

Justyna Mikuła-Pietrasik

**Wpływ stilbenów (resweratrolu i jego analogów) na molekularne i czynnościowe wykładniki starzenia się ludzkich komórek mezotelium otrzewnowego *in vitro***

Rozprawa doktorska

z Katedry i Zakładu Patofizjologii

Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Kierownik: prof. dr hab. med. Andrzej Bręborowicz

Promotor: dr hab. n. med. Krzysztof Książek

Poznań 2011 r.

*Pracę tę dedykuję moim*

*Najbliższym*

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania*

***Panu dr hab. n. med. Krzysztofowi Książkowi***

*za wprowadzenie mnie w ciekawą tematykę badań, opiekę merytoryczną,  
a także czas który mi poświęcił w trakcie realizacji niniejszej rozprawy.*

*Dziękuję za ogromną życzliwość, wsparcie oraz  
motywowanie mnie przez cały czas trwania naszej współpracy.*

Dziękuję

**Panu prof. dr hab. med. Andrzejowi Bręborowiczowi**  
za umożliwienie mi przygotowania rozprawy doktorskiej  
w Katedrze i Zakładzie Patofizjologii.

**Panu dr hab. n. farm. Markowi Muriasowi** z Katedry i Zakładu Toksykologii  
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu  
za pomoc w przeprowadzeniu badań z wykorzystaniem metody HPLC  
oraz konsultację merytoryczną.

**Panu dr n. biol. Błażejowi Rubisiowi** z Katedry i Zakładu Chemii Klinicznej  
i Diagnostyki Molekularnej Uniwersytetu Medycznego  
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu  
za pomoc w oznaczeniu długości telomerowego DNA metodą ilościowego PCR.

**Pani dr n. biol. Katarzynie Piwockiej** z Pracowni Cytometrii Instytutu Biologii  
Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego w Warszawie  
za pomoc w przeprowadzeniu badań z użyciem metody cytometrii  
przepływowej.

Dziękuję także **wszystkim współpracownikom** z Katedry i Zakładu  
Patofizjologii za miłą atmosferę oraz wsparcie.

## **SPIS TREŚCI**

Wykaz stosowanych skrótów.....	6
Streszczenie.....	10
Summary.....	13
Wstęp.....	15
Cel pracy.....	37
Metodyka.....	38
Wyniki.....	54
Dyskusja.....	99
Wnioski.....	115
Piśmiennictwo.....	116

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

<b>3,3',4,4'-THS</b>	3,3',4,4'-tetrahydroksy- <i>trans</i> -stilben
<b>3,3',5,5'-THS</b>	3,3',5,5'-tetrahydroksy- <i>trans</i> -stilben
<b>3,3',4,4',5,5'-HHS</b>	3,3',4,4',5,5'-heksahydroksy- <i>trans</i> -stilben
<b>X-Gal</b>	5-bromo-4-chloro-3-indolo- $\beta$ -D-galaktopiranozyd
<b>8-OH-dG</b>	8-hydroksy-2'-deoksyguanozyna
$\Delta\Psi_m$	potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej
<b>AMPK</b>	(AMP-activated protein kinase) - kinaza białkowa aktywowana przez AMP
<b>ATM</b>	(ataxia telangiectasia mutated) - kinaza białkowa zmutowana w zespole ataksji-teleangiektazji
<b>AQP</b>	(aquaporin) - akwaporyna
<b>bp</b>	(base pairs) - pary zasad
<b>BSA</b>	(bovine serum albumin) - albumina surowicy bydłowej
<b>CDK</b>	(cyclin-dependent kinases) - kinazy zależne od cyklin
<b>CPM</b>	(counts per minute) - liczba impulsów przypadająca na 1 minutę pomiaru
<b>COX</b>	(cyclooxygenase) - cyklooksygenaza
<b>CPD</b>	(cumulative population doublings) - skumulowana liczba podwojeń populacji
<b>DMSO</b>	dimetylosulfotlenek
<b>DAB</b>	diaminobenzzydina
<b>DAPI</b>	4',6'-diamidyno-2-fenylindol
<b>DHEA</b>	dehydroepiandrosteron
<b>EC-SOD</b>	(extracellular superoxide dismutase) - zewnątrzkomórkowa izoforma dysmutazy ponadtlenkowej
<b>ECM</b>	(extracellular matrix) - macierz pozakomórkowa
<b>EDTA</b>	kwasy etylenodiaminotetraoctowy
<b>ELISA</b>	(enzyme-linked immunosorbent assay) - płytkowy test immunoenzymatyczny fazy stałej
<b>eNOS</b>	śródbłonkowa izoforma syntazy tlenku azotu
<b>FACS</b>	(fluorescence activated cell sorting) - cytometria przepływowa

<b>FBS</b>	(fetal bovine serum) - płodowa surowica bydłęca
<b>FOXO</b>	czynnik transkrypcyjny O z rodziny <i>forkhead</i>
<b>GLUT</b>	transporter glukozy
<b>GPX</b>	(glutathione peroxidase) - peroksydaza glutationu
<b>GSH</b>	glutation zredukowany
<b>γ-H2A.X</b>	ufosforylowany wariant histonu H2A.X
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	nadtlenek wodoru
<b>H<sub>2</sub>DCFDA</b>	dwuoctanu 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny
<b>HBSS</b>	(Hanks' balanced salt solution) - roztwór soli buforowany solami Hanksa
<b>HMEC-1</b>	(human microvascular endothelial cells) - komórki śródbłónka mikronaczyń skóry
<b>KM</b>	ludzkie komórki mezotelium otrzewnowego
<b>HPLC</b>	(high performance liquid chromatography) - wysokosprawna chromatografia cieczowa
<b>HRP</b>	(horseradish peroxidase) - peroksydaza chrzanowa
<b>hTERT</b>	katalityczna podjednostka telomerazy
<b>HUVECs</b>	(human umbilical vein endothelial cells) - komórki śródbłónka naczyniowego izolowane z krwi pępowinowej
<b>IL</b>	(interleukin) - interleukina
<b>ICAM-1</b>	(intercellular adhesion molecule) - cząsteczka adhezji międzykomórkowej
<b>IGF-1</b>	insulinopodobny czynnik wzrostu-1
<b>JC-1</b>	jodek 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylobenzimidazolokarbocyaninowy
<b>LDL</b>	(low density lipoproteins) - lipoproteiny o niskiej gęstości
<b>MCP-1</b>	(macrophage chemoattractant protein-1) - białko chemotaktyczne monocytów-1
<b>MnSOD</b>	(manganese superoxide dismutase) - manganowa dysmutaza ponadtlenkowa
<b>mtDNA</b>	mitochondrialne DNA
<b>MMP</b>	(matrix metalloproteinase) - metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej

<b>MUG</b>	4-metyloumbelliferylo- $\beta$ -D-galaktopiranozyd
<b>MTT</b>	formazan błękitu tiazolowego
<b>NAO</b>	<i>N</i> -nonyl oranż akrydyny
<b>NBT</b>	błękit nitrotetrazoliowy
<b>NO</b>	tlenek azotu
<b>PA</b>	(plasminogen activator) - aktywator plazminogenu
<b>PAI</b>	(plasminogen activator inhibitor) - inhibitor aktywatora plazminogenu
<b>PCR</b>	(polymerase chain reaction) - reakcja łańcuchowa polimerazy
<b>PPAR</b>	(peroxisome proliferator-activated receptors) - receptory aktywowane proliferatorami peroksysomów
<b>PBN</b>	<i>N-tert</i> -butylo- $\alpha$ -fenylnitron
<b>PBS</b>	(phosphate buffered saline) - sól fizjologiczna buforowana fosforanami
<b>PCNA</b>	(proliferating cell nuclear antigen) - jądrowy antygen komórek proliferujących
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	(peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ coactivator 1 $\alpha$ ) - koaktywator receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów
<b>PGE, PGI</b>	prostaglandyny E, I
<b>PI</b>	(iodium propide) - jodek propidyny
<b>RFT</b>	reaktywne formy tlenu
<b>SA-<math>\beta</math>-Gal</b>	(senescence-associated $\beta$ -galactosidase) - $\beta$ -galaktozydaza związana ze starzeniem
<b>SFM</b>	(serum free media) - medium pozbawione surowicy
<b>SIRT</b>	sirtuiny
<b>SDS</b>	(sodium dodecyl sulfate) - sól sodowa siarczanu dodecyłu
<b>SOD</b>	(superoxide dismutase) - dysmutaza ponadtlenkowa
<b>t-BHP</b>	hydronadtlenek- <i>tert</i> -butylu
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	(transforming growth factor- $\beta$ 1) - transformujący czynnik wzrostu- $\beta$ 1
<b>TIMP</b>	(tissue inhibitor of metalloproteinase) - tkankowy inhibitor metaloproteinaz
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	(tumor necrosis factor $\alpha$ ) - czynnik martwicy nowotworów $\alpha$
<b>TRF</b>	(telomere repeat factor) - czynnik powtórzeń telomerowych



<b>TxB<sub>2</sub></b>	tromboksan B <sub>2</sub>
<b>VEGF</b>	(vascular endothelial growth factor) - czynnik wzrostu śródbłonna naczyń
<b>VCAM-1</b>	(vascular cell adhesion molecule-1) - cząsteczka adhezyjna komórek śródbłonna

## STRESZCZENIE

Resweratrol (3,4',5-trihydrokso-*trans*-stilben) jest naturalnie występującym polifenolem z grupy stilbenów, znanym z właściwości kardioprotekcyjnych, przeciwnowotworowych i przeciwzapalnych. W ostatnich latach dowiedziono, że wpływa on także na wydłużenie życia wielu organizmów modelowych, jak również wzrost możliwości proliferacyjnych komórek *in vitro*. Celem niniejszej rozprawy było określenie wpływu resweratrolu oraz jego trzech syntetycznych, dodatkowo hydroksylowanych pochodnych (3,3',4,4'-tetrahydrokso-*trans*-stilbenu, 3,3',4,4'-THS; 3,3',5,5'-tetrahydrokso-*trans*-stilbenu, 3,3',5,5'-THS; 3,3',4,4',5,5'-heksahydrokso-*trans*-stilbenu, 3,3',4,4',5,5'-HHS) na wykładniki replikacyjnego starzenia się ludzkich komórek mezotelium otrzewnowego (KM) *in vitro*.

Doświadczenia przeprowadzono na pierwotnych hodowlach KM, wyizolowanych z pobieranych śródoperacyjnie fragmentów sieci większej. Komórki eksponowane na związki badane w stężeniach 0,5 i 10  $\mu\text{M}$  pasażowano w regularnych odstępach czasu, aż do wyczerpania ich aktywności podziałowej. W toku badań oceniono takie parametry, jak: proliferację komórek (m.in. ekspresję antygenu PCNA oraz dystrybucję komórek w cyklu mitotycznym), liczbę osiąganych podziałów, częstość występowania apoptozy (wielkość frakcji subG<sub>1</sub>, kondensacja chromatyny jądrowej), ekspresję markerów starzenia się ( $\beta$ -galaktozydazę związaną ze starzeniem; SA- $\beta$ -Gal), produkcję reaktywnych form tlenu (RFT), aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), stopień oksydacyjnych uszkodzeń DNA (stężenie 8-hydrokso-2'-deoksyguanozyny; 8-OH-dG), masę mitochondriów, potencjał błony wewnętrznej mitochondriów, produkcję czynnika wzrostu śródbłónka naczyń (VEGF) i chemokiny CXCL8/IL-8 oraz zależną od KM proliferację komórek śródbłónka naczyniowego HMEC-1.

Badania wykazały, że resweratrol oraz 3,3',4,4'-THS zastosowane w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  w znaczący sposób zwiększają możliwości proliferacyjne KM *in vitro*, co stwierdzono zarówno w doświadczeniach ostrych (m.in. na podstawie wzrostu ekspresji antygenu PCNA oraz wzrostu odsetka komórek w fazie S cyklu), jak również na podstawie oceny osięganej przez komórki liczby podziałów. Efekt ten szedł w parze ze zmniejszeniem ekspresji i aktywności SA- $\beta$ -Gal. W przypadku 3,3',5,5'-THS oraz 3,3',4,4',5,5'-HHS zaobserwowano, że pomimo pobudzenia proliferacji komórek w systemie ostrym, związki te nie wpływają na wzrost osięganej przez komórki liczby podziałów. Dodatkowo 3,3',4,4'-

THS oraz 3,3',4,4',5,5'-HHS użyte w stężeniu 10  $\mu$ M wywierały działanie antyproliferacyjne w eksperymentach przewlekłych. Przeprowadzone badania dowiodły także, że obserwowane zmiany w proliferacji komórek pod wpływem resweratrolu oraz 3,3',4,4'-THS przebiegały w sposób niezależny od zmian długości telomerowego DNA, jak również nie były związane ze zmianami częstości występowania apoptozy. Wzrost wielkości frakcji komórek zawierających niskocząsteczkowe DNA (frakcji subG<sub>1</sub>) odnotowano tylko w przypadku 3,3',4,4'-THS oraz 3,3',4,4',5,5'-HHS użytych w stężeniu 10  $\mu$ M.

Poprawie możliwości proliferacyjnych komórek pod wpływem resweratrolu oraz 3,3',4,4'-THS towarzyszył trwały wzrost aktywności SOD — być może będący odpowiedzią na silny, lecz krótkotrwały wzrost produkcji RFT — oraz obniżenie stężenia 8-OH-dG. W przypadku 3,3',5,5'-THS oraz 3,3',4,4',5,5'-HHS pobudzenie aktywności SOD było zdecydowanie mniejsze i tylko chwilowe, a stopień uszkodzeń DNA w komórkach młodych był porównywalny z grupą kontrolną, natomiast w komórkach starych był istotnie wyższy. Oceniając metabolizm mitochondriów stwierdzono, że resweratrol oraz 3,3',4,4'-THS powodują nasilenie biogenezy tych organelli w komórkach młodych, czemu towarzyszyło obniżenie wartości potencjału ich błony wewnętrznej. Z kolei 3,3',5,5'-THS pobudzał biogenezę mitochondriów w komórkach młodych, a obniżał w starych, przy jednoczesnym wzroście potencjału ( $\Delta\Psi_m$ ) w obu grupach. 3,3',4,4',5,5'-HHS nie wpływał na masę mitochondriów, natomiast obniżał potencjał błony wewnętrznej zarówno w komórkach młodych i starych.

Stwierdzono ponadto, że resweratrol wpływa na obniżenie wydzielania VEGF oraz CXCL8/IL-8 przez młode KM, co przełożyło się na obniżenie proliferacji komórek śródbłonna naczyń HMEC-1 w odpowiedzi na medium kondycjonowane z hodowli KM. Pozostałe stilbeny wpływały na wzrost sekrecji VEGF oraz CXCL8/IL-8 (oprócz 3,3',5,5'-THS) w komórkach młodych i starych, co w tym przypadku wpłynęło na wzrost proliferacji komórek HMEC-1 (także za wyjątkiem 3,3',5,5'-THS).

Podsumowując można stwierdzić, że stilbeny, a konkretnie resweratrol oraz 3,3',4,4'-THS, mogą skutecznie wpływać na opóźnienie replikacyjnego starzenia się KM, a efekt ten może być związane z mobilizacją w komórkach mechanizmów antyoksydacyjnych oraz obniżeniem stopnia uszkodzeń DNA. Ponadto, resweratrol może być rozpatrywany w kontekście terapii przeciwnowotworowej, co związane jest z jego zdolnością do hamowania angiogenezy *in vitro*. Uzyskane wyniki badań wskazują na zasadność podjęcia

dalszych prac z wykorzystaniem stilbenów w kontekście ograniczenia rozwoju zależnych od KM patologii zachodzących w obrębie jamy otrzewnej, szczególnie powstawania wewnątrztrzewnowych przerzutów nowotworów.

## SUMMARY

Resveratrol (3,4',5-trihydroxy-*trans*-stilbene) is a naturally occurring stilbene known from cardioprotective, anti-inflammatory and anti-cancerogenic properties. It has recently been shown that resveratrol has also an ability to prolong the lifespan of various model organisms and to improve the proliferative capacity of cells *in vitro*. The goal of this dissertation was to determine the effect of resveratrol and its three synthetic, additionally hydroxylated analogues (3,3',4,4'-tetrahydroxy-*trans*-stilbene, 3,3',4,4'-THS; 3,3',5,5'-tetrahydroxy-*trans*-stilbene, 3,3',5,5'-THS; 3,3',4,4',5,5'-hexahydroxy-*trans*-stilbene, 3,3',4,4',5,5'-HHS) on indicators of replicative senescence in human peritoneal mesothelial cells (HPMCs) *in vitro*.

Experiments were performed in primary HPMC cultures established from the pieces of omentum, isolated during abdominal surgery. The cells were continuously exposed to stilbenes at the concentrations of 0,5 and 10  $\mu\text{M}$ , and were serially passaged until exhaustion of their proliferative capacity. During the experiments the following parameters were examined: cell proliferation (expression of PCNA antigen and cell distribution in the cell-cycle), number of divisions achieved, the incidence of apoptosis (subG<sub>1</sub> fraction, condensation of nuclear chromatin), expression of markers of senescence (senescence-associated  $\beta$ -galactosidase; SA- $\beta$ -Gal), production of reactive oxygen species (ROS), activity of superoxide dismutase (SOD), magnitude of oxidative DNA damage (concentration of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; 8-OH-dG), mitochondrial mass, mitochondrial membrane potential, production of vascular endothelial growth factor (VEGF) and chemokine CXCL8/IL-8, and HPMC-dependent proliferation of endothelial cells HMEC-1.

The results showed that both resveratrol and 3,3',4,4'-THS used at the concentration of 0,5  $\mu\text{M}$  markedly increased proliferative capacity of HPMCs *in vitro*, which was evidenced either in the short-term experiments (increased expression of PCNA antigen and increased fraction of cells in the S phase of the cell-cycle) or according to the number of divisions achieved by the cells before senescence. This effect coincided with decreased expression and activity of SA- $\beta$ -Gal. In the case of 3,3',5,5'-THS and 3,3',4,4',5,5'-HHS, it has been observed that despite some improvement of cell proliferation in acute experiments, they do not affect the number of population doublings achieved. In addition, 3,3',4,4'-THS and 3,3',4,4',5,5'-HHS used at the concentration of 10  $\mu\text{M}$  reduced HPMC lifespan in the

chronic experiments. Furthermore, the studies revealed that the observed changes in cell proliferative potential and senescence in response to resveratrol and 3,3',4,4'-THS were not associated with changes in the length of telomeric DNA as well as were not associated with changes in the incidence of apoptotic cell death. Increased fraction of cells with low molecular weight DNA fragments (subG<sub>1</sub> fraction) was found only in cells exposed to 3,3',4,4'-THS and 3,3',4,4',5,5'-HHS used at the concentration of 10  $\mu$ M.

Improved proliferative capacity of the cells upon treatment with resveratrol and 3,3',4,4'-THS coincided with a permanent increase in SOD activity — likely due to a strong, but temporary increase in ROS release — and a decline in a concentration of 8-OH-dG. In the case of 3,3',5,5'-THS and 3,3',4,4',5,5'-HHS the stimulation of SOD activity was significantly lower and only temporary. The magnitude of DNA damage in young cells was comparable with the control group but in the case of senescent cells it was significantly higher. The examination of mitochondrial metabolism showed that resveratrol and 3,3',4,4'-THS cause a remarkable increase in their biogenesis in young cells, which was followed by decreased values of the mitochondrial membrane potential in both groups. In turn, 3,3',5,5'-THS stimulated mitochondria biogenesis in young HPMCs, and decreased it in senescent ones, improving at the same time the values of membrane potential. 3,3',4,4',5,5'-HHS did not affect mitochondria mass, but decreased mitochondrial membrane potential in both young and senescent cells.

It has been found that resveratrol at the concentration of 0,5  $\mu$ M decreased production of VEGF and CXCL8/IL-8 by young HPMCs, which corresponded to decelerated proliferation of HMEC-1 cells in response to conditioned medium from HPMCs. Resveratrol analogues, in turn, stimulated production of VEGF and CXCL8/IL-8 (except 3,3',5,5'-THS) by young and senescent HPMCs dose-dependently, which resulted in an improved proliferation of HMEC-1 cells (except 3,3',5,5'-THS as well).

In conclusion, these findings indicate that stilbenes, in particular resveratrol and 3,3',4,4'-THS, may effectively decelerate the rate at which HPMCs senesce *in vitro*, and this effect is probably associated with mobilization of antioxidative mechanisms and reduction of oxidative DNA damage. Moreover, resveratrol may be considered in the context of the anti-cancer therapy, which is associated with its anti-angiogenic properties. The results obtained justify further studies on the stilbenes, especially with respect to reduction of the development of HPMC-dependent intraperitoneal pathologies, including cancer metastases.

”Wiele czyni młodość, wiele czyni wino.”

Talmud

## **WSTĘP**

### **1. Starzenie się społeczeństw jako współczesne wyzwanie demograficzne**

*Czym jest starzenie się?* Zjawisko to można zdefiniować jako naturalny, postępujący i nieuchronny proces, polegający na stopniowym wyczerpywaniu się rezerwy czynnościowej organizmu, prowadzący do upośledzenia zdolności reakcji na niekorzystne wpływy czynników środowiskowych oraz podwyższenia ryzyka wystąpienia określonych patologii oraz śmierci [1-3]. Proces starzenia się jest zjawiskiem uniwersalnym, a więc dotyczącym każdej osoby, w każdej populacji.

Osiągnięcia medycyny XX i XXI wieku — m.in. wynalezienie i wprowadzenie do użytku antybiotyków oraz upowszechnienie szczepień ochronnych — spowodowały stopniowy wzrost średniej długości życia mieszkańców krajów uprzemysłowionych (w tym także Polski), przy równoczesnym zachowaniu wysokiej sprawności psychofizycznej tych osób [4]. Obserwowany jednocześnie niski wskaźnik urodzeń spowodował, że odsetek osób w wieku podeszłym (powyżej 65 roku życia) stale rośnie, pociągając za sobą szereg wyzwań natury medycznej, ekonomicznej i społecznej. Najważniejszym medycznym aspektem starzenia się społeczeństw jest wzrost częstości zachorowań na tzw. choroby związane z wiekiem (ang. *age-associated diseases*), wśród których można wymienić m.in. choroby sercowo-naczyniowe, chorobę nowotworową i cukrzycę typu II [5].

Do najważniejszych wyzwań współczesnej medycyny oraz nauk pokrewnych można więc zaliczyć, z jednej strony, dalsze poszukiwania przyczyn i mechanizmów procesu starzenia się poszczególnych komórek i tkanek, a z drugiej, opracowywanie takich strategii terapeutycznych (farmakologicznych i nie tylko), które poprzez ingerencję w mechanizmy procesu starzenia się mogą pozytywnie wpłynąć na ograniczenie pojawiania się i/lub zahamowanie tempa rozwoju określonych patologii u osób starszych. Podczas gdy pierwszy aspekt badań nad starzeniem się realizowany jest z dużym powodzeniem, szczególnie dzięki zastosowaniu coraz to nowocześniejszych metod badawczych, nadal niewiele wiadomo na temat związków naturalnych lub syntetycznych, które mogłyby choć w pewnym stopniu spowalniać tempo starzenia się oraz modulować przebieg chorób związanych z wiekiem. Właśnie temu ostatniemu zagadnieniu, w aspekcie badań substancji o potencjalnym działaniu przeciwstarzeniowym, poświęcona jest niniejsza rozprawa.

## 2. Teorie starzenia się

Proces starzenia się jest zjawiskiem o charakterze osobniczo-specyficznym, zachodzącym na kilku poziomach organizacji ustroju, tj. na poziomie struktur subkomórkowych, poszczególnych komórek i tkanek, narządów/układów oraz całej populacji [6]. Do dnia dzisiejszego sformułowano wiele teorii, których celem było wyjaśnienie natury procesu starzenia się, jednak jak dotąd żadna z nich nie była na tyle kompletna, aby w pełni wyjaśnić wszystkie zmiany zachodzące w organizmie w trakcie starzenia się. Innymi słowy, złożoność tego zjawiska uniemożliwiła stworzenie teorii uniwersalnej. Spowodowała natomiast wyodrębnienie się kilku grup teorii, które można w najogólniejszym zarysie podzielić na ewolucyjne (odpowiadające na pytanie: „Dlaczego się starzejemy?”, tj. jaki jest biologiczny sens tego procesu?) i mechanistyczne (odpowiadające na pytanie: „Jak się starzejemy?”, czyli jaki jest mechanizm starzenia się?). Najważniejsze z zaproponowanych dotychczas teorii starzenia się (a w sumie powstało ich ponad 300 [7]) zostały zebrane i krótko scharakteryzowane w tabelach 1 i 2.

### 2.1. Teorie ewolucyjne

Punktem wyjścia do rozważań nad ewolucyjnym uwarunkowaniem procesu starzenia się jest obserwacja, że w warunkach naturalnych, zwierzęta się nie starzeją. Wynika to z wysokiej śmiertelności uwarunkowanej środowiskowo (tzw. *external mortality*), na którą składają się m.in. głód, choroby, wyziębienie, ataki drapieżników, działalność człowieka oraz przegęszczenie populacji. Można więc stwierdzić, że zwierzęta żyjące na wolności, żyją zbyt krótko, aby się zestarzeć. Zasadniczo tylko trzy grupy zwierząt doświadczają procesu starzenia się. Są to zwierzęta utrzymywane w warunkach chronionych (laboratoria, ogrody zoologiczne), zwierzęta cechujące się dużymi rozmiarami i ogromną siłą (np. słonie) oraz zwierzęta żyjące w odosobnieniu (żółwie z Wysp Galapagos).

Ewolucja gatunku *Homo sapiens*, której najważniejsze etapy miały miejsce wiele tysięcy lat temu, rządziła się tymi samymi prawami, co ewolucja innych gatunków zwierząt. Tak więc i w tym przypadku, człowiek pierwotny narażony był na wysoką śmiertelność z przyczyn środowiskowych. Należy także wziąć pod uwagę, że wszelkie cechy związane z procesem starzenia się występują dopiero w okresie poreprodukcyjnym, co oznacza, że siły doboru naturalnego nie „interesowały się” genami warunkującymi pojawienie się oznak starzenia się. Dobór naturalny, bowiem, ingeruje tylko w te geny/cechy (np. promując lub eliminując je), które mają realny wpływ na proces rozrodczy. Jeśli dany gen/cecha nie



rzutują na sprawność rozrodczą osobnika (nawet jeśli są bardzo dla niego niekorzystne), dobór naturalny pozostawia je w genomie bez zmian. Tak prawdopodobnie stało się w przypadku szeregu genów związanych z procesem starzenia się [8]. Obecnie uważa się, że z punktu widzenia ewolucji, starzenie się jest zjawiskiem uwarunkowanym genetycznie, natomiast jedyne rozbieżności jakie istnieją w tej materii dotyczą natury tych genów. Mogą to być bowiem geny determinujące rozwój określonych cech ustroju albo geny związane z jego gospodarką energetyczną (Tabela 1). Niezależnie jednak od tego, jaki charakter mają owe geny, ważne jest to, że proces starzenia się okazuje się być formą zapłaty, którą organizm musi w pewnym wieku uiścić w zamian za wcześniejszy i związany z ich aktywnością skuteczny rozród (tzw. *trade-off theory*) [9].

**Tabela 1. Ewolucyjne teorie starzenia się.**

Twórca, rok	Nazwa teorii	Podstawowe założenia	Źródło
Peter Medawar, 1952	Teoria akumulacji mutacji	Mutacje genów, które ujawniają się po okresie rozrodczym nie zostają eliminowane z populacji ze względu na słabnące z wiekiem siły doboru naturalnego.	[8]
George Williams, 1957	Teoria antagonistycznej plejotropii	Geny będące korzystne dla organizmu w okresie rozrodczym, w późniejszym okresie życia zaczynają wywierać efekty niekorzystne.	[10]
Tom Kirkwood, 1977	Teoria ciała jednorazowego użytku	Geny decydujące o rozdziale zasobów energetycznych faworyzują procesy reprodukcyjne kosztem procesów naprawy uszkodzeń w komórkach.	[11]

Wśród wielu analiz przeprowadzonych w kontekście ewolucji procesu starzenia się człowieka, na szczególną uwagę zasługują badania opisujące dużą populację brytyjskich arystokratek. Badania te, oparte o analizę zapisów w księgach parafialnych (daty urodzeń i zgonów, dietność, wiek matki w chwili urodzenia dziecka) potwierdziły słuszność podstawowych założeń ewolucyjnych teorii starzenia się, wskazując, że istnieje zależność między rozrodczością a długością życia. Wykazały one, że najdłużej żyły te kobiety, które były bezdietne lub urodziły najwyżej jedno dziecko. Im więcej potomstwa wydała na świat dana kobieta, tym krótszy był czas jej życia. Autorzy tej pracy zaobserwowali jeszcze jedną prawidłowość, a mianowicie dodatnią zależność między długością życia kobiet a wiekiem

w którym urodziły swoje pierwsze dziecko; kobiety żyły tym dłużej, im później zostały po raz pierwszy matkami [12].

## 2.2. Teorie mechanistyczne

Zadaniem mechanistycznych teorii starzenia się jest wyjaśnienie tych aspektów omawianego zjawiska, które są odpowiedzialne za narastającą wraz z wiekiem dysfunkcję komórek i narządów, prowadzącą ostatecznie do śmierci organizmu. Punktem wyjścia dla poszczególnych teorii są różne aspekty funkcjonowania ustroju, począwszy od tempa przemiany materii, poprzez zmiany w działaniu niektórych układów (np. hormonalnego i immunologicznego), kończąc na zmianach obserwowanych w budowie i funkcji komórek oraz tworzących je makrocząsteczek. Na dzień dzisiejszy, to właśnie różne populacje komórek somatycznych są najpopularniejszymi modelami badawczymi, wykorzystywanymi w badaniach procesu starzenia się.

### Tabela 2. Najważniejsze mechanistyczne teorie starzenia się.

W tabeli uwzględniono tylko te teorie, których słuszność (częściowa lub całkowita) została potwierdzona na drodze doświadczalnej.

Twórca, rok	Nazwa teorii	Podstawowe założenia	Źródło
August Weismann, 1892	Teoria zużycia	Komórki i tkanki ulegają z czasem zużyciu, czego odzwierciedleniem jest starzenie się człowieka i śmierć.	[13]
Max Rubner, 1908	Teoria tempa życia	Starzenie się postępuje tym szybciej, im szybszy jest metabolizm organizmu.	[14]
Clive McCay, 1935	Teoria restrykcji kalorycznej	Ograniczenie kaloryczności posiłku wydłuża średnią i maksymalną długość życia zwierząt doświadczalnych.	[15]
Denham Harman, 1956	Teoria wolnorodnikowa	Starzenie się jest efektem nagromadzenia uszkodzeń makrocząstek spowodowanych przez działanie reaktywnych form tlenu.	[16]
Leo Szilard, 1959	Teoria mutacji somatycznych	Starzenie się jest spowodowane gromadzeniem mutacji DNA.	[17]

Leslie Orgel, 1963	Teoria nagromadzenia błędów	Starzenie się jest spowodowane wzrostem częstości błędów w procesach transkrypcji i translacji.	[18]
Leonard Hayflick, 1965	Teoria starzenia komórkowego	Komórki somatyczne charakteryzują się skończoną liczbą podziałów.	[19]
William Alexander, 1967	Teoria mitochondrialna	Starzenie się jest spowodowane nagromadzeniem uszkodzeń mitochondrialnego DNA.	[20]
Roy Walford, 1969	Teoria immunologiczna	Starzenie się związane jest ze spadkiem wydolności immunologicznej organizmu.	[21]
Aleksej Olovnikov, 1973	Teoria końca replikacji	Starzenie się jest skutkiem niezdolności polimerazy DNA do pełnej syntezy nici potomnych i związanego z tym skracania się telomerów.	[22;23]
Imre Nagy, 1978	Teoria błonowa	Przyczyną starzenia się są zmiany w strukturze błon biologicznych.	[24]
Vincent Monnier, 1981	Teoria glikacyjna	Nasilona glikacja białek powoduje nasilenie ich usieciowania, co przyczynia się do starzenia się organizmu.	[25]
Anthony Cerami, 1985	Teoria glukozowa	Starzenie się jest efektem narastającego z wiekiem stężenia glukozy we krwi.	[26]
Calvin Harley, 1990	Teoria telomerowa	Skracanie telomerów jest przyczyną starzenia się komórek.	[27]
Ulf Brunk, 2002	Teoria osi mitochondrialno-lizosomalnej	Nagromadzenie uszkodzonych mitochondriów sprzyja starzeniu się komórek.	[28]

### 3. Proces starzenia się na poziomie komórkowym

Choć badania procesu starzenia się na poziomie komórkowym, prowadzone jeszcze z wykorzystaniem komórek ptaków, zaczęły się na początku XX wieku, przez wiele lat właściwe zrozumienie tego zjawiska było skutecznie utrudniane przez popularne wówczas koncepcje prominentnego badacza, Alexisa Carrel'a, zgodnie z którymi prawidłowe komórki są nieśmiertelne, jeśli tylko zapewni się im optymalne warunki wzrostu *in vitro* [29]. Teza

ta, zakładająca, iż proces starzenia się jest pochodną wyłącznie zjawisk natury egzogennej (np. promieniowania UV), okazała się błędna, czego dowiedli jako pierwsi Hayflick i Moorhead w 1961 roku [30]. Wykazali oni, że nawet w zoptymalizowanych warunkach wzrostu, prawidłowe ludzkie komórki somatyczne mogą podzielić się tylko określoną liczbę razy, po czym wchodzi one w fazę bezpodziałową, określaną obecnie mianem replikacyjnego starzenia się (ang. *replicative senescence*). Do dnia dzisiejszego, maksymalną liczbę podziałów, jaką dana komórka przechodzi do momentu zestarzenia się, określa się mianem limitu Hayflicka [31]. Hayflick zasugerował także jako pierwszy, że replikacyjne starzenie się komórek, obserwowane w warunkach hodowli *in vitro*, może odzwierciedlać pewne aspekty starzenia się organizmu człowieka jako całości *in vivo*. Tezę tę wysnuł na podstawie obserwacji odwrotnej zależności pomiędzy potencjałem proliferacyjnym komórek a kalendarzowym wiekiem ich dawcy [19].

Doświadczenia i wnioski Hayflicka zostały w ciągu ostatnich 50 lat powtórzone i potwierdzone w laboratoriach na całym świecie, doprowadzając do ugruntowania się badań procesu starzenia na modelach komórkowych. Dziś wiadomo już, że po osiągnięciu limitu Hayflicka komórki stare zatrzymują swe podziały w fazie G<sub>1</sub> cyklu komórkowego, czemu towarzyszy szereg zmian w ich morfologii i funkcji. Do najważniejszych cech tzw. fenotypu komórek starych (ang. *senescence phenotype*) zalicza się: zwiększenie rozmiarów, spłaszczenie i utratę charakterystycznego kształtu [32], pojawienie biochemicznych markerów starzenia się (np. enzymu β-galaktozydazy związanej ze starzeniem się; SA-β-Gal) [33], gromadzenie rozległych uszkodzeń DNA (szczególnie pęknięć obu nici DNA) [34] oraz zmianę właściwości wydzielniczych komórek [35].

#### **4. Starzenie się komórek zależne od zmian w długości i budowie telomerów**

Choć dziełem Leonarda Hayflicka było opisanie fenomenologii procesu starzenia się na modelu ludzkich fibroblastów płucnych, daleki był on od zidentyfikowania molekularnego mechanizmu odpowiedzialnego za stopniowe wyczerpywanie się potencjału podziałowego komórek. Odkryć tych dokonano pod koniec XX wieku, kiedy to postęp technologiczny zaowocował m.in. stwierdzeniem, że za zjawisko replikacyjnego starzenia się fibroblastów odpowiada, towarzyszący kolejnym podziałom mitotycznym, proces skracania się telomerów [27]. Telomery są to dystalne fragmenty ramion wszystkich chromosomów, zbudowane z wielu tysięcy powtórzeń niekodującej sekwencji 5'-TTAGGG-3'. Funkcja tych struktur polega na zabezpieczeniu chromosomów przed spontanicznym łączeniem się,

nieprawidłową rekombinacją i degradacją. Działanie to jest możliwe dzięki charakterystycznej, pętlowej budowie telomeru, w której wystający koniec 3' (ang. 3' *overhang*) jest osłaniany przez odcinki dwuniciowe, a całość stabilizowana jest za pomocą białek TRF (ang. *telomere repeat factor*) i POT [36]. Jak stwierdzono na przykładzie fibroblastów, z każdym podziałem komórkowym, telomerowe DNA ulega skróceniu o około 50-200 par zasad (bp) na jedno podwojenie populacji [27]. Uważa się, że za skracanie się telomerów odpowiadają dwa zjawiska: tzw. problem replikacji końca (ang. *end-replication problem*) oraz działanie stresu oksydacyjnego [37].

Problem replikacji końca wynika z właściwości enzymu odpowiedzialnego za syntezę potomnych nici DNA (polimerazy DNA), która pracując tylko w kierunku 5' → 3' jest w stanie budować nić potomną w sposób ciągły jedynie na matrycy macierzystej nici wiodącej. Na matrycy nici opóźnionej syntetyzuje ona nowe DNA w sposób skokowy, za pomocą krótkich fragmentów Okazaki. Ważną rolę w procesie syntezy nowych nici DNA pełnią startery RNA, od których rozpoczyna się synteza DNA na obu niciach, a które w końcowych etapach replikacji są usuwane, a powstające po nich przerwy scalane dzięki aktywności ligaz. Proces replikacji DNA przebiega bez zakłóceń aż do momentu jego zbliżenia się do końca chromosomu. Wtedy to właśnie, wycięcie ostatniego startera RNA na końcu nici opóźnionej powoduje, że brakuje miejsca mogącego stanowić matrycę dla polimerazy DNA w toku syntezy kolejnego fragmentu Okazaki. Pozostawiona wówczas luka nie zostaje wypełniona, co powoduje, że z każdym kolejnym podziałem telomer staje się coraz krótszy [38;39]. W momencie, gdy telomer osiąga wartość krytyczną — zazwyczaj typową dla danego typu komórek — zostają uruchomione określone mechanizmy efektorowe na poziomie cyklu mitotycznego i komórka ostatecznie przestaje się dzielić.

Czynnikiem o dużym znaczeniu dla stopniowej erozji telomerowego DNA jest także uszkodzające działanie reaktywnych form tlenu (RFT). Jak wykazały badania zespołu von Zglinickiego, stres oksydacyjny przyspiesza skracanie się telomerów, co udokumentowano na przykładzie fibroblastów rosnących w warunkach podwyższonej prężności parcjalnej tlenu (z 3% do około 40%). Stwierdzono, że w tych komórkach tempo skracania się telomerów wzrosło ponad pięciokrotnie (z 90 bp do 500 bp na podział), czego efektem było zatrzymanie proliferacji komórek zaledwie po kilku podwojeniach populacji [40].

Co istotne, oprócz samego faktu skracania się telomerów, niebagatelne znaczenie dla indukcji starzenia się komórek ma otwieranie ich pętlowej struktury i ekspozycja wolnego końca 3' (ang. *uncapping*) [41]. Stwierdzono m.in., że otwarcie pętli telomeru za pomocą

dominująco-negatywnej ekspresji białka TRF2 spowodowało przedwczesne zatrzymanie podziałów komórkowych, któremu towarzyszyło pojawienie się morfologicznych i biochemicznych oznak komórkowego starzenia się [42].

Na chwilę obecną proces replikacyjnego starzenia się uznaje się za reakcję komórek na rozległe uszkodzenia DNA, zlokalizowane w obrębie telomerów. Dowodem na to jest gromadzenie się w komórkach starych ufosforylowanego wariantu histonu H2A.X (tzw.  $\gamma$ -H2A.X), który przyłącza się do miejsc pęknięć dwuniciowego DNA. Jak wykazały badania na fibroblastach, nawet 80-90% komórek starych zawiera ogniska  $\gamma$ -H2A.X, które zlokalizowane są w obrębie sekwencji telomerowych [43]. Ostatecznych argumentów potwierdzających znaczenie telomerów w procesie replikacyjnego starzenia się dostarczyły badania z wykorzystaniem katalitycznej podjednostki telomerazy (hTERT), tj. enzymu odbudowującego telomery m.in. w komórkach nowotworowych. Badania te wykazały, że ektopowa ekspresja hTERT w fibroblastach skórnych spowodowała rekonstrukcję telomerów oraz wydłużenie możliwości podziałowych komórek ponad typowy dla nich limit Hayflicka [44]. Ponadto wprowadzenie podjednostki hTERT do starych fibroblastów spowodowało wydłużenie telomerów i podjęcie na nowo aktywności podziałowej [45].

Szlaki efektorowe procesu replikacyjnego starzenia się są związane z rozpoznawaniem przez mechanizmy kontrolujące cykl podziałowy krytycznych zmian w długości i budowie telomerów jako poważnych i zagrażających komórce uszkodzeń DNA. W takim wypadku nagromadzenie się ufosforylowanej (wskutek aktywności m.in. kinazy ATM) formy histonu H2A.X oraz rekrutacja takich białek, jak 53BP1 i MRE11 powodują dalszą aktywację białka supresorowego p53, czyli tzw. „strażnika genomu”. Zaktywowane białko p53 powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego, czyniąc to samodzielnie lub za pośrednictwem swego białka efektorowego p21. Białko p21 wywiera działanie poprzez unieczynnienie cyklinozależnych kinaz 4 i 6 (CDK4, CDK6) oraz układu CDK2-cyklina E. Skutkiem tych zjawisk jest zahamowanie fosforylacji białka retinoblastoma (pRb) i zatrzymanie cyklu komórkowego na etapie fazy G<sub>1</sub> [46;47]. Czynniki regulujące przebieg cyklu komórkowego przedstawia **rycina 1**.

## **5. Starzenie się komórek niezależne od telomerów**

W przypadku niektórych typów komórek pochodzenia nabłonkowego, w tym nabłonka gruczołu piersiowego i prostaty oraz w keratynocytach, proces komórkowego starzenia się przebiega w sposób niezależny od zmian zachodzących w telomerach. Jak stwierdzono m.in.

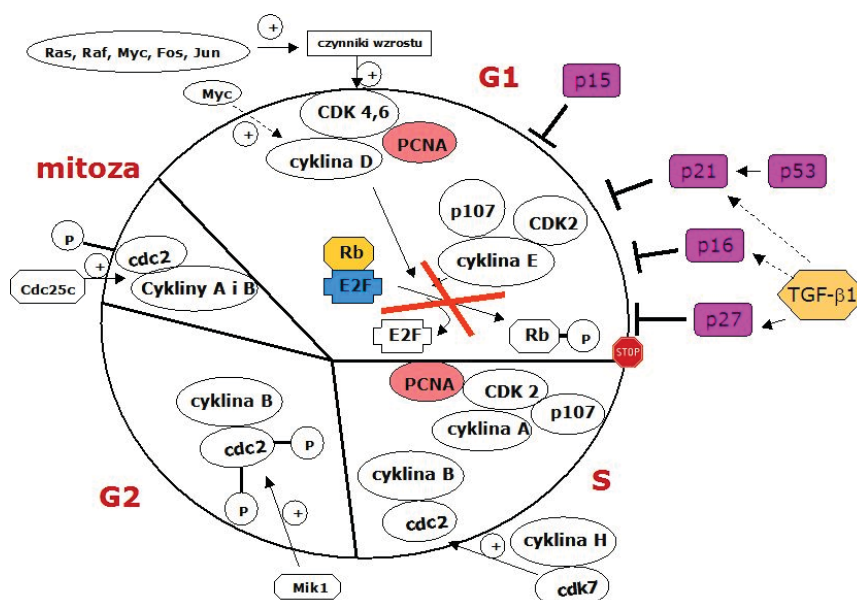
na przykładzie keratynocytów, komórki te starzeją się przy zachowanej wyjściowej długości telomerów [48]. Dodatkowym dowodem, sugerującym brak zaangażowania tych struktur w starzenie się komórek nabłonkowych była obserwacja, że ektopowa ekspresja hTERT nie jest czynnikiem wystarczającym do ich unieśmiertelnienia. Skutek taki osiągnięto dopiero wówczas, gdy reaktywację telomerazy połączono z zahamowaniem aktywności białka inhibitorowego cyklu komórkowego, p16 [49].

