

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών υγείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Διπλωματική Εργασία

***"Ο ρόλος του miR-155-5p στη γήρανση των μεσεγχυματικών
κυττάρων προερχόμενα από τη γέλη Warton (WJ-MSCs)"***

***"The role of miR-155-5p in the onset of senescence of
Warton's Jelly Mesenchymal Stem Cells (WJ-MSCs)"***

Κυριακάκη Σταυρούλα

Του Νικολάου

Τριμελής Επιτροπή

Παπαθανασίου Ιωάννα (επιβλέπουσα): Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Βιολογίας,
Τμήμα Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Γιακουντής Αντώνιος (συνεπιβλέπων): Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας
και Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Τραχανά Βαρβάρα (τρίτο μέλος): Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας,
Τμήμα Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ τη μαμά και τον μπαμπά μου, την Αναστασία, τον Βασίλη και τον Σωτήρη για την αγάπη τους,

Τους φίλους μου που έκαναν τα χρόνια των σπουδών μου τόσο αξέχαστα και τόσο δύσκολα να τα αφήσω πίσω,

Τη γιαγιά μου που έκανε τα πάντα για να διαβάζω ανενόχλητη,

Την κ. Παπαθανασίου και την Ζωζώ για την αμέριστη καθοδήγηση και βοήθεια.

Περίληψη

Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα που προέρχονται από τη γέλη Wharton αποτελούν ενήλικα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα τα οποία παρουσιάζουν δείκτες χαρακτηριστικούς τόσο για το συγκεκριμένο είδος βλαστικών κυττάρων αλλά και παράγοντες οι οποίοι εντοπίζονται στα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα, δηλαδή παρουσιάζουν όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ομοιότητα με τα τελευταία, χωρίς όμως η χρήση τους να χρίζει ηθικών περιορισμών, καθώς απομονώνονται από τον συνδετικό ιστό του ομφάλιου λώρου μέσω μίας μη επεμβατικής διαδικασίας. Το γεγονός ότι αποτελούν μία ιδανική εναλλακτική των εμβρυικών βλαστοκυττάρων καθιστά τα WJ-MSCs ως χρυσό εργαλείο της αναγεννητικής ιατρικής από τους ερευνητές.

Βέβαια, η χρήση τους απαιτεί τον πολλαπλασιασμό τους σε μεγάλους αριθμούς μέσω της ανάπτυξης τους σε κυτταρικές καλλιέργειες. Στο σημείο αυτό παρουσιάζεται ένα μέχρι στιγμής αξεπέραστο εμπόδιο στην ερευνητική εφαρμογή της χρήσης τους, καθώς κατά την παρατεταμένη καλλιέργεια των συγκεκριμένων κυττάρων, αυτά υποβάλλονται στη διαδικασία της γήρανσης. Η κυτταρική γήρανση ορίζεται ως η μη αναστρέψιμη παύση του κυτταρικού κύκλου με αποτέλεσμα τα κύτταρα να χάνουν την ικανότητα του πολλαπλασιασμού, της αυτοανανέωσης και της πιθανής διαφοροποίησης τους δηλαδή του βλαστοκυτταρικού τους χαρακτήρα. Προκειμένου να επιλυθεί το ζήτημα της επαγωγής της κυτταρικής γήρανσης, με στόχο την παρατεταμένη ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των κυττάρων για την μακροχρόνια χρήση τους σε διάφορους πειραματικούς χειρισμούς στα πλαίσια της γονιδιακής θεραπείας και της αναγεννητικής ιατρικής, η μελέτη των μηχανισμών της κυτταρικής γήρανσης έχει αποτελέσει θέμα ανερχόμενου ενδιαφέροντος τα τελευταία χρόνια.

Το miR-155-5p αποτελεί ένα micro-RNA του οποίου η ρυθμιστική δράση του ή η αναστολή αυτής, έχει συσχετιστεί με πληθώρα παθογενών καταστάσεων (πολλαπλούς τύπους καρκίνου, αυτοάνοσα νοσήματα, καρδιαγγειακές παθήσεις) αλλά και κυτταρικές διαδικασίες, όπως η απόπτωση, ο πολλαπλασιασμός, η επαγωγή της φλεγμονής, η αντιμετώπιση του οξειδωτικού stress, το σύνολο των οποίων συνδέεται με το φαινόμενο της κυτταρικής γήρανσης.

Στόχος της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας αποτέλεσε η μελέτη του ρόλου του miR-155-5p στον γηρασμένο φαινότυπο των WJ-MSCs. Αρχικά πραγματοποιήθηκε σύνθεση cDNA(stemloop) για το miR-155-5p, και στην συνέχεια ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR), για τον προσδιορισμό της έκφρασης του συγκεκριμένου miRNA σε νεαρά και γηρασμένα WJ-MSCs. Έπειτα μέσω της χρήσης των εργαλείων βιοπληροφορικής ανάλυσης miRTarBase και TargetScan βρέθηκαν τα γονιδια-στόχοι του συγκεκριμένου microRNA, για τα οποία έπειτα πραγματοποιήθηκε ανάλυση οντολογίας(geneontology) και ανάλυση KEGG μονοπατιών, με στόχο τον προσδιορισμό των βιολογικών διεργασιών και της μοριακής λειτουργίας των πρωτεϊνών-στόχων και της συμμετοχής τους σε κυτταρικά μονοπάτια. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επίδραση μετασχηματισμού με λιποφεκταμίνη σε γηρασμένα WJ-MSCs με mimici miRNA για το miR-155-5p. Ακολούθησε απομόνωση ολικού RNA, σύνθεση cDNA και RT-qPCR για το γονίδιο γονιδια-στόχο FOXO3 και δοκιμασία δραστηριότητας SA-β-gal.

Τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραματικών διαδικασιών έδειξαν την στατιστικώς σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης του miR-155-5p στην ομάδα των γηρασμένων μεσεγχυματικών κυττάρων σε σχέση με αυτής των νεαρών. Στη

συνέχεια όσον αφορά την μοριακή λειτουργία και την συμμετοχή των γονιδίων-στόχων του miR-155-5p σε κυτταρικά μονοπάτια, η πλειοψηφία των μορίων δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες, ρυθμίζοντας την δράση της RNAπολυμεράσης II ενώ συμμετέχουν στη ρύθμιση μονοπατιών σηματοδότησης που συνδέονται με τις λειτουργίες, της πολυδυναμικότητας των βλαστικών κυττάρων, της διαφοροποίησης των οστεοκλαστών και της κυτταρικής γήρανσης. Τα αποτελέσματα της RT-qPCR για το γονίδιο-στόχο FOXO3 έδειξαν την στατιστικώς σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης του συγκεκριμένου παράγοντα κατά τον μετασχηματισμό των κυττάρων με mimicmiR-155-5p σε σχέση με τη συνθήκη του μάρτυρα. Τέλος κατά την πραγματοποίηση της δοκιμασίας δραστηριότητας της β-γαλακτοσιδάσης παρατηρήθηκε μείωση των γηρασμένων κυττάρων, έπειτα από την αύξηση της έκφρασης του miR-155-5p.

Μέσω της μελέτης αυτής, και του εντοπισμού πιθανών μονοπατιών στα οποία ασκεί ρυθμιστική δράση το miR-155-5p, είναι δυνατή η εύρεση μορίων-στόχων τα οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την αποτροπή της εγκαθίδρυσης της γήρανσης στα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα της γέλης Wharton κατά την ανάπτυξη τους σε κυτταρική καλλιέργεια. Αυτό θα είχε ως αποτέλεσμα την βελτίωση των πειραματικών συνθηκών των μελετών της χρήσης των WJMSCs στο πεδίο της αναγεννητικής Ιατρικής διευρύνοντας έτσι τις δυνατότητες των παρόντων θεραπειών.

Abstract

Wharton's Jelly mesenchymal stem cells (WJ-MSCs) are adult multipotent stem cells that exhibit markers characteristic of this specific type of stem cell, as well as factors found in embryonic stem cells. This means they share a high degree of similarity with embryonic stem cells, but their use does not face ethical restrictions as they are isolated from the umbilical cord connective tissue through a non-invasive procedure. This makes them an ideal alternative to embryonic stem cells, thus researchers consider WJ-MSCs as the gold standard in the field of regenerative medicine. However, as MSCs are expanded *in vitro* they eventually experience a functional decline, characteristic of the onset of cellular senescence, which represents one of the major hurdles in their application in cell-based therapies. So the study of cellular senescence mechanisms has become a topic of increasing interest in recent years.

MiR-155-5p is a microRNA that has been linked to numerous pathological conditions (various types of cancer, autoimmune diseases, cardiovascular diseases), as well as cellular processes, such as apoptosis, proliferation, inflammation induction, oxidative stress management, all of which are connected to the phenomenon of cellular senescence.

The goal of this thesis is to study the role of miR-155-5p in the process of cellular senescence. We initially synthesized stem loop cDNA for miR-155-5p, followed by quantitative PCR (RT-qPCR), to evaluate the expression levels of miR-155-5p in early passage and late passage WJ-MSCs from three donors. Subsequently, using the bioinformatics tools miRTarBase and TargetScan, we found the target genes of miR-155-5p. These genes were then subjected to ontology analysis (enrichment analysis) and KEGG pathway analysis to determine the biological processes and molecular functions of the target proteins and their involvement in cellular pathways. Next, we performed lipofectamine-mediated transfection of late passage WJ-MSCs with a mimic miRNA for miR-155-5p followed by isolation of total RNA, cDNA synthesis and RT-qPCR for the target gene FOXO3 and lastly the performance of the SA- β -gal activity assay.

The results of the aforementioned experimental procedures initially indicated a statistically significant decrease in the expression levels of miR-155-5p in the late passage WJ-MSCs compared to early MSCs. Enrichment analysis demonstrated that the majority of miR-155-5p target genes act as transcription factors regulating the activity of RNA polymerase II and participate in the regulation of signaling pathways associated with the functions of stem cell pluripotency, osteoclast differentiation, and cellular senescence. Transfection of late passage WJ-MSCs with mimic miR-155-5p led to a statistically significant reduction of FOXO3 expression levels. Finally, the SA- β -gal activity assay presented a reduction in the number of senescent cells in late passage MSCs after increasing miR-155-5p expression.

Our results provide new evidence regarding the role of miR-155-5p in the establishment of senescence in Wharton's Jelly mesenchymal stem cells during *in vitro* culturing improving our knowledge for using WJ-MSCs in the field of regenerative medicine.

Περιεχόμενα

Εισαγωγή

1. Βλαστοκύτταρα

- 1.1. Είδη Βλαστοκυττάρων
- 1.2. Μεσεγχυματικά Βλαστοκύτταρα
- 1.3. Μεσεγχυματικά Βλαστοκύτταρα της γέλης Wharton (WJ)

2. Κυτταρική γήρανση (cellular senescence)

- 2.1. Μορφολογικά & Μεταβολικά χαρακτηριστικά των γηρασμένων κυττάρων
- 2.2. Δείκτες κυτταρικής γήρανσης
- 2.3. Εκκριτικός φαινότυπος (SASP)
- 2.4. Μονοπάτια κυτταρικής γήρανσης
- 2.5. Είδη κυτταρικής γήρανσης
 - 2.5.1. Κυτταρική γήρανση επαγόμενη από τη βλάβη του γενετικού υλικού
 - 2.5.2. Κυτταρική γήρανση επαγόμενη από την ενεργοποίηση ογκογονιδίων
 - 2.5.3. Κυτταρική γήρανση επαγόμενη από τη δυσλειτουργία μιτοχονδρίων
 - 2.5.4. Κυτταρική γήρανση επαγόμενη από τη μείωση του μήκους των τελομερών των χρωμοσωμάτων

3. Micro-RNAs

- 3.1. Μονοπάτι έκφρασης των Micro-RNAs
- 3.2. Ρόλος των Micro-RNAs στην κυτταρική γήρανση
 - 3.2.1. Ρύθμιση του μονοπατιού p53/p21 από microRNAs
 - 3.2.2. Ρύθμιση του μονοπατιού p16/Rb από microRNAs
 - 3.2.3. MicroRNAs που στοχεύουν συστατικά του SASP

4.miR-155-5p

- 4.1.Γονίδιο του miR-155-5p
- 4.2.Συμμετοχή του miR-155-5p σε φυσιολογικές λειτουργίες του κυττάρου
- 4.3.Συμμετοχή του miR-155-5p σε παθολογικές καταστάσεις
- 4.4.Στόχος εργασίας

5.Υλικά & Μέθοδοι

- 5.1.Κυτταρικός τύπος
- 5.2.Απόψυξη(Thawing) Μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων WJ
- 5.3. Δημιουργία κυτταροκαλλιιεργειών μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων WJ
- 5.4.Συνθήκες καλλιέργειας
- 5.5.Ανακαλλιέργεια(Splitting)
- 5.6.Σύνθεση stem loop cDNA για το miR-155-5p
- 5.7.Απομόνωση RNA
- 5.8.ΣύνθεσηcDNAγια το γονίδιο FOXO3
- 5.9.Real Time PCR για το miR-155-5p
- 5.10.Real Time PCR για το γονίδιο FOXO3
- 5.11. Πραγματοποίηση επίδρασης με miRmimic για το miR-155-5p

5.12.Δοκιμασία προσδιορισμού δραστηρότητας της SA-β-gal

5.13.Στατιστική Ανάλυση

5.14.Ανάλυση αποτελεσμάτων RealTimePCR

6.Αποτελέσματα

6.1.Αποτελέσματα της δοκιμασίας δραστηρότητας της SA-β-gal

6.2.Έκφραση του miR-155-5p σε νεαρά & γηρασμένα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα WJ

6.3.Προσδιορισμός των γονιδίων-στόχων του miR-155-5p με εργαλεία βιοπληροφορικής

6.4.Ανάλυση γονιδιακής οντολογίας(Go enrichment analysis) και σηματοδοτικών μονοπατιών των γονιδίων-στόχων του miR-155-5p

6.5.Έκφραση μεταγραφικών επιπέδων του γονιδίου FOXO3 μετά από τη χορήγηση mimicmiR-155-5p σε κυτταροκαλλιέργειες γηρασμένων WJMSCs

7.Συζήτηση

8.Βιβλιογραφία

Εισαγωγή

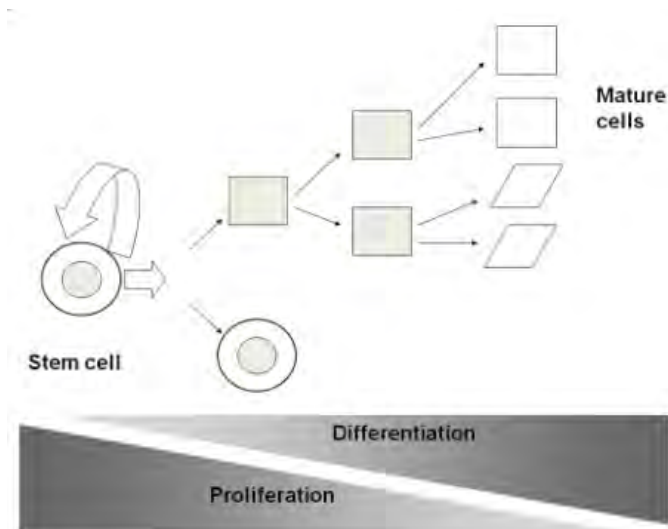
1. Βλαστοκύτταρα (Stem Cells)

Τα βλαστοκύτταρα είναι μη διαφοροποιημένα κύτταρα τα οποία εντοπίζονται στον οργανισμό τόσο κατά την εμβρυική ανάπτυξη αλλά και στην ενήλικη ζωή. Κατά κανόνα,διέπονται από τρία κύρια χαρακτηριστικά: την αυτό-ανανέωση, την

κλωνικότητα και την πολυδυναμικότητα. Τα βλαστοκύτταρα διακατέχουν τα χαρακτηριστικά αυτά σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό ανάλογα με την προέλευση τους, ενώ αναλόγως το στάδιο της ανάπτυξης υπηρετούν διαφορετικούς σκοπούς (Zakrzewski et al., 2019). Πιο συγκεκριμένα, κατά την εμβρυική ανάπτυξη συμβάλλουν στη δημιουργία ιστών και οργάνων, ενώ κατά την ενήλικη ζωή συμμετέχουν στην επιδιόρθωση των ιστών σε περίπτωση κάποιου τραύματος (Kolios et al., 2013).

1.1. Είδη βλαστοκυττάρων

Τα βλαστοκύτταρα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν είτε με βάση το εύρος της διαφοροποιητικής τους ικανότητας είτε με βάση την προέλευση τους (Kolios et al., 2013; Zakrzewski et al., 2019). Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως καθώς τα κύτταρα διαφοροποιούνται πέρα από το στάδιο της βλαστοκύστης, ο βαθμός της διαφοροποίησης τους αυξάνεται ενώ η ικανότητά τους για πολλαπλασιασμό μειώνεται (Hayes et al., 2012). Τα μεγέθη αυτά αποτελούν αντιστρόφως ανάλογα (βλέπε Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Η διαφοροποίηση των κυττάρων και η ικανότητά τους για πολλαπλασιασμό αποτελούν αντιστρόφως ανάλογα μεγέθη (Hayes et al., 2012).

Διαφορετικές κατηγορίες βλαστοκυττάρων με βάση την δυνατότητα διαφοροποίησης:

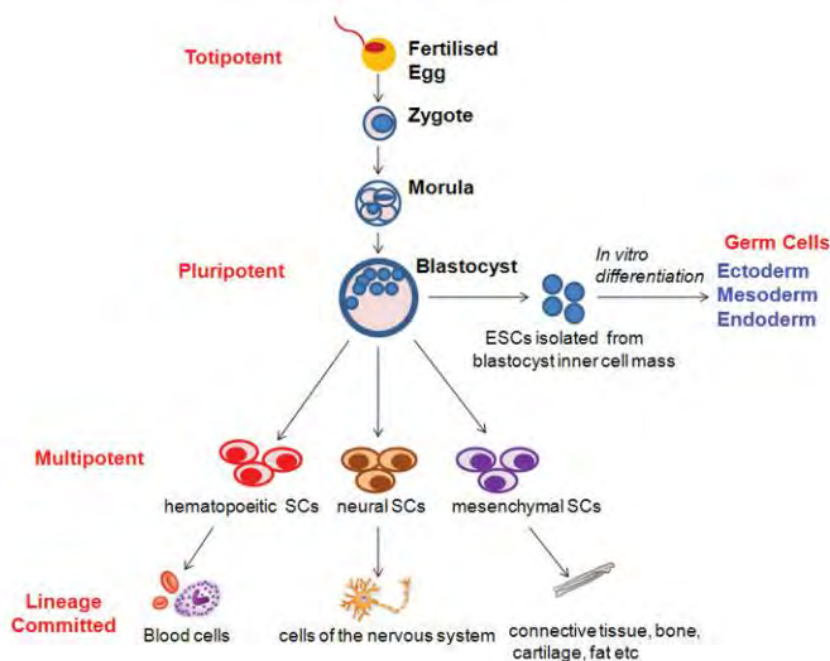
1. Totipotent: Βλαστοκύτταρα τα οποία προκύπτουν κατά τις δύο πρώτες διαιρέσεις του ζυγωτού. Εμφανίζουν την μεγαλύτερη ικανότητα διαφοροποίησης, αφού από αυτά προκύπτουν τόσο οι εμβρυικές όσο και οι εξω-εμβρυικές δομές (π.χ. ο πλακούντας) (Rossant, 2001).

2. Pluripotent: Βλαστοκύτταρα από τα οποία μπορούν να προκύψουν δομές του εξωδέρματος, του ενδοδέρματος και του μεσοδέρματος, δηλαδή όλα τα όργανα του εμβρύου. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα και τα iPCs (Zakrzewski et al., 2019).

3.Multipotent: Βλαστοκύτταρα από τα οποία προκύπτουν δομές μόνο μίας εκ των τριών βλαστικών στιβάδων, είτε του μεσοδέρματος, είτε του ενδοδέρματος είτε του εξωδέρματος. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της κατηγορίας βλαστοκυττάρων είναι τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα. Αυτά εντοπίζονται στο λιπώδη ιστό, στον μυελό των οστών, στα οστά, στο συνδετικό ιστό Wharton's Jelly του ομφάλιου λώρου, στο αίμα του ομφάλιου λώρου και στο περιφερειακό αίμα. Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα διαφοροποιούνται σε κυτταρικούς τύπους των ιστών του μεσοδέρματος, όπως των μυών, των χόνδρων, των οστών και του λιπώδους ιστού (DeMigueletal.,2010;Koliosetal.,2013).

4.Oligopotent: Βλαστοκύτταρα τα οποία διαφοροποιούνται σε δύο κυτταρικές γενεαλογίες στον ίδιο ιστό (Majoetal.,2008).

5.Unipotent: Βλαστοκύτταρα τα οποία διαφοροποιούνται σε ένα κυτταρικό τύπο μίας συγκεκριμένης γενεαλογίας. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι τα μυϊκά βλαστοκύτταρα (Bentzingeretal.,2013; Zakrzewski etal.,2019).



Εικόνα 2: Γενεολογία βλαστικών κυττάρων από τη στιγμή της γονιμοποίησης έως την δημιουργία ολοκληρωτικά διαφοροποιημένων κυττάρων (Hayesetal.,2012)

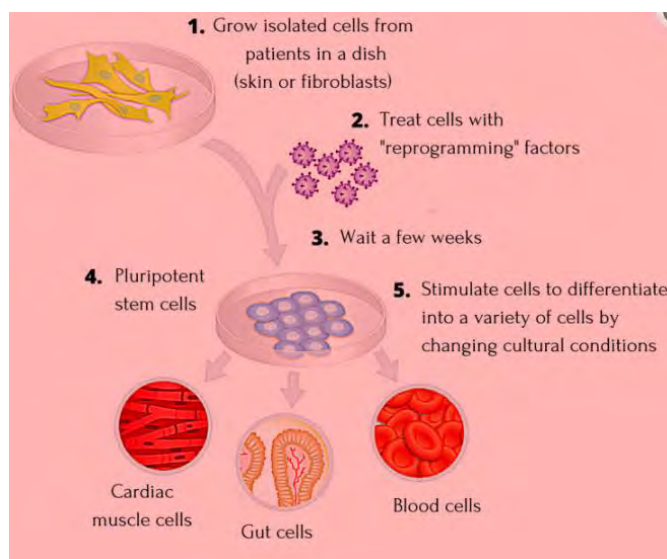
Τα βλαστοκύτταρα διαχωρίζονται σε τρεις κατηγορίες με βάση την προέλευση τους:

1.Εμβρυικά βλαστοκύτταρα: Ανήκουν στην κατηγορία των pluripotent stem cells, δηλαδή με τον πολλαπλασιασμό τους και τη διαφοροποίησή τους προκύπτουν δομές και των τριών βλαστικών στιβάδων (Koliosetal.,2013). Προκύπτουν έπειτα από τη διαίρεση του ζυγωτού 5-6 μέρες μετά τη στιγμή της γονιμοποίησης, ενώ τελικά απομονώνονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης

(Evans&Kaufman,1981). Χαρακτηριστικό γνώρισμα της συγκεκριμένης κατηγορίας βλαστικών κυττάρων αποτελεί η έκφραση μεταγραφικών παραγόντων όπως οι Nanog και Oct4, οι οποίοι συμβάλλουν στην διατήρηση του δυναμικού διαφοροποίησης των κυττάρων και της ικανότητας της αυτό-ανανέωσης (Bongso,2006;Hambilikietal.,2012;Wangetal.,2012;Liangetal.,2008).

2.Ενήλικα βλαστοκύτταρα: Τα βλαστοκύτταρα τα οποία απομονώνονται από τους ιστούς ενήλικου ατόμου. Συμβάλλουν στην αντιφλεγμονώδη απόκριση και στην επανόρθωση ιστών έπειτα από τραυματισμό (Koliosetal.,2013). Τα κύτταρα αυτά εμφανίζουν περιορισμένη δυνατότητα διαφοροποίησης σε σχέση με τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα, εκ της οποίας προκύπτουν δομές μόνο μίας βλαστικής στιβάδας(μεσοδέρματος, εξωδέρματος & ενδοδέρματος), αν και *in vitro* έχουν παραχθεί από ενήλικα βλαστοκύτταρα, κυτταρικοί τύποι και των τριών βλαστικών στιβάδων (Moodleyetal.,2010 ; Plancheranetal.,2009). Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως τα ενήλικα βλαστοκύτταρα παρουσιάζουν ένα σημαντικό πλεονέκτημα στο πεδίο της κυτταρικής θεραπείας, καθώς αν χρησιμοποιηθούν στον ίδιο τον δότη δεν τίθεται θέμα απόρριψης του μοσχεύματος (McCormick&Huso,2010;Kørbling&Estrov,2003).

3.iPSCs:Τα Induced pluripotent stem cells δηλαδή τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα, προκύπτουν από τον επαναπρογραμματισμό πλήρως διαφοροποιημένων σωματικών κυττάρων (Koliosetal.,2012). Αυτό συμβαίνει μέσω της έκφρασης τεσσάρων μεταγραφικών παραγόντων που σχετίζονται με την ιδιότητα της πολυδυναμικότητας, τους octamer binding transcription factor 3/4 (Oct3/4), sex determining regionY—box 2 (SRY-Sox2), Krüppel-likefactor 4 (Klf4), και cellular-Myelocytomatosis (c-Myc) (Takahashietal.,2007). Τα iPSCs σε αντίθεση με τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα δεν προκαλούν ανοσολογική απόκριση ενώ παρουσιάζουν παρόμοια ικανότητα διαφοροποίησης. Επίσης η χρήση τους δεν περιορίζεται από ηθικούς περιορισμούς, επομένως θεωρούνται ως μια ιδανική εναλλακτική των εμβρυικών βλαστοκυττάρων στον τομέα της αναγεννητικής ιατρικής (Aboul-Soudetal.,2021).



Εικόνα3:Μεθοδολογία δημιουργίας επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων iPSCs(Aboul-Soudetal.,2021)

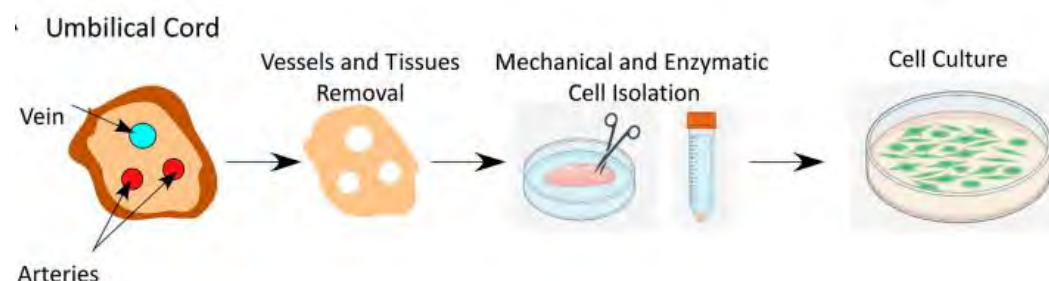
1.2. Μεσεγχυματικά Βλαστοκύτταρα

Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα κατατάσσονται στην κατηγορία των multipotent (πολυδύναμων) βλαστοκυττάρων (Koliosetal.,2012). Μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα μεσοδερμικής γενεαλογίας, όπως λιποκύτταρα, οστεοκύτταρα και χονδροκύτταρα αλλά και σε κύτταρα εξωδερμικής γενεαλογίας, όπως τα νευρικά και τα νευρογλοιακά (Liuetal.,2022). Οι κυριότερες πηγές μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων είναι ο μυελός των οστών, ο λιπώδης ιστός, ο μυϊκός ιστός, ο ομφάλιος λώρος, ο πλακούντας, το αίμα, ο εμβρυϊκός ιστός και τέλος το αμνιακό υγρό (Brownetal.2019).

