

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

DAMIR QUIEN

PROMJENE U IZRAŽAJU GENA HUMANOG CRVULJKA IZAZVANE
STARENJEM

Doktorski rad

Split, 2026.

Doktorska disertacija je izrađena u Klinici za Kirurgiju, Klinici za dječju kirurgiju, Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju Kliničkog bolničkog centra Split te Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu.

Mentorica: doc.dr.sc. Marina Degoricija

ZAHVALA

Ovim putem želim izraziti svoju iskrenu zahvalnost svojoj mentorici doc.dr.sc.Marini Degoreiciji, na njezinoj iznimnoj stručnosti, strpljenju i podršci tijekom cijelog procesa izrade ovog doktorskog rada. Njezini savjeti, poticaji i konstruktivne primjedbe bili su od presudne važnosti za oblikovanje i dovršetak ovog istraživanja.

Zahvaljujem se i svojim kolegama doc.dr.sc. Ognjenu Barčotu, doc.dr.sc. Matiji Boriću, prof.dr.sc. Zenonu Pogoreliću, prof.dr.sc Katarini Vilović, izv.prof.dr.sc. Jeleni Korać Prlić te dr.sc. Ivanu Malešu koji su nesebično dijelili svoje znanje i iskustvo te mi pružali tehničku i logističku pomoć te poticajnu radnu atmosferu u tijeku istraživanja.

Posebnu zahvalnost dugujem svojim prijateljima, a osobito Jeleni Viculin, koji su me podržavali tijekom zahtjevnih razdoblja istraživanja i pisanja, ohrabrivali me i pomagali mi zadržati ravnotežu između znanstvenog rada i privatnog života.

Najdublje se zahvaljujem svojoj obitelji, ocu Josipu, sestri Maji, djeci Toniju i Bepu na bezuvjetnoj podršci, razumijevanju i strpljenju. Vaša vjera u mene, ljubav i ohrabrenje bili su ključni za dovršetak ovog doktorskog rada.

Mojoj supruzi Tini bez čije podrške, ljubavi i motivacije ne bi bio tu gdje jesam. Tvoja ljubav i vjera u mene, čak i kada sam sam sumnjao, me uvijek gurala naprijed. Hvala ti!

Ovu disertaciju posvećujem svojoj pokojnoj majci Anđi čija me je snaga u teškim životnim trenucima uvijek inspirirala i motivirala. Hvala ti mama.

Također je posvećujem mom malenom anđelu Nini koja me je naučila što znači voljeti i izgubiti.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Starenje tkiva	2
1.1.1. Starenje kao biološki proces	2
1.1.2. Obilježja starenja	4
1.1.3. Starenje imunološkog sustava i upalni procesi povezani sa starenjem	11
1.1.4. Sistemsko i tkivno specifično starenje	13
1.2. Starenje probave	15
1.2.1. Strukturalne i morfološke promjene probavnog sustava pri starenju	15
1.2.2. Poremećaj funkcije crijevne barijere	16
1.2.3. Starenje mikrobioma	17
1.2.4. Promjene funkcije crijevnih matičnih stanica	18
1.2.5. Imunološke promjene u GALT-u pri starenju	18
1.3. Crvuljak	19
1.3.1. Povijesni pregled	19
1.3.2. Histološka građa crvuljka	22
1.3.3. Moderan pogled na funkciju crvuljka	23
1.3.4. Apendektomija: kirurški pogled i kliničko značenje	25
1.4. Imunološko starenje i promjene limfnog tkiva	28
1.4.1. Involucija timusa	28
1.4.2. Starenje sekundarnih limfnih organa	29
1.4.3. Degenerativne promjene limfnih folikula crvuljka	30
1.4.4. Promjene urođene i stečene imunosti tijekom starenja	31
1.5. Oksidacijski stres i promjene transkriptoma u starenju	33
1.5.1. Teorija slobodnih radikala i starenje	33
1.5.2. Signalni put faktora NRF2 i antioksidansi	34
1.5.3. Pojačani izražaj gena kao odgovor na stres tijekom starenja	36

1.6.	Starenje crijevnog živčanog sustava.....	38
1.6.1.	Uloga crijevnog živčanog sustava u probavi.....	38
1.6.2.	Gubitak neurona tijekom starenja crijeva.....	39
1.6.3.	Funkcionalne posljedice starenja	41
1.7.	Transkriptomika u istraživanju starenja	42
1.7.1.	Razvoj i važnost transkriptomike u istraživanju starenja.....	42
1.7.2.	Metodologija RNA sekvenciranja	44
1.7.3.	Promjene transkriptoma tijekom starenja.....	46
1.7.4.	Prednosti i uloga modernih pristupa istraživanja starenja.....	48
1.8.	Problematika istraživanja starenja crvuljka.....	50
2.	CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA	54
2.1.	Hipoteza	55
2.2.	Ciljevi istraživanja.....	55
3.	METODE I MATERIJALI	56
3.1.	Ustroj istraživanja	57
3.2.	Uzorci ljudskih crvuljaka	57
3.3.	Veličina uzorka	57
3.4.	Kriteriji uključenja i isključenja	58
3.5.	Sekvenciranje RNA.....	58
3.6.	Histološka analiza	59
3.7.	Statistička analiza.....	60
3.8.	Etička načela	60
4.	REZULTATI.....	61
4.1.	Osnovne karakteristike pacijenata.....	62
4.2.	Promjene izražaja gena crvuljka gerijatrijske populacije.....	64
4.3.	Promjene izražaja spolno vezanih gena crvuljka	72
4.4.	Promjene izražaja gena crvuljka progresivno uvjetovane starenjem	74

4.5. Promjene u izražaju gena crvuljka u pacijenata s gastrointestinalnim tumorima	83
5. RASPRAVA.....	86
6. ZAKLJUČAK	94
7. SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU	97
8. LAIČKI SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU	100
9. SUMMARY	102
10. LAY SUMMARY	105
11. LITERATURA.....	107
12. ŽIVOTOPIS	143
13. DODATAK	146

POPIS OZNAKA I KRATICA

ABI3BP - eng. *ABI family member 3 binding protein*

ADAR2 - eng. *adenosine deaminase acting on RNA 2*

ADHFE1 - eng. *alcohol dehydrogenase, iron containing 1 (engl.)*

AGTR1 - eng. *angiotensin II receptor type 1 (AT1 receptor; angiotenzinski II receptor tip 1)*

AIFM2 - eng. *apoptosis-inducing factor, mitochondria-associated 2*

ALS - amiotrofična lateralna skleroza

AMPA - eng. *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*

AMPK - eng. *AMP-activated protein kinase*

ANKAR - eng. *ankyrin repeat domain-containing protein*

AP1 - eng. *activator protein-1*

AREG - eng. *amphiregulin*

ARSE - eng. *arylsulfatase E (sulfataza E)*

ATG5 - eng. *autophagy-related protein 5*

ATG7 - eng. *autophagy-related protein 7*

ATP - eng. *adenosine triphosphate; adenozin-trifosfat*

B2M - beta-2-mikroglobulin

BMP - eng. *bone morphogenetic protein; koštani morfogogenetski protein*

bulkRNA seq - eng. *bulk RNA sequencing*

CACNA2D1 - eng. *voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-1*

CaV1.1-RyR1 – eng. *l-type voltage-gated calcium channel cav1.1 i ryanodine receptor 1 complex*

CCL11 - eng. *C-C motif chemokine ligand 11 (eotaksin-1)*

CCL13 - eng. *C-C motif chemokine ligand 13 (MCP-4)*

CDKN1A - eng. *cyclin-dependent kinase inhibitor 1a*

CDKN2A - eng. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2a*

CHAT – kolin acetiltransferaza

CLDN1 - eng. *claudin-1*

CLDN2 - eng. *claudin-2*

CNTN1 - eng. *Contactin-1*

COMTD1 - eng. *catechol-O-methyltransferase domain-containing protein 1*

COX-2 – ciklooksigenaza 2

CpG - eng. *cytosine-phosphate-guanine dinucleotide* (CpG mjesto / otok)

CRP – C-reaktivni protein

Cx43 – eng. *connexin 43*

DDX3Y - eng. *DEAD-box helicase 3, Y-linked*

DEG - diferencijalno eksprimirani gen

DNA - deoksiribonukleinska kiselina

EBP - eng. *estrogen-binding protein*

EIF1AY - eng. *eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked*

ELAVL4 - eng. *ELAV-like RNA binding protein 4*

ERAT - eng. *endoscopic retrograde appendicitis therapy*,

ERCP - eng. *endoscopic retrograde cholangiopancreatography*

ERCP - eng. *endoscopic retrograde cholangiopancreatography*

EST - označeni izraženi slijed; eng. *expressed sequence tag*

EVPL2 - eng. *envoplakin-like protein 2*

FDR - eng. *false discovery rate*

FDXR - eng. *ferredoxin reductase*

FGFBP1 – eng. *fibroblast growth factor-binding protein 1*

FOSB - eng. *FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B*

FOXO3 - eng. *forkhead box O3*

GALT - eng. *gut-associated lymphoid tissue*

GCLC - eng. *glutamate-cysteine ligase catalytic subunit*

GCLM - eng. *glutamate-cysteine ligase modifier subunit*

GDF11 - eng. *growth differentiation factor 11*

GDF15 - eng. *growth differentiation factor 15*

GDNF - eng. *glial cell line-derived neurotrophic factor*

GLRB - eng. *glycine receptor subunit beta*

GPT2 - eng. *glutamate pyruvate transaminase 2*

GRIA2 - eng. *glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2*

GRIA3 – eng. *glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3*

GRIK2 - eng. *glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 2*

GRIK3 - eng. *glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 3*

GSEA - analiza obogaćenosti skupa gena; eng. *Gene Set Enrichment Analysis*

GSH - reducirani glutation

GSSG - oksidirani glutation

Hedgehog - Hedgehog signalni put

HES6 - eng. *hes family bHLH transcription factor 6*

HLA-DR - klasa II MHC, HLA-DR, eng. *Human leukocyte antigen DR isotype*

HMOX1 - hemoksigenaza 1

HSP - protein toplinskog šoka, eng. *Heat shock protein*

IgA - Imunoglobulin A

IgG - Imunoglobulin G

IIS/IGF1 - eng. *Insulin/insulin-like growth factor-1 signalling*

IL-1 - Interleukin-1

IL-1 β - Interleukin-1 beta (IL-1 β)

IL-6 - Interleukin-6

IL17 - Interleukin-17

ILC3 - eng. *group 3 innate lymphoid cells*

IPAN - crijevni primarni aferentni neuroni

JAM2 - eng. *junctional adhesion molecule 2*

JSRP1 - eng. *junctional sarcoplasmic reticulum protein 1*

KCNAB1 - eng. *voltage-gated potassium channel subunit beta-1*

KCNMB2 - eng. *calcium-activated potassium channel subunit beta-2*

KDM5D - eng. *lysine-specific demethylase 5D*

KEAP1 - eng. *kelch-like ECH-associated protein 1*

KEGG - eng. *Kyoto encyclopedia of genes and genomes*

KLK11 - kalikrein-11

KLK12 - kalikrein-12

LGALS3 - galektin-3

Lgr5 - eng. *leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5*

LILRA5 - eng. *leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily A member 5*

LPAR4 – eng. *lysophosphatidic acid receptor 4*

LPS - lipopolisaharid

MALT - eng. *mucosa-associated lymphoid tissue*

MAP1LC3C - eng. *microtubule-associated protein 1 light chain 3C (LC3C)*

MAPK - eng. *mitogen-activated protein kinase*

MDA - malondialdehyd

MGST1 - eng. *Microsomal glutathione S-transferase 1*

MHC - glavni kompleks histokompatibilnosti

miRNA - mikro RNA

MOCOS - eng. *Molybdenum cofactor sulfurase*

mTOR - eng. *mechanistic (mammalian) target of rapamycin*

MUC2 - Mucin 2

MUC5AC - Mucin 5AC

NAD⁺ - nikotinamide adenine dinukleotida

NADPH - nikotinamide adenine dinukleotida fosfat

NCAM2 - eng. *neural cell adhesion molecule 2*

NCM460 - ljudska crijevna epitelna stanična linija NCM460

NECTIN4 - eng. *nectin cell adhesion molecule 4*

NEGR1 - eng. *neuronal growth regulator 1*

NELL2 - eng. *neural epidermal growth factor-like 2*

NFE2L2 - eng. *Nuclear factor, erythroid-derived 2-like 2*

NF-κB - eng. *Nuclear factor kappa-B*

NGS - sekvenciranje nove generacije

NLGN4Y - eng. *neuroligin-4 Y-linked*

NOG - eng. *Noggin*

NOS1 - eng. *Nitric oxide synthase 1*

NOTCH - Notch signalni put

NOTES - eng. *natural orifice transluminal endoscopic surgery*

NQO1 - eng. *NAD(P)H quinone dehydrogenase 1*

NRXN1 - neureksin-1

OCLN - okludin

OLFM4 - olfaktomedin 4

PCA - eng. *principal component analysis*

PCDH11Y - eng. *protocadherin 11 Y-linked*

PCSK9 - eng. *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*

PGE2 - prostaglandin E2

PJVK - pejvakin

PLP1 - proteolipidni protein 1

PTGER3 - prostaglandinski E receptor 3

PYCR1 - eng. *pyrroline-5-carboxylate reductase 1*

REG1B - eng. *regenerating islet-derived protein 1 beta*

REG4 - eng. *regenerating islet-derived protein 4*

RET - eng. *RET proto-oncogene (rearranged during transfection)*

RIC3 - eng. *Resistance to inhibitors of cholinesterase 3*

RNA - ribonukleinska kiselina

ROS - reaktivne kisikove vrste

RPS4Y1 - eng. *ribosomal protein S4 Y-linked 1*

S100B - eng. *S100 calcium-binding protein B*

SASP - eng. *senescence-associated secretory phenotype*

scRNA-seq - eng. *single-cell RNA sequencing*

SDS - natrijev dodecil-sulfat

SILS - eng. *Single-incision laparoscopic surgery*

snRNA seq - eng. *single-nucleus RNA sequencing*

SPDEF - eng. *SAM pointed domain-containing ETS transcription factor*

SPINK1 - eng. *serine peptidase inhibitor Kazal type 1*

SPINK4 - eng. *serine peptidase inhibitor Kazal type 4*

ST - eng. *spatial transcriptomics*

STAT1 - eng. *signal transducer and activator of transcription 1*

TEDC2 - eng. *tubulin epsilon and delta complex 2*

TER - transepitelički električni otpor

TFF3 - trefoil faktor 3

THRB - eng. *thyroid hormone receptor beta*

TMEM255 - transmembranski protein 255

TNF- α - eng. *tumor necrosis factor alpha*

TNFRSF12A - eng. *Tumor necrosis factor receptor superfamily member 12A*

TORC1 - eng. *target of rapamycin complex 1 (mTOR kompleks 1)*

TPSG1 - eng. *Tryptase gamma 1*

TSPAN32 - *tetraspanin-32*

TTC39A – eng. *tetratricopeptide repeat domain protein 39A*

TV - eng. *transvaginal*

UCHL - eng. *ubiquitin C-terminal hydrolase L-family*

USP9Y - eng. *ubiquitin-specific peptidase 9 Y-linked*

UTY - eng. *ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene Y-linked*

VIP - vazoaktivni intestinalni peptid

Wnt/ β -katenin - Wnt/ β -katenin signalni put

ZFY - eng. *zinc finger protein Y-linked*

ZMAT1 - eng. *zinc finger matrin-type protein 1*

ZO1 - eng. *zonula occludens-1; tight junction protein 1 (TJP1)*

1. UVOD

1.1. Starenje tkiva

1.1.1. Starenje kao biološki proces

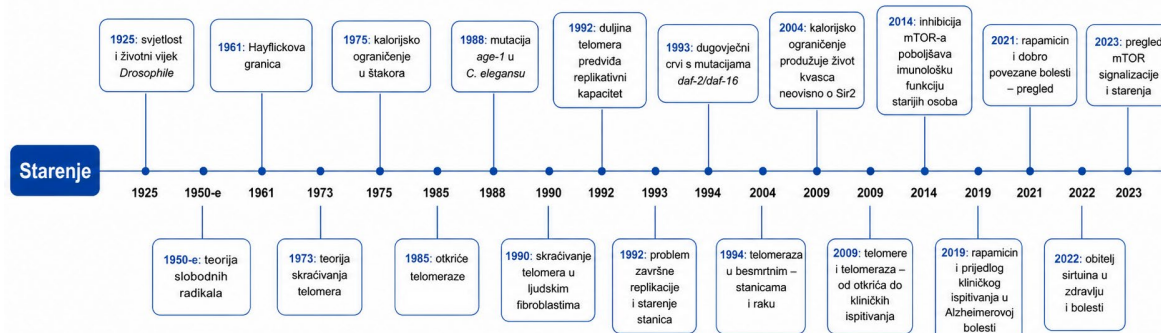
Starenje predstavlja složeni proces psihofizičkog propadanja, karakteriziran progresivnom staničnom i organskom disfunkcijom te nagomilavanjem DNA oštećenja koje dovodi do promjena u izražaju gena. Starenjem tkiva prolaze kroz niz morfoloških i funkcionalnih promjena koje mogu narušiti homeostazu tkiva te organizam postaje podložan razvoju bolesti poput tumora, šećerne bolesti, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih oboljenja (1). Povijesno gledano, starenje je promatrano kao nestrukturirano, gotovo nasumično i nepredvidljivo propadanje tkiva, dok u novije vrijeme istraživanja ukazuju na složen proces predvođen specifičnim molekularnim i staničnim promjenama.

Broj osoba starijih od 60 godina prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji porast će na više od 1,4 milijarde na svjetskoj razini do 2030. godine, prvenstveno zbog poboljšanja životnih uvjeta (2). U Europi je ovaj trend dodatno naglašen zbog niskog nataliteta te možemo govoriti o epidemiji starenja koja zbog pratećih bolesti značajno opterećuje zdravstveni sustav. Fokus znanstvenih napora je stoga osigurati što duži životni vijek neopterećen bolestima. Razumijevanje obilježja starenja može doprinijeti boljem shvaćanju načina na koji ovaj proces mijenja ljudski organizam te u budućnosti omogućiti nove metode usporavanja starenja i smanjivanja njegovog utjecaja na tkiva na staničnoj i molekularnoj razini, što bi za posljedicu moglo imati zdraviju i kvalitetniju starost.

Rana istraživanja starenja otkrila su utjecaj svjetlosti na stopu rasta i životni vijek vrste *Drosophila melanogaster* kao i utjecaj kalorijske restrikcije na starenje i bolesti povezane sa starenjem na miševima i štakorima (3,4). Mogućnost utjecaja na starenje tada je posljedično privukla velik interes znanstvene zajednice i javnosti, što je dovelo do porasta broja radova o starenju. Već 1956. godine Harman je objavio rad o učinku slobodnih kisikovih radikala, nastalih kao posljedica vanjskog zračenja ili normalnih metaboličkih procesa u tkivu, čije je nakupljanje ključno za oštećenje stanica i predstavlja podlogu za starenje i razvoj bolesti (5). Prethodno rašireno uvjerenje da stanice imaju kapacitet neograničene diobe svojom je istraživanjem na fibroblastima opovrgnuo Leonard Hayflick, dokazujući da fibroblasti imaju ograničen kapacitet dioba (50 puta) prije nastupa senescencije (6). Razlog za ograničen broj dioba objasnio je Olovnikov u svom radu, pretpostavljajući da je problem u nemogućnosti potpune replikacije kraja kromosoma (eng. *the end replication problem*) (7). Telomere, krajnji dijelovi kromosoma, svakim staničnim ciklusom se skraćuju i kada dosegnu kritičnu veličinu, potiču stanični odgovor na oštećenje DNA, što vodi stanicu u senescenciju te ujedno objašnjava

Hayflickove rezultate (8–10). Skraćivanje telomera uslijed nepotpune replikacije krajeva kromosoma značajno ograničava broj replikacija ljudskih stanica i može se promatrati kao marker njihovog životnog vijeka. Telomerase, enzimi koji produljuju telomere, otkriveni su kod jednostaničnih eukariotskih organizama *Tetrahymena* te su na njima postavljeni temelji za istraživanja na ljudskim stanicama (11). Daljnja istraživanja usmjerena su na pojačanu aktivnost telomerase, jer ista nije uočena u normalnim somatskim stanicama (12). Moderna istraživanja imaju za cilj definirati ulogu telomerase u staničnom starenju i razvoju raka, kao i potencijalne terapijske mogućnosti koje iz toga proizlaze (13). Istraživanja na *Caenorhabditis elegans* postavila su temelje genetske kontrole starenja, prvenstveno otkrićem gena *Age-1* i *Daf-2*, koji kodiraju komponente signalnog puta inzulin/inzulinu-sličnog hormona rasta 1 (IGF-1). U navedenom organizmu mutacija gena *Age-1*, prvog otkrivenog gena dugovječnosti, produljuje životni vijek (14). Istraživanje iz 1993. godine utvrdilo je da mutacija gena *Daf-2* dvostruko produžava životni vijek *Caenorhabditis elegans* (15). Navedeni geni su dio signalnog puta faktora rasta IGF-1 kod *Caenorhabditis elegans*, čija je važnost za starenje također opisana i kod ljudi, iako se ti geni razlikuju kod sisavaca. Osim tog signalnog puta, otkriće signalnog puta rapamicina u sisavaca (mTOR) proširilo je spoznaje o postojanju drugih gena s učinkom na produljenje života (16). Inhibicija signalnog puta kinaze mTOR, važnog unutarstaničnog senzora nutrijenata, ima sličan učinak kao i smanjenje kalorijskog unosa: produljuje životni vijek stanica poticanjem mehanizama popravka tkiva i smanjenjem upale (17). Rapamicin, inhibitor signalnog puta mTOR, djeluje kao imunosupresor i onemogućuje prelazak stanice iz faze G1 (prva faza rasta) u fazu S (sinteza) te tako zaustavlja stanični ciklus (18). Potrebna su daljnja klinička istraživanja o rapamicinu kao lijeku za borbu protiv starenja, neurodegenerativnih bolesti i malignoma, kako bi se ispitao njegov terapijski potencijal u budućnosti (19). Iako su sirtuini otkriveni 1980-ih, u kontekstu starenja istraženi su tek krajem 90-ih godina prošlog stoljeća. Sirtuini su nikotin adenin dinukleotid (NAD⁺) acetilaze povezane s regulacijom važnih metaboličkih signalnih puteva. Novija istraživanja upućuju da je učinak sirtuina na dugovječnost prvenstveno vezan uz kalorijsku restrikciju (20). Tijekom posljednja dva desetljeća, istraživanja navode njihovu važnu ulogu u neurodegenerativnim, malignim bolestima i starenju, što je dovelo do razvoja sirtuinskih aktivatora i inhibitora kao budućih terapijskih modaliteta (21).

Spomenuta istraživanja postavila su temelje ideje o plastičnosti starenja te mogućim terapijskim intervencijama koje bi mogle utjecati na produljenje životnog vijeka (slika 1). Složenost ljudskog organizma pretpostavlja da i starenje organizma nije jednostavan proces.



