris (125 mM, pH 6,8), SDS (0,1 %), APS (0.025 %), TEMED (0,1 %) a zawartość akrylamidu wynosiła zawsze 5%.

Część eksperymentów przeprowadzono na gotowych żelach gradientowych (4-12%) firmy BioRad.

3.14.4 Elektroforeza SDS – PAGE oraz transfer białek

We wszystkich eksperymentach nanoszono po 20 µg próbki na ścieżkę żelu. Próbki poddawano elektroforezie w warunkach denaturujących (elektroforeza SDS-PAGE) w buforowanym roztworze do elektroforezy o składzie: Tris (25 mM, pH 8,6), glicyna (192 mM), 0,1% SDS (w przypadku własnoręcznie wykonywanych żeli poliakrylamidowych) lub w roztworze BoltTM MOPS SDS Running Buffer (rozdział średniej wielkości i dużych białek) i BoltTM MES SDS Running Buffer (rozdział średniej wielkości i małych białek), gdy używano gotowych żeli gradientowych. Elektroforezę prowadzono przy stałym natężeniu prądu 20 mA na żel w aparatach Mini PROTEAN Tetra Cell Biorad oraz przy stałym natężeniu prądu 20 mA na gotowy żel gradientowy w aparatach Mini Gel Tank Thermo Fisher. Za każdym razem nakładano na żel 2-3 µl białkowego znacznika (standardu) mas cząsteczkowych.

Po zakończeniu elektroforezy przeprowadzano transfer białek z żelu na membranę nitrocelulozową o wielkości porów 0,45 μm (BioRad) w buforowanym roztworze do transferu o składzie: Tris (25 mM), glicyna (192 mM), metanol (20%) w przypadku aparatu firmy Mini PROTEAN Tetra Cell lub w buforze BoltTM Transfer Buffer w aparacie Mini Gel Tank z zastosowanym modułem do transferu Mini Blot Module. W zależności od wielkości żelu i użytego aparatu warunki transferu były różne: dla aparatu firmy BioRad, gdzie wykorzystywano własnoręcznie robiony żel: 60 minut przy stałym natężeniu prądu 400 mA w 4°C, zaś dla aparatu Mini Gel Tank/ Mini Blot Module, gdzie wykorzystywano gotowy żel gradientowy: 60 minut przy stałym napięciu 10 V.

3.14.5 Immunodetekcja

W celu zniwelowania niespecyficznego wiązania przeciwciał do błony nitrocelulozowej, membrane blokowano przez 60 minut w buforze Odyssey Blocking Buffer/ TBS 1:1 (skład buforu TBS: Tris 20 mM (pH 7,6), chlorek sodu (NaCl) 150 mM) w temperaturze pokojowej. Po tym czasie, błone inkubowano z roztworem przeciwciał pierwszorzędowych skierowanych przeciw badanemu białku rozcieńczonych w buforze Odyssey Blocking Buffer/ TBS (1:1) oraz dodatkiem 0,1% Tween-20 przez noc w 4°C. Zastosowane przeciwciała i ich rozcieńczenia przedstawia Tabela 1. Następnie błone płukano trzykrotnie roztworem TBS-T (Tris 20 mM (pH 7,6), chlorek sodu (NaCl) 150 mM, 0,1% Tween-20) i inkubowano przez 60 minut w temperaturze pokojowej w roztworze przeciwciał drugorzędowy sprzężonych z fluorochromami IRDye w buforze Odyssey Blocking Buffer/ TBS (1:1) oraz dodatkiem 0,1% Tween-20. Następnie błonę płukano trzykrotnie po 5 minut roztworem TBS-T, a w końcowym etapie przemwano roztworem TBS, aby wyeliminować detergent, który mógłby wpłynać na wizualizacje sygnału. Do detekcji sygnału wykorzystano skaner Odyssey Infrared Imaging System (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, USA), wyposażony w lasery o długości fali 785 i 685 nm. Intensywności fluorescencji analizowano przy użyciu oprogramowania Image Studio[™] Lite Ver.5.2.

Przeciwciało	Firma	Nr katalogowy	Rozcieńczenie			
Biogeneza mitochondriów						
TFAM	Cell Signalling	7495	1:1000			
Nrf1	Proteintech	12482-1-AP	1:1000			
Nrf2	Proteintech	16396-1-AP	1:1000			
POLG	Abcam	128899	1:1000			
Enzymy antyoksydacyje						
Katalaza	Abcam	ab16731	1:1000			
SOD1	Santa Cruz	sc-11407	1:500			
SOD2	Cell Signalling	13141	1:500			
GPx	Santa Cruz	sc-133160	1:500			
GRx	Santa Cruz	sc-133245	1:500			
Autofagia/mitofagia						
Beclin1	Cell Signalling	3495	1:1000			
LC3	Cell Signalling	12741	1:1000			
PINK1	Novus Biologicals	BC100-494	1:1000			
Parkin	Abcam	ab1594	1:1000			
SQSTM1/p62	Cell Signalling	5114	1:1000			
Receptor estrogenowy						
Fosfo – ERRαS118	Abcam	ab32396	1:1000			
ERRα	Novus	NBP1-47254	1:1000			
Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego – białko referencyjne						
GAPDH – mysie	Merck Millipore Corp.	MAB374	1:10 000			
GAPDH – królicze	Abcam	ab181602	1:10 000			

Tabela 1. Stosowane przeciwciała pierwszorzędowe.

Tabela 2. Stosowane przeciwciała drugorzędowe

Przeciwciało	Firma	Nr katalogowy	Rozcieńczenie
IRDye 680LT anty-mysie	Li-Cor	926-68022	1:10 000
IRDye 800CW anty-mysie	Li-Cor	926-32212	1:10 000
IRDye 680LT anty-królicze	Li-Cor	926-68023	1:10 000
IRDye 800CW anty-królicze	Li-Cor	926-32213	1:10 000

3.15 Woltamperometria cykliczna

Woltamperometria cykliczna jest popularną i jedną z najczęściej stosowanych technik elektroanalitycznych służącą do badania reakcji elektrochemicznych. Pozwala na określenie potencjałów, przy których badana substancja elektroaktywna ulega reakcjom redukcji lub utlenienia oraz pozwala wyjaśnić mechanizm przenoszenia elektronów w reakcjach katalitycznych.

Technika ta polega na pomiarze natężenia przepływającego prądu przez elektrodę pracującą (podczas liniowej i cyklicznej zmiany przyłożonego do niej potencjału) oraz przeciwelektrodę. Przeważnie układ pomiarowy składa się z zestawu trzech elektrod, a każda z nich pełni określone funkcje. Na elektrodzie pracującej zachodzi reakcja redoks badanej substancji, elektroda odniesienia (referencyjna), jest to elektroda niepolaryzowalna, co oznacza, że jej potencjał nie ulega zmianie, zaś przeciwelektroda, czyli elektroda pomocnicza zapewnia stałą wartość potencjału elektrody odniesienia. Właściwa reakcja elektrodowa polega na redukcji (przeniesienie liczby n elektronów z elektrody do depolaryzatora) lub utlenieniu substancji analizowanej (przeniesienie liczby n elektronów z depolaryzatora do elektrody).



Ryc.3.4 Zależność zmiany potencjału w czasie.

Gdy substancja elektroaktywna znajduje się w roztworze elektrolitu podstawowego, rejestrowane krzywe woltamperometryne mają kształt pików. Jest to spowodowane tym, że początkowo na drodze dyfuzji, depolaryzator jest doprowadzany do powierzchni elektrody (dyfuzja do powierzchni elektrody zachodzi prostopadle, można zaniedbać wkład dyfuzji z brzegów elektrody). Następnie gdy przyłożona wartość potencjału osiągnie taką wartość, by umożliwić zajście reakcji elektrodowej, obserwuje się wzrost natężenia prądu. Rejestrowany prąd osiąga wartość maksymalną, gdy znajdujący się przy powierzchni elektrody depolaryzator ulega wyczerpaniu. Spadek natężenia prądu oraz formowanie się piku jest związane ze zużyciem substancji elektroaktywnej przy powierzchni elektrony oraz rozrostem warstwy dyfuzyjnej.



Ryc.3.5 Zależność i=f(E) w woltamperometrii cyklicznej.

Dla procesów odwracalnych natężenie prądu piku w warunkach dyfuzji liniowej opisuje poniższe równanie Randlesa – Ševčika (T=25°C).

$$I_{p} = 2,69 * 10^{5} * n^{\frac{3}{2}} * A * D^{\frac{1}{2}} * v^{\frac{1}{2}} * C_{0}$$

Gdzie:

- I_p- rejestrowany prąd piku [A],
- n liczba elektronów biorących udział w reakcji elektrodowej,
- D współczynnik dyfuzji reagenta [cm² * s⁻¹],
- A powierzchnia elektrody [cm²],
- v szybkość zmian potencjału [V * s⁻¹],
- C₀- stężenie substancji elektroaktywnej w głębi roztworu [mol * cm⁻³]

Zgodnie z nim, rejestrowany prąd piku jest wprost proporcjonalny do stężenia depolaryzatora w roztworze oraz do pierwiastka kwadratowego z szybkości polaryzacji.

W przypadku pracy z substancją aktywną znajdującą się na powierzchni elektrody (jak w przypadku badań prowadzonych w tej pracy) reakcja redoks przebiega wewnątrz warstwy, czyli proces elektrodowy zachodzi w ograniczonej przestrzeni. Zarejestrowane sygnały są pikami typu powierzchniowego (a nie dyfuzyjnego) i charakteryzują się wysoką symetrią (Ryc.3.6). Bardzo mała wartość v (szybkość zmian potencjału) wskazuje na idealny przebieg procesu powierzchniowego, lecz dla dużych szybkości przemiatania potencjałem, krzywe woltamperometryczne przypominają kształtem krzywe woltamperometryczne zarejestrowane w procesach kontrolowanych dyfuzją liniową.



Ryc.3.6 Teoretyczna cykliczna krzywa woltamperometryczna dla odwracalnego układu redoks osadzonego na powierzchni elektrody (n=1).

Poniższe równania opisują proces powierzchniowy, gdzie wartość prądu piku jest wprost proporcjonalna do szybkości polaryzacji, natomiast stężenie powierzchniowe centrów można wyliczyć w oparciu o ładunek, czyli pole powierzchni pod pikiem.

$$ip = \frac{n^2 * F^2 * v * A * \Gamma}{4 * R * T} \qquad \qquad \Gamma = \frac{Q}{n * A * F}$$

Gdzie:

ip- rejestrowany prąd piku [A],

n - liczba elektronów biorących udział w reakcji elektrodowej,

F – stała Faradaya [96500 C * mol⁻¹],

A - powierzchnia elektrody [cm²],

v - szybkość zmian potencjału [V * s -1],

 Γ - stężenie powierzchniowe centrów redoks [mol * cm⁻²],

Gdzie:

 Γ - stężenie powierzchniowe centrów redoks [mol * cm⁻²],

n - liczba elektronów biorących udział w reakcji elektrodowej,

F – stała Faradaya [96500 C * mol⁻¹],

A - powierzchnia elektrody [cm²],

Q – ładunek elektryczny [C],

Procedura przygotowania warstw katalitycznych:

- Do 7,1 mg nanocząstek (nPt) wprowadzono 2 ml wody destylowanej i tak przygotowaną zawiesinę umieszczono w łaźni ultradźwiękowej na ok. 2 godziny, w celu dokładnego rozproszenia nanocząstek. Na elektrodę z węgla szklistego (GC) o powierzchni geometrycznej 0,071 cm² nakładano 2 μl tej zawiesiny, a pokrycie elektrody wynosiło ok. 100 μg *cm⁻². Średni rozmiar nanocząstek platyny wynosił ok.10 nm.
- Przygotowanie zawiesiny wielościennych nanorurek węglowych odbyło się poprzez zdyspergowanie 10mg MWCNTs w 1 ml wody destylowanej i tak przygotowany roztwór umieszczono w łaźni ultradźwiękowej na ok. 1 godzinę. Następnie do probówki wprowadzono mieszadełko magnetyczne pozostawiając próbkę na mieszadle magnetycznym (ok. 1 godzina). Z tak uzyskanej zawiesiny pobrano 0,5 ml i dodano 100 µl etanolu i ponownie umieszczono na mieszadle magnetycznym przez ok. 30 minut. W ostatnim etapie dodano 5 µl 5% roztworu Nafionu i ponownie mieszano przez ok. 1 godzinę. Na elektrodę z węgla szklistego (GC) o powierzchni geometrycznej 0,071 cm² nakładano 2 µl tej zawiesiny, a pokrycie elektrody wynosiło ok. 670 $\mu g * cm^{-2}$

Na tak przygotowane warstwy nanoszono 2µl roztworu daidzeiny (1mg/2ml EtOH) w celu dalszych badań. Elektrody wykorzystane w trakcie prowadzenia badań:

- Elektroda pracująca: elektroda dyskowa z węgla szklistego, GC o powierzchni 0,071 cm², CH Instruments, Inc. Austin, USA
- Elektroda odniesienia: nasycona elektroda kalomelowa (Hg/Hg₂Cl₂/nas. KCl), Metron, Gliwice, Polska
- Elektroda pomocnicza: drucik węglowy, Mennica Polska, Warszawa

Wykorzystane potencjostaty: CHI 760D oraz CHI 660B z firmy CH Instruments Inc. Austin, USA

3.16 Analiza statystyczna

Wyniki przedstawiano jako średnie arytmetyczne ± odchylenia standardowe z co najmniej trzech niezależnych eksperymentów. Uzyskane wyniki zaprezentowano dwustopniowo. W pierwszym etapie porównano między sobą poszczególne grupy badanych komórek: fibroblasty na wczesnych pasażach (młode), na późnych pasażach (#) oraz poddane stresowi oksydacyjnemu (TBH). Wyniki normalizowano do średniej wartości uzyskanej w danym eksperymencie dla komórek młodych (I grupa). W drugim etapie zbadano wpływ daidzeiny na badane komórki. Te wyniki normalizowano osobno dla każdej grupy, do średniej wartości dla komórek nietraktowanych. Istotność statystyczną oceniono w programie Microsoft Excel za pomocą dwustronnego testu t-Studenta dla prób o nierównej wariancji. Tylko wartości p niższe niż 0,05 uznano za statystycznie istotne.

4. WYNIKI

4.1. Dobór odpowiedniego modelu doświadczalnego

Aby przygotować odpowiedni model badawczy – starzenia się komórek na wczesnym etapie tego procesu, wykorzystano pierwotną linię komórkową ludzkich fibroblastów. Komórki pochodziły od zdrowego 27 letniego dawcy. Do modelu indukowanego stresu użyto wodoronadtleneku tert-butylu (dalej zwany: TBH), który jest analogiem nadtlenku wodoru. TBH potrafi wywołać stres oksydacyjny jako egzogenny dawca RFT (Lu i in., 2021). Ludzkie fibroblasty pierwotne pochodzące z niższych pasaży (#5-10) inkubowano z 50, 100 i 200 µM roztworem TBH zawieszonym w pożywce hodowlanej przez 24 godziny, w celu sprawdzenia przeżywalności komórek. Wykonano zdjęcia mikroskopowe co 15 minut.





Fot. 4.1 *Fibroblasty inkubowane z różnymi stężeniami TBH*. A) 50 μM, B) 100μM i C) 200μM.

Wyraźny wzrost śmiertelności komórek wystąpił po traktowaniu TBH w stężeniu 200 μ M po 45 minutach. W przypadku użycia 50 μ M stężenia TBH efekt ten był obserwowany po 2 godzinach, a dla stężenia 100 μ M TBH po 3 godzinach. Dlatego do dalszych badań zdecydowano się na zastosowanie stężenia 100 μ M TBH i czasu inkubacji 30 min, w celu wywołania krótkiego, ale silnego stresu oksydacyjnego.

4.2 Charakterystyka badanych linii komórkowych

4.2.1 Proliferacja

Proliferacja komórek jest dynamicznym oraz złożonym procesem, w którym poprzez podziały komórkowe dochodzi do zwiększenia się populacji komórek. Zdolność proliferacyjna jest jednym z podstawowych parametrów charakteryzujących stan komórek. Aby ją określić wyznacza się czas w jakim dana populacja podwoi swoją liczbę (ang. *Population doubling time*, *PDT*) (Chung i in., 2017). W przypadku linii fibroblastów pochodzących z wczesnych pasaży (#5-10) (w dalszej części rozprawy stosowano skrót: "Kontrola") czas podwojenia populacji wynosił 51±1 godzin. Natomiast dla linii komórek z indukowanym TBH stresem oksydacyjnym (w dalszej części rozprawy stosowano skrót: "TBH") wynosił on 45±9 godzin, a dla linii komórek starzejących się poprzez hodowlę komórkową (w dalszej części rozprawy stosowano skrót: p18-25) 53±9 godzin (Ryc. 4.1). Nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie.



Ryc.4.1 *Czas podwojenia populacji*. Czas podwojenia populacji wyliczono na podstawie liniowego fragmentu krzywej wzrostu komórek (rozdział 3.3). Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

4.2.2 Ocena intensywności podziałów komórkowych - test wbudowywania BrdU

Bromodeoksyurydyna (BrdU) to syntetyczny nukleozyd stosowany do wykrywania proliferacji komórek, który podczas replikacji DNA wbudowuje się w miejsce tyminy (Webster i in., 2014). W kontroli procent komórek aktywnie proliferujących wynosił 73 \pm 12%, w linii komórek TBH 66 \pm 17%, a w linii komórek z późnych pasaży 83 \pm 11% (Ryc.4.2). Nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie.



Ryc.4.2 *Odsetek aktywnie proliferujących komórek*. A) Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z 3 niezależnych doświadczeń, liczba ocenionych jąder komórkowych we wszystkich liniach wynosi co najmniej 1000 jąder w jednym

doświadczeniu. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001. B) Przykładowe zdjęcie pokazujące nałożenie obrazu barwienia BrdU (kolor zielony) oraz znakowania wszystkich jąder komórkowych (kolor niebieski – barwnik Hoechst 33342). W komórkach aktywnie proliferujących jądra wybarwione są obydwoma kolorami (nałożenie widoczne jako kolor jasnoniebieski).

4.2.3 Ocena liczby komórek o podwyższonym poziomie SA-β-GAL w populacji

Jednym z najczęściej stosowanych markerów starzenia jest SA- β -galaktozydaza (SA- β -GAL) (Antropova i in., 2002). Aby sprawdzić ilość komórek starych w populacji, fibroblasty poddano ocenie aktywności SA- β -galaktozydazy. W linii komórek kontrolnych liczba komórek o podwyższonym poziomie SA- β -GAL utrzymywała się na poziomie 12%, zaś w przypadku komórek TBH procent komórek o podwyższonym poziomie SA- β -GAL wynosił 19±5%, a dla komórek pochodzących z późnych pasaży 17±1,8% (Ryc. 4.3). Podsumowując, zaobserwowano większą liczbę komórek o podwyższonym poziomie SA- β -GAL w fibroblastach z późnych pasaży, co może świadczyć o rozpoczęciu/ początkach procesu starzenia komórkowego.



Ryc.4.3 *Aktywność SA-β-galaktozydazy*. A) Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001. Analizowano co najmniej 200 komórek z każdego eksperymentu (z każdej linii komórkowej) z 3 niezależnych doświadczeń. B) Przykładowe zdjęcie komórek SA-β-GAL pozytywnych, gdzie na niebiesko wybarwiono jadra komórkowe, a ciemnoniebieskie otoczenie wokół jąder świadczy o obecności SA-β-galaktozydazy.

4.3 Charakterystyka fizjologii mitochondriów

4.3.1 Potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej

Potencjał elektrochemiczny wewnętrznej błony mitochondrialnej ($\Delta \psi_m$) stanowi ważny parametr do oceny stanu funkcjonalnego mitochondriów. Potencjał generowany jest przez aktywność kompleksów w łańcuchu oddechowym, a następnie wykorzystywany w procesie syntezy ATP oraz w transporcie jonów i metabolitów przez błony mitochondrialne. Do oceny $\Delta \Psi$ w badanych komórkach wykorzystano sondę JC-1. Dodatkowo przeanalizowano także komórki z bardzo późnych pasaży #52-53 (dalej zwane: p52-53), w celu porównania $\Delta \Psi$ w późnym etapie starzenia replikacyjnego. We wszystkich badanych modelach doświadczalnych nie odnotowano istotnych zmian statystycznych w porównaniu do komórek kontrolnych (Ryc 4.4).



Ryc.4.4 *Potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej* oznaczony z wykorzystaniem sondy JC-1 przy użyciu laserowego cytometru skaningowego. A) Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001. B) Obraz pochodzący z LSC z 1 pola widzenia przy zastosowaniu obiektywu, gdzie kolor zielony - zdepolaryzowane mitochondria, kolor czerwony – spolaryzowane mitochondria, kolor żółty – nałożenie obrazów.

4.3.2 Poziom Ca²⁺ w komórce

Mitochondria mają zdolność do buforowania jonów Ca^{2+} , co oznacza, że zaburzenia w ich funkcjonowaniu mogą prowadzić do zmian w cytozolowym stężeniu jonów Ca^{2+} , a tym samym wpływać na procesy przez nie regulowane (Luis-García i in.,

2021). Do oceny cytozolowego poziomu jonów Ca^{2+} użyto sondy Fluo4-AM, a pomiary prowadzono w żywych komórkach w laserowym cytometrze skaningowym (LSC). W komórkach TBH poziom Ca^{2+} był istotnie podwyższony o 7±3% w porównaniu do komórek kontrolnych. W linii komórek z późnych oraz bardzo późnych pasaży nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie, lecz zaobserwowano tendencję do podwyższonego poziomu Ca^{2+} (Ryc 4.5).



Ryc.4.5 *Poziom jonów Ca*²⁺ *w cytoplazmie oznaczony z wykorzystaniem sondy Fluo4-AM przy użyciu laserowego cytometru skaningowego*. A) Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001. B) Obraz pochodzący z LSC z widoczną fluorescencją sondy.

4.3.3 Poziom reaktywnych form tlenu (RFT)

Mitochondrią są jednymi z głównych "producentów" RFT w komórce. Zmiany, defekty czy dysfunkcje mitochondriów mogą przyczyniać się do zwiększonej generacji RFT. Z tego powodu sprawdzono czy poziom anionorodnika ponadtlenkowego (O_2) znajdującego się w mitochondriach oraz czy poziom nadtlenku wodoru (H₂O₂) w cytoplazmie różni się w badanych liniach komórkowych. Analiza wykazała istotny wzrost poziomu O2⁻ w mitochondriach o 88±17% dla linii komórek z bardzo późnych pasaży, zaś dla pozostałych komórek zaobserwowano wzrostową tendencję. Poziom H₂O₂ zarówno dla komórek TBH jak i komórek pochodzących z późnych pasaży jest istotnie podniesiony odpowiednio o $10\pm1\%$ oraz $13\pm2\%$ (Ryc 4.6). Podsumowując w fibroblastach ulegajacych starzeniu replikacyjnemu oraz indukowanemu zaobserwowano podniesiony poziom RFT, który może świadczyć o pierwszych oznakach stresu.



Ryc.4.6 *Poziom reaktywnych form tlenu*. A) Poziom anionorodnika ponadtlenkowego w mitochondriach oznaczony z wykorzystaniem sondy MitoSOX. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001. B) Obraz pochodzący z LSC z widoczną fluorescencją sondy. C) Poziom nadtlenku wodoru w cytoplazmie oznaczony z wykorzystaniem sondy CM-H₂DCFDA. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001. D) Obraz pochodzący z LSC z widoczną fluorescencją sondy. C) Poziom nadtlenku wodoru w cytoplazmie oznaczony z mykorzystaniem sondy CM-H₂DCFDA. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001. D) Obraz pochodzący z LSC z widoczną fluorescencją sondy.

4.4 Poziom enzymów antyoksydacyjnych

Poziom RFT w komórce jest ściśle powiązany z aktywnością systemu antyoksydacyjnego. W skład systemu antyoksydacyjnego wchodzą enzymy odpowiedzialne za usuwanie RFT. Dysmutaza ponadtlenkowa (ang. *Superoxide dismutase, SOD*) katalizuje reakcje dysmutacji O_2^{\bullet} do O_2 i H₂O₂, gdzie w kolejnym etapie

H₂O₂ jest redukowany do H₂O oraz O₂ przez reduktazę glutationową i katalazę (Trist i in., 2021). SOD1 (Cu/ZnSOD) występuje głównie w cytoplazmie oraz w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów. Analiza Western blot nie wykazała różnic pomiędzy komórkami kontrolnymi a komórkami starzejącymi się (Ryc 4.7 A).

Dysmutaza ponadtlenkowa 2 (SOD2, MnSOD) jest obecna w macierzy mitochondrialnej. Poziom SOD2 był obniżony jedynie w linii komórek pochodzących z późnych pasaży o 32±18% (Ryc 4.7 B).

Katalaza (ang. *Catalase, Cat*) jest kluczowym enzymem, który przekształca H_2O_2 do H_2O i O_2 , głównie występującym w peroksysomach (Glorieux & Calderon, 2017). W komórkach TBH oraz w komórkach z późnych pasaży, poziom tego enzymu był istotnie niższy w porównaniu do komórek kontrolnych, odpowiednio o 12±8% i 17±14% (Ryc 4.7 C).

Peroksydazy glutationowe (ang. *Glutathione peroxidase, GPx*) katalizują redukcję H_2O_2 lub organicznych wodoronadtlenków do wody lub odpowiedniego alkoholu kosztem utleniania glutationu (Margis i in., 2008). Glutation jest jednym z tioli redukujących, a w swojej zredukowanej postaci odgrywa kluczową rolę w komórkowej kontroli poziomu RFT (Couto i in., 2016). GPx1 akumuluje się w jądrze komórkowym, cytozolu i mitochondriach. W przypadku tylko fibroblastów pochodzących z późnych pasaży poziom tego enzymu wzrósł o $30\pm24\%$ w porównaniu do fibroblastów linii kontrolnej (Ryc 4.7 D).