1.3. Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα προερχόμενα από τη γέλη Wharton(Wharton Jelly)

Το σημείο από το οποίο απομονώνονται τα συγκεκριμένα βλαστοκύτταρα ονομάζεται Wharton's Jelly. Αποτελεί τον συνδετικό ιστό στο εσωτερικό του ομφάλιου λώρου, ο ρόλος του οποίου είναι να προστατεύει τα αγγεία που εμπεριέχονται στον ομφάλιο λώρο, μία φλέβα και δύο αρτηρίες. Στην ουσία προστατεύει τα αγγεία από τη συμπίεση, τη στρέψη προκειμένου να διατηρηθεί η ροή του αίματος από την μητέρα στο έμβρυο (Drobiova etal.,2023).

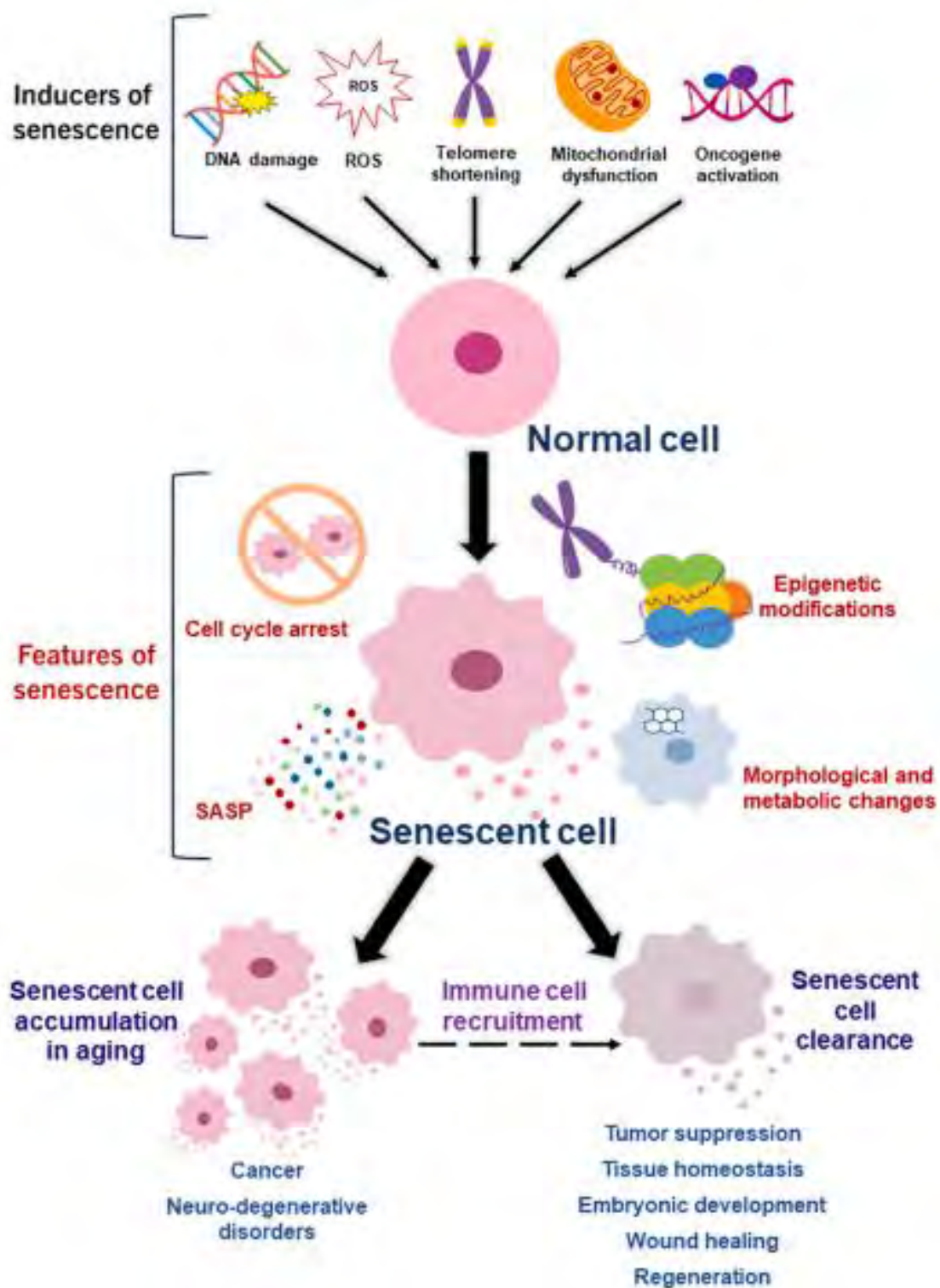
Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα της γέλης Wharton(WJ-MSCs) αρχικά απομονώθηκαν από ανθρώπινο ομφάλιο λώρο ως κύτταρα που έφεραν σημαντική ομοιότητα με ινοβλάστες (Mcelreavey etal.,1991), όμως στη συνέχεια διαπιστώθηκε ότι φέρουν στην επιφάνεια τους δείκτες χαρακτηριστικούς για τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα, τους CD105, CD73, και CD90 (Ghaneialvaretal.,2018 ;Carvalhoetal.,2011). Έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε λιποκύτταρα, οστεοκύτταρα και χονδροκύτταρα, ενώ εκφράζουν και κάποιους μεταγραφικούς παράγοντες χαρακτηριστικούς για τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα, τους OCT4, NANOG, SOX2, και MYC. Επομένως τα WJ-MSCs παρουσιάζουν κοινά χαρακτηριστικά με τα ενήλικα βλαστοκύτταρα αλλά και με τα εμβρυϊκά (Maetal.,2023).



Εικόνα 4: Απομόνωση μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων από τον συνδετικό ιστό Wharton's Jelly του ομφάλιου λώρου(Drobiovaetal.,2023).

2. Κυτταρική γήρανση(Cellular Senescence)

Η κυτταρική γήρανση αποτελεί τη μη αναστρέψιμη παύση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων ως απόκριση στην κυτταρική βλάβη και στο stress. Μπορεί να ενεργοποιηθεί μέσω πληθώρας εσωτερικών και εξωτερικών σημάτων, όπως το οξειδωτικό stress, τη βλάβη του γενετικού υλικού εξαιτίας αυτού, τη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, την ενεργοποίηση ογκογονιδίων, την ακτινοβολία αλλά και από χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (Princillyetal.,2023). Η κυτταρική γήρανση αποτελεί έναν απαραίτητο μηχανισμό για τον περιορισμό της ογκογένεσης και την αντιμετώπιση βλαβών των ιστών. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα γηρασμένα κύτταρα απομακρύνονται από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού, όμως καθώς γερνάει ο οργανισμός, παρατηρείται συσσώρευση των γηρασμένων κυττάρων. Αυτό συμβαίνει είτε εξαιτίας αυξημένης μετατροπής κυττάρων σε μία κατάσταση γήρατος, ή στη μειωμένη ικανότητα του ανοσοποιητικού να απομακρύνει τα γηρασμένα κύτταρα, είτε εξαιτίας του συνδυασμού των δύο αυτών γεγονότων. Όταν τα γηρασμένα κύτταρα δεν απομακρύνονται από τους ιστούς, ενδέχεται να προκαλέσουν παθογένεια, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με το φυσιολογικό τους ρόλο στην ογκοκαταστολή και στην επούλωση πληγών (Burtonetal.,2014).Η κυτταρική γήρανση συσχετίζεται με διάφορες μοριακές και φαινοτυπικές μεταβολές όπως αλλαγές στη μορφολογία των κυττάρων,τη τροποποίηση του βαθμού συσπείρωσης της χρωματίνης, την παύση του κυτταρικού κύκλου, την αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου της β-γαλακτοζιδάσης, τον μηχανισμό απόκρισης στη βλάβη του γενετικού υλικού (DNA damage response, DDR) και τέλος τον εκκριτικό φαινότυπο SASP(senescence-associated secretory phenotype) (Princillyetal.,2023).



Εικόνα 5:(Από πάνω προς τα κάτω)Οι επαγωγείς της κυτταρικής γήρανσης,τα κυτταρικά χαρακτηριστικά τηςκαι η μοίρα των γηρασμένων κυττάρων (Princillyetal.,2023).

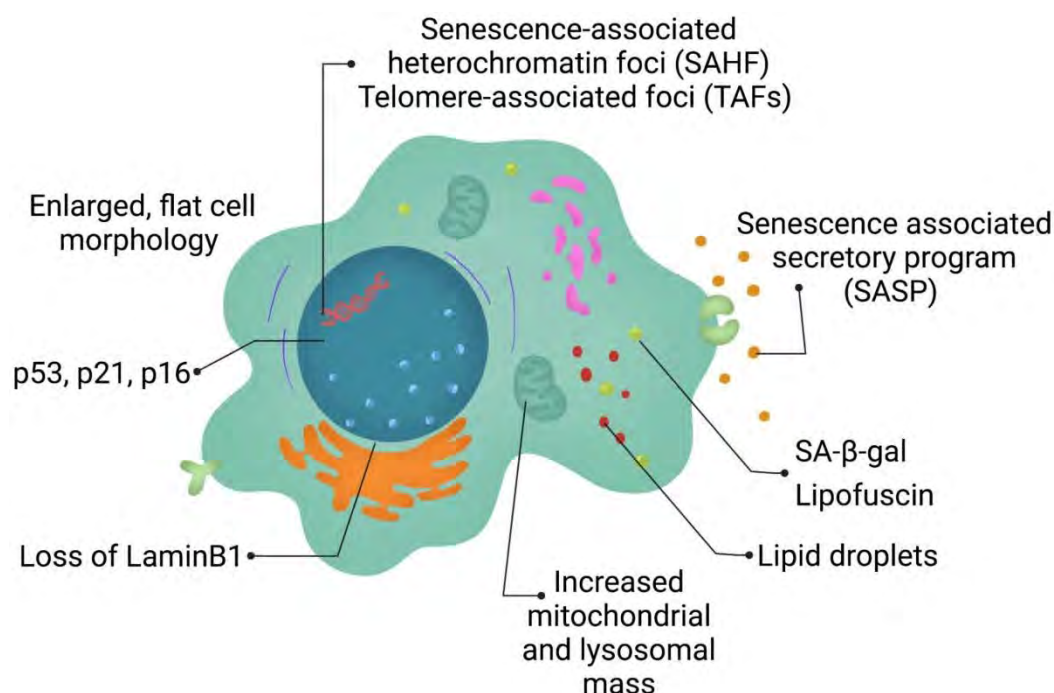
2.1. Μορφολογικά και μεταβολικά χαρακτηριστικά γηρασμένων κυττάρων

Τα κύτταρα που υποβάλλονται στη διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης παρουσιάζουν συγκεκριμένα μορφολογικά αλλά και μεταβολικά χαρακτηριστικά, τα οποία είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση τους. Αρχικά τα γηρασμένα κύτταρα «υιοθετούν» πεπλατυσμένη μορφολογία και ατρακτοειδές σχήμα (Campisi, 1997; Goldstein, 1990), ενώ έχει παρατηρηθεί πως καθώς αυξάνεται ο όγκος τους, μεταβάλλεται η αναλογία της επιφάνειας του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος, με αποτέλεσμα την αύξηση τη επιφάνειας του τελευταίου (Hamsanathan&Gurkar,2022;Freund et al., 2012; Mehta et al., 2007; Zhang et al., 2007). Η απώλεια της ισορροπίας της αναλογίας κυτταροπλάσματος-πυρήνα έχει αποδειχτεί πως συσχετίζεται με την επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης (Neurohretal., 2019). Ένα δεύτερο χαρακτηριστικό των γηρασμένων κυττάρων αποτελεί η αυξημένη συσσώρευση κυστιδίων που φέρουν χρωστικές ενώσεις, τα οποία αποτελούν τη λιποφουσκίνη, στο κυτταρόπλασμα αυτών (Evangelouetal., 2017), αλλά και αυξημένη δραστηριότητα του λυσοσωμικού ενζύμου, της β-γαλακτοζιδάσης, που χρησιμοποιείται και ως δείκτης ανίχνευσης των γηρασμένων κυττάρων (Dimrietal., 1995; Halletal., 2017). Βέβαια, έχει αποδειχτεί πως η αυξημένη παραγωγή και δράση του συγκεκριμένου ενζύμου είναι πιθανό να προκληθεί από παράγοντες ανεξάρτητους από την γήρανση, όπως είναι η αυξημένη πυκνότητα των κυττάρων σε καλλιέργεια ή η ελλιπής παροχή ορρού. Τέλος στα κύτταρα που έχουν υποστεί κυτταρική γήρανση παρατηρείται μη αντιστρέψιμη παύση του κυτταρικού κύκλου και αναστολή της αντιγραφής του γενετικού υλικού (Hamsanathan&Gurkar,2022).

Κατά την επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης επίσης παρατηρούνται χαρακτηριστικές μεταβολές της συμπίκνωσης της χρωματίνης, με αποτέλεσμα την ενίσχυση της ή άλλοτε τη σίγηση της έκφρασης διάφορων παραγόντων. Κατά τη διαδικασία αυτή παρατηρείται η αυξημένη συμπίκνωση της ετεροχρωματίνης, με αποτέλεσμα τη δημιουργία των περιοχών SAHF, οι οποίες χρησιμοποιούνται ως δείκτες γήρανσης, και επάγουν την σίγηση γονιδίων με αποτέλεσμα την εγκαθίδρυση της γήρανσης. Επιπρόσθετα παρατηρείται από-συμπύκνωση της ετεροχρωματίνης, με αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών TAFs, οι οποίες αποτελούν δείκτη της κυτταρικής γήρανσης επαγόμενης από τη βλάβη των τελομερών, και γενικότερα του γενετικού υλικού (DiMiccoetal., 2011).

Εκτός από την συμπίκνωση και χαλάρωση ορισμένων περιοχών ετεροχρωματίνης, έχει παρατηρηθεί στα γηρασμένα κύτταρα η θραυσματοποίηση της χρωματίνης. Τα θραύσματα αυτά παρουσιάζουν την ικανότητα απελευθέρωσης στο κυτταρόπλασμα (DiMiccoetal., 2011; Douetal., 2015), όπου επάγουν την ενεργοποίηση του μονοπατιού ενεργοποίησης των γονιδίων των ιντερφερόνων STING,της κυκλικής συνθάσης του GMP-AMP(cGAS),και την ενίσχυση της παραγωγής των συστατικών του εκκριτικού φαινοτύπου των γηρασμένων κυττάρων SASP (Vizioliatal., 2020).Την απελευθέρωση των θραυσμάτων στο κυτταρόπλασμα «επιτρέπει» ο τροποποιημένος

πυρήνας των γηρασμένων κυττάρων λόγω της απώλειας της λαμίνης B1 (DiMicco et al., 2011; Dou et al., 2015, 2017).



Εικόνα 6:Μορφολογικές & Μεταβολικές αλλαγές των γηρασμένων κυττάρων (Hamsanathan&Gurkar,2022).

2.2. Δείκτες κυτταρικής γήρανσης

Για τον εντοπισμό των κυττάρων που έχουν υποστεί κυτταρική γήρανση χρησιμοποιούνται διάφοροι βιοδείκτες. Τέτοιοι παράγοντες, αποτελούν τα υψηλά επίπεδα ελεύθερων οξειδωτικών ριζών καθώς ενεργοποιούν τον μηχανισμό DDR που συμβάλλει στην επαγωγή της κυτταρικής γήρανσης, πρωτεΐνες που συμμετέχουν στα σηματοδοτικά μονοπάτια του μηχανισμού όπως οι p53, p21, γ-H2AX, p16 και οι περιοχές SAHF (senescence-associated heterochromatin foci) (Narita et al., 2003; Zhang et al., 2005). Τα γηρασμένα κύτταρα μπορούν επίσης να ταυτοποιηθούν μέσω του εκκριτικού τους φαινοτύπου SASP στον οποίο εμπεριέχονται κυτοκίνες, χημειοκίνες, μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs) και άλλοι αυξητικοί παράγοντες, οι οποίοι επιδρούν στο μικροπεριβάλλον του κυττάρου επηρεάζοντας τα γειτονικά του κύτταρα (Campisi, 2005; Coppe et al., 2006; Kuilman and Peeter, 2009). Ο κύριος δείκτης που χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό των γηρασμένων κυττάρων είναι η β-γαλακτοζιδάση (senescence-associated β-galactosidase, SA-β-gal), καθώς παρατηρείται αυξημένη δραστηριότητα της στα γηρασμένα κύτταρα (Dimri et al., 1995).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως προκειμένου να εντοπιστούν κύτταρα που έχουν υποστεί κυτταρική γήρανση είναι αναγκαία η χρήση μίας ομάδας βιοδεικτών από

τους παραπάνω. Η ανάγκη δηλαδή για την εύρεση ενός παράγοντα που θα ταυτοποιεί με επιτυχία την κυτταρική γήρανση δεν έχει κορεστεί καθώς η χρήση ενός μόνο δείκτη δεν είναι επαρκής προκειμένου να εξαχθεί ένα έγκυρο πόρισμα για την κατάσταση του κυττάρου (Munketal.,2017)

2.3. Εκκριτικός φαινότυπος (SASP)

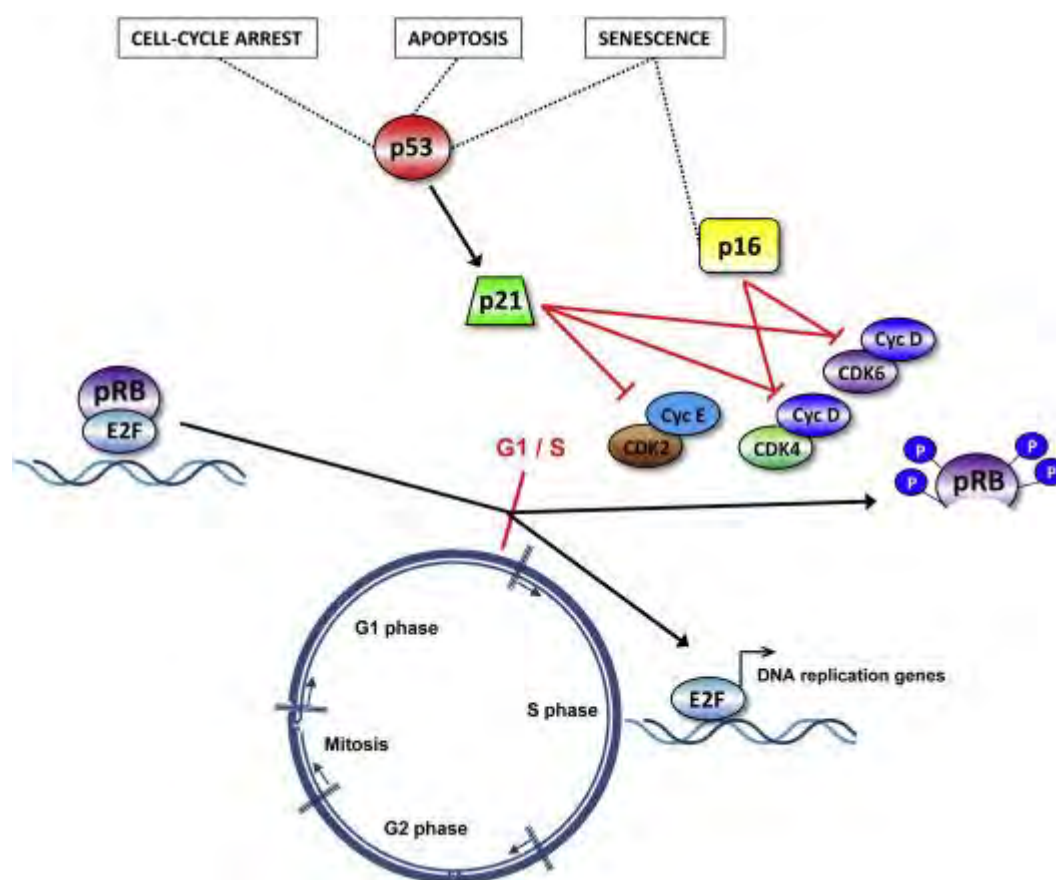
Ως SASP ονομάζεται ο εκκριτικός φαινότυπος των γηρασμένων κυττάρων (Senescence-associated secretory phenotype, SASP). Μέσω της απόκτησης αυτού του φαινοτύπου τα γηρασμένα κύτταρα πλέον δεν παρουσιάζουν μόνο ευεργετική επίδραση στο μικροπεριβάλλον τους, αλλά και επιβλαβή. Όσον αφορά την ευεργετική όψη της κυτταρικής γήρανσης, αυτή δρα ως ένας μηχανισμός που αποτρέπει την πιθανή καρκινογένεση καθώς εγκαθιδρύει την παύση του κυτταρικού κύκλου κυττάρων τα οποία φέρουν μια πληθώρα μεταλλάξεων τις οποίες το κύτταρο έχει αποτύχει να επιδιορθώσει (Campisi&d'AddadiFagagna,2007). Επομένως με αυτόν τον τρόπο, παρεμποδίζεται η κληρονόμηση των μεταλλάξεων αυτών σε νέα κύτταρα. Αντίθετα, μέσω της έκκρισης του SASP δημιουργείται ένα μικροπεριβάλλον ιδανικό για την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων, που αργότερα εξυπηρετεί την μετάσταση των κυττάρων του όγκου (Angelinietal.,2013). Μέσω της έκκρισης μορίων όπως οι ιντερλευκίνες και οι χημειοκίνες δημιουργείται ένα φλεγμονώδες περιβάλλον καθώς ενεργοποιείται η ανοσοαπόκριση του οργανισμού (Wangetal.,2020). Με αυτόν τον τρόπο και μέσω της έκκρισης του Colony formation factor προσελκύονται ακόμη περισσότερα κύτταρα του ανοσοποιητικού, τα οποία είναι γνωστό πως συμβάλλουν στη διαδικασία της μετάστασης καθώς βοηθούν τα καρκινικά κύτταρα να εισχωρήσουν στη κυκλοφορία του αίματος αλλά και να βγουν από αυτή (Metcalf,2013). Μέσω της έκκρισης συγκεκριμένων αυξητικών παραγόντων επίσης επάγεται η ενίσχυση της αγγειογένεσης ένα ακόμα χαρακτηριστικό του μικροπεριβάλλοντος του όγκου (Corré etal.,2006). Τέλος με την έκκριση μεταλλοπρωτεασών τα κύτταρα είναι δυνατόν να μπορέσουν να απελευθερωθούν από την στενή διάταξη του ιστού, καθώς οι MMPs θα κόψουν τα συστατικά της εξωκυτταρικής μήτρας, ένα ακόμη απαραίτητο στοιχείο για την διαδικασία της μετάστασης (Nilandetal.,2022).

Ο εκκριτικός φαινότυπος των γηρασμένων κυττάρων εμπεριέχει πληθώρα διαλυτών αλλά και μη διαλυτών παραγόντων. Μέσω των μορίων αυτών τα γηρασμένα κύτταρα έχουν την ικανότητα να επηρεάσουν τη λειτουργία των γειτονικών τους κυττάρων(μέσω παρακρινούς σηματοδότησης), ενεργοποιώντας υποδοχείς στην επιφάνεια τους (Corréetal.,2010).

2.4. Μονοπάτια κυτταρικής γήρανσης

Ο μηχανισμός απόκρισης στο DNA ενεργοποιείται μέσω ενδογενών και εξωγενών σημάτων, όπως είναι το οξειδωτικό stress, η μείωση του μήκους των τελομερών, η ακτινοβολία, η ενεργοποίηση ογκογονιδίων. Τα ερεθίσματα αυτά έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των 2 κύριων μονοπατιών της κυτταρικής γήρανσης,

τα μονοπάτια p53/p21CIP1/WAF1 και p16INK4A, τα οποία οδηγούν σε παύση του κυτταρικού κύκλου και κυτταρική γήρανση (Wengetal.,2022).



Εικόνα 7: Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου από τα μονοπάτια p53/p21 και p16/rb (Kulaberoglu etal.,2021).

Όπως περιγράφεται στο άρθρο του Engelandetal.(2022), η p21 κωδικοποιείται από το γονίδιο *CDKN1A* και αποτελεί CDK καταστολέας. Η έκφραση της επάγεται ως απόκριση στην βλάβη του DNA από την p53. Η ενεργοποίηση της p21 μειώνει τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του ρετινοβλαστώματος (RB), καθώς απενεργοποιεί την CDK2. Έτσι το RB συνεχίζει να καταστέλλει τη δραστηριότητα του παράγοντα E2F, που αποτελεί κύριος ρυθμιστής της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τον έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού, οδηγώντας στην παύση του κυτταρικού κύκλου. Δηλαδή η φωσφορυλίωση από τη CDK, ρυθμίζει αυστηρά τη δράση του ρετινοβλαστώματος.

Με παρόμοιο τρόπο το μονοπάτι της p16 ρυθμίζει την δραστηριότητα του RB. Το p16 κωδικοποιείται από το γονίδιο *CDKN2A*, και συμβάλλει στην επαγωγή της κυτταρικής ανάπτυξης μέσω καταστολής της CDK4 και της CDK6. Ως αποτέλεσμα το ρετινοβλάστωμα δεν φωσφορυλιώνεται και παραμένει σε μία ενεργή κατάσταση (Takahashietal.,2007).

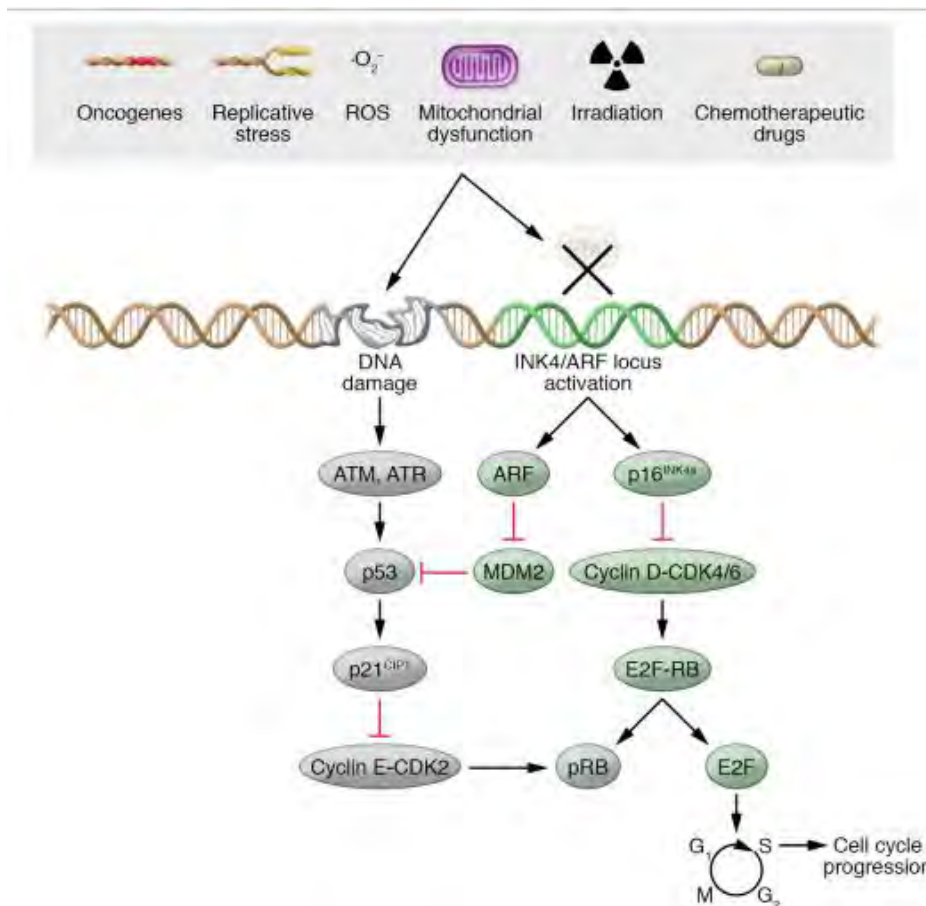
2.5. *Είδη κυτταρικής γήρανσης*

2.5.1. *Κυτταρική γήρανση επαγόμενη από τη βλάβη του γενετικού υλικού*

Η έναρξη της κυτταρικής γήρανσης επάγεται μέσω του μηχανισμού απόκρισης σε βλάβη του DNA (DNA Damage Response pathway,DDR). Μεταλλάξεις στο γενετικό υλικό όπως οι δίκλωνες και οι μονόκλωνες ρήξεις (double και single strand breaks, DSBs και SSBs αντίστοιχα) προκαλούνται εξαιτίας πληθώρας ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών ερεθισμάτων. Οι δίκλωνες ρήξεις προκαλούνται κυρίως μέσω της δραστηριότητας καταστολέων των τοποϊσομερασών και της επίδρασης της ιονίζουσας ακτινοβολίας (deMassyetal.,2013), ενώ οι μονόκλωνες ρήξεις οφείλονται στη δράση ενδογενών οξειδωτικών ριζών που παράγονται στα μιτοχόνδρια κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση και οξειδωτικών ριζών που παράγονται λόγω εξωγενών επαγωγέων (χημικές ουσίες, ακτινοβολία) (Yanetal.,2014).