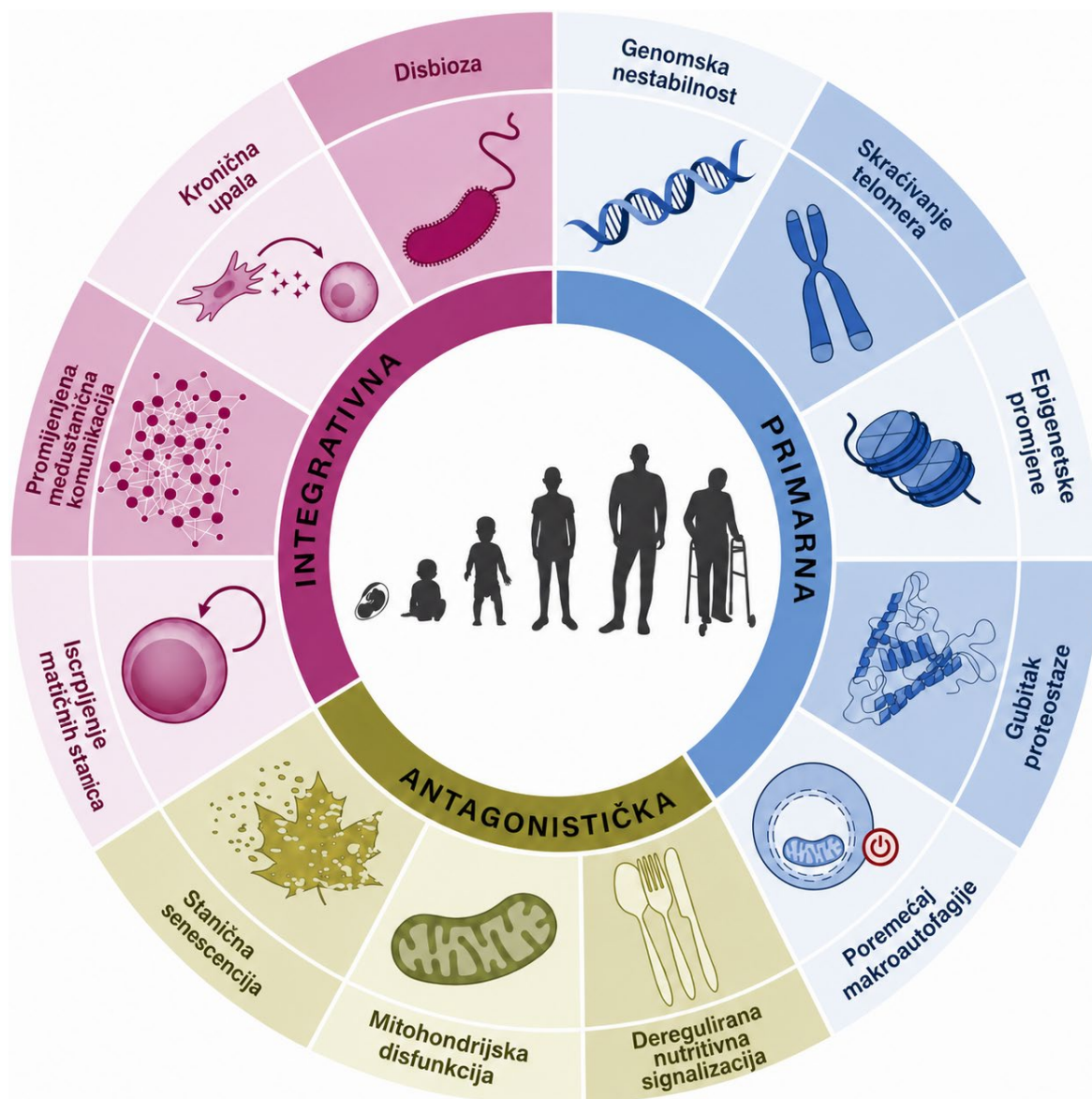
Slika 1. Kronološki pregled važnijih objavljenih istraživanja starenja. Izvor: autor, slika stvorena pomoću UI: Perplexity AI, San Francisco, CA, USA: Perplexity AI; 2026

Multifaktorski pogled na ovaj proces doveo je do porasta broja istraživanja o starenju te se u novije vrijeme definiraju obilježja starenja na sličan način kao što opisujemo obilježja tumorskih oboljenja. Potreba za zdravim životom u kasnim godinama postaje bitna tema u znanosti, pa tako i u zdravstvenim sustavima, no iako zaokuplja pažnju i maštu svjetskih znanstvenika i liječnika, jednostavan odgovor i terapijski modalitet za problem starenja još nije pronađen.

1.1.2. Obilježja starenja

Brojna istraživanja o starenju tijekom godina zahtijevala su sažimanje ključnih koncepata u zajednički okvir. Kao i kod istraživanja malignih bolesti, znanstvena zajednica definirala je karakteristike starenja. Zbog njihove često isprepletene prirode i međuzavisnosti, ne može se u potpunosti govoriti o odvojenim obilježjima, pa je njihova podjela proizvoljna. Kriteriji za obilježja starenja su: 1) vremenska povezanost promjena koje prate proces starenja, 2) mogućnost ubrzavanja starenja eksperimentalnim pojačavanjem obilježja i 3) mogućnost usporavanja, zaustavljanja ili vraćanja procesa starenja unatrag intervencijom na obilježju (22). Obilježja starenja podijeljena su u tri kategorije i obuhvaćaju ukupno dvanaest obilježja: primarna (genska nestabilnost, skraćivanje telomera, epigenetske promjene, gubitak proteostaze, poremećaji makroautofagije), antagonistička (deregulirana nutritivna signalizacija, disfunkcija mitohondrija, stanična senescencija) i integrativna (iscrpljenje matičnih stanica, poremećena međustanična komunikacija, kronična upala, disbioza) (slika 2) (23). Primarna skupina uključuje obilježja nastala kao početna oštećenja koja se nakupljaju tijekom starenja i

smatraju glavnim izvorom drugih oštećenja. Antagonistička obilježja predstavljaju obrambene odgovore organizma na primarna oštećenja, štiteći tijelo dok su manje izražena, ali ako postanu prekomjerno izražena, postaju patološka i pokreću dodatne mehanizme starenja. Integrativna skupina odnosi se na obilježja koja nastaju kao posljedica svih prethodnih i odražavaju sustavne posljedice starenja.



Slika 2. Obilježja starenja. Preuzeto i prilagođeno iz López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell* 2023;186:243–78. doi: 10.1016/j.cell.2022.11.001; prema licenci: 6216460661609, izdanoj 26.2.2026.

Nestabilnost genoma, prvo navedeno obilježje, predstavlja oštećenja genoma nakupljena tokom vremena uzrokovana endogenim ili egzogenim uzrocima, koja mogu dovesti

do različitih tipova oštećenja DNA (točkastih mutacija, delecija, kromosomskih aberacija). Broj somatskih mutacija stanica sisavaca povećava se tijekom života, a dugovječne jedinke nakupljaju manji broj mutacija u svakoj godini života (24). Nakupljanjem epigenetskih promjena tokom života razvija se somatski mozaicizam, koji predstavlja negativnu posljedicu starenja, ali ne mora nužno voditi ka razvoju bolesti ili patološkom stanju (25). Osim direktnih oštećenja jezgre i mitohondrijske DNA i defekti ovojnice stanične jezgre, koja nastaju uslijed oštećenja kodirajućih gena, također mogu dovesti do sindroma ubrzanog starenja, poput Hutchinson-Gilfordove progerije (26).

Skraćivanje telomera pridonosi starenju i nastaje zbog nemogućnosti potpune replikacije krajeva kromosoma tijekom diobe stanica. Kada skraćivanje telomera postane značajno, stanica ulazi u apoptozu ili prelazi u stanje senescencije, uvjetovano staničnim odgovorom na oštećenje DNA (27). Ove pojave prisutne su u normalnom starenju stanica i, za razliku od genomske nestabilnosti, antagonistički djeluju na karcinogenezu jer ograničavaju broj replikacija malignih stanica (28). Uloga telomeraze, enzima sa svojstvom reverzne transkriptaze, je održavanje duljine telomera i prvenstveno je aktivna u zametnim, matičnim stanicama i tumorima, dok je njezina aktivnost odsutna u ljudskim somatskim stanicama (28,29). Poremećaji telomera i telomeraze mogu izazvati bolesti poput aplastične anemije, idopatske plućne fibroze, fibroze jetre s posljedičnom cirozom, kongenitalne diskertoze te Hoyeraal-Hreiderassonov sindroma (30). Uloga telomera i telomeraze u starenju i bolesti nije u potpunosti istražena, te će daljnja istraživanja u budućnosti otvoriti mogućnosti genske i farmakološke intervencije navedenih stanja, kao i terapiju starenja.

Starenje uzrokuje niz epigenetskih promjena koje mogu biti endogenog ili egzogenog porijekla, a obuhvaćaju DNA metilaciju, promjenu ekspresije gena i nekodirajućih RNA, modifikacije histona, reaktivaciju retrotranspozona i remodeliranje kromatina. Metilacija DNA je važna i dobro istražena epigenetska promjena koja izaziva promjene u ekspresiji gena bez da se slijed nukleotida molekule DNA promijeni. Pojavnost metilacije DNA povećava se tijekom starenja i uvjetovana je djelovanjem enzima DNA metiltransferaze. U ranijim studijama, globalna hipometilacija bila je povezana sa starenjem, posebno u intergenskim i ponavljajućim DNA sljedovima (31). Novije analize pokazuju da tijekom starenja, uz globalnu hipometilaciju, usporedno dolazi i do fokalne hipermetilacije CpG otočića, kao kod hipermetilacije promotora tumor supresorskih gena, što može dovesti do karcinogeneze (31,32). Horvath je u svojoj studiji pokazao da DNA metilacija nije prisutna u embrionalnim i pluripotentnim stanicama, te je definirao 353 promotorska CpG otočića koji se hipermetiliraju, a pomoću kojih je formirao

računalne modele za određivanje biološke dobi tkiva, tzv. Horvathov epigenetski sat (33). U daljnjim istraživanjima drugih autora definirani su slični računalni modeli epigenetskih satova koji služe za procjenu biološke dobi u odnosu na kronološku, te se koriste za procjenu učinaka pojedinih intervencija radi produljenja života. Najpoznatiji modeli su Hannumov epigenetski sat, DNA PhenoAge i DNA GrimAge (34–36). Nekodirajuća RNA označava RNA molekule u stanici koje se ne transliraju u proteine, već djeluju kao regulatori koji utječu na izražaj gena i funkciju stanice, a uključuju mikro RNA, duge nekodirajuće RNA i kružne RNA. Važnost nekodirajuće RNA u starenju temelji se na njenom posttranslacijskom utjecaju i povezana je s razvojem mnogih obilježja starenja. Brojna istraživanja fokusiraju se na ulogu mikro RNA u procesu starenja, pri čemu se pad razine specifičnih mikro RNA (miRNA) u krvi povezuje sa razvojem niskog stupnja kronične upale (eng. *inflammaging*) preko porasta razine citokina IL-6 i TNF- α (37). Osim toga, miRNA utječu i na staničnu senescenciju; na primjer, u istraživanju na staničnoj kulturi mezenhimskih matičnih stanica, zabilježena je pojačana ekspresija miRNA tijekom senescencije (38). Histonske modifikacije i remodeliranje kromatina utječu na strukturu i funkciju DNA u stanici. Histoni grade nukleosome oko kojih je DNA omotana, a njihove posttranslacijske modifikacije, poput metilacije, mogu dovesti do promjena u transkripciji gena i regulacije duljine telomera (39). Kompleksi koji remodeliraju kromatin reguliraju ekspresiju gena kroz restrukturiranje nukleosoma za transkripciju i popravak DNA-a, a njihovo opadanje s dobi, zabilježeno u kvascima *Saccharomyces cerevisiae*, povezano je s poremećajima u popravku DNA oštećenja, starenjem i disfunkcijom tkiva (40). Retrotranspozoni su pokretni genetski elementi koji se pomoću RNA međuprodukata umnažaju i umeću u genom. Ovisno o mjestima umetanja, mogu utjecati na transkripciju genoma, stabilnost ili čak utišavanje određenih gena. Njihova reaktivacija igra važnu ulogu u razvoju upalnog fenotipa u starenju, a taj se učinak na miševima može vratiti farmakološkim intervencijama (41). Svi ovi epigenetski mehanizmi konačno utječu na promjenu genske ekspresije. Studija transkriptoma starih i mladih mišićnih matičnih stanica pokazala je značajne razlike u ekspresiji gena tijekom starenja uslijed DNA metilacije (42).

Također, poremećaji metabolizma proteina u stanici igraju značajnu ulogu u starenju. Neurodegenerativne bolesti povezane sa starošću, poput amiotrofne lateralne skleroze (ALS), Alzheimerove bolesti i Parkinsonove bolesti, povezane su s patološkim nakupljanjem proteinskih kompleksa povezanih s poremećenom homeostazom proteina (43). Gubitak proteostaze karakterističan je za starenje i posljedica je neadekvatne sinteze i strukturnog smatanja proteina zbog smanjene aktivnosti staničnih šaperona, direktnih oštećenja na samim

proteinima zbog oksidativnog stresa te, u konačnici, njihove degradacije i neadekvatnog odstranjivanja proteina. Studija na *Caenorhabditis elegans* pokazala je da izlaganje povišenim temperaturama uzrokuje gubitak funkcije metastabilnih proteina osjetljivih na temperaturni stres, što u ranoj odrasloj dobi dovodi do ranijeg i bržeg gubitka proteostaze u usporedbi s normalnim starenjem. (44).

Poremećaj makroautofagije označava smanjenje sposobnosti stanice da odstranjuje nagomilani citoplazmatski materijal putem lizosoma. Osim proteina, ovaj proces obuhvaća i druge makromolekule poput lipida, glikogena, citosolne DNA, kao i cijelih staničnih organela te patogena. Istraživanja na ljudskim staničnim linijama utvrdila su da starenje ima utjecaj na smanjenje izražaja gena povezanih s autofagijom: *ATG5*, *ATG7* i *BECN1* te posljedičnu inhibiciju autofagije (45,46). Nadalje, stimulacija autofagije kroz pojačan izražaj Atg5 u transgeničnih miševa, s druge strane, dovodi do produljenja zdravog životnog vijeka (47).

Deregulirana nutritivna signalizacija označava poremećaj regulacije unutar signalnih puteva inzulin/inzulinu-sličan hormon rasta (IIS/IGF-1) i AMP-aktivirane protein kinaze (AMPK) te rapamicinskog (mTOR) i sirtuinskog signalnog puta u starijoj dobi, čija je prvenstvena zadaća u organizmu spajanje dostupnosti hranjivih tvari s rastom i popravkom stanica i tkiva (48). Starenjem organizma spomenuti anabolički putevi (IIS/IGF-1 i mTOR) postaju pretjerano aktivni, dok katabolički putevi (AMPK, sirtuini) važni za otpornost i odgovor na stres postaju slabije izraženi, ovo za posljedicu ima poremećaj staničnog održavanja i autofagije. FOXO3, transkripcijski faktor povezan sa signalnim putem IIS/IGF-1, smatra se značajnim genom dugovječnosti te je u studijama na ljudima povezan sa produljenim životnim vijekom kao i duljim preživljenjem pacijenata s kardiološkim oboljenjima (49,50). Otkrića vezana za signalne putove nutritivne signalizacije otvorila su prostor za istraživanja potencijalnih intervencija u cilju postizanja dugovječnosti. Kalorijska restrikcija bez izazivanja pothranjenosti, preko navedenih signalnih, produljuje životni vijek *Rhesus* majmuna (51). Podatci iz CALERIE studije, na zdravim dobrovoljcima normalne tjelesne težine, pokazali su utjecaj kalorijske restrikcije na poboljšanje psiholoških i fizioloških ishoda te usporavanje metilacije DNA (52,53).

Mitohondriji su stanični organeli zaduženi za stvaranje adenozin trifosfata (ATP-a). Progresivni gubitak funkcije stvaranja ATP-a u mitohondrijima tokom starenja, uz povećanu proizvodnju reaktivnih kisikovih radikala i nakupljanja oštećenja mitohondrijske DNA, predstavlja važno obilježje starenja. Poremećaj funkcije mitohondrijske DNA polimeraze, enzima odgovornog za replikaciju DNA, u miševa dovodi do nakupljanja mutacija DNA i

skraćenja životnog vijeka uz razvoj tipičnog fenotipa starije dobi (54). Disfunkcija mitohondrija zbog poremećaja proizvodnje energije i povećanog oksidativnog stresa narušava staničnu homeostazu i potencijalno stanicu može uvesti u senescenciju ili apoptozu što u konačnici vodi razvoju tipičnih bolesti povezanih sa starenjem poput neurodegenerativnih i kardioloških oboljenja, pretilosti i šećerne bolesti (55–58).

Stanična senescencija označava prijelaz stanice iz normalnog staničnog ciklusa u stanje u kojem izostaje daljnja dioba i najčešće je uvjetovano onkogenim signalima, infekcijom, oštećenjem genoma, kritičnim skraćenjem telomera, mitohondrijskom disfunkcijom ili mehaničkim oštećenjem (59). U ljudskim tkivima općenito postoji jasna korelacija između starenja i početka stanične senescencije, uz prisutnu heterogenost stope senescencije u različitim tkivima (60). Iako se senescencija smatra obilježjem starenja nalazimo je i u embrionalnim tkivima kao dio fizioloških procesa tokom ranog razvoja života što je pokazano na životinjskom modelu (61). Fiziološka senescencija podrazumijeva prelazak stanice u stanje senescencije i potom, zbog lokalne aktivacije imunološkog odgovora, odstranjivanje senescentnih stanica te popravak tkiva. Ukoliko stanica ostane u trajnoj senescenciji, bez uklanjanja od strane imunološkog sustava, razvija se sekretorni fenotip povezan sa senescencijom (eng. *senescence associated secretory phenotype*, SASP) odgovoran za razvoj mnogih bolesti tipičnih za stariju dob i upale tkiva povezane sa starenjem. Odstranjenje senescentnih stanica kod progeroidnih miševa primjenom farmakološke intervencije dovodi do produljenja životnog vijeka i kasnijeg nastupa disfunkcije tkiva i razvoja bolesti specifičnih za stariju životnu dob (62). Farmakološke intervencije poput ove mogle bi u budućnosti definirati terapijske intervencije u svrhu uklanjanja senescentnih stanica i poboljšanja kvalitete života u starijoj životnoj dobi.

Starenjem matične stanice prolaze kroz niz promjena koje se očituju gubitkom pluripotentnosti zbog visokog stupnja diferencijacije i smanjenja njihovog ukupnog broja što nazivamo iscrpljenjem matičnih stanica. Nakon ozljede tkiva diferencirane somatske stanice mogu proći dediferencijaciju uz promjenu izražaja gena te u konačnici pretvorbu u matičnu stanicu koja omogućava tkivu razvoj plastičnosti uz adekvatan odgovor na ozljedu. Navedena dediferencijacija omogućava obnovu matičnih stanica crijeva i prikladan odgovor na ozljedu tkiva kod miševa (63). Sličan odgovor na ozljedu putem aktivacije signalnih puteva i staničnog reprogramiranja pokazan je i na drugim organima poput središnjeg živčanog sustava, pluća, srca i jetre (64–67). Mogućnost reprogramiranja somatskih stanica i njihove dediferencijacije u

matične stanice otvara mogućnost razvoja terapijskih strategija koje bi mogle poboljšati plastičnost i regenerativni kapacitet tkiva starijih osoba.

Starenje na staničnoj razini dovodi do poremećaja međustanične komunikacije koja se očituje u neadekvatnoj i proupalnoj signalizaciji između stanica, što dovodi do propadanja funkcije tkiva zbog poremećaja tkivne homeostaze. Faktori čiji nedostatak tijekom starenja doprinosi poremećaju signalizacije mogu biti endokrini, neurološki, imunološki, sistemski i lokalni, tj. parakrini. Najizraženiji učinak na nastanak kronične upale tkiva posljedica je aktivacije SASP-a, urođenog imunološkog sustava te parakrinog učinka staničnog oštećenja. U ljudskim kardiomiocitima spomenuti poremećaj međustanične komunikacije, na razini kardiomiocita, fibroblasta i limfocita, može dovesti do razvoja hipertrofične kardiomiopatije (68). Osim navedenog, poremećaj međustanične komunikacije putem signalizacije ligand-receptor, koristeći analizu transkriptoma, definiran je i u drugim tkivima, poput tkiva središnjeg živčanog sustava i kože (69,70).

Ispreplitanje učinaka obilježja starenja dovodi do razvoja kronične upale u starosti, koja je na sistemskoj razini praćena porastom upalnih biomarkera. Porast citokina IL-6 i CRP u starijoj ljudskoj populaciji povezan je s opadanjem fizičkih i kognitivnih funkcija te stopom mortaliteta; dok su u zdravoj starijoj populaciji vrijednosti CRP i IL-6 niže, ali ipak povišene u odnosu na mlade, što govori o razvoju sistemske upale niskog stupnja (71,72). Upalni fenotip pronalazimo u brojnim tkivima, uz razvoj specifičnih upalnih bolesti poput ateroskleroze, osteoartritisa, upale živčanog tkiva i sindroma propusnog crijeva. Razlozi nastanka kronične upale u starosti su brojni i obuhvaćaju epigenetske poremećaje, neadekvatnu proteostazu, narušenu autofagiju, narušenu funkciju imunoloških stanica. Modulacija imunološkog odgovora i utjecaj na nastanak upale u starosti predmet su brojnih istraživanja. Primjena aspirina i utjecaj na starenje u pilot studiji na ljudima nisu pokazali učinak na serumske upalne biomarkere i utjecaj na razvoj sindroma krhkosti u starijoj životnoj dobi (73).

Crijevni mikrobiom prolazi značajne promjene tokom starenja, koje skraćeno nazivamo disbioza. Općenito, starenje dovodi do neravnoteže u crijevnoj mikroflori zbog porasta udjela patoloških i smanjenja udjela korisnih mikroorganizama. Učinak ovih promjena povezanih sa starenjem rezultira razvojem kronične upale, narušene crijevnih barijera te dovodi do nastanka bolesti specifičnih za stariju životnu dob. Velika kineska studija pokazala je da crijevna mikroflora ima ulogu modulatora kardiovaskularnog rizika kod starijih osoba s metaboličkim poremećajem (74). Podaci iz zanimljive ELDERMET studije pokazali su razlike u varijabilnosti mikrobiote u odnosu na zdravstveni status ispitanika, uz razvoj disbioze kod

ispitanika koji borave u domovima za starije osobe, naglašavajući gubitak korisne mikroflore u navedenoj populaciji (75). Utjecaj na mikrofloru putem dijetalne intervencije u kontekstu starenja dovodi do pomaka mikroflore prema zdravijim udjelima korisnih mikroorganizama i smanjenju upale (76). Osim dijetalne intervencije, fekalna transplantacija, prvenstveno opisana kao terapijski modalitet za liječenje recidivirajuće *Clostridium difficile* infekcije, također predstavlja zanimljivu mogućnost intervencije, iako njena standardna primjena u kliničkoj praksi u smislu terapije starenja zasad ostaje eksperimentalna (77).