Białko p16 pełni w komórce funkcję inhibitora kompleksów CDK4/CDK6/cyklina D, których zadaniem jest fosforylacja białka pRb. Wskutek wzrostu ekspresji białka p16 w komórkach starych dochodzi do utrzymywania białka pRb w formie nieufosforylowanej, w wyniku czego komórka nie może pokonać punktu restrykcyjnego G<sub>1</sub>/S [50]. Rolę tego białka, jako potencjalnego mediatora procesu starzenia się komórek nabłonkowych gruczołu piersiowego oraz keratynocytów potwierdziły badania Ramirez i wsp. [51], którzy wykazali, że na wzrost ekspresji tego inhibitora i związane z tym zatrzymanie podziałów komórkowych wydatnie wpływają warunki, w jakich prowadzona jest hodowla *in vitro*. Autorzy zwracają uwagę na wysoce niefizjologiczny czynnik, jakim jest wzrost komórek na powierzchniach plastikowych, zamiast na biogodnych elementach macierzy pozakomórkowej. Wskutek wielokrotnego pasażowania hodowli keratynocytów i komórek nabłonkowych gruczołu piersiowego, starzenie się tych grup komórek następowało relatywnie wcześnie, tj. po przebyciu około 10-20 podwojeń populacji, a zjawisku temu towarzyszył wzrost ekspresji białka p16. Z drugiej strony, gdy komórki posiano w warunkach zoptymalizowanych, tj. na tzw. warstwach odżywczych (ang. *feeder layers*), uformowanych z fibroblastów potraktowanych mitomycyną C, komórki wykazywały dwukrotny wzrost potencjału proliferacyjnego, który szedł w parze z obniżeniem ekspresji białka p16 [51]. Ponadto, jak wykazały badania innej grupy naukowców, poprawa warunków wzrostu komórek pochodzenia nabłonkowego spowodowała, że możliwe było ich unieśmiertelnienie poprzez ektopową ekspresję hTERT, bez jednoczesnej inaktywacji białka p16 [52].

Wpływ czynników związanych ze środowiskiem hodowlanym na proces starzenia się komórek niezależny od zmian długości telomerów, lecz zależny od białka p16, zaowocował powstaniem koncepcji, iż komórki pochodzenia nabłonkowego charakteryzują się wysoką wrażliwością na niefizjologiczne warunki panujące w hodowlach *in vitro*. Oprócz wzrostu na powierzchniach plastikowych, do grupy tych czynników można zaliczyć także brak heterogennych oddziaływań między różnymi populacjami komórek (sąsiadującymi ze sobą

*in vivo*), szkodliwy wpływ trypsyny stosowanej podczas pasażowania hodowli oraz przewlekłą ekspozycję komórek na stres oksydacyjny, związany z prowadzeniem hodowli w warunkach wysokiej, atmosferycznej prężności tlenu. Całość tych zjawisk, mogących w wydatny sposób wpływać na przyspieszone starzenie się komórek, określa się mianem szoku hodowlanego (ang. *culture shock*) [53;54].

Warto wspomnieć także i o tym, że w przypadku komórek wykazujących niewielkie możliwości proliferacyjne i starzejących się bez zmian w długości i budowie telomerów, zdecydowana większość uszkodzeń DNA ( $\gamma$ -H2A.X) zlokalizowana jest w nietelomerowych fragmentach genomu [55].



**Rycina 1. Czynniki regulujące przebieg cyklu komórkowego.** Prawidłowy przebieg cyklu komórkowego opiera się na zsynchronizowanym działaniu cyklinozależnych kinaz (CDK) z ich białkowymi aktywatorami — cyklinami. Warunkiem rozpoczęcia kolejnej rundy replikacji jest przejście punktu restrykcyjnego G1/S, co oznacza fosforylację białka pRb i odłączenie od niego czynnika transkrypcyjnego E2F. W komórkach starych, fosforylacja pRb jest zahamowana wskutek działania szeregu inhibitorów cyklu, w tym układu białek p53-p21 (w starzeniu telomerozależnym) oraz p16 (w starzeniu telomeroniezależnym). Symbolem ⊕ zaznaczono na rycinie efekty pobudzające.

## 6. Rola stresu oksydacyjnego w procesie starzenia się komórek

Stres oksydacyjny, rozpatrywany jako dysproporcja między produkcją reaktywnych form tlenu (RFT) a ich usuwaniem przez systemy antyoksydacyjne, jest czynnikiem zaangażowanym zarówno w starzenie komórek telomerozależne, jak i telomeroniezależne.



W kontekście procesu starzenia się komórek, źródła stresu oksydacyjnego — szczególnie w rozumieniu (nad)produkcji RFT — można podzielić na endogenne i egzogenne.

W pierwszym przypadku, główną, a zarazem najbardziej fizjologiczną przyczyną powstawania RFT są mitochondrialne procesy czteroelektronowej redukcji tlenu, które w części (sięgającej 1-4%) mogą kończyć się przedwcześnie, na formach wolnorodnikowych (anionorodnik ponadtlenkowy, rodnik hydroksylowy) i innych (nadtlenek wodoru) [56]. Stwierdzono, że w miarę starzenia się komórek, mitochondrialna „ucieczka” RFT znacząco wzrasta, czego przyczyny upatruje się m.in. w nasileniu aktywności takich enzymów, jak dehydrogenaza NADH i oksydaza cytochromu c [57]. Niebagatelne znaczenie w tym kontekście mają inne zdarzenia, dziejące się w mitochondriach komórek starych. Wymienić tu należy zjawisko tzw. wstecznej odpowiedzi sygnałowej (ang. *retrograde signaling response*), opisane po raz pierwszy na przykładzie fibroblastów, którego istotą jest wzmocnienie biogenezy mitochondriów w komórkach starych (prowadzące do nadprodukcji RFT) w odpowiedzi na obniżającą się ich zdolność do generowania ATP (spadek potencjału błony mitochondriów) [58].

Oprócz tego, że mitochondria stanowią podstawowe źródło RFT w komórce, są one też pierwszymi „ofiarami” działania tych niszczących molekuł. Dane literaturowe wskazują, że uszkodzenia DNA, które związane są z procesem starzenia się dotyczą głównie mitochondrialnego DNA (mtDNA) [59]. Ta forma DNA wydaje się być bardziej narażona na działanie RFT niż DNA jądrowe, zarówno ze względu na sąsiedowanie z miejscem ich powstawania, jak również ze względu na brak białek histonowych, pełniących funkcje ochronne oraz niższą sprawność mechanizmów naprawiających uszkodzenia [60]. Najczęstszą oksydacyjną modyfikacją DNA jest 8-hydrokso-2'-deoksyguanozyna (8-OH-dG), co wynika z faktu, że spośród zasad azotowych tworzących DNA, to właśnie guanina jest najbardziej podatna na utlenianie. Wykazano, że zawartość 8-OH-dG w komórkach starych jest wyższa w porównaniu z komórkami młodymi, co także można uznać za jeden z dowodów na zaangażowanie stresu oksydacyjnego w proces starzenia się na poziomie komórkowym [61].

Innym ważnym źródłem endogennego stresu oksydacyjnego, towarzyszącego zarówno procesowi starzenia się, jak i cukrzycy, jest metabolizm podwyższonych stężeń glukozy [62]. Jak wykazały liczne badania, glukoza występująca w podwyższonym stężeniu powoduje wzrost generowania RFT w mitochondriach, czego przyczyny można upatrywać w nasilonej biogenezie tych organelli [63]. Ważne w tym kontekście jest także i to, że skutkiem

ekspozycji komórek na podwyższone stężenie glukozy (i związany z tym stres oksydacyjny) jest ograniczenie ich potencjału proliferacyjnego oraz przyspieszony rozwój szeregu oznak procesu starzenia się [63-65].

Jako przyczyny egzogenego stresu oksydacyjnego, mogącego działać jako czynnik spustowy procesu starzenia się komórek, można wymienić wzrost komórek w warunkach hiperoksji [40] oraz działanie utleniaczy (np. t-BHP i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [66;67]. Warto zwrócić uwagę, że komórki wykorzystywane jako modele procesu starzenia się, podlegają ekspozycji na działanie wysokiego ciśnienia parcjalnego tlenu już w momencie izolowania ich z tkanki *in vivo*, co wydaje się w dużej mierze przekładać na ich dalsze losy, w tym możliwości podziałowe *in vitro* [68].

Innym ważnym aspektem starzenia się komórek, a zarazem drugą (obok nadprodukcji RFT) stroną medalu w aspekcie rozwoju stresu oksydacyjnego, jest działanie mechanizmów antyoksydacyjnych. Badania z wykorzystaniem hodowli komórek w warunkach niskiej prężności tlenu lub w obecności antyoksydantów pozwoliły ustalić, że redukcja stresu oksydacyjnego zmniejsza tempo skracania się telomerów oraz wpływa na wzrost możliwości proliferacyjnych komórek *in vitro* [69;70]. Na szczególną uwagę w tym kontekście zasługuje zewnątrzkomórkowa izoforma dysmutazy ponadtlenkowej (EC-SOD). Jak wykazały badania prowadzone na różnych typach fibroblastów, te komórki, które charakteryzowały się wysokim potencjałem podziałowym (np. fibroblasty skórne) posiadały wyższą aktywność EC-SOD od komórek o niższej aktywności proliferacyjnej (np. fibroblastów płucnych) [71].

## 7. Stilbeny

Stilbeny należą do naturalnych polifenoli. Najlepiej poznanym przedstawicielem tych związków jest resweratrol (3,4',5-trihydroksy-*trans*-stilben). Po raz pierwszy związek ten został wyizolowany w 1940 roku z korzenia ciemniżycy wielokwiatowej (*Veratrum grandiflorum*), a w 1976 roku zidentyfikowano go w skórkach winogron [72-74]. Synteza resweratrolu w roślinach następuje w odpowiedzi na światło ultrafioletowe (UV-B, UV-C) i uznawana jest za jeden ze sposobów ich walki z zakażeniami grzybiczymi [75].

Resweratrol występuje w winogronach białych, jak i czerwonych, stąd obecny jest także w białym i czerwonym winie. Stężenie tego związku w winach mieści się w zakresie od 0,2 mg/l do 7,7 mg/l, a różnice te są pochodną warunków klimatycznych w winnicy (szczególnie nasłonecznienia), szczepów winogron i warunków dojrzewania win. Czerwone wina cechuje wyższe stężenie resweratrolu, co jest spowodowane różnicami w procesie winifikacji — do

produkcji win czerwonych używa się całego grona (najwyższe stężenie resweratrolu jest w skórce tych owoców), w przeciwieństwie do białego wina, produkowanego z miąższu pozbawionego skórki [76]. Oprócz winogron i wina, resweratrol możemy znaleźć również w orzeszkach ziemnych, owocach morwy i jagodach, natomiast jego największe stężenie występuje w wysuszonych korzeniach i łodygach rdestu japońskiego (*Polygonum cuspidatum*) [77].

To właśnie obecności resweratrolu przypisuje się wywoływanie tzw. „francuskiego paradoksu”, tj. zjawiska, w którym stopień śmiertelności z powodu chorób naczyń wieńcowych we Francji jest niższy niż w innych państwach o podobnym ryzyku występowania tych chorób [78]. Uważa się, że ma to prawdopodobnie związek z ilością wypijanego przez Francuzów czerwonego wina [79-81].

Po spożyciu, resweratrol jest metabolizowany w hepatocytach, gdzie przy udziale cytochromu P450 przekształcany jest do 3,3',4',5-tetrahydroksy-stilbenu oraz drugiego tetrahydroksy-stilbenu, określanego jako M1 [82].

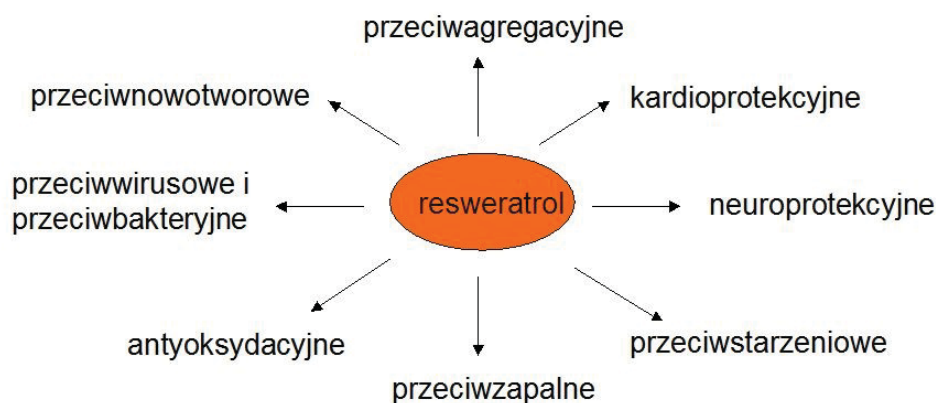
## **8. Właściwości biologiczne resweratrolu**

Lata 90-te ubiegłego wieku przyniosły nową falę zainteresowania resweratrolem, którego aktywność zaczęto utożsamiać z działaniem kardioprotekcyjnym, przeciwnowotworowym i przeciwzapalnym. Pojawiły się także doniesienia, bazujące szczególnie na badaniach na organizmach niższych, że związek ten może także wykazywać działanie opóźniające proces starzenia się.

### **8.1. Działanie ochronne na układ sercowo-naczyniowy**

Badania dotyczące właściwości resweratrolu wskazują na jego wielokierunkowe działanie w zapobieganiu chorobom układu krążenia. Stwierdzono, że związek ten ma zdolność obniżania stopnia utleniania lipoprotein o niskiej gęstości (LDL), uczestniczących w powstawaniu blaszki miażdżycowej [83;84]. Innym efektem działania resweratrolu w kontekście ochrony układu sercowo-naczyniowego jest jego działanie hamujące aktywność płytek krwi. Stwierdzono, że wywiera on działanie antyadhezyjne i antyagregacyjne. Badania wykazały m.in., że godzinna inkubacja płytek krwi z resweratrolem obniża stopień ich adhezji o 32% [85-87]. Uważa się także, że za hamowanie agregacji płytek pod wpływem resweratrolu może odpowiadać jego wpływ na hamowanie aktywności cyklooksygenazy-1 (COX-1) [87]. Innym opisanym działaniem

resweratrolu jest wpływ na rozszerzanie naczyń krwionośnych pod wpływem wzmożonej produkcji tlenku azotu (NO), za co odpowiada pobudzenie aktywności śródbłonkowej izoformy syntazy tlenku azotu (eNOS) [88;89].



**Rycina 2. Najważniejsze biologiczne właściwości resweratrolu.**

Mechanizmy działania kardioprotekcyjnego, przeciwnowotworowego, przeciwwzpalnego i przeciwarzysteniowego resweratrolu zostały szczegółowo opisane w tekście pracy.

W dużej mierze, działanie kardioprotekcyjne resweratrolu jest utożsamiane z jego właściwościami antyoksydacyjnymi. Aktywność antyoksydacyjna resweratrolu wyraża się poprzez hamujący wpływ na wewnątrzkomórkową produkcję RFT [90], zwiększenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej [91] oraz stężenia glutationu zredukowanego (GSH) [92], a także przez zahamowanie utleniania lipidów zawartych w błonie komórkowej [93]. Bartelli i wsp. oceniając hamowanie powstawania RFT pod wpływem resweratrolu zawartego w winie wykazali, że związek ten ogranicza powstawanie rodników hydroksylowych, co przypisuje się jego synergistycznemu działaniu z innymi polifenolami obecnymi w tym trunku [94]. Zaobserwowano, że w aspekcie hamowania peroksydacji lipidów błonowych, za którą w głównej mierze odpowiada rodnik hydroksylowy, resweratrol wykazuje aktywność wyższą niż witaminy E i C [95]. Antyoksydacyjne właściwości resweratrolu mogą być także konsekwencją przyłączonych grup fenolowych do pierścienia aromatycznego. Stwierdzono, że właściwości antyoksydacyjne resweratrolu wzrastają, gdy pierścień zawiera grupy hydroksylowe w pozycji *orto* [96].

## 8.2. Działanie przeciwnowotworowe

Jak wykazały liczne badania, resweratrol może hamować wszystkie etapy kancerogenezy, w tym procesy inicjacji, promocji i progresji komórek nowotworowych [97]. Potencjał przeciwnowotworowy resweratrolu jest przede wszystkim związany z jego działaniem antyproliferacyjnym, co potwierdzono w przypadku licznej grupy komórek nowotworowych, w tym komórek raka piersi [98], raka jelita grubego [99], raka trzustki [100], raka żołądka [101], raka prostaty [102] oraz raka płuc [103]. Uważa się, że antyproliferacyjne działanie resweratrolu jest związane przede wszystkim z aktywacją układu białek supresorowych p53-p21 [98;102;104]. Zaproponowano, że swój wpływ może on także wywierać poprzez zahamowanie aktywności reduktazy rybonukleotydów, tj. enzymu katalizującego jeden z kluczowych etapów komórkowej syntezy DNA *de novo* [105].

Innym, ważnym aspektem przeciwnowotworowego działania resweratrolu jest pobudzanie programowanej śmierci komórek, czyli apoptozy. Dotyczy to m.in. nowotworów okrężnicy [99], tarczycy [106] oraz głowy [107]. Proapoptotyczne działanie resweratrolu jest prawdopodobnie związane z aktywacją enzymów z grupy kaspaz (w tym kaspazy -3,-4,-8, i -9 [108]), aktywacją szlaku *Notch* [106], hamowaniem aktywności antyapoptotycznych białek Bcl-2 oraz Bcl-xL [100] oraz obniżeniem potencjału błony mitochondrialnej ( $\Delta\Psi_m$ ) [109]. Zaobserwowano ponadto, że resweratrol może stanowić element przeciwnowotworowej terapii skojarzonej. Badania przeprowadzone na komórkach neuroblastoma, zwojaków złośliwych, raka trzustki, raka piersi i raka prostaty wykazały, że resweratrol może uwrażliwiać te typy nowotworów na działanie takich, powszechnie stosowanych, chemioterapeutyków, jak: doksorubicyna, cisplatyna, arabinozyd cytozyny oraz metotreksat [110]. Wprowadzenie resweratrolu do schematu terapeutycznego powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie S, co jest korzystne dla dalszej terapii zmierzającej do indukcji apoptotycznej śmierci komórek nowotworowych [110;111]. Badania przeprowadzone przez Battout i wsp. na komórkach raka szyjki macicy, przewlekłej białaczki szpikowej oraz szpiczaka mnogiego wykazały także, że resweratrol może uwrażliwiać komórki nowotworowe na działanie promieniowania X [112].

Inną, cenną właściwością resweratrolu w kontekście terapii przeciwnowotworowej jest zdolność hamowania procesu neowaskularyzacji. Wykazano m.in., że resweratrol hamuje proliferację komórek śródbłonna naczyń zarówno w modelach *in vitro* [113], jak i *in vivo* [77]. W dużej mierze, taki efekt resweratrolu może wynikać z jego hamującego wpływu na

produkcję głównego mediatora angiogenezy, jakim jest czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF) [114;115].

Na koniec warto także wspomnieć, iż resweratrol może wykazywać działanie ochronne przed rakotwórczym wpływem niektórych substancji, jak choćby w przypadku ekspozycji komórek nabłonka oddechowego na benzo[a]piren [116].

### 8.3. Działanie przeciwzapalne

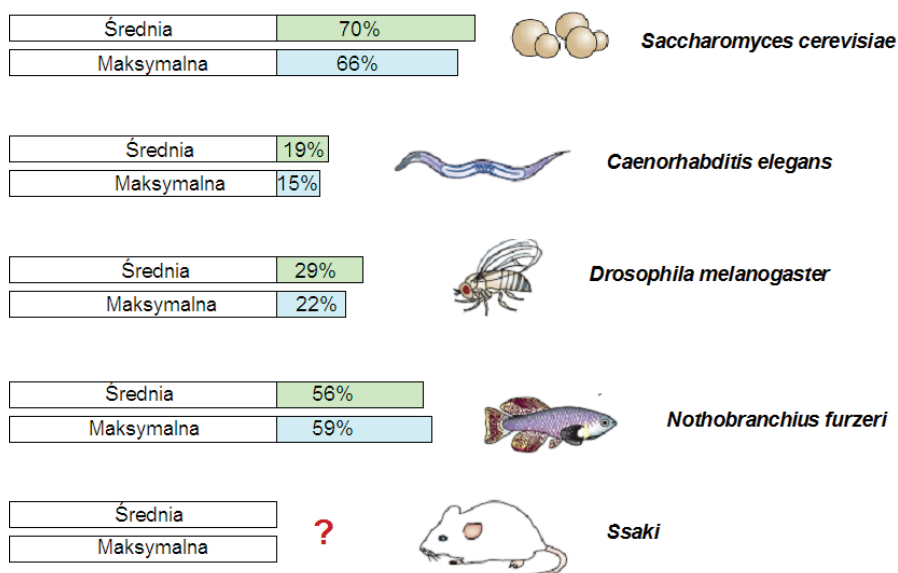
Jednym z efektów działania resweratrolu jest hamowanie aktywności COX-1, prowadzące do obniżenia syntezy wielu czynników prozapalnych [117]. Badania przeprowadzone przez Donnelly i wsp. na komórkach nabłonkowych układu oddechowego wykazały także wpływ resweratrolu na zahamowanie aktywności COX-2 oraz ograniczenie uwalniania chemokiny CXCL8/IL-8 [118]. Resweratrol może także blokować aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B [119] oraz obniżać produkcję czynnika martwicy nowotworów- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) [120], interleukiny-1 (IL-1) [121], interleukiny-6 (IL-6) [122], białka chemotaktycznego monocytów-1 (MCP-1) [123] oraz cząstek adhezyjnych ICAM-1 i VCAM-1 [124].

### 8.4. Wpływ resweratrolu na proces starzenia się

Zainteresowanie biologicznym działaniem resweratrolu wzrosło jeszcze bardziej, gdy okazało się, że związek ten wpływa w bardzo korzystny sposób na długość życia organizmów modelowych. Znaczące wydłużenie życia pod wpływem resweratrolu odnotowano na takich organizmach, jak: drożdże pączkujące *Saccharomyces cerevisiae* [125], nicienie *Caenorhabditis elegans* [126] oraz muszka owocówka *Drosophila melanogaster* [127]. Interesującym spostrzeżeniem, szczególnie w kontekście ewolucyjnych aspektów procesu starzenia się jest fakt, że przedłużając długość życia organizmów niższych resweratrol nie ograniczył ich płodności [127]. Powodzeniem zakończyły się także doświadczenia na organizmach wyższych. Przykładowo, badania przeprowadzone na rybach z gatunku *Nothobranchius furzeri* wykazały, że resweratrol wydłuża ich życie nawet o 56% [128].

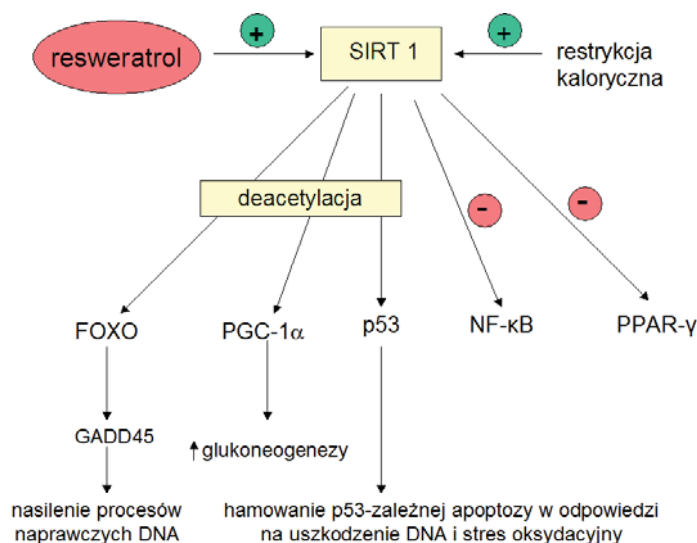
Mechanizm za pośrednictwem którego resweratrol wpływa na przedłużenie życia nie jest do końca poznany, jednak sądzi się, że może on wynikać z aktywacji sirtuin (szczególnie SIRT1 i SIRT2), które należą do NAD(+)-zależnych deacetylaz histonowych, i odgrywają zasadniczą rolę w regulacji metabolizmu energetycznego komórek, utrzymywaniu

stabilności genomu i odpowiedzi na stres [125;129]. Poprzez zwiększenie ekspresji genu *Sirt1*, resweratrol może wpływać m.in. na aktywność czynnika transkrypcyjnego FOXO, regulując przez to takie zjawiska, jak: hamowanie adipogenezy oraz redukcję istniejącej tkanki tłuszczowej [130]. W tym kontekście, ciekawych informacji dostarczyły badania Baur i wsp., którzy wykazali, że resweratrol poprawia stan zdrowia oraz zmniejsza ryzyko zgonu o 30% u myszy będących na diecie wysokotłuszczowej w stosunku do zwierząt kontrolnych [131]. Ten efekt przypisuje się wpływowi resweratrolu na szereg procesów metabolicznych, w tym wzrost wrażliwości tkanek na insulinę, obniżenie stężenia insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), aktywację kinazy aktywowanej AMP (AMPK) oraz wzrost liczby mitochondriów w komórce [131].



**Rycina 3. Wpływ resweratrolu na średnią i maksymalną długość życia organizmów.** Zmodyfikowano na podstawie pracy Baur i Sinclair [132].

W przeciwieństwie do dość dobrze scharakteryzowanego wpływu resweratrolu na proces starzenia się organizmów *in vivo*, wpływ tego związku na starzenie się komórek *in vitro* jest niejednoznaczny. Mianowicie, w przypadku niektórych typów komórek, np. keratynocytów [133] i komórek śródbłonna naczyń [134] resweratrol okazał się hamować ich możliwości proliferacyjne. Z kolei w przypadku mezenchymalnych komórek macierzystych [135] oraz komórek progenitorowych śródbłonna naczyń [136], resweratrol opóźnił tempo ich starzenia się. Gdy natomiast badaniom poddano fibroblasty skórne, okazało się, że związek ten nie wpływa w żaden sposób na ich potencjał podziałowy [137].



**Rycina 4. Rola sirtuin w zależnym od resweratrolu i restrykcji kalorycznej wydłużeniu życia organizmów modelowych.** Znakiem (+) oznaczono aktywację szlaku, natomiast znakiem (-) jego hamowanie.

## 9. Właściwości biologiczne analogów resweratrolu

Mimo wielu korzystnych działań w stosunku do komórek, jak i całych organizmów, zastosowanie resweratrolu na szerszą skalę jest ograniczane przez jego relatywnie niską biodostępność oraz szybki rozkład do mniej aktywnych metabolitów [73]. Aby ominąć te niedogodności, duży nacisk kładzie się obecnie na poszukiwania syntetycznych pochodnych resweratrolu, w przypadku których udałoby się — przy zabezpieczeniu ważnych dla jego biologicznej aktywności grup funkcyjnych — uzyskać lepsze i trwalsze działanie biologiczne. Szczególnym zainteresowaniem cieszą się syntetyczne, dodatkowo hydroksylowane i metoksyłowane analogi resweratrolu [138]. Co istotne, jak wykazano m.in. na przykładzie 3,3',4,4',5,5'-heksahydroksy-*trans*-stilbenu (który uznawany jest obecnie za najbardziej aktywny syntetyczny analog resweratrolu [138]), aktywność biologiczna pochodnych może być znacząco wyższa niż ich naturalnego pierwowzoru. I tak, potencjał antyoksydacyjny 3,3',4,4',5,5'-heksahydroksy-*trans*-stilbenu może być nawet kilka tysięcy razy wyższy niż samego resweratrolu [139]. Stwierdzono także, że zarówno antyoksydacyjne, jak i proapoptotyczne właściwości analogów zawierających grupy 3,4-dihydroksylowe, tj. 3,4-*trans*-dihydroksystilbenu, 3,4,4'-*trans*-trihydroksystilbenu i 3,4,5-*trans*-trihydroksystilbenu były znacząco wyższe w porównaniu z resweratrolem [140].



Podobną prawidłowość zaobserwowano w odniesieniu do antyproliferacyjnego wpływu 3,5,3',4'-tetrahydroksy-*trans*-stilbenu i 3,5,3',4',5'-pentahydroksy-*trans*-stilbenu w stosunku do komórek transformowanych [141]. Jednocześnie trzeba zaznaczyć, że w przeciwieństwie do usystematyzowanej wiedzy, jaką już posiadamy odnośnie aktywności resweratrolu w różnych modelach biologicznych, wiedza o efektach działania jego dodatkowo hydroksylowanych analogów jest wciąż niepełna. Dla przykładu, brak jest na tę chwilę jakichkolwiek doniesień, mówiących o wpływie tych związków na tempo procesu starzenia się *in vitro* lub *in vivo*.

## **10. Komórki mezotelium otrzewnowego**

Otrzewna jest największą błoną surowiczą w ludzkim organizmie, wywodzącą się embriologicznie z mezenchymy. Od wewnątrz, pokrywa ona ściany jamy miednicy i jamy brzusznej — nazywamy ją wtedy otrzewną ścienną. Otrzewna trzewna, natomiast, pokrywa narządy zawarte w jamie brzusznej. Jamą otrzewnową określa się przestrzeń zawartą pomiędzy otrzewną ścienną i otrzewną trzewną [142-144]. Powierzchniową warstwę błony otrzewnej stanowią komórki mezotelialne [142], rozdzielające dwa kompartmenty organizmu, tj. jamę otrzewnową i krew [143].

Komórki mezotelialne (KM) stanowią najliczniejszą populację komórek w obrębie otrzewnej, co predysponuje je do pełnienia szczególnej i dominującej roli w regulacji procesów zachodzących tam zarówno w warunkach fizjologii, jak i patologii. Opisując zakres biologicznych funkcji KM można stwierdzić, że komórki te pełnią zadania ochronne, syntetyczno-wydzielnicze oraz transportowe [144-146].

Funkcja ochronna KM polega na zapobieganiu mikrourazom otrzewnej podczas przemieszczania się narządów jamy brzusznej, co zawdzięczane jest licznym mikrokosmkom na ich powierzchni oraz zdolności do wydzielania substancji fosfolipidowej, zbliżonej budową do surfaktantu, pełniące funkcje nawilżające [144;147]. Przez działanie ochronne komórek mezotelialnych można także rozumieć ich udział w procesach regeneracji otrzewnej, co z kolei wynika m.in. z ich zdolności do produkcji elementów macierzy pozakomórkowej, takich jak kolagen, fibronektyna i laminina [142;144].

Właściwości syntetyczno-wydzielnicze mezotelium związane są z produkcją szeregu czynników, zaangażowanych w takie procesy biologiczne, jak: hemostaza, angiogeneza, przebudowa macierzy pozakomórkowej oraz reakcja zapalna. Czynniki uczestniczące w wymienionych zjawiskach, wydzielane przez KM zostały zebrane w tabeli 3.

**Tabela 3. Najważniejsze czynniki wydzielane przez KM wraz z podziałem na pełnione przez nie funkcje.**

Czynnik	Funkcja	Źródło
<ul style="list-style-type: none"> <li>• tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA),</li> <li>• urokinazowy aktywator plazminogenu (u-PA),</li> <li>• inhibitory aktywatorów plazminogenu-1 i -2 (PAI-1 i PAI-2)</li> </ul>	pobudzanie i hamowanie procesu fibrynolizy	[142-144;148-150]
<ul style="list-style-type: none"> <li>• czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF)</li> </ul>	angiogeneza	[151]
<ul style="list-style-type: none"> <li>• elastyna,</li> <li>• fibronektyna,</li> <li>• kolagen typu I, III, IV,</li> <li>• kwas hialuronowy,</li> <li>• laminina</li> </ul>	elementy macierzy pozakomórkowej; udział w procesach włóknienia, regeneracji, gojenia otrzewnej oraz powstawaniu zrostów błony otrzewnowej	[142-144] [152] [68;153]
<ul style="list-style-type: none"> <li>• transformujący czynnik wzrostu-<math>\beta</math> (TGF-<math>\beta</math>),</li> <li>• metaloproteinazy MMP-1, MMP-3, MMP-9,</li> <li>• tkankowe inhibitory metaloproteinaz TIMP-1 i TIMP-2</li> </ul>	czynniki regulujące syntezę i degradację macierzy pozakomórkowej	[154-156]
<ul style="list-style-type: none"> <li>• interleukina-1 (IL-1),</li> <li>• interleukina-6 (IL-6),</li> <li>• chemokina CXCL8/IL-8,</li> <li>• czynnik chemotaktyczny monocytów-1 (MCP-1),</li> <li>• cząsteczka adhezji międzykomórkowej -1 (ICAM-1),</li> <li>• cząsteczka adhezyjna komórek śródbłonna-1 (VCAM-1)</li> </ul>	regulacja przebiegu reakcji zapalnej	[142-144;157-160]
<ul style="list-style-type: none"> <li>• fosfolipidy (fosfatydylocholina, sfingomielina, fosfatydyloinozytol, fosfatydyloamina)</li> </ul>	zmniejszanie tarcia, ochrona, oraz zapobieganie zrostom	[143;144]

<ul style="list-style-type: none"> <li>• prostaglandyny (PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>),</li> <li>• tromboksan B<sub>2</sub> (TxB<sub>2</sub>),</li> <li>• tlenek azotu (NO),</li> <li>• endotelina-1(ET-1)</li> </ul>	udział w regulowaniu mikrokążenia w otrzewnej	[142-144]
<ul style="list-style-type: none"> <li>• akwaporyny-1,-3 (AQP-1, AQP-3),</li> <li>• transportery glukozy (GLUT1, GLUT3)</li> </ul>	udział w procesach transportowych wody, glukozy	[142;143;161]

Funkcja transportowa komórek mezotelialnych polega na wymianie wody i cząstek rozpuszczonych pomiędzy przestrzenią wewnątrznaczyniową a jamą brzuszną [143]. Transport cząsteczek oparty jest na zjawisku dyfuzji, która zachodzi zarówno drogą międzykomórkową i przezkomórkową, i zależy od właściwości fizyko-chemicznych (głównie wielkości i ładunku) transportowanych cząsteczek [144].

### **11. Starzenie się ludzkich komórek mezotelium otrzewnowego *in vitro***

Jedną z wyróżniających cech ludzkich komórki mezotelium otrzewnowego jest ich bardzo ograniczona aktywność proliferacyjna *in vitro* [162-164]. Także w warunkach *in vivo* komórki te cechuje niskie tempo podziałów, czego odbiciem jest indeks mitotyczny wynoszący około 0,2-0,5% [146;165]. Odzwierciedleniem niskiej aktywności proliferacyjnej KM jest niewielka liczba możliwych do osiągnięcia podziałów. Stwierdzono, że w zoptymalizowanych warunkach hodowli *in vitro*, KM starzeją się po przejściu około 6-10 podziałów, a mediatorem tego zjawiska jest białko p16 [166]. Badania mające na celu wykazanie roli telomerów w procesie starzenia się KM dowiodły, że utracie aktywności proliferacyjnej tej grupy komórek nie towarzyszy proces skracania się telomerów [55]. Co istotne, stwierdzono, że już w młodych KM średnia długość telomerów (~3.5 kbp) jest zdecydowanie niższa od tej, spotykanej w innych typach komórek somatycznych (~8-10 kbp) [167]. Przyczyną tego zjawiska może być duża wrażliwość komórek młodych na działanie zewnątrzpo pochodnego stresu oksydacyjnego. Jak wykazały badania stopnia uszkodzeń DNA w komórkach młodych, frakcja komórek zawierających histon  $\gamma$ -H2A.X może stanowić nawet połowę całej populacji. Co równie istotne, zdecydowana większość uszkodzeń DNA zlokalizowana była pozatelomerowo [55].

Niebagatelne znaczenie stresu oksydacyjnego w starzeniu się KM potwierdziły takie obserwacje, jak wzrost produkcji RFT przez komórki stare, nagromadzenie w nich 8-OH-dG oraz obniżenie stężenia GSH [65;168]. Z drugiej strony, wczesna protekcja komórek przed

stresem oksydacyjnym, przeprowadzona za pomocą pułapki spinowej, *N-tert*-butylo- $\alpha$ -fenylnitronu (PBN), wpłynęła na znaczącą poprawę możliwości podziałowych komórek, ograniczenie produkcji RFT oraz zahamowanie tempa pojawiania się molekularnych oznak komórkowego starzenia się [68].

Stwierdzono także istnienie odwrotnej zależności między potencjałem podziałowym komórek *in vitro* a kalendarzowym wiekiem dawcy komórek *in vivo*. Czynnikiem, który okazał się mieć decydujące znaczenie dla powstania tej zależności była skala produkcji transformującego czynnika wzrostu- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) przez komórki [169]. Badania wykazały, że wydzielanie TGF- $\beta$ 1 wzrasta w miarę starzenia się komórek *in vitro* [65], jak również, że istnieje dodatnia zależność między sekrecją TGF- $\beta$ 1 przez komórki młode, a kalendarzowym wiekiem ich dawcy [169]. Istnienie szczególnie tej drugiej zależności zasugerowało możliwość, że w tkance otrzewnej mogą wraz z wiekiem gromadzić się replikacyjne stare KM. Ostatecznego potwierdzenia tej hipotezy dostarczyły cytochemiczne badania skrawków sieci większej, które wykazały obecność w nich komórek cechujących się aktywnością SA- $\beta$ -Gal [68].

## **CEL PRACY**

Celem pracy było określenie wpływu substancji z grupy stilbenów, tj. resweratrolu oraz jego trzech syntetycznych analogów: 3,3',4,4'-THS, 3,3',5,5'-THS i 3,3',4,4',5,5'-HHS na przebieg procesu replikacyjnego starzenia się ludzkich komórek mezotelium otrzewnowego w modelu *in vitro*.

W szczególności ocenie poddano wpływ stilbenów na takie parametry związane ze starzeniem się komórek, jak:

- a) potencjał proliferacyjny,
- b) kinetykę starzenia się komórek,
- c) ekspresję markera komórek starych (SA- $\beta$ -Gal),
- d) zmiany długości telomerów,
- e) częstość apoptotycznej śmierci komórek,
- f) wykładniki stresu oksydacyjnego (produkcję RFT, aktywność SOD, gromadzenie 8-OH-dG),
- g) metabolizm mitochondriów (wielkość potencjału błony mitochondrialnej  $\Delta\Psi_m$  oraz biogenezę mitochondriów),
- h) właściwości wydzielnicze komórek (VEGF, CXCL8/IL-8),
- i) zależną od KM proliferację komórek śródbłonna naczyniowego (HMEC-1).

## METODYKA

### 1. Materiały

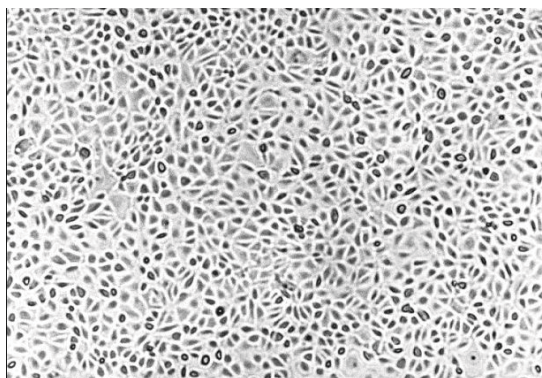
Odczynniki chemiczne używane w trakcie eksperymentów i oznaczeń biochemicznych pochodziły z firmy Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, USA). Materiały wykorzystane do hodowli komórkowej pochodziły z firm Nunc (Roskilde, Dania) oraz Becton Dickinson (BD, NJ, USA).

### 2. Izolacja i hodowla ludzkich komórek mezotelium otrzewnego

Eksperymenty zostały przeprowadzone na pierwotnych hodowlach KM, wyizolowanych z fragmentów sieci większej, usuwanych w czasie zabiegów chirurgicznych ze wskazań lekarskich. Wśród najczęstszych powodów zabiegu chirurgicznego, połączonego ze wskazaniem usunięcia tkanki otrzewnej, można wymienić: zrosty otrzewnej (korekta wcześniejszych zabiegów, powikłania u pacjentów dializowanych otrzewnowo), przepuklinę pępkową i pachwinową, tętniaki aorty, niedrożność jelit, kamieć żółciowa i raka jelita grubego [61]. Tkanki pochodziły od pacjentów w przedziale wiekowym od 45 do 55 lat. Zgodnie z wnioskiem przedstawionym Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (zgoda na prowadzenie badań nr 465/09, z dnia 6 maja 2009 roku), tkanki były pobierane wyłącznie od pacjentów, których zabieg był uprzednio planowany, po uzyskaniu ich zgody, wraz z poinformowaniem o możliwych skutkach ubocznych zabiegu. Pobrana tkanka została przeniesiona do naczynia z płynem Hanksa bez jonów  $Ca^{2+}$  i  $Mg^{2+}$  (ang. *Hanks' Balanced Salt Solution*, HBSS), które następnie zostało umieszczone w lodówce. Po zabiegu, pracownik Katedry Patofizjologii odbierał naczynie z tkanką, z oddziału i w ciągu 30 minut dostarczał je do laboratorium.

Izolacja i hodowla komórek była prowadzona według procedury opisanej przez Van Bronswijka i wsp. [170]. Po dostarczeniu tkanki do pracowni, umieszczano ją w roztworze trypsyny (0,05%) i EDTA (0,02%) rozpuszczonych w HBSS i inkubowano przez 20 minut, wytrząsając w łaźni wodnej, w temperaturze 37 °C. Uzyskaną zawiesinę komórek dwukrotnie przepłukiwano medium hodowlanym M199, zawierającym 10% bydlęcej surowicy płodowej (FBS) (Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein, RFN) oraz dodatek glutaminy (2 mM), penicyliny (100 U/ml), streptomycyny (100 µg/ml) i hydrokortyzonu 50 µl (0,4 µg/ml) (medium standardowe). Po odwirowaniu przez 10 minut przy szybkości 150 x g, komórki zawieszano w standardowym medium hodowlanym

i posiewano w butelkach hodowlanych o powierzchni 25 cm<sup>2</sup>. Komórki inkubowane były w temperaturze 37 °C w środowisku nawilżanym o zawartości 5% CO<sub>2</sub>. Co 3 dni wymieniano całość medium hodowlanego na nowe. Po uzyskaniu przez hodowlę fazy zlewności, komórki przesiewano do naczyń o powierzchni 75 cm<sup>2</sup> w celu ich namnożenia do dalszych eksperymentów.

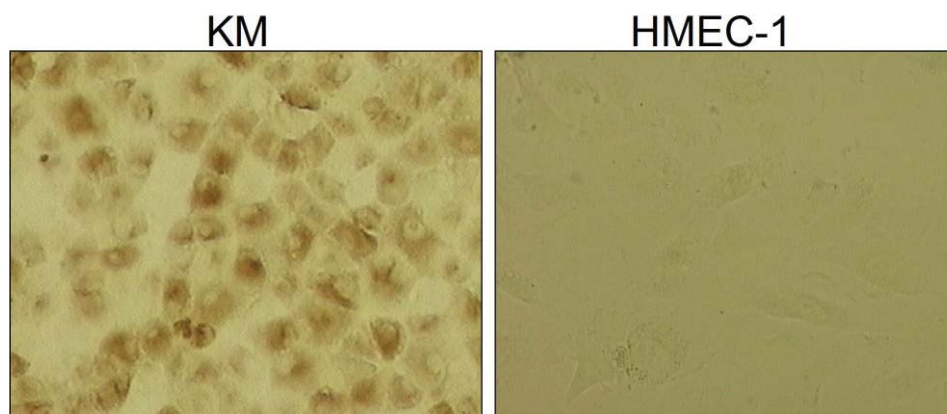


**Rycina 5. Morfologia pierwotnych hodowli KM po osiągnięciu stadium zlewności.** Zastosowane powiększenie 40 x.

### **3. Identyfikacja komórek mezotelium otrzewnowego**

Identyfikację komórek prowadzono kierując się kryterium morfologicznym (kształt „kostki brukowej” [171]), a także stosując badanie immunocytochemiczne na obecność antygeny HBME-1, występującego w mikrokosmkach błony komórkowej KM [172]. Obecność antygeny HBME-1 oceniano w komórkach hodowanych w komorach typu Lab-Tek™ Chamber Slides (Nunc). Po osiągnięciu przez komórki fazy zlewności, płukano je w roztworze soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (ang. *Phosphate Buffered Saline*, PBS), a następnie utrwalano przez 3 minuty w roztworze formaldehydu (3%). Po wypłukaniu utrwalacza, komórki inkubowano przez 5 minut w roztworze H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,3%) w celu zahamowania aktywności endogennych peroksydaz. Następnie komórki inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej z mysim przeciwciałem monoklonalnym anti-HBME-1 (Dako, Glostrup, Dania), rozcieńczonym 1:25 w roztworze Tris-HCl (0,05 M) pH 7,6 z dodatkiem 3% FBS. Po wypłukaniu przeciwciała za pomocą PBS preparat inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37 °C z przeciwciałami wyznakowanymi peroksydazą chrzanową i skierowanymi przeciwko mysiej IgG (Dako EnVision™ system). Po inkubacji i wypłukaniu komórek PBS, preparat inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej w roztworze 3,3'-diaminobenzyny (DAB) (0,06 mM) oraz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 mM), po czym

zabezpieczono wodnym medium mocującym (Dako). Jako komórki cechujące się obecnością antygenu HBME-1 uznano te, których powierzchnia została wybarwiona na kolor brązowy. Jako kontrolę ujemną wykorzystano komórki śródbłonka naczyń włosowatych skóry (ang. *human microvascular endothelial cells*, HMEC-1) zakupione w firmie Lonza (Bazylea, Szwajcaria).