Η βλάβη του DNA μπορεί να «οδηγήσει» το κύτταρο, σε τρεις πιθανές μοίρες. Αρχικά την ενεργοποίηση του μηχανισμού της επιδιόρθωσης των βλαβών του γενετικού υλικού. Στην περίπτωση που οι βλάβες που έχει υποστεί το DNA είναι ήπιες και μπορούν να αντιμετωπιστούν από τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου, επάγεται μία παροδική παύση του κυτταρικού κύκλου, η οποία αναστρέφεται (Liuetal.,2024).Στη συνέχεια εάν η επιδιόρθωση τους δεν είναι εφικτή το κύτταρο οδηγείται είτε στην απόπτωση (στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο), είτε στη γήρανση, έτσι ώστε να μην κληρονομηθούν οι μεταλλάξεις που φέρει σε νέα κύτταρα (da Silva & Schumacher, 2021;Rodieretal.,2009).

Τα γηρασμένα κύτταρα ως απόκριση στη βλάβη ενεργοποιούν το μονοπάτι DDR, το οποίο περικλείει σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία εντοπίζουν συγκεκριμένους τύπους βλάβης στο DNA (da Silva & Schumacher, 2021). Ο μηχανισμός DDR χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα της 53BP1 (p53 bindingprotein) στην χρωματίνη, αύξηση της επιγενετικής τροποποίησης γ-H2Ax(φωσφορυλιωμένη ιστόνη H2AXστη Ser139), και τέλος την ενεργοποίηση ενός καταρράκτη κινασών. Αρχικά ενεργοποιούνται οι κινάσες σερίνης-θρεονίνης ATM και ATR, ενώ καθοδικά των μονοπατιών, οι CHK1 και CHK2 (checkpoint kinases σερίνης-θρεονίνης). Τα παραπάνω γεγονότα οδηγούν στην ενεργοποίηση του άξονα p53/p21CIP1 (Herranzetal.,2018).



Εικόνα 8: Από την ενεργοποίηση του DDR έως την πάση του κυτταρικού κύκλου μέσω των αξόνων *p53/p21/Rb* και *p16/Rb* (Herranz et al., 2018)

2.5.2. Κυτταρική γήρανση επαγόμενη από την ενεργοποίηση ογκογονιδίων

Ένας ακόμη επαγωγέας της κυτταρικής γήρανσης είναι η υπερέκφραση ογκογονιδίων αλλά και η καταστολή της έκφρασης ή της δράσης ογκοκατασταλτικών παραγόντων. Αυτό το είδος της κυτταρικής γήρανσης ονομάζεται OIS (Oncogene-Induced Senescence) (Chandeck et al., 2010).

Τα ογκογονίδια αποτελούν μεταλλαγμένες μορφές γονιδίων, των πρωτο-ογκογονιδίων, που εντοπίζονται πρωταρχικά στο ανθρώπινο γονιδίωμα και υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν έχουν επιβλαβείς επιδράσεις στο κύτταρο και μακροσκοπικά στον οργανισμό καθώς ρυθμίζουν τις διάφορες κυτταρικές λειτουργίες. Στην περίπτωση που υποστούν μετάλλαξη, εξαιτίας της επακόλουθης υπερέκφρασης τους έχουν την δυνατότητα να οδηγήσουν σε καρκινογένεση.

Από την άλλη, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, κωδικοποιούν πρωτεΐνες που ρυθμίζουν μονοπάτια που συμβάλλουν στην αποτροπή της καρκινογένεσης. Συνεπώς η καταστολή τους σημαίνει την καταστολή των μηχανισμών προστασίας ενάντια στον σχηματισμό καρκίνου (Chandrashekara et al., 2020). Κατά την κυτταρική γήρανση

επαγόμενη από την υπερέκφραση ογκογονιδίων OIS έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα των εξής ογκογονιδίων των RAS, BRAF, AKT, E2F1 και του γονιδίου της κυκλίνη-E, ενώ ογκοκατασταλτικά γονίδια των οποίων η δράση έχει αποδειχτεί πως καταστέλλεται είναι τα PTEN και NF-1 (Mylonasetal.,2022).

2.5.3. Κυτταρική γήρανση επαγόμενη από την δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων

Ένας τρίτος παράγοντας που οδηγεί στην εκκίνηση της διαδικασίας της κυτταρικής γήρανσης αποτελεί η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία (mitochondrial dysfunction-associated senescence, MiDAs), εξαιτίας της επιβλαβούς επίδρασης των ελεύθερων ριζών οξυγόνου(reactive oxygen species,ROS) (Miwaetal., 2022;Princillyetal.,2023). Η παραγωγή των ελεύθερων ριζών οξυγόνου λαμβάνει μέρος στα μιτοχόνδρια μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Στην περίπτωση που οι ελεύθερες ρίζες δεν εξουδετερωθούν επιφέρουν βλάβες στις πρωτεΐνες, στο γενετικό υλικό και στα λιπίδια του κυττάρου καθώς τα οξειδώνουν (Kudryavtseva et al., 2016).Υποστηρίζεται πως τα μιτοχόνδρια επάγουν την κυτταρική γήρανση μέσω της αυξημένης παραγωγής ελευθέρων ριζών, καθώς εξαιτίας των μεταλλάξεων που προκαλούν στο γενετικό υλικό του κυττάρου, ενεργοποιείται ο μηχανισμός μηχανισμός DDR με αποτέλεσμα την επαγωγή της παύσης του κυτταρικού κύκλου (Wei&Ji, 2018).

Η αυξημένη παραγωγή και συσσώρευση των ROS οδηγεί στην διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ αυτών και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του κυττάρου, με αποτέλεσμα το κύτταρο να υπόκειται σε μία κατάσταση οξειδωτικού stress.Το οξειδωτικό stress παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική γήρανση καθώς μεταβάλλει την διαμόρφωση των πρωτεϊνών και την καταλυτική τους ικανότητα, ενώ παράλληλα επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και των πρωτεϊνών με το DNA, μεταβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο τη μεταφορά των πρωτεϊνών, και τροποποιώντας κάποιους σηματοδοτικούς μηχανισμούς προκειμένου να ενεργοποιηθούν οι παράγοντες NF-kB και Smad3 (Junqueira et al., 2004). Η εγκαθίδρυση μίας κατάστασης έντονου και συνεχούς οξειδωτικού stress έχει ως αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και τελικά την συσσώρευση μη λειτουργικών μιτοχονδρίων στο κύτταρο. Οι κύριες ιδιότητες αυτών, είναι η αναστολή της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και η επακόλουθη μείωση του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης (Miwaetal., 2022), ενώ έχει παρατηρηθεί πως παρουσιάζουν μεταβολές στην μάζα και στην μορφολογία τους (Wei&Ji, 2018).Τα μιτοχόνδρια γηρασμένων κυττάρων έχει επίσης παρατηρηθεί πως επάγουν την παραγωγή του εκκριτικού φαινοτύπου SASP, και συγκεκριμένα την έκκριση της ιντερλευκίνης-10(IL-10) και του παράγοντα TNFα, οδηγώντας στην εγκαθίδρυση της κυτταρικής γήρανσης (Wei&Ji, 2018).

Οι ελεύθερες οξειδωτικές ρίζες εκτός από την πρόκληση μεταλλάξεων του γενετικού υλικού, και την οξείδωση των λιπιδίων και των πρωτεϊνών, επίσης έχουν την ικανότητα να δρουν ως δευτερογενής αγγελιαφόροι σε σηματοδοτικά μονοπάτια, συμβάλλοντας έτσι στη θετική ή αρνητική ρύθμιση τους καθώς ενεργοποιούν ή καταστέλλουν την έκφραση πολλών γονιδίων (Galaris et al., 2008). Το H₂O₂ που αποτελεί γνωστό οξειδωτικό που παράγεται στα μιτοχόνδρια ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το γήρας, επάγοντας έτσι τη διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης (Galaris et al., 2008), ενώ συγκεκριμένα έχει αποδειχτεί πως τα ROS ρυθμίζουν τη δραστηριότητα των μονοπατιών του p53 και της πρωτεΐνης RAS (Princillyetal.,2023).

2.5.4. Κυτταρική γήρανση επαγόμενη από τη μείωση του μήκους των τελομερών των χρωμοσωμάτων

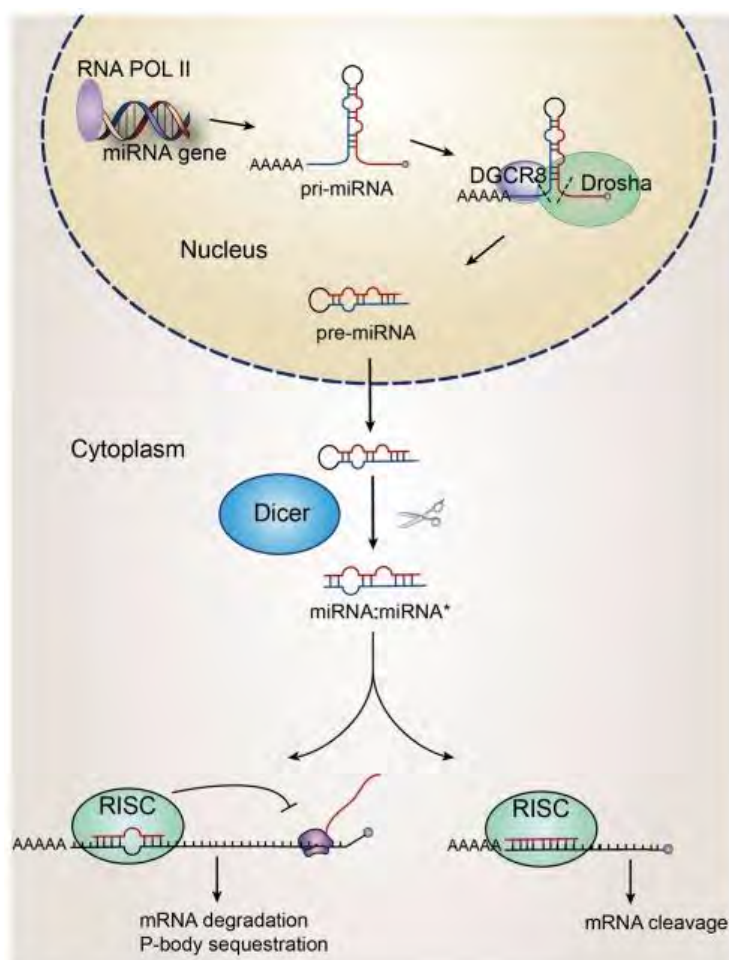
Τα τελομερή αποτελούν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων στα άκρα των χρωμοσωμάτων, αντιστοιχούν σε ετεροχρωματίνη και κατά την γέννηση απαριθμούνται σε 8-12 kb του συνολικού γονιδιώματος. Κάθε φορά που πραγματοποιείται η κυτταρική διαίρεση, χάνονται 50-200 βάσεις των τελομερών (Mylonasetal.,2022). Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της ανικανότητας της DNA πολυμεράσης να συνθέσει DNA χωρίς εκμαγείο (McHugh&Gil, 2018). Η σελτερίνη, αποτελεί ένα μόριο με προστατευτικό ρόλο, καθώς καλύπτει τα άκρα των τελομερών έτσι ώστε να μην αναγνωριστούν ως δίκλωνες ρήξεις και να αποτραπεί η ενεργοποίηση του μηχανισμού DDR (Princilly etal.,2023). Το μήκος των τελομερών μειώνεται με κάθε διαίρεση έως ένα σημείο όπου ενεργοποιείται ο μηχανισμός DDR και παρατηρείται αύξηση των p16INK4A και p21CIP1 έτσι ώστε να προαχθεί η κυτταρική γήρανση. Αυτό το είδος γήρανσης ονομάζεται «Αναδιπλασιαστική γήρανση» (replicative senescence) γιατί οφείλεται στον αριθμό των διαιρέσεων του κυττάρου (Mylonasetal.,2022).

3. Micro-RNAs

3.1. Μονοπάτι έκφρασης των Micro-RNAs

Τα microRNAs ή εναλλακτικά miRNAs αποτελούν μη κωδικοποιητικά μόρια RNA, μικρού μήκους, περίπου 19-24 νουκλεοτιδίων. Επιτυγχάνουν τη ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στόχων τους, μέσω του υβριδισμού τους με τα mRNA μετάγραφα βάσει συμπληρωματικότητας. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα την χαμηλή σταθερότητα των μεταγράφων αλλά και τα μειωμένα επίπεδα μετάφρασης και έκφρασης των γονιδίων στόχων. Όσον αφορά τη διαδικασία της βιογένεσης των microRNAs, στο πρώιμο στάδιο της σύνθεσης τους εμφανίζουν δομή φουρκέτας, η οποία ονομάζεται pri-miRNA. Στην συνέχεια ακολουθεί περαιτέρω επεξεργασία του pri-miRNA εντός του πυρήνα, από το σύμπλοκο

πρωτεϊνών Drosha/DGCR8 έτσι ώστε αυτό να μετατραπεί στο pre-miRNA, το οποίο στη συνέχεια μετατοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Εκεί το πρόδρομο μόριο υπόκειται επεξεργασία από τον παράγοντα DICER1 με αποτέλεσμα την παραγωγή του τελικού ώριμου μορίου miRNA. Τα miRNAs αποτελούν συστατικά του συμπλόκου RISC(RNA-inducible silencing complex), όπου δρουν ως μόρια-οδηγοί για την επίτευξη της στόχευσης μεταγράφων γονιδίων-στόχων (Bartel, 2009; Fabianetal., 2010; Kimetal., 2009; NewmanandHammond, 2010).

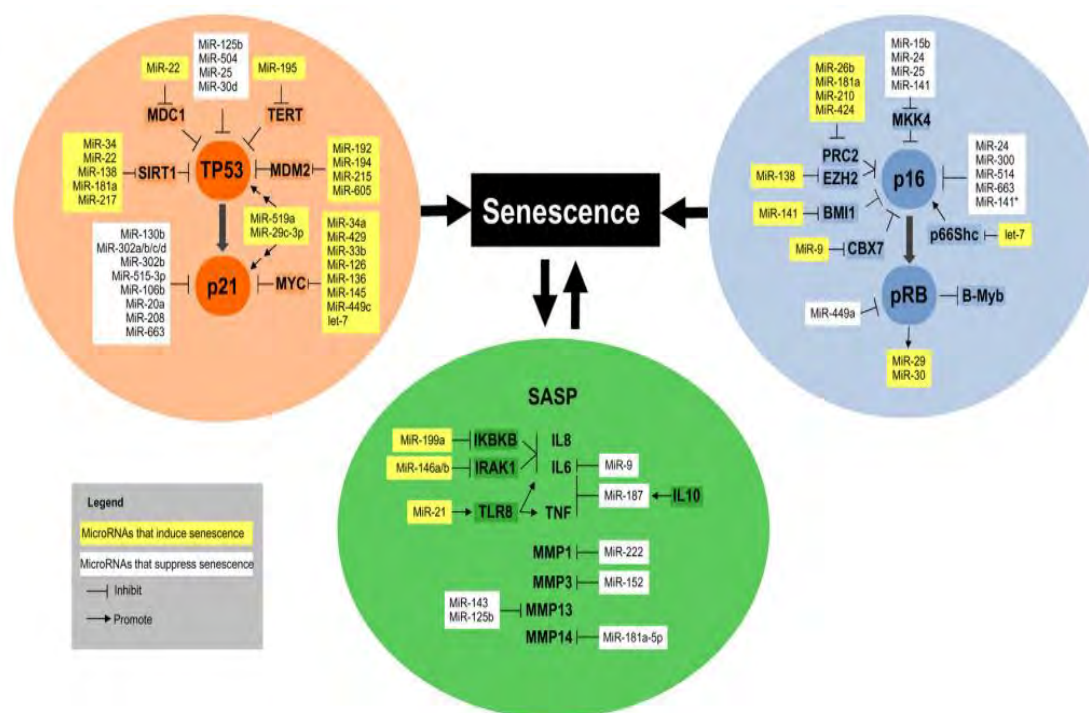


Εικόνα 9:Βιοσύνθεση & μηχανισμός δράσης των miRNAs(Barca-Mayoetal.,2012.

3.2. Ρόλος των Micro-RNAs στην κυτταρική γήρανση

Είναι γνωστό πως τα microRNAs έχουν πρωταρχικό ρόλο στην μετα-μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων που έχουν συσχετιστεί με πληθώρα κυτταρικών λειτουργιών όπως είναι η κυτταρική διαφοροποίηση, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, η κυτταρική διαίρεση αλλά και η κυτταρική γήρανση (AbdelmohsenandGorospe, 2015; BushatiandCohen, 2007; Catalanottoetal., 2016; KloostermanandPlasterk, 2006; Lingor, 2010; Yao, 2016). Χαρακτηριστικά της κυτταρικής γήρανσης όπως η παραγωγή του εκκριτικού φαινοτύπου των γηρασμένων κυττάρων SASP, αλλά και η ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που σχετίζονται με αυτή διαδικασία

γήρανσης, όπως των μονοπατιών p53/p21 και p16/Rb ρυθμίζονται μέσω τις δραστηριότητας των microRNAs ανάμεσα σε άλλους μηχανισμούς(Munk et al.,2017).



Εικόνα 10:MicroRNAs που συμμετέχουν στη ρύθμιση της κυτταρικής γήρανσης, μέσω της στόχευσης των μεταγράφων μορίων που συμμετέχουν στα σηματοδοτικά μονοπάτια p53/p21, p16/Rb και συστατικών του SASP (Munketal.,2017).

3.2.1. microRNAs που συμμετέχουν στη ρύθμιση του μονοπατιού p21/p53

miRNA	Στόχος	Βιβλιογραφία
MiR-130b, MiR-302a, MiR-302b, MiR302c, MiR-302d, MiR-515-3p	p21	Borgdorff et al. (2010)
MiR-106b	p21	Ivanovska et al. (2008) and Li et al. (2011)
MiR-20a	p21	Sokolova et al. (2015)
MiR-17	p21	Gibcus et al. (2011)
MiR-208	p21	Zhang et al. (2011)
MiR-663	p21	Yi et al. (2012)
MiR-125b, MiR-504, MiR-25, MiR-30d	p53	Kumar et al. (2011)
MiR-192, MiR-194, MiR-215, MiR-605	MDM2	Jones and Lal (2012)
MiR-34a, MiR-22, MiR-138, MiR-181a, MiR-217	SIRT1	Jazbutyte et al. (2013), Menghini et al. (2009),

		Ming et al. (2016), and Yamakuchi (2012)
MiR-181a, MiR-181b, MiR-138	<i>SIRT1</i>	Rivetti di Val Cervo et al. (2012) and Zhou et al. (2016)
MiR-195	<i>SIRT1, TERT</i>	Okada et al. (2016)
MiR-34a	<i>MYC</i>	Cui et al. (2016) and Xu et al. (2015)

3.2.2. *microRNAs που ρυθμίζουν το μονοπάτι p16/rb*

<i>microRNA</i>	<i>Στόχος</i>	<i>Βιβλιογραφία</i>
MiR-24s	<i>p16</i>	Lal et al. (2008) and Philipot et al. (2014)
MiR-26b	EED; EZH2	Overhoff et al. (2014)
MiR-181a	CBX7	Overhoff et al. (2014)
MiR-210	EED, EZH2, suz12	Overhoff et al. (2014)
MiR-424	EED, suz12	Overhoff et al. (2014)
MiR-138	EZH2	Liang et al. (2013)
MiR15b, MiR-24, MiR-25, MiR-141	MKK4	Marasa et al. (2009)
let-7	p66SHC	Xu et al. (2014)
MiR-141	BMI1	Dimri et al. (2013)
MiR-9	CBX7	O’Loughlen et al. (2015)
MiR-29, MiR-30	B-Myb	Martinez et al. (2011)
MiR-29c-3p	CNOT6	Shang et al. (2016)
MiR-203	E2F3A, E2F3B, ZBP89	Noguchi et al. (2012)
MiR-205	E2F1	Dar et al. (2011)
MiR-449a	CCND1, E2F1, E2F3	Noonan et al. (2010), Mao et al. (2016), and Ren et al. (2014)

3.2.3. *microRNAs που ρυθμίζουν την έκκριση του SASP*

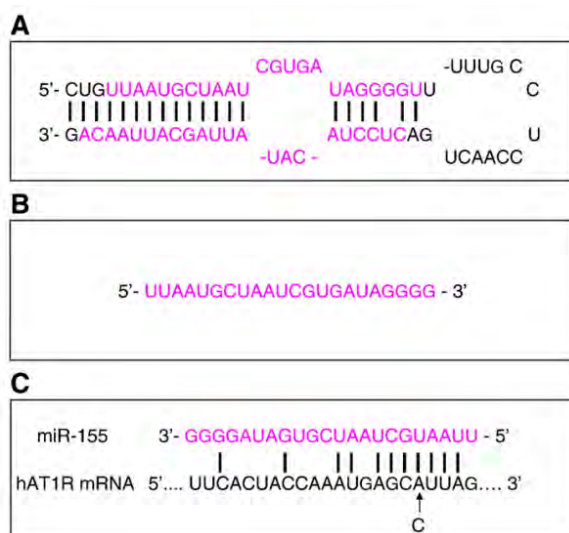
<i>microRNAs</i>	<i>Στόχος</i>	<i>Βιβλιογραφία</i>
MiR-146a/b	IRAK1, TLR8	Bhaumik et al. (2009) and Gysler et al. (2016)
MiR-143	MMP13	Osaki et al. (2011)
MiR-335	PTEN	Kabir et al. (2016)
MiR-183	ITGB1	Li et al. (2010)
MiR-9	IL6	Zhang et al. (2016a)
MiR-222	MMP1	Liu et al. (2009)
MiR-125b	TNF, MMP13	Tili et al. (2007) and Xu et al. (2012)
MiR-152	MMP3	Zheng et al. (2013)

4.miR-155-5p

Το miR-155-5p αποτελεί ένα μόριο microRNA που συμμετέχει σε πολλαπλές φυσιολογικές και παθολογικές λειτουργίες του κυττάρου. Υπό φυσιολογικές συνθήκες το miR-155-5p συμμετέχει στη ρύθμιση διαδικασιών όπως είναι η ανοσία, η φλεγμονώδης απόκριση, και η διαφοροποίηση των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων. Στην περίπτωση που η φυσιολογική λειτουργία του miR-155-5p διαταραχθεί, η δράση του έχει συσχετιστεί με διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως είναι τα καρδιαγγειακά νοσήματα, τύποι καρκίνου και οι μολύνσεις από ιούς (Faraonietal.,2009).

4.1. Γονίδιο του miR-155-5p

Το miR-155-5p αποτελεί ένα μικρό μόριο RNA, το οποίο προκύπτει μέσω της μεταγραφής του γονιδίου του που εντοπίζεται σε εξώνιο του γονιδίου *BIC* (B-cell Integration Cluster) (Lagos-Quintanaetal.,2008). Το ογκογονίδιο αυτό εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 21, και η αλληλουχία του είναι σε μεγάλο βαθμό συντηρημένη στον άνθρωπο και σε οργανισμούς όπως η κότα και το ποντίκι (Faraonietal.,2009).



Εικόνα11: A) Πρωτογενής μορφή του miR-155-5p που δημιουργεί δομή φουρκέτας (stemloop). B) Τελική μονόκλωνη αλληλουχία του miR-155-5p. C) Αλληλεπίδραση μεταξύ του miR-155-5p και μεταγράφου-στόχου του (ως παράδειγμα στόχου το μετάγραφο του γονιδίου *AT1R*) (Faraonietal.,2009).

4.2. Ο ρόλος του miR-155-5p στη ρύθμιση βιολογικών διεργασιών

Το miR-155-5p παρουσιάζει διττό ρόλο, καθώς συμμετέχει στην ρύθμιση φυσιολογικών κυτταρικών λειτουργιών, αλλά και στην ανάπτυξη πληθώρας παθολογικών καταστάσεων. Έχει συσχετιστεί με την διαδικασία της επαγωγής της φλεγμονής, με την επίτευξη της ανοσίας και την διαφοροποίηση των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων στις γενεαλογίες των κυτταρικών τύπων του αίματος, ενώ από

την άλλη έχει αποδειχτεί πως εμπλέκεται σε διάφορες μορφές καρκίνου, στη πρόκληση καρδιαγγειακών παθήσεων αλλά και σε μολύνσεις από ιούς.

4.3. Συμμετοχή του miR-155-5p σε φυσιολογικές λειτουργίες του κυττάρου

Στην πρώτη περίπτωση της εμπλοκής του miR-155-5p σε φυσιολογικές διαδικασίες του οργανισμού, όσον αφορά το φαινόμενο της φλεγμονώδους απόκρισης, έχει εντοπιστεί η ενισχυμένη έκφραση του miR-155-5p σε μακροφάγα έπειτα από την διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης (Taganovetal.2006), ενώ διαπιστώθηκε πως η έκφραση του συγκεκριμένου miRNA υπόκειται στη ρύθμιση από τα μονοπάτια της MAPK και JNK, δύο σημαντικών μονοπατιών για την διαδικασία της ανοσοαπόκρισης (O'Connelletal.2007). Στη συνέχεια κατά την διαδικασία της επίτευξης της ανοσίας το miR-155-5p, έχει αποδειχτεί πως συμβάλλει στη ρύθμιση της απόκρισης των T και B- λεμφοκυττάρων (έπειτα από την ενεργοποίηση των υποδοχέων TCR και BCR αντίστοιχα), της παραγωγής αντισωμάτων IgM, της έκκρισης φλεγμονώδων ουσιών όπως η ιντερλευκίνη 2 και ο IFN γ , και της αντιγονοπαρουσιαστικής ικανότητας των δενδριτικών κυττάρων (Rodriguezetal.,2007). Τέλος όσον αφορά την συμμετοχή του miR-155-5p στη διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων για την δημιουργία της λεμφικής και μυελικής γενεαλογίας(Αιμοποίηση) (Georgantasetal.,2007;), έχει βρεθεί πως το miR-155-5p ρυθμίζει το δυναμικό διαφοροποίησης των HSCs, καθώς έχει εντοπιστεί η ενισχυμένη έκφραση του στα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα, η οποία εξασθενεί κατά τον αυξανόμενο βαθμό διαφοροποίησης των κυττάρων (Masakietal.,2007). Ο μηχανισμός της δράσης του miR-155-5p στην αιμοποίηση δεν έχει εξακριβωθεί όμως είναι πιθανό πως σχετίζεται με την ρύθμιση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου και της δέσμευσης των κυττάρων στην μοίρα της πλήρους διαφοροποίησης (Ranganath, 2015).