Starenje obuhvaća veliki broj staničnih i molekularnih procesa, za čije funkcioniranje je prvenstveno potrebna homeostaza između faktora koji ubrzavaju i onih koji usporavaju starenje. Stanični mehanizmi popravka možda predstavljaju ključ dugoročnog i održivog oporavka genoma, DNA oštećenja i odstranjenja staničnih proteina u svrhu zdravog starenja. Osim navedenog, kontrola signalizacije unutar tkiva te kontrola i modulacija sistemskih proupalnih faktora također predstavljaju značajne mogućnosti utjecaja na promjene tokom starenja. Postojanje velikog broja mehanizama sadržanih u ovom pregledu obilježja starenja zasad ne dopušta jednostavan modalitet usporavanja starenja. Cilj intervencija na obilježja starenja ne može biti isključivo produženje života, već produljenje zdravog životnog vijeka. Dosadašnje studije upućuju na mogućnost da usporavanje starenja poboljšava mehanizme stanične i molekularne homeostaze te tako dovodi do zdravijeg i kvalitetnijeg starenja. Klinička istraživanja u kontekstu lijekova protiv starenja u ljudi i dalje se otežano provode zbog potrebe vezivanja uz bolesti povezanih sa starenjem te najčešće počinju kada je prekasno za terapiju starenja.

1.1.3. Starenje imunološkog sustava i upalni procesi povezani sa starenjem

Starenje je praćeno progresivnim promjenama imunološke funkcije, pri čemu kronična upala ostaje prisutna u tkivima sa smanjenom imunološkom reaktivnošću, oslabljenim kapacitetom obnove stanica i narušenom obranom od patogena. Dugotrajni upalni procesi u starijoj dobi karakterizirani su blagom kroničnom sistemskom upalom na razini cjelokupnog organizma, uz razvoj različitih upalnih fenotipa u pojedinim organima i tkivima. Pojam kronične sterilne upale u starenju (eng. *inflammaging*) uveo je 2000. godine Claudio Francheschi, povezujući ga sa stresom i trajnim opterećenjem imunološkog sustava antigenima (78). Ovo stanje dugotrajne upale predstavlja sustavnu adaptaciju na cjeloživotnu stimulaciju antigenima, nakupljanje senescentnih stanica, disfunkciju mitohondrija, narušen integritet crijevne barijere te promjene u signalizaciji urođene imunosti i tkivnog mikrokruženja (79). Imunološki sustav starenjem razvija specifičan fenotip, nazvan imunosenescencija, koji

označava gubitak sposobnosti prikladnog imunološkog odgovora, zbog čega kod starijih ljudi bilježimo porast incidencije infektivnih bolesti uz slabiji odgovor na cjepivo i infekcije (80,81). U gastrointestinalnom sustavu učinci upalom posredovanog starenja osobito su izraženi zbog trajnog kontakta crijevnog imunološkog tkiva s intraluminalnim antigenima. Crvuljak je u navedenom kontekstu zanimljiv dio probavnog sustava. Sadrži obilno limfno tkivo pridruženo crijevu (eng. *gut associated lymphoid tissue*, GALT), sudjeluje u sluzničnoj imunološkoj signalizaciji i interakciji između organizma i mikrobiote te sadrži veće koncentracije biofilma koji pomaže obnovi crijevnih mikrobiota nakon deplecije u patološkim stanjima. Histološka i transkriptomatska istraživanja pokazala su smanjenje broja limfnih folikula u crvuljku starijih osoba te promjene izražaja gena povezanih s oksidativnim stresom, promjenama crijevnih barijera, kroničnom upalom i neurodegeneracijom, što upućuje na aktivno remodeliranje pri starenju, a ne samo pasivnu involuciju (82–84). Navedene promjene u crvuljku odraz su sustavnih mehanizama imunološkog starenja, zbog čega crvuljak možemo koristiti kao model za proučavanje imunološkog starenja crijeva.

Kronična upala povezana sa starenjem (eng. *inflammaging*) definira se kao dugotrajna, sterilna, upala niskog stupnja koja nastaje tijekom starenja. Za razliku od akutne upale, koja je brza i samoograničavajuća, kronični upalni procesi u starenju su dugotrajni, često subklinički i obilježeni trajno povišenim koncentracijama citokina IL-6, TNF, IL-1 i aktivacijom pripadajućih signalnih putova (71,72). Danas se smatra da ovaj fenomen odražava cjeloživotno remodeliranje imunološkog sustava pod utjecajem infektivnih, okolišnih, metaboličkih i endogenih čimbenika, pri čemu patološke posljedice nastupaju kada regulatorni kapacitet i obnova tkiva više ne mogu održavati homeostazu. U njegovu nastanku sudjeluje više mehanizama: nakupljanje senescentnih stanica s razvojem SASP-a koji pojačava lokalnu i sistemsku upalu, mitohondrijsku disfunkciju, oksidativni stres, poremećaj autofagije te disbiozu uz narušenu crijevnu barijeru (85). Promjene epitelnih i endotelih barijera tijekom starenja povećavaju propusnost za proizvode mikroorganizama i održavaju patološki krug između oštećenja tkiva, aktivacije imunološkog sustava i kronične upale. Povezanost disbioze sa razvojem sistemske upale pokazana je na ljudima i miševima te se smatra važnim u razvoju upalnih procesa povezanih sa starenjem (86,87). Crijevo je ključna lokacija ovih zbivanja jer imunološka homeostaza ovisi o ravnoteži između tkiva domaćina i mikrobiote. Disbioza je povezana sa starenjem uslijed promjena u mukoznom sloju crijeva koje dovode do povećane interakcije mikroorganizama i imunoloških stanica, stvarajući povećanu stimulaciju imunološkog sustava uz lokalnu i sistemsku aktivaciju upalnih medijatora. Zbog svoje uloge

rezervoara mikrobiote, povećane koncentracije biofilma i obilja limfnih folikula, daljnja istraživanja su potrebna kako bi se razjasnilo postojanje moguće uloge crvuljka u modulaciji crijevne imunosti i interakcijama s crijevnom mikrobiotom, za što danas ne postoje jasni dokazi.

Imunološko starenje predstavlja složeno remodeliranje imunološkog sustava, obilježeno promjenama u staničnom sastavu, signalizaciji i funkcionalnom reprogramiranju regulatornih i efektorskih imunoloških odgovora. Urođenu imunost tijekom starenja obilježava održana ili pojačana bazalna upalna aktivnost uz istovremeno smanjenje ključnih efektorskih funkcija, dok stečena imunost pokazuje povećanu diferencijaciju limfocita i oslabljen odgovor na nove antigene, što pogoduje razvoju kronične upale (88). Ove promjene odvijaju se unutar izmijenjenog tkivnog okruženja obilježenog senescencijom i kroničnom upalom. Crvuljak, kao struktura bogata imunološkim stanicama, predstavlja vrijedan model za proučavanje imunološkog remodeliranja uvjetovanog starenjem i upalnih procesa koji obilježavaju tkiva u starijoj životnoj dobi.

1.1.4. Sistemsko i tkivno specifično starenje

Kroz istraživanja koja sežu i do 150 godina unatrag, znanstvenici su pokušavali odrediti faktore koji utječu na starenje i produženje životnog vijeka. Model životinjske parabioze u istraživanjima starenja omogućio je temeljne spoznaje o sustavnom učinku cirkulirajućih faktora na starenje stanica i organa. Parabioza podrazumijeva kirurško spajanje krvotoka dvaju živih organizama, pa su u istraživanjima najčešće korišteni miševi i neke vrste sisavaca. Krajem 1950-ih godina, koristeći heterokronu parabiozu miševa (spajanje dviju miševa različitih dobi), istraživači su dokazali mogućnost poboljšane regeneracije tkiva životinja, usporenje i čak izlječenje bolesti povezanih sa starenjem (89). Poboljšanje općeg stanja i produljenje preživljenja bolesnih jedinki uočeno je kod parabiota kod kojih je prethodno ozračena jedinka spojena sa zdravom, kao i kod sparivanja miševa oboljelih od mišićne distrofije sa zdravom jedinkom (90,91). Navedena istraživanja iz 1950-ih bila su uvelike anegdotalna i opterećena statističkim manjkavostima, ali su dala temelje istraživanjima parabioze u kontekstu starenja. Poboljšanje metodologije istraživanja o učinku heterokrone parabioze na starenje štakora u studiji Ludwiga i Elashoffa rezultiralo je jasnijim i statistički značajnijim dokazima o produženju života ženskih heterokronih parabiota u usporedbi s kontrolnim skupinama (92). Heterokrona parabioza kao potencijalna terapija starenja u ljudi nije izvediva, ali u modernoj znanosti, ovaj model istraživanja na životinjama može pružiti odgovore na sustavne faktore koji utječu na starenje. U novijim istraživanjima matičnih stanica miševa, heterokrona parabioza korištena je kao model za studiju u kojoj su cirkulirajući faktori iz krvi mlađe jedinke potaknuli

aktivaciju Notch signala, poboljšali proliferaciju i regenerativni kapacitet progenitorskih stanica jetre i mišića u odrasloj jedinki (93). Učinak na promjene transkriptoma moždanog tkiva pokazao je rad Ximerakisa i sur. u kojem je RNA sekvenciranjem na razini pojedinih stanica moždanog tkiva nakon heterokrone parabioze prikazano da cirkulirajući faktori iz krvi mlađe jedinke mijenjaju izražaj gena u skladu s mlađim organizmom, što je najizraženije u endotelnim stanicama, uz učinak na moduliranje nekih obilježja starenja (94). U produljenoj heterokronoj parabiozi, opisan je učinak na poboljšanje fizioloških funkcija, smanjenje biološke dobi, promjene izražaja gena i produljenje životnog vijeka starijih miševa (95). Među značajnijim opisanim cirkulirajućim čimbenicima ističe se GDF11, faktor diferencijacije rasta 11 (eng. *growth differentiation factor 11*), koji je pokazao učinak na regresiju srčane hipertrofije u starijih miševa, iako je njegov učinak kao sistemskog faktora pomlađivanja tkiva nejasan (96). Citokini povezani sa SASP-om, koji obuhvaćaju interleukine IL-1 β , IL-6, te TNF- α i β 2-mikroglobulin (B2M), komponentu MHC klase I molekula, imaju učinak na ubrzanje starenja tkiva; dok se apelin, peptidni hormon, izdvaja kao potencijalni faktor pomlađivanja zbog učinka na sintezu proteina i funkciju mitohondrija (97). Kroz daljnja translacijska istraživanja, navedeni faktori se izdvajaju kao ciljevi za određene intervenciju, bilo inhibicijom putem farmakološke intervencije ili, primjerice, uklanjanjem iz cirkulacije. Intervencije zasnovane na izmjeni dijela plazme predstavljaju pokušaj translacije modela parabioze na ljude, u svrhu postizanja učinka pomlađivanja tkiva. Razrjeđivanjem plazme miševa pomoću fiziološke otopine i albumina postignuto je poboljšanje neurogeneze, mišićne funkcije i smanjenje masnog tkiva u jetri (98). U kliničkoj studiji na ljudima, koristeći terapijsku plazmaferezu (razrjeđivanje plazme), analiza plazmatskog proteoma je pokazala smanjenje faktora stanične senescencije i oštećenja DNA nakon intervencije, uz smanjenje biološke dobi prema epigenetskoj analizi, iako je broj uključenih ispitanika u studiji relativno malen (99,100). Sistemsko starenje organizma obuhvaća široki spektar mehanizama, na koje se današnja istraživanja postupno usmjeravaju, kako bi pronašli učinkovit terapijski pristup starenju.

Terapijska plazmafereza, transfer plazme te intravenske primjene cirkulirajućih faktora kod ljudi imaju za cilj premostiti jaz između studija na životinjskoj heterokronoj parabiozi i potencijalnih terapijskih intervencija na ljudima. Znanstvenici parabiozu smatraju primarno modelom kroz koji se mogu mapirati složene veze molekula, signalnih puteva, stanica i tkiva sa konačnim učinkom na starenje organizma. Kroz ova temeljna istraživanja, starenje je na sistemskoj razini shvaćeno kao odraz ravnoteže faktora koji ubrzavaju i onih koji usporavaju starenje.

Promjene koje tokom starenja zahvaćaju čitav organizam smatraju se u velikoj mjeri posljedicom sistemskog starenja vođenog cirkulirajućim, imunološkim i neuroendokrinim čimbenicima. Navedeni faktori imaju utjecaja na sva tkiva istovremeno, ali ne i u potpunosti jednako. Korištenjem višestrukih testova (uključujući analize metaboloma, proteoma te epigenetske modele starenja i kliničke testove) pokazano je da organi i organski sustavi imaju različitu biološku dob, uz postojanje jasnog genetskog utjecaja te jedinstvene strukturne, transkripcijske i funkcionalne promjene (101). U konačnici, ove promjene, u skladu sa već spomenutim obilježjima starenja, dovode do toga da se pojedini organi i stanice ponašaju drugačije od ostatka organizma, uz razvoj specifičnog funkcionalnog fenotipa starije dobi sukladno zahvaćenom organskom sustavu, što posljedično može dovesti do razvoja bolesti starije dobi tipične za pojedini organski sustav.

1.2. Starenje probave

1.2.1. Strukturalne i morfološke promjene probavnog sustava pri starenju

Starenje probavnog sustava ima veliki utjecaj na ukupno starenje organizma i zdravlje pojedinca zbog mnogobrojnih funkcija ovog sustava. Bolesti koje zahvaćaju probavni sustav, poput kronične konstipacije, divertikuloze debelog crijeva i kolorektalnog karcinoma, pokazuju porast incidencije sa životnom dobi (102). Istraživanja na nižim organizmima u kontekstu starenja, poput *Caenorhabditis elegans*, pokazala su da upravo crijeva imaju središnju ulogu signalnog centra prema mozgu, koji na osnovi sistemskih neuroendokrinih medijatora ove signale širi u druga tkiva (103). Starenje dovodi do značajnih promjena strukture tkiva crijeva, koje su dokazane kod nižih organizama i, u manjoj mjeri, kod ljudi. Istraživanja na *Caenorhabditis elegans*, korištenjem elektronskog mikroskopa, pokazala su značajne ultrastrukturne promjene povezane sa starenjem, koje obuhvaćaju progresivnu degeneraciju stanica s gubitkom jezgri, skraćenje crijevnih resica i promjene oblika i širine crijevnog lumena (104). Slične promjene strukture uočene su i na drugim organizmima. Kod miševa, starije jedinke imale su zadebljane mišićne slojeve, poremećaj građe crijevnih resica, povećan broj vrčastih i Panethovih stanica, kao i narušenu funkciju međustaničnih spojeva enterocita, što pokazuje da, kod sisavaca, starenje također narušava strukturu crijeva (105–107). Studije na ljudima nisu pokazale značajne strukturalne promjene u dvanaesniku, ali su pronađene promjene na enterocitima u ostatku tankog crijeva, i to abnormalna hiperproliferacija i apoptoza koje dovode do narušavanja funkcije crijeva u starijoj životnoj dobi (108,109). Stijenka debelog crijeva također je izložena promjenama tokom starenja, koje obuhvaćaju smanjenje gustoće proteina međustaničnih čvrstih spojeva (*zonula occludens*), uz povećano ulaganje elastina u

mišićnom sloju uzlaznog i silaznog dijela debelog crijeva, što može utjecati na funkciju crijeva (110). Crvuljak pokazuje značajne promjene tokom starenja, koje mijenjaju histološku strukturu i funkciju organa. Limfni folikuli unutar crvuljka smanjuju se tokom života, a stopa fibrozne obliteracije raste, zbog čega često nalazimo obliteraciju lumena u starijoj populaciji, koja je vjerojatno povezana sa subkliničkim upalama tokom života (83).

Morfološke promjene u ljudskom crijevu djelomično odražavaju nalaze studija na nižim organizmima. Kod starijih osoba, poremećaji u strukturi i morfologiji crijeva uglavnom su povezani sa starenjem, koje uzrokuje neadekvatnu obnovu epitela, poremećaje u strukturi crijevnih resica i narušenu apoptozu enterocita. Zbog toga, crijevni epitel ima smanjen regenerativni kapacitet i, uslijed akumulacije senescentnih stanica, narušenu funkciju imunološkog sustava, što može dovesti do blage kronične upale povezane sa starenjem. Ove strukturne promjene posljedično povećavaju rizik od razvoja uobičajenih bolesti probave u starijoj dobi.

1.2.2. Poremećaj funkcije crijeвне barijere

Polupropusna crijevna epitelna membrana ključni je dio probavnog sustava. Sastavljena od crijevnih epitelnih stanica i *zonula occludens* koje su građene od proteinskog matriksa, a reguliraju apsorpciju hranjivih tvari i vode. Istovremeno, sprječavaju prelazak patogena i toksina u crijevnu stijenku i dalje u sistemsku cirkulaciju. Narušena propusnost crijeva, koja se često povezuje sa starenjem, naziva se i sindrom propusnog crijeva. Funkcija matičnih crijevnih stanica važna je za redovitu obnovu epitelnih stanica, a imunološke i vrčaste stanice stvaraju dodatni sloj zaštite od patogena. Narušena crijevna barijera često je karakteristična za starije organizme i zabilježena je u mnogim životinjskim vrstama, od štakora do primata (111,112). Otkriće zonulina 2000. godine, opisano u studiji o celijakiji, postavilo je temelje boljem razumijevanju poremećaja crijeвне barijere (113). Kasnije studije potvrdile su njegovu važnost u starenju crijeva kod ljudi. U starijih osoba zabilježeno je povišenje serumskog zonulina, uz istovremeno povišene markere upale (TNF- α i IL-6), što ukazuje da povećana propusnost crijeva može doprinijeti razvoju sistemske upale u starosti (114).

Poremećaj propusnosti crijeva koji se razvija tokom starenja dovodi do razvoja blage kronične sistemske upale, što ubrzava učinke starenja kod sisavaca. Sistemska upala je u znatnoj mjeri posljedica disbioze, koja uz narušenu crijevnu barijeru stvara uvjete za ulazak bakterija i toksina u sistemsku cirkulaciju (115). Istraživanja na progeroidnim mišjim modelima ukazuju na značajan utjecaj transplantacije fekalne mikrobiote zdravih miševa na produženje

životnog vijeka, zbog čega se fekalna transplantacija razmatra kao terapija starenja kod ljudi (116). Navedene promjene propusnosti povezane su sa razvojem nutritivnih alergija, celiakije i upalnih bolesti crijeva te predstavljaju značajan utjecaj starenja na crijeva, što je važno i za svakodnevnu kliničku praksu.

1.2.3. Starenje mikrobioma

Crijevna mikroflora sastoji se od bakterija, gljivica i virusa koje nalazimo u ljudskoj probavi, dominantno u debelom crijevu. Ova simbioza s mikroorganizmima ima širok spektar funkcija, od ograničavanja rasta patogenih organizama, probave hrane, stvaranja sluzi i lipidnih metabolita. Osnovna promjena mikrobioma tijekom starenja je, kako je već navedeno, promjena udjela pojedinih mikroorganizama u korist patogenih mikroorganizama ili, ukratko, disbioza. Nastaje kao posljedica cjeloživotnih izlaganja vanjskim čimbenicima, pretežno nutritivnim, zbog čega je visoko individualna. Promjene mikrobiote, obuhvaćene studijom koja istražuje pojedince odrasle do kasne gerijatrijske dobi (preko 100 godina), pokazuju prorjeđenje osnovnih razreda bakterijskog mikrobioma (*Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* i *Bacteroidaceae*) uz kvantitativno povećanje bakterijskih vrsta povezanih sa zdravim starenjem u stogodišnjaka, poput *Akkermansiae* i *Bifidobacterium* (117). Kod zdravih ljudi u dobi od 70 do 82 godine, u odnosu na grupu koja boluje od bolesti povezanih sa starenjem i šećernom bolesti, također je zabilježena povećana prisutnost *Akkermansia muciniphila*, koju povezujemo sa zdravim starenjem (118). Navedene rezultate treba sagledati i u kontekstu utjecaja senescencije stanica probave tokom starenja koja, uz promjene sastava mikrobioma, može dovesti do značajne stimulacije imunoloških stanica i razvoja blage kronične upale povezane sa starenjem. Studija na miševima pokazala je da su sterilni uvjeti života povezani s dužim preživljenjem i nižim sistemskim markerima upale, što ukazuje da je za razvoj sistemske upale tokom starenja, uz narušenu crijevnu barijeru, potrebna disbioza (115). Ključni utjecaj disbioze na razvoj kronične upale i senescencijskog fenotipa tako može rezultirati razvojem različitih bolesti povezanih sa starenjem. Obzirom na njegov utjecaj, crijevni mikrobiom je istraživao u kontekstu produženja životnog vijeka fekalnom transplantacijom kod miševa, gdje je ova intervencija pokazala korisne učinke (116). Osim imunološki uvjetovanih promjena, poremećaj crijeвне mikroflore u starenju dovodi do smanjenja proizvodnje kratkolančanih masnih kiselina, ključnih za ishranu crijevnog epitela debelog crijeva (119). Jasni mehanizmi utjecaja mikrobioma na zdravlje pojedinca još nisu u potpunosti razjašnjeni. Utjecaj životnog stila, mikrobioma te stanične senescencije na mogućnost prilagodbe pojedinca biološkim procesima starenja, odredit će u konačnici razvoj zdravog staračkog fenotipa ili pojavu oboljenja tipičnih

za stariju životnu dob. Dijeta, tjelovježba i primjena probiotika u svrhu modulacije mikrobioma mogu predstavljati učinkovitu strategiju u osiguravanju zdravog starenja ljudi.