Reduktaza glutationowa (ang. *Glutathione reductase, GRx*) jest enzymem, który katalizuje redukcję utlenionego glutationu, który w postaci zredukowanej może być ponownie wykorzystany do usuwania H₂O₂. Analiza Western blot nie wykazała różnic pomiędzy komórkami kontrolnymi a badanymii liniami (Ryc 4.7 E).

Podsumowując, zaobserwowano zmiany w systemie obrony antyoksydacyjnej, jednak ich profil różnił się w zastosowanych modelach.



Zdjęcia membran z analizy Wester blot zostały pokazane w drugiej części pracy, gdzie zbadano wpływ daidzeiny.



Ryc.4.7 **Poziom enzymów antyoksydacyjnych** zbadany metodą Western blot. A) Poziom cytozolowej izoformy dysmutazy ponadtlenkowej (Cu/ZnSOD) (n=5). B) Poziom mitochondrialnej izoformy dysmutazy ponadtlenkowej (MnSOD) (n=4). C) Poziom katalazy (n=5). D) Poziom peroksydazy glutatinowej (GPx) (n=4) oraz E) poziom reduktazy glutatinowej (GRx) (n=3). Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z co najmniej 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

4.5 Poziom uszkodzeń oksydacyjnych białek – karbonylacja białek

Karbonylacja jest jedną z modyfikacji oksydacyjnych białek, która występuje na skutek działania RFT. W czasie tego procesu dochodzi do wprowadzenia grupy karbonylowej do białka poprzez utlenianie reszt aminokwasów takich jak np. argininy czy treoniny lub w wyniku wieloetapowej serii reakcji (P. Wang & Powell, 2010). W przypadku fibroblastów TBH odnotowano istotny wzrost uszkodzeń oksydacyjnych o 60±42% w porównaniu do komórek kontrolnych. W komórkach pochodzących

66

z późnych pasaży zaobserwowano jedynie tendencję do podwyższonego poziomu uszkodzeń oksydacyjnych (Ryc 4.8)



Ryc.4.8 *Poziom uszkodzeń oksydacyjnych wyrażony stopniem karbonylacji zbadany metodą Western blot.* A) Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z co najmniej 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.B) Zdjęcie przykładowej membrany, gdzie: L – standard wielkości białek.

4.6 Morfologia komórki i sieci mitochondrialnej

4.6.1 Morfologia komórki i sieci mitochondrialnej

Morfologię komórek oceniono w mikroskopie konfokalnym. Zaobserwowano zmiany w kształcie w większości komórek, komórki kontrolne i TBH przypominają wrzecionowaty kształt, natomiast komórki pochodzące z późnych pasaży są bardziej rozgałęzione i rozpostarte po powierzchni adhezyjnej (Ryc 4.9).



Ryc.4.9 *Morfologia fibroblastów*. Obraz reprezentacyjnych komórek: A) Kontrola. B) Komórki TBH oraz C) komórki z późnego pasażu. Jądra komórkowe wyznakowano znacznikiem fluorescencyjnym Hoechst 33342 – kolor niebieski, filamenty aktynowe falloidyną sprzężoną z Alexa Fluor 488TM - kolor zielony, a sieć mitochondrialną biarwnikiem MitoRed – kolor czerwony. Komórki wizualizowano przy użyciu mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP8 zastosowaniem obiektywu olejowego HC PL APO CS2 63x/1.40 OIL





Ryc.4.10 *Przykładowa sieć mitochondrialna w badanych liniach*. A) Komórka kontrolna. B) Komórka TBH oraz C) komórka z późnego pasażu (p18-25).

В

4.6.2 Architektura sieci mitochondrialnej

Mitochondria są dynamicznymi organellami. Tworzą rozgałęzioną sieć, której struktura wpływa na funkcjonowanie mitochondriów. Nieustanna reorganizacja i przebudowa sieci mitochondrialnej poprzez procesy fuzji i fragmentacji jest ważnym elementem adaptacji komórki, a zaburzenia w funkcjonowaniu mitochondriów przekładają się na zmianę organizacji sieci mitochondrialnej. Aby ocenić morfologię (organizację) sieci mitochondrialnej wykorzystano program ImageJ z zastosowaniem odpowiednich wtyczek: *Analyze Skeleton* i *Analyze Particles*. Umożliwiają one ocenę stopnia fragmentacji sieci (poprzez analizę ilości oderwanych elementów, mediana rozmiaru elementu), poziomu jej złożoności (określenie stopnia rozgałęzienia sieci i długości poszczególnych gałęzi), a także wielkości sieci (suma długości gałęzi, całkowita objętość sieci).

Analiza wielkości sieci wykazała, że suma długości gałęzi jest wyraźnie niższa w komórkach z późnych pasaży niż w komórkach kontrolnych. Wartość tego parametru dla komórek kontrolnych wynosi 2646±1725, zaś dla komórek z wyższych pasaży wynosi 949±257 (Ryc.4.11 A). W przypadku całkowitej objętości zaobserwowano istotnie niższy poziom w komórkach z późnych pasaży 484±188 (Ryc.4.11 B).

W przypadku analizy stopnia fragmentacji sieci wykazano, że w sieci mitochondrialnej komórek z późnych pasaży zaobserwowano mniejszą ilość oderwanych od niej elementów 45,6±15,2 (Ryc.4.11 C). Rozmiar największego elementu sieci był niższy (300,9±165) w porównaniu do komórek kontrolnych (Ryc.4.11 E). W parametrze średniej sferyczności dla fibroblastów TBH nie odnotowano istotnych statystycznie różnic. Natomiast w fibroblastach z późnych pasaży zaobserwowano istotnie wyższą wartość w porównaniu do kontroli 0,47±0,03 (Ryc.4.11 F). W wartości mediany rozmiaru pojedynczego elementu (Ryc.4.11 D) nie odnotowano statystycznie istotnych różnic pomiędzy liniami.

Analiza stopnia rozgałęzienia sieci wykazała, że parametrach takich jak stosunek ilości punktów krańcowych do gałęzi (Ryc.4.11 F), stosunek ilości rozgałęzień do gałęzi (Ryc.4.11 G) oraz dla średniej długości gałęzi (Ryc.4.11 I) nie odnotowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi liniami.

Podsumowując, główną z zaobserwowanych zmian jest mniejsza sieć mitochondrialna w komórkach pochodzących z późnych pasaży.




Ryc.4.11 *Wyniki analizy morfologii sieci mitochondrialnej.* A) Suma długości gałęzi, B) Całkowita objętość, C) Ilość oderwanych elementów od sieci mitochondrialnej, D) Mediana rozmiaru pojedynczego elementu, E) Rozmiar największego elementu sieci, F) Średnia sferyczność, G) Stosunek ilości punktów krańcowych do gałęzi, H) Stosunek ilości rozgałęzi do gałęzi i I) Średnia długość gałęzi. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z analizy co najmniej 20 komórek. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

4.7 Biogeneza mitochondriów

4.7.1 Poziom białek zaangażowanych w proces biogenezy

Biogenezę mitochondriów definiuje się, jako proces wzrostu masy mitochondriów i podziału już istniejących mitochondriów. Podczas procesu biogenezy następuje synteza białek i lipidów mitochondrialnych oraz dochodzi do replikacji mtDNA, co w konsekwencji może prowadzić do zwiększenia masy mitochondriów. W biogenezę mitochondriów zaangażowanych jest wiele czynników transkrypcyjnych oraz koaktywatorów transkrypcji.

Jednym z czynników transkrypcyjnych jest jądrowy czynnik oddechowy 1 (ang. *Nuclear respiratory factor 1, NRF1*), który reguluje transkrypcję genów kodujących białka mitochondrialne. Analiza Western blot nie wykazała różnic w poziomie NRF1 pomiędzy komórkami kontrolnymi a badanymi liniami (Ryc.4.12 A).

Jądrowy czynnik oddechowy 2 (ang. *Nuclear respiratory factor 2, NRF2*) reguluje transkrypcję genów kodujących białka mitochondrialne oraz białka antyoksydacyjne. W tym przypadku również nie odnotowano istotnych różnic w jego poziomie pomiędzy badanymi liniami (Ryc.4.12 B).

TFAM, czyli mitochondrialny czynnik transkrypcyjny A (ang. *Mitochondrial transcription factor A, TFAM*) indukuje transkrypcję mtDNA. Nie odnotowano statystycznie istotnych różnic pomiędzy badanymi liniami w poziomie TFAM, widoczna jest jednak tendencja wzrostowa w liniach TBH oraz liniach pochodzących z późnych pasaży (Ryc.4.12 C).

Białkiem uczestniczącym w procesie replikacji mtDNA jest mitochondrialna polimeraza gamma (ang. *Mitochondrial polymerase γ, POLG*).W poziomie tego białka nie odnotowano istotnych różnic pomiędzy badanymi liniami fibroblastów (Ryc.4.12 D), choć można zaobserwować malejącą tendencję.

Podsumowując nie zaobserwowano zmian w białkach uczestniczących w procesie biogenezy mitochondriów między badanymi liniami.

Zdjęcia membran z analizy Western blot zostały pokazane w drugiej części pracy na rycinach, gdzie zbadano wpływ daidzeiny.



Ryc.4.12 *Poziom białek zaangażowanych w proces biogenezy mitochondriów zbadany metodą Western blot.* A) Jądrowy czynnik transkrypcyjny 1 (NRF1) (n=5). B) Jądrowy czynnik transkrypcyjny 2 (NRF2) (n=6). C) Mitochondrialny czynnik transkrypcyjny A (TFAM) (n=4) oraz D) mitochondrialna polimeraza γ (POLG) (n=5). Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z co najmniej 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

4.7.2 Masa mitochondriów

Zmiany w masie mitochondriów są związane z zahamowaniem bądź aktywacją procesu biogenezy lub autofagii/mitofagii. Do oznaczenia masy mitochondriów wykorzystano sondę MitoTracker Green, która niezależnie od potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej akumuluje się w mitochondriach. W przypadku fibroblastów TBH odnotowano nieznaczny, ale statystycznie istotny wyższy poziom masy mitochondriów o $4\pm1\%$ w porównaniu do komórek kontrolnych. W komórkach

pochodzących z późnych oraz bardzo późnych pasaży zaobserwowano tendencję wzrostową w obrębie tego parametru (Ryc.4.13).



Ryc.4.13 *Masa mitochondriów* oznaczona przy użyciu sondy MitoTracker Green przy użyciu laserowego cytometru skaningowego. A) Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z 4 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001. B) Obraz pochodzący z LSC z widoczną fluorescencją sondy.

4.8 Autofagia/mitofagia

4.8.1 Poziom białek zaangażowanych w proces autofagii/mitofagii

Autofagia często jest nazywana procesem samodegradacji, podczas którego usuwane są m.in. dysfunkcyjne organella komórkowe. Przyczynia się to do utrzymania prawidłowego funkcjonowania komórek również w odpowiedzi na stres (Glick i in., 2010). Mitofagia jest selektywną formą autofagii, ukierunkowaną na uszkodzone, a zatem potencjalnie cytotoksyczne mitochondria.

Jednym z najlepiej zbadanych szlaków odpowiedzialnych za usuwanie uszkodzonych mitochondriów w komórkach ssaków jest szlak zależny od białek PINK1 (ang. *PTEN-induced kinase 1, PINK1*) i Parkin (ang. *E3 ubiquitin-protein ligase, Parkin*). Analiza Western blot nie wykazała istotnych różnic w poziomie tych białek pomiędzy liniami komórkowymi (Ryc.4.14 A i B).

Innym ważnym białkiem, które ma wpływ na regulację procesu autofagii jest Beklina 1 (ang. *Beclin1*). W poziomie tego białka nie odnotowano istotnych różnic pomiędzy badanymi liniami fibroblastów (Ryc. 4.14 C).

Zbadano poziom białka p62/SQSTM1 (ang. p62 sqstm1), który jest receptorem autofagii. W fibroblastach TBH zaobserwowano zmniejszenie poziomu białka o 24±16% w porównaniu do linii kontrolnej, a w fibroblastach z późnych pasaży jedynie tendencję malejącą (Ryc.4.14 D)

W proces tworzenia autofagosomów jest zaangażowane białko LC3 (ang. Microtubule-associated protein light chain 3), które ulega modyfikacji. Wzrost stężenia LC3-II jest uważany za wskaźnik procesu aktywacji autofagii. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w poziomie białka LC3 (suma formy LC3-I oraz formy LC3-II). Jednak odnotowano istotny statystycznie wzrost w stosunku ilościowym dwóch form zarówno dla komórek TBH o 56±34% oraz komórek pochodzących z późnych pasaży 63±25% w porównaniu do linii kontrolnej - komórek młodych (Ryc.4.14 E i F).

Podsumowując, zaobserwowane zmiany mogą świadczyć o aktywacji procesu autofagii/mitofagii.

Zdjęcia membran z analizy Western blot zostały pokazane w drugiej części pracy na rycinach, gdzie zbadano wpływ daidzeiny.





Kontrola

TBH

150%

100%

50%

0%

% kontroli







Ryc.4.14 *Poziom białek zaangażowanych w proces autofagii/mitofagii zbadany metodą Western blot.* A) PINK1 (n=3), B) Parkin (n=3), C) Beklina 1 (n=4), D) p62 (n=3), E) Suma LC3 (n=4) oraz F) Stosunek LC3 II/I (n=4). Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z co najmniej 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

4.8.2 Szybkość odnowy puli mitochondriów

Procesy biogenezy i auto/mitofagii determinują szybkość odnowy puli mitochondriów w komórce. Zaburzenie balansu pomiędzy tymi procesami wpływa na szybkość odnowy oraz wiek mitochondriów, a więc pośrednio także na ich funkcję. Do oceny wieku mitochondriów wykorzystano metodę MitoTimer, w której wyższy stosunek zielonej do czerwonej fluorescencji świadczy o szybszej odnowie puli mitochondriów. Analiza nie wykazała istotnych różnic pomiędzy liniami wygenerowanymi a linią kontrolną (Ryc.4.15). Wynik ten świadczy o braku zmian w puli "młodych" i "starych" mitochondriów w badanych liniach.

А





Ryc.4.15 *Szybkość odnowy puli mitochondriów zbadana przy użyciu metody MitoTimer*. A) Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z co najmniej 3 niezależnych doświadczeń (łącznie co najmniej 60 mitochondriów). Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001. B) Przykładowy obraz komórki z wyznakowanym białkiem zlokalizowanym w mitochondriach: czerwony odpowiada dojrzałemu, zaś zielony – świeżo zsyntetyzowanemu białku MitoTimer, kolor żółty pochodzi z nałożenia tych dwóch obrazów.

PODSUMOWANIE I CZĘŚCI:

Parametr	TBH	p18-25		
SA-β-galaktozydaza	-	1		
BrdU	-	-		
$\Delta \Psi$	-	-		
Ca ²⁺ cyt.	1	-		

Stres oksydacyjny:

Parametr	TBH	p18-25		
Poziom O ₂ •-	-	-		
Poziom H ₂ O ₂	1	1		
Poziom Cu/ZnSOD	-	-		
Poziom MnSOD	-	\downarrow		
Poziom Katalaza	\downarrow	\downarrow		
Poziom GPx	-	1		
Poziom GR	-	-		
OXYBLOT	\uparrow	-		

Biogeneza:

Parametr	TBH	p18-25		
Poziom Nrf1	-	-		
Poziom Nrf2	-	-		
Poziom TFAM	-	-		
Poziom POLG	-	-		
Masa mitochondriów	1	-		

Autofagia/mitofagia:

Parametr	TBH	p18-25		
Poziom PINK1	-	-		
Poziom Parkin	-	-		
Poziom Beklina 1	-	-		
Poziom p62	\downarrow	-		
Poziom sumy LC3	-	-		
LC3 II/I	1	1		
Szybkość odnowy puli	-	-		
mitochondriów				

Morfologia mitochondriów:

Parametr	TBH	p18-25		
Suma długości gałęzi	-	Ļ		
Średnia długość gałęzi	-	-		
Całkowita objętość	-	\downarrow		
,				
Średnia sferyczność	-	1		
Stosunek ilości punktów	-	-		
krancow yen/garęzi				
Stosunek ilości	-	-		
10zgaięzien/ gaięzi				
Ilość oderwanych	-	Ļ		
mitochondrialnej				
Mediana rozmiaru	-	-		
pojedynczego elementu				
Rozmiar największego	-	Ļ		
elementu sieci				

WPŁYW DAIDZEINY

4.9 Charakterystyka elektrochemiczna daidzeiny

Daidzeina jest fitozwiązkiem – polifenolem, który występuje w roślinach strączkowych głównie w soi. Stwierdzono, że flawonoidy i izoflawonoidy wykazują właściwości przeciwutleniające oraz wpływają na międzykomórkową gospodarkę redoks, ponieważ potrafią wchodzić w interakcje z niektórymi białkami czy kwasami nukleinowymi (Han i in., 2009).



Ryc.4.16 Wzór strukturalny daidzeiny.

Aby sprawdzić właściwości antyoksydacyjne daidzeiny wykorzystano technikę woltamperometrii cyklicznej (Materiały i Metody 3.15). W pracy zdecydowano się na wykorzystanie nośników umożliwiających lepszą dystrybucję ładunku (przewodnictwo) podczas pomiaru elektrochemicznego. Pierwszym wyborem było zastosowanie nanocząstek platyny (ang. Platinum Nanoparticles, nPt). Centra nPt stanowią przykład materiału elektrodowego zdolnego do indukowania procesów redukcji (obecność zaadsorbowanego wodoru monoatomowego przy potencjałach mniej dodatnich) lub utlenienia (obecność grup PtO i PtOH przy potencjałach bardziej dodatnich). Szereg substancji organicznych oraz nieorganicznych ulega adsopcji na powierzchni Pt i może blokować jej właściwości elektrokatalityczne. Drugim rodzajem nośnika były wielościenne nanorurki weglowe (ang. Multiwalled Carbon Nanotubes, MWCNTs), które stały się nanomateriałem powszechnie używanym do modyfikacji elektrod, w ostatnich latach, ze względu na dobre przewodnictwo oraz wysoką stabilność (Plekhanova i in., 2019). Układy zawierające MWCNTs są wykorzystywane do opracowania zaawansowanych materiałów kompozytowych i katalitycznych. Pomimo ich szerokich zastosowań komercyjnych i zwiększonej produkcji, potencjalny wpływ MWCNTs na środowisko nie jest w pełni zrozumiały – istnieją raporty, które sugerują, że mogą być toksyczne, ale również takie, które mówią o ich zastosowaniu biologicznym (Y. Zhao i in., 2011).

Zarejestrowano poniższe krzywe woltaperometryczne (Ryc.4.17).

А



Ryc.4.17 Woltamperogramy cykliczne zarejestrowane dla A) nPt i nPt z daidzeiną oraz B) MWCNTs i MWCNTs z daidzeiną w zakresie potencjałów od 0,6V do -0,6V w odtlenionym roztworze PBS. Szybkość zmian polaryzacji potencjału: 10 mV·s⁻¹

W obojętnym roztworze PBS linią przerywaną została zarejestrowana krzywa dla nPt, osadzonej na weglu szklistym, jako materiale elektrodowym. Można na niej wyróżnić następujące procesy elektrochemiczne: dwie pary pików pochodzące od redukcji zaadsorbowanego wodoru na powierzchni nanocząstek platyny obserwowane przy potencjale ok. -0,45 V oraz -0,30 V, a w rejonie dodatnich potencjałów obserwuje się sygnały pochodzące od utleniania platyny (0,1 V) oraz jej rozpuszczania (E>0,30 V), jak również, podczas ujemnej polaryzacji elektrody redukcję pierwotnie powstałego tlenku platyny (E>0,40 V). Po naniesieniu daidzeiny na warstwę nPt (linia fioletowa) zaobserwowano częściowe blokowanie powyżej wspomnianej powierzchniowej aktywności elechtrochemicznej nPt, 0 czym świadczy brak sygnałów charakterystycznych procesów redoks zachodzacych na powierzchni nPt. Oznacza to, że daidzeina hamuje procesy adsorpcji wodoru i utleniania na platynie. Przy dodatnich wartościach potencjału od 0,3 V zaobserwowano w obecności daidzeiny wzrost wartości prądowych, co sugeruje, że daidzeina może ulegać utlenieniu. Podobne zachowanie daidzeiny odnotowano przy użyciu nośników z MWCNTs. Po naniesieniu jej na warstwę MWCNTs również odnotowano gwałtowny wzrost prądu (E>0,30 V), przy potencjale nieco bardziej dodatnim niż w przypadku nPt (Ryc.17 A). Fakt, że daidzeina ulega utlenieniu na platynie przy potencjałach mniej dodatnich w porównaniu do zachowania się na nanorurkach weglowych, odzwierciedla działanie indukujące grup PtO i PtOH w procesach elektrochemicznych.

Kolejne krzywe zostały zarejestrowane w natlenionych (nasyconych tlenem) roztworach PBS. (Ryc. 4.18)



Ryc.4.18 Woltamperogramy cykliczne zarejestrowane dla MWCNTs i MWCNTs z daidzeiną w zakresie potencjałów od 0,6V do -0,8V w natlenionym roztworze PBS. Szybkość zmian polaryzacji potencjału: $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

Porównując wyniki zarejestrowane Ryc.4.18 w obecności i nieobecności tlenu Ryc.4.17, pojawienie się piku (fali) redukcyjnej na Ryc.4.18 po nasyceniu roztworu tlenem świadczy o pewnej aktywności katalitycznej daidzeiny w procesie elektroredukcji tlenu. Należy jednak pamiętać, że same nanorurki węglowe (najprawdopodobniej przez obecność śladowych ilości metali takich jak kobalt) wykazują też właściwości elektrokatalityczne wobec redukcji tlenu (krzywa pokazana na Ryc.4.18). Ponieważ proces redukcji tlenu (Ryc.4.18) zachodzi przy dość niskich potencjałach, należy spodziewać się, że obecność daidzeiny nie ma w tym przypadku istotnego znaczenia biochemicznego. Sugeruje to, że tlen może ulegać reakcji chemicznej bezpośrednio z daidzeiną (utleniać ją), a tym samym wykazuje, ona działanie antyoksydacyjne. Można spodziewać się, że redukcja tlenu w obecności daidzeiny ma charakter jednoetapowy (tzn. bezpośrednio do wody).

Nadtlenek wodoru w kontekście badań biologicznych jest cząsteczką sygnałową, jak również jedną z reaktywnych form tlenu. Jego wysoki poziom obecny w komórkach prowadzi do uszkodzeń oksydacyjnych białek, lipidów czy kwasów nukleinowych. Dlatego zbadano właściwości elektrochemiczne daidzeiny w obecności H₂O₂. Krzywe woltamperometryczne zostały zarejestrowane w odtlenionych roztworach PBS uzupełnionych o nadtlenek wodoru, tak aby stężenie H₂O₂ wynosiło 2mM (Ryc. 4.19).



Ryc.4.19 Woltamperogramy cykliczne zarejestrowane dla A) nPt i nPt z daidzeiną oraz B) MWCNTs i MWCNTs z daidzeiną w zakresie potencjałów od 0,6V do -0,6V w odtlenionym 2mM H₂O₂. Szybkość zmian polaryzacji potencjału: 10 mV·s⁻¹

W przypadku pierwszej zarejestrowanej krzywej różnica wartości prądowych pomiędzy nPt a nPt z daidziną jest niewielka, Porównują wyniki przedstawione na Ryc.419 A i Ryc.417 A można stwierdzić, że platyna zarówno w obecności jak i nieobecności warstwy daidzejny wykazuje właściwości elektrokatalityczne wobec nadtlenku wodoru. Obserwuje się utlenianie H₂O₂ przy potencjałach wyższych od 0,3V oraz redukcje H₂O₂ podczas polaryzacji w kierunku potencjałów ujemny (E<0.3V). Takie właściwości należy przypisać głównie platynie (obecność daidzeiny, nie odgrywa roli w procesie katalitycznym) Patra i współpracownicy wykazali, że sygnał redukcji H₂O₂ pojawia się przy potencjale -0,4V (Patra & Munichandraiah, 2009). W obecności Pt) Ryc.4.19 B można stwietdzić, że wykazuje właściwości daidzieny (bez antyoksydacyjne. Przy ujemnych wartościach potencjału zaobserwowano znaczne różnice w gęstościach prądowych pomiędzy MWCNTs a MWCNTs z daidzeiną. Może to świadczyć, że daidzeina inhibituje redukcję H₂O₂, czyli utrudnia działanie H₂O₂ jako jednego z utleniaczny odpowiedzialnych za stres oksydacyjny. Ten diagnostyczny pomiar woltamperometryczny przeprowadzony z wykorzystaniem nanorurek weglowych z i bez daidzeiny wyraźnie wskazuje na efekt inhibitujący wobec elektroredukcji H₂O₂.

W badaniach prowadzonych w niniejszej pracy wykorzystano wodoronadtlenek tert-butylu (TBH), jako substancję generującą stres oksydacyjny w fibroblastach. Substancja ta jest organicznym odpowiednikiem nadtlenku wodoru, jednak charakteryzuje się większą stabilnością w roztworach wodnych oraz pozwala na otrzymanie bardziej powtarzalnych wyników.



Ryc.4.20 Wzór strukturalny TBH.

Dlatego kolejne krzywe woltamperometryczne zostały zarejestrowane w odtlenionych roztworach PBS uzupełnionych o TBH, tak aby stężenie TBH wynosiło 2mM (Ryc. 4.21).