**Rycina 6. Komórki ludzkiego mezotelium otrzewnego (KM) wybarwione dodatnio na obecność antygenu HBME-1 oraz ujemny wynik barwienia komórek śródbłonka naczyń HMEC-1. Zastosowane powiększenie 200x.**

#### **4. Hodowla komórek śródbłonka naczyń włosowatych skóry HMEC-1**

Komórki były przechowywane do czasu eksperymentu w formie zamrożonej w ciekłym azocie z dodatkiem dimetylosulfotlenku DMSO (5%) jako krioprotektanta. Po odmrożeniu i wypłukaniu DMSO, komórki zostały posiane do naczyń o powierzchni 75 cm<sup>2</sup> w medium MCDB-131 z dodatkiem 10% FBS, glutaminy (2 mM), penicyliny (100 U/ml) i streptomycyny (100 µg/ml). W celu namnożenia komórek do liczby niezbędnej do dalszych badań, hodowle HMEC-1 pasażowano co 4-5 dni, co drugi dzień wymieniając medium hodowlane na nowe. W doświadczeniach polegających na ekspozycji komórek HMEC-1 na medium kondycjonowane z hodowli KM, na 2 tygodnie przed planowanym eksperymentem hodowle HMEC-1 przeniesiono do medium właściwego dla komórek KM, tj. medium M199. Jak wykazały badania wstępne (nie pokazano), tempo proliferacji komórek HMEC-1 w pełnym medium M199 było porównywalne z grupą hodowaną w medium MCDB-131.

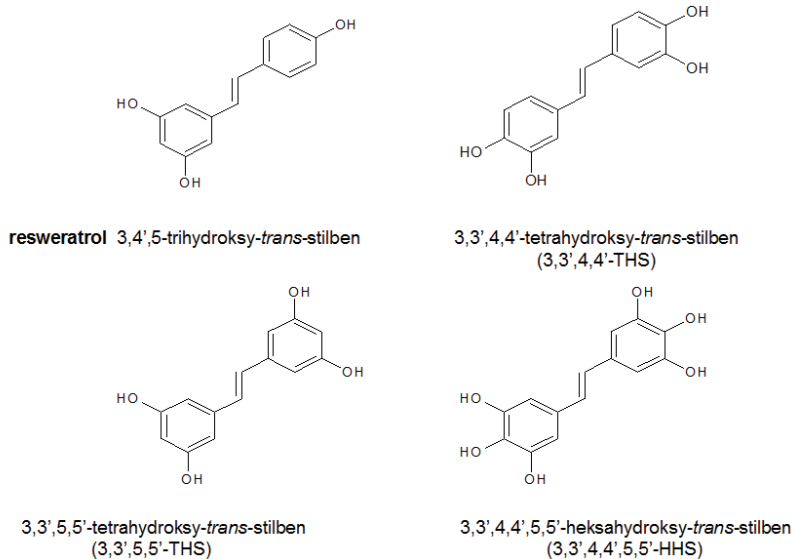


## 5. Wywoływanie replikacyjnego starzenia się KM *in vitro*

Po osiągnięciu przez hodowlę pierwotną stadium zlewności, komórki złuszczano za pomocą roztworu trypsyny (0,05%) i EDTA (0,02%) i zawieszano w standardowym medium hodowlanym z dodatkiem 10% FBS. Złuszczone komórki posiewano w butelkach hodowlanych o powierzchni 25 cm<sup>2</sup> w gęstości 3x10<sup>4</sup> komórek/cm<sup>2</sup>. Kolejne pasáže przeprowadzane były w tygodniowych odstępach, aż do momentu, gdy uzyskana liczba komórek nie była wystarczająca, by przesiać je po raz kolejny zachowując wymaganą gęstość. Pomiedzy pasażami dokonywano jednokrotnej wymiany medium hodowlanego [166]. Podczas każdego pasażu komórki liczono w komorze Bürkera. Skumulowaną liczbę podwojeń populacji (ang. *cumulative population doublings*; CPD) określono posługując się wzorem:  $CPD = \log_2 (C_t/C_0)$ , w którym C<sub>0</sub> - liczbę komórek na początku inkubacji, C<sub>t</sub> - liczbę komórek pod koniec inkubacji [166].

## 6. Związki badane

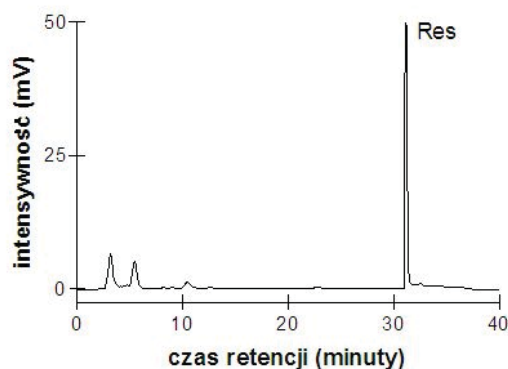
W badaniach wykorzystano cztery związki z grupy stilbenów, tj.: 3,4',5-trihydroksy-*trans*-stilben (resweratrol); 3,3',4,4'-tetrahydroksy-*trans*-stilben (3,3',4,4'-THS); 3,3',5,5'-tetrahydroksy-*trans*-stilben (3,3',5,5'-THS) i 3,3',4,4',5,5'-heksahydroksy-*trans*-stilben (3,3',4,4',5,5'-HHS). Resweratrol zakupiono w firmie Sigma, natomiast analogi resweratrolu zostały zsyntetyzowane w Katedrze i Zakładzie Technologii Chemicznej Środków Leczniczych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, przy użyciu standardowych metod chemicznych [173]. Do mediów hodowlanych stilbeny były dodawane z uprzednio przygotowanych stężonych roztworów, gdzie jako rozpuszczalnika użyto DMSO.



Rycina 7. Budowa chemiczna badanych stilbenów.

## 7. Ocena stabilności związków badanych metodą wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC)

Stabilność resweratrolu i jego analogów oceniana była przy użyciu systemu Beckman (Beckman, High Wycombe, UK) wyposażonego w detektor UV-DAD (zestaw przy długości fali 307 nm dla resweratrolu, 312 nm dla 3,3',4,4'-THS, 304 nm dla 3,3',5,5'-THS i 327 nm dla 3,3',4,4',5,5'-HHS). Rozdział chromatograficzny resweratrolu i jego pochodnych przeprowadzono na kolumnie Hypersil BDS-C18 (5  $\mu$ m, 250  $\times$  4,6 mm ID Astmoor, UK), poprzedzonej przedkolumną BDS-C18 Hypersil (5  $\mu$ m, 10  $\times$  4,6 mm ID), przy przepływie 1 ml/min. W celu wymycia związków badanych faza ruchoma składała się z 5 mM octanu amonu/buforu kwasu octowego, pH 7,4 (faza ruchoma A) i metanolu (faza ruchoma B). Fazę ruchomą przesączono przez filtr 0,45  $\mu$ m (HVLP04700, Millipore, Warszawa, Polska) [174].



**Rycina 8. Przykładowy chromatogram resweratrolu uzyskany metodą wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC).**

## 8. Stężenia robocze substancji badanych oraz punkty czasowe eksperymentów

Na podstawie przeprowadzonych badań pilotażowych wyznaczono dwa stężenia robocze badanych stilbenów, tj. stężenie 0,5  $\mu$ M oraz 10  $\mu$ M. Stężenia te ustalono na podstawie wyników badań proliferacji komórek w systemie ostrym, arbitralnie kierując się danymi uzyskanymi dla naturalnego stilbenu — resweratrolu.

Także w toku badań wstępnych wybrano dwa punkty czasowe do oceny wpływu stilbenów na właściwości komórek mezotelialnych, związane z ich proliferacją i starzeniem się. Jako „komórki młode” wybrano te, ocenione podczas drugiego pasażu, tj. po 14 dniach ekspozycji na substancje badane. Jako drugi punkt czasowy, określany jako „komórki stare”, wybrano moment, w którym stwierdzono replikacyjną starość komórek kontrolnych. W tym

samym momencie zbierano materiał z hodowli eksponowanych na stilbeny, celem ich bezpośredniego porównania z komórkami kontrolnymi.

## **9. Ocena żywotności komórek metodą MTT**

Badania przeprowadzono w 96-studzienkowych płytkach mikrotitracyjnych na komórkach posianych w wysokiej gęstości  $1 \times 10^5$  komórek na studzienkę, celem szybkiego osiągnięcia przez nie stadium zlewności. Do czasu osiągnięcia pełnej zlewności hodowle utrzymywano w kompletnym medium M199 z dodatkiem 10% FBS. Po osiągnięciu zlewności, komórki synchronizowano i uwrażliwiano na działanie substancji badanych poprzez ich 24-godziną inkubację w medium pozbawionym surowicy (SFM).

W czasie testu, po 48-godzinnym okresie ekspozycji na badane stilbeny, komórki inkubowano ze świeżym SFM zawierającym roztwór MTT przez 4 godziny. Wytworzony formazan (produkt redukcji bromku 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolylo)-2,5-difenylo-tetra-zolowego), był następnie solubilizowany przez dodanie 20% roztworu soli sodowej siarczanu dodecyłu (SDS) i 50% *N,N*-dimetyloformamidu. Pomiaru absorbancji dokonano przy użyciu czytnika płytek EL<sub>X</sub>808<sup>TM</sup> firmy Bio-Tek Ltd. (Winooski, USA), przy długości fali 690 nm.

## **10. Ocena proliferacji komórek**

### **10.1. Metoda MTT**

Badania proliferacji komórek mezotelialnych metodą MTT przeprowadzono identycznie jak w przypadku oceny ich żywotności, z tą różnicą, że do studzienek mikrotitracyjnych komórki zostały posiane w niskiej gęstości, tj.  $5 \times 10^3$  komórek na studzienkę. Po 24 godzinach inkubacji w pełnym medium, komórki synchronizowano i poddawano ekspozycji na substancje badane.

W doświadczeniach z wykorzystaniem komórek śródbłonkowych HMEC-1, komórki posiane w gęstości  $1 \times 10^3$  komórek na studzienkę inkubowano w pełnym medium przez 4 godziny, a następnie przez 16 godzin w medium bez surowicy. Po tym czasie, komórki eksponowano na próbki medium kondycjonowanego z hodowli KM przez 24 godziny. Po upływie tego czasu, komórki były starannie płukane i przeprowadzano test MTT [175].

### 10.2. Ocena syntezy DNA w komórkach metodą radioizotopową

Analizę prowadzono na komórkach posiewanych w 48-studzienkowych płytkach hodowlanych, w gęstości  $1 \times 10^4$  komórek/cm<sup>2</sup>. Po posianiu, komórki inkubowano przez 24 godziny w pełnym medium hodowlanym, w temperaturze 37°C i nawilżanym środowisku zawierającym 5% CO<sub>2</sub>. Po tym czasie, komórki poddawano ekspozycji na substancje badane w medium bez surowicy, z dodatkiem [<sup>3</sup>H]-tymidyny (jako metyl-<sup>3</sup>H-tymidyna; 1 μCi/ml; Institute of Radioisotopes, Praga, Czechy) przez 24 godziny.

Oceny proliferacji komórek dokonano na podstawie analizy stopnia wychwytywania i wbudowywania do DNA [<sup>3</sup>H]-tymidyny przez komórki dzielące się. Po okresie inkubacji, komórki złuszczano mieszaniną trypsyny (0,05%) i EDTA (0,02%), a białko komórkowe wytrącano kwasem trójchlorooctowym (20%) (Fluka, Buchs, Szwajcaria), następnie płukano tym samym kwasem w stężeniu 10%. Uzyskany precypitat rozpuszczono w roztworze NaOH (0,1 N), a radioaktywność mierzono po podaniu płynu scyntylicyjnego w liczniku scyntylicyjnym (Wallac, Perkin Elmer, Warszawa, Polska). Wyniki wyrażono jako liczbę impulsów przypadającą na 1 minutę pomiaru (ang. *counts per minute*; cpm).

### 10.3. Ocena ekspresji antygenu proliferacyjnego PCNA metodą immunocytochemiczną

Badania przeprowadzono na komórkach posianych w gęstości  $1 \times 10^4$  komórek na cm<sup>2</sup> w komorach typu Lab-Tek™ Chamber Slides, inkubowanych przez 24 godziny i utrwalonych za pomocą roztworu alkoholu etylowego (70%). Po utrwaleniu, komórki wypłukano trzykrotnie PBS i inkubowano przez 30 minut z roztworem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,3%) w celu zahamowania aktywności endogennych peroksydaz. Po starannym wypłukaniu, preparat inkubowano z mysim monoklonalnym przeciwciałem anti-PCNA (klon PC10, Dako) rozcieńczonym w stosunku 1:500 w roztworze Tris-HCl (0,05 M) pH 7.6 z dodatkiem 2% BSA przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Po inkubacji i starannym wypłukaniu przeciwciał za pomocą PBS, preparaty inkubowano z kompleksem EnVision FLEX (Dako) przez 20 minut, po czym ponownie płukano przez 10 minut. Następnie preparat inkubowano z roztworem DAB przez 5 minut w temperaturze pokojowej, po czym, po dwukrotnym wypłukaniu pozostawiono w wodzie destylowanej. Jądra komórkowe podbarwiono przy pomocy roztworu hematoksyliny Mayer'a przez 5 minut. Na koniec, preparaty zatopiono w Pertex Mounting Medium (HistoLab, Göteborg, Szwecja). Komórki cechujące się ekspresją antygenu PCNA rozpoznano na podstawie brązowego zabarwienia jądra komórkowego. Liczbę komórek dodatnich wyrażono jako odsetek 500 policzonych. Jako kontrolę ujemną

traktowano preparaty, w których przeciwciała anti-PCNA zastąpiono mysią immunoglobuliną klasy IgG w analogicznym stężeniu.

#### **10.4. Ocena dystrybucji w cyklu komórkowym metodą cytometrii przepływowej**

Po wykonaniu pasażu komórki złuszczano przy pomocy roztworu trypsyny (0,05%) i EDTA (0,02%), liczone, a następnie  $1 \times 10^6$  komórek zawieszono w roztworze PBS i utrwalano w lodowatym etanolu (70%). Po utrwaleniu komórki odwirowano, wypłukano w roztworze PBS, a następnie zawieszono w roztworze cytrynianu sodu (0,1 M) pH 7.8 przez okres jednej minuty. W kolejnym etapie, komórki ponownie płukano w PBS i inkubowano przez 30 minut w roztworze jodku propidyny (PI) (5 mg/ml) (Molecular Probes, Leiden, Holandia) i rybonukleaz (0,1 mg/ml) w PBS. Analizy dystrybucji komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego dokonano za pomocą cytometru przepływowego FACS Calibur™ (Becton-Dickinson, Plymouth, UK) zaopatrzonego w program ModFit LT™ (Verity Software House, Topsham, ME, USA).

### **11. Badanie apoptozy komórek**

#### **11.1. Ocena zawartości niskocząsteczkowego DNA**

W badaniu tym komórki apoptotyczne o zmniejszonej barwliwości DNA uwidaczniają się w postaci dodatkowej subpopulacji komórek, tzw. frakcji subG<sub>1</sub> [176]. W trakcie pasażu komórki złuszczano przy pomocy roztworu trypsyny (0,05%) i EDTA (0,02%), liczone, a następnie  $1 \times 10^6$  komórek zawieszono w roztworze PBS i utrwalano w lodowatym etanolu (70%). Po utrwaleniu komórki odwirowywano, płukano w roztworze PBS, a następnie zawieszono w roztworze cytrynianu sodu (0,1 M), pH 7,8 na 1 minutę. W kolejnym etapie komórki płukano w PBS, a następnie inkubowano przez 30 minut w roztworze PI (5 mg/ml) i rybonukleaz (0,1 mg/ml) w PBS. Pomiaru odsetka komórek będących w fazie subG<sub>1</sub> dokonano za pomocą cytometru przepływowego FACS Calibur™ zaopatrzonego w program Cell-Quest (Becton-Dickinson, Plymouth, UK).

#### **11.2. Ocena stopnia kondensacji chromatyny jądrowej**

W celu identyfikacji komórek apoptotycznych na podstawie oceny kondensacji chromatyny jądrowej, komórki posiewano w komorach typu Lab-Tek™ Chamber Slides w gęstości  $4 \times 10^4$  komórek/cm<sup>2</sup>. Po 48 godzinach inkubacji w temperaturze 37 °C, w nawilżonym środowisku zawierającym 5% CO<sub>2</sub>, komórki utrwalano w lodowatym etanolu

(70%). Po utrwaleniu, preparat płukano roztworem PBS i inkubowano przez 15 minut w ciemności z barwnikiem fluorescencyjnym Hoechst 33258 ( $10^{-3}$  M) (Molecular Probes, Leiden, Holandia) znakującym DNA komórek [176]. Po inkubacji komórki oceniano i fotografowano w mikroskopie fluorescencyjnym Zeiss Axio Observer D1 (Carl Zeiss, Jena, RFN) wykorzystując oprogramowanie AxioVision v.4.6.3. Jako komórki apoptotyczne identyfikowano te, charakteryzujące się opalizującym „świeceniem” skondensowanej chromatyny jądrowej. Wyniki wyrażono jako procent komórek apoptotycznych spośród 500 komórek liczonych w każdej grupie.

## 12. Ocena długości telomerów

Oceny długości telomerów dokonano metodą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real-time PCR*) wg metody opisanej przez Cawthon i wsp. [177], z pewnymi modyfikacjami. W trakcie pasażu pobrano zawiesinę medium zawierającą  $2 \times 10^5$  komórek. Komórki wypłukano PBS i odwirowano, a uzyskaną peletę osuszono i zamrożono do czasu wykonania analizy w temperaturze  $-80$  °C. Po odmrożeniu pelet, DNA wyizolowano za pomocą mini kolumn (GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit, Sigma-Aldrich), a jego stężenie określono spektrofotometrycznie (Spekol, AnalytikJena, RFN). Reakcja PCR została wykonana z użyciem 5 ng DNA. Jako wzorzec wykorzystano gen dla albuminy. Po zsyntetyzowaniu wzorca, dokładna liczba kopii genu została wyliczona z liczby Avogadro z wykorzystaniem darmowego oprogramowania dostępnego na stronie <http://www.endmemo.com/bio/dnacopynum.php>. Następnie, wzorce zostały rozcieńczone w szeregu dziesiętnym w celu stworzenia krzywej wzorcowej dla reakcji PCR. Startery dla powtórzeń telomerowych (TRF) pochodziły z zacytowanej wyżej pracy, natomiast dla albuminy zostały zaprojektowane na bieżąco. Reakcja PCR dla TRF przebiegała w następujących etapach: po początkowym ogrzaniu próbek w temperaturze  $95$  °C przez 10 minut, nastąpiły dwa cykle ( $94$  °C/15 sekund i  $49$  °C/15 sekund) oraz 45 cykli trzyetapowych ( $94$  °C/15 sekund,  $66$  °C/15 sekund,  $72$  °C/15 sekund). Specyficzność uzyskanych produktów została potwierdzona poprzez analizę topnienia. Schemat analizy dla genu albuminy był następujący: początkowe podgrzanie do  $95$  °C przez 10 minut, po którym nastąpiło 45 cykli w etapach ( $94$  °C/15 sekund,  $60$  °C/15 sekund,  $72$  °C/15 sekund). Także i w tym przypadku specyficzność produktów została potwierdzona na podstawie analizy topnienia. Stężenie jonów magnezu użytych w obu reakcjach wynosiło 3 mM, natomiast zakres stężeń krzywej wzorcowej dla telomerów wyniósł 42-421 000 kopii, a dla albumin

380-380 000 kopii. Reakcję polimerazową przeprowadzono z wykorzystaniem aparatu LightCycler 2.0 firmy Roche Diagnostics (Warszawa, Polska).

### **13. Ocena ekspresji i aktywności $\beta$ -galaktozydazy związanej ze starzeniem (SA- $\beta$ -Gal)**

#### **13.1. Jakościowa ocena ekspresji SA- $\beta$ -Gal metodą cytochemiczną**

W celu wybarwienia komórek na obecność SA- $\beta$ -Gal, posiewano je w komorach typu Lab-Tek™ Chamber Slides w gęstości  $3 \times 10^4$  komórek/cm<sup>2</sup>. Po 48 godzinach inkubacji, starannym wypłukaniu komórek i ich utrwaleniu w roztworze formaldehydu (3%), dokonano oznaczenia SA- $\beta$ -Gal zgodnie z metodologią opisaną przez Dimri i wsp. [33]. Utrwalone preparaty wypłukano trzykrotnie w PBS, a następnie inkubowano przez 4 godziny w temperaturze 37 °C, w inkubatorze bez CO<sub>2</sub>, z roztworem zawierającym substrat dla  $\beta$ -galaktozydazy, tj. 5-bromo-4-chloro-3-indolo- $\beta$ -D-galaktopiranozyd (X-Gal) (1 mg/ml), kwas cytrynowy (40 mM), K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> (5 mM), K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> x 3H<sub>2</sub>O (5 mM), NaCl (150 mM) oraz MgCl<sub>2</sub> (2 mM). Odczyn buforu został ustalony na wartości 6,0 za pomocą roztworu NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 M). Po zakończeniu inkubacji i starannym wypłukaniu komórek wodą destylowaną, preparat zabezpieczano szkiełkiem nakrywkowym za pomocą wodnego medium mocującego (Dako) i oceniano w mikroskopie świetlnym Zeiss Axio Obserwer D1. Komórki uznawano za dodatnie na podstawie ciemnozielonego wybarwienia ich cytoplazmy w okolicy okołojądrowej. Liczbę komórek wykazujących aktywność SA- $\beta$ -Gal wyrażono jako odsetek 500 policzonych komórek.

#### **13.2. Ilościowa ocena aktywności SA- $\beta$ -Gal**

Ilościowa ocena aktywności SA- $\beta$ -Gal w lizatach komórkowych została przeprowadzona metodą fluorescencyjną, z wykorzystaniem pomiaru tempa konwersji 4-metylumbelliferylo- $\beta$ -D-galaktopiranozydu (MUG) do fluorescencyjnego produktu 4-metylumbelliferonu (4-MU) w pH 6,0, według metody opisanej przez Gary'ego i Kindell [178].

W trakcie pasażu, zebrano zawiesinę  $2 \times 10^5$  komórek, które wypłukano za pomocą PBS, odwirowano, a uzyskaną peletę zlizowano za pomocą buforu, w skład którego wchodziły: 3-[(3-cholamidopropyl)-dimetyloamoni]-propano-sulfonian (CHAPS) (5 mM), kwas cytrynowy (40 mM), fosforan sodu (40 mM), benzamidyna (0,5 mM) oraz fluorek fenylometylosulfonowy (PMSF) (0,25 mM), przy pH 6,0. Po odwirowaniu przy prędkości 12 000 x g uzyskano supernatant, wykorzystywany w dalszej analizie. W następnej

kolejności, próbkę supernatantu wymieszano z taką samą objętością buforu reakcyjnego, składającego się z kwasu cytrynowego (40 mM), fosforanu sodu (40 mM), chlorku sodu (300 mM),  $\beta$ -merkaptoetanolu (10 mM), chlorku magnezu (4 mM) oraz MUG (1,7 mM), przy pH 6,0 i umieszczono w łaźni wodnej o temperaturze 37 °C na dwie godziny, mieszając. Reakcję zatrzymano poprzez dodanie do próbek węglanu sodu (400 mM). Fluorescencję próbek przeniesionych do transparentnych płytek 96-studzienkowych zmierzono przy długości fali wzbudzenia 360 nm i emisji 465 nm na spektrofлуorymetrze Wallac Victor 2 (Perkin-Elmer, Massachusetts, USA). Uzyskane wyniki, wyrażone w jednostkach świetlnych, przedstawiono w przeliczeniu na  $10^5$  komórek badanych.

## **14. Ocena wykładników stresu oksydacyjnego**

### **14.1. Oznaczanie produkcji reaktywnych form tlenu (RFT)**

Oznaczenia produkcji RFT przez komórki dokonano za pomocą metody fluorescencyjnej po uprzednim wyznaczeniu komórek roztworem dwuoctanu 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny ( $H_2DCFDA$ ) (Molecular Probes (Eugene, OR, USA) [168]. W trakcie pasażu pobrano zawiesinę  $1 \times 10^5$  komórek. Po odpłukaniu medium za pomocą PBS komórki zawieszono w świeżym medium M199 bez surowicy z dodatkiem  $H_2DCFDA$  (5  $\mu M$ ), a następnie inkubowano przez 45 minut w temperaturze 37 °C. Po inkubacji, komórki odwirowano, a następnie poddano lizie za pomocą buforu lizującego (Promega, Madison WI, USA). Po 10 minutach uzyskane lizaty przeniesiono do studzienek w transparentnych płytkach 96-dołkowych (Nunc) i dokonano pomiaru uwolnionej fluorescencji przy długości fali wzbudzenia 435 nm i emisji 535 nm, z użyciem spektrofлуorymetru Wallac Victor 2 (Perkin-Elmer).

### **14.2. Ocena stężenia 8-hydroxy-2'-deoksyguanozyny (8-OH-dG)**

Ilościowa ocena stężenia 8-OH-dG w DNA komórek została dokonana w oparciu o kompetycyjną metodę ELISA, z użyciem zestawu firmy Cell Biolabs Inc. (San Diego, CA, USA) [61]. W trakcie pasażu pobrano  $2 \times 10^5$  komórek, które następnie wypłukano za pomocą PBS i odwirowano. Po osuszeniu uzyskanej pelety dokonano ekstrakcji DNA komórkowego z wykorzystaniem zestawu kolumn do elucji GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma), ściśle według procedury zalecanej przez producenta. Uzyskane DNA rozpuszczono w wodzie i doprowadzono do stężenia 5 mg/ml. Następnie dokonano konwersji DNA do postaci jednoniciowej poprzez inkubację próbki przez 5 minut



w temperaturze 95 °C, a następnie gwałtowne schłodzenie na lodzie. W kolejnym etapie dokonano strawienia próbek zdenaturowanego DNA do nukleozydów poprzez jego inkubację z 10 jednostkami nukleazy P1 przez 2 godziny w temperaturze 37 °C, w roztworze octanu sodu (20 mM) w pH 5,2. Następnie nastąpiła inkubacja z 7 jednostkami fosfatazy alkalicznej w roztworze Tris-PBS (100 mM) w pH 7,5, przez 1 godzinę w temperaturze 37 °C. Po odwirowaniu mieszaniny przez 5 minut przy prędkości 6000 x g, uzyskany supernatant wykorzystano w dalszych etapach oznaczania stężenia 8-OH-dG.

Zasada kompetycyjnej metody ELISA polegała na tym, że próbki zawierające nieznaną stężenie 8-OH-dG oraz standardy 8-OH-dG zostały dodane do płytki opłaszczonej konjugatem 8-OH-dG-BSA. Po 10 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej na wytrząsarce, dodano przeciwciało anty-8-OH-dG na okres 1 godziny, po czym płytkę starannie wypłukano buforem płuczającym. Następnie do studzienek dodano wtórne przeciwciało znakowane peroksydazą chrzanową (HRP) i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej na wytrząsarce. Po zakończeniu inkubacji, studzienki trzykrotnie wypłukano buforem płuczającym, a następnie dodano do nich roztwór substratu dla HRP na 15 minut. Reakcję barwną zatrzymano dodaniem buforu stopującego. Absorbancję próbek odczytano przy długości fali 450 nm z użyciem czytnika płytek EL<sub>x</sub>808<sup>TM</sup> (Bio-Tek U.S. Winooski, VT, USA). Stężenie 8-OH-dG w próbkach odczytano z przygotowanej krzywej wzorcowej.

### **14.3. Ocena aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD)**

Całkowitą aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w ekstraktach komórkowych zmierzono za pomocą zestawu firmy R&D Systems Europe (Abingdon, Wielka Brytania) [61]. Anionorodnik ponadtlenkowy generowany przez katalizowaną przez oksydazę ksantynową konwersję ksantyny do kwasu moczowego i nadtlenu wodoru powoduje przekształcenie błękitu nitrotetrazoliowego (NBT) do NBT-diformazanu, który pochłania światło przy długości fali 560 nm. SOD obniża stężenie anionorodnika ponadtlenkowego, przez co obniża też tempo powstawania NBT-diformazanu. Tempo hamowania powstawania NBT-diformazanu zostało wykorzystywane jako miara aktywności SOD w próbce badanej.

W trakcie pasażu pobrano  $2 \times 10^5$  komórek, które następnie wypłukano w PBS, odwirowano i poddano lizie za pomocą buforu lizującego. Po odwirowaniu próbek przez 5 minut przy prędkości 12 000 x g w temperaturze 4 °C, zebrano supernatanty do których

dodano następnie odpowiednie objętości buforu reakcyjnego oraz roztworu ksantyny. Po wymieszaniu, dodano roztwór NBT i znów starannie wymieszano. Następnie do próbek dodano roztwór oksydazy ksantynowej i zamieszano. Odczytu absorbancji dokonywano co 30 sekund przez okres 5 minut, a aktywność SOD odczytano z przygotowanej krzywej wzorcowej, składającej się z próbek o znanej aktywności SOD.

## 15. Ocena metabolizmu mitochondriów

### 15.1. Oznaczanie masy mitochondriów

Oceny masy mitochondriów dokonano na podstawie pomiaru fluorescencji emitowanej przez komórki wyznakowane barwnikiem fluorescencyjnym — *N-nonyl* oranżem akrydyny (NAO) (Sigma) [179]. W trakcie pasażu pobrano  $1 \times 10^5$  komórek, które wypłukano za pomocą PBS, odwirowano, a następnie zawieszono w świeżym medium bez surowicy z dodatkiem NAO (10  $\mu$ M). Po 10 minutach inkubacji w temperaturze 37 °C komórki ponownie odwirowano, a następnie starannie wypłukano celem pozbycia się nadmiaru barwnika. Peletę komórek zawieszono w PBS i przeniesiono do transparentnej płytki 96-studzienkowej (Nunc). Fluorescencję emitowaną przez komórki zmierzono przy długości fali wzbudzenia 435 nm i emisji 535, z użyciem spektrofлуorymetru Wallac Victor 2 (Perkin-Elmer).

### 15.2. Oznaczenie potencjału błony mitochondrialnej ( $\Delta\Psi_m$ )

Wielkość  $\Delta\Psi_m$  oceniono z wykorzystaniem zestawu Mitochondria Staining Kit (Sigma) zawierającego m.in. fluorescencyjny roztwór jodku 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylobenzimidazolokarbocyaninowego (JC-1) [180]. W trakcie pasażu zebrano  $1 \times 10^5$  komórek, które następnie wypłukano w PBS i odwirowano. Następnie komórki zawieszono w świeżym medium bez surowicy z dodatkiem JC-1 (1  $\mu$ M). Po 20 minutach inkubacji w temperaturze 37 °C komórki odwirowano i starannie wypłukano w celu pozbycia się nadmiaru barwnika. Następnie, peletę zawieszono w buforze reakcyjnym i przeniesiono do transparentnej płytki 96-studzienkowej (Nunc). Wówczas to dokonano dwóch pomiarów fluorescencji emitowanej przez komórki, tj. fluorescencji monomerów JC-1 przy długości fali wzbudzenia 490 nm i emisji 530 nm oraz fluorescencji agregatów JC-1 przy długości fali wzbudzenia 525 nm i emisji 590 nm. Pomiarów tych dokonano z wykorzystaniem spektrofлуorymetru Infinite M200 (Tecan Group Ltd, Mannedorf, Szwajcaria) sprzężonego

z programem Tecan i-Control. Wartości  $\Delta\Psi_m$  wyznaczono na podstawie wyliczonego stosunku fluorescencji emitowanej przez agregaty JC-1 do fluorescencji jego monomerów.

## **16. Zbiórka medium kondycjonowanego z hodowli KM**

Na 24 godziny przed planowanym pasażem hodowli, komórki starannie płukano HBSS, a następnie podawano im 4 ml standardowego medium M199 bez surowicy. W trakcie pasażu zbierano próbki podanego uprzednio medium (medium kondycjonowane), które następnie przefiltrowywano za pomocą filtrów strzykawkowych o średnicy porów 0,2  $\mu\text{m}$ . Do czasu wykorzystania, próbki medium kondycjonowanego były przechowywane w temperaturze  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ . W czasie danego pasażu, dokładnie liczono komórki, aby posiadać informację, jaka liczba komórek wydzielala czynniki rozpuszczone do medium w danym punkcie czasowym.

## **17. Ocena właściwości sekrecyjnych komórek**

Stężenia czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF) oraz chemokiny CXCL8/IL-8 oznaczano w zebranych uprzednio próbkach medium kondycjonowanego za pomocą metody immunoenzymatycznej ELISA, z wykorzystaniem zestawów DuoSet ELISA Development Kit (R&D Systems) [175]. Analizę wykonano w 96-studzienkowych płytkach mikrotitracyjnych typu MaxiSorp (Nunc), które pokrywano przeciwciałem „wychwytyjącym” na 24 godziny w temperaturze pokojowej. Po inkubacji, płytkę płukano czterokrotnie roztworem Tween 20 (0,05%) w PBS (bufor płuczący), po czym pozostałe miejsca wiążące blokowano roztworem Roti<sup>®</sup>-Block (10%) (Carl Roth, Karlsruhe, RFN) przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po ponownym czterokrotnym płukaniu studzienek buforem płuczającym, aplikowano do nich stałą objętość badanej próbki oraz szereg wzorców o znanych stężeniach (R&D Systems). Po 24 godzinach inkubacji w temperaturze  $4\text{ }^\circ\text{C}$  studzienki płukano buforem płuczającym, a następnie dodawano do nich przeciwciała biotynylowane. Po 2 godzinach inkubacji w temperaturze pokojowej i czterokrotnym wypłukaniu studzienek, płytkę inkubowano przez 30 minut z konjugatem streptawidyny i peroksydazy chrzanowej (HRP) (ICN Biochemicals, Cleveland, OH, USA), rozcieńczonym 1:10000 w roztworze zawierającym albuminę bydlęcą (0,1 %), Tween 20 (0,05 %), NaCl (150 mM), Tris (20 mM), pH 7,3 (bufor rozcieńczający).

**Tabela 4. Charakterystyka przeciwciał zastosowanych w metodzie ELISA.**

czynnik badany	I przeciwciało („wychytujące”)		II przeciwciało (biotynylowane)		krzywa wzorcowa w zakresie
	rodzaj (producent)	stężenie (rozcieńczone w...)	rodzaj (producent)	stężenie (rozcieńczone w...)	
<b>CXCL8/IL-8</b>	mysie monoklonalne anty-CXCL8/IL-8 (R&D Systems)	4 µg/ml (PBS)	kozie poliklonalne anty-CXCL8/IL-8 (R&D Systems)	20 ng/ml (bufor rozcieńczający)	31,25-2000 pg/ml
<b>VEGF</b>	kozie poliklonalne anty-VEGF (R&D Systems)	0,4 µg/ml (PBS)	kozie poliklonalne anty-VEGF (R&D Systems)	75 ng/ml (bufor rozcieńczający)	31,25-2000 pg/ml

Po wypłukaniu studzienek, rozwijano reakcję barwną poprzez podanie stabilizowanego roztworu 3,3',5,5'-tetrametylobenzydiny (TMB) i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Po 30 minutach przetrzymywania płytki w ciemności, reakcję barwną zatrzymywano poprzez dodanie do studzienek roztworu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 N). Odczytu absorbancji dokonywano przy długości fali 450 nm za pomocą czytnika płytek EL<sub>X</sub>808<sup>TM</sup>. Stężenia badanych substancji zostały automatycznie wygenerowane z krzywej wzorcowej. Uzyskane stężenia wyrażono w przeliczeniu na 10<sup>5</sup> komórek.

### **18. Ocena wpływu medium kondycjonowanego z hodowli KM eksponowanych na stilbeny na proliferację komórek śródbłonka naczyniowego HMEC-1**

Do oceny proliferacji komórek śródbłonka naczyń użyto komórek mikrokrążenia naczyń skórnych HMEC-1 [181], a samego pomiaru dokonano za pomocą testu MTT [175]. Komórki śródbłonka naczyniowego posiano do 96-studzienkowych płytek mikrotitracyjnych w gęstości 2x10<sup>3</sup> komórek na studzienkę i pozostawiono je na 4 godziny. Po tym czasie, studzienki delikatnie wypłukano HBSS i dodano do nich medium pozbawione surowicy na 16 godzin, celem synchronizacji hodowli. Po upływie tego czasu i usunięciu medium, komórki eksponowano na próbki medium kondycjonowanego, pobrane z hodowli KM, przez 48 godzin, po czym wykonano test MTT. Jak wspomniano uprzednio, komórki HMEC-1 rosnące standardowo w medium MCDB-131, na 2 tygodnie przez planowanym przystąpieniem do właściwego eksperymentu były przenoszone do medium M199,

właściwego dla hodowli KM i tożsamego z zastosowanym później medium kondycjonowanym.

### **19. Analiza statystyczna**

Analizę statystyczną wyników wykonano przy użyciu programu statystycznego GraphPad Prism™ 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) posługując się testem analizy wariancji dla powtórzonych pomiarów (repeated measures ANOVA) oraz testem Newman-Keuls jako post-hoc. Porównania krzywych w funkcji czasu dokonano za pomocą wieloczynnikowej analizy wariancji (two-way ANOVA). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  standardowy błąd średniej (SEM). Za istotne statystycznie przyjęto różnice z wartością współczynnika  $P < 0,05$ .

## WYNIKI

### 1. Doświadczenia wstępne

W pierwszej kolejności przeprowadzono szereg badań pilotażowych, których celem było m.in. określenie stopnia cytotoksyczności badanych stilbenów (ocena żywotności komórek testem MTT). Następnie oceniono proliferację komórek poddanych działaniu nietoksycznych stężeń stilbenów, w celu dokonania wyboru stężeń roboczych do dalszych eksperymentów (ocena proliferacji estem MTT oraz za pomocą oceny stopnia wychwyty tymidyny znakowanej trytem). Także w toku badań wstępnych przeprowadzono analizę kinetyki rozkładu badanych stilbenów w medium hodowlanym, w warunkach inkubacji.

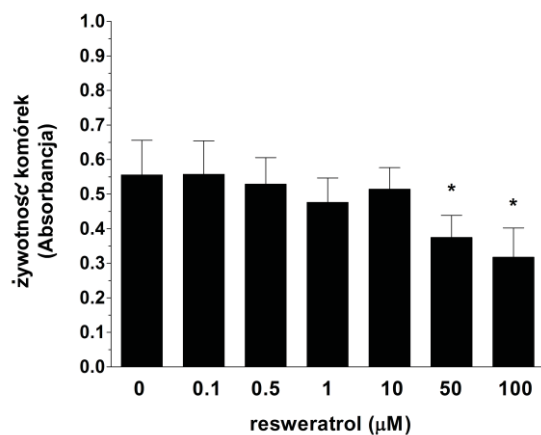
#### 1.1. Wpływ dimetylosulfotlenku (DMSO) na właściwości biologiczne komórek

Stilbeny pozyskane w formie stałej, przed dodaniem ich w odpowiednim stężeniu do medium hodowlanego, rozpuszczane były w niewielkiej objętości DMSO. Doświadczenia przeprowadzone pod kątem oceny wpływu DMSO na żywotność i proliferację KM wykazały, że przy zastosowanym rozcieńczeniu DMSO w medium hodowlanym (<0,05%), związek ten nie wpływa w znaczący sposób na te parametry (nie zilustrowano graficznie). Podobny wynik, oznaczający brak wpływu DMSO, odnotowano w serii pilotażowych badań każdego z parametrów, które zostały ocenione w niniejszej rozprawie.

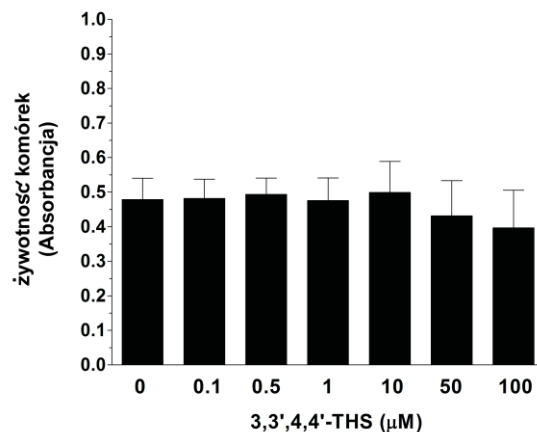
#### 1.2. Ocena żywotności komórek

Badania przeprowadzono na szerokim zakresie stężeń stilbenów, tj. od 0,1 do 100  $\mu\text{M}$ . Komórki poddano działaniu związków badanych przez 24 godziny. Jako grupę kontrolną wykorzystano komórki inkubowane w standardowym medium. Doświadczenia wykazały, że w przypadku resweratrolu oraz 3,3',5,5'-THS i 3,3',4,4',5,5'-HHS, żywotność komórek pozostających w stadium zlewności jest porównywalna z grupą kontrolną aż do stężenia 10  $\mu\text{M}$ . W przypadku stężeń 50 i 100  $\mu\text{M}$  zaobserwowano każdorazowo istotne statystycznie ( $P < 0,01$ ) obniżenie żywotności komórek w porównaniu z grupą kontrolną (**Ryc. 9 A, C, D**). Ekspozycja komórek na 3,3',4,4'-THS pokazała, z kolei, iż związek ten jest najbezpieczniejszy w stosunku do komórek badanych, gdyż nawet w stężeniach 50 i 100  $\mu\text{M}$  uzyskane wyniki żywotności komórek nie różniły się znacząco od grupy kontrolnej (**Ryc. 9B**).

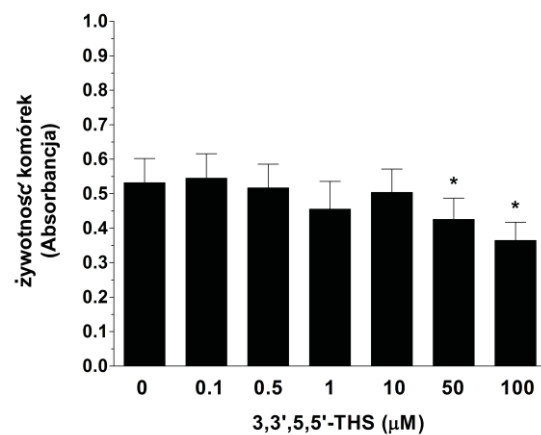
A.



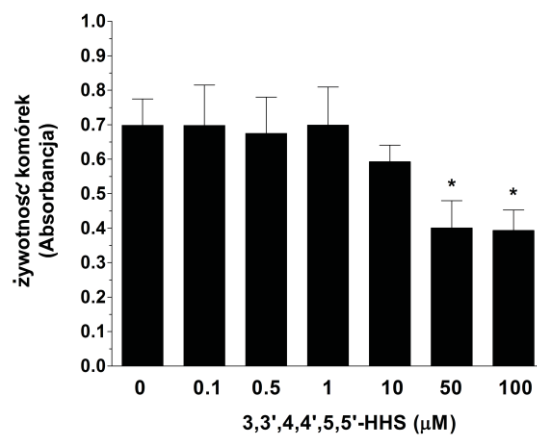
B.



C.



D.



Rycina 9. Wpływ stilbenów: resweratrolu (A), 3,3',4,4'-THS (B), 3,3',5,5'-THS (C) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (D) na żywotność młodych KM. Analizę przeprowadzono na zlewnych hodowlach komórkowych za pomocą testu MTT. Gwiazdkami oznaczono istotne statystycznie różnice w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w kwadryplikatach na komórkach od 4 różnych dawców.