4.4. Συμμετοχή του miR-155-5p σε παθολογικές καταστάσεις

Όσον αφορά τη συμμετοχή του miR-155-5p σε παθολογικές καταστάσεις, η υπερέκφραση του συγκεκριμένου miRNA έχει συσχετιστεί με πληθώρα καρκινικών τύπων, όπως για παράδειγμα σε στερεούς όγκους του πνεύμονα (Voliniaetal.,2006; Jayetal.,2007; Yanaiharatal.,2006), του παγκρέατος (Leeetal.,2007; Szafranskaetal.,2007), του μαστού (Voliniaetal.,2006; Iorioetal.,2005;Yanetal.,2008), του τραχήλου (Wangetal.,2008), του εντέρου και του θυρεοειδούς αδένα (Nikiforovaetal.,2008;Heetal.,2005;Pallanteetal.,2006;Visoneetal.,2007;Weberetal.,2006). Πιο συγκεκριμένα σε καρκινικά κύτταρα T-cell(λευχαιμία), του μαστού (Oncharenkoetal.2006), και του παγκρέατος (Leeetal.2007;Szafranskaetal.2007), έχει διαπιστωθεί πως το miR-155-5p συμβάλλει στην καρκινογένεση μέσω της στόχευσης του μεταγράφου του παράγοντα TP53INP1, ο οποίος φυσιολογικά δρα ως ενεργοποίησης της κασπάσης-3 επιφέροντας έτσι την παύση του κυτταρικού κύκλου και τον προγραμματισμένο θάνατο του κυττάρου. Η λειτουργία αυτή του miR-155-5p

μπορεί να αποτελέσει μία εξήγηση στην αποφυγή της απόπτωσης από τα καρκινικά κύτταρα και στην επίμονη επιβίωση τους. Η υψηλή έκφραση του miR-155-5p έχει συσχετιστεί και με την εμφάνιση καρδιαγγειακών παθήσεων μέσω της ρύθμισης του μονοπατιού ρενίνης αγγειοτενσίνης μέσω της στόχευσης του μεταγράφου του υποδοχέα AT1R (Faraonietal.,2009;Martinetal.,2006). Το γονίδιο αυτό, παρουσιάζει έναν πολυμορφισμό ενός νουκλεοτιδίου (single nucleotide polymorphism, SNP), που έχει συσχετιστεί με παθολογικές καταστάσεις όπως η καρδιακή υπερτροφία, η υπέρταση, ακόμα και με την πρόκληση καρδιακής προσβολής (Faraonietal.,2009). Είναι εμφανές το γεγονός πως ο πολυμορφισμός αυτός επηρεάζει αρνητικά την πρόσδεση του miR-155-5p στην αλληλουχία στόχο του, με αποτέλεσμα τη μείωση της αποτελεσματικότητας της καταστολής της έκφρασης του AT1R. Τέλος το miR-155-5p έχει συσχετιστεί και με την μόλυνση των κυττάρων από DNA ιούς. Πιο συγκεκριμένα, ευρήματα μελετών (Gottweinetal.,2007; Skalskyetal.,2007) υποδεικνύουν ένα μόριο ανάλογο του miR-155-5p εκφράζεται από το ιικό γονιδίωμα του ερπητοϊού σχετιζόμενου με το σάρκωμα Kaposi.

4.5. Στόχος της εργασίας

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αυξανόμενο ενδιαφέρον για την μελέτη της ρύθμισης κυτταρικών λειτουργιών μεταξύ των οποίων και της κυτταρικής γήρανσης. Απώτερος σκοπός της διερεύνησης της κυτταρικής γήρανσης αποτελεί η εύρεση μορίων, μέσω της στόχευσης των οποίων θα επιτευχθεί η αναστροφή του γηρασμένου φαινοτύπου και η επέκταση του χρόνου αξιοποίησης των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων σε καλλιέργεια. Σκοπός της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η διερεύνηση του ρόλου του miR-155-5p στον γηρασμένο φαινότυπο των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων που προέρχονται από τη γέλη Wharton κατά την *in vitro* καλλιέργειά τους.

Για τον σκοπό αυτό, στην διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκαν οι εξής πειραματικές μελέτες:

- ✓ Προσδιορισμός της έκφρασης του miR-155-5p σε νεαρά και γηραμένα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα που προέρχονται από τη γέλη Wharton
- ✓ Ο προσδιορισμός γονιδίων-στόχων του miR-155-5p με εργαλεία βιοπληροφορικής
- ✓ Ανάλυση γονιδιακής οντολογίας [GO enrichment analysis] και σηματοδοτικών μονοπατιών των γονιδίων-στόχων του miR-155-5p
- ✓ Προσδιορισμός της έκφρασης του γονιδίου-στόχου FOXO3 σε γηρασμένα WJ-MSCs μετά από χορήγηση mimicmiR-155-5p
- ✓ Αξιολόγηση της δραστηριότητας του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση με προσθήκη X-gal σε γηρασμένα WJ-MSCs μετά από χορήγηση mimic miR-155-5p

5.Υλικά & Μέθοδοι

5.1.Κυτταρικός Τύπος

Για την πραγματοποίηση των επακόλουθων πειραματικών δοκιμασιών χρησιμοποιήθηκαν Μεσεγχυματικά Βλαστικά Κύτταρα της γέλης Wharton (WJ- MSCs). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα από τρεις δότες, ενώ χρησιμοποιήθηκε ένα εύρος νεαρών και γηρασμένων κυττάρων, με τα νεαρά κύτταρα να αντιστοιχούν σε passage 7-11, ενώ τα γηρασμένα σε passage 33-46.

Με τη χρήση μικροσκοπίου ανάστροφης φάσεως, είναι δυνατή η παρατήρηση της μορφολογίας των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων. Η συγκεκριμένη μορφολογία εμφανίζει ομοιότητες με αυτή των ινοβλαστών, ενώ τα συγκεκριμένα κύτταρα κατά την ανάπτυξη τους σε καλλιέργεια υιοθετούν ένα πεπλατισμένο ατρακτοειδές σχήμα (Secundaetal. 2015).

5.2.Απόψυξη (Thawing) μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων WJ

Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα Wharton's Jelly αποθηκεύονται στους -80°C σε ειδικά φιαλίδια που ονομάζονται cryovials.

Πρωτόκολλο

1. Μεταφορά των ειδικών φιαλιδίων cryovials στο υδατόλουτρο για ένα λεπτό
2. Μεταφορά του περιεχομένου των cryovials σε erpendorfs με πλήρες θρεπτικό DMEM
3. Πραγματοποίηση φυγοκέντρωσης των σωληναρίων στους 25°C, στις 1500 στροφές, για 5 λεπτά.
4. Απομάκρυνση του υπερκειμένου
5. Προσθήκη 5ml πλήρους θρεπτικού DMEM
6. Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος
7. Μεταφορά των κυττάρων σε φλάσκα

5.3.Δημιουργία κυτταροκαλλιιεργειών μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων Wharton'sJelly (WJ-MSCs)

Υλικά

1. FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco), 10% v/v
2. Διάλυμα PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Lonza, Material: L0615-500
3. DMEM (Dulbecco's Modified eagle Medium, BioWest, Material: L0103-500)
4. Αντιβιοτικά (Penicillin/Streptomycin, P/S), 1% v/v

5.4.Συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας

Οι καλλιέργειες των WJ-MSCs δημιουργούνται και αναπτύσσονται σε φλάσκες πολυστυρενίου, καθώς τους παρέχουν την απαραίτητη επιφάνεια ανάπτυξης για την προσκόλληση τους, ενώ τα πώματα των φλασκών τα οποία φέρουν φίλτρα, συμβάλλουν τόσο στην ενίσχυση των στείρων συνθηκών κατά την μεταφορά και αποθήκευση των καλλιεργειών αλλά και επιτρέπουν την ανταλλαγή αερίων ανάμεσα στο εξωτερικό και εσωτερικό της φλάσκας. Οι φλάσκες των κυτταροκαλλιεργειών τελικά τοποθετούνται σε κλίβανο προκειμένου να πραγματοποιηθεί η επώαση των κυττάρων υπό τις σταθερές συνθήκες, των 37°C, με παροχή 5% CO₂.

5.5.Ανακαλλιέργεια (Splitting)

Υλικά

1. Θρυψίνη (Trypsin-EDTA 1X in PBS, Material: L0940-100)
2. PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Lonza, Material: L0615-500)
3. Πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας DMEM

Πρωτόκολλο Ανακαλλιέργειας για φλάσκα T75

- Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
06/09/2026 19:22:21 EEST - 216.73.216.250

7. Ανάδευση των κυττάρων προκειμένου να επιτευχθεί η αποδόμηση πιθανών συσσωματωμάτων που παρατηρήθηκαν
8. Διαμοιρασμός 5ml διαλύματος, μέσα στο οποίο αιωρούνται τα κύτταρα σε 2 νέες φλάσκες είτε σε μία καινούργια φιάσκα ενώ τα 5ml παραμένουν στην αρχική.
9. Προσθήκη 5ml πλήρους θρεπτικού DMEM στις φλάσκες, για επίτευξη του τελικού όγκου των 10ml.
10. Επώαση των νέων φλασκών στον κλίβανο(37°C, 5% CO₂).

5.6.Σύνθεση stemloopcDNA για το miR-155-5p

Ως stemloop ονομάζεται ένα είδος εκκινητή που εμφανίζει μορφολογία φουρκέτας. Εμφανίζει ειδικότητα για το miRNA ενδιαφέροντος και χρησιμοποιείται προκειμένου να ενισχυθεί το μέγεθος του(περίπου 17nt). Το βήμα αυτό είναι απαραίτητο για την πραγματοποίηση ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου, καθώς οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία αυτή έχουν μήκος παρόμοια με αυτό του miRNA ενώ το υπόστρωμα τους πρέπει να έχει μήκος τουλάχιστον διπλάσιο από αυτό προκειμένου να ενισχυθεί.

Εκτός από τη σύνθεση stemloop cDNA για το microRNA ενδιαφέροντος, σε αυτή την περίπτωση το miR-155-5p πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία για το mRNA του γονιδίου U6, το οποίο αποτελεί το γονίδιο αναφοράς.

Υλικά

1 ^ο στάδιο σύνθεση stemloopcDNA	
Συστατικά	Ποσότητες ανά δείγμα
StemLoop-RT	1μL
dNTPs	1μL
DdH ₂ O	11μL

2 ^ο στάδιο σύνθεσηςcDNA	
Συστατικά	Ποσότητες ανά δείγμα
MMLV	0.5μL
DTT	2μL
5x buffer	4μL

Πρωτόκολλο

1. Παρασκευή των 2 MasterMix του πρώτου βήματος για το miR-155-5p και το γονίδιο αναφοράς U6.
2. Διαμοιρασμός 13μl MasterMix σε κάθε eppendorf
3. Προσθήκη 2μl RNA από το κάθε δείγμα
4. Μεταφορά των δειγμάτων στον θερμικό κυκλοποιητή, εφαρμογή προγράμματος PCR: MMLV 1stSTEP, 65°C για 5 λεπτά.
5. Παρασκευή των 2 MasterMix του δεύτερου βήματος για το miR-155-5p και το γονίδιο αναφοράς U6.
6. Διαμοιρασμός 6.5μl από το MasterMix στο κάθε δείγμα
7. Μεταφορά των δειγμάτων στον θερμικό κυκλοποιητή, εφαρμογή προγράμματος PCR: MMLV 2ndSTEP

5.7.ΑπομόνωσηRNA

Υλικά

1. Trizol (Invitrogen, Life technologies, Paisley, UK)
2. Χλωροφόρμιο (Merck)
3. Ισοπροπυλική αλκοόλη (Amresco)
4. 70% αιθανόλη (Scharlau)
5. RNase-free water (QIAGEN)
6. Διάλυμα PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Lonza, Material: L0615-500)
7. Θρυψίνη (Trypsin-EDTA 1X in PBS, Material: L0940-100)

Πρωτόκολλο

1. Απομάκρυνση του παλιού θρεπτικού από το κάθε well
2. Προσθήκη 1ml Trizol σε κάθε well
3. Ανάδευση με πιπέτα
4. Προσθήκη 0.2ml χλωροφορμίου (υπολογισμός χλωροφορμίου ως εξής 0.2ml χλωροφόρμιο για κάθε 1ml Trizol που χρησιμοποιήθηκε αρχικά)
5. Ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα
6. Πραγματοποίηση επώασης για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
7. Πραγματοποίηση φυγοκέντρησης για 15 λεπτά, στους 4°C, στις 12.000 στροφές
8. Τοποθέτηση του υπερκειμένου σε νέο eppendorf
9. Προσθήκη 0.5ml ισοπροπυλικής αλκοόλης (υπολογισμός ισοπροπυλικής αλκοόλης ως εξής 0.5ml ισοπροπυλικής αλκοόλης για κάθε 1ml Trizol που χρησιμοποιήθηκε αρχικά)
10. Πραγματοποίηση επώασης δέκα λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου

11. Πραγματοποίηση φυγοκέντρησης για δέκα λεπτά, στους 4°C, στις 12.000 στροφές
12. Απόχυση του υπερκλειμένου και πλύση του RNA με 1ml 70% αιθανόλης
13. Πραγματοποίηση φυγοκέντρησης για 10 λεπτά, στους 4°C, στις 10.000 στροφές
14. Απόχυση του υπερκλειμένου
15. Στέγνωμα του RNA σε θερμοκρασία δωματίου
16. Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 30μl dH₂O (δεν εμπεριέχει RNAσες)
17. Πραγματοποίηση επώασης για 10 λεπτά σε υδατόλουτρο (60°C)
18. Αποθήκευση του απομονωμένου RNA στους -80°C.

5.8.Σύνθεση CDNA για το γονίδιο FOXO3

Υλικά

1 ^ο στάδιο σύνθεσης cDNA	
Συστατικά	Ποσότητες ανά δείγμα
Random primers	1μl
dNTPs	1μl
DdH ₂ O	10μl

2 ^ο στάδιο σύνθεσης cDNA	
Συστατικά	Ποσότητες ανά δείγμα
5x buffer	4μl
DTT	2μl
MMLV	0.5μl

Πρωτόκολλο

1. Παρασκευή του MasterMix του 1^{ου} βήματος
2. Διαμοιρασμός 12μl MasterMix σε κάθε eppendorf
3. Προσθήκη 3μl RNA από το κάθε δείγμα
4. Μεταφορά των δειγμάτων στον θερμικό κυκλοποιητή, εφαρμογή προγράμματος PCR: MMLV 1stSTEP, 65°C για 5 λεπτά.
5. Παρασκευή του MasterMix του δεύτερου βήματος
6. Διαμοιρασμός 6.5μl από το MasterMix στο κάθε δείγμα
7. Μεταφορά των δειγμάτων στον θερμικό κυκλοποιητή, εφαρμογή προγράμματος PCR: MMLV 2ndSTEP

5.9.Ποσοτική PCRπραγαντικού χρόνου (RT-qPCR) για *miR-155-5p*

Υλικά

Master Mix miR-155-5p	
Συστατικά	Ποσότητες ανά δείγμα
SYBR Green	10μl
Forward primer του miR-155-5p	0.5μl
Reverse primer του miR-155-5p	0.5μl
ddH₂O	6μl

MasterMix γονιδίου αναφοράς U6	
Συστατικά	Ποσότητες ανά δείγμα
SYBR Green	10μl
Forward primer του U6	0.5μl
Reverse primer του U6	0.5μl
ddH₂O	6μl

Πρωτόκολλο

1. Πραγματοποίηση της αραίωσης των cDNA, και προετοιμασία των MasterMix για το miR-155-5p και το γονίδιο αναφοράς U6.
2. Προσθήκη 17μl του mir-155-5p MasterMix στα ειδικά σωληνάρια της PCR (PCRstriptubes, QIAGEN).
3. Προσθήκη 3μl cDNA σε κάθε striptube(τελικός όγκος αντίδρασης=20μl).
4. Προσθήκη 17μl του U6 MasterMix στα ειδικά σωληνάρια της PCR (PCRstriptubes, QIAGEN).
5. Προσθήκη 3μl cDNAU6 σε κάθε striptube(τελικός όγκος αντίδρασης=20μl).
6. Τοποθέτηση των striptubes στο μηχάνημα της RT-PCR, και επιλογή του επιθυμητού προγράμματος αντίδρασης (60°C).

5.10.RT-qPCR για το γονίδιο FOXO3

Υλικά

Master Mix FOXO3	
Συστατικά	Ποσότητες ανά δείγμα
SYBR Green	10μl
Forward primer του FOXO3	0.5μl
Reverse primer του FOXO3	0.5μl
ddH₂O	6μl

Master MixGAPDH	
Συστατικά	Ποσότητες ανά δείγμα
SYBR Green	10μl

Forward primer της GAPDH	0.5μl
Reverse primer της GAPDH	0.5μl
ddH ₂ O	6μl

Πρωτόκολλο

1. Πραγματοποίηση αραίωσης 1:1 των cDNA
2. Προετοιμασία των MasterMix για το FOXO3 και το γονίδιο αναφοράς GAPDH.
3. Προσθήκη 17μl του FOXO3 MasterMix στα ειδικά σωληνάρια της PCR (PCRstriptubes, QIAGEN).
4. Προσθήκη 3μl cDNA σε κάθε striptube(τελικός όγκος αντίδρασης=20μl).
5. Προσθήκη 17μl του GAPDH MasterMix στα ειδικά σωληνάρια της PCR (PCRstriptubes, QIAGEN).
6. Προσθήκη 3μl cDNA σε κάθε striptube(τελικός όγκος αντίδρασης=20μl).
7. Τοποθέτηση των striptubes στο μηχάνημα της RT-PCR, και επιλογή του επιθυμητού προγράμματος αντίδρασης (60°C).

5.11.Πραγματοποίηση επίδρασης με *microRNA mimic* για το *miR-155-5p*

Προκειμένου να παρατηρήσουμε τις μεταβολές που επιφέρει η επίδραση του miR-155-5p στα επίπεδα της κυτταρικής γήρανσης στα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα της γέλης Wharton πραγματοποιήσαμε το πρωτόκολλο διαμόλυνσης ή αλλιώς transfection των κυττάρων με ένα microRNA mimic για το miR-155-5p. Τα mimic των microRNAs αποτελούν συνθετικά δίκλωνα μόρια RNA, των οποίων η 5' αμετάφραστη περιοχή φέρει αλληλουχία μερικώς συμπληρωματική στην 3' αμετάφραστη περιοχή του μεταγράφου του γονιδίου στόχου. Έπειτα από την είσοδο του miR mimic στο κύτταρο και την πρόσδεση του στο μετάγραφο του γονιδίου στόχου, επάγεται η αρνητική ρύθμιση της έκφρασης αυτού, όπως ακριβώς πραγματοποιείται κατά την δράση του φυσιολογικού miRNA. Προκειμένου να μεταφερθεί το mimic miR στο εσωτερικό του κυττάρου πρέπει να προηγηθεί η σύζευξη του με ένα μόριο μεταφορέα, στη συγκεκριμένη περίπτωση τη λιποφεκταμίνη 2000. Η λιποφεκταμίνη αποτελεί ένα κατιονικό λιπόσωμα με επιφάνεια φορτισμένη με θετικό φορτίο. Εξαιτίας αυτού, παρουσιάζει την ικανότητα αλληλεπίδρασης με την αρνητικά φορτισμένη φωσφορική ομάδα του DNA και του RNA, αλλά και με την αρνητικά φορτισμένη μεμβράνη των κυττάρων. Το νουκλεϊκό οξύ εισέρχεται στο εσωτερικό του κυττάρου μέσω ενδοκύτωσης του συμπλέγματος του με τη λιποφεκταμίνη (Felgner et al., 1987).

Υλικά

1. miScript miRNA Mimic Syn-hsa-miR-155-5p (QIAGEN)
2. AllStars Negative Control siRNA

3. Lipofectamine®2000 (Invitrogen)
4. Θρεπτικό μέσο DMEM με 10% FBS χωρίς αντιβιοτικά
5. Θρεπτικό μέσο Opti-MEM® (1X) (Gibco, Life Technologies)
6. Διάλυμα PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Lonza, Material: L0615-500)

Πρωτόκολλο

A) «Στρώσιμο» WJ-MSCs για επίδραση με miR-155-5pmimic

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί με επιτυχία η διαμόλυνση των κυττάρων, η πυκνότητα των κυττάρων στην καλλιέργεια είναι απαραίτητο να είναι της τάξης του 80%. Επομένως 24 ώρες πριν την διαμόλυνση, πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια περίπου 3×10^5 κυττάρων με τη χρήση θρεπτικού μέσου DMEM χωρίς αντιβιοτικά, σε κάθε well ενός 6-wellplate.

B) Προετοιμασία των διαλυμάτων για την πραγματοποίηση της διαμόλυνσης με το miR-155-5pmimic

1. Ανάμειξη 367.5μl Opti-MEM® (1X) με 7.5μl miR-155-5pmimic
2. Ανάμειξη 367.5μl Opti-MEM® (1X) με 7.5μl λιποφεκταμίνης 2000
3. Ανάμειξη 367.5μl Opti-MEM® (1X) με 7.5μl negative Control siRNA
4. Ανάμειξη 367.5μl Opti-MEM® (1X) με 7.5μl λιποφεκταμίνης 2000
5. Ανάμειξη 1:1 των διαλυμάτων Opti-MEM® (1X)-miR-155-5pmimic και Opti-MEM® (1X)-λιποφεκταμίνης 2000, μέσω μεταφοράς του πρώτου στο eppendorf του τελευταίου
6. Πραγματοποίηση επώασης 15 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου για τη δημιουργία του συμπλέγματος λιποφεκταμίνης και miR-155-5pmimic
7. Ανάμειξη 1:1 των διαλυμάτων Opti-MEM® (1X)-negative Control siRNA και Opti-MEM® (1X)-λιποφεκταμίνης 2000, μέσω μεταφοράς του πρώτου στο eppendorftου τελευταίου
8. Πραγματοποίηση επώασης 15 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου για τη δημιουργία του συμπλέγματος λιποφεκταμίνης και negative Control siRNA

Γ) Transfection/διαμόλυνση

1. Απομάκρυνση του παλιού θρεπτικού από τα wells
2. Προσθήκη διαλύματος PBS για την πλύση των wells
3. Προσθήκη 1750μl θρεπτικού DMEM χωρίς αντιβιοτικά σε κάθε well
4. Προσθήκη 250μl διαλύματος λιποφεκταμίνης-miR-155-5pmimic στα wells για την επίδραση του mimic
5. Προσθήκη 250μl διαλύματος λιποφεκταμίνης-siRNA στα wells του negative control
6. Τοποθέτηση των 6-well plate στον κλίβανο επώασης (37°C, 5% CO₂).

5.12.Δοκιμασία προσδιορισμού δραστηριότητας SA-β-gal

1. Διάλυμα μονιμοποίησης: 0,2% φορμαλδεΰδη/ 0,2% γλουταραλδεΰδη διαλυμένα σε PBS
2. Διάλυμα χρώσης:
 - Ρυθμιστικό διάλυμα 40 mM Κιτρικό οξύ/ Φωσφορικό Νάτριο
 - 5mMC6N6FeK4
 - 5mMC6N6FeK3
 - 150 mMNaCl
 - 2 mM MgCl₂
 - 1mg/ml 5-βρόμο-3-ινδολυλ-4-χλώρο-β-D-γαλακτοπυρανοζίτης (Xgal, SigmaAldrich:B4252 250MG)

Πρωτόκολλο

1. Ανακαλλιέργεια $0.3-2 \times 10^5$ κύτταρα σε 6 wellplate
2. Αφαίρεση του παλιού θρεπτικού μέσου
3. Πραγματοποίηση δύο πλύσεων των wells με κρύο διάλυμα PBS(4°C)
4. Προσθήκη του διαλύματος μονιμοποίησης στα wells
5. Πραγματοποίηση επώασης πέντε λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου
6. Πραγματοποίηση δύο πλύσεων των wells με κρύο διάλυμα PBS(4°C)
7. Προσθήκη 1-2ml του διαλύματος χρώσης στα wells
8. Τοποθέτηση των 6 wellplate σε ειδικό κλίβανο επώασης, απουσία του CO₂ για 16-24 ώρες
9. Αφαίρεση του διαλύματος χρώσης
10. Πραγματοποίηση τριών πλύσεων των wells με κρύο διάλυμα PBS(4°C)
11. Λήψη φωτογραφιών των κυττάρων σε οπτικό μικροσκόπιο

5.13.Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό μοντέλο SPSS 23, ενώ ως όριο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε το κατώφλι $p < 0.05$. Τα παρακάτω αποτελέσματα αποτελούν μέσοι όροι (mean), ενώ παρουσιάζεται η τιμή του τυπικού λάθους (standarderror).

5.14.Ανάλυση αποτελεσμάτων RT-qPCR

Τα δεδομένα αναλύθηκαν με βάση τη μέθοδο σύγκρισης των Ct, όπου ο βαθμός της αύξησης ή της μείωσης των επιπέδων έκφρασης ενός γονιδίου ενδιαφέροντος

κανονικοποιείται σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης ενός εσωτερικού μάρτυρα των δειγμάτων αναφοράς(control), μέσω της σχέσης $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen 2001).

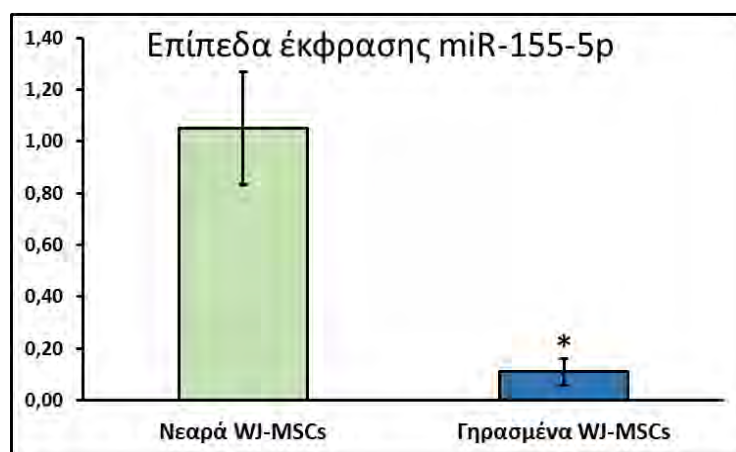
Κατά τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν οι εξής μαθηματικοί τύποι:

1. ΔCt : η διαφορά του Ct του γονιδίου ενδιαφέροντος από το Ct του γονιδίου αναφοράς, δηλαδή $\Delta Ct = Ct \text{ gene of interest} - Ct \text{ housekeeping gene}$
2. $\Delta\Delta Ct$: αποτελεί τη διαφορά του ΔCt του δείγματος της επίδρασης από το ΔCt του δείγματος αναφοράς(control), δηλαδή $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ sample} - \Delta Ct \text{ Control}$
3. $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, RQ αποτελεί η σχετική ποσοτικοποίηση

6. Αποτελέσματα

6.1. Έκφραση του *miR-155-5p* σε νεαρά και γηρασμένα WJ-MSCs

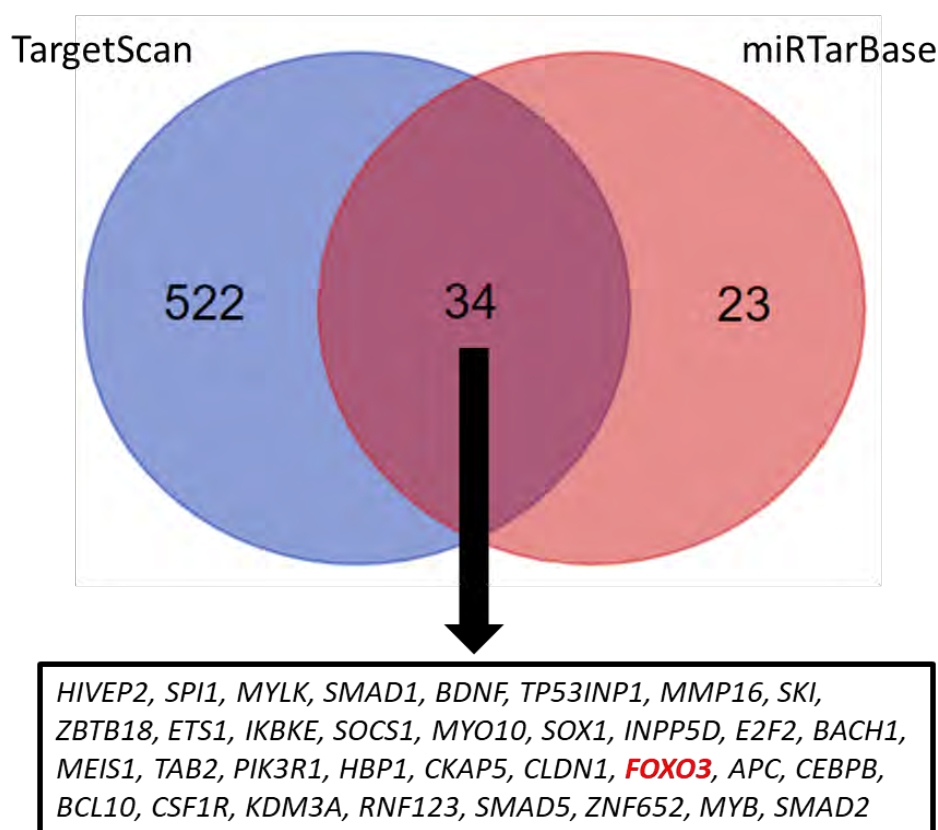
Πραγματοποιήθηκε ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (RT-qPCR), με σκοπό τον εντοπισμό μεταβολών στην έκφραση του *miR-155-5p*, εάν αυτές υπάρχουν ανάμεσα σε μία ομάδα νεαρών και γηρασμένων μεσεγχυματικών κυττάρων της γέλης Wharton. Τα αποτελέσματα της διαδικασίας αυτής υποδεικνύουν την στατιστικώς σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης του *miR-155-5p* στην ομάδα των γηρασμένων μεσεγχυματικών κυττάρων σε σχέση με αυτή των νεαρών.