Ryc.4.21 Woltamperogramy cykliczne zarejestrowane dla A) nPt i nPt z daidzeiną oraz B) MWCNTs i MWCNTs z daidzeiną w zakresie potencjałów od 0,6V do -0,6V w odtlenionym 2mM TBH. Szybkość zmian polaryzacji potencjału: 10 mV·s⁻¹

Właściwości elektrokatalityczne platyny wobec H₂O₂ (Ryc.419A) zachowują się również wobec TBH (Ryc.4.21 A), który uznajemy za organiczny analog nadtlenku wodoru. Obserwuje się jednak pewne różnice w zachowaniu elektrokatalitycznym nPt po naniesieniu warstwy daidzeiny. W prawdzie proces redukcji TBH zaczyna się przy podobnym potencjale ok. 0,4V (zarówno w obecności i nieobecności daidzeiny), ale uzyskane prądy elektroredukcji TBH są zdecydowanie wyższe po wprowadzeniu daidzeiny do nośnika katalitycznego. Sugeruje to o możliwości istnienia oddziaływania o charakterze synergistycznym pomiędzy nPt i daidzeiną, co prowadzi do wzmocnienia efektu katalitycznego platyny. W przypadku zastosowania nanorurek weglowych jako bardziej interntych (w porównaniu do platyny) nośników daidzeiny, proces elektrokatalityczny redukcji TBH również obserwuje się, ale zachodzi on przy potencjałach bardziej ujemnych (E<0,1V). Sygnał ten pojawia się jako fala redukcyjna, natomiast w obecności daidzeiny sygnał redukcji TBH zanika. Świadczy to, że daidzeina wykazuje właściwości inhibitujące wobec redukcji TBH. W praktyce należy spodziewać się, że zdolności utleniające (np. w trakcie stresu oksydacyjnego) TBH (który utleniając sam się redukuje) będą osłabione w obecności daidzieny. Innymi słowy daidziena wydaje się wykazywać właściwości antyoksydacyjne.

MWCNTs i Dai

W celu określenia znaczenia sygnałów prądowych pochodzących od nośników dla daidzeiny zostały zarejestrowane kolejne krzywe woltamperometryczne dla samych warstw nPt i MWCNTs w odtlenionych roztworach PBS uzupełnionych o H₂O₂ i TBH, tak aby stężenie końcowe wynosiło 2mM (Rysc.4.22).



Ryc.4.22 Woltamperogramy cykliczne zarejestrowane dla A) nPt i MWCNTs w H_2O_2 oraz B) nPt i MWCNTs w TBH w zakresie potencjałów od 0,6 V do -0,6V. Szybkość zmian polaryzacji potencjału: 10 mV·s⁻¹

W obu przypadkach zaobserwowano, że to nanocząstki platyny (krzywe niebieskie) charakteryzują się silnymi właściwościami katalitycznych zarówno w redukcji i utleniania TBH oraz H₂O₂ w porównaniu do MWCNTs (krzywe czerwone). W przypadku MWCNTs (krzywe czerwone) nie stwierdzono znacznej aktywności elektrokatalitycznej. Oznacza to, że obecność daidzeiny jest czynnikiem dominującym i określającym jej właściwości elektrokatalityczne wobec elektroutleniania TBH. Z punku potencjalnego działania TBH, jako czynnika wywołującego stres oksydacyjny działanie daidzeiny należy interpretować w kategoriach inhibitowania redukcji TBH, podczas której mógłby wykazywać nieporządzanie właściwości utleniające jak np. peroksydacja lipidów czy utlenianie białek. Podobne właściwości inhibitujące daidzeiny zaobserwowano wobec powszechnie znanej reaktywnej formy tlenu, czyli nadtlenku wodoru. Należy jednak pamiętać, że obecność platyny (w przypadku pomiaru elektrochemicznego jako nośnika) zaczyna dominować właściwości elektrokatalityczne układu i osłabia lub wręcz niweluje działanie inhibitujące daidzeiny. Chcociaż nie było to przedmiotem badań w niniejszej pracy. Można zatem spodziewać się, że pojawienie się platyny nawet w ilościach śladowych będze sprzyjać istnieniu stresu komórkowego.

4.10 Charakterystyka badanych linii komórkowych – efekt daidzeiny

4.10.1 Dobór stężenia daidzeiny

Aby wybrać odpowiednie stężenia daidzeiny (z którą następnie w dalszej części pracy inkubowano fibroblasty) zastosowano test na proliferację. W badaniach wykorzystano niskie (fizjologiczne) stężenia. Zbadano wpływ daidzeiny w różnych stężeniach na prowadzone linie komórkowe. Średni czas podwojenia populacji komórek młodych wynosił 51±1 godzin, zaś po traktowaniu daidzeiną niezależnie od stężeń zaobserwowano tendencję wzrostową. W przypadku zastosowania 10pM stężenia daidzeiny zaobserwowano istotny statystycznie wzrost, a czas podwojenia populacji wynosił 77±11 godzin. Dla linii komórek TBH, zaobserwowano tendencję wzrostową w czasie podwojenia populacji po użyciu daidzeiny. W przypadku zastosowania 0,5 nM stężenia czas podwojenia populacji wynosił 63±3 godziny. Po zastosowaniu daidzeiny szybkość proliferacji komórek pochodzących z późnych pasaży nie uległa zmianom istotnym statystycznie (Ryc.4.23). Do dalszej części badań zdecydowano się na stężenia 0,1 i 0,5 nM, gdyż po ich zastosowaniu zaobserwowano zmiany w badanych liniach.

A





В

PDT - TBH







Ryc.4.23 *Wpływ daidzeiny na czas podwojenia populacji (PDT*). Czas podwojenia populacji wyliczono na podstawie liniowego fragmentu krzywej wzrostu komórek (rozdział 3.3). Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z 3 niezależnych doświadczeń: A) czas podwojenia populacji komórek młodych, B) czas podwojenia populacji komórek TBH oraz C) czas podwojenia populacji komórek pochodzących z późnych pasaży (p18-25). Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

4.10.2 Ocena intensywności podziałów komórkowych - test wbudowywania BrdU

Analiza wpływu daidzeiny na liczbę aktywnie proliferujących komórek nie wykazała różnic istotnych statystycznie pomiędzy badanymi liniami (Ryc.4.24).



Ryc.4.24 *Wpływ daidzeiny na odsetek aktywnie proliferujących komórek*. A) komórki młode, B) komórki traktowane TBH, C) komórki z późnych pasaży (p18-25). Odpowiednio KK oznacza komórki bez traktowania, 0,1D - 0,1 nM stężenie daidzeiny, 0,5D - 0,5 nM stężenie daidzeiny. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z 3 niezależnych doświadczeń, liczba ocenionych jąder komórkowych we wszystkich liniach wynosi co najmniej 1000 jąder w jednym doświadczeniu. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

4.10.3 Ocena liczby komórek o podwyższonym poziomie SA-β-GAL w populacji

W fibroblastach z wczesnych pasaży (młode) po traktowaniu 0,1 nM roztworem daidzeiny zaobserwowano istotny wzrost liczby komórek z podwyższoną aktywnością SA-β-GAL o 24±13%. W przypadku komórek TBH oraz komórek pochodzących z późnych pasaży po traktowaniu daidzeinią nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie (Ryc.4.25).



Ryc.4.25 *Wpływ daidzeiny na aktywność SA-β-galaktozydazy*. A) komórki młode, B) komórki TBH, C) komórki z późnych pasaży (p18-25). Odpowiednio KK oznacza komórki bez traktowania, 0,1D - 0,1 nM stężenie daidzeiny, 0,5D - 0,5 nM stężenie daidzeiny. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z 3 niezależnych doświadczeń, liczba ocenionych komórek we wszystkich liniach wynosi co najmniej 200 komórek. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

4.11 Charakterystyka fizjologii mitochondriów – efekt daidzeiny

4.11.1 Potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej

W młodych fibroblastach nie zaobserwowano zmian w $\Delta \Psi$ po traktowaniu daidzeiną. W przypadku fibroblastów TBH daidzeina spowodowała wzrost $\Delta \Psi$ w stężeniu odpowiednio 0,1 nM 4±2% oraz dla 0,5 nM 7±2% (Ryc 4.26).



Ryc.4.26 *Wpływ daidzeiny na potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej* oznaczony z wykorzystaniem sondy JC-1 przy użyciu laserowego cytometru skaningowego. A)

komórki młode, B) komórki TBH, C) komórki z późnych pasaży (p18-25). Odpowiednio KK oznacza komórki bez traktowania, 0,1D - 0,1 nM stężenie daidzeiny, 0,5D - 0,5 nM stężenie daidzeiny. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

4.11.2 Poziom jonów Ca2+ w komórce

Tylko w komórkach z późnych pasaży po traktowaniu 0,1 nM roztworem daidzeiny odnotowano istotne obniżenie poziomu Ca^{2+} 6±2% (n=3) w stosunku do komórek kontrolnych (Ryc.4.27).



Ryc.4.27 *Wpływ daidzeiny na poziom jonów Ca*²⁺ *w cytoplazmie* oznaczony z wykorzystaniem sondy Fluo4-AM przy użyciu laserowego cytometru skaningowego. A) komórki młode, B) komórki TBH, C) komórki z późnych pasaży (p18-25). Odpowiednio KK oznacza komórki bez traktowania, 0,1D - 0,1 nM stężenie daidzeiny, 0,5D - 0,5 nM stężenie daidzeiny. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

4.11.3 Poziom reaktywnych form tlenu (RFT) - efekt daidzeiny

W przypadku poziomu O_2^{-} nie odnotowano żadnych statycznie istotnych różnic w badanych liniach (Ryc.4.28).



Ryc.4.28 *Wpływ daidzeiny na poziom anionorodnika ponadtlenkowego w mitochondriach* oznaczony z wykorzystaniem sondy MitoSOX przy użyciu laserowego cytometru skaningowego. A) komórki młode, B) komórki TBH, C) komórki z późnych pasaży (p18-25). Odpowiednio KK oznacza komórki bez traktowania, 0,1D - 0,1 nM stężenie daidzeiny, 0,5D - 0,5 nM stężenie daidzeiny. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

W przypadku fibroblastów z wczesnych pasaży (młode) odnotowano istotne obniżenie poziomu nadtlenku wodoru o $3\pm1\%$ (n=3) po inkubacji daidzeiną w stężeniu 0,1 nM. W pozostałych badanych liniach fibroblastów, zaobserwowano tendencję do obniżenia poziomu H₂O₂ (Ryc. 4.29). Podsumowując, inkubacja z daidzeiną w zastosowanych stężeniach może nieznacznie obniżać poziom H₂O₂ w cytozolu.



Ryc.4.29 *Wpływ daidzeiny na poziom nadtlenku wodoru w cytoplazmie* oznaczony z wykorzystaniem sondy CM-H₂DCFDA przy użyciu laserowego cytometru skaningowego. A) komórki młode, B) komórki TBH, C) komórki z późnych pasaży (p18-25). Odpowiednio KK oznacza komórki bez traktowania, 0,1D - 0,1 nM stężenie daidzeiny, 0,5D - 0,5 nM stężenie daidzeiny.. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

4.11.4 Charakterystyka fizjologii mitochondriów - efekt daidzeiny TPP+

W tej części pracy zdecydowano się na wykorzystanie daidzeiny z TPP⁺. Zapis ten oznacza, że do cząsteczki daidzeiny został przyłączony kation trifenylofosfoniowy TPP⁺. Dzięki temu, że TPP⁺ jest nośnikiem dodatniego ładunku selektywnie kieruje daidzeinę do mitochondriów. Ze względu na niewielką ilość tej sondy daidzeiny TPP+ sprawdzono iei działanie, (jako potencjalnego kandydata 0 właściwościach antyoksydacyjnych skierowanego do mitochondriów) tylko do oceny stresu oksydacyjnego. Warto podkreślić fakt, że TPP⁺ w większym stężeniu przy długiej inkubacji wywołuje śmierć komórki. Dlatego w tej pracy zdecydowano się na użycie takich stężeń, jak w przypadku daidzeiny. W tym rozdziale także sprawdzono wpływ daidzeiny TPP⁺ na poziom RFT i podstawowych elementów charakteryzujących fizjologię mitochondriów w komórkach pochodzących z bardzo późnych pasaży p52-53 (tę linię stanowią komórki z bardzo późnego okresu starzenia). W przypadku poziomu O₂[•] nie odnotowano żadnych statycznie istotnych różnic w badanych liniach po traktowaniu 0,1 nM daidzeina TPP⁺ (Ryc. 4.30). Inkubacja z 0,5 nM stężeniem daidzeiny TPP⁺ spowodowała istotny wzrost poziomu anionorodnika ponadtlenkowego o 10±5% w fibroblastach TBH. W przypadku pozostałych linii nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie.





С













Ryc.4.30 *Wpływ daidzeiny TPP*⁺ *na poziom anionorodnika ponadtlenkowego w mitochondriach oznaczony z wykorzystaniem sondy MitoSOX przy użyciu laserowego cytometru skaningowego*. A) komórki młode, B) komórki TBH, C) komórki z późnych pasaży (p18-25), D) komórki z bardzo późnych pasaży (p52-53). Odpowiednio KK oznacza komórki bez traktowania, 0,1D - 0,1 nM stężenie daidzeiny, 0,5D - 0,5 nM stężenie daidzeiny. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Następnie zbadano poziomo H₂O₂. Inkubacja z 0,1 nM stężeniem daidzeiny TPP⁺ spowodowała wzrost poziomu nadtlenku wodoru w fibroblastach z wczesnych pasaży (młode) (wzrost o 15±6%) oraz dla fibroblastów z pasażu bardzo późnego p52-53 (wzrost o 18±11%) w porównaniu do linii kontrolnych (Ryc.4.31). Z kolei inkubacja z 0,5 nM stężeniem daidzeiny TPP⁺ spowodowała istotne obniżenie poziomu nadtlenku wodoru w fibroblastach TBH o 18± 5% oraz w fibroblastach z późnych pasaży p18-25 o 16±10%. W pozostałych liniach nie odnotowano różnic istotnych statystycznie. Podsumowując, inkubacja z daidzeiną TPP⁺ wykazuje zróżnicowany efekt na cytozolowy poziom nadtlenku wodoru w zależności od zastosowanego stężenia.



Ryc.4.31 *Wpływ daidzeiny TPP*⁺ na poziom nadtlenku wodoru w cytoplazmie oznaczony z wykorzystaniem sondy CM-H₂DCFDA przy użyciu laserowego cytometru skaningowego. A) komórki młode, B) komórki TBH, C) komórki z późnych pasaży (p18-25), D) komórki z bardzo późnych pasaży (p52-53). Odpowiednio KK oznacza komórki bez traktowania, 0,1D – 0,1 nM stężenie daidzeiny, 0,5D – 0,5 nM stężenie daidzeiny. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Zbadano wpływ daidzeiny TPP⁺ na masę mitochondriów. Istotne zmiany zostały zaobserwowane jedynie w linii komórek młodych, gdzie masa mitochondriów zmalała o 24±9% (Ryc.4.32).



Ryc.4.32 *Wpływ daidzeiny TPP*⁺ na masę mitochondriów oznaczony z wykorzystaniem sondy MitoTracek Green przy użyciu laserowego cytometru skaningowego. A) komórki młode, B) komórki TBH, C) komórki z późnych pasaży (p18-25). Odpowiednio KK oznacza komórki bez traktowania, 0,1D - 0,1 nM stężenie daidzeiny, 0,5D - 0,5 nM stężenie daidzeiny. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Inkubacja z daidzeiną TPP⁺ w stężeniu 0,5 nM spowodowała podniesienie poziomu Ca²⁺ zarówno w fibroblastach młodych o $37\pm20\%$ jak i tych z późnych pasaży o $56\pm32\%$ (Ryc.4.33).



Ryc.4.33 *Wpływ daidzeiny TPP*⁺ *na poziom jonów Ca*²⁺ *w cytoplazmie oznaczony z wykorzystaniem sondy Fluo4-AM przy użyciu laserowego cytometru skaningowego*. A) komórki młode, B) komórki TBH, C) komórki z późnych pasaży (p18-25). Odpowiednio KK oznacza komórki bez traktowania, 0,5D – 0,5 nM stężenie daidzeiny. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Inkubacja z daidzeiną TPP⁺ nie wpłynęła na potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej (Ryc.4.34).



Ryc.4.34 *Wpływ daidzeiny TPP*⁺ *na potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej oznaczony z wykorzystaniem sondy JC-1 przy użyciu laserowego cytometru skaningowego*. A) komórki młode, B) komórki TBH, C) komórki z późnych pasaży (p18-25). Odpowiednio KK oznacza komórki bez traktowania, 0,1D – 0,1 nM stężenie daidzeiny. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

4.12 Poziom enzymów antyoksydacyjnych – efekt daidzeiny

Jak już wcześniej wspomniano w proces usuwania reaktywnych form tlenu zaangażowane są enzymy antyoksydacyjne. Analiza Western blot wykazała, że poziom SOD1 w komórkach młodych po traktowaniu daidzeiną nie zmienił się. Natomiast w przypadku komórek TBH oraz komórek z późniejszych pasaży poziom SOD1 zmalał o odpowiednio 16±5% dla zastosowanej daidzeiny w stężeniu 0,5 nM oraz o 9±6% dla zastosowanej daidzeiny w stężeniu 0,1 nM (Ryc.4.35).



Ryc.4.35 *Wpływ daidzeiny na poziom SOD1*. A) komórki młode, B) komórki TBH, C) komórki z późnych pasaży (p18-25), D) obraz membrany. Odpowiednio KK oznacza komórki bez traktowania, 0,1D - 0,1 nM stężenie daidzeiny, 0,5D - 0,5 nM stężenie daidzeiny. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z co najmniej 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Poziom SOD2 po inkubacji z daidzeiną nie zmienił się zarówno w komórkach TBH oraz tych z późnych pasaży. W linii komórek młodych inkubacja z daidzeiną w stężeniu 0,1 nM spowodowała obniżenie poziomu enzymu o $19\pm4\%$, natomiast inkubacja z daidzeiną w stężeniu 0,5 nM spowodowała podwyższenie poziomu o $11\pm6\%$ (Ryc. 4.36).



		-	-	-	-	-		-	MnSOD – 22 kDa
М	0,1D	0,5D	TBH	0,1D	0,5D	PP	0,1D	0,5D	
-		-	-	-	-	-	-	-	GAPDH – 38 kDA

Ryc.4.36 *Wpływ daidzeiny na poziom SOD2*. A) komórki młode, B) komórki TBH, C) komórki z późnych pasaży (p18-25), D) obraz membrany. Odpowiednio KK oznacza komórki bez traktowania, 0,1D - 0,1 nM stężenie daidzeiny, 0,5D - 0,5 nM stężenie daidzeiny.Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z co najmniej 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Inkubacja z daidzeiną spowodowała wzrost poziomu katalazy w komórkach młodych, zmiany istotne statystycznie odnotowano po traktowaniu daidzeiną w stężeniu 0,1 nM o 20±14%. W fibroblastach TBH inkubacja z daidzeiną w stężeniu zarówno 0,1 nM jak i 0,5 nM spowodowała obniżenie poziomu o odpowiednio 21±14% i 18±12%. Natomiast w przypadku fibroblastów pochodzących z późnych pasaży inkubacja z daidzeiną nie wpłynęła na poziom tego białka (Ryc. 4.37).



Ryc.4.37 *Wpływ daidzeiny na poziom katalazy*. A) komórki młode, B) komórki TBH, C) komórki z późnych pasaży (p18-25), D) obraz membrany. Odpowiednio KK oznacza komórki bez traktowania, 0,1D - 0,1 nM stężenie daidzeiny, 0,5D - 0,5 nM stężenie daidzeiny. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z co najmniej 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Analiza Western blot wykazała, że poziom peroksydazy glutationowej (GPx) w komórkach młodych po traktowaniu daidzeiną w różnych stężeniach nie uległ zmianie. Traktowanie daidzieną w stężeniu 0,1 nM komórek TBH spowodował wzrost poziomu białka o $9\pm5\%$. Inkubacja z daidzeiną w stężeniu 0,5 nM spowodowała obniżenie poziomu w komórkach pochodzących z późniejszych pasaży o $9\pm3\%$ (Ryc. 4.38)



Ryc.4.38 *Wpływ daidzeiny na poziom peroksydazy glutationowej*. A) komórki młode, B) komórki TBH, C) komórki z późnych pasaży (p18-25), D) obraz membrany. Odpowiednio KK oznacza komórki bez traktowania, 0,1D - 0,1 nM stężenie daidzeiny, 0,5D - 0,5 nM stężenie daidzeiny. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z co najmniej 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Inkubacja z daidzeiną nie wpłynęła na poziom reduktazy glutationowej (GR) zarówno w komórkach pochodzących z niższych jak i z późnych pasaży. Jedynie w komórkach TBH traktowanie daidzeiną w stężeniu 0,1 nM spowodowało obniżenie poziomu tego białka o 23±6% (Ryc. 4.39).

Podsumowując, inkubacja z daidzeiną powoduje zmiany poziomu enzymów antyoksydacyjnych niezależnie od linii komórkowej oraz od zastosowanego stężenia.



Ryc.4.39 *Wpływ daidzeiny na poziom reduktazy glutationowej*. A) komórki młode, B) komórki TBH, C) komórki z późnych pasaży (p18-25), D) obraz membrany. Odpowiednio KK oznacza komórki bez traktowania, 0,1D - 0,1 nM stężenie daidzeiny, 0,5D - 0,5 nM stężenie daidzeiny. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z co najmniej 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

4.13 Poziom uszkodzeń oksydacyjnych białek – efekt daidzeiny

Inkubacja z daidzeiną w stężeniu 0,1 nM powoduje wzrost uszkodzeń oksydacyjnych w fibroblastach młodych o 56 \pm 18%. Natomiast inkubacja z daidzeiną w stężeniu 0,5 nM komórek TBH oraz z daidzeiną w stężeniu 0,1 nM komórek z późniejszych pasaży powoduje obniżenie poziomu o odpowiednio 29 \pm 10% i 13 \pm 5% (Ryc.4.40).





Ryc.4.40 *Wpływ daidzeiny na poziom uszkodzeń oksydacyjnych wyrażony stopniem karbonylacji*. A) komórki młode, B) komórki TBH, C) komórki z późnych pasaży (p18-25), D) obraz membrany. Odpowiednio KK oznacza komórki bez traktowania, 0,1D – 0,1 nM stężenie daidzeiny, 0,5D – 0,5 nM stężenie daidzeiny. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z co najmniej 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

4.14 Morfologia sieci mitochondrialnej – efekt daidzeiny

4.14.1 Architektura sieci mitochondrialnej

Aby określić wielkość sieci mitochondrialnej oceniono dwa parametry. Pierwszym parametrem, który pozwala określić rozmiar sieci jest **suma długości gałęzi**. W tym przypadku po traktowaniu daidzeiną (0,5 nM) istotny wzrost o 667,2 \pm 1026,9 odnotowano dla komórek z późnych pasaży (Ryc.4.41 C). Również inkubacja z daidzeiną w tym samym stężeniu (0,5 nM) spowodowała istotny wzrost o 242,3 \pm 485,9 w parametrze **całkowitej objętość** w linii fibroblastów pochodzących z późnych pasaży (Ryc.4.41 F).

Wielkość sieci mitochondrialnej



Ryc.4.41 *Wpływ daidzeiny na wielkość sieci mitochondrialnej*. A) i D) komórki młode, B) i E) komórki TBH, C) i F) komórki z późnych pasaży (p18-25). Odpowiednio KK oznacza komórki bez traktowania, 0,1D - 0,1 nM stężenie daidzeiny, 0,5D - 0,5 nM stężenie daidzeiny. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z co najmniej 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

W kolejnym etapie oceniono wpływ daidzeiny na stopień fragmentacji sieci mitochondrialnej. Inkubacja z daidzeiną w stężeniu 0,1 nM oraz 0,5 nM nie wpłynęła istotnie na ilość oderwanych elementów od sieci mitochondrialnej, medianę rozmiaru pojedynczego elementu sieci oraz na rozmiar największego elementu sieci w liniach (Ryc.4.42 A-I). Jedyne statystycznie istotne prowadzonych zmiany zaobserwowano w parametrze średniej sferyczności. Inkubacja z daidzeiną w stężeniu 0,1 nM spowodowała obniżenie tego parametru o 0,01±0,02 w młodych fibroblastach pierwotnych (Ryc.4.42 J). Dla fibroblastów TBH po traktowaniu daidzeiną nie odnotowano różnic istotnych statystycznie (Ryc.4.39 K). Z kolei inkubacja z daidzeiną fibroblastów z późnych pasaży spowodowała obniżenie poziomu tego parametru o odpowiednio dla 0,1 nM steżenia o 0,02±0,01 oraz dla 0,5 nM steżenia o 0,02±0,03 (Ryc.4.42 L).



Stopień fragemntacji sieci



0,5D



G



105



Ryc.4.42 *Wpływ daidzeiny na stopień fragmentacji sieci mitochondrialnej*. A), D), G) i J) komórki młode, B), E), H) i K) komórki TBH, C), F), I) i L) komórki z późnych pasaży (p18-25). Odpowiednio KK oznacza komórki bez traktowania, 0,1D - 0,1 nM stężenie daidzeiny, 0,5D - 0,5 nM stężenie daidzeiny. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z co najmniej 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

W ostatnim etapie oceniono wpływ daidzeiny na stopień rozgałęzienia sieci mitochondrialnej. Po inkubacja z daidzeiną nie odnotowano zmian w parametrze jakim jest **stosunek ilości punktów krańcowych do gałęzi** w prowadzonych liniach (Ryc.4.43 A-C). **Stosunek ilości rozgałęzień do gałęzi** po inkubacji z daidzeiną nie zmienił się w komórkach młodych oraz TBH. Natomiast przy zastosowaniu daidzeiny w stężeniu 0,1 nM zaobserwowano obniżenie tego parametru o 0,01±0,02 w fibroblastach z późnych pasaży (Ryc.4.43 F). Nie zaobserwowano zmian dla parametru średniej długości gałęzi po inkubacji daidzeiną w linii komórek młodych oraz TBH (Ryc.4.43 G i H). Pod wpływem inkubacji z daidzeiną w stężeniu 0,5nM w linii komórek pochodzących z późnych pasaży zaobserwowano obniżenie poziomu tego parametru o 0,37±0,23 (Ryc.4.43 I)

Analiza stopnia rozgałezienia sieci mitochondrialnej



106



Ryc.4.43 *Wpływ daidzeiny na stopień rozgałęzienia sieci mitochondrialnej*. A), D) i G) komórki młode, B), E) i H) komórki TBH, C), F) i I) komórki z późnych pasaży (p18-25). Odpowiednio KK oznacza komórki bez traktowania, 0,1D - 0,1 nM stężenie daidzeiny, 0,5D - 0,5 nM stężenie daidzeiny. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z co najmniej 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

Podsumowując, inkubacja z daidzeiną głównie wypływa na wielkość sieci mitochondrialnej komórek z późnych pasaży.