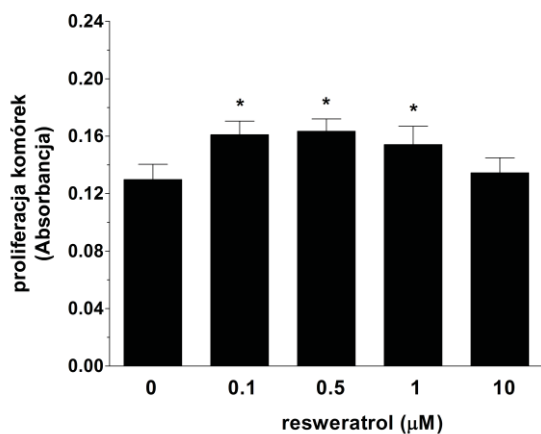
### 1.3. Ocena proliferacji komórek w systemie ostrym

W dalszym toku badań wstępnych, już z wykorzystaniem nietoksycznego zakresu stężeń stilbenów, tj. od 0,1 do 10  $\mu\text{M}$  oceniono proliferację KM w systemie ostrym. W pierwszej kolejności wykorzystano raz jeszcze test MTT, z tą różnicą, że tym razem komórki posiane zostały w studzienkach bardzo rzadko, umożliwiając im swobodną proliferację przez 24 godziny. Badania te wykazały, że wszystkie spośród badanych stilbenów mają zdolność pobudzania proliferacji KM. W przypadku resweratrolu, pobudzenie proliferacji odnotowano przy stężeniach 0,1, 0,5 i 1  $\mu\text{M}$ , przy czym efekt ten był największy przy stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  (wzrost o  $29 \pm 9\%$ ,  $P < 0,05$ ) (**Ryc. 10-A**). Niemal identyczny efekt zaobserwowano w przypadku 3,3',4,4'-THS (wzrost o  $23 \pm 9\%$ ,  $P < 0,05$  przy stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$ ) (**Ryc. 10-B**). W odniesieniu do 3,3',5,5'-THS, pobudzenie proliferacji KM było z kolei najwyższe przy stężeniu związku 0,1  $\mu\text{M}$  (wzrost o  $21 \pm 8\%$ ,  $P < 0,05$ ), a nieco słabszy efekt odnotowano w komórkach eksponowanych na stilben w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  (**Ryc. 10-C**). W przypadku 3,3',4,4',5,5'-HHS stężenie 0,1  $\mu\text{M}$  było jedynym, które wywarło efekt pobudzający (wzrost o  $26 \pm 10\%$ ,  $P < 0,05$ ) (**Ryc. 10-D**).

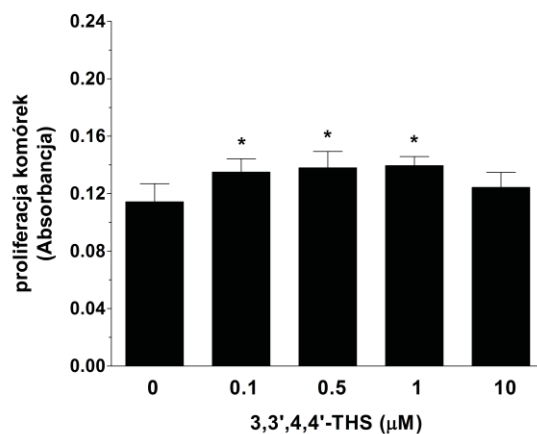
Aby zweryfikować uzyskany efekt, przeprowadzono powtórny analizę proliferacji komórek, tym razem za pomocą oceny stopnia inkorporacji tymidyny znakowanej trytem do DNA komórek proliferujących. W przypadku resweratrolu, uzyskano pobudzenie proliferacji KM wyłącznie przy stężeniu związku 0,5  $\mu\text{M}$ , a efekt ten był jeszcze wyraźniejszy niż ten, uzyskany za pomocą testu MTT (wzrost o  $39 \pm 15\%$ ,  $P < 0,05$ ) (**Ryc. 11-A**). Także 3,3',5,5'-THS pobudził proliferację KM najsilniej przy stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  (wzrost o  $27 \pm 1\%$ ,  $P < 0,05$ ) oraz 0,1  $\mu\text{M}$  (wzrost o  $22 \pm 3\%$ ,  $P < 0,05$ ), natomiast stężenie 10  $\mu\text{M}$  wywarło efekt hamujący (**Ryc. 11-C**). W przypadku 3,3',4,4'-THS, silne i bardzo zbliżone pobudzenie podziałów KM zaobserwowano przy stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  (wzrost o  $56 \pm 12\%$ ,  $P < 0,05$ ) oraz 1  $\mu\text{M}$  (wzrost o  $53 \pm 22\%$ ,  $P < 0,05$ ) (**Ryc. 11-B**), natomiast 3,3',4,4',5,5'-HHS pobudzał proliferację komórek tylko przy stężeniu 0,1  $\mu\text{M}$  (wzrost o  $43 \pm 20\%$ ,  $P < 0,05$ ) (**Ryc. 11-D**).



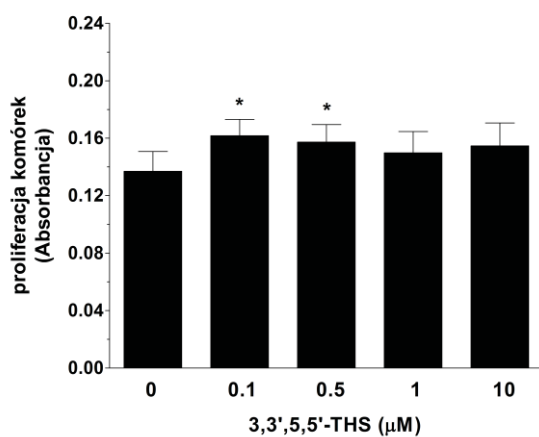
A.



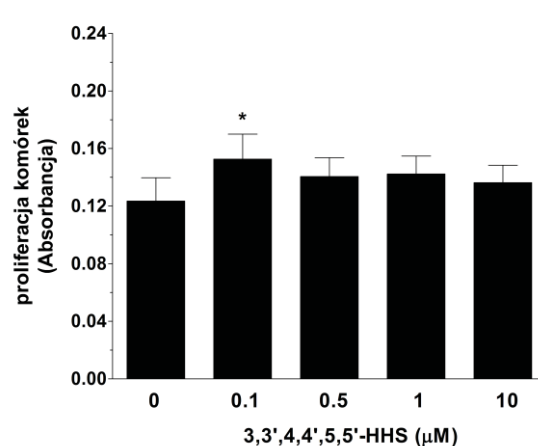
B.



C.

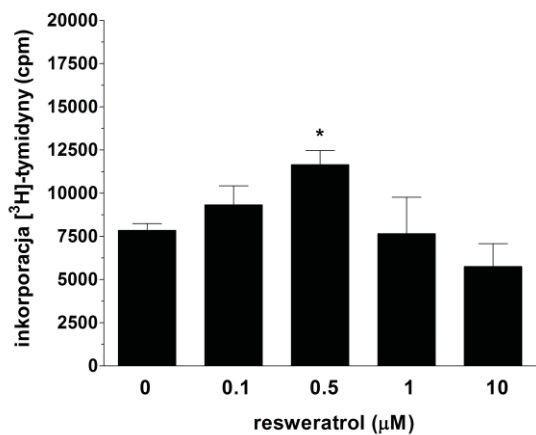


D.

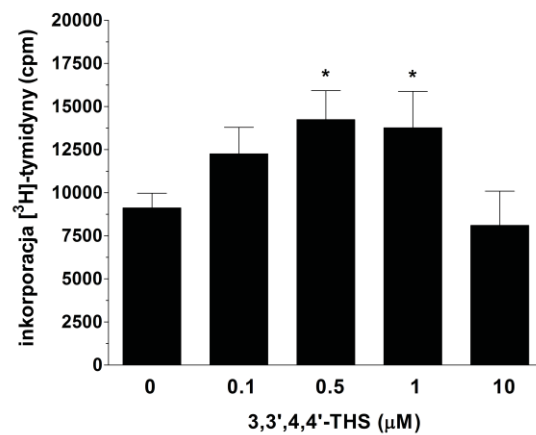


Rycina 10. Wpływ stilbenów: resweratrolu (A), 3,3',4,4'-THS (B), 3,3',5,5'-THS (C) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (D) na proliferację młodych KM. Analizę przeprowadzono na komórkach proliferujących za pomocą testu MTT. Gwiazdkami oznaczono istotne statystycznie różnice w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w kwadruplikatach na komórkach od 6 różnych dawców.

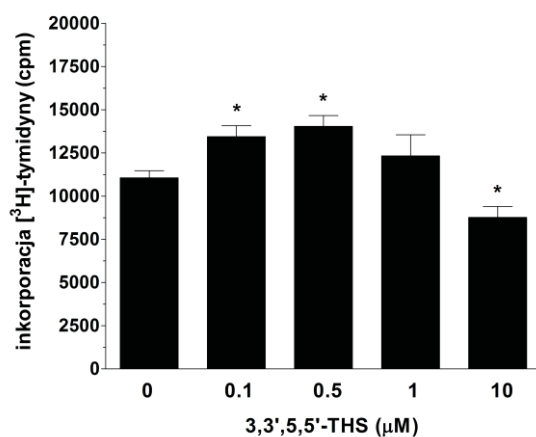
**A.**



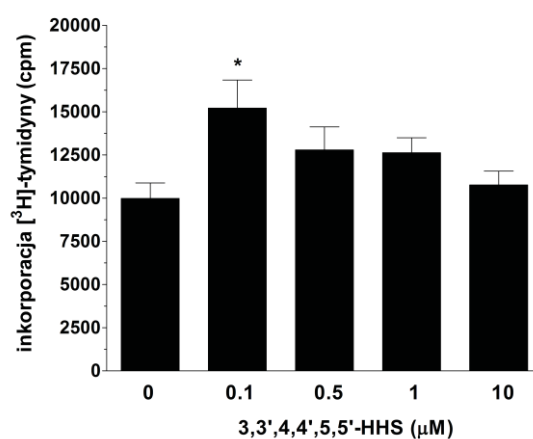
**B.**



**C.**



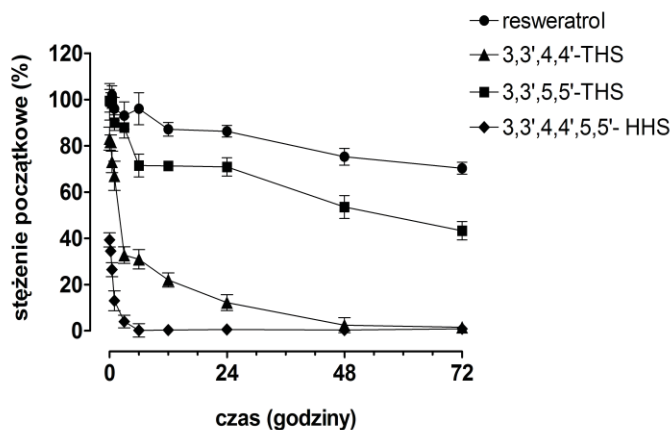
**D.**



**Rycina 11. Wpływ stilbenów: resweratrolu (A), 3,3',4,4'-THS (B), 3,3',5,5'-THS (C) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (D) na proliferację młodych KM.** Analizę przeprowadzono na komórkach proliferujących za pomocą pomiaru wychwytu przez komórki dzielące się tymidyny znakowanej trytem. Gwiazdkami oznaczono istotne statystycznie różnice w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych na komórkach od 3 różnych dawców.

#### 1.4. Stabilność badanych związków w medium hodowlanym

Ocenę stabilności stilbenów w medium hodowlanym przeprowadzono metodą HPLC. Badania wykazały, że najwyższą stabilnością spośród badanych stilbenów charakteryzuje się resweratrol, w przypadku którego, po 72 godzinach inkubacji w 37 °C, pozostało w medium jeszcze  $70 \pm 3\%$  stężenia wyjściowego. Drugim co do trwałości stilbenem okazał się 3,3',5,5'-THS, który choć ulegał szybciej rozkładowi niż resweratrol, to jednak po 72 godzinach jego stężenie w medium wynosiło  $43 \pm 4\%$  wartości początkowej. Co warto podkreślić, w przypadku tego związku, jeszcze po 24 godzinach inkubacji, pozostawało w medium  $71 \pm 4\%$  dawki wyjściowej. Należy także odnotować, iż zarówno w przypadku resweratrolu, jak i 3,3',5,5'-THS, oba te związki cechowały się najwyższym stopniem trwałości w przedziale czasowym do 6 godzin. Trzeci z badanych stilbenów, 3,3',4,4'-THS, cechował się zdecydowanie większym tempem rozkładu, czego dowodem była degradacja związku do  $31 \pm 4\%$  wartości początkowej już w pierwszych 6 godzinach inkubacji. W ostatnim punkcie czasowym, tj. po 72 godzinach, w medium można było stwierdzić zaledwie  $1 \pm 2\%$  stężenia wyjściowego związku. Najszybszym tempem rozkładu charakteryzował się 3,3',4,4',5,5'-HHS, którego krzywa była najbardziej stroma, czego potwierdzeniem była m.in. redukcja stężenia wyjściowego do wartości  $13 \pm 4\%$ ,  $0,2 \pm 3\%$  i  $0,8 \pm 0,7\%$ , po, odpowiednio, 1, 6 i 72 godzinach inkubacji (**Ryc. 12**).



**Rycina 12. Ocena stabilności stilbenów badanych w medium hodowlanym.** Analizę przeprowadzono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) na próbkach medium hodowlanego zawierającego ustalone stężenie resweratrolu, 3,3',4,4'-THS, 3,3',5,5'-THS i 3,3',4,4',5,5'-HHS. W każdym z punktów czasowych pobierano trzy próbki medium badanego i poddawano je analizie chromatograficznej, ustalając stężenie związku oraz odnosząc wynik do stężenia wyjściowego. Dane wyrażono w procentach. Jako wartość 100% dla czasu  $t=0$  wykorzystano roztwór metanolu.

## 2. Doświadczenia właściwe

### 2.1. Wpływ stilbenów na ekspresję antygenu PCNA w młodych i starych KM

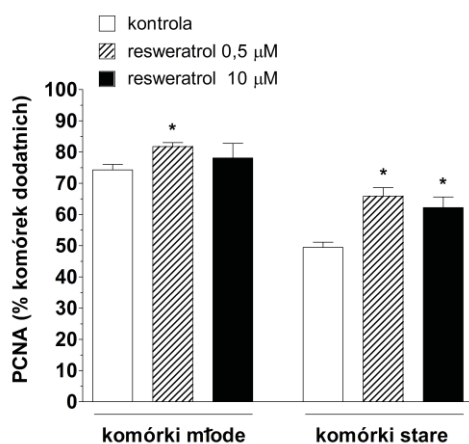
Badania mające na celu określenie stopnia ekspresji antygenu proliferacyjnego PCNA przeprowadzone na komórkach młodych wykazały, że resweratrol w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  zwiększa odsetek komórek PCNA-dodatnich o  $10 \pm 2\%$  ( $P < 0,01$ ). W stężeniu 10  $\mu\text{M}$  nie odnotowano istotnej statystycznie różnicy względem grupy kontrolnej. Z kolei, poddając badaniu hodowle stare zaobserwowano wzrost odsetka komórek PCNA-dodatnich zarówno wskutek ekspozycji na resweratrol w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  (o  $34 \pm 5\%$ ,  $P < 0,001$ ), jak również w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  (o  $27 \pm 7\%$ ,  $P < 0,001$ ) (**Ryc. 13-A**).

W przypadku 3,3',4,4'-THS stwierdzono, iż związek użyty w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  zwiększa frakcję komórek PCNA-dodatnich w hodowlach młodych o  $11 \pm 4\%$  ( $P < 0,05$ ) oraz w komórkach starych o  $28 \pm 4\%$  ( $P < 0,001$ ). W komórkach eksponowanych na stilben w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  nie odnotowano natomiast różnicy w odsetku komórek PCNA-dodatnich w żadnym z badanych punktów czasowych (**Ryc. 13-B**).

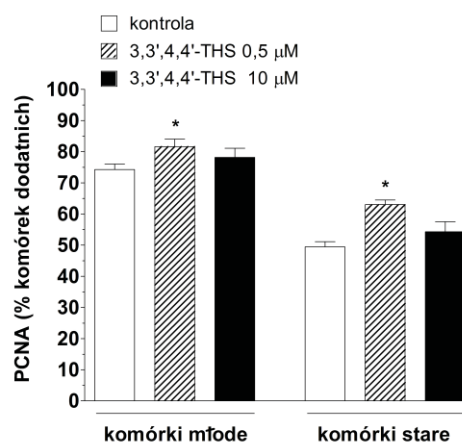
Gdy ocenie poddano preparaty z komórkami eksponowanymi na 3,3',5,5'-THS stwierdzono, że w komórkach młodych stilben ten nie wpływa na zmianę odsetka komórek PCNA-dodatnich, niezależnie od użytego stężenia. Natomiast w komórkach starych, eksponowanych na 3,3',5,5'-THS w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  odnotowano wzrost odsetka komórek PCNA-dodatnich o  $41 \pm 5\%$  ( $P < 0,001$ ). W przypadku komórek poddanych działaniu stilbenu w stężeniu 10  $\mu\text{M}$ , wielkość frakcji komórek PCNA-dodatnich wzrosła o  $22 \pm 5\%$  ( $P < 0,001$ ) (**Ryc. 13-C**).

Stilben 3,3',4,4',5,5'-HHS zastosowany w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  nie wpłynął na odsetek komórek PCNA-dodatnich w komórkach młodych, natomiast w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  spowodował obniżenie wielkości tej frakcji o  $35 \pm 8\%$  ( $P < 0,001$ ). Analogiczny efekt uzyskano w komórkach starych; podczas gdy w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  związek ten nie wpływał w sposób istotny na wielkość frakcji komórek PCNA-dodatnich, w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  spowodował obniżenie wielkości tej frakcji o  $16 \pm 6\%$  ( $P < 0,02$ ) (**Ryc. 13-D**).

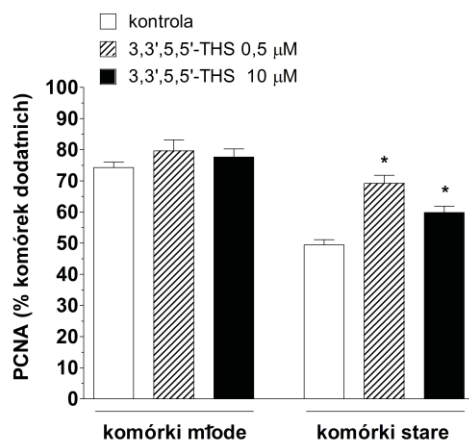
A.



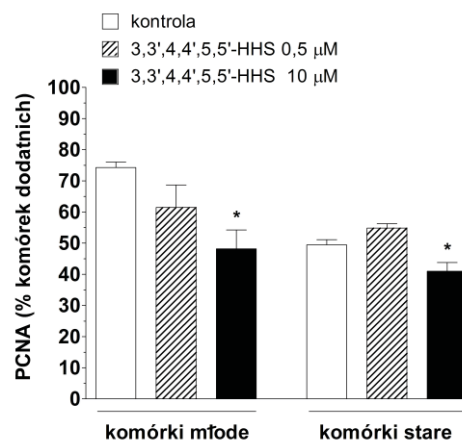
B.



C.



D.



Rycina 13. Wpływ stilbenów: resweratrolu (A), 3,3',4,4'-THS (B), 3,3',5,5'-THS (C) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (D) na ekspresję antygenu proliferacyjnego PCNA w młodych i starych KM. Analizę przeprowadzono na komórkach w stadium 30-50% zlewności za pomocą metody immunocytochemicznej. Gwiazdkami oznaczono istotne statystycznie różnice w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach na komórkach od 6 różnych dawców.

## 2.2. Wpływ stilbenów na dystrybucję młodych i starych KM w cyklu komórkowym

Analizę dystrybucji komórek w poszczególnych fazach cyklu mitotycznego wykonano za pomocą cytometrycznej oceny komórek wybarwionych jodkiem propidyny (PI), z wykorzystaniem oprogramowania ModFit. Szczególną uwagę w tym badaniu położono na zmiany odsetka komórek w fazie S cyklu podziałowego, tj. komórek aktualnie syntetyzujących swoje DNA. Wyniki badań przedstawiono w **tabeli 5**, a przykładowy histogram ilustrujący wpływ resweratrolu w obu stężeniach na komórki stare przedstawiono na **rycinie 14**.

Wykazano, że resweratrol zastosowany w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  zwiększa odsetek komórek fazy S w hodowlach młodych o  $24 \pm 1\%$  ( $P < 0,02$ ) w porównaniu z grupą kontrolną. Jednocześnie nie odnotowano zmian odsetka komórek młodych w fazie S pod wpływem resweratrolu w stężeniu 10  $\mu\text{M}$ . W przypadku analizy komórek starych, resweratrol w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  spowodował wzrost odsetka komórek będących w fazie S cyklu o  $42 \pm 8\%$  ( $P < 0,05$ ). Także i w tym przypadku nie stwierdzono istotnego statystycznie efektu wywieranego przez resweratrol w stężeniu 10  $\mu\text{M}$ .

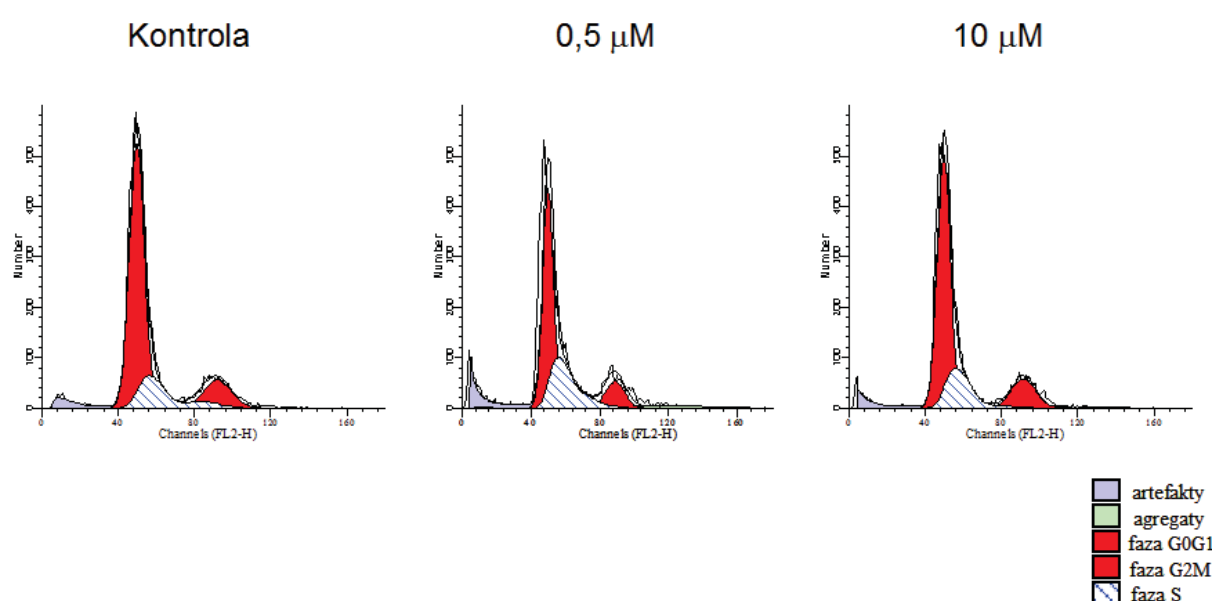
Fracja komórek w fazie S cyklu podziałowego w hodowlach młodych eksponowanych na 3,3',4,4'-THS w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  była o  $24 \pm 11\%$  wyższa ( $P < 0,05$ ) w stosunku do grupy kontrolnej. Z kolei w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  związek ten nie wpłynął na zmianę wielkości frakcji komórek w fazie S. Badania przeprowadzone na komórkach starych wykazały natomiast, iż 3,3',4,4'-THS w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  zwiększa odsetek komórek w fazie S o  $45 \pm 11\%$  ( $P < 0,05$ ), natomiast zastosowany w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  obniża odsetek komórek w fazie S o  $45 \pm 7\%$  ( $P < 0,05$ ).

Badania z użyciem 3,3',5,5'-THS wykazały, że zarówno w komórkach młodych, jak i starych związek ten nie wpływa na zmianę odsetka komórek w fazie S cyklu, niezależnie od zastosowanego stężenia.

3,3',4,4',5,5'-HHS w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  nie wpływał na zmianę odsetka komórek młodych w fazie S, natomiast w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  spowodował obniżenie tej wartości o  $14 \pm 6\%$  ( $P < 0,05$ ). W komórkach starych nie odnotowano istotnego statystycznie wpływu 3,3',4,4',5,5'-HHS na odsetek komórek w fazie S.

**Tabela 5. Wpływ stilbenów na dystrybucję młodych i starych KM w cyklu komórkowym.** Badanie przeprowadzono metodą cytometrii przepływowej na komórkach wyznakowanych PI. Badaniu poddano  $1 \times 10^6$  komórek z każdej grupy. Analizę przeprowadzono w duplikatach na komórkach pobranych od trzech dawców. Gwiazdkami oznaczono istotną statystycznie różnicę w stosunku do grupy kontrolnej. Dokładny poziom poszczególnych istotności statystycznych został podany w tekście pracy.

<b>KOMÓRKI MŁODE</b>					
<b>0,5 <math>\mu</math>M</b>					
<b>faza cyklu</b>	<b>kontrola</b>	<b>resweratrol</b>	<b>3,3',4,4'-THS</b>	<b>3,3',5,5'-THS</b>	<b>3,3',4,4',5,5'-HHS</b>
	%	%	%	%	%
G <sub>0</sub> -G <sub>1</sub>	38 $\pm$ 2	31 $\pm$ 2	27 $\pm$ 1	37 $\pm$ 2	40 $\pm$ 2
S	36 $\pm$ 4	44 $\pm$ 1*	44 $\pm$ 2*	37 $\pm$ 4	35 $\pm$ 3
G <sub>2</sub> -M	26 $\pm$ 4	25 $\pm$ 3	29 $\pm$ 1	26 $\pm$ 2	25 $\pm$ 2
<b>10 <math>\mu</math>M</b>					
G <sub>0</sub> -G <sub>1</sub>	37 $\pm$ 3	37 $\pm$ 1	36 $\pm$ 2	38 $\pm$ 1	42 $\pm$ 1
S	34 $\pm$ 4	34 $\pm$ 4	35 $\pm$ 3	34 $\pm$ 4	28 $\pm$ 1*
G <sub>2</sub> -M	29 $\pm$ 2	29 $\pm$ 1	29 $\pm$ 1	28 $\pm$ 3	30 $\pm$ 2
<b>KOMÓRKI STARE</b>					
<b>0,5 <math>\mu</math>M</b>					
<b>faza cyklu</b>	<b>kontrola</b>	<b>resweratrol</b>	<b>3,3',4,4'-THS</b>	<b>3,3',5,5'-THS</b>	<b>3,3',4,4',5,5'-HHS</b>
	%	%	%	%	%
G <sub>0</sub> -G <sub>1</sub>	68 $\pm$ 5	60 $\pm$ 7	62 $\pm$ 3	68 $\pm$ 4	70 $\pm$ 3
S	20 $\pm$ 2	28 $\pm$ 2*	29 $\pm$ 5*	20 $\pm$ 3	22 $\pm$ 2
G <sub>2</sub> -M	12 $\pm$ 1	12 $\pm$ 1	9 $\pm$ 1	12 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1
<b>10 <math>\mu</math>M</b>					
G <sub>0</sub> -G <sub>1</sub>	63 $\pm$ 2	68 $\pm$ 2	84 $\pm$ 1	66 $\pm$ 4	71 $\pm$ 3
S	20 $\pm$ 2	22 $\pm$ 3	11 $\pm$ 1*	24 $\pm$ 3	20 $\pm$ 3
G <sub>2</sub> -M	17 $\pm$ 1	10 $\pm$ 1	5 $\pm$ 1	10 $\pm$ 1	9 $\pm$ 1



**Rycina 14. Przykładowy histogram ilustrujący wpływ resweratrolu na dystrybucję starych HPMC w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Badanie przeprowadzono na komórkach wyznakowanych PI metodą cytometrii przepływowej, z wykorzystaniem programu Mod-Fit.**



### **2.3. Wpływ stilbenów na kinetykę starzenia się KM *in vitro***

Badania mające na celu określenie maksymalnej liczby podziałów (CPD), którą mogą osiągnąć KM rosnące w obecności resweratrolu wykazały, że związek ten zastosowany w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  zwiększa potencjał podziałowy komórek o  $35 \pm 6\%$  ( $P < 0,01$ ). Natomiast w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  związek ten nie wykazywał statystycznie znamiennych różnic w odniesieniu do grupy kontrolnej (**Ryc. 15-A**).

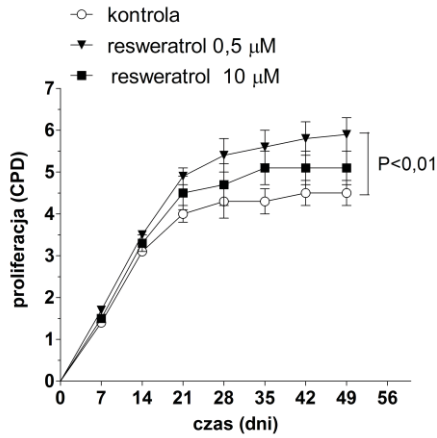
Podobny efekt uzyskano również dla 3,3',4,4'-THS, w przypadku którego wartość CPD wzrosła o  $22 \pm 5\%$  ( $P < 0,05$ ) w porównaniu z grupą kontrolną. Co ciekawe, związek ten użyty w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  wykazał działanie antyproliferacyjne, obniżając wartość CPD komórek o  $25 \pm 9\%$  ( $P < 0,001$ ) w stosunku do grupy kontrolnej (**Ryc. 15-B**).

Ocena komórek rosnących w obecności 3,3',5,5'-THS wykazała, że związek ten nie wpływa na osiąganą przez komórki liczbę podziałów, niezależnie od zastosowanego stężenia (**Ryc. 15-C**).

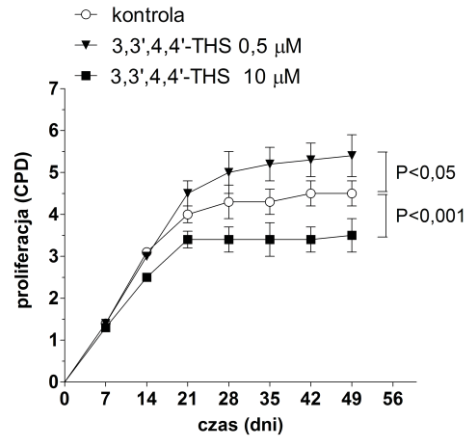
3,3',4,4',5,5'-HHS zastosowany w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  nie wpłynął na zmianę wartości CPD komórek badanych, natomiast przy użyciu stężenia 10  $\mu\text{M}$  odnotowano istotne statystycznie obniżenie potencjału podziałowego w porównaniu z grupą kontrolną (o  $52 \pm 9\%$ ,  $P < 0,001$ ) (**Ryc. 15-D**).

Na **rycinie 16** przedstawiono reprezentatywne zdjęcia, obrazujące wpływ resweratrolu w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  na potencjał podziałowy oraz morfologię komórek w trakcie pasażu 1, 4 i 7 (komórki stare).

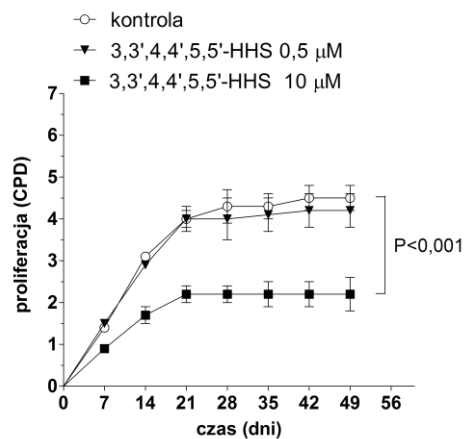
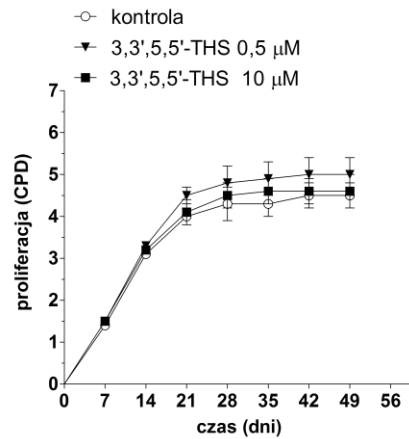
**A.**



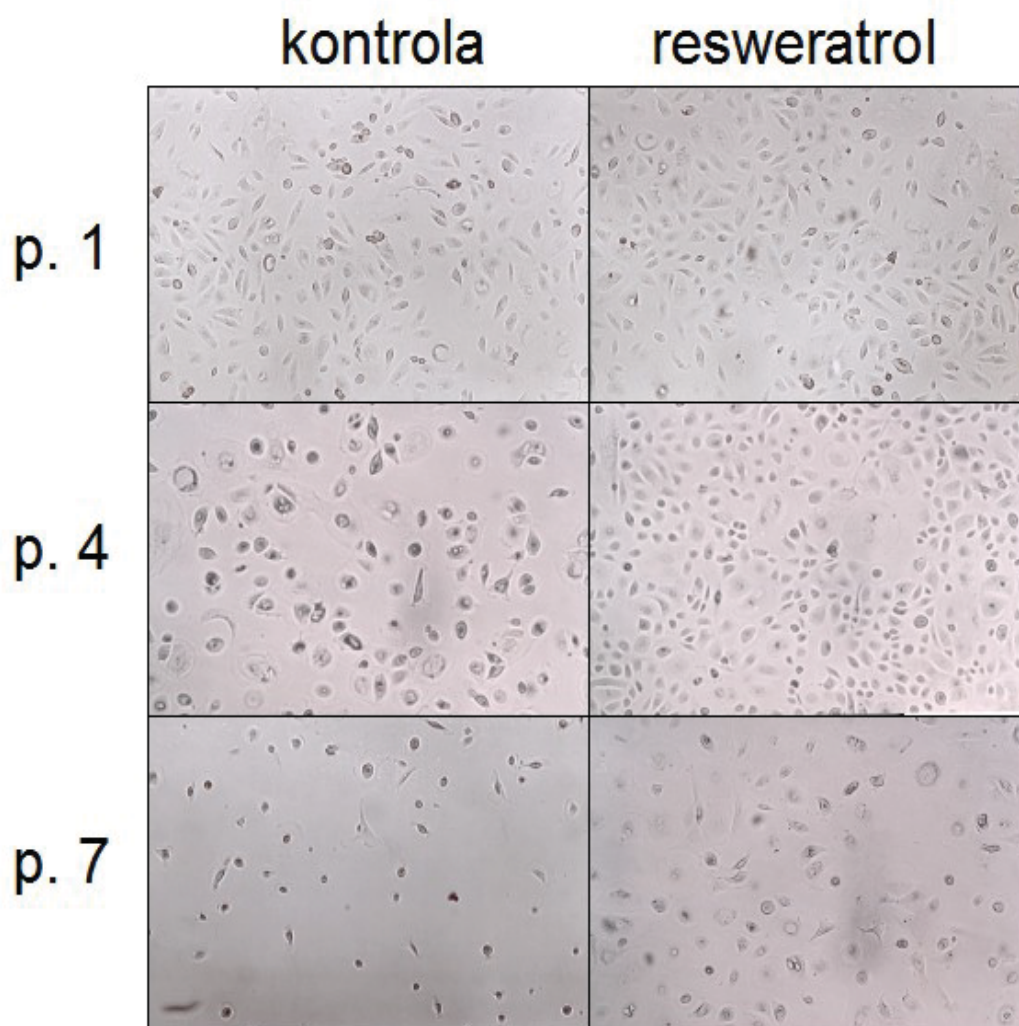
**B.**



**C.**



**Rycina 15. Wpływ stilbenów: resweratrolu (A), 3,3',4,4'-THS (B), 3,3',5,5'-THS (C) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (D) na kinetykę starzenia się KM.** W trakcie doświadczeń, komórki posiewane w stałej gęstości pasażowano co 7 dni aż do momentu wyczerpania ich potencjału podziałowego (osiągnięcia limitu Hayflicka). Porównania krzywych w funkcji czasu dokonano za pomocą wieloczynnikowej analizy wariancji (two-way ANOVA). Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach na komórkach od 9 różnych dawców.



**Rycina 16. Przykładowe zdjęcia ilustrujące wpływ resweratrolu w stężeniu 0,5  $\mu$ M na potencjał proliferacyjny i morfologię KM w trakcie wybranych pasaży.**

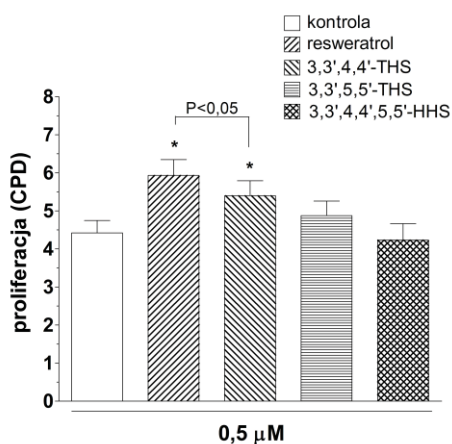
(p) - pasaż. Powiększenie x 40.

## 2.4. Porównanie wpływu poszczególnych stilbenów na liczbę podziałów osiągniętych przez KM *in vitro*

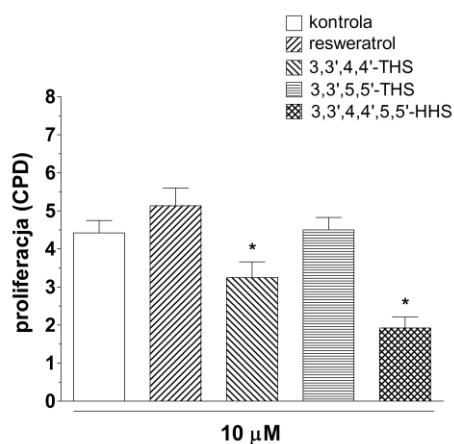
Bezpośrednie porównanie wpływu badanych stilbenów na uzyskiwane przez komórki wartości CPD wykazało, że przy zastosowaniu stężenia 0,5  $\mu\text{M}$  tylko resweratrol oraz 3,3',4,4'-THS zwiększają istotnie możliwości podziałowe komórek, przy czym silniejszy efekt jest wywierany przez pierwszy z wymienionych związków (**Ryc. 17-A**).

Z drugiej strony, gdy analizie poddano komórki rosnące w obecności stilbenów w stężeniu 10  $\mu\text{M}$ , żadna z badanych substancji nie wpłynęła na wzrost wartości CPD w porównaniu z grupą kontrolną. Jednocześnie jednak, 3,3',4,4'-THS oraz 3,3',4,4',5,5'-HHS okazały się zmniejszać potencjał podziałowy komórek, a silniejszy efekt antyproliferacyjny odnotowano w przypadku 3,3',4,4',5,5'-HHS (**Ryc. 17-B**).

**A.**



**B.**



**Rycina 17. Porównanie wpływu poszczególnych stilbenów, zastosowanych w stężeniach 0,5  $\mu\text{M}$  (A) i 10  $\mu\text{M}$  (B) na skumulowaną liczbę podwojeń populacji (CPD), osiąganą przez KM *in vitro*.** Gwiazdkami oznaczono istotne statystycznie różnice w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach na komórkach od 9 różnych dawców.

## **2.5. Wpływ stilbenów na ekspresję SA-β-Gal w młodych i starych KM**

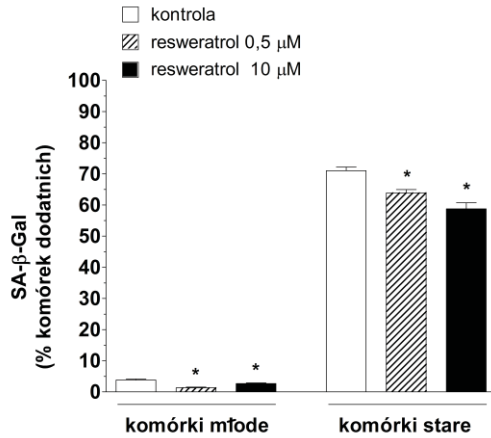
Cytoplazmatyczna ekspresja enzymu β-galaktozydazy związanej ze starzeniem się (SA-β-Gal), wykrywana za pomocą metody cytochemicznej, jest powszechnie uznawanym markerem komórek starych *in vitro* [33]. Badania wykazały, że resweratrol zastosowany w stężeniu 0,5 μM wpływa na obniżenie odsetka komórek SA-β-Gal-dodatnich w hodowlach młodych KM o 63 ± 7% (P<0,001), natomiast w stężeniu 10 μM o 30 ± 3% (P<0,01). W komórkach starych, resweratrol w stężeniu 0,5 μM spowodował obniżenie frakcji komórek SA-β-Gal-dodatnich o 10 ± 2% (P<0,01), natomiast w stężeniu 10 μM o 17 ± 3% (P<0,001). **(Ryc. 18-A).**

Badanie przeprowadzone na komórkach młodych poddanych działaniu 3,3',4,4'-THS wykazały, że związek ten powoduje obniżenie odsetka komórek SA-β-Gal-dodatnich o 65 ± 5% (P<0,001). Nie odnotowano natomiast istotnego wpływu związku w stężeniu 10 μM. W komórkach starych, 3,3',4,4'-THS obniżył wielkość frakcji komórek SA-β-Gal-dodatnich przy obu zastosowanych stężeniach; o 18 ± 3% (P<0,001) przy stężeniu 0,5 μM oraz o 15 ± 3% (P<0,001) przy stężeniu 10 μM **(Ryc. 18-B).**

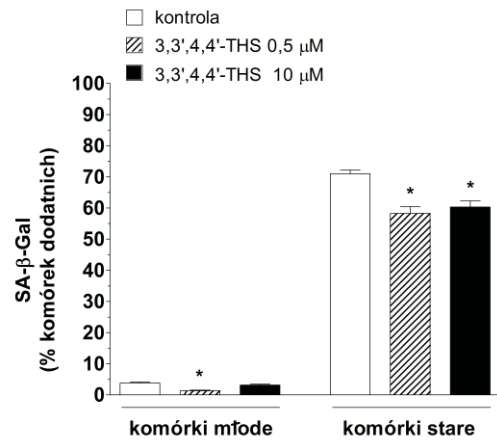
3,3',5,5'-THS użyty w stężeniu 0,5 μM oraz 10 μM nie wpłynął na zmianę wielkości frakcji komórek SA-β-Gal-dodatnich w hodowlach młodych. Natomiast w hodowlach starych, związek ten obniżył odsetek komórek SA-β-Gal-dodatnich o 9 ± 4% (P<0,05) przy stężeniu 0,5 μM oraz o 9 ± 3% (P<0,05) przy stężeniu 10 μM **(Ryc. 18-C).**

Także w przypadku 3,3',4,4',5,5'-HHS nie odnotowano istotnej statystycznie zmiany wielkości frakcji komórek SA-β-Gal-dodatnich w hodowlach młodych, niezależnie od użytego stężenia związku. Z kolei w hodowlach starych, 3,3',4,4',5,5'-HHS w stężeniu 0,5 μM obniżył odsetek komórek SA-β-Gal-dodatnich o 20 ± 7% (P<0,01), natomiast w stężeniu 10 μM o 33 ± 2% (P<0,001) **(Ryc. 18-D).**

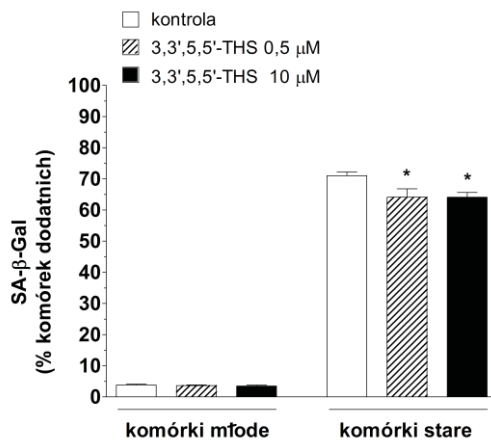
**A.**



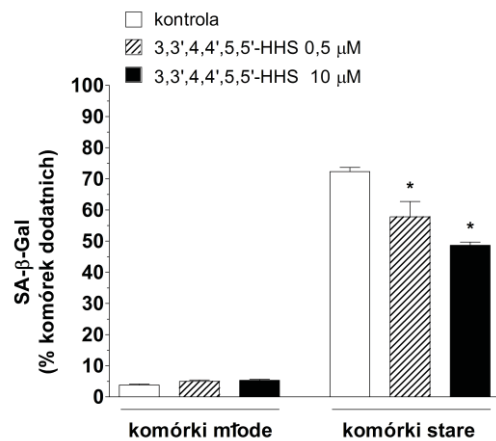
**B.**



**C.**



**D.**



**Rycina 18. Wpływ stilbenów: resweratrolu (A), 3,3',4,4'-THS (B), 3,3',5,5'-THS (C) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (D) na obecność SA-β-Gal w młodych i starych KM. Badania przeprowadzono na komórkach w stadium 50-70% zlewności za pomocą metody cytochemicznej w środowisku o pH 6,0. Gwiazdkami oznaczono istotne statystycznie różnice w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach na komórkach od 6 różnych dawców.**

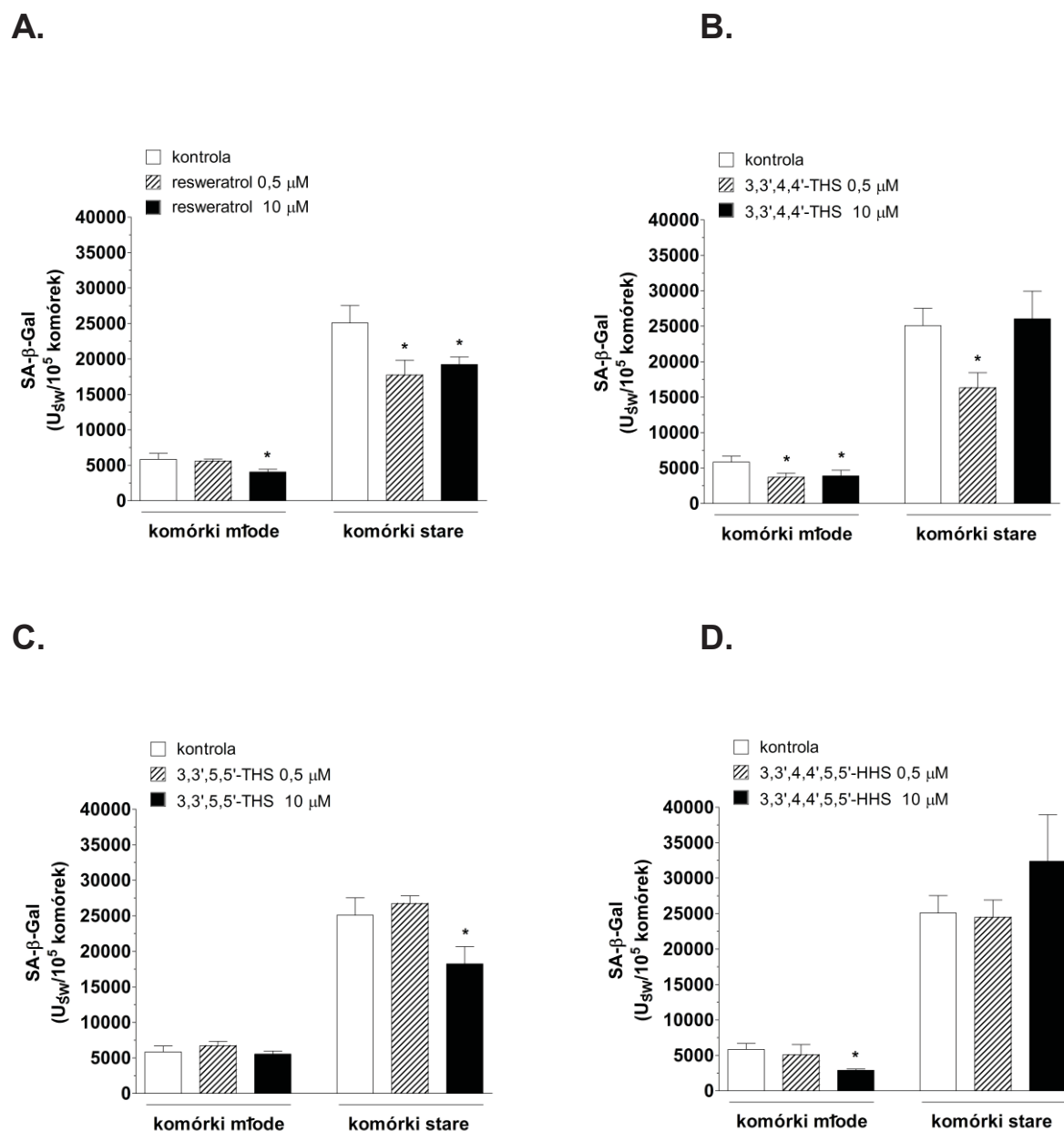
## **2.6. Wpływ stilbenów na aktywność SA-β-Gal w młodych i starych KM**

Analiza ilościowa aktywności SA-β-Gal z użyciem metody fluorescencyjnej wykazała, że ekspozycja komórek młodych na resweratrol w stężeniu 0,5 μM nie wpłynęła na obniżenie aktywności enzymu, natomiast w stężeniu 10 μM spowodowała obniżenie aktywności SA-β-Gal o  $23 \pm 8\%$  ( $P < 0,05$ ). Z kolei w komórkach starych, resweratrol spowodował znaczące obniżenie aktywności SA-β-Gal zarówno przy zastosowaniu stężenia 0,5 μM (o  $26 \pm 10\%$ ,  $P < 0,05$ ), jak i 10 μM (o  $13 \pm 17\%$ ,  $P < 0,05$ ) (**Ryc. 19-A**).