1.2.4. Promjene funkcije crijevnih matičnih stanica

Matične stanice crijeva su multipotentne stanice crijevnog epitela koje proliferacijom i diferencijacijom stvaraju druge loze stanica poput enterocita, vrčastih stanica, enteroendokrinih stanica, Panethovih stanica. Matične stanice crijeva tijekom starenja obilježava kvalitativno slabljenje funkcije u smislu opadanja regenerativnog kapaciteta što za posljedicu ima i narušavanje funkcije crijevne barijere (120,121). Brojni razvojni signalni putovi igraju važnu ulogu u upravljanju diferencijacijom i funkcijom matičnih stanica crijeva i uključuju signalne puteve Wnt/ β -katenina, Notch, Hedgehog te signalni put koštano morfogenetskog proteina (eng. *bone morphogenetic protein*, BMP). Upravo promjena signalizacije u putu Wnt/ β -katenina značajno utječe na funkciju matičnih stanica crijeva tijekom starenja. Pad signalizacije u ovom putu povezan je sa slabljenjem funkcije matičnih stanica tijekom života, dok farmakološka aktivacija poboljšava regenerativni kapacitet (121). Nadalje, u istraživanju na starim miševima, promjene signalnog puta Wnt/ β -katenina dovode do poremećaja diferencijacije u starosti zbog čega ova populacija ima povećan rizik od razvoja tumora (122). Osim navedenog, u literaturi se spominju i kvantitativni poremećaji stanica, za koje dokazi nisu u potpunosti jasni. Kod *Drosophilae spp* tijekom starenja se uočava povećanje broja matičnih stanica (123). Istraživanja na miševima su dala konfliktne rezultate pa tako nisu nađene promjene receptora spregnutog s G proteinom Lgr5, markera matičnih stanica, dok su zabilježeni porasti staničnih populacija s niskim izražajem markera SOX9 (120,121). Iako studije tumače kvantitativne promjene markera kao pokazatelj broja crijevnih matičnih stanica, neki autori navode da je navedeno posljedica promjene u razini izražaja pojedinog istraživanog markera, a ne nužno promjena apsolutnog broja stanica. Za bolje razumijevanje i shvaćanje ovih poremećaja potrebna su dodatna istraživanja osobito na ljudskoj populaciji. Opisane kvalitativne i kvantitativne promjene koje zahvaćaju matične stanice crijeva imaju širi utjecaj na regenerativnu sposobnost epitela crijeva i funkciju crijevne barijere pa je opadanje stope obnove epitela tipično za stariju dob povezano sa narušenom funkcijom epitela i potencijalno dovodi od razvoja bolesti probavnog sustava.

1.2.5. Imunološke promjene u GALT-u pri starenju

Imunološki sustav crijeva predstavlja najveći tjelesni odjeljak imunološkog sustava i sastoji se prvenstveno od limfnog tkiva povezanog s probavom (eng. *gut-associated lymphoid*

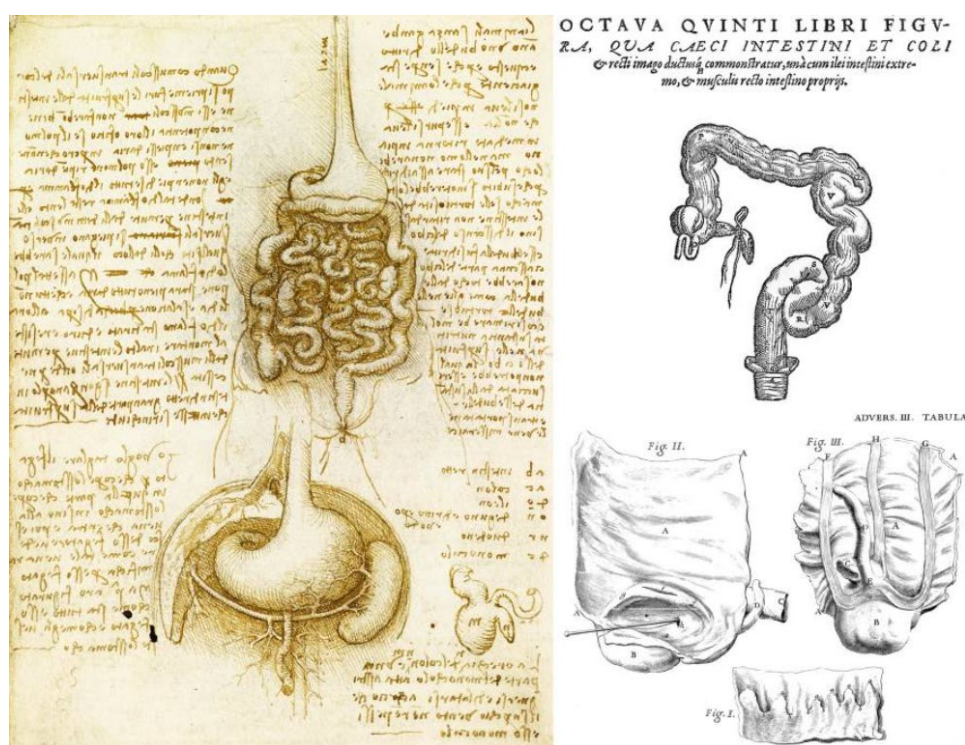
tissue, GALT). Osnovni dijelovi tog sustava su intraepitelni limfociti, limfno tkivo lamine proprije i mezenterijski limfni čvorovi, koji zajedno na više razina osiguravaju ravnotežu u imunološkom odgovoru. Funkcija sustava je dvojaka i odražava potrebu za održavanjem tolerancije prema komenzalnim bakterijama i eliminacijom patogena. Imunološki sustav putem antigen prezentirajućih stanica omogućava prepoznavanje patogena uz aktiviranje i konačnu eliminaciju patogenih mikroorganizama (124). Jednako važna funkcija je osiguravanje imunološke tolerancije na komenzalnu mikrobiotu koja se ostvaruje posredovanjem prirodnih limfnih stanica i regulatornih T limfocita (125). Tijekom starenja, imunološki sustav crijeva, kao i u ostatku organizma, prolazi kroz promjene koje zajednički nazivamo imunosenescencija, a koje označavaju narušenu sposobnost prikladnog imunološkog odgovora na patogene. Narušavanje crijevne barijere dovodi do povećanja interakcije između mikrobiote i imunološkog sustava crijeva, zbog čega se u stijenki crijeva razvija blaga kronična upala. Imunosenescencija u starosti ima za posljedicu poremećen odnos između mikrobiote i imunološkog sustava, uz razvoj upalnog procesa povezanog sa starenjem tkiva (eng. *inflammaging*). Zbog poremećaja imunološkog odgovora na crijevnoj barijeri, razvijaju se mnoge upalom uvjetovane bolesti poput Crohnove bolesti, ulceroznog kolitisa i slično. Sekretorni imunoglobulin A (IgA), važan za imunosni sustav mukozne barijere crijeva, ne pokazuje značajan pad u ukupnoj sekreciji u tankom crijevu ljudi tijekom starenja, uz zabilježen porast broja IgA plazma stanica i pad broja intraepitelnih limfocita u starijoj populaciji u odnosu na mlade (126). Unatoč očuvanoj razini ukupne sekrecije, promjene u staničnoj dinamici ukazuju na kvalitativnu, a ne kvantitativnu disfunkciju IgA uvjetovanog imunološkog odgovora u starijoj dobi. Ovakva neravnoteža u imunološkom odgovoru sluznice može doprinijeti narušenoj homeostazi s crijevnom mikrobiotom i posljedično pojačati sklonost razvoju kronične upale i drugih bolesti crijeva.

1.3.Crvuljak

1.3.1. Povijesni pregled

Prvi jasni opisi crvuljka datiraju s početka 16. stoljeća, kada ih nalazimo u radovima Leonarda da Vincija i Berengaria da Carpija. Leonardo da Vinci zaslužan je za prvi poznati grafički prikaz crvuljka, koji datira iz 1508. godine (slika 3). Talijanski kirurg Jacopo Berengario da Carpi zaslužan je za prvi opis crvuljka u svom radu *Isagoge Breves*, objavljenom 1522. godine (127). U značajnom djelu *De humani corporis fabrica*, Andreasa Vesaliusa iz 1543. godine, sadržan je detaljan opis crvuljka, njegov odnos s organima i njegov izgled nalik na crva (slika 3) (128). U narednom razdoblju, kroz povijesne radove, nalazimo brojne zapise

koji raspravljaju o nazivu crvuljka, njegovom značenju i tada nejasnoj funkciji. Značajniji pomaci u shvaćanju ovog organa i bolesti koje uzrokuje došli su tek u 18. stoljeću. Talijanski anatom Giovanni Battista Morgagni objavljuje detaljniji crtež s naglaskom na lumen organa, koji je u kontinuitetu sa cekumom (slika 3) (129). Nadalje, prva uspješna apendektomija povezuje se s Claudiusom Amyandom, izvršena je 1735. godine u Londonu i značajna je po činjenici da se upaljeni crvuljak nalazio u preponskoj kili, zbog čega je i danas ovaj sindrom poznat kao Amyandova hernija (130).



Slika 3. Povijesni anatomske crteži crvuljka Leonarda Da Vincija (lijevo), Andreasa Vesaliusa (gore desno) i Giovanni Battistae Morgagnija (dolje desno). *Preuzeto iz Müller A, Smith B, et al. World J Surg. 2023;47:928–936. doi:10.1007/s00268-022-06874-6. Prema licenci: CC BY 4.0.*

Spoznaja o važnosti bolesti crvuljka postupno je rasla tijekom prve polovice 19. stoljeća, kada su počele nastajati ideje o apendicitisu kao uzroku upale u desnom donjem kvadrantu trbuha. Liječnici koji su predvodili ove ideje, James Parkinson i Thomas Hodking, u svojim radovima opisuju klinički tijek bolesti i posljedičnu smrt uzrokovanu upalom crvuljka (131). Kroz istraživanja, prvenstveno kroz nalaze obdukcije, postavljena je tada vodeća teorija o opstrukciji lumena fekalitom ili drugim stranim tijelom kao uzroku upale. Saznanja o ovoj bolesti postupno su se širila diljem svijeta, iako su u to vrijeme načini liječenja svodili na

drenažu gnojnog sadržaja iz trbuha i simptomatske mjere, ponajviše zbog ograničenih mogućnosti operacijskog liječenja rezerviranih za kliničku sliku apscesa i razvijenog peritonitisa. Usprkos navedenim istraživanjima, u tom razdoblju razvijena klinička slika apendicitisa, koja je dovela do stvaranja apscesa i fistula u donjem desnom kvadrantu, nazivana je tiflitis i peritiflitis, zbog prevladavajuće ideje da je posljedica bolesti cekuma.

Razvojem anestezioloških i kirurških tehnika u drugoj polovici 19. stoljeća započinju prve operacije akutnog apendicitisa u Europi i SAD-u. Prva apendektomija kroz medijalnu inciziju zbog akutnog apendicitisa povezuje se s Robertom Lawsonom Taitom, ginekologom iz Edinburgha, objavljena je u radu iz 1880. godine (132). Krajem 19. stoljeća, 1886. godine, značajan rad Reginalda Herbera Fitzsa, američkog patologa, potvrdio je ulogu akutnog apendicitisa kao najčešćeg uzroka peritonitisa u desnom hipogastriju, bolest naziva apendicitis, zamjenjujući staro ime tiflitis, te predlaže apendektomiju kao način liječenja (133). Navedeni rad daje dodatni poticaj kirurzima o, tada novim, načinima liječenja ove česte bolesti i potiče širenje znanja diljem svijeta. Značajan iskorak u tom smislu daje Charles McBurney, uvodi dijagnostičku novinu, točku najjače bolnosti, kasnije nazvanu McBurneyeva točka, te standardizira kiruršku tehniku izmjeničnim rezom (McBurneyeva incizija), što dovodi do smanjenja postoperativnih komplikacija (134).

Širenje spoznaja o crvuljku početkom dvadesetog stoljeća rezultira novim istraživanjima i poboljšanjem kirurških zahvata. Početkom dvadesetog stoljeća standardiziraju se ključni klinički znakovi, poput Rovsingovog znaka, i poboljšavaju kirurške tehnike. Poboljšanje tehnika antiseptice, anestezije te nadoknade tekućina dovodi do smanjenja stope komplikacija i smrtnosti nakon apendektomije u ovom razdoblju. Najveći učinak na smanjenje smrtnosti od apendektomije imalo je uvođenje antibiotika. Ulaskom u antibiotsku eru polovicom dvadesetog stoljeća, smrtnost od perforiranog apendicitisa sa posljedičnim septičnim peritonitisom značajno opada, ponajviše nakon uvođenja penicilina (135).

Sljedeći značajan trenutak u liječenju apendicitisa nastupio je početkom osamdesetih godina prošlog stoljeća kada je Kurt Semm, njemački ginekolog, u svibnju 1980. godine, izvršio prvu laparoskopsku apendektomiju (136). Iako je sama tehnika naišla na značajnu skepsu, te je rad objavljen tek nekoliko godina kasnije zbog otpora znanstvene zajednice, razvoj minimalno invazivne kirurgije crvuljka postupno je napredovao. U istom razdoblju Alfredo Alvarado je objavio dijagnostički bodovni sustav (*Alvarado score*) baziran na kliničkoj slici i laboratorijskim parametrima, s ciljem poboljšanja dijagnoze akutnog apendicitisa i smanjenja stope negativnih apendektomija (137). Moderna dijagnostika, prvenstveno ultrazvuk i

komputerizirana tomografija, dovela su do značajnog pomaka u točnosti dijagnostike apendicitisa. Početkom dvadeset i prvog stoljeća, minimalno invazivna kirurgija akutnog apendicitisa postaje zlatni standard, čak i u složenim slučajevima, što je potvrđeno brojnim studijama i meta-analizama (138). Osim standardne laparoskopske tehnike, razvijaju se i nove alternativne tehnike, uglavnom bazirane na drugačijem pristupu putem jedne incizije (eng. *single incision laparoscopic surgery*, SILS), transvaginalnim (eng. *transvaginal*, TV) ili transluminalnim pristupom putem prirodnih otvora (eng. *natural orifice transluminal endoscopic surgery*, NOTES), koje imaju za cilj dodatno smanjenje kirurške traume. Zanimljivu terapijsku opciju u novijoj eri predstavlja i endoskopska retrogradna terapija apendicitisa (eng. *endoscopic retrograde appendicitis therapy*, ERAT), slična endoskopskoj retrogradnoj kolangiopankreatografiji, opisana i objavljena 2012. godine (139).

1.3.2. Histološka građa crvuljka

Histološka građa ljudskog crvuljka djelomično odražava građu ostatka probavnog trakta i sastoji se od četiri osnovna sloja: sluznice, podsluznice, mišićnog sloja (*muscularis externa*) i seroze. Sluznica se sastoji od tri sloja: epitela, lamine proprije i mišićnog sloja sluznice (*muscularis mucosae*). Prvi sloj sluznice prema lumenu građen je od cilindričnog epitela, koji, za razliku od debelog crijeva, nema crijevne resice, te ima nešto kraće i manje crijevne žlijezde (Lieberkühnove kripte) i brojne vrčaste stanice. Dublji slojevi sluznice, lamina propria i mišićni sloj, infiltrirani su brojnim imunološkim stanicama i na mjestima su isprekidani limfnim tkivom organiziranim u folikule, koji dopiru do submukoze. U sluznici i lamini propriji nalazi se mnogo imunoloških stanica poput makrofaga, plazma stanica koje proizvode imunoglobuline IgA i IgG, te intraepitelnih limfocita, uglavnom CD8⁺ T stanica. Limfni folikuli se prema lumenu izbočuju u obliku kupole, a epitel je neposredno iznad prošaran povećanim brojem intraepitelnih limfocita u odnosu na ostatak sluznice. U tim zonama nalazimo i M stanice, T i B stanice koje nose D-povezani humani leukocitni antigen (HLA-DR) (140–142). Obzirom na značajnu prisutnost imunoloških stanica, epitel iznad kupola limfnih folikula ima funkciju imunološke stimulacije, dok se ti folikuli smatraju dijelom GALT-a. Podsluznica (submukoza), građena je od rijetkog rahlog vezivnog tkiva te je ispunjena limfnim folikulima koji se protežu od submukoze do epitela i sadrže krvne i limfne žile. Limfni folikuli, koji se mogu usporediti s Peyerovim pločama u tankom crijevu, nemaju histološki ekvivalent u debelom crijevu i organizirani su poput prstena koji okružuju lumen crvuljka. Građeni su slično limfnim čvorovima, s rubnom zonom ispunjenom gusto zbijenim B stanicama i rijetkim T stanicama, te germinativnim centrom, svjetlijom zonom koja sadrži makrofage, folikularne dendritične

stanice, centrocite, centroblaste i proliferativne B stanice iz kojih nastaje folikul (143). Mišićni sloj crvuljka sastoji se od glatkih mišića organiziranih u kružni unutarnji sloj i uzdužni vanjski sloj. Seroza predstavlja vanjski sloj crvuljka građen od sloja rahlog vezivnog tkiva i pločastih mezenhimskih stanica. Živčano tkivo crvuljka čini dio crijevnog živčanog sustava, koji se sastoji od relativno slabije razvijenih slojeva mijenteričkog i submukoznog plexusa s gustom mrežom mukoznih živčanih vlakana. Ova vlakna, u suradnji s glijalnim stanicama crijevnog živčanog sustava, sudjeluju u lokalnoj regulaciji motiliteta, mikrocirkulacije i imunoloških funkcija sluznice (144). Raspodjela intersticijskih Cajalovih stanica i živčanih struktura značajno se razlikuje od ostatka probavnog sustava, te je ključna za poseban oblik kontrakcije mišićnog sloja crvuljka koji omogućava njegovo pražnjenje prema debelom crijevu (145).

1.3.3. Moderan pogled na funkciju crvuljka

U istraživanjima iz razdoblja od šesnaestog pa sve do devetnaestog stoljeća crvuljak je prvenstveno smatran suvišnim dijelom crijeva i organom bez jasne funkcije. Charles Darwin je u devetnaestom stoljeću utvrdio prisutnost crvuljka u primata, ali i nekih vrsta glodavaca, te je smatrao da je crvuljak nastao involucijom velikog cekuma, važnog za probavu celuloze kod biljojeda (146). Kod zečeva je poznata funkcija cekuma i crvuljka u razgradnji celuloze, dok crvuljak kod ljudi nema direktnu ulogu u probavi hranjivih tvari. Odmak od istraživanja uloge crvuljka u probavi hranjivih tvari dolazi u istraživanjima s početka dvadesetog stoljeća koja su sve više usmjerena na histološku građu i moguću imunološku funkciju crvuljka zbog obilja limfnog tkiva (147). Berry i Lack u 1906. godini objavljuju, vjerojatno prvu, studiju o starenju crvuljka u kojoj opisuju histološke promjene crvuljka s dobi, fibroznu obliteraciju lumena i regresiju limfnog tkiva, što povezuju sa starenjem te navode funkciju crvuljka kao imunološkog organa koja se mijenja sa starijom životnom dobi (148). Zanimljiva studija o shvaćanju važnosti evolucije ovog organa iz 1980-ih je utvrdila progresivnu evoluciju crvuljka kroz različite vrste primata i njegovo očuvanje u višim evolucijskim razredima, što bi zbog njegovog zadržavanja u spomenutim organizmima govorilo u prilog tada još nepoznatoj funkciji (149).

Temelje modernog shvaćanja funkcije crvuljka nalazimo u studiji Bollingera i sur. u kojoj je zbog obilja limfnog tkiva i biofilma bogatog mikrobiotom predložio crvuljak kao rezervoar za komenzalne mikroorganizme u slučajevima kada je potrebna inokulacija nakon deplecije mikrobioma, na primjer nakon epizoda proljeva (150). Biofilm u crvuljku oblaže sluznicu prema lumenu te se sastoji od mucina i komenzalnih bakterija. Unutarnji sloj biofilma, bliži sluznici, je netopiv i stvara barijeru između sluznice i mikrobiote, zbog čega mikroorganizme ne nalazimo u ovom dubljem sloju biofilma (151). Površni sloj biofilma, bliži

lumen, je rahliji i sadrži komenzalne mikroorganizme. Glavnu građevnu komponentu biofilma čini Muc2, mucin kojeg luče vrčaste stanice, i karakterizira ga brza stopa obnove, osobito u distalnom dijelu debelog crijeva (152). Upravo takva građa biofilma ima funkciju barijere koja onemogućava neželjenu interakciju mikroorganizama sa sluznicom i imunološkim stanicama te sprječava invaziju patogena. Zbog svoje brze stope obnove, biofilm se sekvstrira zajedno sa komenzalnim bakterijama iz gornjih slojeva, zbog čega dolazi do njihovog rekoloniziranja u aboralnijim dijelovima debelog crijeva, što je osobito važno nakon epizoda proljeva. Najznačajnija koncentracija intraluminalnog biofilma u probavi životinja je vezana uz crvuljak, a kod životinja bez crvuljka, oralni dio cekuma (153). Zbog ovakve raspodjele biofilma u crvuljku ljudi i izostanka značajnije koncentracije biofilma u tankom crijevu i u aboralnijim dijelovima debelog crijeva, danas govorimo o crvuljku kao području koje predstavlja rezervoar komenzalnih mikroorganizama unutar probave. Crijevne infekcije izazvane čestim patogenima, poput *Shigellae spp.* i *Escherichia coli*, dovode do pojačanog izražaja gena mucina MUC2 i MUC5AC (154,155). Pojačanje sekrecije mucina u stanjima infekcije može se promatrati kao korisna reakcija zbog ubrzanog odstranjivanja bakterija i stvaranja debljeg sloja mucina koji ima funkciju barijere, no jasne potvrde ovog učinka iz studija zasad nema. Osim sekrecije mucina i formiranja biofilma, važnu imunološku funkciju crvuljka predstavlja i sekrecija IgA, imunoglobulina važnog za aglutinaciju bakterija. U interakciji sa sluzi, IgA doprinosi normalnom stvaranju biofilma kroz aglutinaciju bakterija i sprečava njihovu translokaciju unutar crijevne stijenke (156). Iako kod miševa ne nalazimo crvuljak, pri odstranjenju cekuma, koji obnaša sličnu imunološku funkciju, u debelom crijevu dolazi do smanjenja raznolikosti IgA, što dodatno naglašava ovo područje kao važno za sekreciju IgA (157). Prisutnost crvuljka u pojedinim životinjskim vrstama povezana je s produljenjem maksimalnog životnog vijeka jedinki, vjerojatno zbog smanjenja učinka vanjskih uzroka smrtnosti pa autori ove studije predlažu veću otpornost na bolesti povezane s proljevima kao moguće objašnjenje, iako se iz podataka studije ne može donijeti jasan zaključak (158). Navedena istraživanja upućuju na važnost zadržavanja ovog organa tijekom evolucije te moguću ulogu u poboljšanju preživljenja određenih vrsta, što u konačnici može objasniti njegovu prisutnost u ljudima. Zbog obilja imunoloških stanica i bogatog mikrofilma limfni folikuli unutar stijenke crvuljka predstavljaju područja imunološke interakcije s mikrobiomom, važne zbog razvijanja tolerancije na komenzalne mikroorganizme. Upravo zbog velikog udjela imunološkog tkiva, crvuljak se danas smatra dijelom GALT-a. Imunološka funkcija crvuljka utječe na razvoj imunološke tolerancije na komenzalne mikroorganizme te potpomaže stvaranje mikrobioma pojedinca. Povećana koncentracija biofilma u crvuljku i sekrecija IgA održavaju bogatu mikrofloru

crvuljka i čine ga rezervoarom crijevnog mikrobioma. Funkcija crvuljka kao rezervoara komenzalnih bakterija u razvijenom svijetu gubi na važnosti zbog napretka medicine i modernih principa liječenja proljeva.

