

# Abstract

Aging is characterized by the accumulation of senescent cells, which significantly contributes to the development of age-related diseases, including cognitive impairment and compromised integrity of the gut–brain axis. Senolytic intervention aimed at eliminating senescent cells, particularly the combination of Dasatinib and Quercetin (D+Q), represent a promising strategy to mitigate these dysfunctions. The aim of this dissertation was to examine the multidirectional effects of senolytic treatment (D+Q) on cognitive function, gut microbiota composition, bacterial metabolites, and the integrity of the intestinal and brain barriers in aged Wistar rats.

Using cognitive behavioural tests, especially the Active Allothetic Place Avoidance task (AAPAT), it was shown that D+Q treatment significantly improves spatial memory and cognitive abilities in aged rats, with beneficial effects persisting even after the end of treatment. Analysis of the gut microbiota of these animals demonstrated that D+Q administration led to significant changes in its composition, including an increased abundance of *Lactobacillus acidophilus*, a bacterial species previously associated with beneficial effects on cognitive function and metabolic processes. Metabolomic analysis revealed a marked reduction in faecal levels of short-chain fatty acids (SCFAs) and bile acids, consistent with altered microbial production and/or altered host handling of these metabolites, including changes in utilization, degradation, reabsorption, and absorption, while systemic profiles remained largely stable apart from a selective reduction in serum formic acid.

Histological and molecular analyses revealed region-specific changes in intestinal mucosal architecture, expression of tight junction proteins, mucin production, and inflammatory markers in response to D+Q treatment. In the small intestine, mucosal thickening and increased mucin production were observed, whereas in the large intestine a reduced mucosal thickness and decreased mucin synthesis were noted. These changes were accompanied by a decrease in pro-inflammatory markers (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) alongside an increase in anti-inflammatory cytokines (IL-10), indicating a protective and anti-inflammatory effect of D+Q at the intestinal level.

Importantly, D+Q administration contributed to improved blood–brain barrier integrity, confirmed by increased expression of tight junction proteins (zonula occludens-1, Occludin, claudin-1) in brain tissue. Moreover, reduced inflammatory markers and increased IL-10 expression indicate a shift in the brain milieu toward an anti-inflammatory state, which may explain the observed improvement in cognitive function.

These results indicate systemic benefits of senolytic of intermittent D+Q intervention through modulation of the gut microbiota, reduction of inflammation, region-specific remodelling of intestinal barrier-associated features, and improvement of blood–brain barrier integrity. Together, these findings suggest that intermittent administration of D+Q may represent a promising strategy to counteract cognitive impairment, while underscoring the key role of the gut–brain axis as a key mechanistic axis and intervention target in age-related dysfunction.

# Streszczenie

Starzenie się organizmu charakteryzuje się gromadzeniem komórek starzejących się (senescentnych), co istotnie przyczynia się do rozwoju chorób związanych z wiekiem, w tym zaburzeń poznawczych oraz upośledzenia integralności osi jelitowo-mózgowej. Interwencje senolityczne, ukierunkowane na eliminację starzenia komórkowego, zwłaszcza kombinacja dasatynibu i kwercetyny (D+Q), stanowią obiecującą strategię łagodzenia tych dysfunkcji. Celem niniejszej rozprawy było zbadanie wielokierunkowego wpływu podawania senolityków (D+Q) na funkcje poznawcze, skład mikrobioty jelitowej, metabolity bakteryjne oraz integralność barier jelitowej i mózgowej u starych szczurów szczepu Wistar.

Przy użyciu behawioralnych testów poznawczych, a zwłaszcza zadania aktywnego unikania miejsca (AAPAT – active allothetic place avoidance task), wykazano, że podawanie D+Q znacząco poprawia pamięć przestrzenną oraz umiejętności poznawcze u starych szczurów, przy czym pozytywne efekty utrzymują się nawet po zakończeniu leczenia. Analiza mikrobioty jelitowej tych zwierząt wykazała, że podawanie D+Q doprowadziło do istotnych zmian w jej składzie, w tym do zwiększenia liczebności *Lactobacillus acidophilus*, gatunku bakterii, którego obecność wiązana była wcześniej z korzystnym wpływem na funkcje poznawcze oraz procesy metaboliczne. Analiza metabolomiczna wykazała znaczące obniżenie poziomu krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) oraz kwasów żółciowych w kale, co może wskazywać na zmniejszoną produkcję mikrobiologiczną, nasiloną degradację lub zwiększone wchłanianie systemowe tych metabolitów.

Analizy histologiczne oraz molekularne ujawniły regionowo-specyficzne zmiany w architekturze śluzówki jelit, ekspresji białek połączeń ścisłych, produkcji mucyn oraz markerów zapalnych w odpowiedzi na leczenie D+Q. W jelicie cienkim zaobserwowano pogrubienie błony śluzowej oraz podwyższoną produkcję mucyn, natomiast w jelicie grubym odnotowano zmniejszenie jej grubości i obniżenie syntezy mucyn. Zmianom tym towarzyszył spadek poziomu markerów prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) przy jednoczesnym wzroście cytokin przeciwzapalnych (IL-10), co wskazuje na ochronne i przeciwzapalne działanie interwencji D+Q na poziomie jelitowym.

Co ważne, podawanie D+Q przyczyniło się do poprawienia integralności bariery krew-mózg, potwierdzonego podwyższoną ekspresją białek połączeń ścisłych (Zonulina-1, Okludyna, Klaudyna-1) w tkance mózgowej. Ponadto redukcja markerów stanu zapalnego oraz wzrost ekspresji IL-10 świadczą o przesunięciu równowagi w obrębie środowiska mózgowego w kierunku przeciwzapalnym, co może tłumaczyć zaobserwowaną poprawę funkcji poznawczych.

Wyniki te wskazują na ogólnoustrojowe korzyści interwencji senolitycznej poprzez modulację mikrobioty jelitowej, redukcję stanu zapalnego oraz przywrócenie integralności bariery jelitowej i mózgowej. Niniejsza praca wskazuje, że zastosowanie interwencji D+Q stanowi obiecujące podejście przeciwdziałania zaburzeniom poznawczym, podkreślając istotną rolę osi jelitowo-mózgowej jako ważnej osi interwencji w zaburzeniach związanych z wiekiem.