4.15 Biogeneza mitochondriów – efekt daidzeiny

Daidzeina może mieć istotny wpływ na proces biogenezy mitochondriów, ponieważ jest fitoestrogenem. Jej właściwości estrogenowe mogą wpływać na PGC-1- α , gdyż PGC-1- α oddziałuje z receptorami estrogenowymi wpływając na ekspresję genów jądrowych m.in. NRF1 i NRF2. Ze względu na bardzo niską detekcję białka PGC-1- α nie pokozano wyników. Prawdopodobnie w tym typie komórek poziom PGC-1- α jest bardzo niski.
4.15.1 Poziom białek zaangażowanych w proces biogenezy mitochondriów

Analiza Western blot białka TFAM wykazała, że traktowanie 0,5 nM stężeniem daidzeiny komórek młodych powoduje wzrost poziomu o 18±8%.W przypadku komórek TBH nie odnotowano różnic istotnych statystycznie. Natomiast inkubacja z daidzeiną (0,1 nM oraz 0,5 nM) spowodowała obniżenie poziomu tego białka o odpowiednio 18±9% i 19±11% w fibroblastach z późnych pasaży (Ryc.4.44).



Ryc.4.44 *Wpływ daidzeiny na poziom TFAM*. A) komórki młode, B) komórki TBH, C) komórki z późnych pasaży (p18-25), D) obraz membrany. Odpowiednio KK oznacza komórki bez traktowania, 0,1D - 0,1 nM stężenie daidzeiny, 0,5D - 0,5 nM stężenie daidzeiny. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z co najmniej 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Inkubacja z daidzeiną o różnych stężeniach nie wpłynęła na poziom mitochondrialnej polimerazy γ (POLG) w fibroblastach młodych, TBH oraz tych z późnych pasaży (Ryc.4.45).



Ryc.4.45 *Wpływ daidzeiny na poziom POLG*. A) komórki młode. B) komórki TBH, C) komórki z późnych pasaży (p18-25), D) obraz membrany. Odpowiednio KK oznacza komórki bez traktowania, 0,1D - 0,1 nM stężenie daidzeiny, 0,5D - 0,5 nM stężenie daidzeiny. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z co najmniej 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Inkubacja z daidzeiną nie wpłynęła na poziom jądrowego czynnika transkrypcyjnego 1 (NRF1) zarówno w komórkach młodych jak i z późnych pasaży. Jedynie w komórkach TBH traktowanie daidzeiną w stężeniu 0,5 nM spowodowało nieznaczny wzrost poziomu tego białka o 13±6% (Ryc.4.46).





Ryc.4.46 *Wpływ daidzeiny na poziom jądrowego czynnika transkrypcyjnego 1 (NRF1)*. A) komórki młode, B) komórki TBH, C) komórki z późnych pasaży (18-25), D) obraz membrany. Odpowiednio KK oznacza komórki bez traktowania, 0,1D - 0,1 nM stężenie daidzeiny, 0,5D - 0,5 nM stężenie daidzeiny. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z co najmniej 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Traktowanie daidzeiną zarówno w stężeniu 0,1 nM jak i 0,5 nM nie spowodowało zmian istotnych statystycznie w poziomie czynnika transkrypcyjnego 2 (NRF2) w prowadzonych liniach (Ryc.4.47)



Ryc.4.47 *Wpływ daidzeiny na poziom jądrowego czynnika transkrypcyjnego 2 (NRF2)*. A) komórki młode, B) komórki TBH, C) komórki z późnych pasaży (p18-25), D) obraz membrany. Odpowiednio KK oznacza komórki bez traktowania, 0,1D - 0,1 nM stężenie daidzeiny, 0,5D - 0,5 nM stężenie daidzeiny. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z co najmniej 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Podsumowując, inkubacja z daidzeiną nieznacznie wypływa na poziom białek zaangażowanych w proces biogenezy mitochondriów, jednak profil zmian różnił się w zależności od użytego stężenia oraz od badanej linii komórkowej.

4.15.2 Masa mitochondriów

Istotne zmiany zostały zaobserwowane jedynie w linii komórek z późnych pasaży, gdzie masa mitochondriów wzrosła o $4\pm1\%$ (Ryc. 4.48).



Ryc.4.48 *Wpływ daidzeiny na masę mitochondriów*. A) komórki młode, B) komórki traktowane TBH, C) komórki z późnych pasaży (p18-25). Odpowiednio KK oznacza komórki bez traktowania, 0,1D - 0,1 nM stężenie daidzeiny, 0,5D - 0,5 nM stężenie daidzeiny. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z co najmniej 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

4.16 Autofagia/mitofagia - efekt daidzeiny

4.16.1 Poziom białek zaangażowanych w proces autofagii/mitofagii

Inkubacja z daidzeiną w stężeniu 0,5 nM spowodowała wzrost poziomu białka PINK1 o 33±13% (Ryc. 4.49)





Ryc.4.49 *Wpływ daidzeiny na poziom PINK1*. A) komórki młode, B) komórki TBH, C) komórki z późnych pasaży (18-25), D) obraz membrany. Odpowiednio KK oznacza komórki bez traktowania, 0,1D - 0,1 nM stężenie daidzeiny, 0,5D - 0,5 nM stężenie daidzeiny. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z co najmniej 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Inkubacja z daidzeiną nie spowodowała zmian w poziomie białka Parkin w prowadzonych liniach komórkowych (Ryc.4.50).



Ryc.4.50 *Wpływ daidzeiny na poziom Parkin*. A) komórki młode, B) komórki TBH, C) komórki z późnych pasaży (p18-25), D) obraz membrany. Odpowiednio KK oznacza komórki bez traktowania, 0,1D - 0,1 nM stężenie daidzeiny, 0,5D - 0,5 nM stężenie daidzeiny. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z co najmniej 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Poziom białka Beklina 1 zmienił się jedynie w komórkach TBH po taktowaniu daidzeiną w stężeniu 0,1 nM, gdzie odnotowano istotny wzrost poziomu białka o 15±8% (Ryc. 4.51).



Ryc.4.51 *Wpływ daidzeiny na poziom Bekliny 1*. A) komórki młode, B) komórki TBH, C) komórki z późnych pasaży (p18-25), D) obraz membrany. Odpowiednio KK oznacza komórki bez traktowania, 0,1D - 0,1 nM stężenie daidzeiny, 0,5D - 0,5 nM stężenie daidzeiny. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z co najmniej 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

W linii komórek młodych po inkubacji z daidzeiną (0,5 nM) zaobserwowano istotne obniżenie poziomu białka p62 o $36\pm26\%$. W przypadku komórek TBH oraz z późnych pasaży inkubacja z daidzeiną nie spowodowała zmian (Ryc. 4.52).





Ryc.4.52 *Wpływ daidzeiny na poziom p62*. A) komórki młode, B) komórki TBH, C) komórki z późnych pasaży (p18-25), D) obraz membrany. Odpowiednio KK oznacza komórki bez traktowania, 0,1D - 0,1 nM stężenie daidzeiny, 0,5D - 0,5 nM stężenie daidzeiny. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z co najmniej 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Jedynie inkubacja z daidzeiną w stężeniu 0,1 nM wywołała obniżenie poziomu stosunku dwóch form białka LC3 (LC3-II/LC3-I) o 8±2% w komórkach pochodzących z późnych pasaży (Ryc. 4.53).



Ryc.4.53 *Wpływ daidzeiny na poziom stosunku formy LC3-II do LC3-I*. A) komórki młode, B) komórki TBH, C) komórki z późnych pasaży (p18-25), D) obraz membrany. Odpowiednio KK oznacza komórki bez traktowania, 0,1D - 0,1 nM stężenie daidzeiny, 0,5D - 0,5 nM stężenie daidzeiny. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z co najmniej 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Podsumowując, po inkubacji z daidzeiną zmiany w poziomie białek uczestniczących w procesie autofagii/mitofagii mogą świadczyć o aktywacji procesu autofagii/mitofagii.

4.16.2 Szybkość odnowy puli mitochondriów

Wykazano, że po inkubacji z daidzeiną stosunek intensywności fluorescencji barwy zielonej do czerwonej jest niższy o odpowiednio $10\pm5\%$ oraz $18\pm1\%$ po zastosowaniu stężeń 0,1 nM oraz 0,5 nM daidzeiny w linii komórek TBH. Z kolei dla fibroblastów pochodzących z późnych pasaży zaobserwowano taką samą tendencję, a istotne zmiany odnotowano po zastosowaniu daidzeiny w stężeniu 0,5 nM – obniżenie poziomu o $20\pm1\%$ (Ryc. 4.54).



Ryc.4.54 *Wpływ daidzeiny na szybkość odnowy puli mitochondriów zbadany przy użyciu wektora MitoTimer*. A) komórki młode, B) komórki TBH, C) komórki z późnych pasaży (p18-25). Odpowiednio KK oznacza komórki bez traktowania, 0,1D - 0,1 nM stężenie daidzeiny, 0,5D - 0,5 nM stężenie daidzeiny. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z co najmniej 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Podsumowując, wynik ten świadczy o tym, że po inkubacji z daidzeiną zdecydowana część populacji mitochondriów, w fibroblastach TBH oraz tych z późnych pasaży była starsza niż w kontrolach.

4.17 Właściwości estrogenowe – efekt daidzeiny

Daidzeina oprócz właściwości antyoksydacyjnych jest też fitoestrogenem, dlatego sprawdzono jak wpływa na poziom i aktywację receptora estrogenowego. Zaobserwowano, że w komórkach TBH oraz w komórkach pochodzących z późnych pasaży poziom receptoru estrogenowego α (ER α) był obniżony (bez różnic istotnych statystycznie) w porównaniu do komórek kontrolnych (Ryc.4.55 A). Inkubacja z daidzeiną nie spowodowała istotnych statystycznie zmian w przypadku linii komórek młodych oraz z późnych pasaży, jednak w tych z późnych pasaży można zaobserwować wzrostową tendencję w poziomie ER α (Ryc.4.55 D). Po traktowaniu daidzeiną (0,5 nM) fibroblastów TBH odnotowano wzrost poziomu badanego białka o 33±6% (Ryc.4.55 C).



Ryc.4.55 *Poziom receptora estrogenowego a zbadany metodą Western blot.* A) Linie wiodące (bez traktowania daidzeiną), B) Linia komórek młodych po traktowaniu daidzeiną (24h), C) Linia komórek z indukowanym TBH stresem oksydacyjnym po traktowaniu daidzeiną (24h), D) Linia komórek z późnych pasaży po traktowaniu daidzeiną (24h), E) obraz membrany. Odpowiednio KK oznacza komórki bez traktowania, 0,1D-0,1 nM stężenie daidzeiny, 0,5D-0,5 nM stężenie daidzeiny. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z co najmniej 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Fosforylacja receptora estrogenowego α (w pozycji Ser 118) funkcjonalnie pośredniczy w interakcji ER α z białkami koregulatorowymi, a tym samym powoduje jego aktywację (Anbalagan & Rowan, 2015). Analiza Western blot nie wykazała różnic istotnych statystycznie pomiędzy badanymi liniami fibroblastów, jak również inkubacja z daidzeiną nie wpłynęła na zmiany w poziomie ufosforylowanej formy tego białka (Ryc.4.56).



Ryc.4.56 *Poziom receptora estrogenowego a fosforylowany w pozycji Ser 118 zbadany metodą Western blot.* A) Linie wiodące (bez traktowania daidzeiną), B) Linia komórek młodych po traktowaniu daidzeiną (24h), C) Linia komórek z indukowanym TBH stresem oksydacyjnym po traktowaniu daidzeiną (24h), D) Linia komórek z późnych pasaży po traktowaniu daidzeiną (24h), E) obraz membrany. Odpowiednio KK oznacza komórki bez traktowania, 0,1D – 0,1 nM stężenie daidzeiny, 0,5D – 0,5 nM stężenie daidzeiny. Wyniki przedstawiają średnie wraz z odchyleniami standardowymi z co najmniej 3 niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną zbadano testem t-Studenta oraz oznaczono symbolami: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Podsumowując, inkubacja z daidzeiną wpływa jedynie na poziom receptora estrogenowego α w komórkach TBH.

Parametr	"młode"		TI	BH	p18-25	
	0,1D	0,5D	0,1D 0,5D		0,1D	0,5D
SA-β-GAL	1	-	-	-	-	-
BrdU	-	-	-	-	-	-
ΔΨ	-	-	1	1	-	-
Ca ²⁺ cyt.	-	-	-	-	\downarrow	-

PODSUMOWANIE II CZĘŚCI – EFEKT DAIDZEINY:

Stres oksydacyjny:

Parametr	"młode"		TI	BH	p18-25	
	0,1D	0,5D	0,1D	0,5D	0,1D	0,5D
Poziom O ₂ •-	-	-	-	-	-	-
Poziom	\rightarrow	-	-	-	-	-
H_2O_2						
Poziom	-	-	-	\downarrow	\downarrow	-
Cu/ZnSOD						
Poziom	\rightarrow	1	-	-	-	-
MnSOD						
Poziom	1	-	\downarrow	\downarrow	-	-
Katalazy						
Poziom GPx	-	-	1	-	-	\downarrow
Poziom	-	-	\downarrow	-	-	-
GRx						
OXYBLOT	1	-	-	\downarrow	\downarrow	-

	"mł	ode"	TBH		p18-25		p52-53	
Parametr	0,1D TPP+	0,5D TPP+	0,1D TPP+	0,5D TPP+	0,1D TPP+	0,5D TPP+	0,1D TPP+	0,5D TPP+
Poziom	-	-	-	1	-	-	-	-
O2*-								
Poziom	1	-	-	\downarrow	-	\downarrow	1	-
H_2O_2								
ΔΨ	-	Nie	-	Nie	-	Nie	Nie	Nie
		badano		badano		badano	badano	badano
Ca ²⁺ cyt.	Nie	1	Nie	-	Nie	1	Nie	Nie
	badano		badano		badano		badano	badano
masa mit.	Ļ	_	_	-	-	-	-	-

Morfologia mitochondriów:

Parametr	"młode"		TI	BH	p18-25	
	0,1D	0,5D	0,1D	0,5D	0,1D	0,5D
Suma długości	_	-	-	-	-	1
gałęzi						
Średnia długość	-	-	-	-	-	↓
gałęzi						
Całkowita objętość	-	-	-	-	-	1
Średnia	\rightarrow	-	-	-	↓	↓
sferyczność						
Stosunek ilości	_	-	-	-	-	-
punktów						
krańcowych/gałęzi						
Stosunek ilości	-	-	-	-	\downarrow	-
rozgałęzień/gałęzi						
Ilość oderwanych	-	-	-	-	-	-
elementów od sieci						
mitochondrialnej						
Mediana rozmiaru	-	-	-	-	-	-
pojedynczego						
elementu						
Rozmiar	-	-	-	-	-	-
największego						
elementu sieci						

Biogeneza:

Parametr	"młode"		TBH		p18-25	
	0,1D	0,5D	0,1D	0,5D	0,1D	0,5D
Poziom NRF1	-	-	-	1	-	-
Poziom NRF2	-	-	-	-	-	-
Poziom TFAM	-	1	-	-	\downarrow	\downarrow
Poziom POLG	-	-	-	-	-	-
Masa	-	-	-	-	1	-
mitochondriów						

Autofagia/mitofagia:

Parametr	"młode"		TI	BH	p18-25	
	0,1D	0,5D	0,1D	0,5D	0,1D	0,5D
Poziom PINK1	-	-	-	1	-	-
Poziom Parkin	-	-	-	-	-	-
Poziom	-	-	1	-	-	-
Beklina 1						
Poziom p62	-	\downarrow	-	-	-	-
Suma LC3	-	\downarrow	-	-	-	1
LC3 II/I	-	-	-	-	\downarrow	-
Szybkość	-	-	\downarrow	\downarrow	-	↓
odnowy puli						
mitochondriów						

5. DYSKUSJA

Mitochondria są wyspecjalizowanymi, wielofunkcyjnymi i dynamicznymi organellami, które pełnią istotną rolę w komórce. Przede wszystkim są głównym miejscem powstawania energii chemicznej (ATP), reaktywnych form tlenu i biorą udział w sygnalizacji komórkowej. Jedną ze ścieżek sygnalizacyjnych, która pozwala mitochondriom na przystosowanie się do obecnie panujących warunków energetycznych w komórce jest mitochondrialna wsteczna kaskada sygnałowa, czyli sygnalizacja mitochondria – jądro komórkowe – mitochondria. Celem pracy było sprawdzenie jak mitochondria adaptują się do warunków stresowych panujących w komórkach starzejących się, ale we wczesnym etapie starzenia.

5.1 Dobór i charakterystyka modelu badawczego

Ludzka skóra jest stale narażona na różnego rodzaju bodźce zewnętrzne jak i wewnętrzne, które wraz z wiekiem wpływają na jej funkcjonalność. Na poziomie komórkowym starzenie po raz pierwszy opisali Hayflick i Moorhead. Badacze wykazali, że ludzkie pierwotne fibroblasty mają ograniczoną zdolność do podziału (powszechnie określaną, jako limit Hayflicka), która wynika z braku utrzymania długości telomerów w procesie replikacji (Hayflick & Moorhead, 1961). Komórki tracą zdolność proliferacyjną, przez co nie dzielą się, są w stanie nieodwracalnego zatrzymania cyklu komórkowego (tzw. starzenie komórkowe lub replikacyjne) (Csekes & Račková, 2021). Wiadomo, że w "starych" fibroblastach gromadzą się pęknięcia podwójnej nici DNA, uszkodzenia oksydacyjne DNA, aberracje chromosomalne i epigenetyczne. Dodatkowo często poza skracaniem telomerów może dojść do ich uszkodzenia, a występujące błędy w mechanizmach naprawy DNA sa nierozłączną cechą starzenia. Ponadto zwłaszcza starzejące się fibroblasty tracą proteostazę w wyniku nieprawidłowej syntezy, fałdowania i degradacji białek wraz z nieprawidłowościami w modyfikacjach potranslacyjnych (Gruber i in., 2020). Fibroblasty skórne stanowią długowieczną populację komórek, w których dochodzi do ciągłej akumulacji uszkodzeń i adaptacji do nowo panujących warunków. Komórki te trudno się namnażają, a to skutkuje mniejszą zdolnością do usuwania zewnętrznych uszkodzeń. Większość zmian fenotypowych w zewnętrznej warstwie skóry starzejącej się jest związana z ich dysfunkcją i odpowiednią reorganizacją ECM (ang. Extracellular matrix, macierz zewnątrzkomórkowa). Dlatego na poziomie komórkowym fibroblasty skórne sa preferowanym modelem do badania procesów starzenia (Tigges i in., 2014). Brakuje jednak badań na temat jak zmienia się metabolizm mitochondriów we wczesnych etapach tego procesu. W pracy zbadano dwa rodzaje starzenia: indukowane stresem (przyspieszone starzenie) oraz starzenie replikacyjne.

Zwiększający się stres oksydacyjny jest powiązany z różnymi patologiami związanymi z wiekiem, a w tym z samym procesem starzenia. Warto przypomnieć, że głównym miejscem powstawania RFT w komórce są mitochondria a wraz ze starzeniem wzrasta produkcja RFT. Również z wiekiem poziom enzymów antyoksydacyjnych, (czyli podstawowa linia obrony przed RFT) ulega zmniejszeniu. Zdolność adaptacji mitochondriów do stresu oksydacyjnego także obniża się wraz z wiekiem (Kudryavtseva i in., 2016; H. Zhang i in., 2015). Brak balansu pomiędzy produkcją a usuwaniem RFT działa szkodliwie na komórki i zaburza fizjologiczne mechanizmy wskutek czego normalne procesy komórkowe są upośledzone. Zmiany spowodowane stresem oksydacyjnym obejmują m.in. metabolizm komórkowy, szlaki sygnałowe regulujące ekspresję genów, proliferację, różnicowanie i apoptozę komórek. Jedna z hipotez starzenia mówi, że nieprawidłowe funkcjonowanie mitochondriów podczas starzenia się (ang. *Senescence-Associated Mitochondrial Dysfunction, SAMD*) nasila i stymuluje procesy związane ze starzeniem, tak że komórki starzejące się przyczyniają się do dalszej dysfunkcji mitochondrialnej (Passos i in., 2010). Pomimo bliskiego współzależnego związku między starzeniem a SAMD, złożoność tych interakcji i ich rola pozostaje do wyjaśnienia (Korolchuk i in., 2017).

Jedną z najczęściej stosowanych substancji do doświadczalnego wywołania stresu oksydacyjnego czy też procesu starzenia się jest nadtlenek wodoru, który jest endogenną reaktywną formą tlenu. Przyczynia się do stresu oksydacyjnego bezpośrednio – jako utleniacz molekularny i pośrednio – poprzez generowanie wolnych rodników (Murphy & Friedman, 2019). W tej pracy do wywołania krótkotrwałego stresu oksydacyjnego zastosowano wodoronadtlenek tert-butylu (TBH), który stanowi organiczny odpowiednik nadtlenku wodoru. Nadtlenek organiczny TBH indukuje stres oksydacyjny poprzez szlaki rodników alkoksylowych i nadtlenowych. Dodatkowo może indukować stres oksydacyjny przez szlak peroksydazy glutationowej poprzez cytochrom P450. TBH jest powszechnie wykorzystywanym związkiem do badania wpływu stresu oksydacyjnego zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, ze względu na swoją większą stabilność w roztworze niż nadtlenek wodoru, co pozwala na utrzymanie stałego jego stężenia podczas badań (Jung i in., 2022).

Do badań prowadzonych w tej pracy wybrano stężenie 100 μ M TBH oraz czas inkubacji 30 minut, w celu wywołania krótkotrwałego stresu oksydacyjnego. Podobnie w badaniach na wyizolowanych fibroblastach z myszy Surf1- (brak białka odpowiedzialnego za składanie jednego z kompleksów łańcucha oddechowego) zastosowano 100 μ M TBH przez 30 min, aby sprawdzić czy są one bardziej odporne na stres egzogenny niż komórki myszy typu dzikiego (Pharaoh i in., 2016). W erytrocytach TBH w stężeniu już 5 μ M oraz czasie inkubacji 30 min powoduje wzrost RFT (Roy & Sil, 2012)

Wykorzystane w badaniach fibroblasty pochodziły od zdrowego dawcy, a komórki starzejące się były wyprowadzone z tej linii, stąd badane linie komórkowe posiadają takie samo tło genetyczne. Jako kontrole wykorzystano komórki młode z niskich pasaży (p5-10). Komórki z indukowanym starzeniem były traktowane TBH, (wywołano krótkotrwały stres oksydacyjny), był to nasz model wczesnego etapu starzenia wywołanego podwyższonym poziomem RFT. Komórki hodowane dłuższy czas czyli z wyższych pasaży (p18-25), traktowano jako komórki starzejące się replikacyjnie. W celach porównawczych w niektórych doświadczeniach wykonano też badania na komórkach pochodzących z bardzo późnych pasaży (p52-53) – komórki "stare" (po to, by porównać wczesny okres starzenia z późnym).

W pierwszym etapie proces starzenia w badanych liniach oceniono przez analizę proliferacji komórek. Jedynie w komórkach starzejących się replikacyjnie był widoczny nieznacznie podwyższony czas podwojenia populacji, co świadczy o obniżającej się zdolności proliferacyjnej komórek. Nassrally i in. wykazali, że w komórkach fibroblastów wraz ze wzrostem liczby pasaży zostaje utracona zdolność namnażania się komórek, ale także następuje wydłużenie czasu trwania cyklu komórkowego, z jednoczesnym spadkiem tempa, w jakim komórki wchodzą w fazę S (Nassrally i in., 2019). Kim i wsp. donoszą, że czas podwojenia populacji (PD) ludzkich diploidalnych fibroblastów (HDF) zaczyna rosnąć przy około ~PD40 i rośnie aż do ~ PD90, kiedy komórki wchodzą w starzenie komórkowe (Y. Kim i in., 2013; Ogrodnik, 2021). Zatem we wczesnym okresie starzenia nie ma jeszcze mocno widocznych zmian w tempie proliferacji komórek.

Zastosowano test na obecność SA-β-galaktozydazy, której aktywność jest jednym z markerów starzenia komórkowego. W obu typach komórek na wczesnym etapie starzenia odnotowano nieznaczny wzrost liczby komórek SA-β-GAL pozytywnych. Knaś i in. zbadali fibroblasty podlegające starzeniu replikacyjnemu i indukowanemu stresem oksydacyjnym przyspieszonym starzeniem wywołanym TBH w stężeniu 0,15mM w czasie 24 godzin i wykazali, że w każdym dniu hodowli komórkowej następował znaczny wzrost aktywności SA-β-GAL (Knaś i in., 2012), jednak należy zauważyć, że stres wywołany TBH był bardzo silny. Lago i wsp. porównali linie komórkowe ludzkich fibroblastów pierwotnych pochodzących od młodych dawców z wczesnych pasaży (p5) z późniejszych pasaży (p20), z młodych dawców z wczesnych pasaży (p5) poddanymi działaniu UVB oraz z fibroblastami pochodzącymi ze starszych dawców, ale we wczesnym pasażu (p5). Badanie wykazało, że fibroblasty od młodego zdrowego dawcy, komórki od starszego dawcy jak i te napromieniowanie światłem UVB charakteryzowały się wzrostem aktywności SA-β-galaktozydazy (jednocześnie stwierdzono obniżenie ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę kolagenu, za degradację macierzy pozakomórkowej oraz niektórych metaloproteinaz (Lago & Puzzi, 2019).