1.3.4. Apendektomija: kirurški pogled i kliničko značenje

Akutni apendicitis predstavlja najčešće kirurško oboljenje s cjeloživotnim rizikom od oboljenja od 7 do 9 %, koje bilježi značajan pad smrtnosti uz porast incidencije na svjetskoj razini (159). Incidencija akutnog apendicitisa najviša je u mlađim dobnim skupinama, s najvišim stopama od 15 do 19 godina u oba spola (160). Osim upale crvuljka, važna patologija ovog organa su i primarni tumori, koji predstavljaju relativno rijetku skupinu tumora probavnog sustava. Klinički su najčešće asimptomatski, dok se u određenim slučajevima mogu prezentirati slikom akutnog apendicitisa. Dijagnostička obrada je često ograničena, zbog čega ostaju neprepoznati u ranijim stadijima, ponajviše zbog nedostupnosti crvuljka standardnim endoskopskim pregledima poput kolonoskopije. Najčešći oblici obuhvaćaju adenokarcinom, mucionzni i neuroendokrini tumor, od kojih su prva dva češća u starijim dobnim skupinama iznad 60 godina, dok su neuroendokrini tumori češći u mlađim dobnim skupinama i za njih bilježimo porast incidencije zadnjih godina (161).

Kao najčešći oblik liječenja akutnog apendicitisa, i dalje se preporučuje apendektomija, iako konzervativno liječenje ima važnu ulogu u određenim slučajevima (162). U modernoj medicini standard liječenja akutnog apendicitisa predstavlja laparoskopska apendektomija, koja se izvodi i u najsloženijim slučajevima praćenim perforacijom i peritonitisom. Liječenje tumora crvuljka ovisno je o načinu postavljanja dijagnoze i stadiju bolesti. Apendektomija može stoga biti i dijagnostička i terapijska, ukoliko se radi, primjerice, o neuroendokrinim tumorima u početnim stadijima, ali se prema patološkom nalazu može i radikalizirati desnom hemikolektomijom. Zbog poboljšanja liječenja, smrtnost od akutnog apendicitisa u razvijenim zemljama nakon apendektomije iznosi oko 0,25% kod svih operiranih pacijenata, uz nešto više stope kod pacijenata s perforacijom crvuljka (163).

Apendektomija može biti indicirana kod makroskopski neizmijenjenog crvuljka tijekom drugog operacijskog zahvata u trbuhu i tada govorimo o incidentalnoj apendektomiji. Osnovni razlozi za incidentalnu apendektomiju mogu se podijeliti u preventivne, anatomske i onkološke razloge. Preventivni razlozi obuhvaćaju sprečavanje budućih epizoda akutnog apendicitisa ili u slučajevima ponovljenih epizoda bolova zbog rješavanja budućih dijagnostičkih nejasnoća. Malpozicija crvuljka, posljedično malrotaciji cekuma ili mobilizaciji cekuma u sklopu

operacijskog zahvata, može rezultirati netipičnom kliničkom slikom i otežanom dijagnostikom apendicitisa, zbog čega je iz anatomskih razloga preporučljivo uraditi incidentalnu apendektomiju. U slučaju sumnje na neoplazmu crvuljka, incidentalna apendektomija i dalje predstavlja najsigurniji način postavljanja patološke dijagnoze. Ranija istraživanja iz 1980-ih godina o incidentalnoj apendektomiji otvorenim pristupom utvrdila su niske stope infekcije operacijske rane od svega 1,8% kod otvorenih apendektomija, bez smrtnih ishoda, zbog čega se procedura smatra sigurnom (164). Zbog brojnih sličnih radova i raspodjele incidencije akutnog apendicitisa, incidentalna apendektomija se preporučuje u dobnoj skupini između 10 i 30 godina, prvenstveno u svrhu prevencije budućeg apendicitisa, te kod pacijenata s intelektualnim teškoćama (165). Prema smjernicama za liječenje akutnog apendicitisa, apendektomija se preporučuje u slučaju pronalaska urednog crvuljka tijekom operacije simptomatskih pacijenata, što u načelu podrazumijeva incidentalnu apendektomiju, prvenstveno zbog postavljanja krajnje dijagnoze patohistološkom analizom (166). Raniji radovi nisu uzimali u obzir onkološke bolesti crvuljka kao faktor u indikaciji incidentalne apendektomije, koje u novije vrijeme dobivaju na značaju. U starijoj populaciji iznad 60 godina podvrgnutih incidentalnoj apendektomiji u Kliničkom bolničkom centru Split, zabilježena je relativno visoka stopa tumora crvuljka od 7,2%, što govori u prilog izvođenju ovog zahvata kod starijih pacijenata (167). Učestalost tumora u patohistološkim uzorcima crvuljaka s akutnim apendicitisom prema studijama varira između 1-3%, uz nešto više stope u uzorcima nakon incidentalne apendektomije, dok značajno više stope nalazimo u uzorcima nakon intervalnih apendektomija koje iznose i do 14% (167–169). Poznavanje stopa učestalosti tumora crvuljka važno je za pravilno indiciranje incidentalne apendektomije u određenim kliničkim situacijama i dobnim skupinama. Upalne bolesti crijeva, osobito Crohnova bolest, često se mogu prezentirati kliničkom slikom bolova u trbuhu. Incidentalna apendektomija se u pacijenata sa Crohnovom bolešću u načelu ne preporučuje zbog mogućnosti kompliciranog postoperativnog tijeka praćenog infekcijama i razvojem fistula, uz minimalnu potencijalnu korist (170). Iznimku predstavlja izolirana Crohnova bolest crvuljka, rijetka manifestacija, kod koje apendektomija može biti kurativna ukoliko je područje baze cekuma nepromijenjeno.

U pedijatrijskoj populaciji, incidentalna apendektomija se može razmotriti kod djece starije od 10 godina tijekom drugih operativnih zahvata u abdomenu, osobito u području zdjelice, ginekoloških zahvata zbog, primjerice, cista jajnika, te u sklopu dijagnostičke eksplorativne laparoskopije ili laparotomije zbog nejasnih bolova u trbuhu (171). Posebnost pedijatrijske populacije predstavljaju operacije zbog malrotacije crijeva i intususcepcije crijeva,

kod kojih je preporučljivo napraviti apendektomiju kako bi se izbjegla netipična prezentacija akutnog apendicitisa. Kod pacijenata s kroničnom opstipacijom, incidentalna apendektomija se mora temeljiti na procjeni budućih planiranih operativnih zahvata, obzirom da se crvuljak može koristiti kao apendikostoma za apliciranje retrogradnih klizmi (172).

Apendektomiju generalno možemo smatrati vrlo sigurnim zahvatom s dobrim dugoročnim ishodima. Kod većine ljudi ne nalaze se dugoročne kronične posljedice ovog zahvata, ali u velikim kohortama navode se minimalno povišeni rizici od razvoja upalnih bolesti crijeva te dugoročnih komplikacija poput priraslica crijeva i postincizijskih kila. U značajnoj metaanalizi koja je obuhvatila 37 studija, nisu primijećeni značajni dugoročni štetni učinci apendektomije; stopa prevalencije Crohnove bolesti bila je veća kod operiranih, dok je stopa prevalencije ulceroznog kolitisa bila niža u odnosu na kontrolu, što autori povezuju s mogućim pogreškama u dijagnostici (173). Prema navedenoj metaanalizi procijenjena je stopa postoperativne opstrukcije crijeva od 1%, uz stopu postincizijskih hernija od 0,7%, kao najčešćih dugoročnih komplikacija, što predstavlja dobar sigurnosni profil (173). Velika švedska kohortna studija s preko 63 000 pacijenata s ulceroznim kolitisom pokazala je da je apendektomija u djetinjstvu povezana s blažim tijekom bolesti u kasnijoj životnoj dobi (174). Rezultati studije kod pacijenata s razvijenim ulceroznim kolitisom su pokazali da apendektomija može doprinijeti ili ukazivati na agresivniji tijek bolesti (175). Kao zanimljiv dugoročni učinak apendektomije u literaturi se navodi mogući utjecaj na razvoj Parkinsonove bolesti. Zbog prisutnosti patološki smatanog α -sinukleina u crvuljku, koji predstavlja važno patološko obilježje Parkinsonove bolesti, Killinger i sur. su u svojoj studiji koristeći epidemiološke baze podataka, pokazali su da apendektomija desetljećima prije nastupa neurodegenerativne bolesti smanjuje rizik i usporava njen nastup (176). U nedavnoj metaanalizi koja je obuhvatila devet studija i više od sedam milijuna pacijenata, nije pokazana jasna veza između apendektomije i Parkinsonove bolesti (177). Studije o povezanosti apendektomije i Parkinsonove bolesti zasada ostaju podijeljene te su potrebna daljnja istraživanja o mogućim uzročnim vezama.

Apendektomija predstavlja siguran zahvat s dobrim sigurnosnim profilom te je praćena izrazito niskom stopom dugoročnih komplikacija i bez jasnih dugoročnih štetnih učinaka. Osnovne prednosti incidentalne apendektomije tijekom drugih abdominalnih zahvata ostaju relativna jednostavnost postupka, niska stopa komplikacija, izostanak dodatnih rizika opće anestezije, relativno značajna stopa drugih patoloških promjena u uzorku i olakšanje eventualne buduće dijagnostičke obrade. Nedostatci su prvenstveno vezani uz činjenicu da otvaranje

probavne cijevi nosi mogućnost intraabdominalne kontaminacije u čistim operacijama, što narušava kirurške principe, primjerice kod implantacije umjetnih materijala kod popravka preponske kile. Obzirom na nedostatak jasnih širih smjernica, kirurg mora uzeti u obzir incidenciju bolesti crvuljka, potencijalne komplikacije, tip glavnog postupka, opće stanje pacijenta i intraoperativni nalaz pri donošenju odluke o izvođenju incidentalne apendektomije.

1.4. Imunološko starenje i promjene limfnog tkiva

1.4.1. Involucija timusa

Crvuljak je dio sustava limfnog tkiva povezanog s probavom te ga zato treba promatrati i kao sastavni element imunološkog sustava probave koji se mijenja tijekom starenja. U literaturi je opisan dobno uvjetovani gubitak limfnih folikula crvuljka, što predstavlja jednu od posljedica imunosenescencije, usporedivu s strukturnim i funkcionalnim propadanjem koje se zbiva u timusu i drugim sekundarnim limfnim organima (83). Involucija timusa, disfunkcija hematopoetskih matičnih stanica, poremećaj omjera naivnih i memorijskih T i B stanica, kronična upala povezana sa starenjem, nakupljanje senescentnih stanica, povećani stanični stres te akumulacija genetskih oštećenja predstavljaju karakteristične promjene imunološkog sustava tijekom starenja. Timusna involucija klasičan je i najpoznatiji primjer starenja imunološkog sustava. U značajnoj studiji iz 1961. godine timus je opisan kao temeljni organ za razvoj imunološkog sustava u miševa, jer su posljedice timektomije u neonatalnoj dobi kod ovih životinja dovele do atrofije limfnog sustava i pojačane osjetljivosti na infekcije (178). Kao primarni limfni organ, zadužen za stvaranje kompetentnih naivnih T limfocita, započinje involuirati već relativno rano u životu te tijekom godina postupno gubi staničnu gustoću i strukturni integritet. Rane morfološke studije pokazale su jasan pad težine ovog organa s dobi, uz porast lipidne komponente unutar tkiva (179). Promjene strome timusa mogu poremetiti sazrijevanje timocita i mehanizme centralne imunološke tolerancije, čime se povećava rizik od imunološke disfunkcije i razvoja autoimunih oboljenja. Histološki i funkcionalno, taj je proces obilježen narušavanjem jasne podjele na koru i srž, smanjenjem broja timusnih epitelnih stanica, proliferacijom fibroblasta, širenjem perivaskularnog prostora i porastom udjela masnog tkiva unutar organa (179,180). Glavna imunološka posljedica involucije timusa jest smanjena produkcija naivnih T limfocita. Opadanjem proizvodnje novih T limfocita iz timusa, periferni T-stanični rezervoar sve se više oslanja na već postojeće klonove, umjesto na stalno osvježavanje novostvorenim stanicama (181). Navedeni proces tako dovodi do suženja raznolikosti T-staničnih receptora, slabijih odgovora na nove antigene, lošijeg odgovora na cjepiva te manje učinkovitog nadzora nad infekcijama i malignim stanicama u starijoj dobi

(182–184). Timektomija kod novorođenčadi, operiranih zbog transpozicije velikih krvnih žila, rezultirala je tako preuranjenim imunološkim starenjem zbog promjena na razini T stanica, padom u apsolutnom broju CD4⁺ i CD8⁺ T stanica, te povećanim nakupljanjem memorijskih stanica, tipičnih za stariju dob, naglašavajući tako važnost funkcije timusa za T staničnu imunost (185). Involucija timusa ne znači samo smanjenje broja limfocita, nego i kvalitativne promjene. Iako je funkcija timusa u odrasloj dobi donekle nerazjašnjena i timektomija se ponekad izvodi kod određenih kirurških zahvata, dokazi o važnosti ovog organa sve su brojniji u novijim studijama. Timektomija kod odraslih povezuje se sa smanjenom otpornošću na patogene i povećanim rizikom od nastanka autoimunih i malignih oboljenja, što timus čini zanimljivim modelom u kojem strukturno propadanje limfnih organa prelazi u klinički prepoznatljivo starenje imunološkog sustava (186). Očuvanje funkcije timusa u odraslih važno je za ukupno zdravlje pojedinca i dugovječnost. Koristeći računalni model i podatke iz dviju velikih prospektivnih kohortnih studija na ljudima, Bernatz i sur. ukazuju na centralnu regulatornu ulogu timusa u imunološki posredovanom starenju i podložnosti bolestima u starijoj životnoj dobi (187).

Model involucije timusa važan je za razumijevanje imunološke funkcije crvuljka jer uspostavlja opće načelo da gubitak limfne strukture nije isključivi histološki nalaz, nego biološki znak imunosenescencije. Obzirom da crvuljak tijekom starenja prolazi progresivnu redukciju limfnih folikula, taj se proces može tumačiti u istom smislu kao i involucija timusa koja predstavlja starošću uvjetovano slabljenje imunološke funkcije organa.

1.4.2. Starenje sekundarnih limfnih organa

Iako je involucija timusa klasičan primjer, starenje imunološkog sustava nije ograničeno na primarne limfne organe. Sekundarni limfni organi koji obuhvaćaju slezenu, limfne čvorove i organizirana limfna tkiva povezana sa sluznicama (eng. *mucosa-associated lymphoid tissue*, MALT) također prolaze preoblikovanje tijekom starenja koje mijenja način na koji imunološke stanice reagiraju na antigene, komuniciraju sa stromalnim nišama i stvaraju odgovore na antigene. U studiji na miševima, slezena kao najveći sekundarni limfni organ, s dobi podliježe progresivnom gubitku histološke organizacije bijele srži, koju obilježava gubitak jasne granice između T i B staničnih zona, atrofija mreže folikularnih dendritičnih stanica i nakupljanje fibroblasta u marginalnoj zoni (188). Limfni čvorovi tijekom starenja pokazuju narušen stečeni imunološki odgovor zbog odgođenog nakupljanja stanica i prepoznavanja antigena, što rezultira slabijim odgovorom na virusne infekcije (189). Posljedice ovih promjena nadilaze lokalnu

anatomiju i funkciju pojedinih čvorova te se očituju na razini sistemske imunokompetencije, koja može rezultirati slabijim odgovorom na infektivne bolesti u starijoj dobi.

U imunološkom sustavu crijeva, organizirane limfne strukture poput Peyerovih ploča, izoliranih limfnih folikula i drugih nakupina GALT-a, ključne su za uzorkovanje antigena i pokretanje sluzničke imunosti. Istraživanja na starijim miševima pokazuju da su izolirani limfni folikuli crijeva promijenjeni u smislu brojnosti, staničnog sastava, ekspresije kemokina i sinteze imunoglobulina, što starenje dovodi u vezu sa razvojem imunosenescencije na razini probavnog sustava (190). Peyerove ploče i mezenterijski limfni čvorovi, kao ključne strukture GALT-a, sa starenjem pokazuju značajan pad ukupnog broja stanica uz selektivni gubitak CD4⁺ T limfocita i smanjenje razine sekretornog IgA u lumenu crijeva (191). Nadalje, funkcionalni pad GALT-a nastupa kasnije i sporije nego u drugim limfnim organima poput slezene, proliferativni odgovor limfocita i produkcija IL-2 u Peyerovim pločama i mezenterijskim limfnim čvorovima smanjuju se tek u poodmakloj starosti, što upućuje na različite stope starenja pojedinih odjeljaka imunološkog sustava (192). Limfni čvorovi ovise o vrlo precizno organiziranim mikroanatomskim odnosima između limfocita, stromalnih i dendritičnih stanica, krvnih i limfnih žila te koncentracijama signalnih molekula. Starenje može narušiti organizaciju limfnih čvorova i prije nego što dođe do velikog pada ukupnog broja imunosnih stanica pa folikuli na histološkoj razini mogu biti prisutni, ali funkcionirati znatno manje učinkovito (193). Zbog toga se imunološko starenje često ne očituje samo kao atrofija tkiva nego se temelji na funkcionalnim promjenama koje uključuju neprilagođeno remodeliranje imunosnih tkiva, promijenjeni sastav imunosnih odjeljaka i poremećenu koordinaciju imunosnog odgovora.

Crvuljak pripada istom kontinuitetu sekundarnih imunosnih struktura sluznice, a zbog obilja limfnog tkiva i povećane koncentracije biofilma predstavlja zonu imunosne stimulacije značajne za interakciju sa crijevnom mikrobiotom (194). Promjene crvuljka povezane s dobi, zbog navedenog, mogu se promatrati u smislu starenja šire imunosne mreže sluznice crijeva, a ne kao izolirani lokalni degenerativni fenomen.

1.4.3. Degenerativne promjene limfnih folikula crvuljka

Promjene koje zahvaćaju limfne folikule tijekom životnog vijeka predstavljaju najizravniju vezu između histološke građe crvuljka i starenja imunosnog sustava. Limfni folikuli u ljudskom crvuljku počinju se razvijati dva tjedna nakon rođenja uz ubrzano sazrijevanje tijekom prvih nekoliko godina života. Degeneracija limfnih folikula započinje tijekom adolescencije i traje do trećeg desetljeća života, zbog čega su folikuli starijih osoba

značajno manji u odnosu na mlađu populaciju (195,196). Studija Gebbersa i Laissuea navodi povezanost razvoja limfnih folikula s bakterijskom translokacijom unutar lumena crvuljka, što je važno za normalni razvoj GALT-a i imunološke tolerancije na komenzalne bakterije (195). Mehanizmi opadanja funkcije limfnih folikula tijekom starenja nisu razjašnjeni, iako se pojedinim studijama spominje moguća povezanost s remodeliranjem vezivnog tkiva, koje autori smatraju posljedicom upalnih zbivanja u crvuljku (197,198). Iako se histološkim analizama uočava jasna degeneracija limfnih folikula, mehanizmi ove pojave u crvuljku i dalje su predmet istraživanja. U studiji limfnih folikula ljudskih crvuljka, korištenjem metode protočne citometrije i histološkom analizom, pokazano je da se limfni folikuli u crvuljku vrlo rano razvijaju, u prvim danima života, zatim sazrijevaju, a u kasnoj životnoj dobi, oko 80 godina, mogu gotovo potpuno nestati pa se u vrlo starih uzoraka često nalazi gotovo potpuni izostanak limfnih populacija i histološki značajno izmijenjeni folikuli (83). Starenje limfnih folikula ubrzano je u pacijenata s ulceroznim kolitisom, vjerojatno zbog upalne stimulacije u odnosu na zdravu populaciju, te se kod ovih pacijenata stanična deplecija i histološke promjene primjećuju i desetak godina ranije (83). Iz imunološke perspektive, limfni su folikuli prostorno organizirana žarišta za prezentaciju antigena, aktivaciju B i T limfocita i generiranje imunih odgovora na razini sluznice. Stoga je vjerojatno da smanjenje broja folikula u crvuljku odražava oslabljeni lokalni kapacitet za koordiniranu stečenu imunost, osobito na razini sluznice, gdje je nužno razlikovati komenzalne mikroorganizme od patogena i drugih upalnih podražaja. Crvuljak, prema dosadašnjim opisima, predstavlja organ sa zanimljivom imunosnom i mikrobiološkom funkcijom koja uključuje intenzivnu interakciju s crijevnim bakterijama. Upravo je ta interakcija važna za održavanje povoljne ravnoteže između imunog odgovora na patogene i tolerancije komenzalnih bakterija. Gubitak limfne arhitekture s dobi može imati posljedice koje nadilaze isključivi kvantitativni poremećaj stanica i rezultirati slabljenjem homeostazu između organizma i mikrobiote. U tom kontekstu, degeneracija limfnih folikula u crvuljku može se smatrati lokalnim histološkim pokazateljem šireg imunološkog starenja crijeva i promjena u interakciji s mikrobiotom.

1.4.4. Promjene urođene i stečene imunosti tijekom starenja

Ključno obilježje imunološkog starenja jest neujednačen učinak na prirođenu i stečenu imunost. Stečena imunost osobito je osjetljiva jer ovisi o stalnoj proizvodnji naivnih limfocita, očuvanju širokog spektra receptora, prepoznavanju i odgovoru na različite antigene unutar limfnih čvorova i drugih limfnih struktura. Starenjem se mijenja ovaj aspekt imunološkog

sustava, što rezultira slabijim primarnim odgovorom na infekcije, umanjenom učinkovitošću cjepiva i ograničenom sposobnošću prepoznavanja novih patogena.

Involucija timusa i strukturalno propadanje limfnih tkiva ima osobit, već prethodno opisan, učinak na stečenu imunost. Smanjeno stvaranje naivnih T stanica, poremećena folikularna arhitektura i promjene u kemokinski vođenom pozicioniranju stanica zajedno narušavaju inicijaciju i kvalitetu specifičnih odgovora na antigene. U izoliranim crijevnim limfnim folikulima starijih miševa, pad udjela B stanica u kombinaciji s promijenjenom ekspresijom kemokina upućuje na smanjenje sposobnosti održavanja uravnoteženog stečenog imunološkog odgovora u sluznicama (190). Nadalje, slabija funkcija stečene imunosti očituje se i u slabijem odgovoru na infekciju, kao i u učinkovitosti cjepiva. Učinkovitost cjepiva protiv gripe u starijoj populaciji je snižena upravo kao posljedica slabijeg odgovora na primijenjena standardna cjepiva te je zbog toga u ovoj populaciji često potrebno docjepljivanje radi postizanja primjerenog imuniteta, što je direktna posljedica narušene funkcije stečene imunosti povezane s dobi (199–201). Imunološki nadzor nad razvojem malignih oboljenja također je narušen u starosti, zbog čega u starijoj dobi bilježimo povećanu incidenciju malignoma. Iako je zloćudna preobrazba stanica povezana i s drugim obilježjima starenja, poput nagomilavanja DNA oštećenja, imunosenescencija i u užem smislu narušena stečena imunosti imaju također značajan utjecaj. Upravo studija na starijim miševima dovela je do korelacije između starenja i poremećaja progenitorskih stanica B limfocita, koje pokazuju značajne signalne, metaboličke i transkripcijske nedostatke te su u upalnom mikrokruženju skloni onkogenezi (202). U eksperimentalnom modelu karcinoma pluća na mišjem modelu, progresija tumora povezana je sa starenjem zbog ubrzanе mijelopoeze, koja dovodi do infiltracije tumorskog tkiva nezrelim mijeloidnim stanicama, čime se dodatno slabi stečeni imunološki odgovor na malignom (203).