Εικόνα 13: Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης του *miR-155-5p* σε νεαρά και γηρασμένα WJ-MSCs. Τα επίπεδα έκφρασης του *miR-155-5p* είναι ποσοτικοποιημένα ως προς το γονίδιο αναφοράς U6. * $p < 0.05$.

6.2. Προσδιορισμός γονιδίων-στόχων του *miR-155-5p* με εργαλεία βιοπληροφορικής.

Με σκοπό την εύρεση των γονιδίων στόχων του miR-155-5p χρησιμοποιήθηκαν τα εργαλεία βιοπληροφορικής ανάλυσης TargetScan και miRTarbase. Το TargetScan μας παρέχει προβλέψεις για τα πιθανά μόρια στόχους του microRNA με βάση την συμπληρωματικότητα των αλληλουχιών των μεταγράφων και του miR, ενώ η βάση miRTarBase μας παρέχει επιβεβαιωμένους στόχους με βάση πειραματικά δεδομένα. Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιήσαμε τα δεδομένα της βάσης miRTarBase που υποστηρίζονται αποκλειστικά από ισχυρά πειραματικά δεδομένα, όπως η διαδικασία qPCR, Western Blot και Report Assay. Αποκομίσαμε τις λίστες των αποτελεσμάτων στόχων και από τις δύο βάσεις δεδομένων και στη συνέχεια τις διασταυρώσαμε χρησιμοποιώντας το εργαλείο Venn diagram (Εικόνα 14).

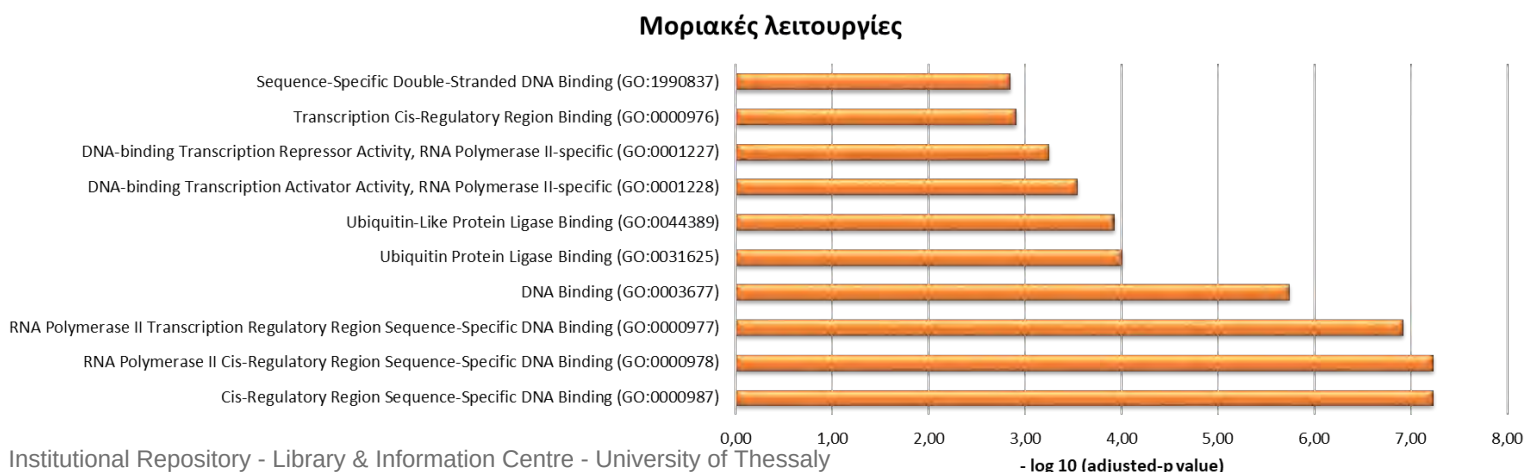


Εικόνα 14 : Διάγραμμα Venn που απεικονίζει τον αριθμό των γονιδίων στόχων του miR-155-5p σε κάθε μία από τις δύο βάσεις δεδομένων (miRTarBase και TargetScan) που χρησιμοποιήθηκαν και τον αριθμό των κοινών γονιδίων στόχων μεταξύ των βάσεων δεδομένων. Τα γονίδια στόχοι του miR-155-5p τα οποία εντοπίστηκαν στις δύο βάσεις δεδομένων.

6.3. Ανάλυση γονιδιακής οντολογίας [GO enrichment analysis] και σηματοδοτικών μονοπατιών των γονιδίων-στόχων του miR-155-5p.

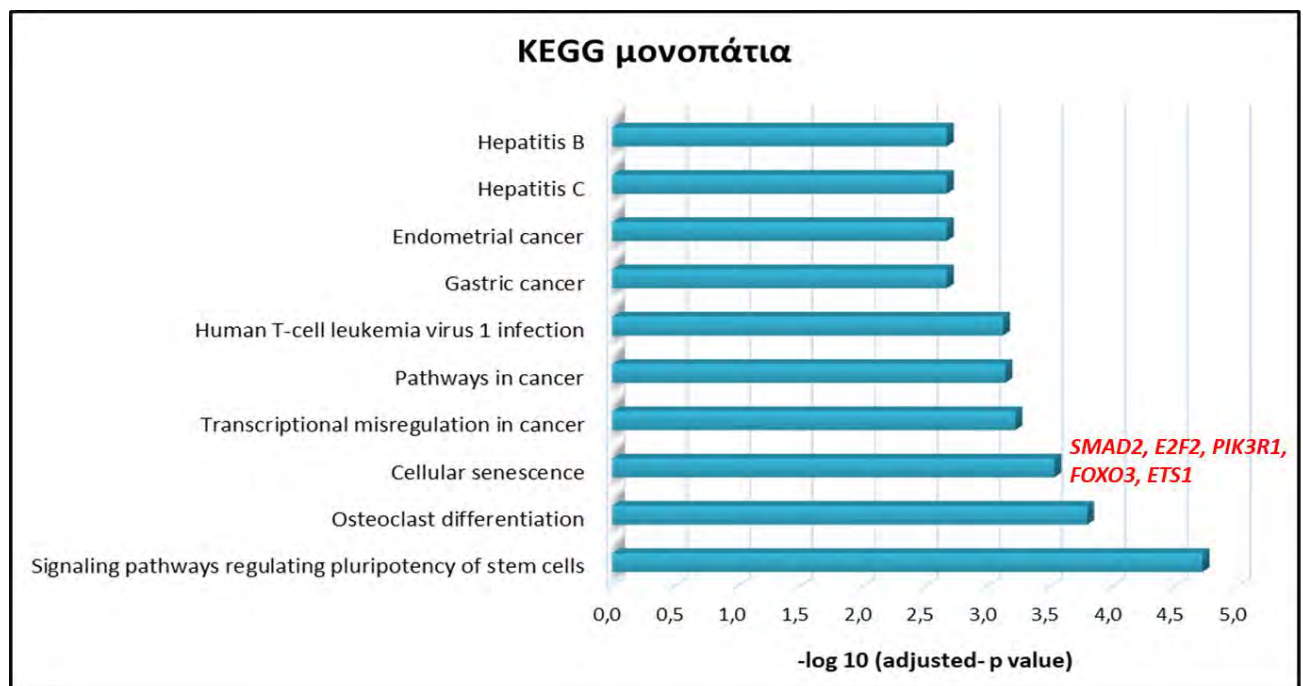
Στη συνέχεια χρησιμοποιώντας την λίστα των 34 κοινών γονιδίων των δύο βάσεων δεδομένων, πραγματοποιήσαμε τη λειτουργική ανάλυση μέσω του εργαλείου enricherR έτσι ώστε πραγματοποιήσουμε την ανάλυση οντολογίας (σε ποιες βιολογικές λειτουργίες συμμετέχουν τα μόρια στόχοι, τη μοριακή τους λειτουργία) και την ανάλυση KEGG προκειμένου να δούμε σε ποια μονοπάτια συμμετέχουν. Με βάση τα αποτελέσματα των τελευταίων αναλύσεων επιλέξαμε ένα γονίδιο το FOXO3 για περαιτέρω μελέτη.

Από την ανάλυση οντολογίας με σκοπό την εύρεση των βιολογικών διεργασιών και μοριακών λειτουργιών των 34 μορίων στόχων του miR-155-5p προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα: Όπως απεικονίζεται στα παρακάτω διαγράμματα, όσον αφορά την βιολογική διεργασία η πλειοψηφία των μορίων δρα ως μεταγραφικός παράγοντας, ρυθμίζοντας την δράση της RNA πολυμεράσης II. Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα της ανάλυσης της μοριακής λειτουργίας των μορίων, όπου υποδεικνύεται η πρόσδεση των παραγόντων σε ρυθμιστικά στοιχεία θετικής ή αρνητικής ρύθμισης της RNA πολυμεράσης, και κυρίως cis ρυθμιστικών στοιχείων που εμφανίζουν εξειδίκευση και πιθανότητα αποτελούν αλληλουχίες υποκινητών, ενισχυτών ή καταστολέων της έκφρασης γονιδίων (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης οντολογίας, για την συμμετοχή των 34 γονιδίων-στόχων σε βιολογικές διεργασίες(πάνω), και τη μοριακή λειτουργία που παρουσιάζουν οι συγκεκριμένοι παράγοντες(κάτω).

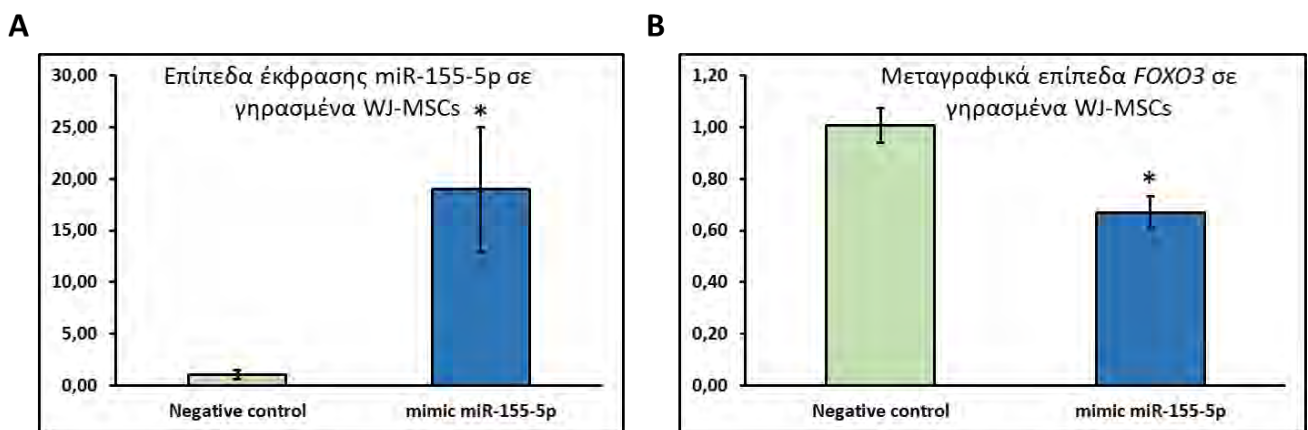
Τέλος πραγματοποιήθηκε ανάλυση των KEGG μονοπατιών, προκειμένου να διαπιστωθεί σε ποια μονοπάτια συμμετέχουν οι πρωτεΐνες των 34 γονιδίων στόχων του miR-155-5p. Όπως παρατηρείται στο παραπάνω γράφημα η πλειοψηφία αυτών συμμετέχει σε κυτταρικές λειτουργίες όπως η σηματοδοτική ρύθμιση της πολυδυναμικότητας των βλαστικών κυττάρων, την διαφοροποίηση των οστεοκλαστών και την κυτταρική γήρανση, η οποία αποτελεί και το αντικείμενο της μελέτης μας (Εικόνα 16). Σημαντικά γονίδια που εμπλέκονται στη διαδικασία αυτή αλλά συγχρόνως υπόκεινται στη ρύθμιση από το miR-155-5p αποτελούν τα *SMAD2*, *E2F2*, *FOXO3*, *PIK3R1* και *ETS1*. Εξαιτίας της συμμετοχής του παράγοντα FOXO3 στην πλειοψηφία των παραπάνω μονοπατιών, αποφασισάμε να εστιάσουμε στην μελέτη του συγκεκριμένου γονιδίου.



Εικόνα 16: Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης Keggpathways για τα 34 γονίδια-στόχους του miR-155-5p.

6.4. Έκφραση μεταγραφικών επιπέδων του γονιδίου *FOXO3* μετά από χορήγηση *mimic miR-155-5p* σε κυτταροκαλλιέργειες γηρασμένων *WJ-MSCs*.

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση πιθανών μεταβολών στα μεταγραφικά επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα *FOXO3* σε γηρασμένα κύτταρα τα οποία είχαν υποστεί μετασχηματισμό με λιποφεκταμίνη και *mimicmiR-155-5p*. Κατά τον μετασχηματισμό των γηρασμένων κυττάρων παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξηση της έκφρασης του *miR-155-5p*, σε σχέση με τη συνθήκη του μάρτυρα (Εικόνα 17Α). Εφόσον το *FOXO3* αποτελεί γνωστός στόχος του *miR-155-5p*, αναμένεται κατά την ενισχυμένη έκφραση του συγκεκριμένου *miRNA* η αρνητική ρύθμιση του μορίου αυτού. Πράγματι, κατά τον μετασχηματισμό των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων *WJ* με το *mimicmiR-155-5p*, παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μείωση της έκφρασης του παράγοντα *FOXO3* σε σχέση με την συνθήκη του μάρτυρα (Εικόνα 17Β).

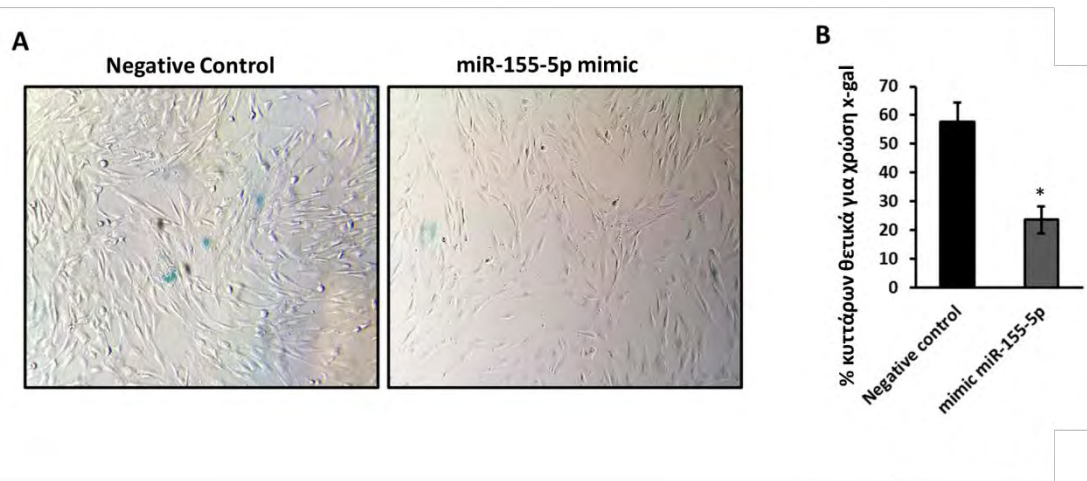


Εικόνα 17: Α) Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης του *miR-155-5p* σε γηρασμένα *WJ-MSCs* τα οποία υπέστησαν μετασχηματισμό είτε με αλληλουχία *siRNAcontrol*, είτε με *mimicmiR-155-5p*. Τα επίπεδα έκφρασης του *miR-155-5p* είναι ποσοτικοποιημένα ως προς το γονίδιο αναφοράς *U6*. * $p < 0.05$. Β) Απεικόνιση των επιπέδων του *FOXO3* σε γηρασμένα *WJ-MSCs* τα οποία υπέστησαν μετασχηματισμό είτε με αλληλουχία *siRNAcontrol*, είτε με *mimicmiR-155-5p*. Τα επίπεδα έκφρασης του *FOXO3* είναι ποσοτικοποιημένα ως προς το γονίδιο *GAPDH*.

6.5. Δραστικότητα της β -γαλακτοσιδάσης μετά τη χορήγηση *mimicmiR-155-5p* σε γηρασμένα *WJ-MSCs*

Τέλος προκειμένου να προσδιοριστεί ο αντίκτυπος της τροποποίησης των επιπέδων έκφρασης του *miR-155-5p* στην κυτταρική γήρανση πραγματοποιήθηκε η

δοκιμή προσδιορισμού δραστηριότητας της β-γαλακτοσιδάσης (SA-β-gal), τον πιο διαδεδομένο δείκτη κυτταρικής γήρανσης, στα κύτταρα που τους χορηγήθηκε *mimicmiR-155-5p*. Στην πλειοψηφία των κυττάρων που τους χορηγήθηκε *mimicmiR-155-5p* παρατηρήθηκε μειωμένη δραστηριότητα της β-γαλακτοσιδάσης και επομένως ο πληθυσμός χαρακτηρίζεται ως μη γηρασμένος (Εικόνα 18). Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώνονται και από την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων όπου το ποσοστό των θετικών για χρώση β-γαλακτοσιδάσης, και επομένως των γηρασμένων κυττάρων μειώθηκε μετά την αύξηση της έκφρασης του *miR-155-5p*.



Εικόνα 18: A) Χρώση SA-b-Gal σε γηρασμένα κύτταρα μετά πριν και μετά το μετασχηματισμό τους με *mimicmiR-155-5p*. B) Υπολογισμός ποσοστού κυττάρων θετικών για χρώση β-γαλακτοσιδάσης σε γηρασμένα κύτταρα μετά πριν και μετά το μετασχηματισμό τους με *mimic miR-155-5p*.

7. Συζήτηση

Πρόβλημα μείζονος σημασίας για το πεδίο της αναγεννητικής ιατρικής, με βάση την εφαρμογή γονιδιακής θεραπείας σε μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα αποτελεί η απώλεια της ικανότητας διαφοροποίησης και αυτό-ανανέωσης των βλαστικών κυττάρων κατά την παρατεταμένη ανάπτυξη τους σε κυτταρική καλλιέργεια (Wengetal.,2022). Το φαινόμενο της μη αναστρέψιμης παύσης του κυτταρικού κύκλου του κυττάρου ονομάζεται κυτταρική γήρανση. Η διαδικασία αυτή ενεργοποιείται από πληθώρα ερεθισμάτων, όπως η βλάβη του γενετικού υλικού, η ενεργοποίηση ογκογονιδίων και το οξειδωτικό stress(Princillyetal.,2023). Ουσιαστικά το κύτταρο συσσωρεύει μεταλλάξεις που διαταράσσουν την φυσιολογική λειτουργία του με αποτέλεσμα προκειμένου να μην επαχθεί ογκογένεση, να χάνει την πολυδυναμικότητα του και να επάγει την κυτταρική γήρανση(da Silva & Schumacher, 2021).Στόχος της έρευνας των μηχανισμών της κυτταρικής γήρανσης αποτελεί η αναστολή της διαδικασίας προκειμένου να επιτευχθεί η ενίσχυση του

διαθέσιμου χρόνου αξιοποίησης των μεσεγγυματικών βλαστικών κυττάρων σε καλλιέργεια για την βελτίωση της ανάπτυξης θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Τα τελευταία χρόνια η ανάδειξη της συμμετοχής των μορίων miRNAs στη ρύθμιση πληθώρας κυτταρικών λειτουργιών ανάμεσα σε αυτές και της κυτταρικής γήρανσης έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας. Το miR-155-5p έχει συσχετιστεί με πληθώρα παθογενών καταστάσεων (πολλαπλούς τύπους καρκίνου, αυτοάνοσα νοσήματα, καρδιαγγειακές παθήσεις) αλλά και κυτταρικές διαδικασίες, όπως η απόπτωση, ο πολλαπλασιασμός και η φλεγμονή, το σύνολο των οποίων συνδέεται με την κυτταρική γήρανση. Στη συγκεκριμένη μελέτη σε πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης των miRNA-155-5p με σκοπό την εξακρίβωση της ύπαρξης διαφορών στα επίπεδα έκφρασης του miR-155-5p σε δύο ομάδες νεαρών και γηρασμένων κυττάρων. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η έκφραση του miR-155-5p παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική μείωση ($p < 0.05$) στα γηρασμένα μεσεγγυματικά βλαστικά κύτταρα σε σχέση με την ομάδα των νεαρών κυττάρων. Αύξηση των επιπέδων έκφρασης του miR-155-5p στα γηρασμένα WI-MSCs είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του ποσοστού κυττάρων θετικών σε χρώση β-γαλακτοσιδάσης, χαρακτηριστικό δείκτη γήρανσης. Το γεγονός αυτό συμβαδίζει με τα αποτελέσματα δύο ανεξάρτητων μελέτων των Espina-Ordoñez et al. (2024) και Nguyen et al. (2021). Η πρώτη επιστημονική ομάδα παρατήρησε πως κατά την κυτταρική γήρανση η έκφραση του miR-155-5p μειώνεται σημαντικά, με αποτέλεσμα την θετική ρύθμιση της έκφρασης του μορίου στόχου του, TP53INP1 το οποίο στη συνέχεια ενεργοποιεί την p53. Επιπρόσθετα κατά την μείωση του miR-155-5p παρατηρήθηκε και αυξημένη έκφραση δεικτών γήρανσης, ενώ κατά την υπερέκφραση του miR-155-5p παρατηρήθηκε πτώση των επιπέδων τόσο της έκφρασης του γονιδίου TP53 όσο και των μορίων-δεικτών της γήρανσης, ενώ επάχθηκε ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων. Η δεύτερη ερευνητική ομάδα παρατήρησε επίσης την μειωμένη έκφραση του miR-155-5p σε γηρασμένα κύτταρα λείου μυός σε σχέση με νεαρά ενώ εντόπισε τη σχέση μεταξύ του παράγοντα KLF5 και του miR-155-5p. Ο παράγοντας αυτός επάγει έμμεσα την καταστολή της p21, ενώ ενισχύει την έκφραση του miR με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση αντιοξειδωτικών παραγόντων και την επαγωγή οξειδωτικού stress. Επομένως οι επιστήμονες θεώρησαν πως η μείωση του miR-155-5p αποτελεί ένα ρυθμιστικό μηχανισμό του κυττάρου έναντι στην εγκαθίδρυση του οξειδωτικού stress. Αντίθετα δύο ομάδες ερευνητών παρατήρησαν την αύξηση του miR-155-5p στα γηρασμένα κύτταρα σε σχέση με τα νεαρά. Οι Zhan et al. (2024) μέσω της μελέτης βλαστικών κυττάρων του μυελου των οστών διαπίστωσαν πως το miR-155-5p αυξάνεται σημαντικά αυτή τη φορά στα γηρασμένα κύτταρα, καταστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση τους, και ενισχύοντας την απόπτωση και τη γήρανση, μέσω της παρεμπόδισης της έκφρασης και της μεταφοράς των παραγόντων YAP/TAZ στον πυρήνα του κυττάρου. Τέλος οι Hong et al. (2020) παρατήρησαν σε γηρασμένα μεσεγγυματικά βλαστικά κύτταρα μυελού των οστών, την αυξημένη έκφραση του miR-155-5p σε σχέση με την ομάδα νεαρών κυττάρων. Επίσης κατά τον μετασχηματισμό των κυττάρων με μόριο mimic για το miR-155-5p παρατηρήθηκε

αυξημένη έκφραση των δεικτών γήρανσης p21, p53 αλλά και των γηρασμένων κυττάρων κατά την καταμέτρηση τους σε δοκιμασία β-γαλακτοζιδάσης. Από την άλλη, όταν πραγματοποιήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη χορήγηση μορίου αναστολέα για το miR-155-5p, παρατηρήθηκαν τα αντίθετα αποτελέσματα, ενώ επίσης εντοπίστηκε η αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Από τα παραπάνω αντικρουόμενα αποτελέσματα γίνεται αντιληπτό πως η ρύθμιση της κυτταρικής γήρανσης από το miR-155-5p δεν αποτελεί απλή διαδικασία και ο ρόλος του ως επαγωγέας ή καταστολέας της γήρανσης εξαρτάται από το είδος του κυτταρικού τύπου που μελετάται η διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης.

Στην συνέχεια μέσω της χρήσης των βάσεων δεδομένων miRTarBase και TargetScan, προσδιορίστηκαν τα γονίδια-στόχοι του miR-155-5p. Έπειτα μέσω του προγράμματος Venn diagram, οι δύο λίστες διασταυρώθηκαν με αποτέλεσμα της δημιουργίας μία τελικής παράταξης 34 γονιδίων-στόχων. Προκειμένου να απαντηθούν τα ερωτήματα της βιολογικής και μοριακής δράσης των μορίων-στόχων αλλά και της συμμετοχής τους σε βιολογικά μονοπάτια πραγματοποιήθηκε ανάλυση οντολογίας. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την μελέτη αυτή υπέδειξαν το γεγονός πως η πλειοψηφία των 34 μορίων δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες, καθώς συμβάλλουν είτε στη θετική είτε στην αρνητική ρύθμιση της δράσης της RNA πολυμεράσης II, μέσω της πρόσδεσης τους σε ρυθμιστικά στοιχεία όπως υποκινητές, ενισχυτές αλλά και αλληλουχίες σίγησης της μεταγραφής. Όσον αφορά τη συμμετοχή των παραγόντων σε βιολογικά μονοπάτια του κυττάρου, μεγάλος αριθμός των παραγόντων συμμετέχει στη ρύθμιση γονιδίων που σχετίζονται με διάφορους τύπους καρκίνου. Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με το γεγονός πως η συμμετοχή του miR-155-5p στη σηματοδότηση του καρκίνου έχει αποδειχτεί. Βέβαια τα τρία μονοπάτια που παρουσίασαν συσχέτιση με τον υψηλότερο αριθμό παραγόντων αποτέλεσαν, με σειρά προτεραιότητας τα εξής: Η διατήρηση της πολυδυναμικότητας των βλαστικών κυττάρων, η διαφοροποίηση των οστεοκλαστών και τέλος η κυτταρική γήρανση, που αποτελεί και το αντικείμενο της συγκεκριμένης μελέτης. Επομένως μέσω της μελέτης των παραπάνω αποτελεσμάτων προκύπτει το συμπέρασμα πως αρχικά το miR-155-5p εμφανίζει υψηλή συσχέτιση με την κυτταρική λειτουργία της γήρανσης ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων που ελέγχουν την παραπάνω διαδικασία και συγκεκριμένα μέσω της ρύθμισης της έκφρασης μεταγραφικών παραγόντων που με τη σειρά τους επάγουν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την κυτταρική γήρανση.