5.2 Charakterystyka mitochondriów we wczesnym okresie starzenia

Jedną z cech definiujących dysfunkcję mitochondriów jest zmniejszenie wartości potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej ($\Delta\Psi$). Potencjał na wewnętrznej błonie mitochondrialnej jest generowany w wyniku transportu elektronów poprzez kompleksy łańcucha oddechowego. Zarówno długotrwałe obniżenie, jak i wzrost $\Delta\Psi$ w stosunku do normalnego poziomu może prowadzić do uszkodzenia komórek oraz występować

w różnego rodzaju patologiach. Warto podkreślić, że $\Delta \Psi$ odgrywa kluczową rolę w selektywnej eliminacji dysfunkcyjnych mitochondriów poprzez ścieżkę PINK1/Parkin zależną, jak również jest ważny w procesie biogenezy mitochondriów. Wpływa też na produkcję reaktywnych form tlenu oraz zdolność buforowania jonów wapnia (Miwa i in., 2022; Zorov i in., 2014; Zorova i in., 2018). W badaniach przeprowadzonych w tej pracy, w fibroblastach traktowanych TBH oraz tych z późnych pasaży, nie odnotowano istotnych statystycznie zmian $\Delta \Psi$ w stosunku do kontroli (zaobserwowano jedynie zniżkową tendencję). Z kolei Passos i wsp. wykazali, że w fibroblastach (z linii MRC5) o cechach przedwczesnego starzenia wywołanego stresem, $\Delta \Psi$ był obniżony (Passos i in., 2010).

Jedną z istotnych funkcji, jaką pełnią mitochondria jest buforowanie Ca²⁺ w komórce. W warunkach fizjologicznych napływ Ca²⁺ do mitochondriów stymuluje metabolizm oksydacyjny poprzez modulacje aktywności dehydrogenaz i nośników metabolitów wrażliwych na Ca²⁺. Warto podkreślić, że napływ Ca²⁺ do mitochondriów wpływa na produkcję ATP oraz na powstawanie RFT (Marchi i in., 2018). W sytuacji, gdy wzrasta stężenie tych jonów w cytozolu, dochodzi do szybkiej akumulacji Ca²⁺ wewnątrz macierzy mitochondrialnej. W przypadku dysfunkcji mitochondriów związanej z obniżeniem $\Delta \Psi \operatorname{Ca}^{2+}$ nie jest buforowany przez mitochondria i zwiększa się jego stężenie w cytoplazmie. To może wpływać na wiele procesów komórkowych, ponieważ Ca²⁺ jest regulatorem wielu procesów fizjologicznych oraz cząsteczką sygnałową. W fibroblastach TBH poziom jonów wapnia w cytoplazmie był nieznacznie podwyższony. Taką samą tendencję zaobserwowano w fibroblastach pochodzących z późnych i bardzo późnych pasaży - w komórkach "starych", starzejących się replikacyjnie. Jednakże, nawet przy braku wyraźnych zmian w $\Delta \Psi$ zdolności buforowania Ca²⁺ przez mitochondria mogą być zmienione. Metodami, którymi posłużono się w tej pracy przy ocenie $\Delta \Psi$ czy Ca²⁺, nie jesteśmy w stanie wychwycić subtelnych zmian w poziomie tych czynników. Calvo-Rodriguez i in. udowodnili, że w starzejących się neuronach (komórkach, w których Ca^{2+} odgrywaja bardzo istotna role) zwiększone jest stężenie Ca²⁺ w cytozolu oraz zmieniona ekspresja kluczowych białek biorących udział w komórkowej homeostazie Ca²⁺ (Calvo-Rodriguez i in., 2020). Natomiast w komórkach HaCaT wyższy poziom Ca²⁺ był skorelowany z aktywnościa telomerazy. Autorzy sugerują, że aktywność telomerazy może być regulowana przez Ca^{2+} , co wiaże się ze starzeniem replikacyjnym (Farfariello i in., 2015). Mimo, że zmiany w poziomie Ca^{2+} są bardzo małe w przedstawionych w tej pracy modelach, to nie jest wykluczone, że wiaża sie one z subtelnymi zmianami w funkcjonowaniu mitochondriów.

Ponieważ jedną z cech starzenia komórkowego jest nadmiar RFT, to sprawdzono czy i jak zmienia się poziom RFT w badanych modelach wczesnego okresu starzenia. W komórkach traktowanych TBH oraz tych pochodzących z późnych pasaży zaobserwowano jedynie tendencję do podwyższonego poziomu anionordnika ponadtlenkowego O_2^{-} w mitochondriach, zaś w fibroblastach "starych" (p52-53), poziom mitochondrialnego O_2^{-} był znacznie podwyższony. Być może we wczesnym okresie starzenia system antyoksydacyjny, który zapobiega nagromadzaniu się RFT,

działa sprawnie. Harman pokazał, że powstający O_2^{\bullet} jest jednym z ważnych wyznaczników procesu starzenia, a nadprodukcja O_2^{\bullet} w starzejących się komórkach była powszechnie obserwowana (Afanas'ev, 2009).

W niniejszej pracy zbadano zatem poziom enzymów antyoksydacyjnych W przekształcanie anionorodonika ponadtlenkowego w badanych modelach. zaangażowane są dysmutazy ponadtlenkowe. Jedynie poziom enzymu SOD2, (który znajduje się w macierzy mitochondrialnej) w fibroblastach ulegających starzeniu replikacyjnemu był obniżony. Nie miało to jednak przełożenia na wzrost O_2^{-1} w mitochondriach w tych komórkach. Być może pomiary O₂⁻ w mitochondriach nie są tak precyzyjne, aby uchwycić ich zmiany, chociaż pomiary, które stosowano w tej pracy były prowadzone w warunkach in vivo i z wykorzystaniem dużej puli komórek. Wiadomo, że okres półtrwania O₂⁻ w mitochondriach jest bardzo krótki (Jaeschke, 2010). Guemouri i wsp. pokazali, że wraz z wiekiem obniża się poziom enzymów antyoksydacyjnych (Guemouri i in., 1991). Badania te dotyczyły jednak późniejszego etapu starzenia komórkowego, niż etap badany w niniejszej pracy. Kim i in. wykazali, że w fibroblastach z wywołanym H₂O₂ stresem oksydacyjnym poziom SOD2 obniża się (J.-S. Kim i in., 2018). Także Pansarasa i in. zaobserwowali, że całkowita aktywność SOD znacznie niższa w próbkach mięśni ludzkich pobranych od hospitalizowanych pacjentów w wieku 66-75 lat (Pansarasa i in., 1999). Wynik ten jest ciekawy, gdyż często mówiono, że aktywność SOD2 wzrasta do 65 roku życia, choć istnieją przypadki, w których odnotowano spadek SOD2 np. w związku z występowaniem chorób. Ponadto stwierdzono, że myszy z nokautem genu SOD2 lub GPx-1 wykazują zaburzenia neurologiczne i zwiększone uszkodzenia oksydacyjne, podobne do obserwowanych u pacjentów z chorobami mitochondrialnymi (Y. H. Wei i in., 2001). W niniejszej pracy zaobserwowano obniżenie poziomu katalazy (która jest odpowiedzialna za usuwanie H₂O₂ z komórek). Być może, dlatego w obu badanych liniach starzejących się fibroblastów poziom H₂O₂ jest znacząco podwyższony. Poziom nadtlenku wodoru koreluje z poziomem katalazy. Pokazano, że w fibroblastach wraz z wiekiem zmniejsza się poziom i aktywność katalazy (Y. H. Wei i in., 2001). Legakis i in. wykazali, że w fibroblastach (HDFs) ze wzrostem liczby pasaży aktywność katalazy zmniejsza się (Legakis i in., 2002). Badania na modelu mysim, w których porównano myszy z KOkatalazy oraz myszy typu dzikiego, dowodzą, że te pierwsze wykazywały cechy szybszego starzenia się (Dutta i in., 2022). Peroksydaza glutationowa (GPx) odgrywa kluczową rolę w redukcji lipidów oraz nadtlenków wodoru. W komórkach ulegających starzeniu replikacyjnemu zaobserwowano wzrost poziomu GPx. Podobne badania na komórkach mieśni szkieletowych C2C12 pokazały, że indukcja stresu oksydacyjnego poprzez dodanie nadtlenku wodoru prowadzi do nadekspresji GPx (L. Z.-H. Zhou i in., 2001). Inne badania pokazują, że przy przewlekłym stresie oksydacyjnym (podobnie jak w przypadku cukrzycy) można spodziewać się zwiekszonej aktywności GPx (Espinoza i in., 2008). My jednak nie badaliśmy aktywności tego enzymu. Badaliśmy natomiast poziom uszkodzeń oksydacyjnych w białkach (poziom karbonylacji białek). W komórkach z indukowanym stresem (TBH) poziom karbonylacji białek był wyższy.

Jest to zrozumiałe ponieważ, stres TBH powoduje stres oksydacyjny i koreluje z podwyższonym poziomem H_2O_2 i obniżeniem poziomu katalazy.

Sieć mitochondrialna jest dynamiczna i zmienia się tak, aby dopasować się do warunków panujących w komórce. Wpływ czynników wewnętrznych oraz zewnętrznych kształtuje odpowiedź mitochondriów na zadane bodźce, a wiadomo, że w warunkach stresowych sieć mitochondrialna ulega reorganizacji. Mitochondria wydłużają się w fazach G1/S, zapewniając w ten sposób wystarczającą ilość ATP potrzebną do procesu replikacji (Schrepfer & Scorrano, 2016). Z kolei w fazie G2/M ulegają fragmentacji, w celu zapewnienia równomiernej dystrybucji mitochondriów do komórek potomnych. Lee i in. zmniejszyli poziomy ekspresji białka hFis1, biorącego udział we fragmentacji sieci mitochondrialnej, w komórkach ssaków. Zaobserwowali, że skutkuje to większym odsetkiem komórek β-GAL pozytywnych oraz spowolnioną szybkością proliferacji, co sugeruje, że komórki przechodzą zmiany fenotypowe związane ze starzeniem. Badacze odnotowali też trwałe wydłużenie mitochondriów a komórki były powiększone, spłaszczone oraz o zwiększonej ziarnistości. Dane te wskazują, że długotrwałe wydłużenie mitochondriów indukuje zmiany fenotypowe związane ze starzeniem (S. Lee i in., 2007).

Na podstawie analiz organizacji sieci mitochondrialnej w komórce, oszacowano stopnień fragmentacji sieci mitochondrialnej, morfologie i kształt jej poszczególnych elementów. Taka ilościowa i jakościowa ocena morfologii jest jedynie możliwa przy użyciu odpowiednich programów komputerowych, gdyż w tym przypadku znalezienie różnic zauważalnych ludzkim okiem nie jest możliwe. Największe różnice zaobserwowano w kształcie i wielkości sieci mitochondrialnej w komórkach starzejących się replikacyjnie. Sieć mitochondrialna jest zdecydowanie mniej rozbudowana. Wykazano zmniejszoną ilość mitochondriów oderwanych od sieci, a oderwane elementy dodatkowo miały mniejszy rozmiar. Wynik ten może wskazywać na zaburzenia procesów dynamiki sieci mitochondrialnej (w tym fuzji i fragmentacji mitochondriów). Można zatem sugerować, że sieć mitochondrialna w komórkach starzejących się replikacyjnie jest mniej dynamiczna i nie potrafi się już tak sprawnie przystosować się do wymagań komórki. Inna możliwa interpretacja jest taka, że sięć ulega przeorganizowaniu, żeby zoptymalizować swoje działanie i nie dopuścić do śmierci komórki pomimo obecności stresu. Możliwe, że w długotrwałym stresie replikacyjnego starzenia przebudowa sieci świadczy o jej adaptacji. Warto podkreślić, że upośledzenia czy też dysfunkcje w procesie fragmentacji mitochondriów prowadzą do przerwania autofagii/mitofagii, a następnie do akumulacji dysfunkcyjnych organelli (Romanello, 2020). Li i wsp. wykazali, że w starzejących się mezenchymalnych komórkach macierzystych są nasilone właśnie procesy fuzji (X. Li i in., 2019). W niektórych stanach chorobowych np. u pacjentów z zespołem Blooma (ang. Bloom Syndrome, BS) mitochondria w fibroblastach były znacznie mniejsze, bardziej okragłe i mniej rozgałęzione niż mitochondria w komórkach kontrolnych (Subramanian i in., 2021), podobnie jak w naszych modelach.

W komórkach traktowanych TBH nie obserwowano zmian w organizacji sieci mitochondrialnej mimo tak silnego stresu. Być może nie był to wystarczający czas, aby sieć mitochondrialna zdążyła się przeorganizować, chociaż to wytłumaczenie wydaje się niedostateczne, ponieważ przy silnym stresie morfologia sieci mitochondrialnej może ulegać zmianom dość szybko.

Biogeneza mitochondrialna wymaga koordynacji genomu mitochondrialnego i genomu jądrowego, (bo 13 białek jest kodowanych przez genom mitochondrialny, a reszta czyli ok. 1000 białek przez genom jądrowy) (P. A. Li i in., 2017). Białko PGC-1- α jest koaktywatorem tego procesu, jednak w niniejszej pracy nie wykryto zmian w jego poziomie. Warto zaznaczyć, ze poziom tego białka w fibroblastach jest bardzo niski, w przeciwieństwie do komórek mięśniowych oraz nerwowych, czyli tam gdzie zapotrzebowanie energetyczne jest największe (Cantó & Auwerx, 2009). W niniejszej pracy wyników pomiaru poziomu PGC-1- α nie przedstawiono ze względu na bardzo słabą detekcję.

Za ekspresję jądrowych genów mitochondrialnych odpowiedzialne są czynniki transkrypcyjne NRF1 i NRF2. Czynnik transkrypcyjny TFAM indukuje transkrypcję i replikację mtDNA. W proces replikacji mtDNA też zaangażowane jest białko POLG. Zbadano poziom tych białek i nie odnotowano różnic istotnych statystycznie w porównaniu do kontroli, (możemy jedynie sugerować pewne tendencje np. w przypadku poziomu białka POLG malejącą, zaś w poziomie białka TFAM wzrostową).

Niższy poziom POLG może powodować zwiększoną produkcję RFT, co pokazał Delic i in. badając mysie fibroblasty z niedoborem POLG (Delic i in., 2018). Inna grupa badaczy wykazała, że niedobór POLG koreluje z akumulacjami mutacji w mtDNA i wykazuje cechy przyspieszonego starzenia (Kujoth i in., 2005). POLG odgrywa ważną rolę w utrzymaniu "zdrowej" puli mtDNA. Wiadomo, że nagromadzanie mutacji mtDNA jest jedną z cech starzenia poprzez dysfunkcyjne mitochondria. Pęknięcia w dwuniciowej kolistej cząsteczce mtDNA mogą skutkować tworzeniem liniowych fragmentów DNA, które ulegają szybkiej degradacji poprzez POLG. Gdy egzonukleaza POLG nie wykazuje aktywności to zostaje utrzymuje się poziom liniowych fragmentów mtDNA w mitochondriach, co prowadzi do zwiększonego poziomu mtDNA z delecjami. Zostało to wykryte u pacjentów z mutacjami *POLG* oraz powiązane z normalnym procesem starzenia (Nissanka i in., 2018). W bardzo wczesnym okresie starzenia nie ma istotnych różnic w poziomie POLG i też w związku z tym nie spodziewamy się zmian w mtDNA, chociaż nie można tego wykluczyć, bo nie zbadaliśmy aktywacji POLG ani mutacji w mtDNA.

Co do zaobserwowanej w tej pracy wzrostowej tendencji TFAM, także nie można się odnieść, jaki ma wpływ na replikacje i integralność mtDNA, a tym samym na proces biogenezy mitochondriów. Jednakże wiadomo, że niedobór TFAM może prowadzić do stresu mitochondrialnego i zmian w mtDNA, a tym samym może odgrywać rolę w procesie starzenia (Riley & Tait, 2020). Zespół Lee i in. porównali ludzkie diploidalne fibroblasty napletka (ang. foreskin human diploid fibroblasts, fs-HDF) i wykazali, że

komórki pochodzące z wyższych pasaży (gdzie czas podwojenia populacji wynosił ok 14 dni) charakteryzują się wzrostem poziomu białka TFAM w porównaniu z komórkami młodymi (Y. Y. Lee i in., 2020). W przedstawionym w tej pracy modelu wczesnego etapu starzenia replikacyjnego czas podwojenia populacji wynosi ok 2,5 dni, dlatego być może, nie zaobserwować zmian w poziomi TFAM i biogenezie mitochondriów.

Jedną z oznak aktywacji procesu biogenezy mitochondriów w komórce jest zwiększona masa mitochondrialna (Ding i in., 2021). Wzrost masy zaobserwowano jedynie w komórkach traktowanych TBH. Podobnie w ludzkich komórkach płuc MRC-5, znaleziono korelację wzrostu masy mitochondriów ze wzrostem stresu oksydacyjnego. Już niskie stężenia nadtlenku wodoru w młodych komórkach powodowały wzrost masy mitochondriów (podobnie jak w naszych starzejących się komórkach TBH) (H.-C. Lee i in., 2002). Można też sugerować, że we wczesnym okresie starzenia wywołanym TBH następuje bardzo szybka odpowiedź adaptacyjna wywołana nadmiernym poziomem RFT mimo braku zmian w poziomie czynników transkrypcyjnych biogenezy. Wtedy jest aktywowana wsteczna kaskada sygnałowa i w konsekwencji / w odpowiedzi na silny stres aktywowane są procesy biogenezy mitochondriów. Można też mieć watpliwości co do wyniku otrzymanego z pomiaru masy mitochondriów. Masa mitochondriów została zmierzona w warunkach in vivo za pomoca sondy MitoTracker Green poprzez pomiar średniej intensywności fluorescencji. Być może w komórkach traktowanych TBH mitochondria są nieco nabrzmiałe, stąd średnia intensywność fluorescencji jest wyższa i sugeruje wyższą masę mitochondriów. Jest to jednak tylko dywagacja. Dlatego w kolejnym etapie został zbadany proces autofagii/mitofagii, bo być może w komórkach TBH wzrost masy mitochondriów jest spowodowany tym, że mitochondria dysfunkcyjne nie są usuwane (czyli proces autofagii/mitofagii może być zahamowany).

Wiadomo, że w prawidłowo funkcjonującej komórce procesy biogenezy i mitofagii są w równowadze. Aby zapewnić pulę prawidłowo funkcjonujących mitochondriów i aby sprostać wymaganiom komórki mitochondria rozwinęły wiele systemów kontroli jakości (Pickles i in., 2018). Proces autofagii/mitofagii ma na celu, utrzymanie zdrowej i funkcjonalnej puli mitochondriów. Odgrywa to bardzo ważną rolę zarówno podczas rozwoju organizmu jak i w dojrzałym wieku, ale też w sytuacjach stresowych dla komórki (w tym dla mitochondriów). Jednym z głównych szlaków usuwania dysfunkcyjnych mitochondriów jest tzw. szlak PINK1/Parkin zależny. Sprawdzono poziom tych białek, ale nie zaobserwowano żadnych różnic istotnych statystycznie. Badanie tylko poziomu tych białek nie jest dostateczne, i aby stwierdzić czy proces autofagii/mitofagii jest wzmożony trzeba byłoby zbadać jeszcze inne ścieżki aktywujące te procesy oraz ocenić innymi metodami proces mitofagii. Zbadano również poziom białek, zaangażowanych w autofagię: nie są one specyficzne dla mitofagii, ale również uczestniczą w tym procesie.

Białko p62 bierze udział w różnych procesach komórkowych (np. regulacji metabolizmu) oraz odgrywa rolę w autofagii i szlakach sygnałowych, a według doniesień także w starzeniu się i patologiach związanych z wiekiem (Bitto i in., 2014). Poziom p62 był obniżony w fibroblastach traktowanych TBH. Uważa się, że poziom białka p62 jest

niższy w komórkach z aktywowaną autofagią, ponieważ po fuzji autofagosomów z lizosomami białko to ulega degradacji w procesie autofagii (Walczak i in., 2017; H. Wei i in., 2015). Bierze także udział w aktywnej mitofagii, bo położone jest na zewnętrznej błonie mitochondrialnej i w czasie fuzji mitochondriów poprzez autofagosom jest degradowane. Możemy jedynie sugerować, że niższy poziom białka p62 w komórkach traktowanych TBH świadczy o aktywacji procesu autofagii/mitofagii w tych komórkach. Co wiecej, w tych komórkach był też wyższy stosunek formy LC3 II/LC3I (oraz lekko podwyższony poziom Bekliny 1, choć nieistotnie statystycznie. Walczak i in. wykazali, że w komórkach z mutacją NARP (w ATPazie mitochondrialnej) oraz w komórkach Rho0 (w komórkach pozbawionych mtDNA), czyli z silnym i przewlekłym stresem też jest obniżony poziom białka p62 i podwyższony stosunek LC3-II/LC3-I. Oznacza to, że w bardzo silnym i przewlekłym/chronicznym stresie mitochondrialnym, proces autofagii/mitofagii jest aktywowany po to, by komórka mogła przeżyć. Autorzy sugerują, że prawdopodobnie jest to adaptacja mitochondriów, a proces ten jest zależny od działania wstecznej kaskady sygnałowej (Walczak i in., 2017). Rola p62/SQSTM1 w starzeniu się czy chorobach związanych z wiekiem nie jest jeszcze w pełni poznana. Kwon i in. porównywali myszy p62^{-/-}w różnym wieku. Myszy p62^{-/-} szybciej się starzały, przy czym obserwowano wzrost poziomu H₂O₂. Pokazano, że u myszy p62^{-/-} wraz z wiekiem, nasilały się dysfunkcje mitochondriów (Kwon i in., 2012). Być może krótkotrwały, ale silny stres oksydacyjny TBH spowodował obniżenie poziomu p62 z powodu uszkodzenia funkcjonowania mitochondriów i nadprodukcji H₂O₂ a nie aktywnego procesu autofagii/mitofagii.

Wzrost LC3-II/LC3-I w komórkach TBH oraz tych ulegających starzeniu replikacyjnemu, świadczy o aktywacji procesu autofagii/mitofagii. Young i in. wykazali, że w ludzkich fibroblastach diploidalnych, w których starzenie przyspieszone zostało indukowane onkogenem Ras, następował wzrost poziomu LC3-II. Autorzy postulują, że autofagia może pośredniczyć w procesie w starzenia (Young i in., 2009). Podobne wyniki uzyskali Goehe i wsp. na komórkach nowotworu piersi MCF-7 i komórkach raka okrężnicy HCT-116, sugerując, że oba procesy i autofagia i starzenie nasilają się w tym samym czasie. Jednak oba te procesy nie są współzależne, ponieważ starzenie może wystąpić, a autofagia nie będzie aktywowana (Goehe i in., 2012). Pernodet i in. zbadali, że w starzejących się normalnych fibroblastach ludzkiej skóry jest obserwowane znaczące zmniejszenie poziomu białka LC3-II w porównaniu z młodymi fibroblastami (Pernodet i in., 2016). Z kolei Kim i wsp. wykazali, że liczba autofagosomów na 1 μ m² powierzchni cytoplazmatycznej, ilość formy LC3-II oraz poziomy ekspresji innych genów modulujących autofagię (tj. BECN1, MAP1LC3B, ATG5, ATG7 i mTOR) nie różnił się między młodymi i starzejącymi się fibroblastami (H. Kim i in., 2018). Nie można definitywnie stwierdzić, że proces autofagii/mitofagii w modelach zastosowanych w tej pracy jest indukowany. Tym bardziej, że z analizy szybkości puli odnowy mitochondriów przy wykorzystaniu metody MitoTimer nie obserwowano różnic. Być może, zarówno proces usuwania dysfunkcyjnych mitochondriów (aufoagia/mitofagia) oraz proces powstawania nowych mitochondriów (biogeneza) są w tych komórkach w równowadze.

Przedstawione przez nas modele badawcze być może nie są doskonałe, gdyż mają swoje ograniczenia, by badać procesy we wczesnym okresie starzenia. Zaobserwowane zmiany w komórkach z indukowanym starzeniem przyspieszonym bardziej świadczą o występującym stresie oksydacyjnym ($Ca^{2+}\uparrow$, RFT \uparrow , poziom karbonylacji białek \uparrow), który jak wiadomo jest podłożem procesu starzenia się komórek i napędza ten proces. Warto jednak podkreślić fakt, że widać podobne analogie w obu rodzajach starzenia (RFT \uparrow , poziom karbonylacji białek \uparrow).