Nasuprot tome, prirođena imunost u starijih osoba često ostaje relativno očuvana u pogledu broja stanica, ali je funkcionalno izmijenjena. U starijoj dobi često se bilježi povišena bazalna aktivacija prirođenih upalnih putova, pojačana proizvodnja upalnih medijatora i smanjena sposobnost razrješenja upale, umjesto učinkovite i brzo ograničene prve linije obrane. Monociti starijih ljudi tako imaju više intracelularnog TNF α u bazalnim uvjetima i nakon imunološke stimulacije, te smanjenu sposobnost fagocitiranja, što rezultira kroničnom aktivacijom, ali funkcionalno neuravnoteženim odgovorom ovih stanica (204). U makrofazima koštane srži starih miševa također je pokazan poremećaj prirođene imunosti s povišenim bazalnim razinama proupalnih citokina i markera aktivacije, uz istodobno usporeno razrješavanje akutne upale (205,206). Navedeno objašnjava kako starenje istodobno može biti

praćeno kroničnom upalom blažeg stupnja bez jasne infekcije i oslabljenim imunološkim odgovorom urođene imunosti.

Crvuljak predstavlja zonu sluznice na kojoj stećeni i urođeni imunološki sustavi moraju trajno surađivati. Starenjem imunološkog sustava dolazi do smanjenja broja organiziranih limfnih folikula u crvuljku, a stećena komponenta lokalne imunosti vjerojatno slabi, dok istovremeno urođena imunost i održana crijevna barijera dobivaju na važnosti. Dostupna literatura podupire jedinstveno tumaćenje crvuljka kao mjesta u kojem su vidljive posljedice imunološkog starenja probave. Involucija timusa pruža klasičan obrazac dobno uvjetovane involucije limfnog organa, dok istraživanja limfnih tkiva povezanih sa sluznicom probavnog sustava pokazuju da starenje mijenja i sekundarne imunološke strukture kroz remodeliranje limfne mikroarhitekture, promjene kemokina i slabljenje funkcije. Crvuljak istovremeno predstavlja imunološki i sluznični organ u stalnoj interakciji s mikrobiotom. Involucija limfnih folikula crvuljka stoga vjerojatno odražava slabljenje stećene imunosne organizacije, kronično upalno remodeliranje i slabiji lokalni imunosni nadzor nad mikroflorom.

1.5.Oksidacijski stres i promjene transkriptoma u starenju

1.5.1. Teorija slobodnih radikala i starenje

Oksidacijski stres oznaćava neravnotežu između stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva (eng. *reactive oxygen species*, ROS) i sposobnosti stanice da ih neutralizira antioksidacijskim mehanizmima te predstavlja jedan od najstarijih proućavanih uzroka stanićnog starenja (5). Njegova uloga u starenju nije ogranićena na izravno oštećenje makromolekula, već se odražava i na razini regulacije transkripcije pa tako nagomilavanje oksidacijskog oštećenja mijenja izražaj gena, remeti proteostazu i potiće senescenciju, što u konaćnici pridonosi propadanju tkivnih funkcija (23). Razumijevanje posljedica oksidacijskog stresa na promjene transkriptoma u starenju ključno je za tumaćenje nalaza dobivenih modernim metodama sekvenciranja, a posebno za razumijevanje obrazaca izražaja gena opaženih u tkivima kao što je crvuljak.

Teoriju slobodnih radikala postavio je Denham Harman 1956. godine, u ključnom radu u kojem je iznio hipotezu da slobodni radikali, reaktivni mećuprodukti stanićnog metabolizma, uzrokuju kumulativno oštećenje stanićnih sastavnica, što predstavlja temelj biološkog starenja (5). Harman je temeljio svoju teoriju na nekoliko opažanja: ionizirajuće zraćenje izaziva preuranjeno starenje, ono djeluje putem slobodnih radikala kisika, a stanice normalno stvaraju takve radikale u metabolićkim procesima (5). U godinama nakon navedenog rada, teorija je

dopunjena razjašnjenjem uloge mitohondrija kao primarnog izvora i primarnog cilja ROS-a (207,208). Mitohondrijska teorija slobodnih radikala objašnjava starenje curenjem elektrona iz respiracijskog lanca, što stvara superoksidne radikale, koji se potom pretvaraju u vodikov peroksid i hidroksilne radikale (208). Stvoreni slobodni radikali (ROS) oštećuju mitohondrijsku DNA (mtDNA), koja, za razliku od jezgrene DNA, nije zaštićena histonima niti ima učinkovit sustav popravka, što rezultira nakupljanjem mutacija mtDNA s dobi i daljnjim pogoršanjem funkcije mitohondrija u patološkom krugu oksidacijskog oštećenja (209,210).

Stupanj oksidacijskog oštećenja proteina, lipida i DNA uobičajeno se kvantificira nizom provjerenih biomarkera, uključujući karbonilizirane proteine kao pokazatelje oksidacije proteina, 8-hidroksi-2-deoksigvanozin (8-OHdG) kao marker oksidacijskog oštećenja DNA, malondialdehid (MDA) kao marker lipidne peroksidacije te omjer oksidiranog i reduciranog glutationa (GSSG/GSH) kao pokazatelja ukupnog oksidacijsko-redukcijskog statusa i oksidacijskog stresa (211–214). Navedeni biomarkeri oksidacijskog oštećenja dosljedno rastu s kronološkom dobi u tkivima sisavaca i ljudi (211,215). U novoj eri Harmanova teorija se donekle relativizira te se o ROS-u govori kao o jednom od više mehanizama starenja koji djeluju paralelno. Istraživanja na genetskim modelima koji ne mogu smanjiti produkciju ROS-a ili povećati antioksidacijsku obranu ne dovode do skraćanja životnog vijeka u svih vrsta, što sugerira da je oksidacijsko oštećenje jedan od nekoliko paralelnih mehanizama starenja, a ne jedini uzrok (216,217). Ipak, odgovor transkriptoma stanica na oksidacijski stres kroz aktivaciju antioksidacijskih puteva, stresom induciranih gena i signalnih puteva, ostaje relevantan za razumijevanje promjena izražaja gena u starenju. Doprinos ROS-a u starenju danas se promatra kroz prizmu hormeze, biološkog fenomena u kojem izlaganje malim dozama inače štetnih tvari ima koristan učinak na organizam, dok visoke doze izazivaju štetne ili smrtonosne posljedice. Tako se danas smatra da niske razine ROS-a djeluju kao signalne molekule koje aktiviraju zaštitne signalne puteve transkripcijskih faktora (NRF2, FOXO), dok visoke razine uzrokuju oštećenje i staničnu senescenciju (218,219). U kontekstu dosada navedenoga, starenje mijenja ravnotežu prema oksidativnoj strani, ali također i onemogućuje adekvatni antioksidacijski odgovor zbog pada aktivnosti transkripcijskog faktora NRF2.

1.5.2. Signalni put faktora NRF2 i antioksidansi

Transkripcijski faktor NRF2 (eng. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) je važan regulator staničnog antioksidacijskog odgovora i detoksikacije od ksenobiotika (220). U bazalnim uvjetima NRF2 je vezan za KEAP1 (eng. *kelch-like ECH-associated protein 1*) u citoplazmi, koji posreduje njegovu kontinuiranu razgradnju i tako onemogućava nakupljanje

NRF2 u stanici (220). Kada u stanici poraste razina reaktivnih molekula poput ROS-a, one mijenjaju protein KEAP1 i sprječavaju razgradnju NRF2. Tada se NRF2 nakuplja u citoplazmi, ulazi u jezgru stanice, povezuje se s drugim proteinima i aktivira gene koji štite stanicu od oksidativnog stresa i štetnih tvari (221). NRF2 aktivira skupinu zaštitnih gena koji kodiraju enzime važne za obranu stanice od oksidacijskog stresa i štetnih kemikalija. Ti enzimi pomažu u neutralizaciji reaktivnih kisikovih radikala (ROS), u održavanju glutaciona u njegovom zaštitnom (reduciranom) obliku te u razgradnji elektrofila i oštećenih hemoproteina, zbog čega NRF2 zauzima središnje mjesto u staničnoj citoprotektivnoj mreži. NRF2 ciljni geni obuhvaćaju enzime ključnih antioksidacijskih i detoksikacijskih sustava: NAD(P)H kinon oksidoreduktazu 1 (NQO1), hemoksigenazu 1 (HMOX1), podjedinice glutamil cistein sintetaze (GCLC i GCLM), ključnog enzima u biosintezi glutaciona, tioredoksin reduktazu 1 (TXNRD1), te nekoliko glutation transferaza (222,223).

U starenju dolazi do značajnih promjena u izražaju *NRF2*, što utječe na regulaciju odgovora na oksidacijski stres, koji s dobi postaje sve važniji faktor staničnog oštećenja. Paradoksalno, a klinički značajno, aktivnost progresivno opada s dobi u većini tkiva unatoč porastu oksidacijskog stresa, što povećava ranjivost stanica zbog slabljenja antioksidacijskog odgovora u trenutku kada je *NRF2* potreban. U skeletnom mišiću starih miševa, nedostatak *Nrf2* pogoršava oksidacijski stres povezan sa starenjem, što korelira s povećanim markerima oksidacijskog stresa (224). Studija Suh i sur. iz 2004. godine na štakorima pokazala je da pad *NRF2* aktivnosti u jetri i mozgu s dobi dovodi do statistički značajnog smanjenja izražaja i *GCLM*, podjedinice γ -glutamylcistein sintetaze, ključne za biosintezu *GCLC* glutaciona, i pada koncentracije glutaciona, a može se povratno pojačati suplementacijom alfa-lipoičnom kiselinom (225). Pad izražaja *NRF2* u starenju djelomično je uvjetovan epigenetskim utišavanjem promotora gena *NFE2L2* metilacijom, pojačanom ekspresijom mikroRNA koje destabiliziraju *NRF2*, te nakupljanjem mutacija Kelch-domene KEAP1, koji regulira razgradnju *NRF2* (220). Negativna povratna sprega predstavlja temelj odnosa *NRF2* i senescencije, pa tako gubitak *NRF2* ubrzava senescenciju, a senescencija dalje smanjuje izražaj *NRF2*. Upravo taj mehanizam pokazan je na životinjskim modelima. Nedostatak gena *Nrf2* u miševa pojačava indukciju senescencijskih markera i proupalnih SASP faktora u starijoj dobi, što pojačava kronične upalne procese povezane sa starenjem u hipokampusu (226). S druge strane, trajna aktivacija *NRF2* u fibroblastima kože inducira senescenciju, ali i može pridonijeti karcinogenezi, što upućuje na dvostruki učinak ovog transkripcijskog faktora koji varira između zaštitnog i štetnog djelovanja, ovisno o duljini aktivacije (227).

1.5.3. Pojačani izražaj gena kao odgovor na stres tijekom starenja

Zanimljivost starenja na razini transkriptoma jest da oksidacijski stres, koji raste s dobi uz pad NRF2 aktivnosti, ipak uzrokuje pojačanje ekspresije niza gena povezanih s odgovorom na stres alternativnim signalnim putevima. Ovaj fenomen, opisan kao stresna hipersignalizacija, uzrokovan je kompenzacijskim odgovorom na stres u starenju i rezultira karakterističnim promjenama transkripcije koje se razlikuju u odnosu na mlađa tkiva s urednim NRF2 odgovorom. Stresna hipersignalizacija označava kroničnu aktivaciju integriranog odgovora na stres, oksidacijskog stresa i odgovora na oštećenje DNA. Ovaj proces dovodi do povećanog izražaja stresom induciranog hormona i citokina GDF15 (eng. *growth differentiation factor 15*) kao sekretornog stresnog signala te inhibicije staničnog ciklusa povezanog sa senescencijom putem gena *CDKN1A/CDKN2A*, uz poremećaje u proteostatskoj obrani posredovanoj proteinima toplinskog šoka HSPA i promjene u NRF2 odgovoru. Tijekom starenja, stanice zbog navedenih promjena postaju senescentne, proupalne i sekretorno aktivne, pa održavaju kronični stresni signal u tkivu i mijenjaju transkriptomski profil starijih u odnosu na mlada tkiva.

Hormon i citokin induciran stresom, GDF15, jedan je od važnijih transkriptomskih markera starenja u brojnim tkivima (228). GDF15 indukcija odvija se putem integriranog odgovora na stres koji obuhvaća disfunkciju mitohondrija, oksidacijski stres i nakupljanje neodgovarajuće smatanih proteina, koji aktiviraju kinaze koje fosforiliraju eIF2 (eng. *eukaryotic initiation factor 2*), aktivirajući tako transkripcijski faktor ATF4 (eng. *activating transcription factor 4*), koji inducira transkripciju GDF15 (229). Sustavna analiza GTEx (eng. *Genotype tissue expression project*) kohorte, koja obuhvaća više od 1.000 uzoraka iz 44 ljudska tkiva u dobnom rasponu od 20 do 70 godina, pokazuje da GDF15 raste s dobi u većini analiziranih tkiva (230). U literaturi se kao važni markeri stanične senescencije navode *CDKN1A* i *CDKN2A*, inhibitori ciklin-ovisne kinaze. Pojačanje ekspresije inhibitora staničnog ciklusa *CDKN1A* i *CDKN2A* u starenju dokumentirano je studijama transkriptoma u gotovo svim tkivima i odražava nakupljanje senescentnih stanica koje su izašle iz staničnog ciklusa kao odgovor na kumulativno oksidacijsko oštećenje DNA (230,231). *CDKN1A* i *CDKN2A* uvode stanice u senescenciju kao odgovor na nagomilavanje DNA oštećenja ili trajno oksidacijsko oštećenje. U modelima induciranog oksidacijskog stresa (npr. vodikovim peroksidom u kulturama stanica), pojačana ekspresija *CDKN1A* i *CDKN2A* prati razvoj senescentnog staničnog fenotipa, dok farmakološko ili genetsko snižavanje njihovog izražaja smanjuje razinu inhibicije staničnog ciklusa, senescenciju i posljedičnu fibrozu, što dodatno potvrđuje njihovu ključnu ulogu u povezivanju oksidacijskog stresa sa starenjem tkiva

(231,232). Oksidacijsko oštećenje proteina dovodi do nakupljanja nepravilno smatanih proteina, koje aktivira stanični odgovor u endoplazmatskom retikulumu i kroz unutarstanične sustave za kontrolu kvalitete proteina, uključujući proteine toplinskog šoka (eng. *heat shock proteins*, HSP) i druge mehanizme proteostaze. U starijim tkivima opisano je paradoksalno stanje u kojem su signalni putevi staničnog stresa, uključujući proteine toplinskog šoka, kronično bazalno aktivirani (233). Istovremeno, akutni odgovor na toplinski ili drugi oblik staničnog stresa s dobi se smanjuje, što upućuje na trajno narušenu proteostazu i ograničen rezervni kapacitet prilagodbe na dodatni stres (233–235). Zbog trajne bazalne aktivacije i oslabljenog akutnog odgovora, opisane promjene označavaju narušeni odgovor na stres, koji može pridonijeti ranjivosti starih tkiva u odnosu na infektivne, toksične i ishemijske događaje.

U debelom crijevu, kao i u drugim tkivima, starenje je obilježeno postupnim porastom oksidacijskog stresa i istovremenim slabljenjem obrambenih mehanizama protiv reaktivnih kisikovih radikala. U tom procesu posebnu ulogu ima signalni put NRF2, čije smanjeno djelovanje dovodi do smanjenja izražaja gena zaštitnih antioksidativnih enzima i olakšava nakupljanje oksidiranih lipida i drugih oštećenja. U crijevima je posljedično narušena funkcija epitelne barijere, pojačana aktivacija proupalnih gena te smanjen regenerativni kapacitet crijevnog epitela, što pridonosi razvoju kronične upale u starijoj dobi (236,237). Studije transkriptoma, u skladu s navedenim, opisuju smanjenje izražaja ciljnih gena *NRF2*, *NQO1* i gena membranske glutation transferaze *MGST1*, uz porast biomarkera lipidne peroksidacije u starenju, što upućuje na progresivno slabljenje antioksidacijske zaštite kolona (225,238). Učinak oksidacijskog oštećenja na matične stanice je značajan zbog njihove osobite važnosti za regeneraciju epitela. U normalnim uvjetima homeostaze, matične stanice održavaju niske razine slobodnih kisikovih radikala, što uvelike ovisi o regulaciji *NRF2*. U starenju, zbog smanjenja izražaja *NRF2*, matične stanice se nalaze u trajnom oksidacijskom stresu, što vodi u metaboličku disfunkciju i konačno iscrpljenje matičnih stanica. U *Drosophila melanogaster*, opisani gubitak zaštite posredovane *NRF2* u crijevnim matičnim stanicama od oksidativnog stresa može pridonijeti smanjenom regenerativnom potencijalu crijevnog epitela opaženom u starijoj dobi (237).

Oksidacijski stres predstavlja jedan od temeljnih mehanizama koji dovodi do promjena transkriptoma u starenju. Progresivno nakupljanje ROS-induciranog oštećenja dovodi do aktivacije i kasnijeg iscrpljenja antioksidacijskih sustava, pri čemu pad izražaja *NRF2* zauzima središnje mjesto u daljnjem pogoršanju oksidativnog oštećenja u starim tkivima. Istodobno, alternativni signalni putevi integrativnog stresnog odgovora pojačano su izraženi u starenju, što

rezultira karakterističnim promjenama transkriptoma koje uključuju porast gena *GDF15*, *CDKN1A* i proteina toplinskog šoka, uz pad proliferacijskih i metaboličkih markera (230,231,233,235).

1.6.Starenje crijevnog živčanog sustava

1.6.1. Uloga crijevnog živčanog sustava u probavi

Crijevni živčani sustav predstavlja najsloženiji odjeljak perifernoga živčanog sustava, koji funkcionalno može djelovati neovisno o središnjem živčanom sustavu. Živčani sustav crijeva tako koordinira gotovo sve aspekte crijeвне fiziologije: motilitet, sekreciju, apsorpciju, vazodilataciju te imunološke i upalne procese i na taj način osigurava homeostazu probavnog sustava. Starenje dovodi do promjena i u ovom sustavu, koje se očituju gubitkom stanica i posljedičnom disfunkcijom. Degenerativne promjene crijevnog živčanog sustava s dobi dovode do progresivnog gubitka neurona, poremećaja neuropeptidne signalizacije i motoričke disfunkcije, što se klinički može očitovati simptomima dispepsije, gastroezofagealnog refluksa i opstipacije (239,240). Sustavno razumijevanje starenja živčanog sustava crijeva od izravne je kliničke važnosti, tim više jer su crijevni neuroni sve prepoznatiji kao moguće mjesto početnih promjena u razvoju neurodegenerativnih bolesti, prvenstveno Parkinsonove bolesti (241). Crijevni živčani sustav nastaje iz vagalnih stanica neuralnog grebena koje migriraju u crijevo tijekom fetalnog razvoja i organiziraju se u međusobno povezanu mrežu neurona i glija stanica raspoređenih u dva glavna pleksusa: mijenterički Auerbachov pleksus i submukozni Meissnerov pleksus. Mijenterički živčani pleksus smješten je između longitudinalnog i cirkularnog mišićnog sloja duž cijelog crijevnog trakta te koordinira crijevenu peristaltiku. Submukozni pleksus, smješten ispod sluznice, ograničen je na tanko i debelo crijevo te igra ključnu ulogu u regulaciji sekrecije, apsorpcije hranjivih tvari i protoka krvi u crijevnoj sluznici.

Živčani sustav crijeva čovjeka sadržava između 200 i 600 milijuna neurona, broj usporediv s ukupnim brojem neurona leđne moždine, čija se brojnost održava ravnotežom između apoptoze i neurogeneze (242). Crijevne glija stanice, koje svojim nastavcima okružuju neurone i krvne žile u sluznici i žičanim spletovima, imaju regulatornu ulogu u kontroli propusnosti crijeвне barijere, sekreciji hormona, modulaciji imunološkog odgovora i zaštiti neurona od oksidativnog stresa (243–246). Navedene stanice su funkcionalno analogne astrocitima središnjeg živčanog sustava, a njihova disfunkcija u starenju pridonosi ranjivosti crijevnih neurona obzirom na širok spektar funkcija. Kao dio cjelokupnog živčanog sustava organizma, crijevni živčani sustav integriran je sa središnjim živčanim sustavom, uz određeni

stupanj autonomije u obavljanju svojih funkcija. Ova integracija crijevnog živčanog sustava sa središnjim živčanim sustavom čini ga ključnim posrednikom između crijevnog mikrobioma, imunološkog sustava, sekretorne i apsorpcijske funkcije probave.

Analize transkriptoma životinjskih i ljudskih uzoraka imale su za cilj definirati razlike između vrsta, kao i razlike između pojedinih anatomskih regija unutar crijeva. Upravo s tim ciljem Zeisel i sur. su RNA sekvenciranjem neurona crijeva miša i čovjeka identificirali više funkcionalnih podtipova neurona mijenteričkog plexusa, pokazujući da su neki podtipovi neurona evolucijski očuvani u ljudi i miševa, dok drugi pokazuju izražene razlike između vrsta (247). Složenost živčanog sustava probave dodatno je opisana u zanimljivoj studiji Drokhlyansky i sur. koji su RNA sekvenciranjem opisali staničnu raznolikost crijevnog živčanog sustava čovjeka i miša, definirajući detaljan stanični atlas neuronskih i glijalnih podtipova te njihove transkripcijske genske potpise u različitim anatomskim regijama crijeva (248). Navedeni radovi postavljaju molekularni referentni atlas crijevnog živčanog sustava, u kojem su funkcionalni neuronski i glijalni podtipovi precizno definirani na razini transkripcijskih profila. Time se omogućuje da se promjene povezane sa starenjem, bolestima ili terapijskim intervencijama više ne promatraju na razini cijelog crijevnog živčanog sustava, nego u jasno određenim staničnim populacijama s poznatim funkcijama. Spomenute studije pružaju okvir važan za translaciju nalaza iz životinjskih modela na čovjeka i za identifikaciju specifičnih terapijskih ciljeva u starenju i bolestima crijevnog živčanog sustava.