Badanie przeprowadzone na komórkach młodych poddanych działaniu 3,3',4,4'-THS pokazały, że związek ten obniża aktywność SA-β-Gal w obu użytych stężeniach, odpowiednio o  $36 \pm 13\%$  ( $P < 0,05$ ) w przypadku stężenia 0,5 μM oraz o  $35 \pm 7\%$  ( $P < 0,05$ ) w przypadku stężenia 10 μM. Z kolei w komórkach starych, efektywne okazało się tylko stężenie 0,5 μM, które spowodowało obniżenie aktywności enzymu o  $34 \pm 8\%$  ( $P < 0,05$ ) (**Ryc. 19-B**).

3,3',5,5'-THS użyty w stężeniu 0,5 oraz 10 μM nie wpłynął na obniżenie aktywności SA-β-Gal w komórkach młodych. W komórkach starych, natomiast, stężenie 0,5 μM nie wywarło żadnego efektu w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast stężenie 10 μM spowodowało obniżenie aktywności enzymu o  $23 \pm 11\%$  ( $P < 0,05$ ) (**Ryc. 19-C**).

Na podstawie oceny preparatów uzyskanych z komórek młodych ekspozowanych na 3,3',4,4',5,5'-HHS stwierdzono istotne statystycznie obniżenie aktywności SA-β-Gal wskutek zastosowania stężenia 10 μM (o  $25 \pm 14\%$ ,  $P < 0,01$ ). Z kolei w komórkach starych, stilben ten nie wpłynął na istotną zmianę aktywności enzymu w stosunku do grupy kontrolnej. Na uwagę zasługuje natomiast trend rosnący, dający się zauważyć w przypadku starych komórek poddanych działaniu 3,3',4,4',5,5'-HHS w stężeniu 10 μM (**Ryc. 19-D**).

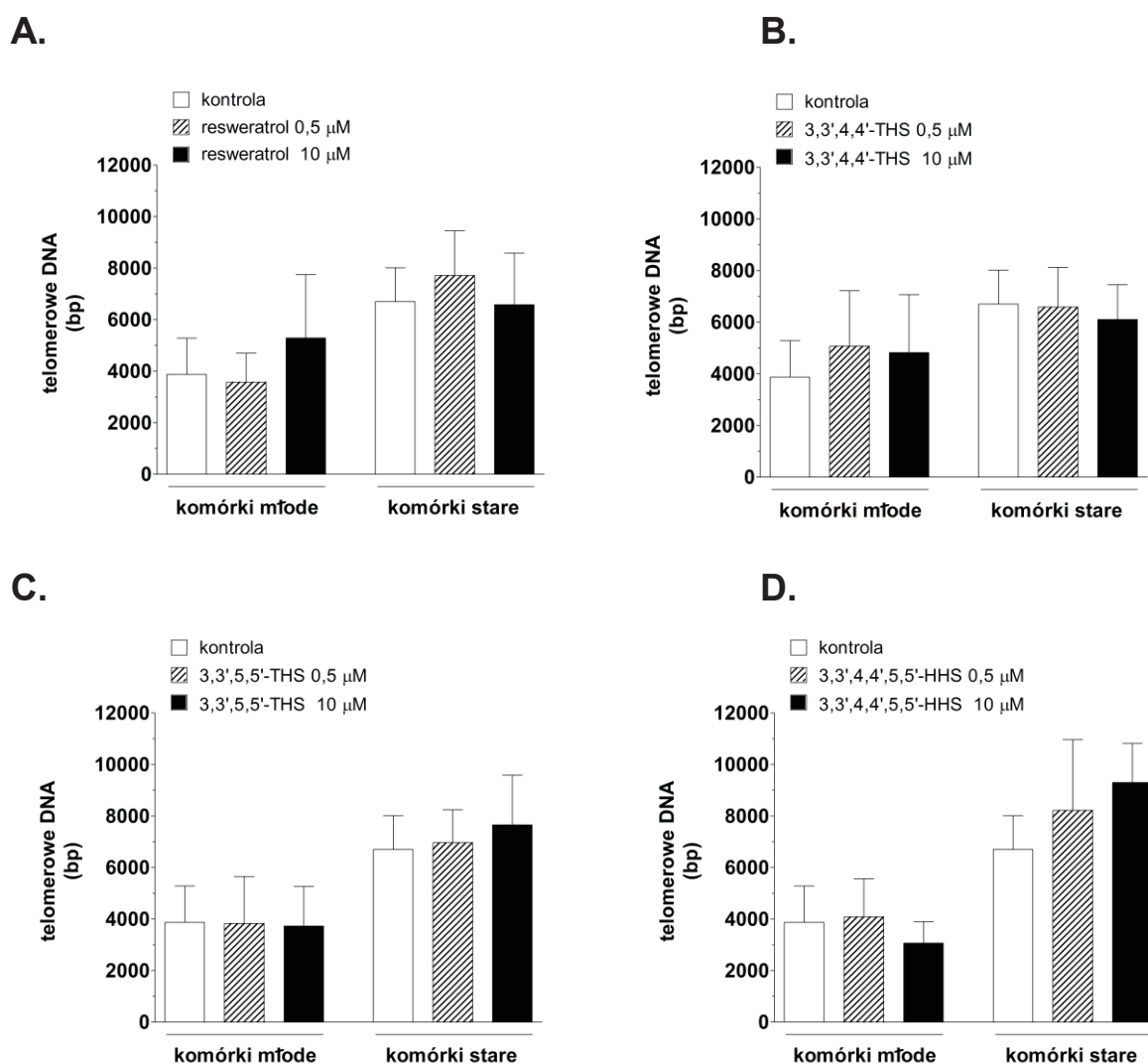


**Rycina 19. Wpływ stilbenów: resweratrolu (A), 3,3',4,4'-THS (B), 3,3',5,5'-THS (C) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (D) na aktywność SA-β-Gal w młodych i starych KM.** Badania przeprowadzono na ekstraktach komórkowych w buforze o pH 6,0, za pomocą metody fluorescencyjnej. Gwiazdkami oznaczono istotne statystycznie różnice w porównaniu z grupą kontrolną. U<sub>św</sub> - jednostki świetlne. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach na komórkach od 6 różnych dawców.



## 2.7. Wpływ stilbenów na długość telomerów w młodych i starych KM

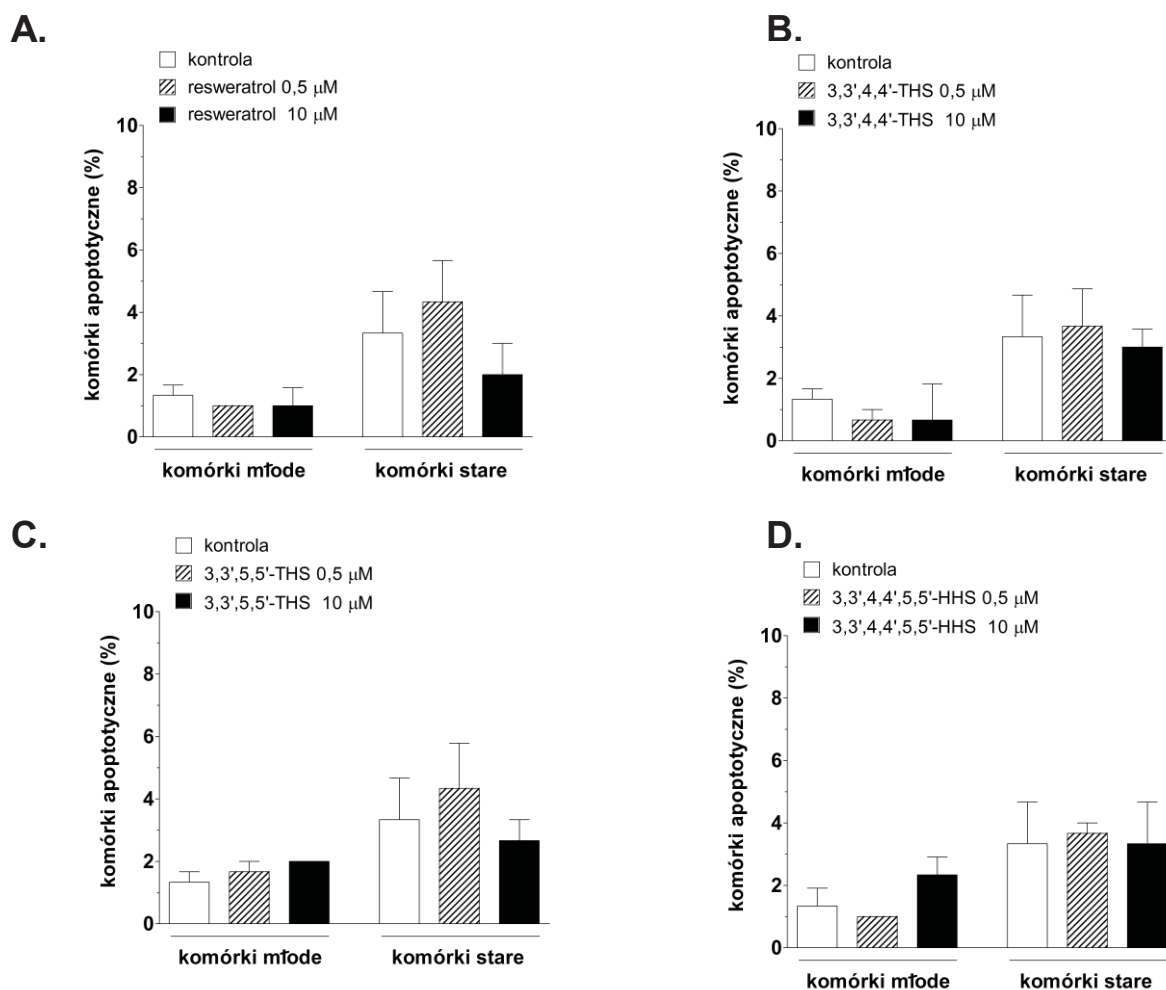
Badania mające na celu określenie zmian długości telomerów w młodych i starych KM eksponowanych na stilbeny przeprowadzono metodą ilościowego PCR. Analiza długości powtórzeń telomerowego DNA wykazała, że żaden z badanych stilbenów, zarówno zastosowany w stężeniu 0,5, jak i 10  $\mu\text{M}$ , nie wpływa w znaczący sposób na zmianę długości telomerów, zarówno w młodych, jak i starych KM (Ryc. 20 A-D).



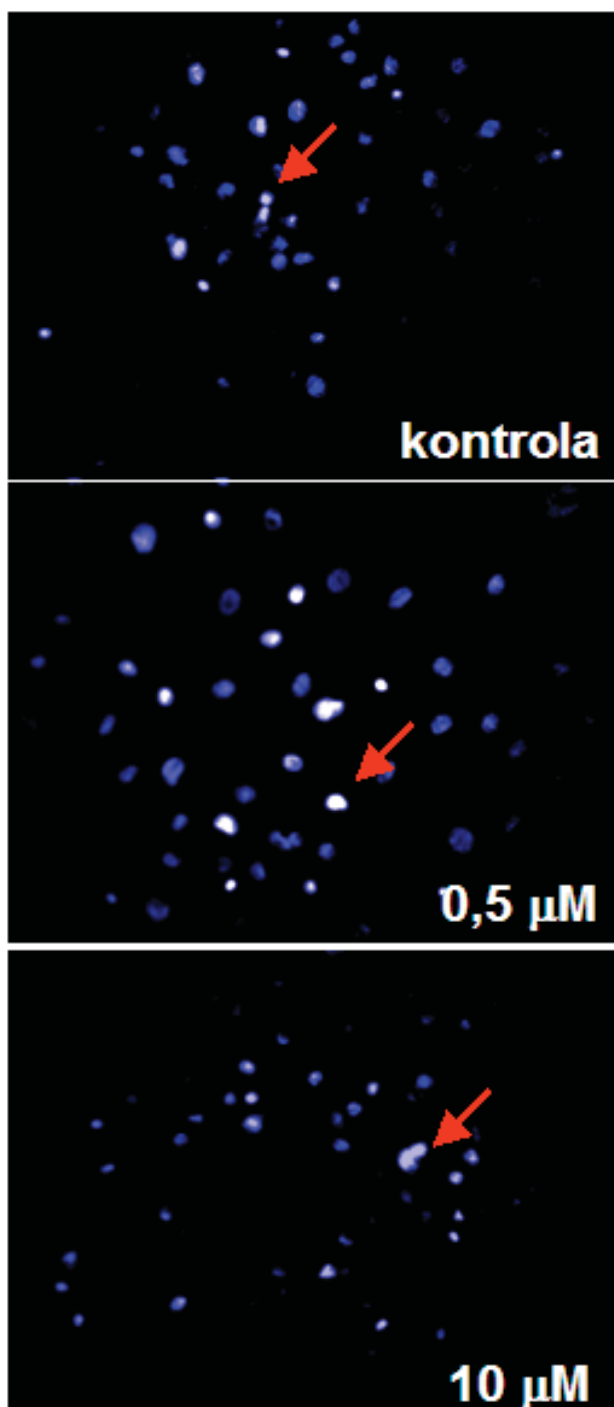
Rycina 20. Wpływ stilbenów: resweratrolu (A), 3,3',4,4'-THS (B), 3,3',5,5'-THS (C) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (D) na długość telomerów w młodych i starych KM. Badania przeprowadzono metodą ilościowego PCR. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w kwadruplikatach na komórkach od 4 różnych dawców.

## 2.8. Wpływ stilbenów na kondensację chromatyny jądrowej w młodych i starych KM

Ocena częstości występowania apoptozy, na podstawie zmian kondensacji chromatyny jądrowej, z użyciem barwnika fluorescencyjnego Hoechst 33258 wykazała, że żaden ze stilbenów zastosowanych w stężeniach 0,5 i 10  $\mu\text{M}$  nie wpływa na istotną statystycznie zmianę odsetka komórek apoptotycznych, zarówno w hodowli młodych, jak i starych KM (Ryc. 21 A-D). Reprezentatywne zdjęcia starych KM eksponowanych na resweratrol i wybarwionych znacznikiem Hoechst 33258 przedstawiono na rycinie 22.



Rycina 21. Wpływ stilbenów: resweratrolu (A), 3,3',4,4'-THS (B), 3,3',5,5'-THS (C) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (D) na kondensację chromatyny jądrowej w młodych i starych KM. Badania przeprowadzono na komórkach w stadium 50-70% zlewności wyznakowanych barwnikiem fluorescencyjnym Hoechst 33258. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach, na komórkach pochodzących od 4 różnych dawców.



**Rycina 22.** Przykładowe zdjęcia ilustrujące wynik barwienia starych KM eksponowanych na resweratrol odczynnikiem Hoechst 33258. Strzałkami zaznaczono skondensowaną, silnie fluoryzującą chromatynę jądrową komórek apoptotycznych.

## 2.9. Wpływ stilbenów na obecność drobnocząsteczkowego DNA w młodych i starych KM

Ocenę apoptozy na podstawie zawartości drobnocząsteczkowego DNA w komórkach (tzw. frakcji subG<sub>1</sub>) przeprowadzono metodą cytometrii przepływowej, z wykorzystaniem komórek znakowanych jodkiem propidyny. Badania wykazały, iż zarówno w młodych, jak i starych KM resweratrol nie wpływa na zmianę odsetka komórek frakcji subG<sub>1</sub>, niezależnie od użytego stężenia (**Ryc. 23-A**).

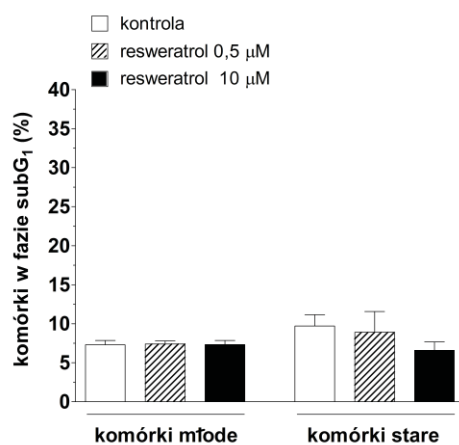
3,3',4,4'-THS w stężeniu 0,5 i 10 μM nie wpływał na odsetek komórek frakcji subG<sub>1</sub> w komórkach młodych, natomiast w komórkach starych, wyższe z zastosowanych stężeń spowodowało wzrost odsetka komórek apoptotycznych o 132 ± 23% (P<0,05) (**Ryc. 23-B**).

W przypadku badań przeprowadzonych z użyciem 3,3',5,5'-THS, związek ten, podobnie jak resweratrol, nie wpływał na zmianę wielkości frakcji komórek posiadających pofragmentowane DNA w hodowlach komórek młodych i starych, bez względu na zastosowane stężenie (**Ryc. 23-C**).

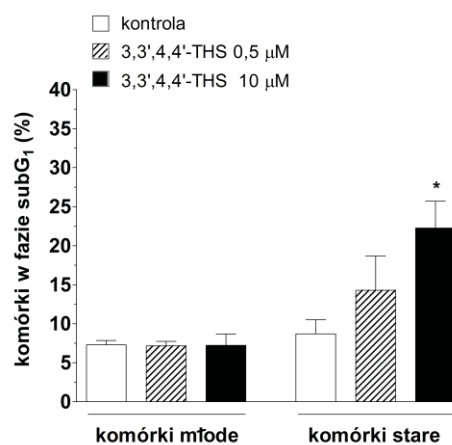
Z kolei badania na komórkach rosnących w obecności 3,3',4,4',5,5'-HHS wykazały, że żadne z zastosowanych stężeń nie wpływa na zmianę odsetka komórek apoptotycznych w hodowlach komórek młodych. W komórkach starych, stilben ten nie wpłynął na zmianę odsetka komórek w fazie subG<sub>1</sub> przy zastosowanym stężeniu 0,5 μM, natomiast przy stężeniu 10 μM zaobserwowano wzrost odsetka komórek apoptotycznych o 219 ± 13% (P<0,05) (**Ryc. 23-D**).

Reprezentatywne histogramy ilustrujące wpływ 3,3',4,4'-THS w obu stężeniach na wielkość frakcji subG<sub>1</sub> w komórkach starych przedstawiono **na rycinie 24**.

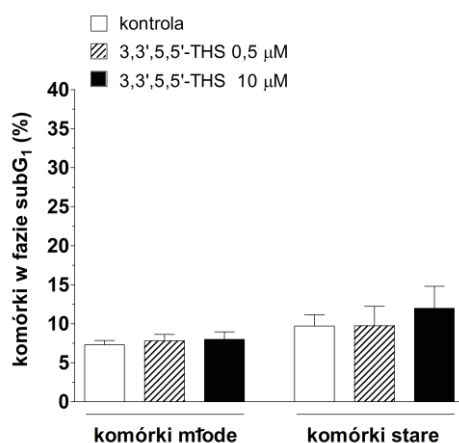
A.



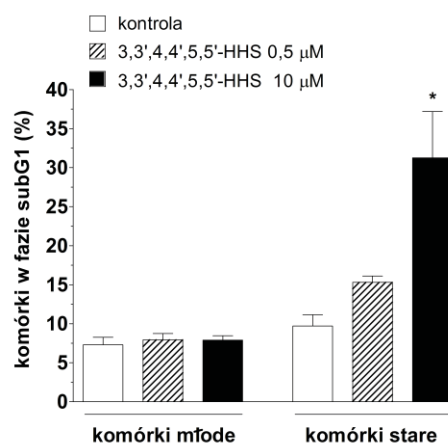
B.



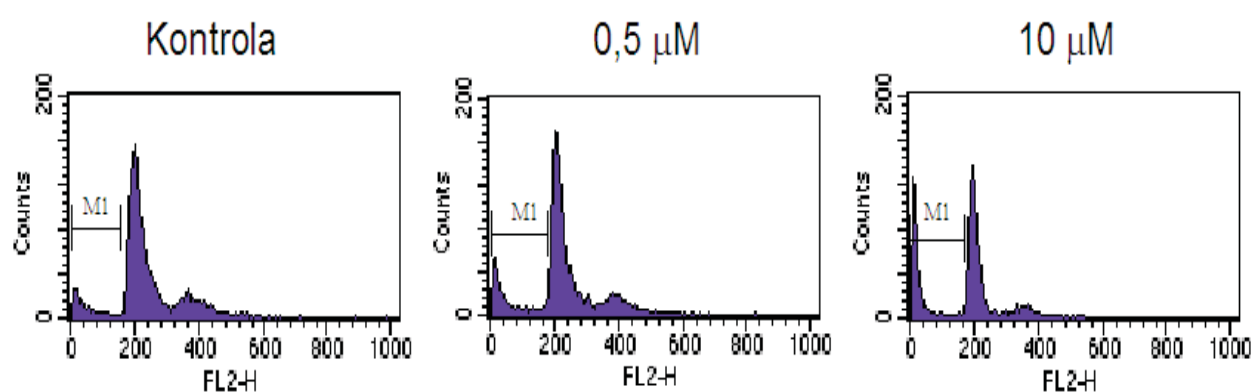
C.



D.



Rycina 23. Wpływ stilbenów: resweratrolu (A), 3,3',4,4'-THS (B), 3,3',5,5'-THS (C) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (D) na odsetek komórek zawierających drobnocząsteczkowe DNA (frakcja subG1). Badania przeprowadzono na komórkach utrwalonych w etanolu i wybarwionych PI, metodą cytometrii przepływowej. Gwiazdkami oznaczono istotne statystycznie różnice w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach na komórkach od 3 różnych dawców.



**Rycina 24. Przykładowe histogramy ilustrujące wpływ stilbenu 3,3',4,4'-THS na odsetek komórek zawierających drobnocząsteczkowe DNA (frakcja subG1) w hodowlach starych KM. Frakcję subG1 na histogramie odzwierciedlają komórki bramkowane symbolem M1.**

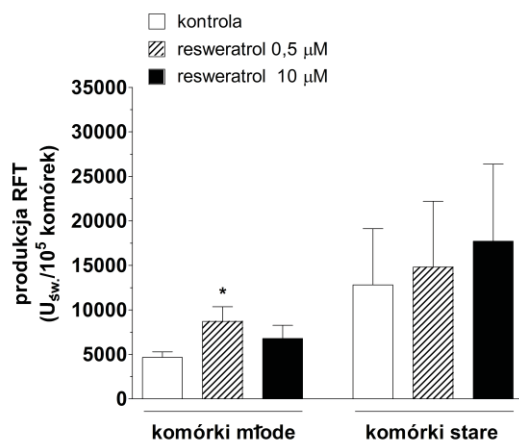
## **2.10. Wpływ stilbenów na produkcję reaktywnych form tlenu w młodych i starych KM**

Podstawową produkcję reaktywnych form tlenu (RFT) przez KM poddawane działaniu stilbenów oceniono na podstawie pomiaru fluorescencji emitowanej przez komórki wyznakowane dwuocianem 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (H<sub>2</sub>DCFDA). Stwierdzono, że resweratrol w stężeniu 0,5 μM w sposób istotny zwiększa produkcję RFT przez komórki młode (o 101 ± 42%, P<0,04) w porównaniu do grupy kontrolnej. Nie odnotowano natomiast wpływu resweratrolu w stężeniu 10 μM na produkcję RFT przez młode KM, jak również istotnego statystycznie wpływu tego związku na produkcję RFT przez komórki stare, przy obu zastosowanych stężeniach (**Ryc. 25-A**).

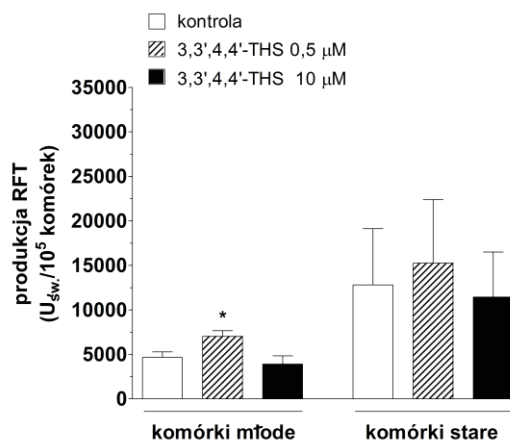
3,3',4,4'-THS zastosowany w stężeniu 0,5 μM zwiększył produkcję RFT przez młode KM o 65 ± 23% (P<0,04). W komórkach rosnących w obecności tego związku w stężeniu 10 μM, nie odnotowano zmiany produkcji RFT w porównaniu z grupą kontrolną. Poddając analizie komórki stare nie stwierdzono zmian produkcji RFT eksponowanych na 3,3',4,4'-THS w obu użytych stężeniach (**Ryc. 25-B**).

W przypadku 3,3',5,5'-THS (**Ryc. 25-C**) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (**Ryc. 25-D**) nie stwierdzono wpływu tych związków na produkcję RFT, zarówno przez komórki młode, jak i stare, przy obu zastosowanych stężeniach.

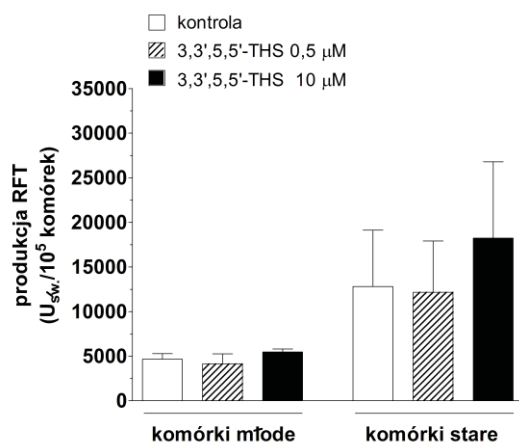
A.



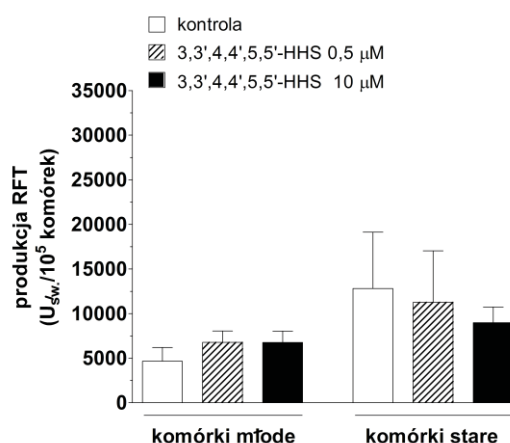
B.



C.



D.



Rycina 25. Wpływ stilbenów: resweratrolu (A), 3,3',4,4'-THS (B), 3,3',5,5'-THS (C) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (D) na produkcję reaktywnych form tlenu (RFT) przez młode i stare KM. Badania przeprowadzono na lizatach komórkowych, po uprzednim wyznaczeniu komórek roztworem  $H_2DCFDA$ . Gwiazdkami oznaczono istotne statystycznie różnice w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki wyrażono w jednostkach świetlnych ( $U_{sw.}$ ) przeliczonych na  $10^5$  komórek. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach na komórkach od 5 różnych dawców.



### **2.11. Wpływ stilbenów na zmiany produkcji RFT w czasie**

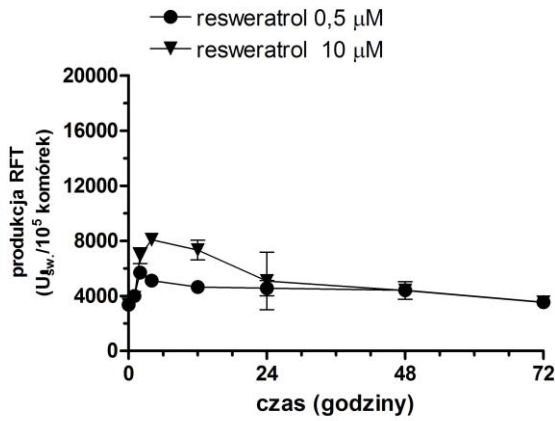
Oceny produkcji RFT przez młode KM dokonano także w doświadczeniu ostrym, w którym komórki poddawane działaniu stilbenów zbierano i oceniano pod kątem podstawowej produkcji RFT w następujących punktach czasowych: czas 0, 1 godzina, 2 godziny, 4 godziny, 12 godzin, 24 godziny, 48 godzin i 72 godziny. Punkty czasowe zostały dobrane w ten sposób, aby odzwierciedlić zmiany produkcji RFT w czasie korespondującym z wykonanymi pomiarami stabilności chemicznej związków badanych.

Badania wykazały, że resweratrol pobudza produkcję RFT przez KM w sposób zależny od czasu ekspozycji. Przy zastosowaniu stężenia 0,5  $\mu\text{M}$ , szczyt produkcji RFT odnotowano po 2 godzinach ekspozycji, a następnie produkcja RFT malała, osiągając po 72 godzinach wartość wyjściową (z punktu  $t_0$ ). Z kolei w przypadku stężenia 10  $\mu\text{M}$ , szczyt produkcji RFT przypadł na 4 godzinę ekspozycji, po czym generowanie RFT ulegało obniżeniu, w 24 godzinie zrównując się z wartościami uzyskiwanymi dla stężenia 0,5  $\mu\text{M}$ , a w 72 godzinie wracając do wartości początkowych (**Ryc. 26-A**).

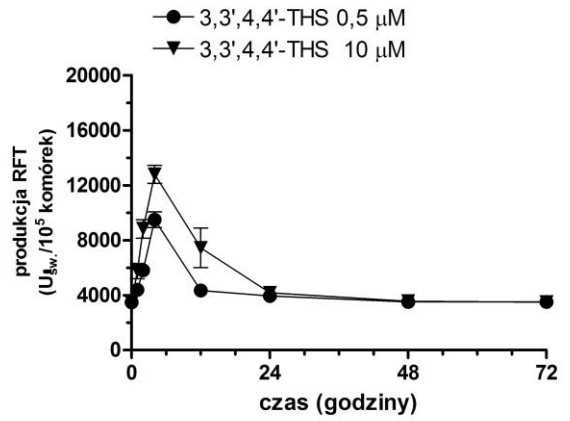
W badaniach z wykorzystaniem 3,3',4,4'-THS, 3,3',5,5'-THS oraz 3,3',4,4',5,5'-HHS stwierdzono, iż niezależnie od użytego stężenia któregośkolwiek ze związków, szczytowa produkcja RFT następuje po 4 godzinach ekspozycji, a następnie stopniowo zmniejsza się osiągając wartość wyjściową w 48 godzinie eksperymentu (**Ryc. 26-B-D**).

Z przeprowadzonych doświadczeń wynikają także pewne różnice w skali szczytowej produkcji RFT. Najsilniejsze pobudzenie wydzielania RFT stwierdzono w przypadku 3,3',4,4',5,5'-HHS, kiedy to produkcja RFT pod wpływem stężenia 0,5  $\mu\text{M}$  była 2,4-razy wyższa, natomiast pod wpływem stężenia 10  $\mu\text{M}$  — 4,7-razy wyższa w porównaniu z punktem  $t_0$ . W przypadku 3,3',4,4'-THS stwierdzono, że produkcja RFT pod wpływem 0,5  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$  związku była, odpowiednio, 2,8-razy i 3,7-razy wyższa w porównaniu z wartościami uzyskanymi dla czasu  $t_0$ . Resweratrol oraz 3,3',5,5'-THS wpływały na pobudzenie produkcji RFT w sposób zbliżony. Pierwszy ze stilbenów nasilał produkcję RFT 1,5- i 2,3-krotnie (odpowiednio dla stężeń 0,5  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$ ), natomiast drugi ze związków, 1,5- i 1,9-krotnie (odpowiednio dla stężeń 0,5  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$ ) (**Ryc. 26-A-D**).

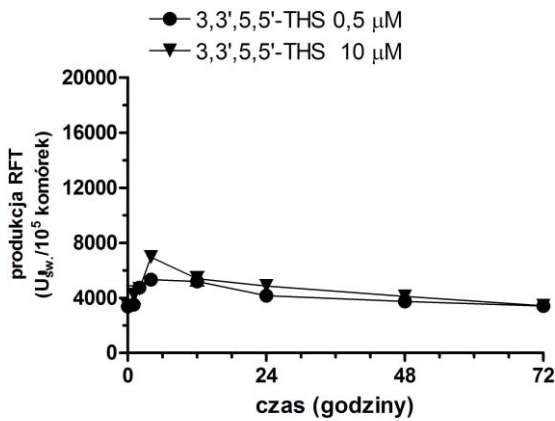
A.



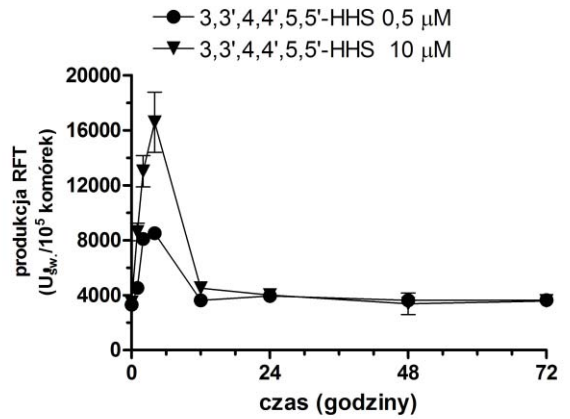
B.



C.



D.



Rycina 26. Wpływ stilbenów: resweratrolu (A), 3,3',4,4'-THS (B), 3,3',5,5'-THS (C) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (D) na zmiany produkcji reaktywnych form tlenu (RFT) przez młode KM w czasie. Badania przeprowadzono na lizatach komórkowych, po uprzednim wyznaczeniu komórek roztworem  $\text{H}_2\text{DCFDA}$ . Wyniki wyrażono w jednostkach świetlnych ( $U_{\text{św.}}$ ) przeliczonych na  $10^5$  komórek. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w tryplikatach na komórkach od 3 różnych dawców.

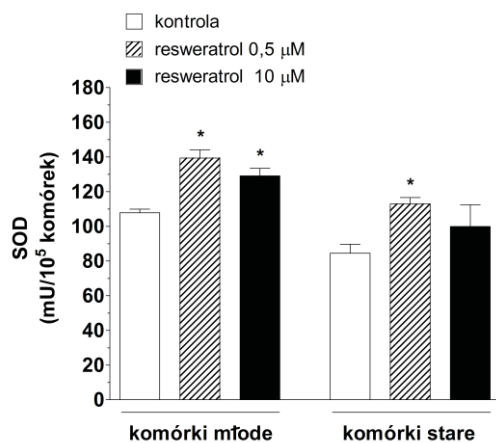
## **2.12. Wpływ stilbenów na aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w młodych i starych KM**

Badania aktywności całkowitej dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) wykazały, że młode KM poddane działaniu resweratrolu w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  charakteryzują się podwyższoną aktywnością tego enzymu w porównaniu z grupą kontrolną (wzrost o  $32 \pm 5\%$ ,  $P < 0,001$ ). Także w przypadku komórek eksponowanych na resweratrol w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  odnotowano podwyższoną aktywność SOD w komórkach młodych (wzrost o  $20 \pm 6\%$ ,  $P < 0,001$ ). Z kolei w starych KM stwierdzono, iż resweratrol w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  wpływa na wzrost aktywności SOD o  $34 \pm 10\%$  ( $P < 0,001$ ) w porównaniu z grupą kontrolną. Nie stwierdzono natomiast zmian aktywności SOD w komórkach starych po ich ekspozycji na resweratrol w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  (**Ryc. 27-A**).

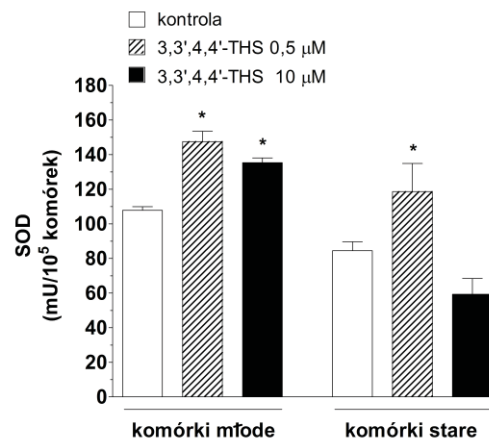
Badania przeprowadzone z użyciem 3,3',4,4'-THS dostarczyły analogicznych wyników. Mianowicie, w przypadku ekspozycji komórek młodych na związek w stężeniach 0,5 i 10  $\mu\text{M}$  zaobserwowano podwyższenie aktywności SOD o, odpowiednio,  $40 \pm 6\%$  ( $P < 0,001$ ) i  $26 \pm 3\%$  ( $P < 0,001$ ). Z kolei w komórkach starych, aktywność SOD po ekspozycji na 3,3',4,4'-THS w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  była o  $37 \pm 18\%$  ( $P < 0,05$ ) wyższa w porównaniu do grupy kontrolnej. Nie stwierdzono natomiast wpływu tego związku w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  na aktywność SOD w komórkach starych (**Ryc. 27-B**).

W przypadku komórek poddawanych działaniu 3,3',5,5'-THS (**Ryc. 27-C**) oraz 3,3',4,4',5,5'-HHS (**Ryc. 27-D**) badania nie wykazały istotnych statystycznie zmian aktywności SOD zarówno w komórkach młodych, jak i starych, niezależnie od zastosowanego stężenia związku.

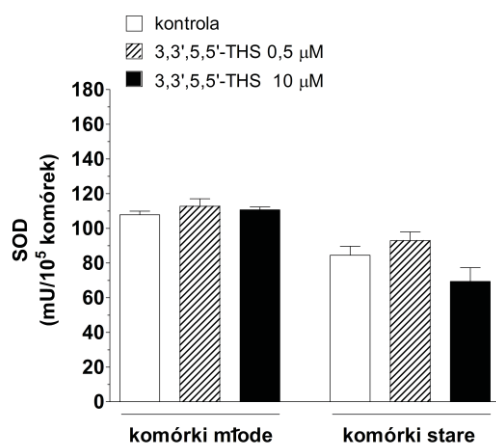
**A.**



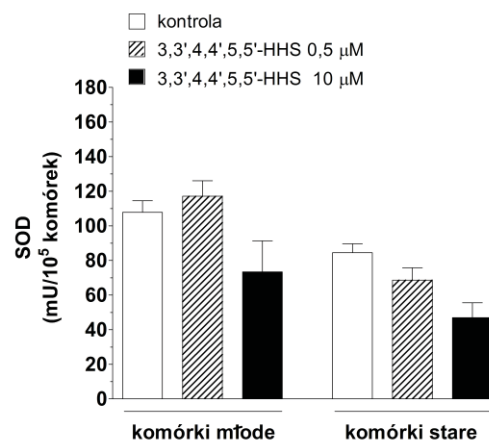
**B.**



**C.**



**D.**



Rycina 27. Wpływ stilbenów: resweratrolu (A), 3,3',4,4'-THS (B), 3,3',5,5'-THS (C) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (D) na aktywność całkowitą dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w młodych i starych KM. Gwiazdkami oznaczono istotne statystycznie różnice w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach na komórkach od 6 różnych dawców.

### **2.13. Wpływ stilbenów na aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w czasie**

Oceny aktywności całkowitej SOD w młodych KM dokonano także w doświadczeniu ostrym, w którym komórki poddawano działaniu stilbenów, podobnie jak w przypadku oceny produkcji RFT, w następujących punktach czasowych: czas 0, 1 godzina, 2 godziny, 4 godziny, 12 godzin, 24 godziny, 48 godzin i 72 godziny.

Badania wykazały, że ekspozycja komórek na resweratrol w stężeniu 0,5 i 10  $\mu\text{M}$  jest związana z pobudzeniem aktywności SOD w sposób zależny od czasu. W przypadku niższego z zastosowanych stężeń, w pierwszych dwóch godzinach eksperymentu, aktywność enzymu była zbliżona do wartości wyjściowej (punkt 0), jednak po 4 godzinach odnotowano jej znaczący wzrost, który ostatecznie osiągnął wartość szczytową po 12 godzinach. Po tym czasie, w kolejnych punktach czasowych dało się zauważyć stopniowe obniżanie aktywności SOD, która jednak nawet w 72 godzinie eksperymentu była znacząco wyższa od wartości początkowej ( $P < 0,05$ ). W przypadku stężenia 10  $\mu\text{M}$  przebieg krzywej był niemal identyczny, natomiast otrzymane wartości aktywności SOD były nieco niższe w porównaniu ze stężeniem 0,5  $\mu\text{M}$  (**Ryc. 28-A**).