WPŁYW DAIDZEINY

Ciągle poszukuje się naturalnych substancji, które mogą przeciwdziałać starzeniu. Daidzeina, której działanie badaliśmy, poprzez swoją budowę może działać, jako przeciwutleniacz, jej właściwości antyoksydacyjne powodują zmniejszanie uszkodzeń oksydacyjnych i może też działać jako estrogen. Daidzeina jest stosowana, jako suplement. Działa przeciwzapalnie i wpływa na proces apoptozy, starzenia oraz wykazuje działanie przeciwnowotworowe (Alshehri i in., 2021). Badania wykazały, że spożywanie 63 mg daidzeiny dziennie przez 6 miesięcy powoduje poprawę czynności nerek u kobiet po menopauzie (Z. Liu i in., 2014), suplementacja 40-60 mg dziennie przez 12 tygodni zmniejsza uderzenia goraca u kobiet w okresie menopauzy (Khaodhiar i in., 2008). W dawce 200 mg/kg zwiększa liczbę żywotnych zarodków na wczesnym etapie ciąży świń (Xie i in., 2020). Jednak stosowanie fitoestrogenów, jako potencjalnych leków, ze względu na wcześniej wspominane właściwości, poza pozytywnym wpływem może wykazywać negatywne skutki dla życia komórki poprzez właściwości prooksydacyjne przy użyciu wysokiego stężenia. Chen i in. wykazali, że suplementacja daidzeina w wysokiej dawce 640mg/kg powoduje działanie prooksydacyjne w wątrobie i tkance tłuszczowej u świń (W. Chen i in., 2016). Kumar i Chauhan donoszą, że traktowanie daidzeiną w stężeniu 50 i 100 µM przez 30 i 60 minut powoduje "wybuch" (ang. Outburst) RFT w komórkach MCF-7 (Kumar & Chauhan, 2021), co indukuje apoptozę wraz z obniżeniem ER α/β . Dlatego w niniejszej pracy zdecydowano się na zastosowanie bardzo niskich stężeń daidzeiny. Daidzeina po spożyciu, nawet w bardzo wysokich stężeniach, ulega wielu przemianom metabolicznym w organizmie i jej stężenie w komórce – w fibroblaście może być już bardzo niskie. W większości badań stosuje się wysokie stężenia naturalnych substancji tak aby uzyskać silne efekty. Jednak stężenia znacznie powyżej stężeń fizjologicznych mogą wykazywać wręcz odwrotne efekty niż stężenia fizjologiczne. W tej pracy badano także daidzeinę skoniugowana z TPP⁺. Kation TPP⁺ jest dodatnio naładowanym atomem fosforu, który jest otoczony trzema grupami fenylowymi. Właściwości te powodują kierowanie hydrofobowymi skoniugowanej z TPP⁺ substancji do wnętrza mitochondriów (Battogtokh i in., 2018). Wiadomo jednak, że TPP⁺ w większych stężeniach powoduje dysfunkcje mitochondriów. Spośród dostępnych danych literaturowych nie ma żadnych badań odnośnie wpływu daidzeinv – TPP⁺ na funkcjonowanie mitochondriów. Istnieją jednak doniesienia, które pokazują że celowanie w mitochondria antyoksydantami skoniugowanymi z TPP⁺ np. MitoQ (koeanzym Q skoniugowany z TPP⁺) przynoszą pozywyne efekty w łagodzeniu stresu oksydacyjnego związanego ze starzeniem (Braakhuis i in., 2018).

5.3 Wpływ daidzeiny na funkcjonowanie mitochondriów

Daidzeina jako fitoestrogen posiada też właściwości estrogenowe, sprawdziliśmy jej wpływ na poziom i aktywację receptora estrogenowego α. Daidzeina spowodowała wzrost w poziomie ERa w komórkach starzejących się, ale nie nastąpił wzrost aktywacji ERa. Być może zastosowane stężenie było zbyt niskie do aktywacji tego receptora. Nie stwierdzono istotnego wpływu daidzeiny na proliferację fibroblastów czy liczbę komórek dzielących się. Daidzeina w wyższych stężeniach 200 nM, w komórkach H19-7/IgF-IR promowała proliferację, ale już przy zastosowaniu niższego stężenia, 20 nM, nie zaobserwowano tego efektu (Pan i in., 2012). W naszych badaniach daidzeina powodowała nieznaczny wzrost ilości komórek starych w linii komórek kontrolnych (z niższych pasaży). W badaniach z zastosowaniem innych fitoestrogenów czy też polifenoli w dużo wyższym stężeniu (nawet o kilka rzędów wyższe), pokazano, że fitoestrogen apigenina obniża ilość komórek starych w modelu ludzkich fibroblastów poddanych działaniu promieniowa UVA (Choi i in., 2016). Jeszcze inna grupa stwierdziła, że kurkumina (polifenol) zmniejsza aktywność SA-β-galaktozydazy w komórkach TM (ang. Trabecularmeshwork, TM: komórki siateczki beleczkowej w oku) z wywołanym stresem oksydacyjnym przez H₂O₂ (Lin & Wu, 2016). W tych pracach stosowano jednak stężenie polifenoli o kilka rzędów wielkości wyższe niż w niniejszej pracy.

Jednym z objawów świadczących o dysfunkcji mitochondriów w starzejących się komórkach jest zmniejszenie wartości potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej ($\Delta\Psi$) oraz wzrost poziomu Ca²⁺ w komórkach. Po inkubacji z daidzeiną zaobserwowano istotny wzrost $\Delta\Psi$ w komórkach TBH z wywołanym stresem oksydacyjnym. Tang i in., wykazali że traktowanie daidzeiną (w stężeniu 20, 40 i 80 µM) prowadzi do hiperpolaryzacji mitochondriów w komórkach raka żołądka (BGC-823) (Tang i in., 2013).

Z kolei w fibroblastach ulegających starzeniu replikacyjnemu poziom Ca^{2+} pod wpływem daidzeiny obniżył się. Warto zaznaczyć, że bez inkubacji z daidzeiną poziom Ca^{2+} w tych komórkach był wyższy niż w kontroli, (czyli w starzeniu nastąpił wzrost Ca^{2+}). Jing i in. wykazali że kwercetyna, która też jest fitoestrogenem powoduje obniżenie poziomu Ca^{2+} w komórkach H9c2 (Jing i in., 2016). Badacze twierdzą, że kwercetyna wykazuje ochronne działanie na pourazowe uszkodzenie serca, w którego mechanizmie pośredniczy zmniejszenie apoptozy komórek poprzez hamowanie stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego oraz osłabienie wewnątrzkomórkowej nadprodukcji Ca^{2+} w kardiomiocytach.

Nasze badania elektrochemiczne podkreślają fakt, że daidzeina posiada właściwości antyoksydacyjne. Ponadto wykazaliśmy, że daidzeina inhibituje redukcję H_2O_2 , czyli utrudnia działanie H_2O_2 jako jednego z utleniaczy odpowiedzialnych za stres oksydacyjny. Z badań na fibroblastach wynika, że daidzeina obniżyła poziom H_2O_2 jedynie w komórkach młodych (wczesny pasaż). Li i in., wykazali że daidzeina w stężeniu 40 μ M wywiera działanie ochronne przed stresem oksydacyjnym indukowanym przez H_2O_2 w komórkach IPEC-J2. Autorzy sugerują, że jej działanie może być związane z aktywacją szlaku sygnałowego Nrf2, który to ma wpływ na ekspresję genów enzymów oksydacyjnych (Y. Li i in., 2022).

Daidzeina TPP⁺ obniżyła poziom H₂O₂ w fibroblastach starzejących się (zarówno w fibroblastach TBH jak i p18-25). Z kolei w komórkach młodych (p5-10) jak i starych (p52-53) obserwowano nieznaczny wzrost cytozolowego H₂O₂. Pod wpływem daidzeiny TPP⁺ wzrósł także poziom mitochondrialnego O₂⁻⁻ w fibroblastach traktowanych TBH. Można też sugerować, że sama obecność daidzeiny TPP⁺, która bezpośrednio jest kierowana do mitochondriów może indukować powstawanie RFT w związku ze wzrostem $\Delta \Psi$. Można było oczekiwać, że wytworzony rodnik (Ryc.5.1) powinien być stabilizowany przez struktury rezonansowe (stabilny rodnik fenoksylowy, który nie powinien wtórnie generować rodników). Jednak w mitochondriach, gdzie lokalne stężenie wolnych rodników jest największe może powodować, że względnie stabilny rodnik fenoksylowy może wchodzić w interakcję z innymi rodnikami lub nierdonikowymi reaktywnymi formami tlenu, co może powodować wtórne generowanie anionorodnika ponadtlenkowego. Mechanizm ten jest jedynie spekulacją, a poznanie dokładnego podłoża obserwowanego efektu wymaga dodatkowych analiz. Wynik ten może wskazywać, że lokalizacja daidzieny ma kluczowe znaczenie dla komórki.



BDE = 332 kJ/molin water, B3LYP/6-311++G**

 $ref \ do \ BDE: \ https://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2013/cp/c3cp00095h$



Ryc.5.1 Struktury rezonansowe daidzeiny powstające w wyniku oderwania atomu wodoru z grupy OH.

Istnieją doniesienia pokazujące, że daidzeina podnosi poziom enzymów antyoksydacyjnych (Karale & Kamath, 2017; Y. Li i in., 2021; Q. Zhang i in., 2018), ale takie rezultaty uzyskano, gdy stosowano wyższe stężenie daidzeiny oraz badania były prowadzone na innych typach komórek, a nie na fibroblastach. Li i in. przedstawiają, że daidzeina zwiększa aktywność enzymów GPx i SOD (S.-L. Li i in., 2021). W niniejszej pracy w fibroblastach ulegających starzeniu replikacyjnemu odnotowano spadek w poziomie GPx po traktowaniu daidzeina. Jak już wcześniej wspomniano, po traktowaniu daidzeiną nie zaobserwowano, by poziom RFT wzrósł w porównaniu do linii kontrolnej. Warto podkreślić, że fitoestrogeny mogą wywierać bezpośrednie działanie przeciwutleniające, ale także pośrednie poprzez modulację układu systemu obrony antyoksydacyjnej. Katalaza też jest enzymem, który jest zaangażowany w usuwanie nadtlenku wodoru. W fibroblastach TBH daidzeina spowodowała obniżenie poziomu tego enzymu. Liu i in. donoszą, że daidzeina zmniejszała aktywność katalazy (J. Liu i in., 2023). W naszych badaniach jest możliwe, że daidzeina zadziałała jako cząsteczka przeciwutleniająca redukując w ten sposób nadmiar RFT (brak wzrostu cytozolowego H_2O_2 oraz mitochondrialnego O_2^{\bullet}). Daidzeina powodowała też zmiany w karbonylacji białek. Zarówno w linii komórek TBH jak również tych z późnych pasaży obniżył się poziom karbonylacji białek pod jej wpływem. Wynik ten może świadczyć że daidzeina w tak wczesnym starzeniu ma działanie przeciwutleniające, łagodząc w ten sposób stres komórkowy. W przypadku komórek "młodych" daidzeina spowodowała wzrost poziomu karbonylacji białek. Jak już wcześniej wspomniano, wynik ten jest bardzo zaskakujący. Być może, daidzeina konkuruje o miejsce wiążące, a tym samym odsłonięty rodnik determinuje proces karbonylacji, czego skutkiem jest wzrost poziomu uszkodzeń oksydacyjnych.Istnieją doniesienia, które wykazują, że estrogeny (estradiole, E2) inhibują katalityczne działanie MnSOD, przez co poziom O2⁻⁻ wzrasta (Lone i in., 2017).

Stres oksydacyjny towarzyszy komórkom już na wczesnym etapie starzenia. Można sugerować, że daidzeina już w bardzo niskich stężeniach wykazuje właściwości przeciwutleniające oraz modulujące system obrony antyoksydacyjnej. Być może też wykazuje działanie jako antyoksydant i estrogen, (regulując poziom enzymów antyoksydacyjnych). Warto jednak podkreślić, że istotna jest jej lokalizacja w komórce oraz stężenie.

Daidzeina ma wpływ na wielkość i kształt sieci mitochondrialnej. Zaobserwowano, że po traktowaniu daidzeiną komórek starzejących się replikacyjnie, uprzednio zmienione poprzez starzenie parametry (suma długości gałęzi, całkowita objętość czy średnia sferyczność) powróciły do wartości zbliżonych takich jak w komórkach kontrolnych. Zmiany morfologii sieci mitochondrialnej często odwierciedlają odpowiedź na stres, zatem uzyskany wynik może świadczyć o tym, że daidzeina poprawia funkcjonowanie mitochondriów, reorganizuje sieć w ten sposób, aby swoim rozmiarem i kształtem przypominały sieć mitochondrialna komórek prawidłowych pochodzących z wczesnych pasaży. Pokazano, że witamina E w fibroblastach NHFs z wywołanym krótkim stresem oksydacyjnym, też odwracała zmiany w morfologii mitochondriów (X. Wang i in., 2008).

Daidzeina poprzez swoje właściwości antyoksydacyjne jak i estrogenowe może mieć wpływ na biogenezę mitochondriów. Wiadomo, że ekspresja genów niektórych białek mitochondrialnych może być kontrolowana przez estrogeny. Daidzeina powoduje nieznaczny wzrost NRF1 w fibroblastach z indukowanym starzeniem. Yoshino i in. zbadali wpływ daidzeiny na biogenezę mitochondriów w komórkach C2C12. Badanie wykazało, że po traktowaniu 25-50 µM stężeniem daidzeiny przez 24 godziny obserwuje się wzrost ekspresji genów Tfam (Yoshino i in., 2015). Inne polifenole np. resweratrol w stężeniu 100 µM zwiększają ekspresję PGC-1a, NRF1 i Tfam u dorosłych samców szczurów (Chuang i in., 2019). Należy zauważyć, że zastosowane stężenia była kilka rzędów wyższe niż w naszych doświadczeniach. Poziom czynnika transkrypcyjnego TFAM pod wpływem daidzeiny wzrósł w fibroblastach "młodych", zaś w fibroblastach ulegających starzeniu replikacyjnemu obniżył się. Kwercetyna w stężeniu 2,5 µM także powoduje wzrost ekspresji Tfam w komórkach SH-SY5Y (Ho i in., 2022). Resweratrol prowadzi do takiego samego efektu (Q. Zhang i in., 2020). Uważa się, że poprzez zastosowanie antyoksydantów, proces biogenezy mitochondriów jest aktywowany na drodze zależnego od SIRT-1 szlaku sygnałowego PGC-1a/NRF1/TFAM (Q. Zhao i in.,

2020) lub bezpośrednio aktywacją SIRT-3, która reguluje stan acetylacji TFAM (Bagul i in., 2018).

Istnieje wiele doniesień, które mówia o wpływie antyoksydantów na proces autofagii/mitofagii. Na przykład kwercetyna przywraca aktywność autofagiczną w komórkach Schwanna oraz komórkach RSC96 zwiekszajac poziomy ekspresji białek Bekliny 1 i LC3 (Qu i in., 2014) czy też wpływa na aktywację procesu autofagii indukowanej przez SIRT1 (Costa i in., 2016). Z kolei resweratrol wykazuje działanie lecznicze przez wzmacnianie procesu mitofagii (pośredniczy w szlaku sygnałowym SIRT1 i PI3K/AKT/mTOR) (X. Yang i in., 2019). W naszych modelach daidzeina spowodowała nieznaczny wzrost poziomu białka PINK1 i Bekliny w komórkach jednak jednoznacznie stwierdzić, traktowanych TBH. Trudno że proces autofagii/mitofagii jest aktywowany w tych komórkach, gdyż tak wybiórcze zmiany są trudne do oceny. Użycie innych polifenoli w wyższych stężeniach powodowało aktywację tych procesów. Ma i in. zaobserwowali spadek w poziomie p62 pod wpływem mieszaniny związków składającą się z arctiny, daidzeiny, kwasu lukrecjowego i likwirytyny w komórkach NK-92MI zakażonych H3N2 (Ma i in., 2021). Resweratrol natomiast powoduje wzmożoną autofagię przez degradację p62 w komórkach raka płuc A549 (J. Zhang i in., 2015). Daidzeina spowodowała też częściowe zahamowanie autofagii chroniąc w ten sposób kardiomioblasty przed uszkodzeniami wywołanym przez doksorubicynę (J. Wu i in., 2023). Istnieją jednak doniesienia, które wskazują, że izoflawony sojowe mają wpływ na indukcję procesu mitofagii, o czym świadczy zwiększona ekspresja LC3-II (P. Li i in., 2021). Zastosowanie pochodnej daidzeiny również powoduje wzrost formy LC3-II (P.-S. Wu i in., 2020; W. Zhou i in., 2017). Dane uzyskane w niniejszej pracy wskazują, że po zastosowaniu daidzeiny synteza autofagosomów nie musi być nasilona, gdyż występuje zmniejszona ilość uszkodzonych organelli. Warto podkreślić fakt, że istnieje pewna korelacja między RFT a procesem autofagii. Istnieje kilka szlaków zależnych od RFT jak np.: RFT-FOXO3-LC3/BNIP3, RFT – HIF1 – BNIP3/NIX i RFT – TIGAR, których my nie zbadaliśmy. Nie ulega watpliwościom, że RFT mogą działać jako cząsteczki sygnalizujące, a tym samym mogą inicjować tworzenie autofagosomów (L. Li i in., 2015). Być może po inkubacji z daidzeiną w fibroblastach ulegających starzeniu replikacyjnemu, gdzie nastąpiło zmniejszenie poziomu H₂O₂, sygnał do aktywacji procesu autofagii nie był konieczny. Stąd dla tej linii i przy danym traktowaniu zaobserwowano obniżenie poziomu białka LC3-II/LC3-I. Wiadomo, że w prawidłowo funkcjonującej komórce proces autofagii/mitofagii i biogenezy jest w równowadze, więc szybkość odnowy puli mitochondriów jest na ustalonym poziomie. Inkubacja z daidzeina spowodowała zwiększenie puli "starych mitochondriów" dobrze funkcjonujących i nie usuwanych z komórki. Można sugerować, że daidzeina poprzez swoje właściwości antyoksydacyjne i estrogenowe, może poprawiać funkcjonowanie mitochondriów. jak Nie zaobserwowaliśmy aktywacji procesu biogenezy ani autofagii/mitofagii, czyli zachowana jest pula "starych mitochondriów", które prawdopodobnie po dobroczynnym działaniu daidzeiny, funkcjonują prawidłowo.

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

W niniejszej pracy wykorzystano pierwotne fibroblasty ludzkie do zbadania odpowiedzi mitochondriów na stres związany z wczesnymi etapami starzenia komórkowego. Zastosowano dwa modele odzwierciedlające różne mechanizmy starzenia:

- 1. Starzenie replikacyjne, związane ze skracaniem telomerów fibroblasty pochodzące z późniejszych etapów hodowli (długotrwały, łagodny stres).
- 2. Starzenie indukowane stresem oksydacyjnym. Zastosowano oksydant TBH, który był egzogennym dawcą RFT (krótkotrwały, silny stres).

W powyższych modelach scharakteryzowano funkcje mitochondriów oraz elementy odpowiedzi komórkowej na stres mitochondrialny. Badania te wykazały:

- wspólną cechą obu typów starzenia komórkowego jest podniesiony poziom RFT, następuje wzrost uszkodzeń oksydacyjnych białek oraz aktywacja procesu autofagii/mitofagii.
- <u>W silnym, lecz krótkotrwałym stresie oksydacyjnym (starzenie indukowane)</u> brak wyraźnych zmian odpowiedzi związanej z adaptacją mitochondriów do stresu.
- <u>W łagodnym, lecz długotrwałym stresie (starzenie replikacyjne)</u> zaobserwowano adaptację mitochondriów poprzez rearanżację sieci mitochondrialnej. Można sugerować, że mitochondria zaadaptowały się do chronicznego, łagodnego stresu także poprzez brak zmian w równowadze pomiędzy procesami biogenezy i usuwania mitochondriów.
- <u>W długotrwałym stresie (starzenie replikacyjne) w komórkach "starych" (p52-53)</u> zobserwowano znacznie większą liczbę komórek SA- β -GAL pozytywnych (w prówaniu do komórek z p18-25) oraz silny wzrost poziomu O₂[•] w mitochondriach.

Zbadano wpływ daidzeiny (związku o właściwościach estrogenowych i antyoksydacyjnych), która może mieć "dobroczynne" działanie na funkcjonowanie mitochondriów w procesie starzenia. Zaobserwowano zróżnicowane efekty działania daidzeiny w zależności od użytego modelu:

- W komórkach młodych daidzeina wydaje się mieć (nawet w bardzo niskich stężęniach) działanie prooksydacyjne, widoczne jako podniesienie poziomu H₂O₂ oraz uszkodzeń oksydacyjnych białek.
- W komórkach z indukowanym stresem przyspieszonym starzeniem, daidzeina wykazuje właściwości antyoksydacyjne, co zostało zaobserwowane poprzez zmniejszony poziom RFT oraz zmniejszony poziom uszkodzeń oksydacyjnych białek. Prawdopodobnie w ten sposób poprawia funkcjonowanie mitochondriów, stąd przewaga puli prawidłowych mitochondriów dłużej funkcjonujących w komórce (tzw. "starych").

 W łagodnym, długotrwałym stresie związanym ze starzeniem replikacyjnym daidzeina wykazuje właściwości antyoksydacyjne, co zostało zaobserwowane poprzez zmniejszony poziom RFT, zmniejszony poziom uszkodzeń oksydacyjnych białek oraz modyfikacje sieci mitochondrialnej.

Dodatkowo dla wybranych "parametrów mitochondrialnych" porównano działanie daidzeiny z daidzeiną skoniugowaną z kationem TPP⁺ (kierowaną bezpośrednio do mitochondriów).

Badania wykazały, że daidzeina TPP⁺ obniża poziom H₂O₂ w obu typach starzenia na wczesnym etapie, zaś w komórkach młodych oraz starych (p52-53) podnosi poziom H₂O₂. Ponadto, daidzeina TPP⁺ zwiększa cytozolowy poziom Ca²⁺ w komórkach młodych oraz starzejących się replikacyjnie. Badania także potwierdziły, że zastosowanie daidzeiny z TPP⁺ (w wybranych stężeniach) nie prowadzi do depolaryzacji mitochondriów, zatem bioenergetyka mitochondriów nie została zaburzona.

Wnioski ogólne:

- We wczesnych etapach starzenia, zarówno indukowanego jak i replikacyjnego, może następować indukcja wstecznej kaskady sygnałowej poprzez podniesiony poziom RFT i Ca²⁺ w komórce.
- W odpowiedzi na stres spowodowany starzeniem następuje adaptacja mitochondriów. Typ adaptacji jest różny dla rodzaju starzenia indukowanego i replikacyjnego.
- Daidzeina w obu typach starzenia ma pozytywny wpływ na funkcjonowanie mitochondriów.



Ryc.6.1 Podusmowanie – Adaptacja mitochondriów na drodze wstecznej kaskady sygnałowej w modelach wczesnego etapu starzenia.

7. BIBLIOGRAFIA

- Adebayo, M., Singh, S., Singh, A. P., & Dasgupta, S. (2021). Mitochondrial fusion and fission: The fine-tune balance for cellular homeostasis. *The FASEB Journal*, 35(6). https://doi.org/10.1096/fj.202100067R
- 2. Afanas'ev, I. (2009). Superoxide and nitric oxide in senescence and aging. *Frontiers in Bioscience*, *Volume*(14), 3899. https://doi.org/10.2741/3499
- Alshehri, M. M., Sharifi-Rad, J., Herrera-Bravo, J., Jara, E. L., Salazar, L. A., Kregiel, D., Uprety, Y., Akram, M., Iqbal, M., Martorell, M., Torrens-Mas, M., Pons, D. G., Daştan, S. D., Cruz-Martins, N., Ozdemir, F. A., Kumar, M., & Cho, W. C. (2021). Therapeutic Potential of Isoflavones with an Emphasis on Daidzein. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 1– 15. https://doi.org/10.1155/2021/6331630
- 4. Alster, O., & Korwek, Z. (2014). Znaczniki starzenia komórkowego. Postępy Biochemii.
- Amorim, J. A., Coppotelli, G., Rolo, A. P., Palmeira, C. M., Ross, J. M., & Sinclair, D. A. (2022). Mitochondrial and metabolic dysfunction in ageing and age-related diseases. *Nature Reviews Endocrinology*, 18(4), 243–258. https://doi.org/10.1038/s41574-021-00626-7
- Anbalagan, M., & Rowan, B. G. (2015). Estrogen receptor alpha phosphorylation and its functional impact in human breast cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 418, 264–272. https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.01.016
- Antropova, Y. G., Bryantsev, A. L., Kalinina, N. I., & II, O. P. (2002). Proliferative Activity and Expression of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p21WAF1 and p53 Protein in Endothelial Cells of Human Aorta during Replicative Aging in Vitro. 3. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, No. 1, 2002 BIOGERONTOLOGY; DOI: 10.1023/a:1020677209755
- Aryal, B., Denison, T. A., Gonzalez, Y., & Rao, V. A. (2014). Autophagy-Based Protein Biomarkers for In Vivo Detection of Cardiotoxicity in the Context of Cancer Therapy. W *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging* (s. 289– 307). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405529-2.00019-6
- 9. Bagul, P., Katare, P., Bugga, P., Dinda, A., & Banerjee, S. K. (2018). SIRT-3 Modulation by Resveratrol Improves Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Diabetic Heart through Deacetylation of TFAM. *Cells*, 7(12), 235. https://doi.org/10.3390/cells7120235
- 10. Bartnik, E., Tońska, K., & Rusecka, J. (2018). Choroby mitochondrialne, postęp w badaniu i leczeniu. *Postępy Biochemii*, 64(4), 300–303. https://doi.org/10.18388/pb.2018_143
- Battogtokh, G., Choi, Y. S., Kang, D. S., Park, S. J., Shim, M. S., Huh, K. M., Cho, Y.-Y., Lee, J. Y., Lee, H. S., & Kang, H. C. (2018). Mitochondria-targeting drug conjugates for cytotoxic, anti-oxidizing and sensing purposes: Current strategies and future perspectives. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 8(6), 862–880. https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.05.006
- Bhatti, J. S., Bhatti, G. K., & Reddy, P. H. (2017). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders—A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1863(5), 1066–1077. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.010
- 13. Bitto, A., Lerner, C. A., Nacarelli, T., Crowe, E., Torres, C., & Sell, C. (2014). P62/SQSTM1 at the interface of aging, autophagy, and disease. *AGE*, *36*(3), 9626. https://doi.org/10.1007/s11357-014-9626-3
- 14. Bottai, G., Mancina, R., Muratori, M., Di Gennaro, P., & Lotti, T. (2012). 17β-estradiol protects human skin fibroblasts and keratinocytes against oxidative damage: Oestrogens protect human skin against oxidative damage. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, no-no. https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2012.04697.x
- Braakhuis, A. J., Nagulan, R., & Somerville, V. (2018). The Effect of MitoQ on Aging-Related Biomarkers: A Systematic Review and Meta-Analysis. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2018, 1–12. https://doi.org/10.1155/2018/8575263
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 72, 248-254 (1976).
- 17. Branca, F., & Lorenzetti, S. (2005). Health Effects of Phytoestrogens. W I. Elmadfa (Red.), *Forum of Nutrition* (T. 57, s. 100–111). S. Karger AG. https://doi.org/10.1159/000083773
- Bratic, A., & Larsson, N.-G. (2013). The role of mitochondria in aging. *Journal of Clinical Investigation*, 123(3), 951–957. https://doi.org/10.1172/JCI64125
- 19. Calvo-Rodriguez, M., Hernando-Pérez, E., López-Vázquez, S., Núñez, J., Villalobos, C., & Núñez, L. (2020). Remodeling of Intracellular Ca2+ Homeostasis in Rat Hippocampal Neurons