1.6.2. Gubitak neurona tijekom starenja crijeva

Živčani sustav crijeva prolazi kroz niz promjena tijekom starenja, od kojih možda najznačajniju predstavlja kvantitativni gubitak neurona. Opadanje broja crijevnih neurona u gotovo svim regijama gastrointestinalnog trakta istraženo je na višestrukim životinjskim modelima i ljudskim uzorcima te predstavlja jedan od najjasnijih histoloških nalaza starenja živčanog tkiva probave (239,249–252). U ljudskim uzorcima debelog crijeva opisano je povećanje postotka ganglija s prazninama, mjestima gdje nedostaju neuronska tijela, za gotovo tri puta u usporedbi s novorođenačkom i starijom dobi (250). Studija Gomesa i sur. u ljudskom debelom crijevu bilježi gubitak od 37% mijenteričkih neurona u starijoj životnoj dobi (240). Na životinjskim modelima, u uzorcima duodenuma štakora, opisano je također smanjenje ukupnog broja neurona mijenteričkog plexusa u starijih jedinki (253). Istraživanja na mišjim modelima opisuju gubitak neurona u mijenteričkom plexusu koji počinje između 16. i 20. mjeseca, ovisno o anatomskoj regiji, što također prati značajno opadanje funkcije crijevnog motiliteta u starijih jedinki (252). Prema studiji Cowen i sur., kalorijska restrikcija kod miševa i štakora dosljedno

spriječava ili odgađa gubitak mijenteričkih neurona, uz očekivano produljenje životnog vijeka, što predstavlja zanimljiv rezultat koji upućuje na to da je gubitak neurona barem djelomično metabolički posredovan i moguće reverzibilan (254). Za razliku od mijenteričkog plexusa, studije koje su uključivale submukozni plexus su rijetke. Kvantitativna analiza silaznog kolona sugerira da ukupan broj submukoznih neurona ne pokazuje jasan linearan pad s dobi (239). Istraživanja na životinjskim modelima tijekom starenja u submukoznom plexusu identificirala su dobno uvjetovane promjene izražaja proteina α -sinukleina u kontekstu mogućeg razvoja neurodegenerativnih promjena (255).

Gubitak neurona u crijevnom živčanom sustavu nije jednoobrazan pa tako različite subpopulacije neurona pokazuju različitu osjetljivost prema procesu starenja. Kolinergički ekscitatorni motorni neuroni pokazuju veći stupanj gubitka u usporedbi sa nitrinergičkim inhibitornim motornim neuronima, koji su razmjerno pošteđeni u ranoj fazi starenja u većini regija crijeva (239,256). Studija usmjerena na ljudski mijenterički plexus zabilježila je znatan pad izražaja gena protoonkogenog receptora tirozin kinaze *RET*, neurotrofinskog receptora *NGFR* i neuronalne sintaze dušikovog oksida *NOS1*, uz istodobno povećanje izražaja gena za kolin acetil transferazu *CHAT*, što sugerira subpopulacijsko remodeliranje neovisno o ukupnom gubitku neurona (257).

Intersticijske Cajalove stanice djeluju kao posrednici između crijevnog živčanog sustava i glatke muskulature crijeva, generirajući spore valne depolarizacije koje koordiniraju peristaltiku (258). U zdravom ljudskom želucu i kolonu, broj ovih stanica i volumen mreže opada s dobi po stopi od 13% po desetljeću života, neovisno o spolu i regiji crijeva, što može negativno utjecati na motilitet crijeva (259). U miševa, smanjenje populacije intersticijskih Cajalovih stanica prethodi gubitku neurona i pojavljuje se ranije u oralnijim dijelovima probave, želucu, što sugerira da ove stanice mogu biti inicijalni čimbenik disfunkcije crijevnog motiliteta (252). Smanjenje izražaja gena transmembranskog proteina koneksina 43 (*Cx43*) u crijevnim glija stanicama miševa, koji posreduje u međustaničnoj komunikaciji, prethodi opadanju broja intersticijskih stanica i neurona, što otvara mogućnosti za ranu terapijsku intervenciju (252).

Oksidativni stres prepoznat je kao jedan od ključnih mehanizama gubitka crijevnih neurona u starenju, reaktivne kisikove vrste (ROS) oštećuju mitohondrijsku membranu neurona i induciraju apoptozu (260). Pad razine neurotrofnih čimbenika, posebno neurotrofičnog čimbenika izvedenog iz glijalnih stanica (eng. *glial cell line-derived neurotrophic factor*, *GDNF*) i moždanog neurotrofnog čimbenika (eng. *brain-derived neurotrophic factor*, *BDNF*),

smanjuje antiapoptotsku zaštitu crijevnih neurona u starijoj dobi (261). Studija na štakorima pokazuje da kalorijska restrikcija, koja smanjuje oksidativni stres i povećava dostupnost neurotrofnih faktora, može prevenirati do 50% gubitka ilealnih mijenteričkih neurona u životinjskom modelu (260).

1.6.3. Funkcionalne posljedice starenja

Najizravija klinička posljedica starenja crijevnog živčanog sustava je progresivno pogoršanje gastrointestinalnog motiliteta, pri čemu je kronični zatvor jedan od najčešćih gastrointestinalnih poremećaja u gerijatrijskoj populaciji. Gubitak inhibitornih nitrenergičkih neurona koji putem dušikovog oksida koordiniraju relaksaciju glatke muskulature aboralnih segmenata kolona, uz istodobno slabiju koordinaciju peristaltike od strane intersticijskih stanica, dovodi do smanjene propulzivne aktivnosti i produljenog vremena tranzita crijevnog sadržaja (252,262). Smanjenje ekspresije VIP-a, vazoaktivnog intestinalnog peptida i supstancije P u anorektumu starih životinja dodatno narušava koordinaciju anorektalnog refleksa (263). Iz navedene literature je uočljivo da kumulativni gubitak neurona i neuromodulatora u crijevnom živčanom sustavu, zajedno s promjenama efektorskih stanica, čini neurodegenerativnu podlogu za visoku prevalenciju motoričkih poremećaja crijeva u starijoj dobi.

Submukozni plexus, koji inervira epitelne sekretorne i resorptivne stanice, tijekom starenja prolazi kroz kvantitativno propadanje zbog čega su narušene funkcije crijeвне sekrecije i apsorpcije hranjivih tvari. U studiji na štakorima, gubitak neurona submukoznog plexusa aboralnog dijela kolona opažen je već u dvanaestom mjesecu starosti i progresivno napreduje (264). Gubitak neurona submukoznog plexusa dovodi do poremećaja ionskog transporta epitela i smanjene sekrecije mucina, što pridonosi slabijem vlaženju crijevnog sadržaja i daljnjem pogoršanju opstipacije. Primarna senzorna neuronska mreža crijeva, koju čine intrinzički primarni aferentni neuroni (IPAN), detektira kemijske promjene u lumenu crijeva, tijekom starenja gubi funkciju zbog smanjenja ekscitabilnosti, što u konačnici narušava refleksne sekretorne odgovore na nutrijente (265,266).

Starenje crijevnog živčanog sustava nije izolirani lokalni fenomen već dio sustavnog neurodegenerativnog procesa koji zahvaća i središnji živčani sustav. Nakupljanje α -sinukleina, temeljnog patohistološkog obilježja Parkinsonove bolesti u obliku Lewyjevih tjelešaca, zabilježeno je u crijevnim neuronima pacijenata s Parkinsonovom bolesti godinama prije pojave motoričkih simptoma, kao i na životinjskim modelima (241,267,268). Eksperimentalni dokazi pokazuju da inokulacija α -sinukleina u mijenterički plexus duodenuma starih miševa, za

razliku od mladih, uzrokuje progresivnu propagaciju patološkog α -sinukleina u središnji živčani sustav putem vagusnog živca i razvoj motoričkih deficita, što upućuje na postojanje dobno vezanih faktora na razini crijeva koji utječu na razvoj Parkinsonove bolesti (269). I druga neurodegenerativna oboljenja, poput Alzheimerove bolesti, povezuju se sa crijevnim živčanim sustavom kao mjestom inicijalnih patoloških promjena. Patološki depoziti τ -proteina i β -amiloidnih peptida opisani su u transgeničnih miševa s Alzheimerovom bolešću, a eksperimentalna inokulacija A β fibrila u debelo crijevo transgeničnih miševa uzrokuje propagaciju patologije do mozga putem vagusnog živca (270,271). U zanimljivoj studiji Kim i sur. pokazali su terapijski učinak transplantacije zdrave mikroflore na istom modelu transgeničnih miševa, zbog čega bi buduće studije na ljudima mogle koristiti ovu intervenciju u terapiji Alzheimerove bolesti (270).

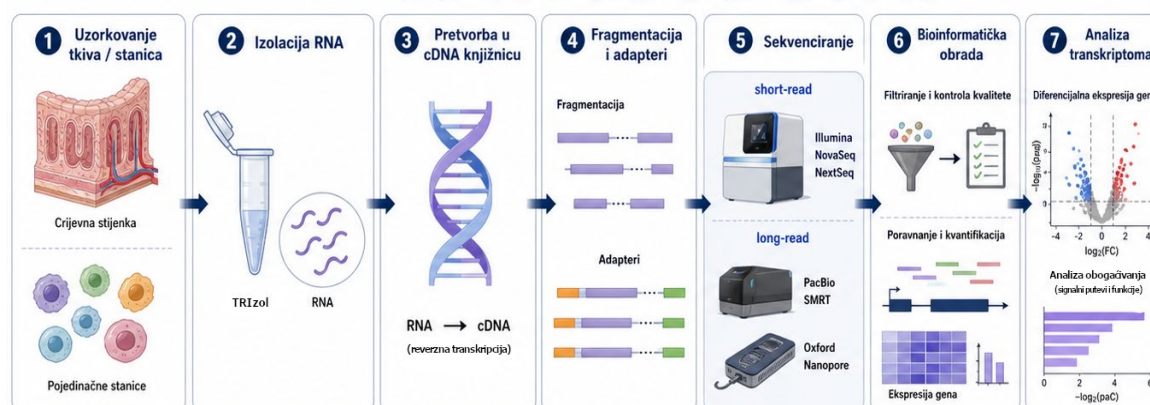
U debelom crijevu starih Fischer 344 štakora otkrivena je kombinacija distrofijskih depozita sa i bez nakupljanja α -sinukleina te djelomično preklapanje s fosforiliranim tau-agregatima, što upućuje na to da su dobno uvjetovane crijevne neuropatije morfološki i molekularno heterogene, pri čemu se više neovisnih degenerativnih putova isprepliće tijekom starenja mijenteričkog plexusa (272). Biopsija tkiva crijevnog živčanog sustava, zbog svega navedenog i zbog relativne pristupačnosti putem endoskopskih pretraga, u budućnosti bi mogla predstavljati metodu ranog otkrivanja promjena povezanih s neurodegenerativnim bolestima (273). Živčani sustav crijeva sve se više prepoznaje kao važan dio cjelokupnog živčanog sustava, osobito u komunikaciji sa središnjim živčanim sustavom, pri čemu se patološke promjene crijevnih neurona i mikrookoliša crijeva povezuju s razvojem i progresijom neurodegenerativnih bolesti, osobito Parkinsonove i Alzheimerove bolesti. Nakupljanje patoloških proteina, promjene crijevne mikrobiote i kronična upala u crijevu mogu se putem crijevnog živčanog sustava propagirati prema središnjem živčanom sustavu, stvarajući mogući periferni izvor neurodegeneracije.

1.7. Transkriptomika u istraživanju starenja

1.7.1. Razvoj i važnost transkriptomike u istraživanju starenja

Transkriptomika je znanstvena grana koja se bavi proučavanjem ukupnog skupa RNA molekula unutar stanice ili tkiva u određenom trenutku. Proučavanje RNA je temeljni alat suvremene biomedicine koji je revolucionirao razumijevanje molekularnih mehanizama starenja i drugih važnih staničnih procesa. RNA u stanici predstavlja efektivni dio genoma koji, za razliku od DNA, mijenja svoj izražaj ovisno o biološkom stanju stanice. DNA, zbog

navedenoga, smatramo statičnim dijelom genoma, dok nam RNA omogućava uvid u dinamične promjene transkripcije genoma koje odražavaju stanične procese. Početci RNA sekvenciranja sežu od 1990-ih godina, kada su se u praksu uvodile metode označavanja eksprimirane sekvence (eng. *expressed sequence tag*, EST), koje su razvili Adams i suradnici, te kasnije i metoda serijske analize genske ekspresije (eng. *serial analysis of gene expression*, SAGE), koju su razvili Velculescu i suradnici (274,275). Dok su starije tehnike, poput analiza RNA matricama (eng. *microarray*), omogućile osnovnu karakterizaciju izražaja gena na razini genoma, razvoj sekvenciranja sljedeće generacije (eng. *next-generation sequencing*, NGS) od 2008. godine nadalje donio je kvantitativno, ponovljivo i sveobuhvatno mjerenje transkriptoma s razlučivošću koja je ranije bila nezamisliva (276). Općenito, RNA sekvenciranje uključuje uzorkovanje tkiva, iz kojeg se potom izolira RNA. Ovisno o tome radi li se o analizi ukupnog tkiva ili pojedinih stanica, ovaj korak može biti složeniji ili jednostavniji (slika 4). Zatim se ukupna izolirana RNA pretvara u komplementarnu DNA knjižnicu, koja se potom fragmentira uz dodavanje adaptera na oba kraja. Sekvenciranje obuhvaća svaku molekulu (fragment) visoko propusnom metodom, kako bi se prikupile kratke sekvence s jednog kraja (eng. *single-end sequencing*) ili s oba kraja (eng. *pair-end sequencing*). Duljina očitavanja može varirati od 30 do 400 baznih parova, ovisno o platformi koja se koristi. Za većinu istraživačkih transkriptomskih studija danas se za sekvenciranje kratkih očitavanja najčešće koriste Illumina platforme poput NovaSeq ili NextSeq, dok se PacBio SMRT i Oxford Nanopore sustavi najčešće primjenjuju za sekvenciranje dugih očitavanja i transkripte pune duljine (277). Rezultati očitavanja prvo se filtriraju, poravnaју na referentni genom ili transkriptom te se potom kvantificira izražaj gena kako bi se omogućila bioinformatička obrada i analiza (slika 4).



Slika 4. Prikaz ključnih koraka u RNA sekvenciranju. Izvor: autor; slika stvorena pomoću UI: Perplexity AI, San Francisco, CA, USA: Perplexity AI; 2026

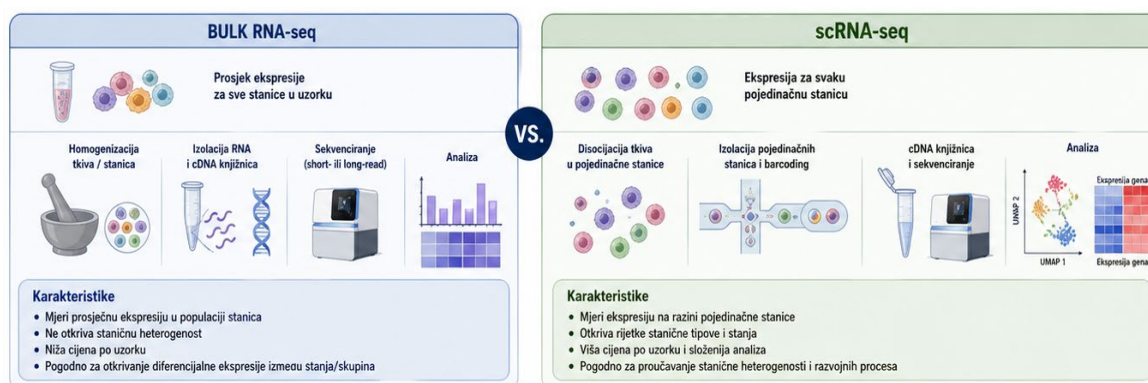
Primjena transkriptomike u istraživanjima starenja ima središnje mjesto. Promjene u izražaju gena odražavaju dinamičku prilagodbu stanica na kumulativno oštećenje, metabolički stres i imunosnu disfunkciju. U posljednjem desetljeću, istraživanja su napredovala od sekvenciranja ukupne RNA pojedinih uzoraka (eng. *bulk RNA-seq*) do gradnje atlasa tkiva na razini pojedinih stanica korištenjem metoda RNA sekvenciranja na razini pojedinih stanica (eng. *single-cell RNA sequencing, scRNA-seq*), što je temeljito promijenilo paradigmu proučavanja starenja probavnog sustava i ostalih organa.

1.7.2. Metodologija RNA sekvenciranja

Metoda sekvenciranja RNA iz ukupnog uzorka tkiva (eng. *bulk RNA sequencing, bulk RNA-seq*) temelji se na izolaciji ukupne RNA iz homogeniziranog uzorka tkiva koji sadržava milijune stanica, a dobiveni profil izražaja gena predstavlja prosječnu vrijednost svih staničnih populacija prisutnih u uzorku. Prednosti ovog pristupa su višestruke: relativno niska cijena (tipično deset puta niža od metode sekvenciranja na razini stanica), jednostavnija bioinformatička obrada, visoka osjetljivost detekcije gena i pogodnost za studije koje istražuju pregled genskog izražaja u pojedinim tkivima (slika 5) (278). U istraživanjima starenja *bulk RNA-seq* je korišten u studiji *The GTEx Consortiuma* u sklopu projekta *Genotype-Tissue Expression* za opis profila izražaja gena gotovo 54 ljudska tkiva, uključujući značajne dijelove probavnog sustava poput debelog crijeva i želuca (279). Za identifikaciju diferencijalno izraženih gena (eng. *differentially expressed genes, DEG*) između dobnih skupina, ispitivanje signalnih puteva u poznatim tipovima stanica, *bulk RNA-seq* predstavlja optimalan izbor, osobito kada je broj bioloških replikata važniji od stanične razlučivosti. Ključno ograničenje *bulk RNA-seq* pristupa je problem prosječnog izražaja gena u pojedinom tkivu budući da se istodobno sekvencira RNA iz epitelnih, imunoloških, stromalnih, endotelih i živčanih stanica unutar istog uzorka, a promjene uzrokovane starenjem u pojedinim populacijama stanica mogu biti smanjeno uočljive zbog dominantnijih tipova stanica. U heterogenim tkivima poput crijeвне stijenke koja sadrži matične stanice crijeva, limfocite lamine proprije, enteroendokrine, Panethove, živčane, endotelne i glatkomišićne stanice u anatomski bliskim odjeljcima ovo ograničenje ima poseban metodološki značaj.

Sekvenciranje RNA na razini pojedinih stanica (*scRNA-seq*), čiji je konceptualni temelj postavio Tang i sur. 2009. godine sekvenciranjem transkriptoma mišje blastomere, razvilo se u visokopropusnu tehnologiju za simultanu analizu transkriptoma velikog broja stanica u jednoj studiji (slika 5) (280). Moderne platforme temeljene na mikrofluidičkim kapljicama, poput 10x Genomics Chromium, smanjile su troškove i povećale propusnost metode do razine koja

omogućava izradu staničnih atlasa (281). Sekvenciranje RNA na razini pojedinih stanica



Slika 5. Karakteristike metoda RNA sekvenciranja. Izvor: autor, slika stvorena pomoću UI: Perplexity AI, San Francisco, CA, USA: Perplexity AI; 2026

omogućuje identifikaciju rijetkih staničnih populacija poput enteroendokrinih podtipova, urođenih limfnih stanica tipa 3 (ILC3), progenitora Panethovih stanica te rekonstrukciju diferencijacijskih puteva i mapiranje dobno ovisnih promjena u staničnom sastavu tkiva, koje metodom sekvenciranja na razini cijelog uzorka ne bi bile uočljive (282). Sekvenciranje jezgara pojedinih stanica (eng. *single nucleus RNA sequencing, snRNA-seq*) nastalo je kao metoda analize tkiva koja nisu pogodna za pripremu svježe stanične suspenzije, poput smrznutih arhivskih uzoraka ili tkiva s visokim sadržajem lipida i vezivnog matriksa (283). Sekvenciranje RNA na razini jezgre pojedinih stanica (eng. *snRNA-seq*) sekvencira isključivo intranuklearne transkripte, ali bez mogućnosti analize citoplazmatskih transkripata i smanjenu zastupljenost mRNA izoformi koje nastaju transkripcijom u jezgri i potom migriraju u citoplazmu. Metode sekvenciranja na razini pojedinih stanica imaju specifična ograničenja: složenu izolaciju stanica, visoku stopu tehničkog šuma, potrebu za naprednom bioinformatičkom infrastrukturom i znatno veće troškove po uzorku u usporedbi s *bulk RNA-seq* metodom (278). Posebno je važna razlika u osjetljivosti detekcije gena; *bulk RNA-seq* po uzorku detektira između 15.000 i 30.000 gena u ljudskim uzorcima, dok *scRNA-seq* po stanici detektira između 1.000 i 5.000 visoko varijabilnih gena za daljnju analizu, ovisno o dubini sekvenciranja i tipu stanice (284,285). Metoda sekvenciranja na razini pojedinih stanica opterećena je *dropout* fenomenom, koji označava srednji ili umjereni izražaj gena u jednoj stanici dok se isti u drugoj stanici istog tipa ne detektira (286). Upravo zbog ovog efekta, *scRNA-seq* analize detektiraju velike brojeve gena, dok njihov broj iznosi nula u velikom dijelu rezultata, zbog čega je potrebna dodatna informatička obrada kako bi se ovaj efekt umanjio. Ovaj fenomen može biti osobito

problematičan pri analizi rijetko izraženih transkripcijskih faktora i signalnih molekula u analizama starenja tkiva.