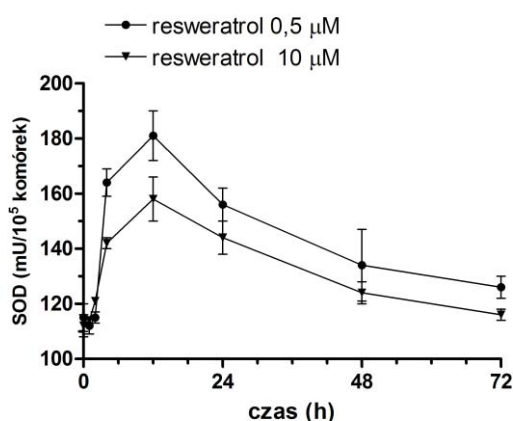
Doświadczenia wykonane na komórkach poddawanych działaniu 3,3',4,4'-THS wykazały, iż także w przypadku tego związku następuje zależne od czasu pobudzenie aktywności całkowitej SOD. W przypadku obu zastosowanych stężeń, po początkowym, trwającym do 2 godzin obniżeniu aktywności SOD, odnotowano znaczący wzrost aktywności enzymu, która dla obu użytych stężeń swój szczyt osiągnęła w 12 godzinie eksperymentu. Następnie, podobnie jak w przypadku resweratrolu, nastąpiło stopniowe obniżanie się aktywności SOD, które w 72 godzinie eksperymentu było jednak nadal wyższe w porównaniu z punktem  $t=0$  ( $P < 0,05$ ) (**Ryc. 28-B**).

Badania z wykorzystaniem 3,3',5,5'-THS wykazały, iż w tym przypadku następuje jedynie krótkotrwałe pobudzenie aktywności SOD w komórkach, utrzymujące się jedynie przez 2 godziny eksperymentu. Po tym czasie, aktywność enzymu w komórkach eksponowanych na 3,3',5,5'-THS w stężeniach 0,5 i 10  $\mu\text{M}$  wróciła do wartości początkowych i pozostawała porównywalna z nimi aż do 72 godziny eksperymentu (**Ryc. 28-C**).

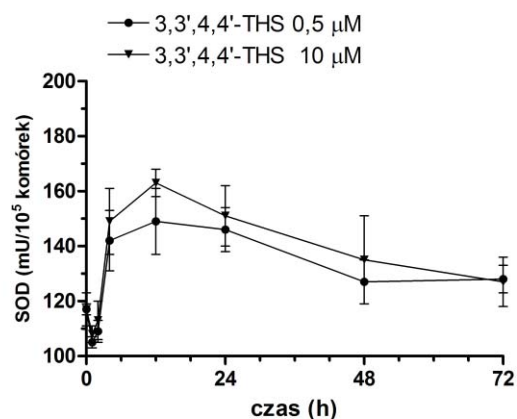
W przypadku komórek eksponowanych na 3,3',4,4',5,5'-HHS zaobserwowano wyraźne różnice w zmianach aktywności SOD pod wpływem związku w stężeniu 0,5 i 10  $\mu\text{M}$ . Analizując niższe z zastosowanych stężeń stwierdzono, że w komórkach następuje wzrost aktywności enzymu, który utrzymuje się przez 12 godzin eksperymentu (szczyt przypada na

12 godzinę), po czym aktywność SOD zaczyna się obniżać i oscylować wokół wartości początkowych. Z kolei w komórkach poddawanych działaniu stilbenu w stężeniu 10  $\mu\text{M}$ , po niewielkim i krótkotrwałym wzroście aktywności SOD (szczyt po 2 godzinach), obserwuje się stopniowe obniżanie aktywności enzymu, która to wartość już od 12 godziny eksperymentu jest niższa od wartości dla punktu początkowego ( $P < 0,05$ ) (Ryc. 28-D).

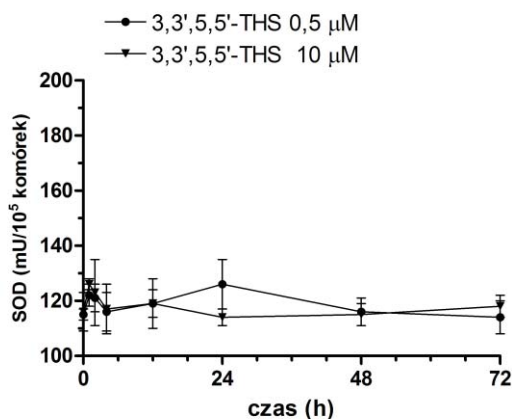
A.



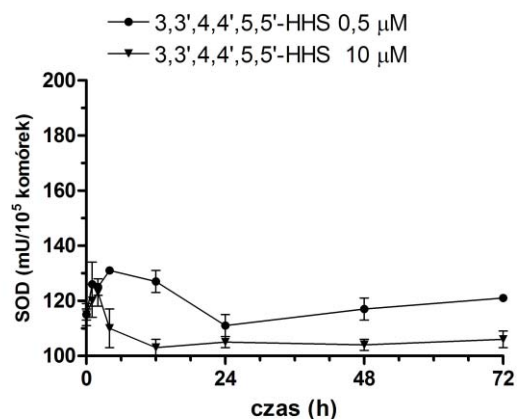
B.



C.



D.



Rycina 28. Wpływ stilbenów: resweratrolu (A), 3,3',4,4'-THS (B), 3,3',5,5'-THS (C) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (D) na zmiany aktywności całkowitej SOD w młodych KM w czasie. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w tryplikatach na komórkach od 3 różnych dawców.

#### **2.14. Wpływ stilbenów na stężenie 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyny w młodych i starych KM**

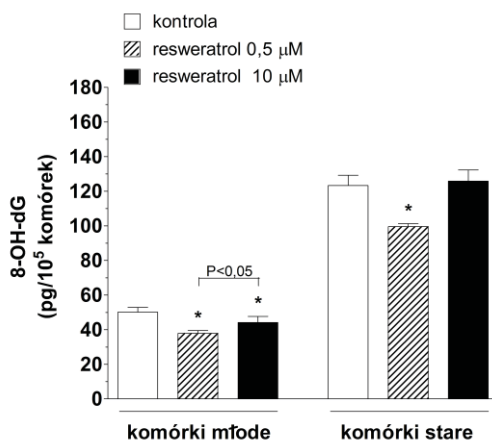
Badania wykazały, że w komórkach młodych resweratrol obniża stężenie 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyny (8-OH-dG) w sposób zależny od dawki. Przy zastosowaniu stężenia 0,5  $\mu\text{M}$  stężenie 8-OH-dG było niższe w porównaniu do grupy kontrolnej o  $24 \pm 3\%$  ( $P < 0,001$ ), natomiast przy zastosowaniu stężenia 10  $\mu\text{M}$ , o  $12 \pm 4\%$  ( $P < 0,05$ ). W przypadku komórek starych, istotne statystycznie obniżenie stężenia 8-OH-dG odnotowano tylko w komórkach eksponowanych na resweratrol w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  (o  $19 \pm 3\%$ ,  $P < 0,01$ ) **(Ryc. 29-A)**.

Ocena stężenia 8-OH-dG w komórkach młodych poddanych działaniu 3,3',4,4'-THS wykazała, że związek ten zastosowany w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  obniża zawartość oksydacyjnej modyfikacji DNA o  $12 \pm 2\%$  ( $P < 0,01$ ). Nie zaobserwowano natomiast wpływu tego związku na zmianę stężenia 8-OH-dG w przypadku zastosowania stężenia 10  $\mu\text{M}$ . Z kolei badając komórki stare wykazano, że 3,3',4,4'-THS w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  obniża stężenie 8-OH-dG o  $15 \pm 5\%$  ( $P < 0,05$ ), natomiast w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  w znaczący sposób podwyższa stężenie tej modyfikacji (o  $16 \pm 6\%$ ,  $P < 0,05$ ) **(Ryc. 29-B)**.

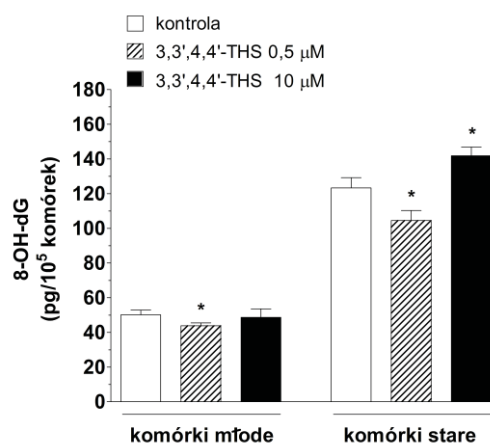
Badania przeprowadzone z użyciem 3,3',5,5'-THS wykazały, że w przypadku młodych KM, związek ten nie wpływa na istotną statystycznie zmianę stężenia 8-OH-dG ani w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$ , ani 10  $\mu\text{M}$ . Natomiast w komórkach starych, stilben ten powoduje wzrost stężenia 8-OH-dG (o  $19 \pm 4\%$ ,  $P < 0,05$ ) przy zastosowaniu stężenia 10  $\mu\text{M}$ . Gdy zastosowano stężenie 0,5  $\mu\text{M}$ , nie odnotowano wpływu 3,3',5,5'-THS na stężenie 8-OH-dG w starych KM **(Ryc. 29-C)**.

Analogiczne wyniki uzyskano analizując zmiany stężenia 8-OH-dG w komórkach poddawanych działaniu 3,3',4,4',5,5'-HHS. I w tym przypadku, jedyną istotną statystycznie zmianą stężenia 8-OH-dG był jego wzrost (o  $26 \pm 3\%$ ,  $P < 0,01$ ) w komórkach starych eksponowanych na związek w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  **(Ryc. 29-D)**.

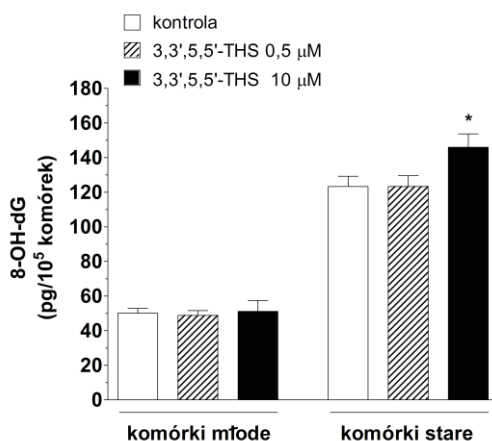
A.



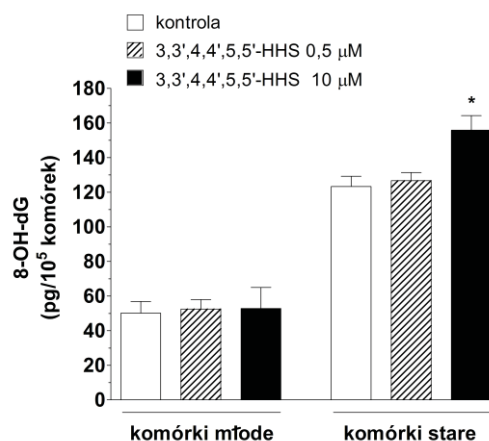
B.



C.



D.



Rycina 29. Wpływ stilbenów: resweratrolu (A), 3,3',4,4'-THS (B), 3,3',5,5'-THS (C) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (D) na stężenie 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyny (8-OH-dG) w młodych i starych KM. Badania przeprowadzono na DNA wyekstrahowanym z komórek za pomocą kompetycyjnego testu ELISA. Gwiazdkami oznaczono istotne statystycznie różnice w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach na komórkach od 6 różnych dawców.



### **2.15. Wpływ stilbenów na masę mitochondriów w młodych i starych KM**

Badania mające na celu określenie wpływu stilbenów na masę (biogenezę) mitochondriów zostały wykonane na komórkach wyznakowanych *N*-nonyl oranżem akrydyny (NAO). Badania te wykazały, że w komórkach młodych resweratrol w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  powoduje wzrost masy mitochondriów o  $68 \pm 27\%$  ( $P < 0,05$ ) w porównaniu z grupą kontrolną, a w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  o  $49 \pm 27\%$  ( $P < 0,05$ ). Z kolei w komórkach starych nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic między grupą kontrolną a komórkami ekspozycjami na oba stężenia resweratrolu (**Ryc. 30-A**).

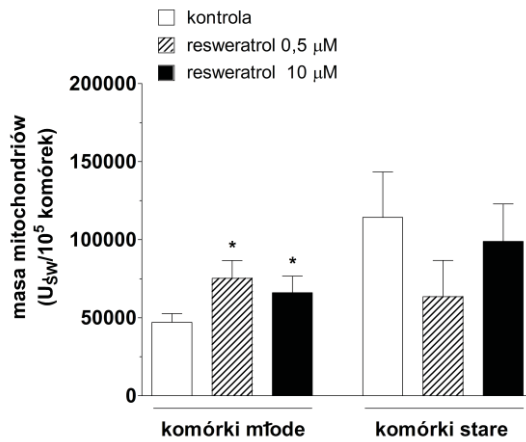
Ocena tego parametru w komórkach młodych poddanych działaniu 3,3',4,4'-THS wykazała, że związek ten użyty w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  podwyższa masę mitochondriów o  $49 \pm 18\%$  ( $P < 0,05$ ). Nie zaobserwowano jednocześnie wpływu tego związku na zmianę masy mitochondriów przy zastosowaniu 10  $\mu\text{M}$ . Z kolei badając komórki stare wykazano, że w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  3,3',4,4'-THS nie wpływa na masę mitochondriów, natomiast w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  obniża ją porównaniu do grupy kontrolnej o  $47 \pm 12\%$  ( $P < 0,05$ ) (**Ryc. 30-B**).

Badania przeprowadzone z użyciem 3,3',5,5'-THS wykazały, że w przypadku młodych KM, związek ten zastosowany w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  podwyższa masę mitochondriów o  $28 \pm 11\%$  ( $P < 0,05$ ), natomiast w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  nie powoduje istotnej statystycznie zmiany wielkości tego parametru w stosunku do grupy kontrolnej. Z kolei w komórkach starych, stilben ten, w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$ , powoduje obniżenie masy mitochondriów o  $37 \pm 6\%$  ( $P < 0,01$ ), a przy zastosowaniu stężenia 10  $\mu\text{M}$  o  $26 \pm 6\%$  ( $P < 0,01$ ) (**Ryc. 30-C**).

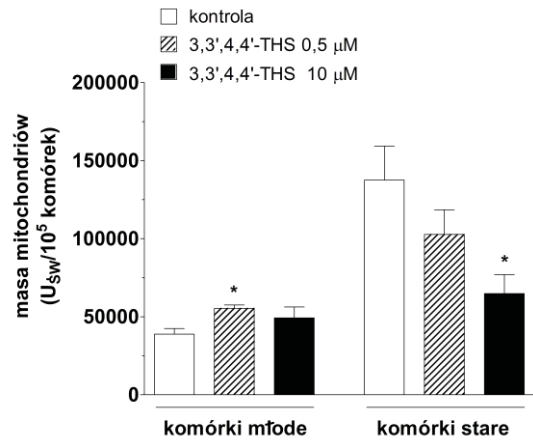
Analizując wpływ 3,3',4,4',5,5'-HHS stwierdzono, że zarówno w komórkach młodych, jak i starych związek ten nie wpływa w istotny statystycznie sposób na masę mitochondriów w porównaniu z grupą kontrolną, niezależnie od zastosowanego stężenia (**Ryc. 30-D**).

Aby zweryfikować możliwość, iż wzrost produkcji RFT przez komórki ekspozycjami na resweratrol i 3,3',4,4'-THS jest pochodną wzrostu masy mitochondriów, dokonano przeliczenia uzyskanych wartości RFT dla młodych KM na masę mitochondriów. Wyliczenia te pokazały, iż w przypadku obu badanych związków, stosunek produkcji RFT do masy mitochondriów w komórkach był porównywalny z grupą kontrolną (danych nie zilustrowano).

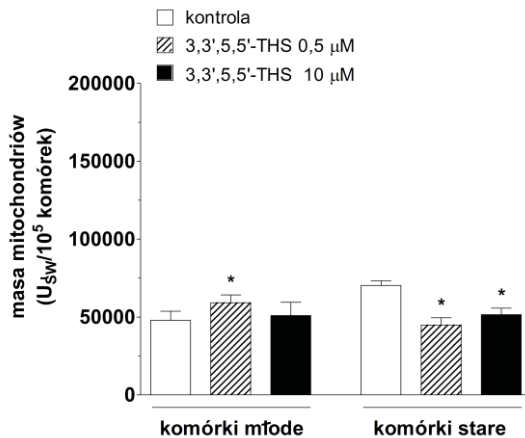
**A.**



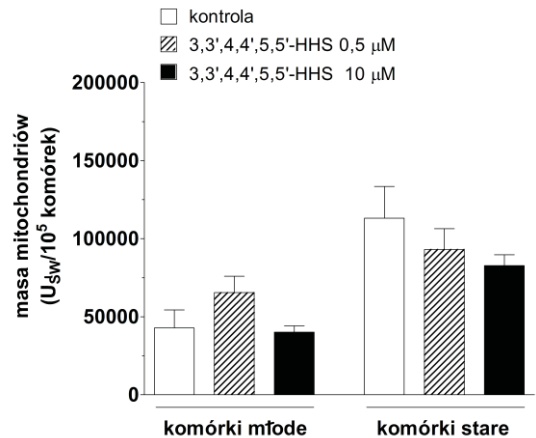
**B.**



**C.**



**D.**



**Rycina 30. Wpływ stilbenów: resweratrolu (A), 3,3',4,4'-THS (B), 3,3',5,5'-THS (C) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (D) na masę mitochondriów w młodych i starych KM. Badania przeprowadzono na komórkach wyznakowanych NAO metodą fluorescencyjną. Gwiazdkami oznaczono istotne statystycznie różnice w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki wyrażono w jednostkach świetlnych ( $U_{sw}$ ) przeliczonych na  $10^5$  komórek. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach na komórkach od 5 różnych dawców.**

## **2.16. Wpływ stilbenów na potencjał błony mitochondrialnej ( $\Delta\Psi_m$ ) w młodych i starych KM**

Oceny wielkości potencjału błony mitochondriów ( $\Delta\Psi_m$ ) dokonano na podstawie wyznakowania komórek roztworem jodku 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylobenzimidazolokarbocyaninowego (JC-1), a następnie wyliczenia stosunku zielonej fluorescencji emitowanej przez agregaty tego związku do czerwonej fluorescencji emitowanej przez jego formę monomeryczną.

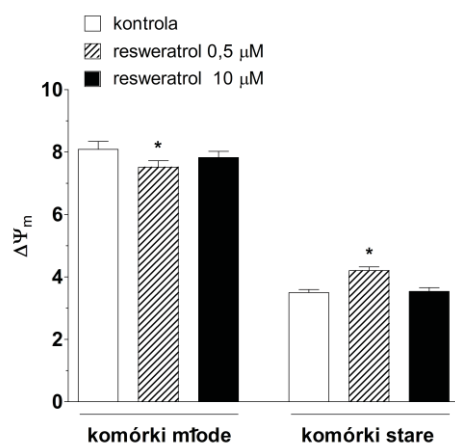
Badania wykazały, że resweratrol zastosowany w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  obniża wartość  $\Delta\Psi_m$  w młodych KM o  $5 \pm 2\%$  ( $P < 0,05$ ), natomiast w komórkach starych podwyższa ją o  $20 \pm 3\%$  ( $P < 0,01$ ) w porównaniu z grupą kontrolną. Potencjał błony mitochondrialnej w komórkach eksponowanych na resweratrol w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  nie różnił się od wartości uzyskanych dla grupy kontrolnej (**Ryc. 31-A**).

3,3',4,4'-THS wpłynął na obniżenie wartości  $\Delta\Psi_m$  w komórkach młodych, w sposób zależny od dawki. Przy zastosowaniu stężenia 0,5  $\mu\text{M}$  odnotowano obniżenie wartości potencjału o  $16 \pm 3\%$  ( $P < 0,01$ ), natomiast przy stężeniu 10  $\mu\text{M}$  o  $27 \pm 5\%$  ( $P < 0,001$ ). Jednocześnie, nie stwierdzono zmian wartości  $\Delta\Psi_m$  w komórkach starych, niezależnie od użytego stężenia związku (**Ryc. 31-B**).

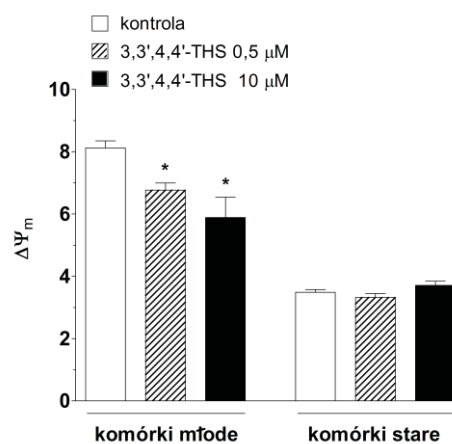
3,3',5,5'-THS nie spowodował zmiany wartości  $\Delta\Psi_m$  w komórkach młodych, niezależnie od zastosowanego stężenia związku. Natomiast w komórkach starych eksponowanych na stilben w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$ , wartość  $\Delta\Psi_m$  wzrosła o  $17 \pm 3\%$  ( $P < 0,05$ ), a pod wpływem 10  $\mu\text{M}$  pozostała bez zmian (**Ryc. 31-C**).

3,3',4,4',5,5'-HHS w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  spowodował obniżenie wartości  $\Delta\Psi_m$  w komórkach młodych o  $12 \pm 3\%$  ( $P < 0,01$ ), natomiast zastosowany w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  o  $21 \pm 3\%$  ( $P < 0,01$ ). Z kolei w komórkach starych, związek ten zastosowany w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  wpłynął na obniżenie wartości  $\Delta\Psi_m$  o  $18 \pm 4\%$  ( $P < 0,05$ ), natomiast przy stężeniu 10  $\mu\text{M}$  wartość ta była porównywalna z grupą kontrolną (**Ryc. 31-D**).

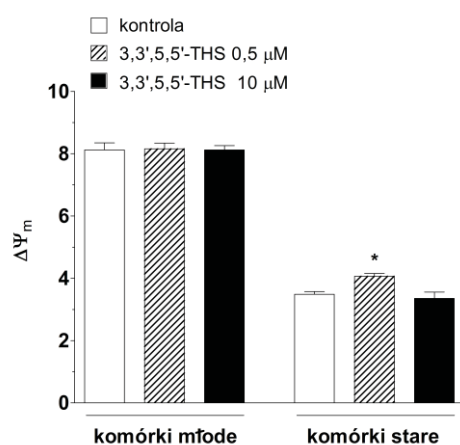
**A.**



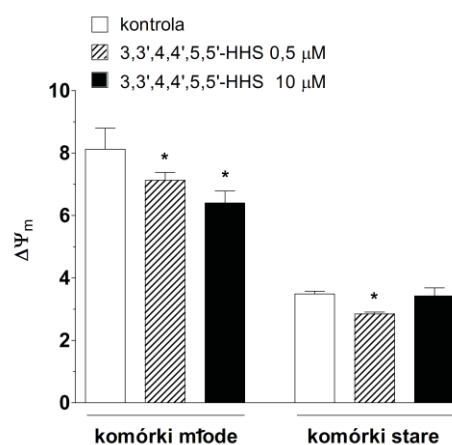
**B.**



**C.**



**D.**



**Rycina 31. Wpływ stilbenów: resweratrolu (A), 3,3',4,4'-THS (B), 3,3',5,5'-THS (C) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (D) na wielkość potencjału błony mitochondrialnej ( $\Delta\Psi_m$ ) w młodych i starych KM.** Badania przeprowadzono na komórkach wyznakowanych JC-1 metodą fluorescencyjną. Wyniki wyrażone są jako stosunek fluorescencji emitowanej przez agregaty tego związku do fluorescencji jego formy monomerycznej. Gwiazdkami oznaczono istotne statystycznie różnice w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w duplikatach na komórkach od 5 różnych dawców.

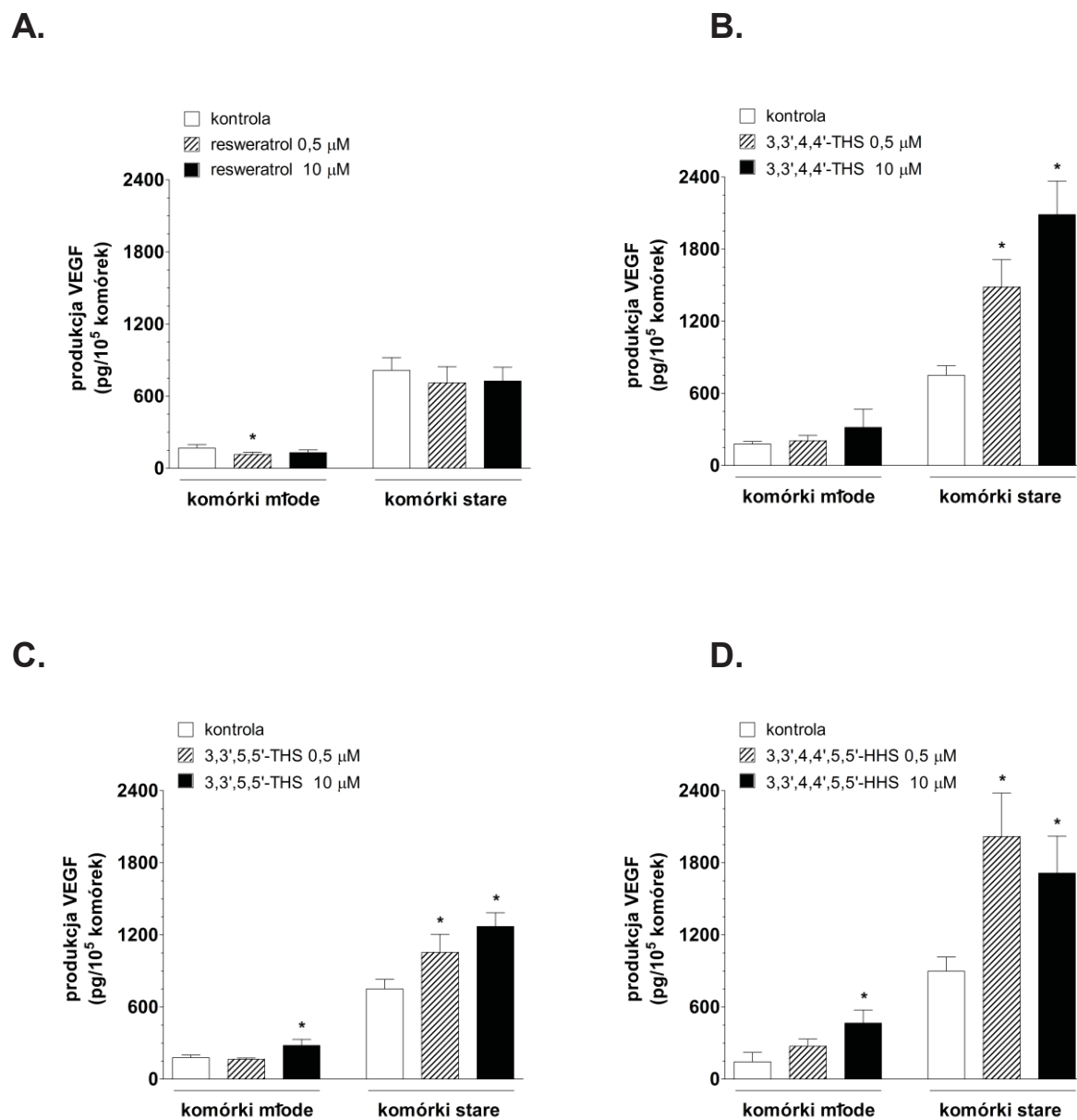
## **2.17. Wpływ stilbenów na wydzielanie czynnika wzrostu śródbłonka naczyń (VEGF) przez młode i stare KM**

Badania przeprowadzone metodą ELISA wykazały, że resweratrol w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  obniża wydzielanie VEGF przez komórki młode o  $31 \pm 7\%$  ( $P < 0,05$ ) w porównaniu do komórek grupy kontrolnej. Jednocześnie nie stwierdzono zmian produkcji VEGF przez młode KM pod wpływem resweratrolu w stężeniu 10  $\mu\text{M}$ , jak również efektu tego związku zastosowanego w obu stężeniach na sekrecję VEGF przez komórki stare (**Ryc. 32-A**).

3,3',4,4'-THS nie spowodował istotnej statystycznie zmiany wydzielania VEGF przez młode KM, niezależnie od użytego stężenia. Z kolei w komórkach starych, związek ten wpłynął na wzrost wydzielania VEGF o  $121 \pm 55\%$  ( $P < 0,05$ ) oraz  $175 \pm 11\%$  ( $P < 0,01$ ) dla, odpowiednio, stężeń 0,5 i 10  $\mu\text{M}$  (**Ryc. 32-B**).

Wydzielanie VEGF przez młode KM eksponowane na 3,3',5,5'-THS w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  nie różniło się znacząco od grupy kontrolnej, natomiast w przypadku komórek poddawanych działaniu stężenia 10  $\mu\text{M}$  było podwyższone o  $56 \pm 23\%$  ( $P < 0,05$ ). Z kolei badania na komórkach starych wykazały, że wydzielanie VEGF pod wpływem 3,3',5,5'-THS w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  było o  $41 \pm 14\%$  ( $P < 0,05$ ) wyższe, a w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  o  $72 \pm 12\%$  ( $P < 0,01$ ) wyższe w porównaniu z komórkami grupy kontrolnej (**Ryc. 32-C**).

Wydzielanie VEGF przez KM eksponowane na 3,3',4,4',5,5'-HHS ma charakter identyczny do tego, odnotowanego dla 3,3',5,5'-THS. W komórkach młodych, związek ten wywiera wpływ tylko w stężeniu 10  $\mu\text{M}$ , co przekłada się na wzrost produkcji VEGF o  $253 \pm 60\%$  ( $P < 0,001$ ). Z kolei w komórkach starych, wydzielanie VEGF pod wpływem 3,3',4,4',5,5'-HHS w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  było o  $153 \pm 55\%$  ( $P < 0,05$ ) wyższe, a w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  o  $122 \pm 41\%$  ( $P < 0,05$ ) wyższe w porównaniu z komórkami grupy kontrolnej (**Ryc. 32-D**).



**Rycina 32. Wpływ stilbenów: resweratrolu (A), 3,3',4,4'-THS (B), 3,3',5,5'-THS (C) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (D) na produkcję VEGF przez młode i stare KM.**

Pomiaru stężenia VEGF dokonano metodą ELISA w supernatantach (medium kondycjonowanym) zebranych z hodowli komórek młodych i starych. Gwiazdkami oznaczono istotne statystycznie różnice w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych na komórkach od 6 różnych dawców.

## **2.18. Wpływ stilbenów na wydzielanie chemokiny CXCL8/IL-8 przez młode i stare KM**

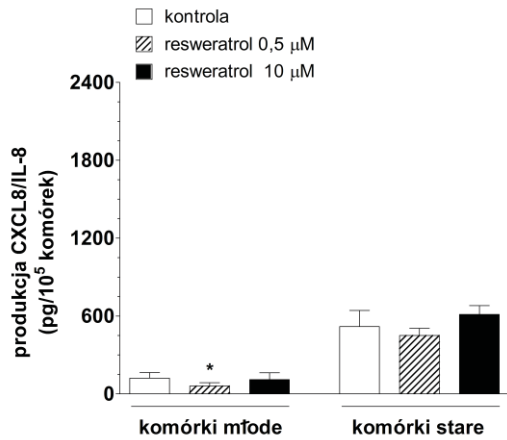
Ocena wydzielania CXCL8/IL-8 dokonana metodą ELISA wykazała, że resweratrol w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  obniża produkcję tego czynnika przez komórki młode o  $57 \pm 4\%$  ( $P < 0,04$ ) w porównaniu z komórkami grupy kontrolnej. Jednocześnie nie stwierdzono wpływu resweratrolu w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  na wydzielanie CXCL8/IL-8 przez komórki młode, jak również jego wpływu w obu stężeniach na wydzielanie CXCL8/IL-8 przez komórki stare (**Ryc. 33-A**).

3,3',4,4'-THS w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  nie spowodował zmian wydzielania chemokiny CXCL8/IL-8 ani w komórkach młodych, ani w starych. Z kolei zastosowany w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  wpłynął pobudzająco na to zjawisko, czego odzwierciedleniem był wzrost sekrecji o  $340 \pm 117\%$  ( $P < 0,001$ ) przez komórki młode oraz o  $373 \pm 144\%$  ( $P < 0,05$ ) przez komórki stare (**Ryc. 33-B**).

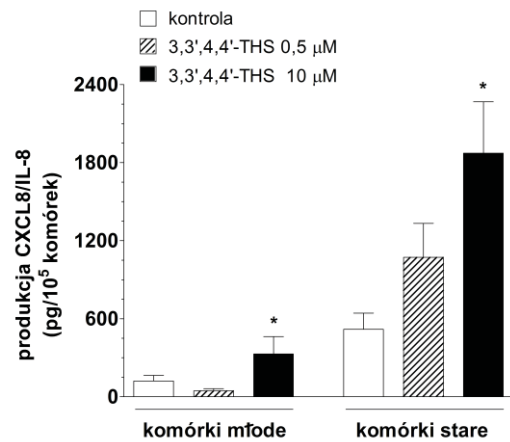
Produkcja chemokiny CXCL8/IL-8 pod wpływem 3,3',5,5'-THS nie różniła się znacząco od grupy kontrolnej, niezależnie od zastosowanego stężenia związku oraz replikacyjnego wieku komórek badanych (**Ryc. 33-C**).

3,3',4,4',5,5'-HHS w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  nie wpłynął na zmianę wydzielania CXCL8/IL-8 w komórkach młodych, natomiast w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  spowodował wzrost wydzielania chemokiny o  $1351 \pm 109\%$  ( $P < 0,001$ ). Z kolei w komórkach starych, związek ten zastosowany w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  spowodował wzrost wydzielania CXCL8/IL-8 o  $232 \pm 83\%$  ( $P < 0,05$ ), natomiast w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  o  $331 \pm 155\%$  ( $P < 0,05$ ) (**Ryc. 33-D**).

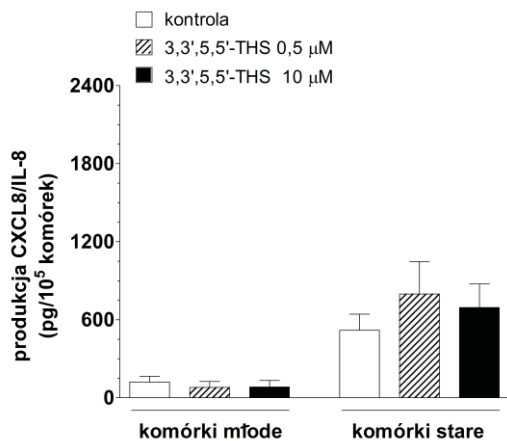
A.



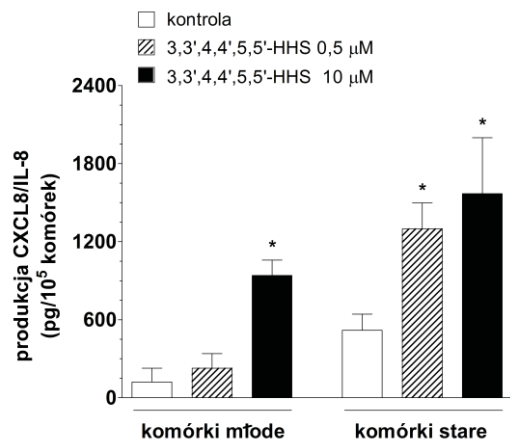
B.



C.



D.



Rycina 33. Wpływ stilbenów: resweratrolu (A), 3,3',4,4'-THS (B), 3,3',5,5'-THS (C) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (D) na produkcję chemokiny CXCL8/IL-8 przez młode i stare KM. Pomiaru stężenia CXCL8/IL-8 dokonano metodą ELISA w supernatantach (medium kondycjonowanym) zebranych z hodowli komórek młodych i starych. Gwiazdkami oznaczono istotne statystycznie różnice w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych na komórkach od 6 różnych dawców.



## **2.19. Wpływ stilbenów na proliferację komórek śródbłonka naczyń skóry HMEC-1**

Aby ocenić biologiczne znaczenie zmian produkcji czynników angiogennych przez młode i stare KM poddawane działaniu stilbenów, komórki śródbłonka naczyniowego HMEC-1 były eksponowane przez 48 godzin na media kondycjonowane zebrane z hodowli KM, po czym oceniono ich proliferację metodą MTT.

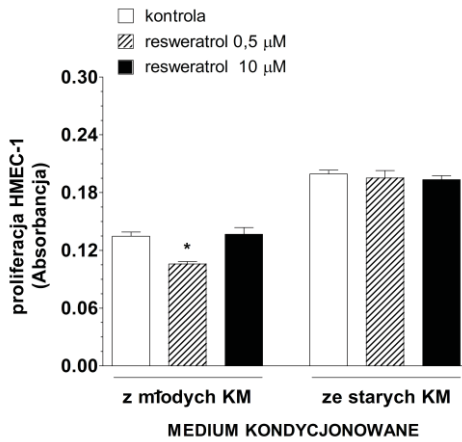
Badania wykazały, że komórki eksponowane na medium kondycjonowane z młodych KM poddawanych działaniu resweratrolu w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  cechowały się proliferacją słabszą o  $21 \pm 4\%$  ( $P < 0,01$ ) w porównaniu z grupą kontrolną. W przypadku pozostałych grup badanych, nie odnotowano istotnej statystycznie zmiany tempa proliferacji komórek HMEC-1 (**Ryc. 34-A**).

W przypadku komórek HMEC-1 rosnących w obecności medium kondycjonowanego zebranych z hodowli młodych KM eksponowanych na 3,3',4,4'-THS w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  odnotowano pobudzenie proliferacji komórek o  $18 \pm 5\%$  ( $P < 0,05$ ) w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast przy użyciu stężenia 0,5  $\mu\text{M}$  nie stwierdzono różnic w porównaniu z grupą kontrolną. Jednocześnie, w przypadku komórek eksponowanych na medium kondycjonowane ze starych KM poddanych działaniu stilbenu w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  stwierdzono wzrost proliferacji komórek o  $16 \pm 3\%$  ( $P < 0,01$ ), a w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  o  $49 \pm 4\%$  ( $P < 0,001$ ) (**Ryc. 34-B**).

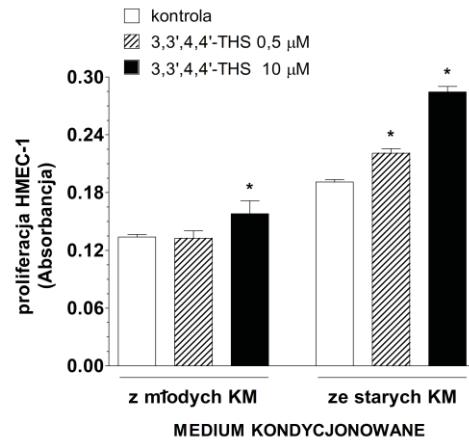
W przypadku komórek HMEC-1 eksponowanych na medium kondycjonowane z młodych i starych KM poddanych działaniu 3,3',5,5'-THS w obu stężeniach, nie odnotowano istotnych statystycznie różnic w proliferacji komórek badanych, niezależnie od użytego stężenia związku (**Ryc. 34-C**).

W przypadku komórek HMEC-1 rosnących w obecności mediów kondycjonowanych zebranych z hodowli młodych KM eksponowanych na 3,3',4,4',5,5'-HHS w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  odnotowano pobudzenie proliferacji komórek o  $33 \pm 6\%$  ( $P < 0,001$ ) w porównaniu z grupą kontrolną. Nie stwierdzono natomiast zmian proliferacji komórek HMEC-1 pod wpływem stilbenu w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$ . Jednocześnie, w przypadku komórek eksponowanych na medium kondycjonowane ze starych KM poddanych działaniu stilbenu w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  stwierdzono wzrost proliferacji komórek o  $34 \pm 4\%$  ( $P < 0,001$ ), a w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  o  $54 \pm 5\%$  ( $P < 0,001$ ) (**Ryc. 34-D**).

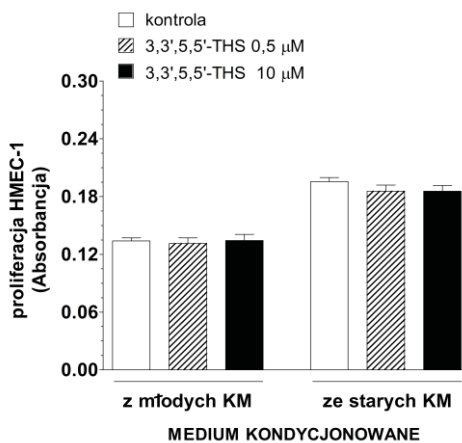
A.



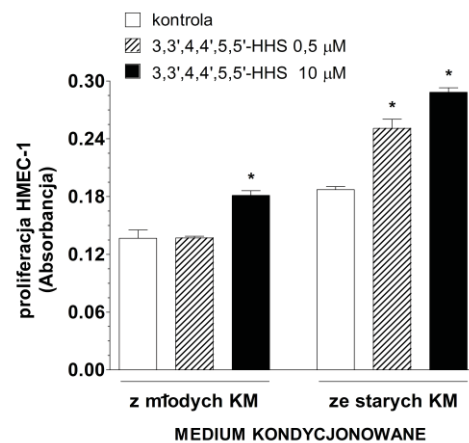
B.



C.



D.



Rycina 34. Wpływ medium kondycjonowanego z hodowli młodych i starych KM, eksponowanych na resweratrol (A), 3,3',4,4'-THS (B), 3,3',5,5'-THS (C) i 3,3',4,4',5,5'-HHS (D) na proliferację komórek śródbłonna naczyniowego HMEC-1. Pomiaru aktywności proliferacyjnej komórek HMEC-1 dokonano metodą MTT. Grupę kontrolną w eksperymencie stanowiły komórki śródbłonkowe rosnące w obecności standardowego medium M199 bez surowicy, przechowywanego podobnie jak próbki medium kondycjonowanego w temperaturze  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Wyniki znormalizowano poprzez odpowiednie rozcieńczenie próbek medium kondycjonowanego w odniesieniu do liczby komórek młodych i starych, wydzielających czynniki do tego medium. Gwiazdkami oznaczono istotne statystycznie różnice w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych z użyciem medium wyprodukowanego przez komórki od 6 różnych dawców.

## DYSKUSJA

Jak do tej pory, w badaniach biogerontologicznych wykorzystywano szereg zróżnicowanych chemicznie związków, których celem działania miało być opóźnienie tempa starzenia się komórek i/lub organizmów, względnie spowolnienie lub zahamowanie rozwoju określonych chorób związanych z wiekiem. Na tym polu testowano między innymi hormon wzrostu [182], dehydroepiandrosteron (DHEA) [183], kwas L-2-oksotiazolidyno-4-karboksyowy (procysteinę) [68;168], L-argininę [184],  $\beta$ -alanylo-L-histydynę (L-karnozyne) [185], peroksyredoksynę II [186],  $\alpha$ -fenylo-*tert*-butylnitron (PBN) [69] i wiele innych. Co istotne, w przypadku części z tych związków, obserwowane efekty były niezadowalające (zbyt słabe lub zbyt krótkotrwałe), a w przypadku części z nich, efektów przeciwstarzeniowych w ogóle nie stwierdzono. W tej sytuacji, szczególnie ciekawym kandydatem okazał się naturalny stilben — resweratrol, którego działanie, oprócz efektów kardioprotekcyjnych, przeciwnowotworowych i przeciwzapalnych, przełożyło się zarówno na znaczący wzrost długości życia organizmów modelowych [125-128], jak i wydłużenie możliwości proliferacyjnych niektórych typów komórek *in vitro* [135;136].

Niniejsza rozprawa jest próbą kompleksowej oceny działania resweratrolu i jego trzech syntetycznych, dodatkowo hydroksylowanych pochodnych w aspekcie procesu starzenia się na poziomie komórkowym. W przypadku użytych do badań analogów resweratrolu, niniejsze badania są pionierską próbą określenia ich wpływu na wykładniki wzrostu i proliferacji komórek w warunkach hodowlanych. Jak dotąd bowiem, w zakresie tematyki związanej ze starzeniem komórkowym, resweratrol był jedynym stilbenem wykorzystywanym w tego typu badaniach. Jako kryterium wyboru pochodnych resweratrolu wykorzystano liczbę i umiejscowienie dodatkowych grup hydroksylowych ( $-\text{OH}$ ) w pierścieniach aromatycznych. Uważa się bowiem, że to rodzaj, lokalizacja oraz liczba podstawników są czynnikami o decydującym znaczeniu dla biologicznych właściwości stilbenów [173;187]. Tak więc, oprócz resweratrolu, do badań wybrano 3,3',5,5'-THS, który podobnie jak jego naturalny prekursor cechuje się tym, że nie posiada sąsiadujących ze sobą podstawników hydroksylowych. Jako dwa kolejne analogi wybrano 3,3',4,4'-THS oraz 3,3',4,4',5,5'-HHS, których charakterystyczną cechą jest umiejscowienie grup hydroksylowych w położeniu *orto*, co według niektórych autorów wzmacnia właściwości biologiczne pochodnych resweratrolu [138]. Należy podkreślić, że w odniesieniu do

wszystkich wybranych analogów resweratrolu zachowana jest symetria podstawników w obu pierścieniach aromatycznych, co miało służyć wykluczeniu wzajemnych oddziaływań pomiędzy pierścieniami. Ostatnią, lecz nie mniej ważną przesłanką w wyborze do badań 3,3',4,4'-THS oraz 3,3',5,5'-THS była bardzo niewielka liczba doniesień literaturowych o ich aktywności biologicznej.