Aged In Vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1549. https://doi.org/10.3390/ijms21041549

- Campisi, J., & d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(9), 729–740. https://doi.org/10.1038/nrm2233
- Cantó, C., & Auwerx, J. (2009). PGC-1α, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Current Opinion in Lipidology*, 20(2), 98–105. https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e328328d0a4
- 22. Chan, D. C. (2019). Mitochondrial Dynamics and Its Involvement in Disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2020. 15:235–59; https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis012419-032711
- 23. Chen, G., Kroemer, G., & Kepp, O. (2020). Mitophagy: An Emerging Role in Aging and Age-Associated Diseases. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*, 200. https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00200
- 24. Chen, H., Detmer, S. A., Ewald, A. J., Griffin, E. E., Fraser, S. E., & Chan, D. C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *Journal of Cell Biology*, 160(2), 189–200. https://doi.org/10.1083/jcb.200211046
- 25. Chen, W., Ma, X., Lin, Y., Xiong, Y., Zheng, C., Hu, Y., Yu, D., & Jiang, Z. (2016). Dietary supplementation with a high dose of daidzein enhances the antioxidant capacity in swine muscle but experts pro-oxidant function in liver and fat tissues. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 7(1), 43. https://doi.org/10.1186/s40104-016-0102-z
- Chmielewska, M., Skibińska, I., & Kotwicka, M. (2017). Mitochondria: Target organelles for estrogen action. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 71(1), 0–0. https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.3828
- Choi, S., Youn, J., Kim, K., Joo, D. H., Shin, S., Lee, J., Lee, H. K., An, I.-S., Kwon, S., Youn, H. J., Ahn, K. J., An, S., & Cha, H. J. (2016). Apigenin inhibits UVA-induced cytotoxicity in vitro and prevents signs of skin aging in vivo. *International Journal of Molecular Medicine*, 38(2), 627–634. https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2626
- Chuang, Y.-C., Chen, S.-D., Hsu, C.-Y., Chen, S.-F., Chen, N.-C., & Jou, S.-B. (2019). Resveratrol Promotes Mitochondrial Biogenesis and Protects against Seizure-Induced Neuronal Cell Damage in the Hippocampus Following Status Epilepticus by Activation of the PGC-1α Signaling Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 998. https://doi.org/10.3390/ijms20040998
- Chung, S., Kim, S.-H., Seo, Y., Kim, S.-K., & Lee, J. Y. (2017). Quantitative analysis of cell proliferation by a dye dilution assay: Application to cell lines and cocultures: Simultaneous Proliferation Analysis of Cocultured Cells. *Cytometry Part A*, 91(7), 704–712. https://doi.org/10.1002/cyto.a.23105
- Cossarizza, A., Baccaranicontri, M., Kalashnikova, G., & Franceschi, C. (1993). A New Method for the Cytofluorometric Analysis of Mitochondrial Membrane Potential Using the J-Aggregate Forming Lipophilic Cation 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine Iodide (JC-1). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 40–45; DOI: 10.1006/bbrc.1993.2438
- Costa, L. G., Garrick, J. M., Roquè, P. J., & Pellacani, C. (2016). Mechanisms of Neuroprotection by Quercetin: Counteracting Oxidative Stress and More. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016, 1–10. https://doi.org/10.1155/2016/2986796
- Couto, N., Wood, J., & Barber, J. (2016). The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homoeostasis network. *Free Radical Biology and Medicine*, 95, 27–42. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028
- Csekes, E., & Račková, L. (2021). Skin Aging, Cellular Senescence and Natural Polyphenols. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12641. https://doi.org/10.3390/ijms222312641
- Cui, H., Kong, Y., & Zhang, H. (2012). Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging. Journal of Signal Transduction, 2012, 1–13. https://doi.org/10.1155/2012/646354
- Curtin, J. F., Donovan, M., & Cotter, T. G. (2002). Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *Journal of Immunological Methods*, 265(1–2), 49–72. https://doi.org/10.1016/S0022-1759(02)00070-4
- Davis, R. E., & Williams, M. (2012). Mitochondrial Function and Dysfunction: An Update. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 342(3), 598–607. https://doi.org/10.1124/jpet.112.192104

- 37. Delic, V., Noble, K., Zivkovic, S., Phan, T.-A., Reynes, C., Zhang, Y., Phillips, O., Claybaker, C., Ta, Y., Dinh, V. B., Cruz, J., Prolla, T. A., & Bradshaw, P. C. (2018). The effects of AICAR and rapamycin on mitochondrial function in immortalized mitochondrial DNA mutator murine embryonic fibroblasts. *Biology Open*, bio.033852. https://doi.org/10.1242/bio.033852
- Ding, Q., Qi, Y., & Tsang, S.-Y. (2021). Mitochondrial Biogenesis, Mitochondrial Dynamics, and Mitophagy in the Maturation of Cardiomyocytes. *Cells*, 10(9), 2463. https://doi.org/10.3390/cells10092463
- Dorn, G. W. (2019). Evolving Concepts of Mitochondrial Dynamics. Annual Review of Physiology, 81(1), 1–17. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020518-114358
- 40. Drabik, K., Malińska, D., Duszyński, J., Szczepanowska, J. (2016). Mechanizmy transportu i dystrybucji mitochondriów w komórce. *Postępy Biochemii*.
- Driscoll, J. J., & Abdel Malek, M. (2015). Molecular Cross-Talk between the Autophagy and Apoptotic Networks in Cancer. W Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging (s. 51–64). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801033-4.00002-3
- 42. Dubal, D. B. (2001). Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(4), 1952–1957. https://doi.org/10.1073/pnas.041483198
- Dutta, R. K., Lee, J. N., Maharjan, Y., Park, C., Choe, S.-K., Ho, Y.-S., Kwon, H. M., & Park, R. (2022). Catalase-deficient mice induce aging faster through lysosomal dysfunction. *Cell Communication and Signaling*, 20(1), 192. https://doi.org/10.1186/s12964-022-00969-2
- Espinoza, S. E., Guo, H., Fedarko, N., DeZern, A., Fried, L. P., Xue, Q.-L., Leng, S., Beamer, B., & Walston, J. D. (2008). Glutathione Peroxidase Enzyme Activity in Aging. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 63(5), 505–509. https://doi.org/10.1093/gerona/63.5.505
- Farfariello, V., Iamshanova, O., Germain, E., Fliniaux, I., & Prevarskaya, N. (2015). Calcium homeostasis in cancer: A focus on senescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1853(9), 1974–1979. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.03.005
- Fernández-Vizarra, E., Enriquez, J. A., Pérez-Martos, A., Montoya, J., & Fernández-Silva, P. (2008). Mitochondrial gene expression is regulated at multiple levels and differentially in the heart and liver by thyroid hormones. *Current Genetics*, 54(1), 13–22. https://doi.org/10.1007/s00294-008-0194-x
- Ferree, A. W., Trudeau, K., Zik, E., Benador, I. Y., Twig, G., Gottlieb, R. A., & Shirihai, O. S. (2013). MitoTimer probe reveals the impact of autophagy, fusion, and motility on subcellular distribution of young and old mitochondrial protein and on relative mitochondrial protein age. *Autophagy*, 9(11), 1887–1896. https://doi.org/10.4161/auto.26503
- Filipović, B., Šošić-Jurjević, B., Ajdžanović, V., Brkić, D., Manojlović-Stojanoski, M., Milošević, V., & Sekulić, M. (2010). Daidzein administration positively affects thyroid C cells and bone structure in orchidectomized middle-aged rats. *Osteoporosis International*, 21(9), 1609–1616. https://doi.org/10.1007/s00198-009-1092-x
- Friedman, J. R., & Nunnari, J. (2014). Mitochondrial form and function. *Nature*, 505(7483), 335–343. https://doi.org/10.1038/nature12985
- Fuentes, N., & Silveyra, P. (2019). Estrogen receptor signaling mechanisms. W Advances in Protein Chemistry and Structural Biology (T. 116, s. 135–170). Elsevier. https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.01.001
- 51. Gao, A. W., Cantó, C., & Houtkooper, R. H. (2014). Mitochondrial response to nutrient availability and its role in metabolic disease. *EMBO Molecular Medicine*, 6(5), 580–589. https://doi.org/10.1002/emmm.201303782
- 52. Gao, X., Yu, X., Zhang, C., Wang, Y., Sun, Y., Sun, H., Zhang, H., Shi, Y., & He, X. (2022). Telomeres and Mitochondrial Metabolism: Implications for Cellular Senescence and Age-related Diseases. *Stem Cell Reviews and Reports*, 18(7), 2315–2327. https://doi.org/10.1007/s12015-022-10370-8
- 53. Garrel, C., Fowler, P. A., & Al-Gubory, K. H. (2010). Developmental changes in antioxidant enzymatic defences against oxidative stress in sheep placentomes. *Journal of Endocrinology*, 205(1), 107–116. https://doi.org/10.1677/JOE-09-0362
- Gee, K. R., Brown, K. A., Chen, W.-N. U., Bishop-Stewart, J., Gray, D., & Johnson, I. (2000). Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca2+-indicator dyes. *Cell Calcium*, 27(2), 97–106. https://doi.org/10.1054/ceca.1999.0095
- 55. Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy: Cellular and molecular mechanisms. *The Journal of Pathology*, 221(1), 3–12. https://doi.org/10.1002/path.2697

- Glorieux, C., & Calderon, P. B. (2017). Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biological Chemistry*, 398(10), 1095–1108. https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0131
- 57. Goehe, R. W., Di, X., Sharma, K., Bristol, M. L., Henderson, S. C., Valerie, K., Rodier, F., Davalos, A. R., & Gewirtz, D. A. (2012). The Autophagy-Senescence Connection in Chemotherapy: Must Tumor Cells (Self) Eat Before They Sleep? *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 343(3), 763–778. https://doi.org/10.1124/jpet.112.197590
- Gorman, G. S., Chinnery, P. F., DiMauro, S., Hirano, M., Koga, Y., McFarland, R., Suomalainen, A., Thorburn, D. R., Zeviani, M., & Turnbull, D. M. (2016). Mitochondrial diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(1), 16080. https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.80
- 59. Gottlieb, R. A., & Stotland, A. (2015). MitoTimer: A novel protein for monitoring mitochondrial turnover in the heart. *Journal of Molecular Medicine*, 93(3), 271–278. https://doi.org/10.1007/s00109-014-1230-6
- Grabowska, W., Sikora, E., & Bielak-Zmijewska, A. (2017). Sirtuins, a promising target in slowing down the ageing process. *Biogerontology*, 18(4), 447–476. https://doi.org/10.1007/s10522-017-9685-9
- Gruber, F., Kremslehner, C., Eckhart, L., & Tschachler, E. (2020). Cell aging and cellular senescence in skin aging—Recent advances in fibroblast and keratinocyte biology. *Experimental Gerontology*, 130, 110780. https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.110780
- 62. Guemouri, L., Artur, Y., Herbeth, B., Jeandel, C., Cuny, G., & Siest, G. (1991). Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clinical Chemistry*, *37*(11), 1932–1937; PMID: 1934468
- Han, R.-M., Tian, Y.-X., Liu, Y., Chen, C.-H., Ai, X.-C., Zhang, J.-P., & Skibsted, L. H. (2009). Comparison of Flavonoids and Isoflavonoids as Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3780–3785. https://doi.org/10.1021/jf803850p
- 64. Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3), 585–621. https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6
- Hernandez, G., Thornton, C., Stotland, A., Lui, D., Sin, J., Ramil, J., Magee, N., Andres, A., Quarato, G., Carreira, R. S., Sayen, M. R., Wolkowicz, R., & Gottlieb, R. A. (2013). MitoTimer: A novel tool for monitoring mitochondrial turnover. *Autophagy*, 9(11), 1852–1861. https://doi.org/10.4161/auto.26501
- 66. Hernandez, G., Zhao, L., Franke, A. A., Chen, Y.-L., Mack, W. J., Brinton, R. D., & Schneider, L. S. (2018). Pharmacokinetics and safety profile of single-dose administration of an estrogen receptor β-selective phytoestrogenic (phytoSERM) formulation in perimenopausal and postmenopausal women. *Menopause*, 25(2), 191–196. https://doi.org/10.1097/GME.00000000000984
- 67. Ho, C.-L., Kao, N.-J., Lin, C.-I., Cross, T.-W. L., & Lin, S.-H. (2022). Quercetin Increases Mitochondrial Biogenesis and Reduces Free Radicals in Neuronal SH-SY5Y Cells. *Nutrients*, 14(16), 3310. https://doi.org/10.3390/nu14163310
- Horinouchi, T., Nakagawa, H., Suzuki, T., Fukuhara, K., & Miyata, N. (2011). A novel mitochondria-localizing nitrobenzene derivative as a donor for photo-uncaging of nitric oxide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21(7), 2000–2002. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.02.027
- Ikeda, K., Horie-Inoue, K., & Inoue, S. (2019). Functions of estrogen and estrogen receptor signaling on skeletal muscle. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 191, 105375. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105375
- Itahana, K., Campisi, J., & Dimri, G. P. (2007). Methods to Detect Biomarkers of Cellular Senescence. W T. O. Tollefsbol (Red.), *Biological Aging* (T. 371, s. 21–31). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-361-5_3
- 71. Itoh, K., Ye, P., Matsumiya, T., Tanji, K., & Ozaki, T. (2015). Between the Keap1 Nrf2 system and mitochondria. J. Clin. Biochem. Nutr. vol. 56 no. 2 s. 91–97 https://doi.org/doi: 10.3164/jcbn.14-134
- Jaeschke, H. (2010). Antioxidant Defense Mechanisms. W Comprehensive Toxicology (s. 319– 337). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01012-5
- Jeandard, D., Smirnova, A., Tarassov, I., Barrey, E., Smirnov, A., & Entelis, N. (2019). Import of Non-Coding RNAs into Human Mitochondria: A Critical Review and Emerging Approaches. *Cells*, 8(3), 286. https://doi.org/10.3390/cells8030286
- 74. Jin, K. (2010). Modern Biological Theories of Aging. *Aging and Disease*, 1(2), 72–74. PMID: 21132086.

- Jing, Z., Wang, Z., Li, X., Li, X., Cao, T., Bi, Y., Zhou, J., Chen, X., Yu, D., Zhu, L., & Li, S. (2016). Protective Effect of Quercetin on Posttraumatic Cardiac Injury. *Scientific Reports*, 6(1), 30812. https://doi.org/10.1038/srep30812
- Joanny, F., Held, J., & Mordmüller, B. (2012). In Vitro Activity of Fluorescent Dyes against Asexual Blood Stages of Plasmodium falciparum. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 56(11), 5982–5985. https://doi.org/10.1128/AAC.00709-12
- 77. Jornayvaz, F. R., & Shulman, G. I. (2010). Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays in Biochemistry*, 47, 69–84. https://doi.org/10.1042/bse0470069
- Jung, W. K., Park, S.-B., Yu, H. Y., Kim, Y. H., & Kim, J. (2022). Effect of Esculetin on Tert-Butyl Hydroperoxide-Induced Oxidative Injury in Retinal Pigment Epithelial Cells In Vitro. *Molecules*, 27(24), 8970. https://doi.org/10.3390/molecules27248970
- 79. Karale, S., & Kamath, J. V. (2017). Effect of daidzein on cisplatin-induced hematotoxicity and hepatotoxicity in experimental rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 49(1), 49–54. https://doi.org/10.4103/0253-7613.201022
- Khaodhiar, L., Ricciotti, H. A., Li, L., Pan, W., Schickel, M., Zhou, J., & Blackburn, G. L. (2008). Daidzein-rich isoflavone aglycones are potentially effective in reducing hot flashes in menopausal women. *Menopause*, 15(1), 125–134. https://doi.org/10.1097/gme.0b013e31805c035b
- Kim, H., Park, S.-Y., Moon, S., Lee, J., & Kim, S. (2018). Autophagy in Human Skin Fibroblasts: Impact of Age. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2254. https://doi.org/10.3390/ijms19082254
- Kim, J.-S., Jeong, S.-H., Han, S.-H., & Yi, H.-K. (2018). Gomisin A modulates aging progress via mitochondrial biogenesis in human diploid fibroblast cells. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 45(6), 547–555. https://doi.org/10.1111/1440-1681.12914
- Kim, Y., Byun, H., Jee, B. A., Cho, H., Seo, Y., Kim, Y., Park, M. H., Chung, H., Woo, H. G., & Yoon, G. (2013). Implications of time-series gene expression profiles of replicative senescence. *Aging Cell*, 12(4), 622–634. https://doi.org/10.1111/acel.12087
- Knaś, M., Zalewska, A., Krętowski, R., Niczyporuk, M., Waszkiewicz, N., Cechowska-Pasko, M., Waszkiel, D., & Zwierz, K. (2012). The profile of lysosomal exoglycosidases in replicative and stress-induced senescence in early passage human fibroblasts. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 50(2), 220–227. https://doi.org/10.5603/FHC.2012.0031
- Korolchuk, V. I., Miwa, S., Carroll, B., & von Zglinicki, T. (2017). Mitochondria in Cell Senescence: Is Mitophagy the Weakest Link? *E Bio Medicine*, 21, 7–13. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.03.020
- Kruppa, A. J., & Buss, F. (2021). Motor proteins at the mitochondria–cytoskeleton interface. Journal of Cell Science, 134(7), jcs226084. https://doi.org/10.1242/jcs.226084
- Kudryavtseva, A. V., Krasnov, G. S., Dmitriev, A. A., Alekseev, B. Y., Kardymon, O. L., Sadritdinova, A. F., Fedorova, M. S., Pokrovsky, A. V., Melnikova, N. V., Kaprin, A. D., Moskalev, A. A., & Snezhkina, A. V. (2016). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget*, 7(29), 44879–44905. https://doi.org/10.18632/oncotarget.9821
- Kujoth, G. C., Hiona, A., Pugh, T. D., Someya, S., Panzer, K., Wohlgemuth, S. E., Hofer, T., Seo, A. Y., Sullivan, R., Jobling, W. A., Morrow, J. D., Van Remmen, H., Sedivy, J. M., Yamasoba, T., Tanokura, M., Weindruch, R., Leeuwenburgh, C., & Prolla, T. A. (2005). Mitochondrial DNA Mutations, Oxidative Stress, and Apoptosis in Mammalian Aging. *Science*, *309*(5733), 481–484. https://doi.org/10.1126/science.1112125
- Kumar, V., & Chauhan, S. (2021). Daidzein Induces Intrinsic Pathway of Apoptosis along with ER α/β Ratio Alteration and ROS Production. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 22(2), 603–610. https://doi.org/10.31557/APJCP.2021.22.2.603
- Kwon, J., Han, E., Bui, C., Shin, W., Lee, J., Lee, S., Choi, Y., Lee, A., Lee, K., Park, C., Obin, M. S., Park, S. K., Seo, Y. J., Oh, G. T., Lee, H., & Shin, J. (2012). Assurance of mitochondrial integrity and mammalian longevity by the p62–Keap1–Nrf2–Nqo1 cascade. *EMBO Reports*, 13(2), 150–156. https://doi.org/10.1038/embor.2011.246
- Lago, J. C., & Puzzi, M. B. (2019). The effect of aging in primary human dermal fibroblasts. *PLOS ONE*, 14(7), e0219165. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219165
- 92. Lee, H., & Yoon, Y. (2016). Mitochondrial fission and fusion. *Biochemical Society Transactions*, 44(6), 1725–1735. https://doi.org/10.1042/BST20160129
- Lee, H.-C., Yin, P.-H., Chi, C.-W., & Wei, Y.-H. (2002). Increase in mitochondrial mass in human fibroblasts under oxidative stress and during replicative cell senescence. *Journal of Biomedical Science*, 9(6), 517–526. https://doi.org/10.1007/BF02254978

- Lee, J. E., Westrate, L. M., Wu, H., Page, C., & Voeltz, G. K. (2016). Multiple dynamin family members collaborate to drive mitochondrial division. *Nature*, 540(7631), 139–143. https://doi.org/10.1038/nature20555
- 95. Lee, S., Jeong, S.-Y., Lim, W.-C., Kim, S., Park, Y.-Y., Sun, X., Youle, R. J., & Cho, H. (2007). Mitochondrial Fission and Fusion Mediators, hFis1 and OPA1, Modulate Cellular Senescence. *Journal of Biological Chemistry*, 282(31), 22977–22983. https://doi.org/10.1074/jbc.M700679200
- 96. Lee, Y. Y., Choi, Y. S., Kim, D. W., Cheong, J. Y., Song, K. Y., Ryu, M. S., & Lim, I. K. (2020). Mitochondrial nucleoid remodeling and biogenesis are regulated by the p53-p21WAF1-PKCζ pathway in p16INK4a-silenced cells. *Aging*, 12(8), 6700–6732. https://doi.org/10.18632/aging.103029
- Legakis, J. E., Koepke, J. I., Jedeszko, C., Barlaskar, F., Terlecky, L. J., Edwards, H. J., Walton, P. A., & Terlecky, S. R. (2002). Peroxisome Senescence in Human Fibroblasts. *Molecular Biology* of the Cell, 13(12), 4243–4255. https://doi.org/10.1091/mbc.e02-06-0322
- Lewis, M. T., Kasper, J. D., Bazil, J. N., Frisbee, J. C., & Wiseman, R. W. (2019). Quantification of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Metabolic Disease: Application to Type 2 Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), 5271. https://doi.org/10.3390/ijms20215271
- Li, L., Tan, J., Miao, Y., Lei, P., & Zhang, Q. (2015). ROS and Autophagy: Interactions and Molecular Regulatory Mechanisms. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 35(5), 615–621. https://doi.org/10.1007/s10571-015-0166-x
- 100.Li, P. A., Hou, X., & Hao, S. (2017). Mitochondrial biogenesis in neurodegeneration: Mitobiogenesis in Neurodegeneration. *Journal of Neuroscience Research*, 95(10), 2025–2029. https://doi.org/10.1002/jnr.24042
- 101.Li, P., Yao, L.-Y., Jiang, Y.-J., Wang, D.-D., Wang, T., Wu, Y.-P., Li, B.-X., & Li, X.-T. (2021). Soybean isoflavones protect SH-SY5Y neurons from atrazine-induced toxicity by activating mitophagy through stimulation of the BEX2/BNIP3/NIX pathway. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 227, 112886. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112886
- 102.Li, S.-L., Cao, R., Hu, X.-F., Xiong, P., Zhao, G.-Y., Xie, Y.-N., Wang, Z.-M., Li, Y.-K., Yang, B., & Yang, J. (2021). Daidzein ameliorated concanavalin A-induced liver injury through the Akt/GSK-3β/Nrf2 pathway in mice. *Annals of Translational Medicine*, 9(15), 1228–1228. https://doi.org/10.21037/atm-21-378
- 103.Li, X., Hong, Y., He, H., Jiang, G., You, W., Liang, X., Fu, Q., Han, S., Lian, Q., & Zhang, Y. (2019). FGF21 Mediates Mesenchymal Stem Cell Senescence via Regulation of Mitochondrial Dynamics. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1–13. https://doi.org/10.1155/2019/4915149
- 104.Li, Y., He, G., Chen, D., Yu, B., Yu, J., Zheng, P., Huang, Z., Luo, Y., Luo, J., Mao, X., Yan, H., & He, J. (2021). Supplementing daidzein in diets improves the reproductive performance, endocrine hormones and antioxidant capacity of multiparous sows. *Animal Nutrition*, 7(4), 1052– 1060. https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.09.002
- 105.Li, Y., Jiang, X., Cai, L., Zhang, Y., Ding, H., Yin, J., & Li, X. (2022). Effects of daidzein on antioxidant capacity in weaned pigs and IPEC-J2 cells. *Animal Nutrition*, 11, 48–59. https://doi.org/10.1016/j.aninu.2022.06.014
- 106.Lin, C., & Wu, X. (2016). Curcumin Protects Trabecular Meshwork Cells From Oxidative Stress. Investigative Opthalmology & Visual Science, 57(10), 4327. https://doi.org/10.1167/iovs.16-19883
- 107.Liu, J., Fu, Y., Zhou, S., Zhao, P., Zhao, J., Yang, Q., Wu, H., Ding, M., & Li, Y. (2023). Comparison of the effect of quercetin and daidzein on production performance, anti-oxidation, hormones, and cecal microflora in laying hens during the late laying period. *Poultry Science*, 102(6), 102674. https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102674
- 108.Liu, Y. J., McIntyre, R. L., Janssens, G. E., & Houtkooper, R. H. (2020). Mitochondrial fission and fusion: A dynamic role in aging and potential target for age-related disease. *Mechanisms of Ageing and Development*, 186, 111212. https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111212
- 109.Liu, Z., Ho, S. C., Chen, Y., Tang, N., & Woo, J. (2014). Effect of whole soy and purified isoflavone daidzein on renal function—A 6-month randomized controlled trial in equol-producing postmenopausal women with prehypertension. *Clinical Biochemistry*, 47(13–14), 1250–1256. https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.05.054
- 110.Lone, M.-U.-D., Baghel, K. S., Kanchan, R. K., Shrivastava, R., Malik, S. A., Tewari, B. N., Tripathi, C., Negi, M. P. S., Garg, V. K., Sharma, M., Bhatt, M. L. B., & Bhadauria, S. (2017). Physical interaction of estrogen receptor with MnSOD: Implication in mitochondrial O2.–
upregulation and mTORC2 potentiation in estrogen-responsive breast cancer cells. Oncogene, 36(13), 1829–1839. https://doi.org/10.1038/onc.2016.346