Κατά τη μελέτη οντολογίας προέκυψε η ανάδειξη σημαντικών γονιδίων που συσχετίζονται με μονοπάτια της κυτταρικής γήρανσης, όπως είναι τα FOXO3, SMAD2, E2F2, PI3KR1 και ETS1, ενώ το πρώτο γονίδιο το FOXO3 παρουσίασε συμμετοχή στην πλειοψηφία των μονοπατιών της ανάλυσης KEGG, επομένως αποφασίστηκε η περαιτέρω μελέτη του.

Ο παράγοντας FOXO3 αποτελεί ένα από τα τέσσερα μέλη της οικογένειας των παραγόντων FOXO (FOXO1, FOXO3, FOXO4, FOXO6) που εμφανίζονται στα θηλαστικά, δρα ως μεταγραφικός παράγοντας και έχει συσχετιστεί με την μακροζωία των οργανισμών και το υγιές γήρας (Greer&Brunet,2005; Kenyonetal.,1993;

Nebel&Bosch,2012; Boschetal.,2010; Giannakou&Partridge,2004; Webbetal.,2016; Martinsetal.,2015;Torigoeetal.,2024). Είναι γνωστή η συμμετοχή του παράγοντα FOXO3 στον καθορισμό της μοίρας του κυττάρου, μέσω της ρύθμισης της κυτταρικής επιβίωσης, της απόπτωσης και της γήρανσης ως απόκριση σε στρεσογόνους παράγοντες όπως το οξειδωτικό stress μέσω της ρύθμισης της μεταγραφής σχετικών γονιδίων (Khor&Wong,2024).

Επομένως στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αύξηση των επιπέδων έκφρασης του miR-155-5p στα γηρασμένα κυττάρα με χρήση mimicmiR-155-5p και ακολούθησε προσδιορισμός των μεταγραφικών επιπέδων του γονιδίου FOXO3. Η αύξηση της έκφρασης του miR-155-5p επέφερε μείωση των επιπέδων έκφρασης του FOXO3 στα γηρασμένα κύτταρα αποδεικνύοντας την στόχευση του μεταγράφου του FOXO3 από το miR-155-5p και έναν πιθανό μηχανισμό ρύθμισης της κυτταρικής γήρανσης μέσω του άξονα miR-155-5p/FOXO3.

Η βιβλιογραφία παρέχει αποτελέσματα μελετών που υποστηρίζουν την ρύθμιση της έκφρασης και συνεπώς της δράσης του FOXO3 μέσω της δραστηριότητας του miR-155-5p, ιδιαίτερα ως απόκριση στο ερέθισμα του οξειδωτικού stress με τελικό αποτέλεσμα την αποφυγή της απόπτωσης(ChenandYang 2022;Khor&Wong,2024). Μέσω της μελέτης τους οι Huangetal.,(2015) παρατήρησαν πώς η καταστολή του miR-155-5p οδηγεί στην θετική ρύθμιση του FOXO3, με αποτέλεσμα την αύξηση του παράγοντα ARC και την μείωση της έκκρισης φλεγμονώδων παραγόντων όπως οι ιντερλευκίνες IL-18 και IL-1β όπως και της κασπάσης-1, η οποία αποτελεί μόριο-κλειδί για την επαγωγή της απόπτωσης. Αντίθετα η υπερέκφραση του miR-155-5p, παρατήρησαν πως οδήγησε στην αποφυγή της ενεργοποίησης της απόπτωσης του κυττάρου. Επιπρόσθετα κατά την μελέτη πάνω σε λεμφοπλασματικά κύτταρα, παρατηρήθηκε το γεγονός πως κατά τη σίγηση της έκφρασης του miR-155-5p, η έκφραση του παράγοντα FOXO3 ενισχύθηκε, όπως και ο παράγοντας BIM ο οποίος αποτελεί καθοδικό συστατικό του μονοπατιού του FOXO3 , το οποίο καταλήγει στην έναρξη του αποπτωτικού μηχανισμού. Αντίθετα σε μονοκύτταρα προσβεβλημένα από το βακτήριο Mycobacterium tuberculosis, παρατηρήθηκε πως η διαδικασία της απόπτωσης επάγεται από το miR-155-5p μέσω του FOXO3(Khor&Wong,2024). Επομένως γίνεται αντιληπτή η σύνθετη φύση του μηχανισμού που πιθανώς διαφέρει με βάση τον διαφορετικό κυτταρικό τύπο, και τον επαγωγέα που προκάλεσε την ενεργοποίηση του.

Κατά τη μελέτη της βιβλιογραφία γίνεται εμφανής η σύνδεση της δραστηριότητας του FOXO3 με πολλαπλά μονοπάτια και λειτουργίες της κυτταρικής γήρανσης(Zhao and Liu,2021). Αρχικά κατά την απενεργοποίηση του FOXO3, η οποία επέρχεται μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού PI3K/Akt, που επάγει την φωσφορυλίωση του παράγοντα από την Akt, καταστέλλεται η μεταγραφική του ικανότητα επομένως αποτρέπει η απόπτωση, ενώ ταυτόχρονα η Akt ενεργοποιεί το μονοπάτι NF-KB, το οποίο οδηγεί στην σύνθεση και έκκριση των συστατικών του εκκριτικού φαινοτύπου SASP(Baar et al. 2017a). Από την άλλη στην περίπτωση που ο παράγοντας PTEN καταστείλει την δράση του μονοπατιού PI3K/Akt με αποτέλεσμα την άρση της

απενεργοποίησης του FOXO3, τότε όπως είναι φυσικό αποκαθίσταται η μεταγραφική του ικανότητα. Πρώτον, μέσω της θετικής ρύθμισης της έκφρασης των παραγόντων Pink/Parkin/Beclin1 ενισχύεται η αυτοφαγία, ενώ μέσω της αύξησης της έκφρασης των παραγόντων BIM και BAX επάγεται η απόπτωση (Xing et al. 2018; Zhao and Liu 2021). Τέλος κατά το οξειδωτικό stress το οποίο επίσης αποτελεί χαρακτηριστικό των γηρασμένων κυττάρων, καταστέλλεται η δράση της πρωτεΐνης SIRT1 με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του FOXO3, το οποίο με τη σειρά του ενισχύει την έκφραση αντιοξειδωτικών παραγόντων όπως τα SOD2 και CAT (Tothova and Gilliland 2007). Επομένως στην περίπτωση αυτή η ενεργοποίηση του FOXO3 αποτελεί ένα προστατευτικό μηχανισμό του κυττάρου για την αντιμετώπιση του οξειδωτικού stress. Τέλος το FOXO3 συμβάλλει στη ρύθμιση της παύσης του κυτταρικού κύκλου μέσω της ρύθμισης των μονοπατιών p53/p21 και RB (Khor&Wong,2024), δύο μονοπατιών-ορόσημων για την κυτταρική γήρανση.

Συμπερασματικά, το miR-155-5p παρουσιάζει μειωμένη έκφραση στα γηρασμένα WJ-MSCs με επακόλουθο την αναστολή της ενδογενούς κατασταλτικής δραστηριότητας του miR-155-5p στην έκφραση των γονιδίων-στόχων του, όπως είναι ο μεταγραφικός παράγοντας FOXO3. Η αύξηση της έκφρασης του miR-155-5p επέφερε μείωση του γηρασμένου πληθυσμού των WJ-MSCs που φαίνεται να επιτυγχάνεται μέσω της τροποποίησης της έκφρασης του FOXO3 και κατ' επέκταση των γονιδίων που αυτός ρυθμίζει. Ωστόσο για να διαλευκανθεί σε μεγαλύτερο βαθμό ο ρόλος του miR-155-5p στη διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης απαιτούνται περαιτέρω μελέτες. Προς αυτή την κατεύθυνση, η τροποποίηση της έκφρασης του miR-155-5p στα WJ-MSCs και ο επακόλουθος προσδιορισμός της έκφρασης άλλων δεικτών γήρανσης (p21 και 16) και της μελέτης των μονοπατιών που συμμετέχουν τα γονίδια-στόχοι του FOXO3 καισχετίζονται με την κυτταρική γήρανση(αυτοφαγία, αντιοξειδωση, παύση κυτταρικού κύκλου, έκκριση του SASP)θα δώσουν νέα στοιχεία τα οποία θα βοηθήσουν στην αποσαφήνιση του πλειοτροπικού τρόπου δράσης του miR-155-5p στη διαδικασία της γήρανσης.

8. Βιβλιογραφία

Abdelmohsen, K., &Gorospe, M. (2015). Noncoding RNA control of cellular senescence. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 6(6), 615–629.
<https://doi.org/10.1002/wrna.1297>

Abdelmohsen, K., Srikantan, S., Tominaga, K., Kang, M. J., Yaniv, Y., Martindale, J. L., Yang, X., Park, S. S., Becker, K. G., Subramanian, M., Maudsley, S., Lal, A., & Gorospe, M. (2012). Growth inhibition by miR-519 via multiple p21-inducing pathways. *Molecular and cellular biology*, 32(13), 2530–2548.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00510-12>

Aboul-Soud, M. A. M., Alzahrani, A. J., & Mahmoud, A. (2021). Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs)-Roles in Regenerative Therapies, Disease Modelling and Drug Screening. *Cells*, 10(9), 2319. <https://doi.org/10.3390/cells10092319>

Acosta, J. C., O'Loughlen, A., Banito, A., Guijarro, M. V., Augert, A., Raguz, S., Fumagalli, M., Da Costa, M., Brown, C., Popov, N., Takatsu, Y., Melamed, J., d'Adda di Fagagna, F., Bernard, D., Hernando, E., & Gil, J. (2008). Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell*, 133(6), 1006–1018. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.038>

Angelini, P. D., Zacarias Fluck, M. F., Pedersen, K., Parra-Palau, J. L., Guiu, M., Bernadó Morales, C., Vicario, R., Luque-García, A., Navalpotro, N. P., Giralt, J., Canals, F., Gomis, R. R., Tabernero, J., Baselga, J., Villanueva, J., & Arribas, J. (2013). Constitutive HER2 signaling promotes breast cancer metastasis through cellular senescence. *Cancer research*, 73(1), 450–458. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2301>

Baar MP, Brandt RMC, Putavet DA, Klein JDD, Derks KWJ, Bourgeois BRM, Stryeck S, Rijksen Y, van Willigenburg H, Feijtel DA, van der Pluijm I, Essers J, van Cappellen WA, van Ijcken WF, Houtsmuller AB, Pothof J, de Bruin RWF, Madl T, Hoeijmakers JHJ, Campisi J, de Keizer PLJ (2017a) Targeted apoptosis of senescent cells restores tissue homeostasis in response to chemotoxicity and aging. *Cell* 169:132-147.e116

Baek, D., Villén, J., Shin, C., Camargo, F. D., Gygi, S. P., & Bartel, D. P. (2008). The impact of microRNAs on protein output. *Nature*, 455(7209), 64–71. <https://doi.org/10.1038/nature07242>

Barca-Mayo, O., & Lu, Q. R. (2012). Fine-Tuning Oligodendrocyte Development by microRNAs. *Frontiers in neuroscience*, 6, 13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2012.00013>

Bartel D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2), 215–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>

Begum, H., Murugesan, P., & Tangutur, A. D. (2022). Western blotting: a powerful staple in scientific and biomedical research. *BioTechniques*, 73(1), 58–69. <https://doi.org/10.2144/btn-2022-0003>

Bentzinger, C. F., Wang, Y. X., von Maltzahn, J., & Rudnicki, M. A. (2013). The emerging biology of muscle stem cells: implications for cell-based therapies. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 35(3), 231–241. <https://doi.org/10.1002/bies.201200063>

Bhaumik, D., Scott, G. K., Schokrpur, S., Patil, C. K., Orjalo, A. V., Rodier, F., Lithgow, G. J., & Campisi, J. (2009). MicroRNAs miR-146a/b negatively modulate

the senescence-associated inflammatory mediators IL-6 and IL-8. *Aging*, 1(4), 402–411. <https://doi.org/10.18632/aging.100042>

Blasi, F., & Carmeliet, P. (2002). uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 3(12), 932–943. <https://doi.org/10.1038/nrm977>

Bode-Böger, S. M., Scalera, F., & Martens-Lobenhoffer, J. (2005). Asymmetric dimethylarginine (ADMA) accelerates cell senescence. *Vascular medicine (London, England)*, 10 Suppl 1, S65–S71. <https://doi.org/10.1177/1358836X0501000110>

Bongso A. (2006). Blastocyst culture for deriving human embryonic stem cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 331, 13–22. <https://doi.org/10.1385/1-59745-046-4:13>

Borgdorff, V., Lleonart, M. E., Bishop, C. L., Fessart, D., Bergin, A. H., Overhoff, M. G., & Beach, D. H. (2010). Multiple microRNAs rescue from Ras-induced senescence by inhibiting p21(Waf1/Cip1). *Oncogene*, 29(15), 2262–2271. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.497>

Bosch, T. C., Anton-Erxleben, F., Hemmrich, G., & Khalturin, K. (2010). The Hydra polyp: nothing but an active stem cell community. *Development, growth & differentiation*, 52(1), 15–25. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2009.01143.x>

Bracken, A. P., Kleine-Kohlbrecher, D., Dietrich, N., Pasini, D., Gargiulo, G., Beekman, C., Theilgaard-Mönch, K., Minucci, S., Porse, B. T., Marine, J. C., Hansen, K. H., & Helin, K. (2007). The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. *Genes & development*, 21(5), 525–530. <https://doi.org/10.1101/gad.415507>

Brooks, C. L., & Gu, W. (2009). How does SIRT1 affect metabolism, senescence and cancer?. *Nature reviews. Cancer*, 9(2), 123–128. <https://doi.org/10.1038/nrc2562>

Brown, C., McKee, C., Bakshi, S., Walker, K., Hakman, E., Halassy, S., Svinarich, D., Dodds, R., Govind, C. K., & Chaudhry, G. R. (2019). Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 13(9), 1738–1755. <https://doi.org/10.1002/term.2914>

Burton, D. G., & Krizhanovsky, V. (2014). Physiological and pathological consequences of cellular senescence. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 71(22), 4373–4386. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1691-3>

Bushati, N., & Cohen, S. M. (2007). microRNA functions. *Annual review of cell and developmental biology*, 23, 175–205. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123406>

Campisi J. (1997). The biology of replicative senescence. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 33(5), 703–709. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(96\)00058-5](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(96)00058-5)

- Campisi, J., & d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(9), 729–740. <https://doi.org/10.1038/nrm2233>
- Carvalho, M. M., Teixeira, F. G., Reis, R. L., Sousa, N., & Salgado, A. J. (2011). Mesenchymal stem cells in the umbilical cord: phenotypic characterization, secretome and applications in central nervous system regenerative medicine. *Current stem cell research & therapy*, 6(3), 221–228. <https://doi.org/10.2174/157488811796575332>
- Castro, P., Giri, D., Lamb, D., & Ittmann, M. (2003). Cellular senescence in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *The Prostate*, 55(1), 30–38. <https://doi.org/10.1002/pros.10204>
- Catalanotto, C., Cogoni, C., & Zardo, G. (2016). MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. *International journal of molecular sciences*, 17(10), 1712. <https://doi.org/10.3390/ijms17101712>
- Chandeck, C., & Mooi, W. J. (2010). Oncogene-induced cellular senescence. *Advances in anatomic pathology*, 17(1), 42–48. <https://doi.org/10.1097/PAP.0b013e3181c66f4e>
- Chandrashekar, P., Ahmadinejad, N., Wang, J., Sekulic, A., Egan, J. B., Asmann, Y. W., Kumar, S., Maley, C., & Liu, L. (2020). Somatic selection distinguishes oncogenes and tumor suppressor genes. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 36(6), 1712–1717. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz851>
- Chang, B. D., Swift, M. E., Shen, M., Fang, J., Broude, E. V., & Roninson, I. B. (2002). Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(1), 389–394. <https://doi.org/10.1073/pnas.012602599>
- Chang, H. Y., Chi, J. T., Dudoit, S., Bondre, C., van de Rijn, M., Botstein, D., & Brown, P. O. (2002). Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(20), 12877–12882. <https://doi.org/10.1073/pnas.162488599>
- Chen, R., & Yang, M. (2022). Melatonin Inhibits OGD/R-Induced H9c2 Cardiomyocyte Pyroptosis via Regulation of MT2/miR-155/FOXO3a/ARC Axis. *International heart journal*, 63(2), 327–337. <https://doi.org/10.1536/ihj.21-571>
- Chen, R., Alvero, A. B., Silasi, D. A., Kelly, M. G., Fest, S., Visintin, I., Leiser, A., Schwartz, P. E., Rutherford, T., & Mor, G. (2008). Regulation of IKKbeta by miR-199a affects NF-kappaB activity in ovarian cancer cells. *Oncogene*, 27(34), 4712–4723. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.112>
- Comi, P., Chiamonte, R., & Maier, J. A. (1995). Senescence-dependent regulation of type 1 plasminogen activator inhibitor in human vascular endothelial

cells. *Experimental cell research*, 219(1), 304–308.
<https://doi.org/10.1006/excr.1995.1232>

Coppé, J. P., Desprez, P. Y., Krtolica, A., & Campisi, J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annual review of pathology*, 5, 99–118. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102144>

Coppé, J. P., Desprez, P. Y., Krtolica, A., & Campisi, J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annual review of pathology*, 5, 99–118. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102144>

Coppé, J. P., Kauser, K., Campisi, J., & Beauséjour, C. M. (2006). Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *The Journal of biological chemistry*, 281(40), 29568–29574.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M603307200>

Coppé, J. P., Kauser, K., Campisi, J., & Beauséjour, C. M. (2006). Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *The Journal of biological chemistry*, 281(40), 29568–29574.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M603307200>

Coppé, J. P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D. P., Goldstein, J., Nelson, P. S., Desprez, P. Y., & Campisi, J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS biology*, 6(12), 2853–2868.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060301>

Coppé, J. P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D. P., Goldstein, J., Nelson, P. S., Desprez, P. Y., & Campisi, J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS biology*, 6(12), 2853–2868.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060301>

Coster, G., & Goldberg, M. (2010). The cellular response to DNA damage: a focus on MDC1 and its interacting proteins. *Nucleus (Austin, Tex.)*, 1(2), 166–178.
<https://doi.org/10.4161/nucl.1.2.11176>

Cui, H., Ge, J., Xie, N., Banerjee, S., Zhou, Y., Antony, V. B., Thannickal, V. J., & Liu, G. (2017). miR-34a Inhibits Lung Fibrosis by Inducing Lung Fibroblast Senescence. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 56(2), 168–178. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-0163OC>

Cunningham, S. C., Gallmeier, E., & Kern, S. E. (2010). MKK4 as oncogene or tumor suppressor: in cancer and senescence, the story's getting old. *Aging*, 2(11), 752–753.
<https://doi.org/10.18632/aging.100233>

da Silva, P. F. L., & Schumacher, B. (2021). Principles of the Molecular and Cellular Mechanisms of Aging. *The Journal of investigative dermatology*, 141(4S), 951–960. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.11.018>

Dar, A. A., Majid, S., de Semir, D., Nosrati, M., Bezrookove, V., & Kashani-Sabet, M. (2011). miRNA-205 suppresses melanoma cell proliferation and induces senescence via regulation of E2F1 protein. *The Journal of biological chemistry*, 286(19), 16606–16614. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.227611>

de Massy B. (2013). Initiation of meiotic recombination: how and where? Conservation and specificities among eukaryotes. *Annual review of genetics*, 47, 563–599. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155423>

De Miguel, M. P., Fuentes-Julián, S., & Alcaina, Y. (2010). Pluripotent stem cells: Di Micco, R., Sulli, G., Dobрева, M., Lontos, M., Botrugno, O. A., Gargiulo, G., dal Zuffo, R., Matti, V., d'Ario, G., Montani, E., Mercurio, C., Hahn, W. C., Gorgoulis, V., Minucci, S., & d'Adda di Fagagna, F. (2011). Interplay between oncogene-induced DNA damage response and heterochromatin in senescence and cancer. *Nature cell biology*, 13(3), 292–302. <https://doi.org/10.1038/ncb2170>

Di Micco, R., Sulli, G., Dobрева, M., Lontos, M., Botrugno, O. A., Gargiulo, G., dal Zuffo, R., Matti, V., d'Ario, G., Montani, E., Mercurio, C., Hahn, W. C., Gorgoulis, V., Minucci, S., & d'Adda di Fagagna, F. (2011). Interplay between oncogene-induced DNA damage response and heterochromatin in senescence and cancer. *Nature cell biology*, 13(3), 292–302. <https://doi.org/10.1038/ncb2170>

Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., & Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(20), 9363–9367. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9363>

Dimri, M., Carroll, J. D., Cho, J. H., & Dimri, G. P. (2013). microRNA-141 regulates BMI1 expression and induces senescence in human diploid fibroblasts. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 12(22), 3537–3546. <https://doi.org/10.4161/cc.26592>

Dou, Z., Xu, C., Donahue, G., Shimi, T., Pan, J. A., Zhu, J., Ivanov, A., Capell, B. C., Drake, A. M., Shah, P. P., Catanzaro, J. M., Ricketts, M. D., Lamark, T., Adam, S. A., Marmorstein, R., Zong, W. X., Johansen, T., Goldman, R. D., Adams, P. D., & Berger, S. L. (2015). Autophagy mediates degradation of nuclear lamina. *Nature*, 527(7576), 105–109. <https://doi.org/10.1038/nature15548>

Drobiova, H., Sindhu, S., Ahmad, R., Haddad, D., Al-Mulla, F., & Al Madhoun, A. (2023). Wharton's jelly mesenchymal stem cells: a concise review of their secretome and prospective clinical applications. *Frontiers in cell and developmental biology*, 11, 1211217. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1211217>

Engeland K. (2022). Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell death and differentiation*, 29(5), 946–960. <https://doi.org/10.1038/s41418-022-00988-z>

Espina-Ordoñez, M., Balderas-Martínez, Y. I., Torres-Machorro, A. L., Herrera, I., Maldonado, M., Romero, Y., Toscano-Marquez, F., Pardo, A., Selman, M., & Cisneros, J. (2024). Mir-155-5p targets TP53INP1 to promote proliferative phenotype in hypersensitivity pneumonitis lung fibroblasts. *Non-coding RNA research*, 9(3), 865–875. <https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2024.02.010>

Esquela-Kerscher, A., & Slack, F. J. (2006). Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 6(4), 259–269. <https://doi.org/10.1038/nrc1840>

Evangelou, K., Lougiakis, N., Rizou, S. V., Kotsinas, A., Kletsas, D., Muñoz-Espín, D., Kastrinakis, N. G., Pouli, N., Marakos, P., Townsend, P., Serrano, M., Bartek, J., & Gorgoulis, V. G. (2017). Robust, universal biomarker assay to detect senescent cells in biological specimens. *Aging cell*, 16(1), 192–197. <https://doi.org/10.1111/accel.12545>

Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), 154–156. <https://doi.org/10.1038/292154a0>

Fabbri, M., Paone, A., Calore, F., Galli, R., Gaudio, E., Santhanam, R., Lovat, F., Fadda, P., Mao, C., Nuovo, G. J., Zanesi, N., Crawford, M., Ozer, G. H., Wernicke, D., Alder, H., Caligiuri, M. A., Nana-Sinkam, P., Perrotti, D., & Croce, C. M. (2012). MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(31), E2110–E2116. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209414109>

Fabian, M. R., Sonenberg, N., & Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annual review of biochemistry*, 79, 351–379. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060308-103103>

Faraoni, I., Antonetti, F. R., Cardone, J., & Bonmassar, E. (2009). miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochimica et biophysica acta*, 1792(6), 497–505. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.02.013>

Faraoni, I., Antonetti, F. R., Cardone, J., & Bonmassar, E. (2009). miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochimica et biophysica acta*, 1792(6), 497–505. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.02.013>

Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., & Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(21), 7413–7417. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.21.7413>

- Freund, A., Laberge, R. M., Demaria, M., & Campisi, J. (2012). Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Molecular biology of the cell*, 23(11), 2066–2075. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-10-0884>
- Galaris, D., & Pantopoulos, K. (2008). Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 45(1), 1–23. <https://doi.org/10.1080/10408360701713104>
- Garfinkel, S., Brown, S., Wessendorf, J. H., & Maciag, T. (1994). Post-transcriptional regulation of interleukin 1 alpha in various strains of young and senescent human umbilical vein endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(4), 1559–1563. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.4.1559>
- Garfinkel, S., Brown, S., Wessendorf, J. H., & Maciag, T. (1994). Post-transcriptional regulation of interleukin 1 alpha in various strains of young and senescent human umbilical vein endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(4), 1559–1563. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.4.1559>
- Georgantas, R. W., 3rd, Hildreth, R., Morisot, S., Alder, J., Liu, C. G., Heimfeld, S., Calin, G. A., Croce, C. M., & Civin, C. I. (2007). CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(8), 2750–2755. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610983104>
- Ghaneialvar, H., Soltani, L., Rahmani, H. R., Lotfi, A. S., & Soleimani, M. (2018). Characterization and Classification of Mesenchymal Stem Cells in Several Species Using Surface Markers for Cell Therapy Purposes. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*, 33(1), 46–52. <https://doi.org/10.1007/s12291-017-0641-x>
- Giannakou, M. E., & Partridge, L. (2004). The interaction between FOXO and SIRT1: tipping the balance towards survival. *Trends in cell biology*, 14(8), 408–412. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.07.006>
- Gironella, M., Seux, M., Xie, M. J., Cano, C., Tomasini, R., Gommeaux, J., Garcia, S., Nowak, J., Yeung, M. L., Jeang, K. T., Chaix, A., Fazli, L., Motoo, Y., Wang, Q., Rocchi, P., Russo, A., Gleave, M., Dagorn, J. C., Iovanna, J. L., Carrier, A., ... Dusetti, N. J. (2007). Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(41), 16170–16175. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703942104>
- Goldstein S. (1990). Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science (New York, N.Y.)*, 249(4973), 1129–1133. <https://doi.org/10.1126/science.2204114>

Gottwein, E., Mukherjee, N., Sachse, C., Frenzel, C., Majoros, W. H., Chi, J. T., Braich, R., Manoharan, M., Soutschek, J., Ohler, U., & Cullen, B. R. (2007). A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155. *Nature*, 450(7172), 1096–1099. <https://doi.org/10.1038/nature05992>

Greer, E. L., & Brunet, A. (2005). FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene*, 24(50), 7410–7425. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209086>

Grillari, J., Hohenwarter, O., Grabherr, R. M., & Katinger, H. (2000). Subtractive hybridization of mRNA from early passage and senescent endothelial cells. *Experimental gerontology*, 35(2), 187–197. [https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(00\)00080-2](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(00)00080-2)

Guerrero, A., Herranz, N., Sun, B., Wagner, V., Gallage, S., Guiho, R., Wolter, K., Pombo, J., Irvine, E. E., Innes, A. J., Birch, J., Glegola, J., Manshaei, S., Heide, D., Dharmalingam, G., Harbig, J., Olona, A., Behmoaras, J., Dauch, D., Uren, A. G., ... Gil, J. (2019). Cardiac glycosides are broad-spectrum senolytics. *Nature metabolism*, 1(11), 1074–1088. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0122-z>

Hambiliki, F., Ström, S., Zhang, P., & Stavreus-Evers, A. (2012). Co-localization of NANOG and OCT4 in human pre-implantation embryos and in human embryonic stem cells. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 29(10), 1021–1028. <https://doi.org/10.1007/s10815-012-9824-9>

Hamsanathan, S., & Gurkar, A. U. (2022). Lipids as Regulators of Cellular Senescence. *Frontiers in physiology*, 13, 796850. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.796850>

Hamsanathan, S., & Gurkar, A. U. (2022). Lipids as Regulators of Cellular Senescence. *Frontiers in physiology*, 13, 796850. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.796850>

Hayes, M., Curley, G., Ansari, B., & Laffey, J. G. (2012). Clinical review: Stem cell therapies for acute lung injury/acute respiratory distress syndrome - hope or hype?. *Critical care (London, England)*, 16(2), 205. <https://doi.org/10.1186/cc10570>

He, H., Jazdzewski, K., Li, W., Liyanarachchi, S., Nagy, R., Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C. G., Franssila, K., Suster, S., Kloos, R. T., Croce, C. M., & de la Chapelle, A. (2005). The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(52), 19075–19080. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509603102>

He, H., Jazdzewski, K., Li, W., Liyanarachchi, S., Nagy, R., Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C. G., Franssila, K., Suster, S., Kloos, R. T., Croce, C. M., & de la Chapelle, A. (2005). The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proceedings of*

the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(52), 19075–19080. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509603102>

Herranz, N., & Gil, J. (2018). Mechanisms and functions of cellular senescence. *The Journal of clinical investigation*, 128(4), 1238–1246. <https://doi.org/10.1172/JCI95148>

Hnasko, T. S., & Hnasko, R. M. (2015). The Western Blot. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1318, 87–96. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5_9

Hong, Y., He, H., Jiang, G., Zhang, H., Tao, W., Ding, Y., Yuan, D., Liu, J., Fan, H., Lin, F., Liang, X., Li, X., & Zhang, Y. (2020). miR-155-5p inhibition rejuvenates aged mesenchymal stem cells and enhances cardioprotection following infarction. *Aging cell*, 19(4), e13128. <https://doi.org/10.1111/accel.13128>

Hornebeck, W., & Maquart, F. X. (2003). Proteolyzed matrix as a template for the regulation of tumor progression. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 57(5-6), 223–230. [https://doi.org/10.1016/s0753-3322\(03\)00049-0](https://doi.org/10.1016/s0753-3322(03)00049-0)
<https://doi.org/10.1007/s12015-010-9170-1>

Huang, J., Jiao, J., Xu, W., Zhao, H., Zhang, C., Shi, Y., & Xiao, Z. (2015). MiR-155 is upregulated in patients with active tuberculosis and inhibits apoptosis of monocytes by targeting FOXO3. *Molecular medicine reports*, 12(5), 7102–7108. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4250>

Huang, N. N., Wang, D. J., & Heppel, L. A. (1993). Stimulation of aged human lung fibroblasts by extracellular ATP via suppression of arachidonate metabolism. *The Journal of biological chemistry*, 268(15), 10789–10795.