Bardzo ważnym zagadnieniem w planowaniu badań był wybór właściwych stężeń roboczych związków badanych. Warto zauważyć, że badania z wykorzystaniem resweratrolu i jego pochodnych prowadzone były dotychczas w dość szerokim zakresie stężeń, ze wskazaniem na wartości w zakresie 25 - 200  $\mu\text{M}$  [188]. Zastosowanie tak wysokich stężeń było podyktowane chęcią wykorzystywania cytotoksycznych właściwości związków w kontekście ich działania przeciwnowotworowego [189;190]. W niniejszym projekcie, stężenia resweratrolu i jego pochodnych zostały dobrane w ten sposób, aby zapewnić długotrwałą przeżywalność komórek badanych, a zarazem, aby możliwe było zaobserwowanie ich wpływu na parametry związane z replikacyjnym starzeniem się komórek (m.in. dynamiką starzenia się, stresem oksydacyjnym, właściwościami wydzielniczymi). W toku badań pilotażowych udało się wykazać, że te warunki mogą być spełnione w zakresie stężeń do 10  $\mu\text{M}$ , przy czym stężenie 0,5  $\mu\text{M}$  okazało się w najwyższym stopniu pobudzać proliferację komórek w systemie ostrym. Tak więc dla potrzeb doświadczeń właściwych wybrano dwa stężenia stilbenów, tj. 0,5  $\mu\text{M}$  oraz 10  $\mu\text{M}$ , przy czym to drugie, będące stężeniem granicznym, miało stanowić swego rodzaju dodatkową kontrolę względem stężenia 0,5  $\mu\text{M}$ . Planując doświadczenia nie wykluczono bowiem możliwości, że w komórkach eksponowanych na związki badane w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  będzie można uchwycić określone efekty, nieobecne przy zastosowaniu stężenia dwudziestokrotnie niższego. Stabilności związków badanych w medium hodowlanym dowiodły doświadczenia z wykorzystaniem metody HPLC, przy czym wyniki tych badań wykazały pewne, czasem znaczące różnice między poszczególnymi stilbenami. Najtrwalszym spośród badanych związków okazał się resweratrol, a zaraz po nim 3,3',5,5'-THS, natomiast zdecydowanie wyższym tempem degradacji cechowały się 3,3',4,4'-THS oraz 3,3',4,4',5,5'-HHS. Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki nie można wykluczyć, że część obserwowanych efektów biologicznych może być pochodną różnic w trwałości związków badanych w medium hodowlanym. Ponieważ jednak sytuacja ta nie wydaje się być prostą zależnością typu: trwałość związku  $\rightarrow$  efekt działania związku, kwestia ta zostanie

uszczegółowiona w dalszej części dyskusji, po gruntownym omówieniu uzyskanych wyników doświadczeń.

Ludzkie komórki mezotelium otrzewnowego — stanowiące model doświadczalny w niniejszej rozprawie — znane są z relatywnie niskiego tempa podziałów mitotycznych, wczesnego wyczerpywania się potencjału podziałowego oraz replikacyjnego starzenia się, które następuje zwykle po zaledwie kilku rundach replikacji *in vitro* [166]. Cechy te czynią z KM dobry obiekt badań nad wpływem czynników mogących modulować tempo ich starzenia się [65;168]. Ważne znaczenie KM w regulacji zjawisk fizjologicznych oraz patologii przebiegających w jamie otrzewnej stanowiło dodatkową przesłankę, przemawiającą za wyborem tej grupy komórek dla potrzeb niniejszej rozprawy [145;146;164].

W pierwszej części badań za cel postawiono sobie określenie wpływu resweratrolu i jego analogów na potencjał podziałowy oraz kinetykę starzenia się KM. Badania proliferacji komórek polegające m.in. na ocenie stopnia wychwytu tymidyny znakowanej trytem przez DNA komórek dzielących się, dystrybucji komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego (ze szczególną uwagą zwróconą na komórki syntetyzujące DNA w fazie S) oraz ekspresji antygenu proliferacyjnego PCNA (którego szczyt ekspresji przypada także na fazę S [191]), wykazały, że resweratrol w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  w znaczący sposób zwiększa zdolności podziałowe KM *in vitro*. Efekt ten potwierdziły także badania przewlekłe, podczas których wykazano, iż starzenie się KM eksponowanych na resweratrol w tym stężeniu jest opóźnione w porównaniu z komórkami grupy kontrolnej. Uzyskane wyniki badań są zgodne z wcześniejszymi obserwacjami poczynionymi na modelu komórek progenitorowych śródbłónka naczyń [136] i mezenchymalnych komórkach macierzystych [135]. Z drugiej strony należy wspomnieć, że w przypadku fibroblastów wyizolowanych z mięśnia sercowego [192], komórek śródbłónka naczyniowego [193], keratynocytów [133] i komórek mięśni gładkich [194], resweratrol wykazywał działanie antyproliferacyjne. Jako jedną z przyczyn różnic we wpływie resweratrolu na aktywność podziałową komórek, oprócz ewidentnego wpływu typu komórek badanych, można uznać zastosowane stężenia związku. Otóż dla przykładu, pobudzające działanie resweratrolu na proliferację mezenchymalnych komórek macierzystych odnotowano przy stężeniu 10  $\mu\text{M}$ , natomiast w stężeniu 100  $\mu\text{M}$ , związek ten wywierał już działanie antyproliferacyjne [135]. Z kolei badania z wykorzystaniem płodowych fibroblastów płucnych wykazały, że związek ten w stężeniach

do 10  $\mu\text{M}$  nie wpływa na ich aktywność podziałową, natomiast w stężeniach 25  $\mu\text{M}$  i wyższych hamuje proliferację komórek w sposób zależny od dawki [195]. I wreszcie, w badaniach na komórkach śródbłonna naczyń HUVEC wykazano, że w stężeniach 10-100  $\mu\text{g/ml}$  resweratrol hamuje proliferację komórek, natomiast w stężeniu 0,1  $\mu\text{g/ml}$  wydatnie ją pobudza [196].

W sposób zbliżony do resweratrolu, w tym na odsetek komórek w fazie S cyklu, ekspresję antygenu PCNA oraz kinetykę starzenia się KM wpływał 3,3',4,4'-THS, przy czym istotne statystycznie różnice względem grupy kontrolnej odnotowano tylko przy zastosowaniu stężenia 0,5  $\mu\text{M}$ . Co warto jednak zaznaczyć, w bezpośrednim porównaniu ze swym naturalnym prekursorem, działanie tego analogu w kontekście zwiększania możliwości podziałowych KM okazało się być znacząco słabsze. W odniesieniu do biologicznego działania 3,3',4,4'-THS należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że w przypadku zastosowania stężenia 10  $\mu\text{M}$ , analiza wielkości frakcji komórek w fazie S cyklu komórkowego (podczas globalnej oceny populacji komórek starych), jak również ocena skumulowanej liczby podwojeń populacji (CPD) wykazały, że związek ten wywiera silne działanie antyproliferacyjne. Obserwacja ta, w kontekście potencjalnego wykorzystywania 3,3',4,4'-THS, chociażby w terapii przeciwnowotworowej, może świadczyć, że związek ten może działać skutecznie już w relatywnie niskich stężeniach, pod warunkiem wydłużenia czasu ekspozycji. Taka strategia terapeutyczna może się okazać nadzwyczaj korzystna z tego względu, iż pozwoli ona połączyć działanie antyproliferacyjne 3,3',4,4'-THS względem komórek nowotworowych z brakiem jednoczesnej cytotoksyczności względem komórek prawidłowych. Warto bowiem nadmienić, iż spośród wszystkich badanych w niniejszej rozprawie stilbenów to właśnie 3,3',4,4'-THS cechował się najniższą cytotoksycznością w odniesieniu do KM. Badania wykazały, że żywotność komórek badanych nie różniła się od grupy kontrolnej nawet wówczas, gdy eksponowano je na 3,3',4,4'-THS w stężeniach 50 i 100  $\mu\text{M}$ .

Wpływ 3,3',5,5'-THS na właściwości proliferacyjne KM okazał się zdecydowanie słabszy, a przede wszystkim krótszy w porównaniu z resweratroliem i 3,3',4,4'-THS. Pobudzenie aktywności podziałowej komórek pod wpływem tego związku zaobserwowano w modelu ostrym na podstawie oceny inkorporacji znakowanej trytem tymidyny do DNA komórek proliferujących oraz ekspresji antygenu PCNA w populacji komórek starych.

Ocena wartości CPD osiągniętych przez komórki nie wykazała natomiast wpływu 3,3',5,5'-THS na kinetykę starzenia się KM, niezależnie od użytego stężenia związku.

Wyniki badań z zastosowaniem 3,3',4,4',5,5'-HHS wykazały, że działanie tego związku wyraźnie różni się od pozostałych badanych stilbenów. Najbardziej przykuwającym uwagę efektem działania 3,3',4,4',5,5'-HHS było zahamowanie proliferacji komórek po zastosowaniu stężenia 10  $\mu$ M. Efekt ten stwierdzono na podstawie oceny wielkości frakcji komórek PCNA-dodatnich (zarówno w hodowlach młodych, jak i starych), analizy wielkości frakcji komórek w fazie S cyklu mitotycznego, jak również w wyniku pomiaru wartości CPD hodowli. Dane te mogą potwierdzać wcześniejsze obserwacje innych zespołów badawczych, wskazujące, iż 3,3',4,4',5,5'-HHS cechuje się wyjątkowo silnymi właściwościami antyproliferacyjnymi, a także relatywnie wysoką cytotoksycznością, szczególnie w odniesieniu do komórek nowotworowych [197].

Wyniki badań wpływu stilbenów na kinetykę starzenia się KM za pomocą pomiaru wartości CPD zostały zweryfikowane za pomocą oceny ekspresji biochemicznego markera komórek starych, jakim jest cytoplazmatyczna (mierzona przy pH 6,0) aktywność enzymu  $\beta$ -galaktozydazy związanej ze starzeniem (SA- $\beta$ -Gal) [33]. Ponieważ biologiczna wartość oceny ekspresji SA- $\beta$ -Gal jako markera starzenia się za pomocą metody cytochemicznej została w ostatnich latach zakwestionowana [198], klasyczną metodę półilościową, polegającą na wizualizacji aktywności enzymu w cytoplazmie komórek starych uzupełniono o metodę ilościową, polegającą na ocenie globalnej aktywności SA- $\beta$ -Gal w lizatach komórkowych, techniką fluorescencyjną [178]. Przeprowadzone badania wykazały, że wzrost aktywności podziałowej oraz opóźnienie replikacyjnego starzenia się KM pod wpływem resweratrolu idzie w parze z obniżeniem zarówno odsetka komórek SA- $\beta$ -Gal-dodatnich, jak i aktywności tego enzymu w całej populacji komórek. Godnym uwagi jest fakt, że resweratrol wpłynął na obniżenie ekspresji i aktywności SA- $\beta$ -Gal zarówno w hodowlach komórek młodych i starych, co sugeruje, iż dobroczynne efekty działania tego związku zaczynają być dostrzegalne już po 14 dniach ekspozycji. Co ciekawe, istotny statystycznie wpływ resweratrolu odnotowano także dla stężenia 10  $\mu$ M. Ten efekt można interpretować jednak w dwojaki sposób. Z jednej strony jest możliwe, iż resweratrol mógł korzystnie zmodyfikować tylko określone fenotypowe oznaki starzenia się komórek, bez jednoczesnego przełożenia na kryterium główne, tj. ich możliwości podziałowe. Nie można także wykluczyć, że w komórkach eksponowanych na resweratrol w stężeniu 10  $\mu$ M aktywowany jest inny (lub dodatkowy) mechanizm, czego efektem jest zmiana aktywności

SA- $\beta$ -Gal, bez jednoczesnego opóźnienia indukcji programu starzenia się. Ten scenariusz jest po części zgodny z sugestiami tych autorów, którzy twierdzą, że ekspresja SA- $\beta$ -Gal nie powinna być traktowana jako uniwersalny marker komórek starych [198]. Niemniej jednak, uzyskane w niniejszej rozprawie wyniki potwierdzają szereg doniesień literaturowych, w tym wyniki badań Xia i wsp., pokazujące obniżenie frakcji SA- $\beta$ -Gal-dodatnich komórek progenitorowych pod wpływem resweratrolu [136] oraz Kao i wsp., wskazujące, że resweratrol w stężeniach 10-50  $\mu$ M hamuje w sposób zależny od dawki indukowaną  $H_2O_2$  ekspresję SA- $\beta$ -Gal w komórkach śródbłonna naczyń HUVEC [199]. Zależność między działaniem resweratrolu oraz ekspresją SA- $\beta$ -Gal wykazali także Faragher i wsp. na modelu fibroblastów płucnych, z tą różnicą jednak, że w ich badaniach resweratrol zastosowany w stężeniach 25-100  $\mu$ M hamował proliferację komórek oraz zwiększał odsetek komórek SA- $\beta$ -Gal-dodatnich [195].

Z kolei w odniesieniu do 3,3',4,4'-THS zaobserwowano obniżenie odsetka komórek SA- $\beta$ -Gal-dodatnich oraz aktywności tego enzymu w całej populacji komórek, co było zgodne ze stwierdzonym wcześniej wpływem tego związku na tempo starzenia się komórek. Nieco słabszy wpływ na SA- $\beta$ -Gal odnotowano dla 3,3',5,5'-THS, który to efekt był widoczny tylko w populacjach komórek starych. Na tej podstawie można wyciągnąć wniosek, że nie tylko siła działania, lecz także i tempo działania 3,3',5,5'-THS są słabsze w porównaniu z resweratrolem oraz 3,3',4,4'-THS. W przypadku ostatniego z badanych związków, 3,3',4,4',5,5'-HHS, daje się ponownie zauważyć, iż zmiana ekspresji SA- $\beta$ -Gal w komórkach nie idzie w parze ze zmianą ich możliwości podziałowych. Jest to widoczne m.in. przy zastosowaniu stężenia 10  $\mu$ M, które w znaczący sposób ograniczało możliwości podziałowe komórek, jednak nie wpływało na spodziewany wzrost ekspresji i/lub aktywności SA- $\beta$ -Gal. Dane te mogą wskazywać, iż pomimo dość bezkrytycznego wykorzystywania SA- $\beta$ -Gal jako markera komórek starych, wyniki półilościowej oraz ilościowej oceny aktywności tego enzymu nie zawsze są zgodne z obserwowanymi zmianami tempa proliferacji i starzenia się komórek *in vitro*.

W badaniach przeprowadzonych przez Książka i wsp. wykazano, że starzenie się KM ma charakter telomeroniezależny [55]. W niniejszych badaniach, wykorzystujących metodę ilościowego PCR wykazano, że zmiany możliwości podziałowych KM pod wpływem badanych stilbenów również nie są związane ze zmianami długości telomerowego DNA.

Kolejnym aspektem prowadzonych badań było określenie wpływu resweratrolu i jego pochodnych na częstość apoptozy komórek. W tym celu posłużono się dwoma metodami, tj.



oceną stopnia kondensacji chromatyny jądrowej oraz oceną wielkości frakcji komórek posiadających pofragmentowane, niskocząsteczkowe DNA (tzw. frakcji subG<sub>1</sub>). Badania te podjęto ze względu na fakt, że korzystne działanie resweratrolu w kontekście terapii przeciwnowotworowej jest często utożsamiane z jego działaniem proapoptotycznym [100;106;108;109]. Nie można także wykluczyć, że pobudzanie proliferacji komórek może być częściowo związane z hamowaniem w nich sygnałów proapoptotycznych. Przeprowadzone badania dowiodły, iż w zdecydowanej większości grup badanych, stilbeny w zastosowanych stężeniach nie wpływają na zmianę częstości apoptozy w młodych i starych KM. Istotny statystycznie wzrost odsetka komórek frakcji subG<sub>1</sub> odnotowano wyłącznie w komórkach starzejących się w obecności 3,3',4,4'-THS i 3,3',4,4',5,5'-HHS w stężeniu 10 μM. Efekt ten może w pewnej mierze tłumaczyć przyczynę obniżenia uzyskanych wartości CPD komórek eksponowanych na te związki. Należy nadmienić, iż przygotowując materiał komórkowy do oceny wielkości frakcji subG<sub>1</sub> zwrócono uwagę na to, aby oprócz komórek rosnących w naczyniu hodowlanym zbierać także komórki odklejone od jego powierzchni i obecne w medium. Tak więc, uwzględniając tę procedurę, można stwierdzić, że choć zjawiska starzenia się komórek oraz apoptozy nie są tożsame, a nawet zazwyczaj nie przebiegają łącznie, to jednak w przypadku dwóch spośród badanych stilbenów, działanie tych związków może polegać na przyspieszaniu procesu starzenia się KM (przy użytym stężeniu 10 μM) oraz nasileniu częstości występowania oligonukleosomalnej fragmentacji DNA, będącej jednym z uznawanych wyznaczników apoptotycznej śmierci komórek [200]. Wzrost częstości apoptotycznej śmierci komórek wskutek ekspozycji na 3,3',4,4',5,5'-HHS został uprzednio zaobserwowany m.in. przez Muriasa i wsp. w komórkach raka piersi [197] oraz Saiko i wsp. w komórkach białaczki promielocytowej [201]. Z kolei rola 3,3',4,4'-THS jako związku mogącego nasilać częstość występowania apoptozy nie została jak dotąd opisana. Warto także wspomnieć, że choć prezentowane w niniejszej rozprawie badania nie wykazały wpływu resweratrolu na apoptozę KM, efekt taki uzyskano badając m.in. wpływ tego związku na komórki raka piersi [202;203]. Poza faktem, że cytowane badania prowadzone były na komórkach nowotworowych, uzyskany w nich efekt mógł być związany z zastosowanymi stężeniami resweratrolu, które były wielokrotnie wyższe.

Stres oksydacyjny jest uznawany za podstawową przyczynę starzenia się komórek w warunkach *in vitro* [37;40;70]. Także w odniesieniu do KM stwierdzono, że ich wczesne starzenie się jest w głównej mierze spowodowane szczególną wrażliwością na

środowiskowy stres oksydacyjny [68;204]. Biorąc pod uwagę doniesienia mówiące o antyoksydacyjnych właściwościach resweratrolu i jego pochodnych, kolejnym krokiem w prowadzonych badaniach było określenie wpływu badanych stilbenów na szereg parametrów związanych ze stresem oksydacyjnym, w tym produkcję reaktywnych form tlenu (RFT), aktywność wewnątrzkomórkowych mechanizmów antyoksydacyjnych oraz zawartość oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Ponieważ w rozwoju stresu oksydacyjnego w starzejących się komórkach niebagatelną rolę odgrywają dysfunkcyjne mitochondria [58;205], przeanalizowano także takie parametry związane z metabolizmem tych organeli, jak potencjał błony wewnętrznej ( $\Delta\Psi_m$ ) oraz ich biogenezę.

Badania mające na celu określenie wpływu resweratrolu na produkcję RFT wykazały, że związek ten, zastosowany w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  zwiększa generowanie RFT przez młode KM. Identyczny efekt odnotowano analizując komórki eksponowane na 3,3',4,4'-THS, natomiast w odniesieniu do 3,3',5,5'-THS oraz 3,3',4,4',5,5'-HHS nie stwierdzono wpływu tych związków na produkcję RFT przez młode i stare KM. Pobudzenie produkcji RFT pod wpływem resweratrolu zostało uprzednio zaobserwowane przez Leonarda i wsp. w komórkach śródbłonna naczyń eksponowanych na ten związek w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  [90]. Uzyskane wyniki sugerujące prooksydacyjne działanie resweratrolu oraz jednego z jego analogów względem KM, stojące jednak w pewnej sprzeczności z dużą częścią doniesień, mówiących o jego potencjale antyoksydacyjnym [90;206], były powodem kontynuowania tego wątku badań pod kątem oceny wpływu stilbenów na produkcję RFT w okresie 0-72 godziny, tj. w czasie odpowiadającym pojedynczej ekspozycji komórek na świeżo przygotowane związki. Badania wykazały, że w przypadku każdego z badanych stilbenów, daje się zauważyć silne, lecz krótkotrwałe nasilenie produkcji RFT, przy czym silniejszy efekt zaobserwowano dla stilbenów zastosowanych w stężeniu 10  $\mu\text{M}$ . Najsilniejsze wzbudzenie produkcji RFT odnotowano dla 3,3',4,4',5,5'-HHS oraz 3,3',4,4'-THS, natomiast efekty wykazane dla resweratrolu i stilbenu 3,3',5,5'-THS były słabsze i zbliżone do siebie. Dane literaturowe sugerują, że przyczyną zaobserwowanych różnic w sile działania poszczególnych związków mogła być liczba i umiejscowienie grup —OH w pierścieniach. Uważa się, że pochodne resweratrolu posiadające dodatkowe grupy hydroksylowe w pozycji *orto* (czyli m.in. 3,3',4,4'-THS i 3,3',4,4',5,5'-HHS) mogą tworzyć tzw. ortosemichinony, które z kolei, poprzez przemiany red-ox, mogą być dalszym źródłem RFT [139]. Co więcej, właśnie tym pochodnym przypisuje się największe działanie

cytotoksyczne w stosunku do komórek nowotworowych, co mogłoby się częściowo komponować ze znacznym ograniczeniem wartości CPD (przyspieszonym starzeniem się) KM eksponowanych na te właśnie stilbeny w stężeniu 10  $\mu\text{M}$ .

W kontekście uzyskanych wyników intrygującą była obserwacja, że produkcja RFT, pobudzona w krótkim czasie po podaniu stilbenów, wkrótce potem ulega stopniowemu obniżaniu, wracając w trzeciej dobie ekspozycji do wartości wyjściowych. Wynik ten wydaje się stać w sprzeczności z faktem, że mierząc produkcję RFT w komórkach po 2 tygodniach ekspozycji uzyskano istotny statystycznie wzrost produkcji RFT pod wpływem resweratrolu oraz 3,3',4,4'-THS. Taką sytuację może tłumaczyć jednak, wspomniana wcześniej, wysoka wrażliwość KM na stres oksydacyjny. Można bowiem założyć, że wielokrotnie powtarzana ekspozycja komórek na stilbeny (związana z cyklicznym, silnym pobudzaniem wytwarzania w nich RFT) może prowadzić do przedwczesnego starzenia się pewnej frakcji komórek, nawet w obrębie populacji uznawanych za młode. Jak wykazano wcześniej, jedną z cech starych KM jest właśnie wzmożone generowanie RFT [55]. Co więcej, ustalono, że w hodowlach KM z wczesnych pasaży może istnieć duża frakcja komórek wykazujących fenotypowe oznaki starzenia się [55;68].

Oceniwszy wpływ stilbenów na produkcję RFT przystąpiono do przeprowadzenia analogicznych pomiarów względem aktywności całkowitej dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), a więc jednego z kluczowych enzymów antyoksydacyjnych [139]. Badania wykazały, że zarówno resweratrol, jak i 3,3',4,4'-THS wpływają na znaczący wzrost aktywności SOD w komórkach młodych i starych, przy czym w komórkach młodych efekt ten odnotowano dla obu zastosowanych stężeń związków, natomiast w komórkach starych tylko dla stężenia 0,5  $\mu\text{M}$ . Ekspozycja KM na dwa pozostałe stilbeny nie wiązała się ze zmianami aktywności SOD, przy czym w przypadku 3,3',4,4',5,5'-HHS zastosowanego w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  zaobserwowano tendencję do obniżania się aktywności SOD w komórkach młodych i starych. Co więcej, analiza wpływu stilbenów na aktywność SOD w czasie 0-72 godziny wykazała, że szczyt indukcji SOD pod wpływem resweratrolu oraz 3,3',4,4'-THS następuje krótko po szczycie generowania RFT przez komórki, w związku z czym można dopatrywać się związku przyczynowo-skutkowego między tymi dwoma zjawiskami [207]. Co ciekawe, w przypadku resweratrolu, to stężenie 0,5  $\mu\text{M}$  pobudzało aktywność SOD w większym stopniu niż stężenie 10  $\mu\text{M}$ , co może potwierdzać, iż kluczowe efekty biologiczne (w tym wzrost wartości CPD komórek) uzyskiwane pod wpływem tego stilbenu związane są

z zastosowaniem bardzo niskiego stężenia związku. Indukcja aktywności SOD pod wpływem resweratrolu została uprzednio opisana przez innych autorów, m.in. w komórkach śródbłonna naczyniowego [91;208], fibroblastach [209] oraz w komórkach nabłonkowych siatkówki oka [210]. Z kolei obniżenie aktywności SOD odnotowano w komórkach raka piersi poddawanych działaniu 3,3',4,4',5,5'-HHS, który to efekt, według autorów pracy, miał być częściowo odpowiedzialny za cytotoksyczność tego związku [197].

Niektórzy autorzy sądzą, że skutki biologiczne wywierane przez resweratrol mogą stanowić przykład hormezy, czyli zjawiska, w którym zastosowanie niskich stężeń/dawek danego czynnika (stresora) przynosi efekty przeciwstawne do tych, wywieranych przez jego wysokie stężenia/dawki. Zazwyczaj działanie niskich stężeń/dawek stresora jest utożsamiane z efektami pobudzającymi i korzystnymi dla danego układu biologicznego, natomiast efekty wywierane przez jego wysokie stężenia/dawki mają naturę hamującą i skutkują niekorzystnie [211;212]. Zjawisko hormezy było wielokrotnie rozpatrywane, jako mechanizm działania przeciwstarzeniowego, m.in. w kontekście roli stresu oksydacyjnego [213], wysiłku fizycznego [214] oraz restrykcji kalorycznej [215]. W przypadku resweratrolu zaobserwowano m.in. zróżnicowanie odpowiedzi proliferacyjnej różnego typu komórek nowotworowych w zależności od tego, czy poddawane były działaniu niskich, czy wysokich stężeń tego związku [211]. Przywołanie zjawiska hormezy służy uzasadnieniu, wydawać by się mogło, paradoksalnego efektu działania resweratrolu oraz 3,3',4,4'-THS, które wzmagają możliwości proliferacyjne KM oraz opóźniają ich starzenie się, mimo wyraźnego działania prooksydacyjnego. Jest jednak bardzo prawdopodobne, że związki te zastosowane w niskiej dawce 0,5  $\mu$ M powodują pobudzenie aktywności mechanizmów obronnych komórek (do których zaliczyć można też mechanizmy antyoksydacyjne), czego efektem będzie poprawa „biologicznej kondycji” całej populacji komórek. Warto zwrócić uwagę, że znaczący wzrost aktywności SOD uzyskano tylko w komórkach eksponowanych na resweratrol oraz 3,3',4,4'-THS, przy czym silniejszy efekt odnotowano dla stężenia 0,5  $\mu$ M. Trzeba też podkreślić, że w przeciwieństwie do indukcji RFT przez te związki, która utrzymywała się tylko w komórkach młodych, pobudzenie aktywności SOD występowało zarówno w hodowlach młodych, jak i starych. Efekt ten sugeruje, że trwalszym — a przez to i ważniejszym biologicznie skutkiem działania tych stilbenów — mogła być ochrona antyoksydacyjna komórek. Z kolei, w przypadku 3,3',4,4',5,5'-HHS, bardzo silna indukcja RFT nie szła w parze z pobudzeniem aktywności SOD, co może uzasadniać przyspieszone

starzenie się komórek eksponowanych na ten związek, szczególnie przy zastosowaniu stężenia 10  $\mu\text{M}$ .

Aby dowieść, że ostatecznym skutkiem działania resweratrolu oraz 3,3',4,4'-THS jest protekcja komórek przed niekorzystnym działaniem RFT, postanowiono dokonać ilościowej oceny stopnia oksydacyjnych uszkodzeń DNA w komórkach. Badania z wykorzystaniem resweratrolu oraz 3,3',4,4'-THS w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  wykazały, że związki te znacząco zmniejszają stężenie 8-hydrokso-2'-deoksyguanozyny (8-OH-dG) w komórkach młodych i starych. Co ciekawe, 3,3',4,4'-THS, 3,3',5,5'-THS oraz 3,3',4,4',5,5'-HHS zastosowane w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  wpłynęły na wzrost stężenia 8-OH-dG w populacjach komórek starych, co może uzasadniać przyspieszone starzenie się KM eksponowanych na pierwszy i trzeci z nich, a także może dowodzić znaczenia braku indukcji SOD pod wpływem RFT przez drugi z wymienionych związków. Obniżenie stopnia oksydacyjnych uszkodzeń DNA (w tym zawartości 8-OH-dG) pod wpływem resweratrolu stwierdzono m.in. w komórkach glejaka C6 [216] oraz w tkankach [217] i moczu zwierząt doświadczalnych [218]. Uzyskane w tej części badań wyniki sugerują więc, że kwestia działania resweratrolu oraz 3,3',4,4'-THS w kontekście modulowania stresu oksydacyjnego komórek jest bardzo złożona. Mimo działania prooksydacyjnego, nawet w niskim stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$ , związki te mobilizują w silny i trwały sposób mechanizmy antyoksydacyjne komórek (SOD), czego efektem jest wzrost protekcji komórek przed szkodliwym działaniem RFT, obniżenie stopnia oksydacyjnych uszkodzeń DNA i, w efekcie, wzmocnienie możliwości proliferacyjnych komórek *in vitro*. W kontekście uzyskanych wyników warto także zwrócić uwagę na fakt, że efekty działania niektórych analogów resweratrolu na KM odbiegają od tych, opisanych dla innych typów komórek, szczególnie komórek nowotworowych. Jako przykład takiej rozbieżności może służyć działanie 3,3',4,4',5,5'-HHS, który uznawany jest za związek o wysokiej aktywności antyoksydacyjnej, przekładającej się m.in. na skuteczną redukcję oksydacyjnych uszkodzeń DNA [219]. Trzeba jednak pamiętać, że w dużej części doniesień literaturowych, badania właściwości antyoksydacyjnych resweratrolu oraz jego pochodnych nie były prowadzone w układach biologicznych, lecz wykorzystywały tylko systemy chemiczne pozbawione komórek, np. metodę spektroskopii elektronowego rezonansu spinowego (ESR) [90]. Warta uwagi w tym kontekście jest konkluzja autorów jednej z prac, którzy stwierdzili, że wyniki dotyczące cytotoksyczności i właściwości antyoksydacyjnych stilbenów, uzyskiwane w

systemach bezkomórkowych nie są prognostycznymi dla właściwych modeli biologicznych [220].

Ponieważ głównym źródłem RFT w komórce są mitochondria, poszukując przyczyny wzmożonej produkcji RFT pod wpływem działania stilbenów, przeprowadzono ocenę wpływu tych związków na biogenezę mitochondriów oraz potencjał ich błony wewnętrznej ( $\Delta\Psi_m$ ). Badania biogenezy mitochondriów wykazały, że w komórkach młodych resweratrol oraz 3,3',4,4'-THS zwiększają masę mitochondriów, czemu towarzyszy obniżenie wartości potencjału  $\Delta\Psi_m$ , będącego, pośrednio, miarą zdolności komórek do generowania ATP [221]. Wyniki przeliczenia produkcji RFT na masę mitochondriów w komórkach potwierdziły, że wzmożone generowanie RFT przez młode KM eksponowane na resweratrol i 3,3',4,4'-THS jest bezpośrednim skutkiem wzmożonej biogenezy mitochondriów. Z kolei 3,3',5,5'-THS oraz 3,3',4,4',5,5'-HHS wpływały na mitochondria dużo bardziej niespecyficznie. Pierwszy z nich pobudzał biogenezę mitochondriów w komórkach młodych, odwrotny efekt dając w komórkach starych, czemu towarzyszył wzrost wartości potencjału  $\Delta\Psi_m$  (ale tylko w komórkach starych). Drugi ze związków nie wpływał natomiast na masę mitochondriów, lecz obniżał potencjał błony wewnętrznej w komórkach młodych i starych. Wzrost biogenezy mitochondriów pod wpływem resweratrolu jest zgodny z obserwacjami innych autorów, którzy sugerują, że efekt ten może być związany z pobudzeniem aktywności koaktywatora  $1\alpha$  receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksysonów  $\gamma$  (PGC- $1\alpha$ ) [222;223] oraz jądrowego czynnika oddechowego-1 i mitochondrialnego czynnika transkrypcyjnego A [224]. Wpływ resweratrolu na obniżenie wartości  $\Delta\Psi_m$  został z kolei opisany w komórkach czerniaka [225] oraz siatkówczaka [226]. Podobny efekt, polegający na obniżeniu wartości  $\Delta\Psi_m$ , zgodny z wynikami niniejszych badań, opisano także w komórkach raka piersi eksponowanych na 3,3',4,4',5,5'-HHS [197].

Interpretując biologiczne znaczenie uzyskanych efektów można sądzić, że wzrost biogenezy mitochondriów pod wpływem resweratrolu może tłumaczyć wzmożoną produkcję RFT przez komórki eksponowane na ten związek, natomiast obniżenie wartości potencjału  $\Delta\Psi_m$  może być wynikiem bądź uszkodzenia łańcucha oddechowego (pod wpływem RFT), bądź też wzrostu przepuszczalności wewnętrznej błony mitochondrialnej wobec protonów, ewentualnie otwarcia megakanału mitochondrialnego. Istnienie wzajemnej zależności między wzmożoną produkcją RFT i masą mitochondriów, a obniżonym potencjałem  $\Delta\Psi_m$  zostało już wcześniej opisane w przypadku fibroblastów [58] oraz KM [63]. Należy jednak

dodać, że w cytowanych pracach, zależność ta, określana jako tzw. wsteczna odpowiedź sygnałowa była charakterystyczną cechą komórek starych, a czynnikiem ją wyzwalającym był stres oksydacyjny, powodujący dysfunkcję mitochondriów (obniżenie  $\Delta\Psi_m$ ) i wywołujący kompensacyjny wzrost ich syntezy. Nie sposób w tym momencie jednak wykluczyć, że sekwencja zdarzeń w komórkach młodych może być nieco inna, szczególnie w kontekście działania egzogenego czynnika inicjującego.

Scharakteryzowawszy wpływ badanych stilbenów na proces starzenia się KM, ze szczególnym uwzględnieniem wykładników stresu oksydacyjnego, w ostatnim etapie badań za cel postawiono sobie sprawdzenie, czy związki te wpływają także na cechy czynnościowe KM. Jako miarę czynności komórek wykorzystano ich zdolność do wydzielania dwóch czynników proangiogennych, tj. czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF) oraz chemokiny CXCL8/IL-8 [227;228]. Jak wykazały wcześniejsze badania, wydzielanie obu tych czynników przez stare KM jest znamienne wyższe w porównaniu z komórkami młodymi [175]. W toku niniejszych badań stwierdzono, że resweratrol w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  obniża sekrecję VEGF przez młode KM, natomiast pozostałe badane stilbeny powodują efekt odwrotny, tj. podwyższają wydzielanie tego czynnika w komórkach młodych i starych (3,3',5,5'-THS, 3,3',4,4',5,5'-HHS) lub tylko w starych (3,3',4,4'-THS). W odniesieniu do angiogennej chemokiny CXCL8/IL-8, resweratrol w stężeniu 0,5  $\mu\text{M}$  obniżył jej wydzielanie w młodych KM, natomiast 3,3',4,4'-THS oraz 3,3',4,4',5,5'-HHS powodowały wzrost wydzielania, szczególnie pod wpływem stężenia 10  $\mu\text{M}$ . Uzyskane wyniki, pokazujące hamujący wpływ resweratrolu na uwalnianie VEGF są zgodne z danymi literaturowymi, pochodzącymi m.in. z badań na fibroblastach [229], komórkach nabłonkowych siatkówki oka [230] oraz komórkach raka jajnika [114] i raka piersi [231]. Obniżenie produkcji VEGF pod wpływem resweratrolu nie jest jednak efektem wykazywanym przez wszystkich autorów. Przykładowo, Fukuda i wsp. pokazali, że związek ten zwiększa produkcję VEGF, wpływając w ten sposób na naprawę uszkodzeń w mięśniu sercowym u szczurów [232]. Te ostatnie wyniki mogą sugerować, że duże znaczenie dla wpływu resweratrolu na produkcję VEGF może mieć kontekst tkankowy, czyli m.in. wpływ współistniejących patologii. Tezę tę mogą potwierdzać wyniki badań Losso i wsp., którzy zaobserwowali, z kolei, zahamowane wydzielanie VEGF pod wpływem resweratrolu przez komórki nabłonkowe, rosnące w środowisku o podwyższonym stężeniu glukozy [233]. Hamujący wpływ resweratrolu na wydzielanie chemokiny CXCL8/IL-8 potwierdzają

natomiast badania przeprowadzone na komórkach nabłonkowych pęcherzyków płucnych [118] oraz monocytach [234].

Zaobserwowany wzrost sekrecji VEGF oraz CXCL8/IL-8 pod wpływem analogów resweratrolu jest obserwacją intrygującą, a zarazem pionierską. Bazując na uzyskanych wynikach można jednak spekulować, że odmienność obserwowanych efektów działania resweratrolu i jego analogów pod kątem produkcji czynników angiogennych może wynikać z obecności dodatkowych grup hydroksylowych w pozycji *orto*, przy czym wpływ ten będzie tym silniejszy, im więcej jest przyłączonych grup funkcyjnych. Za tą hipotezą może częściowo świadczyć brak wpływu stilbenu 3,3',5,5'-THS (nie posiadającego grupy —OH w pozycji *orto*) na produkcję CXCL8/IL-8.

Aby ocenić, czy wpływ stilbenów na produkcję VEGF i CXCL8/IL-8 ma znaczenie biologiczne w postaci zmian wydajności angiogenezy, komórki śródbłonka naczyniowego HMEC-1 eksponowano na medium kondycjonowane z hodowli KM (eksponowanych na stilbenu oraz media kontrolne), a następnie mierzono ich proliferację. Uzyskane wyniki pokazały, że zmiana wydzielania czynników angiogennych pod wpływem resweratrolu oraz jego analogów koresponduje ze zmianami proliferacji komórek śródbłonka naczyń. Mianowicie media z KM eksponowanych na resweratrol w stężeniu 0,5  $\mu$ M hamowały proliferację komórek, natomiast media z komórek poddawanych działaniu 3,3',4,4'-THS oraz 3,3',4,4',5,5'-HHS pobudzały proliferację komórek HMEC-1 w sposób zależny od dawki. Antyangiogenne działanie resweratrolu zostało uprzednio zademonstrowane m.in. przez Lin i wsp., którzy pokazali hamujące działanie tego związku na zależną od VEGF proliferację komórek śródbłonka naczyniowego HUVEC [235]. Zgodne wyniki uzyskano także na modelu mysim, kiedy to pokazano, że resweratrol hamuje neowaskularyzację raka płuc, który to efekt może być zależny od zahamowania przyłączania się VEGF do komórek śródbłonka naczyniowego [77]. Antyangiogenne działanie resweratrolu, odbywające się poprzez obniżenie sekrecji VEGF odnotowano także w modelu hodowli mieszanej komórek śródbłonka naczyniowego i czerniaka [115]. W tym momencie warto także raz jeszcze przywołać wpływ resweratrolu na przyspieszone starzenie się komórek śródbłonka naczyniowego [193]. Jednak w kontekście wpływu na angiogenezę, dane literaturowe dotyczące działania resweratrolu są niejednoznaczne. Okazuje się bowiem, że związek ten poprawia neowaskularyzację zależną od komórek mononuklearnych pochodzenia szpikowego u myszy z cukrzycą [236]. Jak wykazali Wang i wsp., resweratrol pobudza także aktywność (proliferyację, adhezję i migrację) komórek progenitorowych śródbłonka



naczyniowego uzyskanych z krwi obwodowej [237]. Na podstawie uzyskanych wyników i danych literaturowych można więc stwierdzić, że działanie resweratrolu pod kątem angiogenezy w dużej mierze zależy od typu komórek badanych, użytego stężenia oraz zastosowanego modelu badawczego, w rozumieniu współistniejących patologii. Trzeba także nadmienić, iż uzyskane wyniki dotyczące wpływu analogów resweratrolu na proliferację komórek śródbłonna naczyń są pionierskimi i dlatego nie można ich odnieść do istniejących danych literaturowych. Z drugiej strony wymaga podkreślenia fakt, że pobudzenie angiogenezy pod wpływem działania tych związków może być czynnikiem znacząco ograniczającym ich przydatność w terapii przeciwnowotworowej.

Przedstawione w niniejszej rozprawie wyniki badań wpływu stilbenów na proces komórkowego starzenia się dowiodły, iż związki te — szczególnie resweratrol oraz 3,3',4,4'-THS — mogą efektywnie opóźnić tempo tego zjawiska. W świetle uzyskanych wyników dodatkowego komentarza wymaga kwestia stabilności związków badanych w medium hodowlanym. Jak wykazano metodą HPLC, stilbeny różnią się od siebie tempem rozkładu, co — przynajmniej teoretycznie — może w znaczący sposób interferować z uzyskiwanymi wynikami. Stilbenem o najwyższej trwałości okazał się być resweratrol, co może uzasadniać regularność i skalę wywieranych przez niego efektów. Ale z drugiej strony, 3,3',4,4'-THS rozkładał się zdecydowanie szybciej, co nie stanowiło przeszkody dla wywierania przez niego efektów o sile zazwyczaj zbliżonej do resweratrolu. Z kolei 3,3',5,5'-THS okazał się być związkiem wywierającym najsłabsze efekty działania, pomimo, iż jego trwałość była tylko nieco niższa niż resweratrolu. Tak więc nie sposób wykluczyć wpływu tempa metabolizmu związku na wywierane przez niego efekty, jednak na podstawie uzyskanych wyników, zależność ta wydaje się być, co najmniej, niejednoznaczna. W tym kontekście nie można także wykluczyć, że w przypadku określonych stilbenów, aktywne biologicznie (w zbliżony sposób) są także produkty ich metabolizmu. Należy także zaznaczyć, że w toku prowadzenia doświadczeń, komórki otrzymywały nowe porcje stilbenów w odstępach trzydniowych. Oznacza to, że pomimo metabolizmu związku, komórki były pobudzane na dwa sposoby, tj. poprzez ciągłą ekspozycję na malejące stężenie wyjściowego związku oraz poprzez ekspozycję pulsacyjną. W związku z tym, można wyobrazić sobie scenariusz, mówiący, że w takim schemacie doświadczalnym, oba mechanizmy działania związków są względem siebie komplementarne, co może tłumaczyć uzyskiwanie silnych i trwałych rezultatów nawet w przypadku stilbenów o najniższej trwałości (3,3',4,4',5,5'-HHS).

Uzyskane w rozprawie wyniki są punktem wyjścia do dalszych badań nad właściwościami biologicznymi resweratrolu i jego pochodnych w stosunku do komórek mezotelium otrzewnowego. Szczególnie intrygujące wydają się być wyniki uzyskane dla 3,3',4,4'-THS, który będąc związkiem bardzo aktywnym, jak dotąd nie spotkał się z zainteresowaniem innych grup badaczy. Wartym głębszej uwagi jest także i to, że w niektórych przypadkach, efekty wywierane przez resweratrol różnią się pod względem kierunku od tych, wywieranych przez jego analogi. Dalszych badań wymaga także zróżnicowanie efektów działania badanych związków w zależności od replikacyjnego wieku komórek. Biorąc natomiast pod uwagę zaangażowanie KM w rozwój szeregu patologii zachodzących w obrębie jamy otrzewnej, wskazanym wydaje się określenie wpływu badanych stilbenów m.in. na takie zjawiska, jak: toksyczność wysokich stężeń glukozy, włóknienie trzewnej oraz wewnątrzotrzewnowe przerzuty nowotworów.