- 111.Lu, H., Jia, C., Wu, D., Jin, H., Lin, Z., Pan, J., Li, X., & Wang, W. (2021). Fibroblast growth factor 21 (FGF21) alleviates senescence, apoptosis, and extracellular matrix degradation in osteoarthritis via the SIRT1-mTOR signaling pathway. *Cell Death & Disease*, *12*(10), 865. https://doi.org/10.1038/s41419-021-04157-x
- 112.Luis-García, E. R., Becerril, C., Salgado-Aguayo, A., Aparicio-Trejo, O. E., Romero, Y., Flores-Soto, E., Mendoza-Milla, C., Montaño, M., Chagoya, V., Pedraza-Chaverri, J., El Hafidi, M., Orozco-Ibarra, M., Pardo, A., & Selman, M. (2021). Mitochondrial Dysfunction and Alterations in Mitochondrial Permeability Transition Pore (mPTP) Contribute to Apoptosis Resistance in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Fibroblasts. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 7870. https://doi.org/10.3390/ijms22157870
- 113.Ma, R., Ma, R.-Q., Chen, B., Wang, L.-Y., & Fan, X.-Y. (2021). Compound Cocktail Inhibits Influenza Viral Pneumonia via Phospholipase Cγ1 Phosphorylation-Related Necroptosis and Partial Autophagy in Natural Killer Cells. *Planta Medica*, 87(07), 538–549. https://doi.org/10.1055/a-1353-6672
- 114.MacAskill, A. F., & Kittler, J. T. (2010). Control of mitochondrial transport and localization in neurons. *Trends in Cell Biology*, 20(2), 102–112. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.11.002
- 115.Marchi, S., Patergnani, S., Missiroli, S., Morciano, G., Rimessi, A., Wieckowski, M. R., Giorgi, C., & Pinton, P. (2018). Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death. *Cell Calcium*, 69, 62–72. https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.05.003
- 116.Margis, R., Dunand, C., Teixeira, F. K., & Margis-Pinheiro, M. (2008). Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview: Evolutionary overview of glutathione peroxidases. *FEBS Journal*, 275(15), 3959–3970. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06542.x
- 117.Mayo, B., Vázquez, L., & Flórez, A. B. (2019). Equol: A Bacterial Metabolite from The Daidzein Isoflavone and Its Presumed Beneficial Health Effects. *Nutrients*, 11(9), 2231. https://doi.org/10.3390/nu11092231
- 118.McCarron, J. G., Wilson, C., Sandison, M. E., Olson, M. L., Girkin, J. M., Saunter, C., & Chalmers, S. (2013). From Structure to Function: Mitochondrial Morphology, Motion and Shaping in Vascular Smooth Muscle. *Journal of Vascular Research*, 50(5), 357–371. https://doi.org/10.1159/000353883
- 119.Mead, T. J., & Lefebvre, V. (2014). Proliferation Assays (BrdU and EdU) on Skeletal Tissue Sections. W M. J. Hilton (Red.), *Skeletal Development and Repair* (T. 1130, s. 233–243). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-989-5_17
- 120.Memme, J. M., Erlich, A. T., Phukan, G., & Hood, D. A. (2021). Exercise and mitochondrial health. *The Journal of Physiology*, 599(3), 803–817. https://doi.org/10.1113/JP278853
- 121. Meyer, J. N., Leuthner, T. C., & Luz, A. L. (2017). Mitochondrial fusion, fission, and mitochondrial toxicity. *Toxicology*, 391, 42–53. https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.07.019
- 122.Miwa, S., Kashyap, S., Chini, E., & von Zglinicki, T. (2022). Mitochondrial dysfunction in cell senescence and aging. *Journal of Clinical Investigation*, 132(13), e158447. https://doi.org/10.1172/JCI158447
- 123. Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Yoshihiro, K., Haskó, G., & Pacher, P. (2007). Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358(1), 203–208. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.04.106
- 124.Muñoz-Espín, D., Cañamero, M., Maraver, A., Gómez-López, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., Rodríguez-Baeza, A., Varela-Nieto, I., Ruberte, J., Collado, M., & Serrano, M. (2013). Programmed Cell Senescence during Mammalian Embryonic Development. *Cell*, 155(5), 1104–1118. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.019
- 125. Murphy, E. C., & Friedman, A. J. (2019). Hydrogen peroxide and cutaneous biology: Translational applications, benefits, and risks. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 81(6), 1379– 1386. https://doi.org/10.1016/j.jaad.2019.05.030
- 126.Nakamura, A., & Goto, S. (1996). Analysis of Protein Carbonyls with 2,4-Dinitrophenyl Hydrazine and Its Antibodies by Immunoblot in Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Journal of Biochemistry*, *119*(4), 768–774. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021306
- 127. Nassrally, M. S., Lau, A., Wise, K., John, N., Kotecha, S., Lee, K. L., & Brooks, R. F. (2019). Cell cycle arrest in replicative senescence is not an immediate consequence of telomere dysfunction. *Mechanisms of Ageing and Development*, 179, 11–22. https://doi.org/10.1016/j.mad.2019.01.009
- 128.Ng, Y. S., Bindoff, L. A., Gorman, G. S., Klopstock, T., Kornblum, C., Mancuso, M., McFarland, R., Sue, C. M., Suomalainen, A., Taylor, R. W., Thorburn, D. R., & Turnbull, D. M. (2021).

Mitochondrial disease in adults: Recent advances and future promise. *The Lancet Neurology*, 20(7), 573–584. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00098-3

- 129.Nissanka, N., Bacman, S. R., Plastini, M. J., & Moraes, C. T. (2018). The mitochondrial DNA polymerase gamma degrades linear DNA fragments precluding the formation of deletions. *Nature Communications*, *9*(1), 2491. https://doi.org/10.1038/s41467-018-04895-1
- 130.Ogrodnik, M. (2021). Cellular aging beyond cellular senescence: Markers of senescence prior to cell cycle arrest *in vitro* and *in vivo*. Aging Cell, 20(4). https://doi.org/10.1111/acel.13338
- 131.Onishi, M., Yamano, K., Sato, M., Matsuda, N., & Okamoto, K. (2021). Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy. *The EMBO Journal*, 40(3). https://doi.org/10.15252/embj.2020104705
- 132.Oparka, M., Walczak, J., Malinska, D., van Oppen, L. M. P. E., Szczepanowska, J., Koopman, W. J. H., & Wieckowski, M. R. (2016). Quantifying ROS levels using CM-H 2 DCFDA and HyPer. *Methods*, 109, 3–11. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.06.008
- 133.Pan, M., Han, H., Zhong, C., & Geng, Q. (2012). Effects of genistein and daidzein on hippocampus neuronal cell proliferation and BDNF expression in H19-7 neural cell line. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, 16(4), 389–394. https://doi.org/10.1007/s12603-011-0140-3
- 134.Pansarasa, O., Bertorelli, L., Vecchiet, J., Felzani, G., & Marzatico, F. (1999). Age-dependent changes of antioxidant activities and markers of free radical damage in human skeletal muscle. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(5–6), 617–622. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00108-2
- 135.Passos, J. F., Nelson, G., Wang, C., Richter, T., Simillion, C., Proctor, C. J., Miwa, S., Olijslagers, S., Hallinan, J., Wipat, A., Saretzki, G., Rudolph, K. L., Kirkwood, T. B. L., & von Zglinicki, T. (2010). Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Molecular Systems Biology*, 6(1), 347. https://doi.org/10.1038/msb.2010.5
- 136.Patra, S., & Munichandraiah, N. (2009). Electrochemical reduction of hydrogen peroxide on stainless steel. *Journal of Chemical Sciences*, 121(5), 675–683. https://doi.org/10.1007/s12039-009-0081-0
- 137.Pawlowski, J. W., Martin, B. R., McCabe, G. P., McCabe, L., Jackson, G. S., Peacock, M., Barnes, S., & Weaver, C. M. (2015). Impact of equol-producing capacity and soy-isoflavone profiles of supplements on bone calcium retention in postmenopausal women: A randomized crossover trial ,. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 102(3), 695–703. https://doi.org/10.3945/ajcn.114.093906
- 138.Pernodet, N., Dong, K., & Pelle, E. (2016). Autophagy in human skin fibroblasts: Comparison between young and aged cells and evaluation of its cellular rhythm and response to Ultraviolet A radiation. *Journal of Cosmetic Science*, 67(1), 13–20; PMID: 27319057.
- 139.Pharaoh, G., Pulliam, D., Hill, S., Sataranatarajan, K., & Van Remmen, H. (2016). Ablation of the mitochondrial complex IV assembly protein Surf1 leads to increased expression of the UPRMT and increased resistance to oxidative stress in primary cultures of fibroblasts. *Redox Biology*, 8, 430–438. https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.05.001
- 140.Picca, A., & Lezza, A. M. S. (2015). Regulation of mitochondrial biogenesis through TFAMmitochondrial DNA interactions. *Mitochondrion*, 25, 67–75. https://doi.org/10.1016/j.mito.2015.10.001
- 141.Pickles, S., Vigié, P., & Youle, R. J. (2018). Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. *Current Biology*, 28(4), R170–R185. https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.004
- 142.Plekhanova, Tarasov, Bykov, Prisyazhnaya, Kolesov, Sigaev, Signore, & Reshetilov. (2019). Multiwalled Carbon Nanotubes and the Electrocatalytic Activity of Gluconobacter oxydans as the Basis of a Biosensor. *Biosensors*, 9(4), 137. https://doi.org/10.3390/bios9040137
- 143.Popov, L. (2020). Mitochondrial biogenesis: An update. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 24(9), 4892–4899. https://doi.org/10.1111/jcmm.15194
- 144.Presley, A. D., Fuller, K. M., & Arriaga, E. A. (2003). MitoTracker Green labeling of mitochondrial proteins and their subsequent analysis by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. J. Chromatogr. B, 10; DOI: 10.1016/s1570-0232(03)00371-4
- 145.Qu, L., Liang, X., Gu, B., & Liu, W. (2014). Quercetin alleviates high glucose-induced Schwann cell damage by autophagy. *Neural Regeneration Research*, 9(12), 1195. https://doi.org/10.4103/1673-5374.135328
- 146.Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouységu, L. (2011). Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. Angewandte Chemie International Edition, 50(3), 586–621. https://doi.org/10.1002/anie.201000044

- 147.Rettberg, J. R., Yao, J., & Brinton, R. D. (2014). Estrogen: A master regulator of bioenergetic systems in the brain and body. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 35(1), 8–30. https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2013.08.001
- 148.Richardson, T. E., Yang, S.-H., Wen, Y., & Simpkins, J. W. (2011). Estrogen Protection in Friedreich's Ataxia Skin Fibroblasts. *Endocrinology*, 152(7), 2742–2749. https://doi.org/10.1210/en.2011-0184
- 149.Rietjens, I. M. C. M., Louisse, J., & Beekmann, K. (2017). The potential health effects of dietary phytoestrogens: Potential health effects of dietary phytoestrogens. *British Journal of Pharmacology*, 174(11), 1263–1280. https://doi.org/10.1111/bph.13622
- 150.Rietjens, I. M. C. M., Sotoca, A. M., Vervoort, J., & Louisse, J. (2013). Mechanisms underlying the dualistic mode of action of major soy isoflavones in relation to cell proliferation and cancer risks. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(1), 100–113. https://doi.org/10.1002/mnfr.201200439
- 151.Riley, J. S., & Tait, S. W. (2020). Mitochondrial DNA in inflammation and immunity. *EMBO Reports*, 21(4). https://doi.org/10.15252/embr.201949799
- 152.Romanello, V. (2020). The Interplay between Mitochondrial Morphology and Myomitokines in Aging Sarcopenia. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 91. https://doi.org/10.3390/ijms22010091
- 153.Roy, A., & Sil, P. C. (2012). Tertiary butyl hydroperoxide induced oxidative damage in mice erythrocytes: Protection by taurine. *Pathophysiology*, 19(2), 137–148. https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2012.05.001
- 154.Sas, K., Szabó, E., & Vécsei, L. (2018). Mitochondria, Oxidative Stress and the Kynurenine System, with a Focus on Ageing and Neuroprotection. *Molecules*, 23(1), 191. https://doi.org/10.3390/molecules23010191
- 155.Schrepfer, E., & Scorrano, L. (2016). Mitofusins, from Mitochondria to Metabolism. *Molecular Cell*, 61(5), 683–694. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.022
- 156.Shibata, Y., Hu, J., Kozlov, M. M., & Rapoport, T. A. (2009). Mechanisms Shaping the Membranes of Cellular Organelles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25(1), 329–354. https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113324
- 157.Shigenaga, M. K., Hagen, T. M., & Ames, B. N. (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(23), 10771–10778. https://doi.org/10.1073/pnas.91.23.10771
- 158. Sikora, E., Bielak-Żmijewska, A., & Mosieniak, G. (2018). Czym jest i czym nie jest starzenie komórki? *Postępy Biochemii*, 64(2), 110–118. https://doi.org/10.18388/pb.2018_120
- 159.Simpkins, J. W., Yang, S.-H., Sarkar, S. N., & Pearce, V. (2008). Estrogen actions on mitochondria—Physiological and pathological implications. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 290(1–2), 51–59. https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.04.013
- 160.Singh, S., Grewal, S., Sharma, N., Behl, T., Gupta, S., Anwer, Md. K., Vargas-De-La-Cruz, C., Mohan, S., Bungau, S. G., & Bumbu, A. (2023). Unveiling the Pharmacological and Nanotechnological Facets of Daidzein: Present State-of-the-Art and Future Perspectives. *Molecules*, 28(4), 1765. https://doi.org/10.3390/molecules28041765
- 161.Sirotkin, A. V., & Harrath, A. H. (2014). Phytoestrogens and their effects. European Journal of Pharmacology, 741, 230–236. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.057
- 162.Smiley, S. T., Reers, M., Mottola-Hartshorn, C., Lin, M., Chen, A., Smith, T. W., Steele, G. D., & Chen, L. B. (1991). Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(9), 3671–3675. https://doi.org/10.1073/pnas.88.9.3671
- 163.Stetler, R. A., Leak, R. K., Gao, Y., & Chen, J. (2013). The Dynamics of the Mitochondrial Organelle as a Potential Therapeutic Target. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 33(1), 22–32. https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.158
- 164.Subramanian, V., Rodemoyer, B., Shastri, V., Rasmussen, L. J., Desler, C., & Schmidt, K. H. (2021). Bloom syndrome DNA helicase deficiency is associated with oxidative stress and mitochondrial network changes. *Scientific Reports*, 11(1), 2157. https://doi.org/10.1038/s41598-021-81075-0
- 165.Tang, S., Hu, J., Meng, Q., Dong, X., Wang, K., Qi, Y., Chu, C., Zhang, X., & Hou, L. (2013). Daidzein Induced Apoptosis via Down-Regulation of Bcl-2/Bax and Triggering of the Mitochondrial Pathway in BGC-823 Cells. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 65(2), 197–202. https://doi.org/10.1007/s12013-012-9418-2

- 166.Tanida, I., Ueno, T., & Kominami, E. (2008). LC3 and Autophagy. W V. Deretic (Red.), Autophagosome and Phagosome (T. 445, s. 77–88). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-157-4_4
- 167.Thornton, M. J. (2013). Estrogens and aging skin. *Dermato-Endocrinology*, 5(2), 264–270. https://doi.org/10.4161/derm.23872
- 168. Tigges, J., Krutmann, J., Fritsche, E., Haendeler, J., Schaal, H., Fischer, J. W., Kalfalah, F., Reinke, H., Reifenberger, G., Stühler, K., Ventura, N., Gundermann, S., Boukamp, P., & Boege, F. (2014). The hallmarks of fibroblast ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*, 138, 26– 44. https://doi.org/10.1016/j.mad.2014.03.004
- 169. Torrens-Mas, M., Pons, D.-G., Sastre-Serra, J., Oliver, J., & Roca, P. (2020). Sexual hormones regulate the redox status and mitochondrial function in the brain. Pathological implications. *Redox Biology*, 31, 101505. https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101505
- 170. Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9), 4350–4354. https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350
- 171.Trist, B. G., Hilton, J. B., Hare, D. J., Crouch, P. J., & Double, K. L. (2021). Superoxide Dismutase 1 in Health and Disease: How a Frontline Antioxidant Becomes Neurotoxic. Angewandte Chemie International Edition, 60(17), 9215–9246. https://doi.org/10.1002/anie.202000451
- 172. Trudeau, K. M., Gottlieb, R. A., & Shirihai, O. S. (2014). Measurement of Mitochondrial Turnover and Life Cycle Using MitoTimer. W *Methods in Enzymology* (T. 547, s. 21–38). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801415-8.00002-3
- 173. Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, 552(2), 335–344. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478
- 174. Uittenbogaard, M., & Chiaramello, A. (2014). Mitochondrial Biogenesis: A Therapeutic Target for Neurodevelopmental Disorders and Neurodegenerative Diseases. *Current Pharmaceutical Design*, 20(35), 5574–5593. https://doi.org/10.2174/1381612820666140305224906
- 175. Vrtačnik, P., Ostanek, B., Mencej-Bedrač, S., & Marc, J. (2014). The many faces of estrogen signaling. *Biochemia Medica*, 24(3), 329–342. https://doi.org/10.11613/BM.2014.035
- 176. Walczak, J., Partyka, M., Duszyński, J., & Szczepanowska, J. (2017). Implications of mitochondrial network organization in mitochondrial stress signalling in NARP cybrid and Rho0 cells. *Scientific Reports*, 7(1), 14864. https://doi.org/10.1038/s41598-017-14964-y
- 177.Wang, P., & Powell, S. R. (2010). Decreased sensitivity associated with an altered formulation of a commercially available kit for detection of protein carbonyls. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(2), 119–121. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.03.005
- 178. Wang, X., Su, B., Fujioka, H., & Zhu, X. (2008). Dynamin-Like Protein 1 Reduction Underlies Mitochondrial Morphology and Distribution Abnormalities in Fibroblasts from Sporadic Alzheimer's Disease Patients. *The American Journal of Pathology*, *173*(2), 470–482. https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.071208
- 179. Webster, A. F., Williams, A., Recio, L., & Yauk, C. L. (2014). Bromodeoxyuridine (BrdU) treatment to measure hepatocellular proliferation does not mask furan-induced gene expression changes in mouse liver. *Toxicology*, 323, 26–31. https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.06.002
- 180. Wei, H., Liu, L., & Chen, Q. (2015). Selective removal of mitochondria via mitophagy: Distinct pathways for different mitochondrial stresses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1853(10), 2784–2790. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.03.013
- 181.Wei, Y. H., Lu, C. Y., Wei, C. Y., Ma, Y. S., & Lee, H. C. (2001). Oxidative stress in human aging and mitochondrial disease-consequences of defective mitochondrial respiration and impaired antioxidant enzyme system. *The Chinese Journal of Physiology*, 44(1), 1–11; PMID: 11403514.
- 182. Wilkinson, H. N., & Hardman, M. J. (2017). The role of estrogen in cutaneous ageing and repair. *Maturitas*, 103, 60–64. https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2017.06.026
- 183. Wu, J., Li, K., Liu, Y., Feng, A., Liu, C., Adu-Amankwaah, J., Ji, M., Ma, Y., Hao, Y., Bu, H., & Sun, H. (2023). Daidzein ameliorates doxorubicin-induced cardiac injury by inhibiting autophagy and apoptosis in rats. *Food & Function*, 14(2), 934–945. https://doi.org/10.1039/D2FO03416F
- 184.Wu, P.-S., Yen, J.-H., Wang, C.-Y., Chen, P.-Y., Hung, J.-H., & Wu, M.-J. (2020). 8-Hydroxydaidzein, an Isoflavone from Fermented Soybean, Induces Autophagy, Apoptosis, Differentiation, and Degradation of Oncoprotein BCR-ABL in K562 Cells. *Biomedicines*, 8(11), 506. https://doi.org/10.3390/biomedicines8110506
- 185.Wu, Y., Chen, M., & Jiang, J. (2019). Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and drug targets via apoptotic signaling. *Mitochondrion*, 49, 35–45. https://doi.org/10.1016/j.mito.2019.07.003

- 186.Xie, K., Li, Y., Chen, D., Yu, B., Luo, Y., Mao, X., Huang, Z., Yu, J., Luo, J., Zheng, P., Yan, H., & He, J. (2020). Daidzein supplementation enhances embryo survival by improving hormones, antioxidant capacity, and metabolic profiles of amniotic fluid in sows. *Food & Function*, 11(12), 10588–10600. https://doi.org/10.1039/D0FO02472D
- 187. Yang, P.-C., & Mahmood, T. (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429. https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998
- 188. Yang, X., Jiang, T., Wang, Y., & Guo, L. (2019). The Role and Mechanism of SIRT1 in Resveratrol-regulated Osteoblast Autophagy in Osteoporosis Rats. *Scientific Reports*, 9(1), 18424. https://doi.org/10.1038/s41598-019-44766-3
- 189.Yoo, S.-M., & Jung, Y.-K. (2018). A Molecular Approach to Mitophagy and Mitochondrial Dynamics. Mol. Cells 41(1): 18-26. http://dx.doi.org/10.14348/molcells.2018.2277
- 190. Yoshino, M., Naka, A., Sakamoto, Y., Shibasaki, A., Toh, M., Tsukamoto, S., Kondo, K., & Iida, K. (2015). Dietary isoflavone daidzein promotes Tfam expression that increases mitochondrial biogenesis in C2C12 muscle cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(11), 1193–1199. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.05.010
- 191. Young, A. R. J., Narita, M., Ferreira, M., Kirschner, K., Sadaie, M., Darot, J. F. J., Tavaré, S., Arakawa, S., Shimizu, S., Watt, F. M., & Narita, M. (2009). Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes & Development*, 23(7), 798–803. https://doi.org/10.1101/gad.519709
- 192.Zhang, H., Davies, K. J. A., & Forman, H. J. (2015). Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 88, 314–336. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.036
- 193.Zhang, J. (2013). Autophagy and mitophagy in cellular damage control. *Redox Biology*, 1(1), 19–23. https://doi.org/10.1016/j.redox.2012.11.008
- 194.Zhang, J., Ma, K., Qi, T., Wei, X., Zhang, Q., Li, G., & Chiu, J.-F. (2015). P62 Regulates resveratrol-mediated Fas/Cav-1 complex formation and transition from autophagy to apoptosis. *Oncotarget*, 6(2), 789–801. https://doi.org/10.18632/oncotarget.2733
- 195.Zhang, Q., Xie, H., Chen, D., Yu, B., Huang, Z., Zheng, P., Mao, X., Yu, J., Luo, Y., Luo, J., & He, J. (2018). Dietary Daidzein Supplementation During Pregnancy Facilitates Fetal Growth in Rats. *Molecular Nutrition & Food Research*, 62(24), 1800921. https://doi.org/10.1002/mnfr.201800921
- 196.Zhang, Q., Zhang, C., Ge, J., Lv, M.-W., Talukder, M., Guo, K., Li, Y., & Li, J.-L. (2020). Ameliorative effects of resveratrol against cadmium-induced nephrotoxicity via modulating nuclear xenobiotic receptor response and PINK1/Parkin-mediated Mitophagy. Food & Function, 11(2), 1856–1868. https://doi.org/10.1039/C9FO02287B
- 197.Zhao, Q., Tian, Z., Zhou, G., Niu, Q., Chen, J., Li, P., Dong, L., Xia, T., Zhang, S., & Wang, A. (2020). SIRT1-dependent mitochondrial biogenesis supports therapeutic effects of resveratrol against neurodevelopment damage by fluoride. *Theranostics*, 10(11), 4822–4838. https://doi.org/10.7150/thno.42387
- 198.Zhao, Y., Allen, B. L., & Star, A. (2011). Enzymatic Degradation of Multiwalled Carbon Nanotubes. *The Journal of Physical Chemistry A*, 115(34), 9536–9544. https://doi.org/10.1021/jp112324d
- 199.Zhou, L. Z.-H., Johnson, A. P., & Rando, T. A. (2001). NFκB and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(11), 1405–1416. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00719-5
- 200.Zhou, W., Liu, X., Cheng, K., Zhang, X., Lu, J., & Hu, R. (2017). X-11-5-27, a daidzein derivative, inhibits NLRP3 inflammasome activity via promoting autophagy. *Experimental Cell Research*, 360(2), 320–327. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.09.022
- 201.Zorov, D. B., Juhaszova, M., & Sollott, S. J. (2014). Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiological Reviews*, 94(3), 909–950. https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2013
- 202.Zorova, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S., Babenko, V. A., Zorov, S. D., Balakireva, A. V., Juhaszova, M., Sollott, S. J., & Zorov, D. B. (2018). Mitochondrial membrane potential. *Analytical Biochemistry*, 552, 50–59. https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.009

8. LISTA PUBLIKACJI NAUKOWYCH

- Karolina Drabik, <u>Karolina Piecyk</u>, Artur Wolny, Lidia Szulc-Dąbrowska, Grażyna Dębska-Vielhaber, Stefan Vielhaber, Jerzy Duszyński, Dominika Malińska, Joanna Szczepanowska. Adaptation of mitochondrial network dynamics and velocity of mitochondrial movement to chronic stress present in fibroblasts derived from patients with sporadic form of Alzheimer's disease – The FASEB Journal. 2021 Jun;35(6):e21586. doi: 10.1096/fj.202001978RR.
- Karolina Drabik, Dominika Malińska, <u>Karolina Piecyk</u>, Grażyna Dębska-Vielhaber, Stefan Vielhaber, Jerzy Duszyński, Joanna Szczepanowska. Effect of Chronic Stress Present in Fibroblasts Derived from Patients with a Sporadic Form of AD on Mitochondrial Function and Mitochondrial Turnover – *Antioxidants*. 2021 Jun 10;10(6):938. doi: 10.3390/antiox10060938.