Ilancheran, S., Moodley, Y., & Manuelpillai, U. (2009). Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair?. *Placenta*, 30(1), 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2008.09.009>

Iorio, M. V., Ferracin, M., Liu, C. G., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S., Magri, E., Pedriali, M., Fabbri, M., Campiglio, M., Ménard, S., Palazzo, J. P., Rosenberg, A., Musiani, P., Volinia, S., Nenci, I., Calin, G. A., Querzoli, P., Negrini, M., & Croce, C. M. (2005). MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer research*, 65(16), 7065–7070. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1783>

Iorio, M. V., Ferracin, M., Liu, C. G., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S., Magri, E., Pedriali, M., Fabbri, M., Campiglio, M., Ménard, S., Palazzo, J. P., Rosenberg, A., Musiani, P., Volinia, S., Nenci, I., Calin, G. A., Querzoli, P., Negrini, M., & Croce, C. M. (2005). MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer research*, 65(16), 7065–7070. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1783>

Ivanovska, I., Ball, A. S., Diaz, R. L., Magnus, J. F., Kibukawa, M., Schelter, J. M., Kobayashi, S. V., Lim, L., Burchard, J., Jackson, A. L., Linsley, P. S., & Cleary, M. A. (2008). MicroRNAs in the miR-106b family regulate p21/CDKN1A and promote

- cell cycle progression. *Molecular and cellular biology*, 28(7), 2167–2174. <https://doi.org/10.1128/MCB.01977-07>
- Jay, C., Nemunaitis, J., Chen, P., Fulgham, P., & Tong, A. W. (2007). miRNA profiling for diagnosis and prognosis of human cancer. *DNA and cell biology*, 26(5), 293–300. <https://doi.org/10.1089/dna.2006.0554>
- Jay, C., Nemunaitis, J., Chen, P., Fulgham, P., & Tong, A. W. (2007). miRNA profiling for diagnosis and prognosis of human cancer. *DNA and cell biology*, 26(5), 293–300. <https://doi.org/10.1089/dna.2006.0554>
- Jazbutyte, V., Fiedler, J., Kneitz, S., Galuppo, P., Just, A., Holzmann, A., Bauersachs, J., & Thum, T. (2013). MicroRNA-22 increases senescence and activates cardiac fibroblasts in the aging heart. *Age (Dordrecht, Netherlands)*, 35(3), 747–762. <https://doi.org/10.1007/s11357-012-9407-9>
- Jones, M., & Lal, A. (2012). MicroRNAs, wild-type and mutant p53: more questions than answers. *RNA biology*, 9(6), 781–791. <https://doi.org/10.4161/rna.20146>
- Jones, M., & Lal, A. (2012). MicroRNAs, wild-type and mutant p53: more questions than answers. *RNA biology*, 9(6), 781–791. <https://doi.org/10.4161/rna.20146>
- Junqueira, V. B., Barros, S. B., Chan, S. S., Rodrigues, L., Giavarotti, L., Abud, R. L., & Deucher, G. P. (2004). Aging and oxidative stress. *Molecular aspects of medicine*, 25(1-2), 5–16. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2004.02.003>
- Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., & Tabtiang, R. (1993). A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature*, 366(6454), 461–464. <https://doi.org/10.1038/366461a0>
- Khor, Y. S., & Wong, P. F. (2024). MicroRNAs-associated with FOXO3 in cellular senescence and other stress responses. *Biogerontology*, 25(1), 23–51. <https://doi.org/10.1007/s10522-023-10059-6>
- Khor, Y. S., & Wong, P. F. (2024). MicroRNAs-associated with FOXO3 in cellular senescence and other stress responses. *Biogerontology*, 25(1), 23–51. <https://doi.org/10.1007/s10522-023-10059-6>
- Kim, K. H., Park, G. T., Lim, Y. B., Rue, S. W., Jung, J. C., Sonn, J. K., Bae, Y. S., Park, J. W., & Lee, Y. S. (2004). Expression of connective tissue growth factor, a biomarker in senescence of human diploid fibroblasts, is up-regulated by a transforming growth factor-beta-mediated signaling pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, 318(4), 819–825. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.04.108>
- Kim, V. N., Han, J., & Siomi, M. C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(2), 126–139. <https://doi.org/10.1038/nrm2632>

- Kloosterman, W. P., & Plasterk, R. H. (2006). The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Developmental cell*, 11(4), 441–450. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.09.009>
- Kolios, G., & Moodley, Y. (2013). Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration; international review of thoracic diseases*, 85(1), 3–10. <https://doi.org/10.1159/000345615>
- Kørbling, M., & Estrov, Z. (2003). Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept?. *The New England journal of medicine*, 349(6), 570–582. <https://doi.org/10.1056/NEJMra022361>
- Kortlever, R. M., Higgins, P. J., & Bernards, R. (2006). Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nature cell biology*, 8(8), 877–884. <https://doi.org/10.1038/ncb1448>
- Kruger N. J. (1994). The Bradford method for protein quantitation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 32, 9–15. <https://doi.org/10.1385/0-89603-268-X:9>
- Kudryavtseva, A. V., Krasnov, G. S., Dmitriev, A. A., Alekseev, B. Y., Kardymon, O. L., Sadritdinova, A. F., Fedorova, M. S., Pokrovsky, A. V., Melnikova, N. V., Kaprin, A. D., Moskalev, A. A., & Snezhkina, A. V. (2016). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget*, 7(29), 44879–44905. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9821>
- Kuilman, T., & Peeper, D. S. (2009). Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nature reviews. Cancer*, 9(2), 81–94. <https://doi.org/10.1038/nrc2560>
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L. C., Douma, S., van Doorn, R., Desmet, C. J., Aarden, L. A., Mooi, W. J., & Peeper, D. S. (2008). Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell*, 133(6), 1019–1031. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.039>
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L. C., Douma, S., van Doorn, R., Desmet, C. J., Aarden, L. A., Mooi, W. J., & Peeper, D. S. (2008). Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell*, 133(6), 1019–1031. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.039>
- Kulaberoglu, Y., Hergovich, A., & Gómez, V. (2021). The role of p53/p21/p16 in DNA damage signaling and DNA repair. In *Elsevier eBooks* (pp. 257–274). <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-85679-9.00015-544>
- Kumar, M., Lu, Z., Takwi, A. A., Chen, W., Callander, N. S., Ramos, K. S., Young, K. H., & Li, Y. (2011). Negative regulation of the tumor suppressor p53 gene by microRNAs. *Oncogene*, 30(7), 843–853. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.457>
- Kumar, S., Millis, A. J., & Baglioni, C. (1992). Expression of interleukin 1-inducible genes and production of interleukin 1 by aging human fibroblasts. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America, 89(10), 4683–4687.
<https://doi.org/10.1073/pnas.89.10.4683>

Kumar, S., Millis, A. J., & Baglioni, C. (1992). Expression of interleukin 1-inducible genes and production of interleukin 1 by aging human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(10), 4683–4687.
<https://doi.org/10.1073/pnas.89.10.4683>

Kumazaki, T., Kobayashi, M., & Mitsui, Y. (1993). Enhanced expression of fibronectin during in vivo cellular aging of human vascular endothelial cells and skin fibroblasts. *Experimental cell research*, 205(2), 396–402.
<https://doi.org/10.1006/excr.1993.1103>

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Current biology : CB*, 12(9), 735–739. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)00809-6](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)00809-6)

Lal, A., Kim, H. H., Abdelmohsen, K., Kuwano, Y., Pullmann, R., Jr, Srikantan, S., Subrahmanyam, R., Martindale, J. L., Yang, X., Ahmed, F., Navarro, F., Dykxhoorn, D., Lieberman, J., & Gorospe, M. (2008). p16(INK4a) translation suppressed by miR-24. *PloS one*, 3(3), e1864. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001864>

Le, M. T., Teh, C., Shyh-Chang, N., Xie, H., Zhou, B., Korzh, V., Lodish, H. F., & Lim, B. (2009). MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. *Genes & development*, 23(7), 862–876. <https://doi.org/10.1101/gad.1767609>

Lee, A. C., Fenster, B. E., Ito, H., Takeda, K., Bae, N. S., Hirai, T., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Howard, B. H., & Finkel, T. (1999). Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *The Journal of biological chemistry*, 274(12), 7936–7940. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.12.7936>

Lee, E. J., Gusev, Y., Jiang, J., Nuovo, G. J., Lerner, M. R., Frankel, W. L., Morgan, D. L., Postier, R. G., Brackett, D. J., & Schmittgen, T. D. (2007). Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *International journal of cancer*, 120(5), 1046–1054. <https://doi.org/10.1002/ijc.22394>

Lee, E. J., Gusev, Y., Jiang, J., Nuovo, G. J., Lerner, M. R., Frankel, W. L., Morgan, D. L., Postier, R. G., Brackett, D. J., & Schmittgen, T. D. (2007). Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *International journal of cancer*, 120(5), 1046–1054. <https://doi.org/10.1002/ijc.22394>

Lee, J. H., Park, S. J., Jeong, S. Y., Kim, M. J., Jun, S., Lee, H. S., Chang, I. Y., Lim, S. C., Yoon, S. P., Yong, J., & You, H. J. (2015). MicroRNA-22 Suppresses DNA Repair and Promotes Genomic Instability through Targeting of MDC1. *Cancer research*, 75(7), 1298–1310. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2783>

- Li, B., Shi, X. B., Nori, D., Chao, C. K., Chen, A. M., Valicenti, R., & White, R. de V. (2011). Down-regulation of microRNA 106b is involved in p21-mediated cell cycle arrest in response to radiation in prostate cancer cells. *The Prostate*, 71(6), 567–574. <https://doi.org/10.1002/pros.21272>
- Liang, J., Wan, M., Zhang, Y., Gu, P., Xin, H., Jung, S. Y., Qin, J., Wong, J., Cooney, A. J., Liu, D., & Songyang, Z. (2008). Nanog and Oct4 associate with unique transcriptional repression complexes in embryonic stem cells. *Nature cell biology*, 10(6), 731–739. <https://doi.org/10.1038/ncb1736>
- Lingor, P., 2010. Regulation of Cell Death and Survival by RNA Interference - The Roles of miRNA and siRNA. Apoptosome: An up-and-Coming Therapeutic Tool 95-117
- Liu, D., & Hornsby, P. J. (2007). Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer research*, 67(7), 3117–3126. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3452>
- Liu, H. L., Nan, H., Zhao, W. W., Wan, X. B., & Fan, X. J. (2024). Phase separation in DNA double-strand break response. *Nucleus (Austin, Tex.)*, 15(1), 2296243. <https://doi.org/10.1080/19491034.2023.2296243>
- Liu, J., Gao, J., Liang, Z., Gao, C., Niu, Q., Wu, F., & Zhang, L. (2022). Mesenchymal stem cells and their microenvironment. *Stem cell research & therapy*, 13(1), 429. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02985-y>
- Liu, X., Yu, J., Jiang, L., Wang, A., Shi, F., Ye, H., & Zhou, X. (2009). MicroRNA-222 regulates cell invasion by targeting matrix metalloproteinase 1 (MMP1) and manganese superoxide dismutase 2 (SOD2) in tongue squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer genomics & proteomics*, 6(3), 131–139.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- López-Bermejo, A., Buckway, C. K., Devi, G. R., Hwa, V., Plymate, S. R., Oh, Y., & Rosenfeld, R. G. (2000). Characterization of insulin-like growth factor-binding protein-related proteins (IGFBP-rPs) 1, 2, and 3 in human prostate epithelial cells: potential roles for IGFBP-rP1 and 2 in senescence of the prostatic epithelium. *Endocrinology*, 141(11), 4072–4080. <https://doi.org/10.1210/endo.141.11.7783>
- Lu, S. Y., Chang, K. W., Liu, C. J., Tseng, Y. H., Lu, H. H., Lee, S. Y., & Lin, S. C. (2006). Ripe areca nut extract induces G1 phase arrests and senescence-associated phenotypes in normal human oral keratinocyte. *Carcinogenesis*, 27(6), 1273–1284. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgi357>

- Lu, S. Y., Chang, K. W., Liu, C. J., Tseng, Y. H., Lu, H. H., Lee, S. Y., & Lin, S. C. (2006). Ripe areca nut extract induces G1 phase arrests and senescence-associated phenotypes in normal human oral keratinocyte. *Carcinogenesis*, 27(6), 1273–1284. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgi357>
- Lu, T., Tian, L., Han, Y., Vogelbaum, M., & Stark, G. R. (2007). Dose-dependent cross-talk between the transforming growth factor-beta and interleukin-1 signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(11), 4365–4370. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700118104>
- Ma, L., He, X., & Wu, Q. (2023). The Molecular Regulatory Mechanism in Multipotency and Differentiation of Wharton's Jelly Stem Cells. *International journal of molecular sciences*, 24(16), 12909. <https://doi.org/10.3390/ijms241612909>
- Macip, S., Igarashi, M., Fang, L., Chen, A., Pan, Z. Q., Lee, S. W., & Aaronson, S. A. (2002). Inhibition of p21-mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence. *The EMBO journal*, 21(9), 2180–2188. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.9.2180>
- Maier, J. A., Statuto, M., & Ragnotti, G. (1994). Endogenous interleukin 1 alpha must be transported to the nucleus to exert its activity in human endothelial cells. *Molecular and cellular biology*, 14(3), 1845–1851. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.3.1845-1851.1994>
- Maier, J. A., Voulalas, P., Roeder, D., & Maciag, T. (1990). Extension of the life-span of human endothelial cells by an interleukin-1 alpha antisense oligomer. *Science (New York, N.Y.)*, 249(4976), 1570–1574. <https://doi.org/10.1126/science.2218499>
- Majo, F., Rochat, A., Nicolas, M., Jaoudé, G. A., & Barrandon, Y. (2008). Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. *Nature*, 456(7219), 250–254. <https://doi.org/10.1038/nature07406>
- Mantovani, A., Locati, M., Vecchi, A., Sozzani, S., & Allavena, P. (2001). Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines. *Trends in immunology*, 22(6), 328–336. [https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(01\)01941-x](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(01)01941-x)
- Mantovani, A., Locati, M., Vecchi, A., Sozzani, S., & Allavena, P. (2001). Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines. *Trends in immunology*, 22(6), 328–336. [https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(01\)01941-x](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(01)01941-x)
- Mao, A., Liu, Y., Wang, Y., Zhao, Q., Zhou, X., Sun, C., Di, C., Si, J., Gan, L., & Zhang, H. (2016). miR-449a enhances radiosensitivity through modulating pRb/E2F1 in prostate cancer cells. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(4), 4831–4840. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4336-8>
- Marasa, B. S., Srikantan, S., Martindale, J. L., Kim, M. M., Lee, E. K., Gorospe, M., & Abdelmohsen, K. (2010). MicroRNA profiling in human diploid fibroblasts

uncovers miR-519 role in replicative senescence. *Aging*, 2(6), 333–343. <https://doi.org/10.18632/aging.100159>

Marasa, B. S., Srikantan, S., Masuda, K., Abdelmohsen, K., Kuwano, Y., Yang, X., Martindale, J. L., Rinker-Schaeffer, C. W., & Gorospe, M. (2009). Increased MKK4 abundance with replicative senescence is linked to the joint reduction of multiple microRNAs. *Science signaling*, 2(94), ra69. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000442>

Martin, M. M., Buckenberger, J. A., Jiang, J., Malana, G. E., Nuovo, G. J., Chotani, M., Feldman, D. S., Schmittgen, T. D., & Elton, T. S. (2007). The human angiotensin II type 1 receptor +1166 A/C polymorphism attenuates microRNA-155 binding. *The Journal of biological chemistry*, 282(33), 24262–24269. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701050200> (Retraction published J Biol Chem. 2013 Feb 8;288(6):4227. doi: 10.1074/jbc.A112.701050)

Martin, M. M., Lee, E. J., Buckenberger, J. A., Schmittgen, T. D., & Elton, T. S. (2006). MicroRNA-155 regulates human angiotensin II type 1 receptor expression in fibroblasts. *The Journal of biological chemistry*, 281(27), 18277–18284. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601496200> (Retraction published J Biol Chem. 2013 Feb 8;288(6):4226. doi: 10.1074/jbc.A112.601496)

Martinez, I., Cazalla, D., Almstead, L. L., Steitz, J. A., & DiMaio, D. (2011). miR-29 and miR-30 regulate B-Myb expression during cellular senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(2), 522–527. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017346108>

Martins, R., Lithgow, G. J., & Link, W. (2016). Long live FOXO: unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity. *Aging cell*, 15(2), 196–207. <https://doi.org/10.1111/accel.12427>

Masaki, S., Ohtsuka, R., Abe, Y., Muta, K., & Umemura, T. (2007). Expression patterns of microRNAs 155 and 451 during normal human erythropoiesis. *Biochemical and biophysical research communications*, 364(3), 509–514. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.10.077>

McCormick, J. B., & Huso, H. A. (2010). Stem cells and ethics: current issues. *Journal of cardiovascular translational research*, 3(2), 122–127. <https://doi.org/10.1007/s12265-009-9155-0>

McElreavey, K. D., Irvine, A. I., Ennis, K. T., & McLean, W. H. (1991). Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. *Biochemical Society transactions*, 19(1), 29S. <https://doi.org/10.1042/bst019029s>

McHugh, D., & Gil, J. (2018). Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *The Journal of cell biology*, 217(1), 65–77. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708092>

- McLachlan, J. A., Serkin, C. D., Morrey-Clark, K. M., & Bakouche, O. (1995). Immunological functions of aged human monocytes. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*, 63(3), 148–159. <https://doi.org/10.1159/000163946>
- McLachlan, J. A., Serkin, C. D., Morrey-Clark, K. M., & Bakouche, O. (1995). Immunological functions of aged human monocytes. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*, 63(3), 148–159. <https://doi.org/10.1159/000163946>
- McQuibban, G. A., Gong, J. H., Wong, J. P., Wallace, J. L., Clark-Lewis, I., & Overall, C. M. (2002). Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood*, 100(4), 1160–1167.
- Meftahi, G. H., Bahari, Z., Zarei Mahmoudabadi, A., Iman, M., & Jangravi, Z. (2021). Applications of western blot technique: From bench to bedside. *Biochemistry and molecular biology education : a bimonthly publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 49(4), 509–517. <https://doi.org/10.1002/bmb.21516>
- Mehta, I. S., Figgitt, M., Clements, C. S., Kill, I. R., & Bridger, J. M. (2007). Alterations to nuclear architecture and genome behavior in senescent cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1100, 250–263. <https://doi.org/10.1196/annals.1395.027>
- Menghini, R., Casagrande, V., Cardellini, M., Martelli, E., Terrinoni, A., Amati, F., Vasa-Nicotera, M., Ippoliti, A., Novelli, G., Melino, G., Lauro, R., & Federici, M. (2009). MicroRNA 217 modulates endothelial cell senescence via silent information regulator 1. *Circulation*, 120(15), 1524–1532. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.864629>
- Metcalf D. (2013). The colony-stimulating factors and cancer. *Cancer immunology research*, 1(6), 351–356. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0151>
- Millis, A. J., Hoyle, M., McCue, H. M., & Martini, H. (1992). Differential expression of metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase genes in aged human fibroblasts. *Experimental cell research*, 201(2), 373–379. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(92\)90286-h](https://doi.org/10.1016/0014-4827(92)90286-h)
- Ming, G. F., Wu, K., Hu, K., Chen, Y., & Xiao, J. (2016). NAMPT regulates senescence, proliferation, and migration of endothelial progenitor cells through the SIRT1 AS lncRNA/miR-22/SIRT1 pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, 478(3), 1382–1388. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.133>

- Mishra, M., Tiwari, S., & Gomes, A. V. (2017). Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques. *Expert review of proteomics*, 14(11), 1037–1053. <https://doi.org/10.1080/14789450.2017.1388167>
- Mittal, S., Aslam, A., Doidge, R., Medica, R., & Winkler, G. S. (2011). The Ccr4a (CNOT6) and Ccr4b (CNOT6L) deadenylase subunits of the human Ccr4-Not complex contribute to the prevention of cell death and senescence. *Molecular biology of the cell*, 22(6), 748–758. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-11-0898>
- Miwa, S., Kashyap, S., Chini, E., & von Zglinicki, T. (2022). Mitochondrial dysfunction in cell senescence and aging. *The Journal of clinical investigation*, 132(13), e158447. <https://doi.org/10.1172/JCI158447>
- Momand, J., Wu, H. H., & Dasgupta, G. (2000). MDM2--master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene*, 242(1-2), 15–29. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(99\)00487-4](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(99)00487-4)
- Moodley, Y., Ilancheran, S., Samuel, C., Vaghjiani, V., Atienza, D., Williams, E. D., Jenkin, G., Wallace, E., Trounson, A., & Manuelpillai, U. (2010). Human amnion epithelial cell transplantation abrogates lung fibrosis and augments repair. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 182(5), 643–651. <https://doi.org/10.1164/rccm.201001-0014OC>
- Mudhasani, R., Zhu, Z., Hutvagner, G., Eischen, C. M., Lyle, S., Hall, L. L., Lawrence, J. B., Imbalzano, A. N., & Jones, S. N. (2008). Loss of miRNA biogenesis induces p19Arf-p53 signaling and senescence in primary cells. *The Journal of cell biology*, 181(7), 1055–1063. <https://doi.org/10.1083/jcb.200802105>
- Munk, R., Panda, A. C., Grammatikakis, I., Gorospe, M., & Abdelmohsen, K. (2017). Senescence-Associated MicroRNAs. *International review of cell and molecular biology*, 334, 177–205. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2017.03.008>
- Munk, S., Sigurðsson, J. O., Xiao, Z., Batth, T. S., Franciosa, G., von Stechow, L., Lopez-Contreras, A. J., Vertegaal, A. C. O., & Olsen, J. V. (2017). Proteomics Reveals Global Regulation of Protein SUMOylation by ATM and ATR Kinases during Replication Stress. *Cell reports*, 21(2), 546–558. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.059>
- Musilova, K., & Mraz, M. (2015). MicroRNAs in B-cell lymphomas: how a complex biology gets more complex. *Leukemia*, 29(5), 1004–1017. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.351>
- Mylonas, A., & O'Loughlen, A. (2022). Cellular Senescence and Ageing: Mechanisms and Interventions. *Frontiers in aging*, 3, 866718. <https://doi.org/10.3389/fragi.2022.866718>

- Nakanishi, M., Ozaki, T., Yamamoto, H., Hanamoto, T., Kikuchi, H., Furuya, K., Asaka, M., Delia, D., & Nakagawara, A. (2007). NFBD1/MDC1 associates with p53 and regulates its function at the crossroad between cell survival and death in response to DNA damage. *The Journal of biological chemistry*, 282(31), 22993–23004. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611412200>
- Narita, M., N  nez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A. W., Hearn, S. A., Spector, D. L., Hannon, G. J., & Lowe, S. W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*, 113(6), 703–716. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00401-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00401-x)
- Nebel, A., & Bosch, T. C. (2012). Evolution of human longevity: lessons from Hydra. *Aging*, 4(11), 730–731. <https://doi.org/10.18632/aging.100510>
- Neurohr, G. E., Terry, R. L., Lengefeld, J., Bonney, M., Brittingham, G. P., Moretto, F., Miettinen, T. P., Vaites, L. P., Soares, L. M., Paulo, J. A., Harper, J. W., Buratowski, S., Manalis, S., van Werven, F. J., Holt, L. J., & Amon, A. (2019). Excessive Cell Growth Causes Cytoplasm Dilution And Contributes to Senescence. *Cell*, 176(5), 1083–1097.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.018>
- Newman, M. A., & Hammond, S. M. (2010). Emerging paradigms of regulated microRNA processing. *Genes & development*, 24(11), 1086–1092. <https://doi.org/10.1101/gad.1919710>
- Nguyen, D. D. N., Zain, S. M., Kamarulzaman, M. H., Low, T. Y., Chilian, W. M., Pan, Y., Ting, K. N., Hamid, A., Abdul Kadir, A., & Pung, Y. F. (2021). Intracellular and exosomal microRNAome profiling of human vascular smooth muscle cells during replicative senescence. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 321(4), H770–H783. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00058.2021>
- Nikiforova, M. N., Tseng, G. C., Steward, D., Diorio, D., & Nikiforov, Y. E. (2008). MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 93(5), 1600–1608. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-2696>
- Nikiforova, M. N., Tseng, G. C., Steward, D., Diorio, D., & Nikiforov, Y. E. (2008). MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 93(5), 1600–1608. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-2696>
- Niland, S., Riscanevo, A. X., & Eble, J. A. (2021). Matrix Metalloproteinases Shape the Tumor Microenvironment in Cancer Progression. *International journal of molecular sciences*, 23(1), 146. <https://doi.org/10.3390/ijms23010146>
- Noguchi, S., Mori, T., Otsuka, Y., Yamada, N., Yasui, Y., Iwasaki, J., Kumazaki, M., Maruo, K., & Akao, Y. (2012). Anti-oncogenic microRNA-203 induces senescence

by targeting E2F3 protein in human melanoma cells. *The Journal of biological chemistry*, 287(15), 11769–11777. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.325027>

Noonan, E. J., Place, R. F., Basak, S., Pookot, D., & Li, L. C. (2010). miR-449a causes Rb-dependent cell cycle arrest and senescence in prostate cancer cells. *Oncotarget*, 1(5), 349–358. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.167>

O'Connell, R. M., Taganov, K. D., Boldin, M. P., Cheng, G., & Baltimore, D. (2007). MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(5), 1604–1609. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610731104>

Okada, M., Kim, H. W., Matsu-ura, K., Wang, Y. G., Xu, M., & Ashraf, M. (2016). Abrogation of Age-Induced MicroRNA-195 Rejuvenates the Senescent Mesenchymal Stem Cells by Reactivating Telomerase. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 34(1), 148–159. <https://doi.org/10.1002/stem.2211>

O'Loghlen, A., Brookes, S., Martin, N., Rapisarda, V., Peters, G., & Gil, J. (2015). CBX7 and miR-9 are part of an autoregulatory loop controlling p16(INK) (4a). *Aging cell*, 14(6), 1113–1121. <https://doi.org/10.1111/accel.12404>

origin, maintenance and induction. *Stem cell reviews and reports*, 6(4), 633–649.
Osaki, M., Takeshita, F., Sugimoto, Y., Kosaka, N., Yamamoto, Y., Yoshioka, Y., Kobayashi, E., Yamada, T., Kawai, A., Inoue, T., Ito, H., Oshimura, M., & Ochiya, T. (2011). MicroRNA-143 regulates human osteosarcoma metastasis by regulating matrix metalloprotease-13 expression. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 19(6), 1123–1130. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.53>

Ovcharenko, D., Kelnar, K., Johnson, C., Leng, N., & Brown, D. (2007). Genome-scale microRNA and small interfering RNA screens identify small RNA modulators of TRAIL-induced apoptosis pathway. *Cancer research*, 67(22), 10782–10788. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1484>

Overhoff, M. G., Garbe, J. C., Koh, J., Stampfer, M. R., Beach, D. H., & Bishop, C. L. (2014). Cellular senescence mediated by p16INK4A-coupled miRNA pathways. *Nucleic acids research*, 42(3), 1606–1618. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1096>

Pallante, P., Visone, R., Ferracin, M., Ferraro, A., Berlingieri, M. T., Troncone, G., Chiappetta, G., Liu, C. G., Santoro, M., Negrini, M., Croce, C. M., & Fusco, A. (2006). MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. *Endocrine-related cancer*, 13(2), 497–508. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01209>

Pallante, P., Visone, R., Ferracin, M., Ferraro, A., Berlingieri, M. T., Troncone, G., Chiappetta, G., Liu, C. G., Santoro, M., Negrini, M., Croce, C. M., & Fusco, A.

