

Streszczenie

Starzenie komórkowe charakteryzuje się stabilnym i nieodwracalnym zatrzymaniem podziałów komórki, przy jednoczesnym zachowaniu jej aktywności metabolicznej. Wraz z pojawiającymi się nowymi doniesieniami na temat starzenia komórkowego, rośnie świadomość złożoności i różnorodności tego procesu. Jedną z cech komórek starych, mającą największe znaczenie fizjologiczne jest tzw. fenotyp wydzielniczy związany ze starzeniem (SASP, ang. *Senescence Associated Secretory Phenotype*), a istotną chociaż do tej pory mało poznaną rolę w złożonych i zróżnicowanych funkcjach SASP mogą odgrywać pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EVs, ang. *Extracellular vesicles*). Udowodniono, że SASP może przyczyniać się między innymi do powstania przewlekłego stanu zapalnego, który sprzyja chorobom związanym z wiekiem, w tym miażdżycy. Opublikowane do tej pory prace dowiodły obecności starych komórek mięśni gładkich aorty w obrębie blaszki miażdżycowej. Wydzielane przez stare komórki czynniki SASP mogą wpływać na sąsiadujące komórki, w tym limfocyty T i modyfikować mikrośrodowisko tkanki przyczyniając się do promowania lokalnego stanu zapalnego i w konsekwencji rozwoju choroby.

W niniejszej rozprawie dokonałam charakterystyki i porównania fenotypu przespieszonego starzenia indukowanego doksorubicyną lub nadtlakiem wodoru w trzech różnych typach komórek hodowanych *in vitro*. Zmiany w fenotypie komórek starych były porównywane z fenotypem komórek proliferujących oraz komórek spoczynkowych. Wykazałam, że zmianami, które najsilniej korelowały ze starzeniem i były dla niego unikalne to spadek poziomu białek: laminy B1, HMGB1, PARP1 oraz cykliny B1. Zmiany te można uznać za uniwersalne markery starzenia.

W dalszej części porównałam starzenie replikacyjne oraz przyspieszone komórek mięśni gładkich aorty, będących na wczesnym oraz późnym etapie tego procesu. Wykazałam, że zmiany obserwowane na wczesnych etapach nasilają się w miarę upływu czasu od zahamowania proliferacji. Przeprowadziłam również analizę wybranych markerów starzenia w komórkach mięśni gładkich izolowanych z blaszek miażdżycowych jako modelu starzenia w warunkach *in vivo*. Komórki ulegające starzeniu *in vivo* charakteryzowały się zwiększonym wydzielaniem czynników SASP, a profil wydzielniczy komórek mięśni gładkich izolowanych z blaszek miażdżycowych w znacznym stopniu był podobny do profilu wydzielniczego komórek mięśni gładkich aorty ulegających starzeniu replikacyjnemu oraz przyspieszonemu na późnym etapie tego procesu.

Dokonałam charakterystyki pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez komórki mięśni gładkich aorty. Wykazałam, że ulegające starzeniu replikacyjnemu i przyspieszonemu komórki wydzielają zdecydowanie więcej EVs. Na podstawie przeprowadzonej analizy proteomicznej pęcherzyków oraz czynników rozpuszczalnych wykazałam różnice w składzie sekretomu komórek młodych i starych, jak i sekretomu komórek ulegających starzeniu replikacyjnemu i przyspieszonemu.

Oceeniłam wpływ czynników wydzielanych przez ulegające starzeniu komórki mięśni gładkich na aktywację, proliferację i migrację limfocytów T oraz na wydzielanie cytokin przez te komórki. Wykazałam, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe mogą regulować aktywację komórek układu odpornościowego poprzez częściowe jej hamowanie, a także promują sekrecję niektórych cytokin produkowanych przez te komórki.

Uzyskane i opisane wyniki przyczyniają się do lepszego zrozumienia złożoności procesu jakim jest starzenie komórkowe, a szczegółowa analiza wielu markerów starzenia pozwoliła wytypować te, które potencjalnie mogłyby być uniwersalnymi znacznikami tego procesu. Z kolei badania dotyczące SASP wskazały na potencjalną rolę starych komórek mięśni gładkich aorty w rozwoju miażdżycy między innymi poprzez wpływanie na komórki układu odpornościowego, takie jak limfocyty.

Summary

Cellular senescence is characterized by a stable and irreversible cell cycle arrest, while maintaining its metabolic activity. Along with new research on cellular senescence, awareness of the complexity and diversity of this process is growing. One of the most important features of senescent cells that have the greatest physiological significance is senescence-associated secretory phenotype (SASP) and extracellular vesicles (EVs) may play an important role in the complex and diverse functions of SASP. It has been proven that SASP may contribute to chronic inflammation, which promotes age-related diseases, such as atherosclerosis. The studies published so far have demonstrated the presence of senescent vascular smooth muscle cells (VSMC) within the atherosclerotic plaque, where they play an important role in its development. Moreover, SASP factors secreted by senescent cells can influence neighboring cells, including T lymphocytes, and modify the tissue microenvironment, thereby contributing to the promotion of inflammation.

In the first part of this dissertation, I characterized and compared the premature senescence phenotype in three different types of normal cells cultured *in vitro* and induced to senescence by doxorubicin or hydrogen peroxide treatment. Changes in the phenotype of senescent cells were compared with the phenotype of proliferating cells and quiescent cells. I showed that the changes which correlated the most strongly with senescence were decreased level proteins: lamin B1, HMGB1, PARP1 and cyclin B1. These changes can be considered as universal markers of senescence.

Next, I compared the replicative and premature senescence of VSMC at the early and late stages of this process. I have shown that the changes observed at the early stage intensify over the time after the inhibition of proliferation. I also analyzed selected markers in smooth muscle cells isolated from atherosclerotic plaques as an *in vivo* model of senescence. Cells undergoing senescence *in vivo* were characterized by increased secretion of SASP factors, and the secretory profile of smooth muscle cells isolated from atherosclerotic plaques was largely similar to the secretory profile of cells undergoing replicative senescence and premature senescence at a late state of this process.

I characterized extracellular vesicles (EVs) secreted by VSMC cells. I have shown that VSMC undergoing replicative and premature senescence secrete significantly more EVs than control one. Based on the proteomic analysis of EVs and soluble factors, I showed differences in the composition of the secretome of control and senescent cells, as well as the secretome of cells undergoing replicative and premature senescence.

I examined the influence of factors secreted by senescent VSMC on the activation, proliferation and migration of T lymphocytes and on the secretion of cytokines by these cells. I showed that extracellular vesicles can regulate the activation of immune cells by partially inhibiting it, and also promote the secretion of cytokines produced by T cells.

The results obtained and described in this dissertation contribute to a better understanding of the complexity of the cellular senescence process. The detailed analysis of many senescent markers allowed the selection of those that could potentially be universal markers of this process. What is more, research on SASP revealed the role of senescent VSMC cells as an important factor that may contribute to the development of atherosclerosis, by influencing the immune cells, such as lymphocytes.