## **WNIOSKI**

1. Resweratrol oraz 3,3',4,4'-THS zwiększają możliwości proliferacyjne i opóźniają starzenie się KM *in vitro*, a efekt ten jest prawdopodobnie związany z ich wpływem na mobilizację mechanizmów antyoksydacyjnych i obniżeniem stopnia oksydacyjnych uszkodzeń DNA w komórkach.
2. Zmiana cech fenotypowych, w tym właściwości wydzielniczych KM pod wpływem stilbenów znajduje przełożenie na efekty biologiczne, w tym na proces angiogenezy, ocenianej *in vitro* na podstawie tempa proliferacji komórek śródbłonna naczyniowego.
3. Wpływ stilbenów na zjawisko angiogenezy, a szczególnie hamowanie tego procesu pod wpływem resweratrolu może sugerować przydatność tego związku w terapii przeciwnowotworowej.
4. 3,3',4,4'-THS oraz 3,3',4,4',5,5'-HHS powinny być wykorzystywane w terapii przeciwnowotworowej z dużą ostrożnością, gdyż w przypadku ekspozycji na nie komórek starych (w tym KM) może dojść do wzmożenia angiogenezy i pobudzenia progresji nowotworów.
5. Dalszych, uszczegółowionych badań wymaga zdefiniowanie wewnątrzkomórkowych mechanizmów działania stilbenów, a także zależności między strukturą chemiczną związków (w tym liczba i umiejscowienie grup —OH) a wywieranymi przez nie efektami biologicznymi.
6. Uzyskane wyniki uzasadniają podjęcie dalszych badań nad wpływem resweratrolu oraz jego syntetycznych pochodnych (szczególnie 3,3',4,4'-THS) na rozwój zależnych od KM patologii w jamie otrzewnej.

## PIŚMIENNICTWO

1. Sehl ME, Yates FE: Kinetics of human aging: I. Rates of senescence between ages 30 and 70 years in healthy people. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56:B198-B208, 2001
2. Harman D: Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span. *Ann N Y Acad Sci* 1067:10-21, 2006
3. Harman D: Aging: overview. *Ann N Y Acad Sci* 928:1-21, 2001
4. Oeppen J, Vaupel JW: Demography. Broken limits to life expectancy. *Science* 296:1029-1031, 2002
5. Davies AM: Epidemiology and the challenge of ageing. *Int J Epidemiol* 14:9-21, 1985
6. Weinert BT, Timiras PS: Invited review: Theories of aging. *J Appl Physiol* 95:1706-1716, 2003
7. Medvedev ZA: An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol Rev Camb Philos Soc* 65:375-398, 1990
8. Medawar PB: *An Unsolved Problem of Biology*. London, H.K. Lewis, 1952
9. Książek K, Bartosz G.: Ewolucyjne teorie starzenia się., chap. 2, in *Biogerontologia*, Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN SA, 2009, pp 19-32
10. Williams, G. C. Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution* 11, 398-411. 1957.
11. Kirkwood TB: Evolution of ageing. *Nature* 270:301-304, 1977
12. Westendorp RG, Kirkwood TB: Human longevity at the cost of reproductive success. *Nature* 396:743-746, 1998
13. Weismann A: *Über Leben und Tod*. Jena, Verlag von Gustav Fisher, 1892
14. Rubner M: Das problem der lebensdauer. *Oldenburg Munich*, 1908
15. McCay CM, Crowell MF, Maynard LA: The effect of retarded growth upon the length of lifespan and upon the ultimate body size. *J Nutr* 10:63-79, 1935
16. Harman D: Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11:298-300, 1956
17. Szilard L: On the nature of the aging process. *Proc Natl Acad Sci USA* 45:30-45, 1959
18. Orgel LE: The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 49:517-521, 1963

19. Hayflick L: The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 37:614-636, 1965
20. Alexander P: The role of DNA lesions in processes leading to aging in mice. *Symp Soc Exp Biol* 21:29-50, 1967
21. Walford RL: Immunologic aspects of aging. *Klin Wochenschr* 47:599-605, 1969
22. Olovnikov AM: Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides. *Dokl Akad Nauk SSSR* 201:1496-1499, 1971
23. Olovnikov AM: Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory. *Exp Gerontol* 31:443-448, 1996
24. Zs-Nagy I: The biological waste product formation in the light of the membrane hypothesis of aging. *Arch Gerontol Geriatr* 34:329-341, 2002
25. Monnier VM: Nonenzymatic glycosylation, the Maillard reaction and the aging process. *J Gerontol* 45:B105-B111, 1990
26. Cerami A: Hypothesis. Glucose as a mediator of aging. *J Am Geriatr Soc* ,626-634, 1985
27. Harley CB, Futcher AB, Greider CW: Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345:458-460, 1990
28. Brunk UT: The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur J Biochem* 269:1996-2002, 2002
29. Witkowski JA: Dr. Carrel's immortal cells. *Med Hist* 24:129-142, 1980
30. Hayflick L, Moorhead PS: The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25:585-621, 1961
31. Shay JW, Wright WE: Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature* 1:72-76, 2000
32. Norwood TH, Pendergrass WR: The cultured diploid fibroblast as a model for the study of cellular aging. *Crit Rev Oral Biol Med* 3:353-370, 1992
33. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, Campisi J: A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9363-9367, 1995
34. von Zglinicki T, Saretzki G, Ladhoff J, d'Adda di Fagagna F, Jackson SP: Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech Ageing Dev* 126:111-117, 2005
35. Coppe JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J: The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* 5:99-118, 2010

36. Cech TR: Beginning to understand the end of the chromosome. *Cell* 116:273-279, 2004
37. von Zglinicki T: Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* 27:339-344, 2002
38. Broccoli D: Function, replication and structure of the mammalian telomere. *Cytotechnology* 45:3-12, 2004
39. Greider CW: Telomeres and senescence: the history, the experiment, the future. *Curr Biol* 8:R178-R181, 1998
40. von Zglinicki T, Saretzki G, Docke W, Lotze C: Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp Cell Res* 220:186-193, 1995
41. Stewart SA, Ben Porath I, Carey VJ, O'Connor BF, Hahn WC, Weinberg RA: Erosion of the telomeric single-strand overhang at replicative senescence. *Nat Genet* 33:492-496, 2003
42. van SB, Smogorzewska A, de LT: TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 92:401-413, 1998
43. d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP: A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426:194-198, 2003
44. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE: Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279:349-352, 1998
45. Vaziri H, Benchimol S: Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr Biol* 8:279-282, 1998
46. Herbig U, Sedivy JM: Regulation of growth arrest in senescence: telomere damage is not the end of the story. *Mech Ageing Dev* 127:16-24, 2006
47. Itahana K, Dimri G, Campisi J: Regulation of cellular senescence by p53. *Eur J Biochem* 268:2784-2791, 2001
48. Kang MK, Guo W, Park NH: Replicative senescence of normal human oral keratinocytes is associated with the loss of telomerase activity without shortening of telomeres. *Cell Growth Differ* 9:85-95, 1998
49. Kiyono T, Foster SA, Koop JI, McDougall JK, Galloway DA, Klingelhutz AJ: Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 396:84-88, 1998
50. Lowe SW, Sherr CJ: Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr Opin Genet Dev* 13:77-83, 2003

51. Ramirez RD, Morales CP, Herbert BS, Rohde JM, Passons C, Shay JW, Wright WE: Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes Dev* 15:398-403, 2001
52. Herbert BS, Wright WE, Shay JW: p16(INK4a) inactivation is not required to immortalize human mammary epithelial cells. *Oncogene* 21:7897-7900, 2002
53. Rubin H: Cell aging in vivo and in vitro. *Mech Ageing Dev* 98:1-35, 1997
54. Sherr CJ, DePinho RA: Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell* 102:407-410, 2000
55. Książek K., Passos JF, Olijslagers S, Saretzki G, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T: Premature senescence of mesothelial cells is associated with non-telomeric DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun* 362:707-711, 2007
56. Richter C: Do mitochondrial DNA fragments promote cancer and aging? *FEBS Lett* 241:1-5, 1988
57. Allen RG, Tresini M, Keogh BP, Doggett DL, Cristofalo VJ: Differences in electron transport potential, antioxidant defenses, and oxidant generation in young and senescent fetal lung fibroblasts (WI-38). *J Cell Physiol* 180:114-122, 1999
58. Passos JF, Saretzki G, Ahmed S, Nelson G, Richter T, Peters H, Wappler I, Birket MJ, Harold G, Schaeuble K, Birch-Machin MA, Kirkwood TB, von Zglinicki T: Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. *PLoS Biol* 5:e110, 2007
59. Lenaz G: Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim Biophys Acta* 1366:53-67, 1998
60. Ozawa T: Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases. *Biochim Biophys Acta* 1271:177-189, 1995
61. Książek K, Piątek K, Witowski J: Impaired response to oxidative stress in senescent cells may lead to accumulation of DNA damage in mesothelial cells from aged donors. *Biochem Biophys Res Commun* 373:335-339, 2008
62. Książek K., Witowski J: [Impaired insulin signaling and human ageing]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 62:263-271, 2008
63. Książek K., Passos JF, Olijslagers S, von Zglinicki T: Mitochondrial dysfunction is a possible cause of accelerated senescence of mesothelial cells exposed to high glucose. *Biochem Biophys Res Commun* 366:793-799, 2008
64. Blazer S, Khankin E, Segev Y, Ofir R, Yalon-Hacohen M, Kra-Oz Z, Gottfried Y, Larisch S, Skorecki KL: High glucose-induced replicative senescence: point of no return and effect of telomerase. *Biochem Biophys Res Commun* 296:93-101, 2002

65. Książek K., Korybalska K, Jorres A, Witowski J: Accelerated senescence of human peritoneal mesothelial cells exposed to high glucose: the role of TGF-beta1. *Lab Invest* 87:345-356, 2007
66. Dumont P, Burton M, Chen QM, Gonos ES, Frippiat C, Mazarati JB, Eliaers F, Remacle J, Toussaint O: Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radic Biol Med* 28:361-373, 2000
67. Gorbunova V, Seluanov A, Pereira-Smith OM: Expression of human telomerase (hTERT) does not prevent stress-induced senescence in normal human fibroblasts but protects the cells from stress-induced apoptosis and necrosis. *J Biol Chem* 277:38540-38549, 2002
68. Książek K., Mikula-Pietrasik J, Jorres A, Witowski J: Oxidative stress-mediated early senescence contributes to the short replicative life span of human peritoneal mesothelial cells. *Free Radic Biol Med* 45:460-467, 2008
69. Chen Q, Fischer A, Reagan JD, Yan LJ, Ames BN: Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:4337-4341, 1995
70. von Zglinicki T, Pilger R, Sitte N: Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 28:64-74, 2000
71. Serra V, von Zglinicki T, Lorenz M, Saretzki G: Extracellular superoxide dismutase is a major antioxidant in human fibroblasts and slows telomere shortening. *J Biol Chem* 278:6824-6830, 2003
72. Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y: Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 24:2783-2840, 2004
73. Mikstacka R, Ignatowicz E.: Działanie chemoprewencyjne i terapeutyczne trans-resweratrolu i jego analogów w chorobach nowotworowych. *Pol Merk Lek XXVIII*:496-500, 2011
74. Shakibaei M, Harikumar KB, Aggarwal BB: Resveratrol addiction: to die or not to die. *Mol Nutr Food Res* 53:115-128, 2009
75. Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM: Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin Biochem* 30:91-113, 1997
76. Carper J: *Żywność twój cudowny lek*. Poznań, VESPER, 2008
77. Kimura Y, Okuda H: Resveratrol isolated from *Polygonum cuspidatum* root prevents tumor growth and metastasis to lung and tumor-induced neovascularization in Lewis lung carcinoma-bearing mice. *J Nutr* 131:1844-1849, 2001



78. Kopp P: Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'? *Eur J Endocrinol* 138:619-620, 1998
79. Lorigeril M., Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N: Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 99:779-785, 1999
80. Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Djordjevic BS, Dontas AS, Fidanza F, Keys MH, .: The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *Am J Epidemiol* 124:903-915, 1986
81. Ungvari Z, Orosz Z, Rivera A, Labinsky N, Xiangmin Z, Olson S, Podlutzky A, Csiszar A: Resveratrol increases vascular oxidative stress resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:H2417-H2424, 2007
82. Piver B, Fer M, Vitrac X, Merillon JM, Dreano Y, Berthou F, Lucas D: Involvement of cytochrome P450 1A2 in the biotransformation of trans-resveratrol in human liver microsomes. *Biochem Pharmacol* 68:773-782, 2004
83. Kerry NL, Abbey M: Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation *in vitro*. *Atherosclerosis* 135:93-102, 1997
84. Rocha KK, Souza GA, Ebaid GX, Seiva FR, Cataneo AC, Novelli EL: Resveratrol toxicity: effects on risk factors for atherosclerosis and hepatic oxidative stress in standard and high-fat diets. *Food Chem Toxicol* 47:1362-1367, 2009
85. Shen MY, Hsiao G, Liu CL, Fong TH, Lin KH, Chou DS, Sheu JR: Inhibitory mechanisms of resveratrol in platelet activation: pivotal roles of p38 MAPK and NO/cyclic GMP. *Br J Haematol* 139:475-485, 2007
86. Zbikowska HM, Olas B, Wachowicz B, Krajewski T: Response of blood platelets to resveratrol. *Platelets* 10:247-252, 1999
87. Olas B, Wachowicz B: Resveratrol, a phenolic antioxidant with effects on blood platelet functions. *Platelets* 16:251-260, 2005
88. Wallerath T, Deckert G, Ternes T, Anderson H, Li H, Witte K, Forstermann U: Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 106:1652-1658, 2002
89. Schini-Kerth VB, Auger C, Kim JH, Etienne-Selloum N, Chataigneau T: Nutritional improvement of the endothelial control of vascular tone by polyphenols: role of NO and EDHF. *Pflugers Arch* 459:853-862, 2010
90. Leonard SS, Xia C, Jiang BH, Stinefelt B, Klandorf H, Harris GK, Shi X: Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochem Biophys Res Commun* 309:1017-1026, 2003

91. Spanier G, Xu H, Xia N, Tobias S, Deng S, Wojnowski L, Forstermann U, Li H: Resveratrol reduces endothelial oxidative stress by modulating the gene expression of superoxide dismutase 1 (SOD1), glutathione peroxidase 1 (GPx1) and NADPH oxidase subunit (Nox4). *J Physiol Pharmacol* 60 Suppl 4:111-116, 2009
92. Brito PM, Mariano A, Almeida LM, Dinis TC: Resveratrol affords protection against peroxynitrite-mediated endothelial cell death: A role for intracellular glutathione. *Chem Biol Interact* 164:157-166, 2006
93. Tadolini B, Juliano C, Piu L, Franconi F, Cabrini L: Resveratrol inhibition of lipid peroxidation. *Free Radic Res* 33:105-114, 2000
94. Bertelli A, Falchi M, Lo SR, Morelli R: EPR evaluation of the antiradical activity of wines containing high concentrations of resveratrol. *Drugs Exp Clin Res* 30:111-115, 2004
95. Stojanovic S, Sprinz H, Brede O: Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. *Arch Biochem Biophys* 391:79-89, 2001
96. Ng TB, Liu F, Wang ZT: Antioxidative activity of natural products from plants. *Life Sci* 66:709-723, 2000
97. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM: Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275:218-220, 1997
98. Hsieh TC, Wong C, Bennett DJ, Wu JM: Regulation of p53 and cell proliferation by resveratrol and its derivatives in breast cancer cells: An in silico and biochemical approach targeting integrin alphavbeta3. *Int J Cancer*, 2011
99. Vanamala J, Reddivari L, Radhakrishnan S, Tarver C: Resveratrol suppresses IGF-1 induced human colon cancer cell proliferation and elevates apoptosis via suppression of IGF-1R/Wnt and activation of p53 signaling pathways. *BMC Cancer* 10:238, 2010
100. Cui J, Sun R, Yu Y, Gou S, Zhao G, Wang C: Antiproliferative effect of resveratrol in pancreatic cancer cells. *Phytother Res* 24:1637-1644, 2010
101. Holian O, Wahid S, Atten MJ, Attar BM: Inhibition of gastric cancer cell proliferation by resveratrol: role of nitric oxide. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282:G809-G816, 2002
102. Hsieh TC, Huang YC, Wu JM: Control of prostate cell growth, DNA damage and repair and gene expression by resveratrol analogues, in vitro. *Carcinogenesis* 32:93-101, 2011
103. Kubota T, Uemura Y, Kobayashi M, Taguchi H: Combined effects of resveratrol and paclitaxel on lung cancer cells. *Anticancer Res* 23:4039-4046, 2003

104. Liao PC, Ng LT, Lin LT, Richardson CD, Wang GH, Lin CC: Resveratrol arrests cell cycle and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma Huh-7 cells. *J Med Food* 13:1415-1423, 2010
105. Fontecave M: Ribonucleotide reductases and radical reactions. *Cell Mol Life Sci* 54:684-695, 1998
106. Truong M, Cook MR, Pinchot SN, Kunnimalaiyaan M, Chen H: Resveratrol Induces Notch2-Mediated Apoptosis and Suppression of Neuroendocrine Markers in Medullary Thyroid Cancer. *Ann Surg Oncol*, 2010
107. Chow SE, Wang JS, Chuang SF, Chang YL, Chu WK, Chen WS, Chen YW: Resveratrol-induced p53-independent apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma cells is correlated with the downregulation of DeltaNp63. *Cancer Gene Ther* 17:872-882, 2010
108. Huang TT, Lin HC, Chen CC, Lu CC, Wei CF, Wu TS, Liu FG, Lai HC: Resveratrol induces apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma cells via activation of multiple apoptotic pathways. *J Cell Physiol* 226:720-728, 2011
109. Sun W, Wang W, Kim J, Keng P, Yang S, Zhang H, Liu C, Okunieff P, Zhang L: Anti-cancer effect of resveratrol is associated with induction of apoptosis via a mitochondrial pathway alignment. *Adv Exp Med Biol* 614:179-186, 2008
110. Fulda S, Debatin KM: Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol. *Oncogene* 23:6702-6711, 2004
111. Rezk YA, Balulad SS, Keller RS, Bennett JA: Use of resveratrol to improve the effectiveness of cisplatin and doxorubicin: study in human gynecologic cancer cell lines and in rodent heart. *Am J Obstet Gynecol* 194:e23-e26, 2006
112. Baatout S, Derradji H, Jacquet P, Ooms D, Michaux A, Mergeay M: Enhanced radiation-induced apoptosis of cancer cell lines after treatment with resveratrol. *Int J Mol Med* 13:895-902, 2004
113. Igura K, Ohta T, Kuroda Y, Kaji K: Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis *in vitro*. *Cancer Lett* 171:11-16, 2001
114. Cao Z, Fang J, Xia C, Shi X, Jiang BH: trans-3,4,5'-Trihydroxystibene inhibits hypoxia-inducible factor 1alpha and vascular endothelial growth factor expression in human ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res* 10:5253-5263, 2004
115. Trapp V, Parmakhtiar B, Papazian V, Willmott L, Fruehauf JP: Anti-angiogenic effects of resveratrol mediated by decreased VEGF and increased TSP1 expression in melanoma-endothelial cell co-culture. *Angiogenesis* 13:305-315, 2010
116. Berge G, Ovrebo S, Botnen IV, Hewer A, Phillips DH, Haugen A, Mollerup S: Resveratrol inhibits benzo[a]pyrene-DNA adduct formation in human bronchial epithelial cells. *Br J Cancer* 91:333-338, 2004

117. Crescente M, Jessen G, Momi S, Holtje HD, Gresele P, Cerletti C, de GG: Interactions of gallic acid, resveratrol, quercetin and aspirin at the platelet cyclooxygenase-1 level. Functional and modelling studies. *Thromb Haemost* 102:336-346, 2009
118. Donnelly LE, Newton R, Kennedy GE, Fenwick PS, Leung RH, Ito K, Russell RE, Barnes PJ: Anti-inflammatory effects of resveratrol in lung epithelial cells: molecular mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287:L774-L783, 2004
119. Kumar A, Sharma SS: NF-kappaB inhibitory action of resveratrol: a probable mechanism of neuroprotection in experimental diabetic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 394:360-365, 2010
120. Kowalski J, Samojedny A, Paul M, Pietsz G, Wilczok T: Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the expression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha genes in J774.2 macrophages. *Pharmacol Rep* 57:390-394, 2005
121. Hassan-Khabbar S, Vamy M, Cottart CH, Wendum D, Vibert F, Savouret JF, Therond P, Clot JP, Waligora AJ, Nivet-Antoine V: Protective effect of post-ischemic treatment with trans-resveratrol on cytokine production and neutrophil recruitment by rat liver. *Biochimie* 92:405-410, 2010
122. Zhong M, Cheng GF, Wang WJ, Guo Y, Zhu XY, Zhang JT: Inhibitory effect of resveratrol on interleukin 6 release by stimulated peritoneal macrophages of mice. *Phytomedicine* 6:79-84, 1999
123. Cullen JP, Morrow D, Jin Y, Curley B, Robinson A, Sitzmann JV, Cahill PA, Redmond EM: Resveratrol, a polyphenolic phytoestrogen, inhibits endothelial monocyte chemoattractant protein-1 synthesis and secretion. *J Vasc Res* 44:75-84, 2007
124. Ferrero ME, Bertelli AE, Fulgenzi A, Pellegatta F, Corsi MM, Bonfrate M, Ferrara F, De CR, Giovannini L, Bertelli A: Activity in vitro of resveratrol on granulocyte and monocyte adhesion to endothelium. *Am J Clin Nutr* 68:1208-1214, 1998
125. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA: Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425:191-196, 2003
126. Zarse K, Schmeisser S, Birringer M, Falk E, Schmoll D, Ristow M: Differential effects of resveratrol and SRT1720 on lifespan of adult *Caenorhabditis elegans*. *Horm Metab Res* 42:837-839, 2010
127. Wood JG, Rogina B, Lavu S, Howitz K, Helfand SL, Tatar M, Sinclair D: Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* 430:686-689, 2004
128. Valenzano DR, Terzibasi E, Genade T, Cattaneo A, Domenici L, Cellierino A: Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Curr Biol* 16:296-300, 2006

129. Marques FZ, Markus MA, Morris BJ: Resveratrol: cellular actions of a potent natural chemical that confers a diversity of health benefits. *Int J Biochem Cell Biol* 41:2125-2128, 2009
130. Kucińska M, Piotrowska H, Murias M: [Sirtuins--modulation of their activity as a novel therapeutic target]. *Pol Merkur Lekarski* 28:231-235, 2010
131. Baur JA, Pearson KJ, Price NL *et al.*: Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444:337-342, 2006
132. Baur JA, Sinclair DA: Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 5:493-506, 2006
133. Holian O, Walter RJ: Resveratrol inhibits the proliferation of normal human keratinocytes in vitro. *J Cell Biochem Suppl* 36:55-62, 2001
134. Hsieh TC, Juan G, Darzynkiewicz Z, Wu JM: Resveratrol increases nitric oxide synthase, induces accumulation of p53 and p21(WAF1/CIP1), and suppresses cultured bovine pulmonary artery endothelial cell proliferation by perturbing progression through S and G2. *Cancer Res* 59:2596-2601, 1999
135. Dai Z, Li Y, Quarles LD, Song T, Pan W, Zhou H, Xiao Z: Resveratrol enhances proliferation and osteoblastic differentiation in human mesenchymal stem cells via ER-dependent ERK1/2 activation. *Phytomedicine* 14:806-814, 2007
136. Xia L, Wang XX, Hu XS, Guo XG, Shang YP, Chen HJ, Zeng CL, Zhang FR, Chen JZ: Resveratrol reduces endothelial progenitor cells senescence through augmentation of telomerase activity by Akt-dependent mechanisms. *Br J Pharmacol* 155:387-394, 2008
137. Stefani M, Markus MA, Lin RC, Pinese M, Dawes IW, Morris BJ: The effect of resveratrol on a cell model of human aging. *Ann N Y Acad Sci* 1114:407-418, 2007
138. Szekeres T, Fritzer-Szekeres M, Saiko P, Jager W: Resveratrol and resveratrol analogues--structure-activity relationship. *Pharm Res* 27:1042-1048, 2010
139. Murias M, Jager W, Handler N, Erker T, Horvath Z, Szekeres T, Nohl H, Gille L: Antioxidant, prooxidant and cytotoxic activity of hydroxylated resveratrol analogues: structure-activity relationship. *Biochem Pharmacol* 69:903-912, 2005
140. Cai YJ, Wei QY, Fang JG, Yang L, Liu ZL, Wyche JH, Han Z: The 3,4-dihydroxyl groups are important for trans-resveratrol analogs to exhibit enhanced antioxidant and apoptotic activities. *Anticancer Res* 24:999-1002, 2004
141. She QB, Ma WY, Wang M, Kaji A, Ho CT, Dong Z: Inhibition of cell transformation by resveratrol and its derivatives: differential effects and mechanisms involved. *Oncogene* 22:2143-2150, 2003
142. Grzybowski A, Bręborowicz A: [Peritoneum as a dialysis membrane. I. Physiology]. *Przegl Lek* 53:565-573, 1996

143. Czyżewska K, Grzelak T, Szary B: [Peritoneum as a specific membrane]. *Przegl Lek* 64:489-494, 2007
144. Czyżewska K.: Budowa i funkcja mezotelium ssaków. *Post Biol Kom* 17:335-351, 1990
145. Mutsaers SE: Mesothelial cells: their structure, function and role in serosal repair. *Respirology* 7:171-191, 2002
146. Mutsaers SE: The mesothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol* 36:9-16, 2004
147. Hills BA, Burke JR, Thomas K: Surfactant barrier lining peritoneal mesothelium: lubricant and release agent. *Perit Dial Int* 18:157-165, 1998
148. Ivarsson ML, Holmdahl L, Falk P, Molne J, Risberg B: Characterization and fibrinolytic properties of mesothelial cells isolated from peritoneal lavage. *Scand J Clin Lab Invest* 58:195-203, 1998
149. Sitter T, Toet K, Quax P, Kooistra T: Fibrinolytic activity of human mesothelial cells is counteracted by rapid uptake of tissue-type plasminogen activator. *Kidney Int* 55:120-129, 1999
150. van Hinsbergh VW, Kooistra T, Scheffer MA, Hajo van BJ, van Muijen GN: Characterization and fibrinolytic properties of human omental tissue mesothelial cells. Comparison with endothelial cells. *Blood* 75:1490-1497, 1990
151. Inagi R, Miyata T, Yamamoto T, Suzuki D, Urakami K, Saito A, van Ypersele de SC, Kurokawa K: Glucose degradation product methylglyoxal enhances the production of vascular endothelial growth factor in peritoneal cells: role in the functional and morphological alterations of peritoneal membranes in peritoneal dialysis. *FEBS Lett* 463:260-264, 1999
152. Aalto M, Kulonen E, Penttinen R, Renvall S: Collagen synthesis in cultured mesothelial cells. Response to silica. *Acta Chir Scand* 147:1-6, 1981
153. Yung S, Coles GA, Williams JD, Davies M: The source and possible significance of hyaluronan in the peritoneal cavity. *Kidney Int* 46:527-533, 1994
154. Rougier JP, Moullier P, Piedagnel R, Ronco PM: Hyperosmolality suppresses but TGF- $\beta$ 1 increases MMP9 in human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int* 51:337-347, 1997
155. Ma C, Tarnuzzer RW, Chegini N: Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases in mesothelial cells and their regulation by transforming growth factor- $\beta$ 1. *Wound Repair Regen* 7:477-485, 1999
156. Martin J, Yung S, Robson RL, Steadman R, Davies M: Production and regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors by human peritoneal mesothelial cells. *Perit Dial Int* 20:524-533, 2000

157. Lanfrancone L, Boraschi D, Ghiara P, Falini B, Grignani F, Peri G, Mantovani A, Pelicci P: Human peritoneal mesothelial cells produce many cytokines (granulocyte colony-stimulating factor [CSF], granulocyte- monocyte-CSF, macrophage-CSF, interleukin-1 [IL-1], and IL-6) and are activated and stimulated to grow by IL-1. *Blood* 80:2835-2842, 1992
158. Topley N, Brown Z, Jörres A, Westwick J, Davies M, Coles GA, Williams JD: Human peritoneal mesothelial cells synthesize interleukin-8. Synergistic induction by interleukin-1b and tumor necrosis factor-a. *Am J Pathol* 142:1876-1886, 1993
159. Visser CE, Tekstra J, Brouwer-Steenbergen JJ, Tuk CW, Boorsma DM, Sampat-Sardjoepersad SC, Meijer S, Krediet RT, Beelen RH: Chemokines produced by mesothelial cells: huGRO-alpha, IP-10, MCP-1 and RANTES. *Clin Exp Immunol* 112:270-275, 1998
160. Klein CL, Bittinger F, Skarke CC, Wagner M, Kohler H, Walgenbach S, Kirkpatrick CJ: Effects of cytokines on the expression of cell adhesion molecules by cultured human omental mesothelial cells. *Pathobiology* 63:204-212, 1995
161. Lai KN, Lam MF, Leung JC: Peritoneal function: the role of aquaporins. *Perit Dial Int* 23 Suppl 2:S20-S25, 2003
162. Chung-Welch N, Patton WF, Shepro D, Cambria RP: Two-stage isolation procedure for obtaining homogenous populations of microvascular endothelial and mesothelial cells from human omentum. *Microvasc Res* 54:121-134, 1997
163. Pronk A, Leguit P, Hoyneck van Papendrecht AA, Hagelen E, van Vroonhoven TJ, Verbrugh HA: A cobblestone cell isolated from the human omentum: the mesothelial cell; isolation, identification, and growth characteristics. *In Vitro Cell Dev Biol* 29A:127-134, 1993
164. Yung S, Li FK, Chan TM: Peritoneal mesothelial cell culture and biology. *Perit Dial Int* 26:162-173, 2006
165. Mutsaers SE, Whitaker D, Papadimitriou JM: Stimulation of mesothelial cell proliferation by exudate macrophages enhances serosal wound healing in a murine model. *Am J Pathol* 160:681-692, 2002
166. Książek K, Piwocka K, Brzezińska A, Sikora E, Zabel M, Bręborowicz A, Jorres A, Witowski J: Early loss of proliferative potential of human peritoneal mesothelial cells in culture: the role of p16INK4a-mediated premature senescence. *J Appl Physiol* 100:988-995, 2006
167. Campisi J: The biology of replicative senescence. *Eur J Cancer* 33:703-709, 1997
168. Książek K., Bręborowicz A, Jorres A, Witowski J: Oxidative stress contributes to accelerated development of the senescent phenotype in human peritoneal mesothelial cells exposed to high glucose. *Free Radic Biol Med* 42:636-641, 2007

169. Książek K., Winckiewicz M, Staniszewski R, Breborowicz A, Witowski J: Correlation between the donor age and the proliferative lifespan of human peritoneal mesothelial cells in vitro: is TGF-beta1 a link? *Exp Gerontol* 42:840-843, 2007
170. Van Bronswijk H, Verburgh HA, Bos HJ: Cytotoxic effect of commercial continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) fluids and bacterial exoproducts on human mesothelial cells in vitro. *Perit Dial Int* 9:197-202, 1989
171. Hjelle JT, Golinska BT, Waters DC, Steidley KR, McCarroll DR, Dobbie JW: Isolation and propagation in vitro of peritoneal mesothelial cells. *Perit Dial Int* 9:341-347, 1989
172. Hirano H, Kizaki T, Sashikata T, Maeda T, Yoshii Y, Mori H: Synovial sarcoma arising from the pleura: a case report with ultrastructural and immunohistological studies. *Med Electron Microsc* 35:102-108, 2002
173. Murias M, Handler N, Erker T, Pleban K, Ecker G, Saiko P, Szekeres T, Jager W: Resveratrol analogues as selective cyclooxygenase-2 inhibitors: synthesis and structure-activity relationship. *Bioorg Med Chem* 12:5571-5578, 2004
174. Murias M, Miksits M, Aust S, Spatzenegger M, Thalhammer T, Szekeres T, Jaeger W: Metabolism of resveratrol in breast cancer cell lines: impact of sulfotransferase 1A1 expression on cell growth inhibition. *Cancer Lett* 261:172-182, 2008
175. Książek K., Jorres A, Witowski J: Senescence induces a proangiogenic switch in human peritoneal mesothelial cells. *Rejuvenation Res* 11:681-683, 2008
176. Gawlik T: Metody wykrywania apoptozy. *Diagn Lab* 36:353-361, 2000
177. Cawthon RM: Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* 30:e47, 2002
178. Gary RK, Kindell SM: Quantitative assay of senescence-associated beta-galactosidase activity in mammalian cell extracts. *Anal Biochem* 343:329-334, 2005
179. Kunz-Schughart LA, Habbersett RC, Freyer JP: Impact of proliferative activity and tumorigenic conversion on mitochondrial function of fibroblasts in 2D and 3D culture. *Cell Biol Int* 25:919-930, 2001
180. Cossarizza A, Baccarani-Contri M, Kalashnikova G, Franceschi C: A new method for the cytofluorimetric 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). *Biochem Biophys Res Commun* 197:40-45, 1993
181. Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC, Lawley TJ: HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol* 99:683-690, 1992



182. Bartke A, Brown-Borg HM, Bode AM, Carlson J, Hunter WS, Bronson RT: Does growth hormone prevent or accelerate aging? *Exp Gerontol* 33:675-687, 1998
183. Debonneuil EH, Quillard J, Baulieu EE: Hypoxia and dehydroepiandrosterone in old age: a mouse survival study. *Respir Res* 7:144, 2006
184. Zhong W, Zou G, Gu J, Zhang J: L-arginine attenuates high glucose-accelerated senescence in human umbilical vein endothelial cells. *Diabetes Res Clin Pract* 89:38-45, 2010
185. McFarland GA, Holliday R: Retardation of the senescence of cultured human diploid fibroblasts by carnosine. *Exp Cell Res* 212:167-175, 1994
186. Han YH, Kim HS, Kim JM, Kim SK, Yu DY, Moon EY: Inhibitory role of peroxiredoxin II (Prx II) on cellular senescence. *FEBS Lett* 579:4897-4902, 2005
187. Ovesna Z, Horvathova-Kozics K: Structure-activity relationship of trans-resveratrol and its analogues. *Neoplasma* 52:450-455, 2005
188. Kozuki Y, Miura Y, Yagasaki K: Resveratrol suppresses hepatoma cell invasion independently of its anti-proliferative action. *Cancer Lett* 167:151-156, 2001
189. Bhat KP, Pezzuto JM: Resveratrol exhibits cytostatic and antiestrogenic properties with human endometrial adenocarcinoma (Ishikawa) cells. *Cancer Res* 61:6137-6144, 2001
190. Harikumar KB, Kunnumakkara AB, Sethi G, Diagaradjane P, Anand P, Pandey MK, Gelovani J, Krishnan S, Guha S, Aggarwal BB: Resveratrol, a multitargeted agent, can enhance antitumor activity of gemcitabine *in vitro* and in orthotopic mouse model of human pancreatic cancer. *Int J Cancer* 127:257-268, 2010
191. Kurki P, Vanderlaan M, Dolbeare F, Gray J, Tan EM: Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. *Exp Cell Res* 166:209-219, 1986
192. Wang S, Wang X, Yan J, Xie X, Fan F, Zhou X, Han L, Chen J: Resveratrol inhibits proliferation of cultured rat cardiac fibroblasts: correlated with NO-cGMP signaling pathway. *Eur J Pharmacol* 567:26-35, 2007
193. Schilder YD, Heiss EH, Schachner D, Ziegler J, Reznicek G, Sorescu D, Dirsch VM: NADPH oxidases 1 and 4 mediate cellular senescence induced by resveratrol in human endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 46:1598-1606, 2009
194. Zou J, Huang Y, Chen Q, Wang N, Cao K, Hsieh TC, Wu JM: Suppression of mitogenesis and regulation of cell cycle traverse by resveratrol in cultured smooth muscle cells. *Int J Oncol* 15:647-651, 1999
195. Faragher RG, Burton DG, Majecha P, Fong NS, Davis T, Sheerin A, Ostler EL: Resveratrol, but not dihydroresveratrol, induces premature senescence in primary human fibroblasts. *Age (Dordr)*, 2011

196. Szende B, Tyihak E, Kiraly-Veghely Z: Dose-dependent effect of resveratrol on proliferation and apoptosis in endothelial and tumor cell cultures. *Exp Mol Med* 32:88-92, 2000
197. Murias M, Luczak MW, Niepsuj A, Krajka-Kuzniak V, Zielinska-Przyjemska M, Jagodzinski PP, Jager W, Szekeres T, Jodynis-Liebert J: Cytotoxic activity of 3,3',4,4',5,5'-hexahydroxystilbene against breast cancer cells is mediated by induction of p53 and downregulation of mitochondrial superoxide dismutase. *Toxicol In Vitro* 22:1361-1370, 2008
198. Severino J, Allen RG, Balin S, Balin A, Cristofalo VJ: Is beta-galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo? *Exp Cell Res* 257:162-171, 2000
199. Kao CL, Chen LK, Chang YL, Yung MC, Hsu CC, Chen YC, Lo WL, Chen SJ, Ku HH, Hwang SJ: Resveratrol protects human endothelium from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress and senescence via SirT1 activation. *J Atheroscler Thromb* 17:970-979, 2010
200. Zhang JH, Xu M: DNA fragmentation in apoptosis. *Cell Res* 10:205-211, 2000
201. Saiko P, Horvath Z, Murias M, Handler N, Jaeger W, Erker T, Fritzer-Szekeres M, Szekeres T: Antitumor effects of 3,3',4,4',5,5'-hexahydroxystilbene in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 25:1013-1017, 2006
202. Nakagawa H, Kiyozuka Y, Uemura Y, Senzaki H, Shikata N, Hioki K, Tsubura A: Resveratrol inhibits human breast cancer cell growth and may mitigate the effect of linoleic acid, a potent breast cancer cell stimulator. *J Cancer Res Clin Oncol* 127:258-264, 2001
203. Kim YA, Choi BT, Lee YT, Park DI, Rhee SH, Park KY, Choi YH: Resveratrol inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human breast carcinoma MCF-7 cells. *Oncol Rep* 11:441-446, 2004
204. Książek K., Mikula-Pietrasik J, Olijslagers S, Jorres A, von Zglinicki T, Witowski J: Vulnerability to oxidative stress and different patterns of senescence in human peritoneal mesothelial cell strains. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296:R374-R382, 2009
205. Passos JF, von Zglinicki T, Saretzki G: Mitochondrial dysfunction and cell senescence: cause or consequence? *Rejuvenation Res* 9:64-68, 2006
206. Pinteá A, Rugina D, Pop R, Bunea A, Socaciu C, Diehl HA: Antioxidant Effect of Trans-Resveratrol in Cultured Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2011
207. Liu R, Buettner GR, Oberley LW: Oxygen free radicals mediate the induction of manganese superoxide dismutase gene expression by TNF- $\alpha$ . *Free Radic Biol Med* 28:1197-1205, 2000

208. Ungvari Z, Labinsky N, Mukhopadhyay P, Pinto JT, Bagi Z, Ballabh P, Zhang C, Pacher P, Csiszar A: Resveratrol attenuates mitochondrial oxidative stress in coronary arterial endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297:H1876-H1881, 2009
209. Robb EL, Page MM, Wiens BE, Stuart JA: Molecular mechanisms of oxidative stress resistance induced by resveratrol: Specific and progressive induction of MnSOD. *Biochem Biophys Res Commun* 367:406-412, 2008
210. Zheng Y, Liu Y, Ge J, Wang X, Liu L, Bu Z, Liu P: Resveratrol protects human lens epithelial cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress by increasing catalase, SOD-1, and HO-1 expression. *Mol Vis* 16:1467-1474, 2010
211. Calabrese EJ, Mattson MP, Calabrese V: Resveratrol commonly displays hormesis: occurrence and biomedical significance. *Hum Exp Toxicol* 29:980-1015, 2010
212. Furst A: Hormetic effects in pharmacology: pharmacological inversions as prototypes for hormesis. *Health Phys* 52:527-530, 1987
213. Ristow M, Zarse K: How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). *Exp Gerontol* 45:410-418, 2010
214. Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Vina J: Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Ann N Y Acad Sci* 1067:425-435, 2006
215. Masoro EJ: Role of hormesis in life extension by caloric restriction. *Dose Response* 5:163-173, 2007
216. Quincozes-Santos A, Andreazza AC, Nardin P, Funchal C, Goncalves CA, Gottfried C: Resveratrol attenuates oxidative-induced DNA damage in C6 Glioma cells. *Neurotoxicology* 28:886-891, 2007
217. Wong YT, Gruber J, Jenner AM, Ng MP, Ruan R, Tay FE: Elevation of oxidative-damage biomarkers during aging in F2 hybrid mice: protection by chronic oral intake of resveratrol. *Free Radic Biol Med* 46:799-809, 2009
218. Mizutani K, Ikeda K, Kawai Y, Yamori Y: Protective effect of resveratrol on oxidative damage in male and female stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28:55-59, 2001
219. Ovesna Z, Kozics K, Bader Y, Saiko P, Handler N, Erker T, Szekeres T: Antioxidant activity of resveratrol, piceatannol and 3,3',4,4',5,5'-hexahydroxy-trans-stilbene in three leukemia cell lines. *Oncol Rep* 16:617-624, 2006
220. Ruweler M, Gulden M, Maser E, Murias M, Seibert H: Cytotoxic, cytoprotective and antioxidant activities of resveratrol and analogues in C6 astrogloma cells *in vitro*. *Chem Biol Interact* 182:128-135, 2009

221. Duchen MR: Roles of mitochondria in health and disease. *Diabetes* 53 Suppl 1:S96-102, 2004
222. Tan L, Yu JT, Guan HS: Resveratrol exerts pharmacological preconditioning by activating PGC-1alpha. *Med Hypotheses* 71:664-667, 2008
223. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J: Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 127:1109-1122, 2006
224. Csiszar A, Labinskyy N, Pinto JT, Ballabh P, Zhang H, Losonczy G, Pearson K, de CR, Pacher P, Zhang C, Ungvari Z: Resveratrol induces mitochondrial biogenesis in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297:H13-H20, 2009
225. van Ginkel PR, Darjatmoko SR, Sareen D, Subramanian L, Bhattacharya S, Lindstrom MJ, Albert DM, Polans AS: Resveratrol inhibits uveal melanoma tumor growth via early mitochondrial dysfunction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:1299-1306, 2008
226. Sareen D, van Ginkel PR, Takach JC, Mohiuddin A, Darjatmoko SR, Albert DM, Polans AS: Mitochondria as the primary target of resveratrol-induced apoptosis in human retinoblastoma cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:3708-3716, 2006
227. Folkman J, Shing Y: Angiogenesis. *J Biol Chem* 267:10931-10934, 1992
228. Risau W: Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386:671-674, 1997
229. Nunez MJ, Novio S, Balboa J, Seoane J, Suarez JA, Freire-Garabal M: Effects of resveratrol on expression of vascular endothelial growth factor in human gingival fibroblasts stimulated by periodontal pathogens. *Acta Odontol Scand* 68:239-247, 2010
230. Dugas B, Charbonnier S, Baarine M, Ragot K, Delmas D, Menetrier F, Lherminier J, Malvitte L, Khalfaoui T, Bron A, Creuzot-Garcher C, Latruffe N, Lizard G: Effects of oxysterols on cell viability, inflammatory cytokines, VEGF, and reactive oxygen species production on human retinal cells: cytoprotective effects and prevention of VEGF secretion by resveratrol. *Eur J Nutr* 49:435-446, 2010
231. Garvin S, Ollinger K, Dabrosin C: Resveratrol induces apoptosis and inhibits angiogenesis in human breast cancer xenografts in vivo. *Cancer Lett* 231:113-122, 2006
232. Fukuda S, Kaga S, Zhan L, Bagchi D, Das DK, Bertelli A, Maulik N: Resveratrol ameliorates myocardial damage by inducing vascular endothelial growth factor-angiogenesis and tyrosine kinase receptor Flk-1. *Cell Biochem Biophys* 44:43-49, 2006

233. Losso JN, Truax RE, Richard G: trans-resveratrol inhibits hyperglycemia-induced inflammation and connexin downregulation in retinal pigment epithelial cells. *J Agric Food Chem* 58:8246-8252, 2010
234. Shen F, Chen SJ, Dong XJ, Zhong H, Li YT, Cheng GF: Suppression of IL-8 gene transcription by resveratrol in phorbol ester treated human monocytic cells. *J Asian Nat Prod Res* 5:151-157, 2003
235. Lin MT, Yen ML, Lin CY, Kuo ML: Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by resveratrol through interruption of Src-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation. *Mol Pharmacol* 64:1029-1036, 2003
236. Gan L, Matsuura H, Ichiki T, Yin X, Miyazaki R, Hashimoto T, Cui J, Takeda K, Sunagawa K: Improvement of neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells from diabetic mice by ex vivo pretreatment with resveratrol. *Hypertens Res* 32:542-547, 2009
237. Wang XB, Huang J, Zou JG, Su EB, Shan QJ, Yang ZJ, Cao KJ: Effects of resveratrol on number and activity of endothelial progenitor cells from human peripheral blood. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34:1109-1115, 2007