(2006). MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. *Endocrine-related cancer*, 13(2), 497–508. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01209>

Palmieri, C., Roberts-Clark, D., Assadi-Sabet, A., Coope, R. C., O'Hare, M., Sunter, A., Hanby, A., Slade, M. J., Gomm, J. J., Lam, E. W., & Coombes, R. C. (2003). Fibroblast growth factor 7, secreted by breast fibroblasts, is an interleukin-1beta-induced paracrine growth factor for human breast cells. *The Journal of endocrinology*, 177(1), 65–81. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1770065>

Palmieri, D., Watson, J. M., & Rinehart, C. A. (1999). Age-related expression of PEDF/EPC-1 in human endometrial stromal fibroblasts: implications for interactive senescence. *Experimental cell research*, 247(1), 142–147. <https://doi.org/10.1006/excr.1998.4341>

Parrinello, S., Coppe, J. P., Krtolica, A., & Campisi, J. (2005). Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *Journal of cell science*, 118(Pt 3), 485–496. <https://doi.org/10.1242/jcs.01635>

Piette, J., Neel, H., & Maréchal, V. (1997). Mdm2: keeping p53 under control. *Oncogene*, 15(9), 1001–1010. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201432>

Princilly, J., Veerabhadrapa, B., Rao, N. N., & Dyavaiah, M. (2023). Cellular senescence in aging: Molecular basis, implications and therapeutic interventions. *Advances in protein chemistry and structural biology*, 136, 1–33. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2023.02.021>

Princilly, J., Veerabhadrapa, B., Rao, N. N., & Dyavaiah, M. (2023). Cellular senescence in aging: Molecular basis, implications and therapeutic interventions. *Advances in protein chemistry and structural biology*, 136, 1–33. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2023.02.021>

Quintero-Ronderos P, Arango MT, Castiblanco J, et al. Analysis of proteins and antibodies. In: Anaya JM, Shoenfeld Y, Rojas-Villarraga A, et al., editors. Autoimmunity: From Bench to Bedside [Internet]. Bogota (Colombia): El Rosario University Press; 2013 Jul 18. Chapter 48. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459443/>

Ranganath P. (2015). MicroRNA-155 and Its Role in Malignant Hematopoiesis. *Biomarker insights*, 10, 95–102. <https://doi.org/10.4137/BMI.S27676>

Rasoamanantana, P., Thweatt, R., Labat-Robert, J., & Goldstein, S. (1994). Altered regulation of fibronectin gene expression in Werner syndrome fibroblasts. *Experimental cell research*, 213(1), 121–127. <https://doi.org/10.1006/excr.1994.1181>

Ren, X. S., Yin, M. H., Zhang, X., Wang, Z., Feng, S. P., Wang, G. X., Luo, Y. J., Liang, P. Z., Yang, X. Q., He, J. X., & Zhang, B. L. (2014). Tumor-suppressive microRNA-449a induces growth arrest and senescence by targeting E2F3 in human

lung cancer cells. *Cancer letters*, 344(2), 195–203.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.10.031>

Rodier, F., Coppé, J. P., Patil, C. K., Hoeijmakers, W. A., Muñoz, D. P., Raza, S. R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A. R., & Campisi, J. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nature cell biology*, 11(8), 973–979. <https://doi.org/10.1038/ncb1909>

Rodier, F., Coppé, J. P., Patil, C. K., Hoeijmakers, W. A., Muñoz, D. P., Raza, S. R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A. R., & Campisi, J. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nature cell biology*, 11(8), 973–979. <https://doi.org/10.1038/ncb1909>

Rodier, F., Coppé, J. P., Patil, C. K., Hoeijmakers, W. A., Muñoz, D. P., Raza, S. R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A. R., & Campisi, J. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nature cell biology*, 11(8), 973–979. <https://doi.org/10.1038/ncb1909>

Rodriguez, A., Vigorito, E., Clare, S., Warren, M. V., Couttet, P., Soond, D. R., van Dongen, S., Grocock, R. J., Das, P. P., Miska, E. A., Vetrie, D., Okkenhaug, K., Enright, A. J., Dougan, G., Turner, M., & Bradley, A. (2007). Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5824), 608–611. <https://doi.org/10.1126/science.1139253>

Rossant J. (2001). Stem cells from the Mammalian blastocyst. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 19(6), 477–482. <https://doi.org/10.1634/stemcells.19-6-477>

Rossato, M., Curtale, G., Tamassia, N., Castellucci, M., Mori, L., Gasperini, S., Mariotti, B., De Luca, M., Mirolo, M., Cassatella, M. A., Locati, M., & Bazzoni, F. (2012). IL-10-induced microRNA-187 negatively regulates TNF- α , IL-6, and IL-12p40 production in TLR4-stimulated monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(45), E3101–E3110. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209100109>

Sarkar, D., Lebedeva, I. V., Emdad, L., Kang, D. C., Baldwin, A. S., Jr, & Fisher, P. B. (2004). Human polynucleotide phosphorylase (hPNPaseold-35): a potential link between aging and inflammation. *Cancer research*, 64(20), 7473–7478. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1772>

Sarkar, D., Lebedeva, I. V., Emdad, L., Kang, D. C., Baldwin, A. S., Jr, & Fisher, P. B. (2004). Human polynucleotide phosphorylase (hPNPaseold-35): a potential link between aging and inflammation. *Cancer research*, 64(20), 7473–7478. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1772>

Sarkar, S., Vellaichamy, E., Young, D., & Sen, S. (2004). Influence of cytokines and growth factors in ANG II-mediated collagen upregulation by fibroblasts in rats: role of myocytes. *American journal of physiology. Heart and circulatory*

physiology, 287(1), H107–H117. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00763.2003> (Retraction published Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2021 Mar 1;320(3):H1018. doi: 10.1152/ajpheart.00763.2003_RET)

Sato, I., Morita, I., Kaji, K., Ikeda, M., Nagao, M., & Murota, S. (1993). Reduction of nitric oxide producing activity associated with in vitro aging in cultured human umbilical vein endothelial cell. *Biochemical and biophysical research communications*, 195(2), 1070–1076. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.2153>

Secunda, R., Vennila, R., Mohanashankar, A. M., Rajasundari, M., Jeswanth, S., & Surendran, R. (2015). Isolation, expansion and characterisation of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood and matrix: a comparative study. *Cytotechnology*, 67(5), 793–807. <https://doi.org/10.1007/s10616-014-9718-z>

Seoane, J., Le, H. V., & Massagué, J. (2002). Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature*, 419(6908), 729–734. <https://doi.org/10.1038/nature01119>

Sethupathy, P., Borel, C., Gagnebin, M., Grant, G. R., Deutsch, S., Elton, T. S., Hatzigeorgiou, A. G., & Antonarakis, S. E. (2007). Human microRNA-155 on chromosome 21 differentially interacts with its polymorphic target in the AGTR1 3' untranslated region: a mechanism for functional single-nucleotide polymorphisms related to phenotypes. *American journal of human genetics*, 81(2), 405–413. <https://doi.org/10.1086/519979>

Shang, J., Yao, Y., Fan, X., Shangguan, L., Li, J., Liu, H., & Zhou, Y. (2016). miR-29c-3p promotes senescence of human mesenchymal stem cells by targeting CNOT6 through p53-p21 and p16-pRB pathways. *Biochimica et biophysica acta*, 1863(4), 520–532. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.01.005>

Sharma, V., Collins, L. B., Chen, T. H., Herr, N., Takeda, S., Sun, W., Swenberg, J. A., & Nakamura, J. (2016). Oxidative stress at low levels can induce clustered DNA lesions leading to NHEJ mediated mutations. *Oncotarget*, 7(18), 25377–25390. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8298>

Shawi, M., & Autexier, C. (2008). Telomerase, senescence and ageing. *Mechanisms of ageing and development*, 129(1-2), 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2007.11.007>

Skalsky, R. L., Samols, M. A., Plaisance, K. B., Boss, I. W., Riva, A., Lopez, M. C., Baker, H. V., & Renne, R. (2007). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes an ortholog of miR-155. *Journal of virology*, 81(23), 12836–12845. <https://doi.org/10.1128/JVI.01804-07>

Sokolova, V., Fiorino, A., Zoni, E., Crippa, E., Reid, J. F., Gariboldi, M., & Pierotti, M. A. (2015). The Effects of miR-20a on p21: Two Mechanisms Blocking Growth

Arrest in TGF- β -Responsive Colon Carcinoma. *Journal of cellular physiology*, 230(12), 3105–3114. <https://doi.org/10.1002/jcp.25051>

Song, J., Jin, E. H., Kim, D., Kim, K. Y., Chun, C. H., & Jin, E. J. (2014). MicroRNA-222 regulates MMP-13 via targeting HDAC-4 during osteoarthritis pathogenesis. *BBA clinical*, 3, 79–89. <https://doi.org/10.1016/j.bbcli.2014.11.009>

Szafranska, A. E., Davison, T. S., John, J., Cannon, T., Sipos, B., Maghnouj, A., Labourier, E., & Hahn, S. A. (2007). MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene*, 26(30), 4442–4452. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210228>

Szafranska, A. E., Davison, T. S., John, J., Cannon, T., Sipos, B., Maghnouj, A., Labourier, E., & Hahn, S. A. (2007). MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene*, 26(30), 4442–4452. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210228>

Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K. J., & Baltimore, D. (2006). NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(33), 12481–12486. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605298103>

Takahashi, A., Ohtani, N., & Hara, E. (2007). Irreversibility of cellular senescence: dual roles of p16INK4a/Rb-pathway in cell cycle control. *Cell division*, 2, 10. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-2-10>

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>

Thai, T. H., Calado, D. P., Casola, S., Ansel, K. M., Xiao, C., Xue, Y., Murphy, A., Frendewey, D., Valenzuela, D., Kutok, J. L., Schmidt-Suppran, M., Rajewsky, N., Yancopoulos, G., Rao, A., & Rajewsky, K. (2007). Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5824), 604–608. <https://doi.org/10.1126/science.1141229>

Tili, E., Michaille, J. J., Cimino, A., Costinean, S., Dumitru, C. D., Adair, B., Fabbri, M., Alder, H., Liu, C. G., Calin, G. A., & Croce, C. M. (2007). Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179(8), 5082–5089. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.8.5082>

Torigoe, T. H., Willcox, D. C., Shimabukuro, M., Higa, M., Gerschenson, M., Andrukhiv, A., Suzuki, M., Morris, B. J., Chen, R., Gojanovich, G. S., Allsopp, R. C., & Willcox, B. J. (2024). Novel protective effect of the FOXO3 longevity genotype on mechanisms of cellular aging in Okinawans. *npj aging*, 10(1), 18. <https://doi.org/10.1038/s41514-024-00142-8>

Tothova Z, Gilliland DG (2007) FoxO transcription factors and stem cell homeostasis: insights from the hematopoietic system. *Cell Stem Cell* 1:140–152

Van Den Steen, P. E., Wuyts, A., Husson, S. J., Proost, P., Van Damme, J., & Opdenakker, G. (2003). Gelatinase B/MMP-9 and neutrophil collagenase/MMP-8 process the chemokines human GCP-2/CXCL6, ENA-78/CXCL5 and mouse GCP-2/LIX and modulate their physiological activities. *European journal of biochemistry*, 270(18), 3739–3749. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03760.x>

van der Loo, B., Labugger, R., Skepper, J. N., Bachschmid, M., Kilo, J., Powell, J. M., Palacios-Callender, M., Erusalimsky, J. D., Quaschnig, T., Malinski, T., Gygi, D., Ullrich, V., & Lüscher, T. F. (2000). Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *The Journal of experimental medicine*, 192(12), 1731–1744. <https://doi.org/10.1084/jem.192.12.1731>

Verma, R. P., & Hansch, C. (2007). Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 15(6), 2223–2268. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.01.011>

Vigorito, E., Perks, K. L., Abreu-Goodger, C., Bunting, S., Xiang, Z., Kohlhaas, S., Das, P. P., Miska, E. A., Rodriguez, A., Bradley, A., Smith, K. G., Rada, C., Enright, A. J., Toellner, K. M., MacLennan, I. C., & Turner, M. (2007). microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. *Immunity*, 27(6), 847–859. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.10.009>

Visone, R., Pallante, P., Vecchione, A., Cirombella, R., Ferracin, M., Ferraro, A., Volinia, S., Coluzzi, S., Leone, V., Borbone, E., Liu, C. G., Petrocca, F., Troncone, G., Calin, G. A., Scarpa, A., Colato, C., Tallini, G., Santoro, M., Croce, C. M., & Fusco, A. (2007). Specific microRNAs are downregulated in human thyroid anaplastic carcinomas. *Oncogene*, 26(54), 7590–7595. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210564>

Visone, R., Pallante, P., Vecchione, A., Cirombella, R., Ferracin, M., Ferraro, A., Volinia, S., Coluzzi, S., Leone, V., Borbone, E., Liu, C. G., Petrocca, F., Troncone, G., Calin, G. A., Scarpa, A., Colato, C., Tallini, G., Santoro, M., Croce, C. M., & Fusco, A. (2007). Specific microRNAs are downregulated in human thyroid anaplastic carcinomas. *Oncogene*, 26(54), 7590–7595. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210564>

Vizioli, M. G., Liu, T., Miller, K. N., Robertson, N. A., Gilroy, K., Lagnado, A. B., Perez-Garcia, A., Kiourtis, C., Dasgupta, N., Lei, X., Kruger, P. J., Nixon, C., Clark,

W., Jurk, D., Bird, T. G., Passos, J. F., Berger, S. L., Dou, Z., & Adams, P. D. (2020). Mitochondria-to-nucleus retrograde signaling drives formation of cytoplasmic chromatin and inflammation in senescence. *Genes & development*, 34(5-6), 428–445. <https://doi.org/10.1101/gad.331272.119>

Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C. G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., Prueitt, R. L., Yanaihara, N., Lanza, G., Scarpa, A., Vecchione, A., Negrini, M., Harris, C. C., & Croce, C. M. (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(7), 2257–2261. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510565103>

Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C. G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., Prueitt, R. L., Yanaihara, N., Lanza, G., Scarpa, A., Vecchione, A., Negrini, M., Harris, C. C., & Croce, C. M. (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(7), 2257–2261. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510565103>

Wang Z. (2011). The guideline of the design and validation of MiRNA mimics. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 676, 211–223. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-863-8_15

Wang, B., Kohli, J., & Demaria, M. (2020). Senescent Cells in Cancer Therapy: Friends or Foes?. *Trends in cancer*, 6(10), 838–857. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.05.004>

Wang, S., Moerman, E. J., Jones, R. A., Thweatt, R., & Goldstein, S. (1996). Characterization of IGFBP-3, PAI-1 and SPARC mRNA expression in senescent fibroblasts. *Mechanisms of ageing and development*, 92(2-3), 121–132. [https://doi.org/10.1016/s0047-6374\(96\)01814-3](https://doi.org/10.1016/s0047-6374(96)01814-3)

Wang, X., Tang, S., Le, S. Y., Lu, R., Rader, J. S., Meyers, C., & Zheng, Z. M. (2008). Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth. *PloS one*, 3(7), e2557. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002557>

Wang, X., Tang, S., Le, S. Y., Lu, R., Rader, J. S., Meyers, C., & Zheng, Z. M. (2008). Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth. *PloS one*, 3(7), e2557. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002557>

Wang, Z., Oron, E., Nelson, B., Razis, S., & Ivanova, N. (2012). Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in human embryonic stem cells. *Cell stem cell*, 10(4), 440–454. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.02.016>

- Webb, A. E., Kundaje, A., & Brunet, A. (2016). Characterization of the direct targets of FOXO transcription factors throughout evolution. *Aging cell*, 15(4), 673–685. <https://doi.org/10.1111/accel.12479>
- Weber, F., Teresi, R. E., Broelsch, C. E., Frilling, A., & Eng, C. (2006). A limited set of human MicroRNA is deregulated in follicular thyroid carcinoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 91(9), 3584–3591. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-0693>
- Weber, F., Teresi, R. E., Broelsch, C. E., Frilling, A., & Eng, C. (2006). A limited set of human MicroRNA is deregulated in follicular thyroid carcinoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 91(9), 3584–3591. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-0693>
- Wei, W., & Ji, S. (2018). Cellular senescence: Molecular mechanisms and pathogenicity. *Journal of cellular physiology*, 233(12), 9121–9135. <https://doi.org/10.1002/jcp.26956>
- Weng, Z., Wang, Y., Ouchi, T., Liu, H., Qiao, X., Wu, C., Zhao, Z., Li, L., & Li, B. (2022). Mesenchymal Stem/Stromal Cell Senescence: Hallmarks, Mechanisms, and Combating Strategies. *Stem cells translational medicine*, 11(4), 356–371. <https://doi.org/10.1093/stcltm/szac004>
- Weng, Z., Wang, Y., Ouchi, T., Liu, H., Qiao, X., Wu, C., Zhao, Z., Li, L., & Li, B. (2022). Mesenchymal Stem/Stromal Cell Senescence: Hallmarks, Mechanisms, and Combating Strategies. *Stem cells translational medicine*, 11(4), 356–371. <https://doi.org/10.1093/stcltm/szac004>
- West, M. D., Pereira-Smith, O. M., & Smith, J. R. (1989). Replicative senescence of human skin fibroblasts correlates with a loss of regulation and overexpression of collagenase activity. *Experimental cell research*, 184(1), 138–147. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(89\)90372-8](https://doi.org/10.1016/0014-4827(89)90372-8)
- West, M. D., Shay, J. W., Wright, W. E., & Linskens, M. H. (1996). Altered expression of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor during cellular senescence. *Experimental gerontology*, 31(1-2), 175–193. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(95\)02013-6](https://doi.org/10.1016/0531-5565(95)02013-6)
- Xin, M. G., Zhang, J., Block, E. R., & Patel, J. M. (2003). Senescence-enhanced oxidative stress is associated with deficiency of mitochondrial cytochrome c oxidase in vascular endothelial cells. *Mechanisms of ageing and development*, 124(8-9), 911–919. [https://doi.org/10.1016/s0047-6374\(03\)00163-5](https://doi.org/10.1016/s0047-6374(03)00163-5)
- Xing Y-Q, Li A, Yang Y, Li X-X, Zhang L-N, Guo H-C (2018) The regulation of FOXO1 and its role in disease progression. *Life Sci* 193:124–131

- Xu, D., Takeshita, F., Hino, Y., Fukunaga, S., Kudo, Y., Tamaki, A., Matsunaga, J., Takahashi, R. U., Takata, T., Shimamoto, A., Ochiya, T., & Tahara, H. (2011). miR-22 represses cancer progression by inducing cellular senescence. *The Journal of cell biology*, 193(2), 409–424. <https://doi.org/10.1083/jcb.201010100>
- Xu, X., Chen, W., Miao, R., Zhou, Y., Wang, Z., Zhang, L., Wan, Y., Dong, Y., Qu, K., & Liu, C. (2015). miR-34a induces cellular senescence via modulation of telomerase activity in human hepatocellular carcinoma by targeting FoxM1/c-Myc pathway. *Oncotarget*, 6(6), 3988–4004. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2905>
- Yamakuchi M. (2012). MicroRNA Regulation of SIRT1. *Frontiers in physiology*, 3, 68. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00068>
- Yan, L. X., Huang, X. F., Shao, Q., Huang, M. Y., Deng, L., Wu, Q. L., Zeng, Y. X., & Shao, J. Y. (2008). MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA (New York, N.Y.)*, 14(11), 2348–2360. <https://doi.org/10.1261/rna.1034808>
- Yan, L. X., Huang, X. F., Shao, Q., Huang, M. Y., Deng, L., Wu, Q. L., Zeng, Y. X., & Shao, J. Y. (2008). MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA (New York, N.Y.)*, 14(11), 2348–2360. <https://doi.org/10.1261/rna.1034808>
- Yan, S., Sorrell, M., & Berman, Z. (2014). Functional interplay between ATM/ATR-mediated DNA damage response and DNA repair pathways in oxidative stress. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 71(20), 3951–3967. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1666-4>
- Yanaihara, N., Caplen, N., Bowman, E., Seike, M., Kumamoto, K., Yi, M., Stephens, R. M., Okamoto, A., Yokota, J., Tanaka, T., Calin, G. A., Liu, C. G., Croce, C. M., & Harris, C. C. (2006). Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer cell*, 9(3), 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.01.025>
- Yanaihara, N., Caplen, N., Bowman, E., Seike, M., Kumamoto, K., Yi, M., Stephens, R. M., Okamoto, A., Yokota, J., Tanaka, T., Calin, G. A., Liu, C. G., Croce, C. M., & Harris, C. C. (2006). Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer cell*, 9(3), 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.01.025>
- Yao S. (2016). MicroRNA biogenesis and their functions in regulating stem cell potency and differentiation. *Biological procedures online*, 18, 8. <https://doi.org/10.1186/s12575-016-0037-y>
- Yi, C., Wang, Q., Wang, L., Huang, Y., Li, L., Liu, L., Zhou, X., Xie, G., Kang, T., Wang, H., Zeng, M., Ma, J., Zeng, Y., & Yun, J. P. (2012). MiR-663, a microRNA targeting p21(WAF1/CIP1), promotes the proliferation and tumorigenesis of

nasopharyngeal carcinoma. *Oncogene*, 31(41), 4421–4433.
<https://doi.org/10.1038/onc.2011.629>

Yin, Q., McBride, J., Fewell, C., Lacey, M., Wang, X., Lin, Z., Cameron, J., & Flemington, E. K. (2008). MicroRNA-155 is an Epstein-Barr virus-induced gene that modulates Epstein-Barr virus-regulated gene expression pathways. *Journal of virology*, 82(11), 5295–5306. <https://doi.org/10.1128/JVI.02380-07>

Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z. (2019). Stem cells: past, present, and future. *Stem cell research & therapy*, 10(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>

Zeng, G., & Millis, A. J. (1996). Differential regulation of collagenase and stromelysin mRNA in late passage cultures of human fibroblasts. *Experimental cell research*, 222(1), 150–156. <https://doi.org/10.1006/excr.1996.0019>

Zhang H. (2007). Molecular signaling and genetic pathways of senescence: Its role in tumorigenesis and aging. *Journal of cellular physiology*, 210(3), 567–574. <https://doi.org/10.1002/jcp.20919>

Zhang, J., Jia, J., Zhao, L., Li, X., Xie, Q., Chen, X., Wang, J., & Lu, F. (2016). Down-regulation of microRNA-9 leads to activation of IL-6/Jak/STAT3 pathway through directly targeting IL-6 in HeLa cell. *Molecular carcinogenesis*, 55(5), 732–742. <https://doi.org/10.1002/mc.22317>

Zhang, J., Zhang, D., Wu, G. Q., Feng, Z. Y., & Zhu, S. M. (2013). Propofol inhibits the adhesion of hepatocellular carcinoma cells by upregulating microRNA-199a and downregulating MMP-9 expression. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT*, 12(3), 305–309. [https://doi.org/10.1016/s1499-3872\(13\)60048-x](https://doi.org/10.1016/s1499-3872(13)60048-x)

Zhang, L., Zhang, C., Zheng, J., Wang, Y., Wei, X., Yang, Y., & Zhao, Q. (2024). miR-155-5p/Bmal1 Modulates the Senescence and Osteogenic Differentiation of Mouse BMSCs through the Hippo Signaling Pathway. *Stem cell reviews and reports*, 20(2), 554–567. <https://doi.org/10.1007/s12015-023-10666-3>

Zhang, R., Poustovoitov, M. V., Ye, X., Santos, H. A., Chen, W., Daganzo, S. M., Erzberger, J. P., Serebriiskii, I. G., Canutescu, A. A., Dunbrack, R. L., Pehrson, J. R., Berger, J. M., Kaufman, P. D., & Adams, P. D. (2005). Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Developmental cell*, 8(1), 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.10.019>

Zhang, Y., Wang, Y., Wang, X., Zhang, Y., Eisner, G. M., Asico, L. D., Jose, P. A., & Zeng, C. (2011). Insulin promotes vascular smooth muscle cell proliferation via microRNA-208-mediated downregulation of p21. *Journal of hypertension*, 29(8), 1560–1568. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e328348ef8e>

Zhao Y, Liu Y-S (2021) Longevity factor FOXO3: a key regulator in aging-related vascular diseases. *Front Cardiovasc Med* 8:778674

Zhou, Z., Yin, Y., Chang, Q., Sun, G., Lin, J., & Dai, Y. (2017). Downregulation of B-myb promotes senescence via the ROS-mediated p53/p21 pathway, in vascular endothelial cells. *Cell proliferation*, 50(2), e12319. <https://doi.org/10.1111/cpr.12319>

Zor, T., & Selinger, Z. (1996). Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Analytical biochemistry*, 236(2), 302–308. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0171>