1.7.3. Promjene transkriptoma tijekom starenja

Sustavna istraživanja promjena transkriptoma u starenju, od životinjskih modela, primata do čovjeka, otkrila su očuvan skup specifičnih transkripcijskih promjena koje se ponavljaju u različitim tkivima i vrstama. Pojačana ekspresija proupalnih gena (IL-6, TNF- α , IL-1 β), aktivacija NF- κ B signalnog puta, porast ekspresije gena povezanih sa razvojem SASP-a, smanjenje ekspresije mitohondrijskih i metaboličkih gena te poremećaji proteostaznih mehanizama nalaze se konzistentno u gotovo svim tkivima starih organizama (71,287,288). Promjene koje zahvaćaju tkiva životinja tijekom starenja istraživane su već opisanim metodama RNA sekvenciranja na razini pojedinih stanica, kako bi se dobio temeljni uvid u starenje na razini stanica i pojedinih organskih sustava. Tako je primjerice analiza podataka *Tabula Muris Senis* grupe identificirala veći skup gena čiji se trend ekspresije, smanjenje ili pojačanje, dosljedno ponavlja u različitim tipovima stanica iz 23 različita tkiva i organa miševa, što snažno sugerira koordinirani sustavni program starenja na razini transkriptoma (289). Najdosljednija promjena transkriptoma u starenju jest imunološki pomak prema kroničnoj upali niskog stupnja, fenomenu poznatom kao *inflammageing*, koji rezultira razvojem sterilnih upalnih zbivanja u tkivima tijekom starenja. Na razini RNA transkripcije u životinjskim i ljudskim tkivima, ovo se očituje progresivnim pojačanjem izražaja ciljnih gena *NF- κ B* poput ciklooksigenaze 2 (*COX-2*) i proupalnih citokina, uz istodobno smanjenje izražaja gena stečenog imunološkog odgovora i pojačanje izražaja gena povezanih s urođenim imunološkim sustavom (287,290,291). Tkivo probave također prolazi kroz promjene koje dovode do promjena u izražaju gena tijekom starenja organizma. Istraživanje promjena transkriptoma debelog crijeva u starenju na mišjim modelima identificiralo je 85 diferencijalno izraženih gena, dominantno povezanih s imunološkim odgovorom i upalnim signalnim putevima (292). U debelom crijevu miševa tako dolazi do pojačanog izražaja signalnih puteva povezanih s upalom, poput stečenog upalnog odgovora, aktivacije limfocita, što ukazuje na oslabljenju sposobnost crijeva da uspostavi imunološku homeostazu i rezultira razvojem kroničnog stanja upale, koje je uvelike posljedica narušene funkcije crijevne barijere (292). Analiza transkriptoma mezenterijskih limfnih čvorova u istoj studiji ukazuje na poremećaj imunološke regulacije zbog pada broja stanica povezanih s ovom funkcijom, dok je istovremeno broj proupalnih stanica porastao s dobi, što je u skladu s pojačanjem sistemske upale i pojačanim izražajem gena povezanih s citokinima u kasnijoj životnoj dobi (292). Pojačan izražaj faktora rasta i

diferencijacije 15 (GDF15), citokina induciranog stresom i biljega sistemske kronične upale, u starijoj životnoj dobi povezan je s bolestima starije životne dobi poput kardiovaskularnih, neurodegenerativnih i bubrežnih oboljenja (228). Prostorno vremenski atlas kolona, koji obuhvaća oko 1500 tkiva i 400.000 *snRNA-seq* profila iz 11 dobnih skupina miševa i tri anatomske regije, pokazao je da starenje dovodi do gubitka vrčastih stanica i razvoja difuznog upalnog stanja, uz različite prostorne gradijente tih učinaka (293). Osim promjena u sastavu stanica i razvoja kronične upale, tkiva tijekom starenja pokazuju cijeli niz promjena genskog izražaja. Meta-analiza 127 skupova podataka transkriptomskih analiza tkiva miševa, štakora i ljudi utvrdila je smanjenje izražaja gena važnih za funkciju mitohondrija, uključujući gene elektronskog transportnog lanca (287). Osim ovih nalaza, brojne transkriptomske studije u više vrsta organizama i tkiva dosljedno pokazuju smanjenje izražaja gena uključenih u oksidativnu fosforilaciju, mitohondrijsku biogenezu i ključne aspekte lipidnog metabolizma tijekom starenja, pri čemu su geni povezani s mitohondrijima i oksidativnom fosforilacijom među najdosljednije smanjeno izraženim transkripcijskim putevima u starenju tkiva (294–296). Ove studije ukazuju da starenje na genskoj razini prati obrazac porasta izražaja proupalnih i SASP povezanih gena, što ukazuje na razvoj sistemske upale u sklopu *inflammaginga*. Istovremeno, dolazi do smanjenja izražaja gena za mitohondrije, oksidativnu fosforilaciju i metaboličke putove, što ukazuje na narušenu energetska funkciju stanica. U crijevima je ovaj pomak u izražaju dodatno pojačan zbog narušene crijevne barijere, koja, uz porast izražaja gena citokina i imunoloških odgovora, dovodi do razvoja sistemske upale i disbioze. Regulatorna funkcija mezenterijskih limfnih čvorova opada, što predstavlja daljnji pomak prema sistemskoj upali. Prostorno-vremenski atlas transkriptoma debelog crijeva dodatno pokazuje da starenje ne mijenja crijevo jednako, već dovodi do gubitka vrčastih stanica i razvoja difuznog upalnog stanja duž crijeva, s jasnim prostornim gradijentima tih promjena. Na sistemskoj razini, meta-analize mnogih tkiva dosljedno nalaze pad izražaja gena mitohondrijske biogeneze, elektronskog transportnog lanca i lipidnog metabolizma, dok geni povezani s upalom i NF-κB signalizacijom postaju dominantni. Zbog pada lipidnog metabolizma i funkcije mitohondrija, stanice postaju energetska neučinkovite i ulaze u stanje trajnog energetskeg stresa. Iz literature je vidljivo da starenje pokreće koordinirani, genski upravljani program prelaska tkiva, uključujući crijeva, u stanje kronične, sterilne upale i energetske štednje, uz gubitak homeostaze i potencijala za regeneraciju.

1.7.4. Prednosti i uloga modernih pristupa istraživanja starenja

Tabula Muris Senis (TMS), objavljena 2020. od strane *The Tabula Muris Consortiuma*, prvi je sustavni stanični atlas starenja sisavaca koji obuhvaća preko 300.000 stanica iz 23 tkiva i organa miševa unutar šest dobnih skupina, od 1 do 30 mjeseci (289). Ovaj atlas je izrađen metodom RNA sekvenciranja na razini pojedinačnih stanica i predstavlja značajan rad u kontekstu istraživanja starenja. Rezultati navedene studije pokazali su da je propadanje tkiva u starenju uzrokovano promjenama u genskoj ekspresiji unutar pojedinačnih stanica, ali i promjenama u omjerima stanica unutar tkiva. Osobit naglasak u ovom istraživanju stavljen je na istraživanje stanične senescencije mjerenjem izražaja tumorsupresorskog gena *Cdkn2a* čiji je izražaj gotovo udvostručen u starijih miševa te je također utvrđena drugačija stopa starenja za različite stanice i tkiva (289).

Tabula Sapiens, objavljena 2022. godine, predstavlja analognu studiju na ljudima i molekularni referentni atlas za više od 400 staničnih tipova čovjeka, konstruiran *scRNA-seq* analizom oko 500.000 stanica iz 24 tkiva i organa dobivenih od dobrovoljnih donora organa (297). U jedinstvenoj analizi, više tkiva i stanica, autori su definirali 3792 gena povezana sa senescencijom i pokazali da ne postoji univerzalan set senescentnih gena, nego skup djelomično preklapajućih, stanično i tkivno specifičnih transkriptomskih promjena gena tijekom senescencije. Unatoč značajnoj heterogenosti, identificiran je manji skup široko prisutnih gena povezanih sa senescencijom te više funkcionalnih puteva povezanih sa staničnom adhezijom, proteostazom, mitohondrijskom disfunkcijom, metaboličkim remodeliranjem i stresom organela, koji se u različitim kombinacijama pojavljuju u brojnim staničnim tipovima. Rezultati ove studije ukazuju da se promjene transkriptoma povezane sa senescencijom uglavnom grupiraju prema staničnoj lozi, a ne prema tkivu ili donoru (297). U 2025. godini objavljena je nova, proširena studija *Tabula Sapiens Consortiuma*, koja je uključila devet novih donora, uz dodatak četiri nova tipa tkiva, te je značajno proširila bazu podataka. Nadovezujući se na osnovu *Tabula Sapiens* skupa podataka, u novoj analizi, detaljnije je analizirala mrežu transkripcijskih faktora, transkriptomskih programa povezanih sa senescencijom, kao i spolno specifične promjene genskog izražaja kroz različite stanične tipove (298). Zajedno, ove studije nude okvir za interpretaciju regulacije genskog izražaja i fenotipova senescencije između tkiva, staničnih loza i spolova na razini stanice.

Human Cell Aging Transcriptome Atlas je atlas starenja ljudskih tkiva objavljen 2025. godine i izrađen od setova podataka dobivenih *scRNA-seq*-om koji su analizirali promjene transkriptoma tijekom starenja čovjeka iz ukupno 76 publikacija (299). Studija objedinjuje 92

milijuna stanica i 3.475 tkivnih uzoraka iz više od 50 različitih tipova tkiva, sa rasponom dobi od 0 do 103 godine. Ova baza podataka omogućuje analizu diferencijalno izraženih gena tijekom starenja na razini stanice i tkiva, pri čemu identifikacija pojačano izraženih puteva kronične upale tijekom starenja u gotovo svim analiziranim tkivima predstavlja najznačajniji nalaz. Rezultati studije pokazuju i trajno promijenjene puteve elektronskog transportnog lanca, signaliziranja proteinom TORC1, kao i puteve stanične adhezije za koje je poznato da pokazuju promjene tijekom starenja (299).

Aging Atlas, objavljen 2021. u časopisu *Nucleic Acids Research*, prva je baza podataka koja sustavno organizira istraživanja starenja na razini gena i metabolizma, uključujući module RNA sekvenciranja s preko 18.000 diferencijalno izraženih gena vezanih uz starenje, kao i module *scRNA-seq* koji pokrivaju 14 tipova tkiva u štakora, majmuna i čovjeka (300). Baza integrira podatke o genskoj manipulaciji s fiziološkim starenjem u specifičnim tkivima i organima, zbog čega predstavlja zanimljiv alat za proučavanje novih nalaza analiza transkriptoma u okviru poznatih promjena tijekom starenja (300).

Daljnji napredak u ovom području istraživanja donosi prostorna transkriptomika (eng. *spatial transcriptomics*, *ST*), koja omogućuje mapiranje transkriptomskih profila uz očuvanje prostornih koordinata stanica unutar uzorka tkiva (301). Ova metoda je značajna u istraživanju starenja jer omogućuje detekciju finih, prostorno vezanih promjena u genskoj ekspresiji, staničnoj heterogenosti i mikrookolišu koje se ne mogu otkriti drugim metodama sekvenciranja. Primjenom prostorne transkriptomike moguće je precizno povezati promjene transkriptoma sa specifičnim nišama poput matičnih stanica, imunoloških infiltrata ili vezivno promijenjenih područja, što otvara put identifikaciji ranih, lokaliziranih znakova starenja tkiva i potencijalnih terapijskih meta koje bi ostale neprepoznate bez definiranja prostornog konteksta. Prostorni atlas kolona Martinez-Jimeneza i sur., iz 2024. godine, koristio je prostornu transkriptomiku u kombinaciji sa oko 400.000 *snRNA-seq* genskih profila za izradu prvog prostornog atlasa starenja debelog crijeva u miševa, identificirajući na ovaj način promjene povezane sa starenjem koje se razlikuju prema anatomskoj regiji (293).

Vrijednost modernih transkriptomskih pristupa očituje se i u mogućnosti razvoja markera biološke dobi. Promjene transkriptoma tijekom starenja identificirane u atlasima, poput bodovnog sustava konstruiranog iz skupova podataka *Tabula Muris Senis*, mogu se koristiti za procjenu biološke dobi tkiva, neovisno o kronološkoj dobi donora, što otvara put prema individualiziranoj medicini starenja (289). Nadalje, integracijom transkriptomskih atlasa s epigenomskim pokazateljima biološke dobi, poput DNA-metilacijskih satova (npr. Horvathov

sat), te s proteomskim profilima, moguće je identificirati potencijalne uzročne veze između promjena u genskoj ekspresiji, epigenetskoj regulaciji i funkcionalnom propadanju tkiva, što predstavlja jedan od ključnih ciljeva suvremene gerontologije. Konačno, dostupnost podataka iz studija o starenju crijevnih tkiva, integriranih u internetskim platformama, poput *Human Cell Atlas Data Portala*, olakšava pristup podacima iz ovih istraživanja, omogućujući daljnje analize postojećih podataka u kontekstu novih istraživačkih pitanja, pa tako i izravnu usporedbu transkriptomskog profila crvuljka s profilima tankog i debelog crijeva iz istih baza podataka.

1.8.Problematika istraživanja starenja crvuljka

Starenje predstavlja složeni proces psihofizičkog propadanja, karakteriziran progresivnom staničnom i organskom disfunkcijom sustava te nagomilavanjem DNA oštećenja koje dovodi do promjena u izražaju gena. Starenjem crijeva prolaze kroz niz morfoloških i funkcionalnih promjena koje mogu narušiti funkciju i homeostazu tkiva. Najvažnije promjene tijekom starenja zahvaćaju matične stanice crijeva, crijevni živčani sustav i crijevni epitel, koji je usko povezan s mikrobiotom. Integritet crijeвне barijere probavnog sustava slabi s životnom dobi te doprinosi razvoju sistemskog upalnog stanja u starijoj populaciji. Navedene promjene tkiva u starijoj populaciji dovode do disfunkcije koja vodi povećanoj incidenciji bolesti i drugih poremećaja probavnog sustava te predstavlja značajno opterećenje za zdravstvene sustave diljem svijeta (102). Promjene uzrokovane starenjem tkiva zahvaćaju sve dijelove probave, pa tako i crvuljak. Iako je dugo funkcija ovog organa bila nejasna, crvuljak se u novije vrijeme smatra sekundarnim limfnim organom koji funkcionira kao dio GALT-a. Prisutnost biofilma bogatog mikrobiotom i sama struktura organa čine ga rezervoarom mikroflore u slučajevima eradikacije iste (150). S kliničke strane, apendektomija nije povezana s dugoročnim štetnim posljedicama; dapače, povezuje se s mogućim smanjenjem rizika od razvoja ulceroznog kolitisa kasnije u životu (173,175).

Istraživanja promjena transkriptoma tijekom starenja crijeva doživjela su snažan razvoj napretkom tehnologije sljedeće generacije sekvenciranja RNA, ali su gotovo u cijelosti ograničena na tanko i debelo crijevo. Crvuljak, kao sastavni dio debelog crijeva i važno mjesto produkcije sekretornog IgA unutar crijeva, sustavno je izostavljan iz transkriptomskih analiza starenja. Referentni atlas starenja kolona koji su izradili Širvinskis i sur. obuhvatio je *scRNA-seq* epitela i imunoloških stanica debelog crijeva iz više anatomskih regija miševa, identificirajući značajne dobno ovisne promjene u staničnom sastavu, pomak od apsorpcijskih prema sekretornim epitelnim stanicama i depleciju naivnih limfocita, kao i specifične anatomske promjene unutar crijeva povezane sa starenjem (302). Sveobuhvatni atlas humanoga

crijevnog trakta koji integrira oko 428.000 stanica tankog i debelog crijeva od fetalnog do odraslog doba ne uključuje analizu tkiva crvuljka (282). Već navedena transkriptomaska analiza kolona i mezenterijalnih limfnih čvorova u mišjim modelima identificirala je 85 diferencijalno izraženih gena vezanih uz upalu i imunosni odgovor kao glavni fokus istraživanja (292). Novije studije transkriptoma crijeva dale su važan uvid u nekoliko specifičnih procesa povezanih s dobi. Drokhlyansky i sur. definirali su prvi nacrt transkriptoma mišjeg i ljudskog crijevnog živčanog sustava, opisali podtipove neuronskih i glija stanica te definirali značajke specifične za lokaciju unutar probavnog sustava i dobi (248). Istraživanja transkriptoma miševa pokazala su da matične stanice crijeva starih miševa imaju narušenu sposobnost regeneracije i doprinose procesima starenja predvođenim upalom tkiva (eng. *inflammaging*) zbog pojačane prezentacije MHC-II antigena (303). Studija izražaja gena na pojedinačnim matičnim stanicama crijeva kod miševa pokazala je smanjen izražaj markera matičnih stanica *Lgr5* u nakupinama starih matičnih stanica (304). Možda i najznačajnija studija u kontekstu transkriptomskih istraživanja crvuljka, sekvenciranjem RNA na razini pojedinačnih stanica crvuljaka djece fetalne do predškolske dobi, definirala je detaljni stanični atlas koji opisuje 76 tipova stanica u razvoju ljudskog crvuljka i otkrila da signalni put proteina BMP (eng. *bone morphogenetic protein*) ima značajnu ulogu u razvoju epitelnih stanica crvuljka (305). Sveobuhvatni pregled literature o trendovima intestinalnog starenja, Wang i sur., iz 2025. godine, navodi pretjeranu usmjerenost istraživanja na bolesti bez usmjerenja na primarne mehanizme starenja, nedostatak specifičnih terapijskih modaliteta i ograničenost studija o crijevnoj disbiozi (306). Iako široka i obuhvatna, navedena istraživanja dosad nisu uključivala crvuljak, za čim postoji potreba, obzirom da predstavlja zanimljivu imunološku i funkcionalnu nišu unutar probave.

Raspon transkriptomskih promjena opisanih u kolonu i tankom crijevu u starenju obuhvaća četiri ključna aspekta. Prvo, crijevne matične stanice starenjem gube regenerativni kapacitet; u studijama je zabilježena pojačana ekspresija MHC klase II gena posredovana signalnim putem transkripcijskog faktora STAT1 (eng. *signal transducer and activator of transcription 1*), poremećaj WNT/ β -katenin signalizacije i pojačano lučenje sekretornog enzima koji inhibira WNT u Panethovim stanicama Notum-a (121,236,304). Crvuljak, koji posjeduje vlastitu epitelnu kriptu s populacijom matičnih stanica, nije bio predmetom nijedne studije o starenju crijevnih matičnih stanica. Drugo, funkcija crijevne barijere progresivno slabi uz smanjene izražaja gena za kladin (*CLDN1*), okcludin (*OCLN*) i zonulin (*ZOI*), sastavnih proteina *zonule occludens* u debelom crijevu starih životinja, što rezultira povećanom propusnošću i sustavnom toksemijom s posljedičnim imunološkim odgovorom koji dovodi do blage kronične sistemske upale (110,112,292,307). Obrasci promjena izražaja gena epitelnog

barijere u crvuljku nisu sistemski obrađivani u kontekstu starenja. Treće, oksidativni stres i deregulacija antioksidativnog odgovora posredovanog *NRF2* prepoznati su kao važni čimbenici u crijevnoj homeostazi i patogenezi bolesti povezanih sa starenjem, što implicira potencijalnu ulogu pada izražaja ovog transkripcijskog faktora u intestinalnom starenju (225,308,309). Dok većina studija pokazuje da antioksidativni odgovor ovisan o *NRF2* transkripciji s dobi općenito slabi ili se mijenja na tkivno specifičan način, promjene koje izaziva oksidativni stres u crvuljku tek trebaju biti istražene. Četvrto, crijevni živčani sustav u debelom crijevu pokazuje neurodegeneraciju povezanu sa starenjem uz gubitak neurona i promjene u izražaju gena, uključujući smanjenje izražaja gena povezanih sa signalizacijom neurona i ionskim kanalima u crijevnim ganglijima starijih osoba (239,257). Promjene u živčanim strukturama crvuljka na razini transkripcije RNA dosad nisu opisane, te je kroz planiranu studiju potrebno obraditi i ovaj aspekt transkriptomskih promjena u starenju.

Razlozi sustavnog izostavljanja crvuljka iz studija su višestruki. Dostupnost morfološki normalnog tkiva crvuljka odraslih i gerijatrijskih pacijenata je ograničena, ponajviše jer se tkivo crvuljka živih dobrovoljaca dobiva operativnim zahvatom, apendektomijom. Obzirom da se često izvodi zbog hitnog stanja, akutnog apendicitisa, udio histološki normalnog tkiva unutar takvih preparata je relativno nizak. Zbog znanstvene percepcije crvuljka kao rudimentarnog organa u studijama, ovaj organ je često zanemaren. Obzirom na opisane funkcije primarnog mjesta za produkciju IgA, sigurne zone za komenzalnu mikrobiotu i polazišta za obnovu crijevnog flore u slučajevima deplecije, crvuljak predstavlja zanimljiv dio probavnog sustava za sadašnja i buduća istraživanja. Povijesni pregled studija o starenju crvuljka uključuje studiju Berry i Lack iz 1906. godine koja opisuje morfološke promjene crvuljka tijekom starenja, fibrozu obliteraciju lumena i regresiju limfnog tkiva, te postavlja zaključak o mogućoj imunološkoj funkciji ovog organa (148). Takeuchi u svom radu opisuje čimbenike degeneracije limfnog tkiva crvuljka, ali isključivo na morfolškoj razini (83). Značajnija transkriptomska studija crvuljka Menga i sur. iz 2024. godine, koristi *scRNA-seq* na tkivu crvuljaka djece u kontekstu razvoja stanica i upalnog procesa, bez uključivanja starenja kao varijable, fokusira se na analizu razvojnih puteva stanica i BMP signalizaciju (305). Dok su Peyerove ploče i mezenterijalni limfni čvorovi bili predmetom imunoloških studija starenja već krajem 1980-ih, crvuljak, kao struktura bogata limfnim tkivom, nije bio predmetom nijednog sustavnog transkriptomskog istraživanja starenja (191,192). U literaturi se ne nalazi ni osnovna referentna transkriptomska mapa stanica zdravog crvuljka odraslog i starog čovjeka, bez koje je svaka buduća studija starenja crvuljka bez adekvatne komparativne osnove. Upravo zbog ove

činjenice, crvuljak se uspoređuje sa debelim crijevom, što ne mora uvijek dati dobru osnovu za usporedbu, ali zasad predstavlja jedinu mogućnost, te je upravo zbog toga važno provesti istraživanja na ljudskom crvuljku. Istraživanja transkriptomskih promjena u tkivu crvuljka tijekom starenja imaju važno mjesto u širem kontekstu istraživanja starenja probave, jer crvuljak predstavlja jedinstvenu funkcionalnu i imunološku nišu. Svrha ovog istraživanja je utvrditi razlike u ukupnom izražaju gena inoentnog (morfološki urednog) crvuljka tijekom starenja koje su povezane s biološkim starenjem tkiva i narušavanjem crijevne barijere u ljudskoj populaciji. Analizom diferencijalnog izražaja gena po dobnim skupinama moguće je steći uvid u procese ključne za starenje tkiva. Zbog morfološke sličnosti tkiva s ostatkom crijeva, crvuljak može predstavljati zanimljiv model proučavanja promjena izražaja gena crijeva tijekom starenja. Osim promjena u izražaju gena, tkivo crvuljka se također histološki mijenja starenjem. Crvuljak, kao dio GALT-a, sadrži brojne limfne folikule čija se brojnost povećava do puberteta, kada su najbrojniji, te potom može opadati ili opstajati do starije životne dobi. Fibrozna obliteracija crvuljka, benigni nalaz koji je moguća posljedica subkliničkih upala crvuljka, a koja rezultira formiranjem fibromiksoidne strome, ima raspon incidencije od 0,8 do 20,5% (310–312). Studija transkriptoma inoentnog crvuljka čovjeka s usporedbom svih dobnih skupina nije dosad provedena i predstavljala bi vrijedan uvid u procese starenja tkiva ovog dijela probavnog sustava. Važnost planirane studije leži u popunjavanju praznine podataka o transkripcijskim promjenama tijekom starenja crvuljka i boljem razumijevanju njegove uloge u starenju probave. Značaj procesa starenja u kliničkoj medicini svakodnevno raste zbog jasne poveznice između starenja i razvoja brojnih oboljenja. Upravo kao i istraživanja malignih bolesti, istraživanja starenja predstavljaju sljedeću granicu u znanosti koja će otvoriti nove načine liječenja starenja i bolesti povezane sa starošću. Cilj je kroz ovakve i slične studije bolje razumjeti bolesti starije dobi i njihovu etiologiju. Rezultati takvih istraživanja omogućit će uvođenje novih terapijskih modaliteta i promicanje zdravijeg starenja, neopterećenog bolestima. Razumijevanje mehanizama starenja koji dovode do disfunkcije crijevnog tkiva ključno je za kvalitetnije liječenje bolesti probavnog sustava kod starije populacije.

2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

2.1. Hipoteza

Hipoteze ovog istraživanja:

1. Postoji razlika u izražaju gena u innocentnom crvuljku populacije gerijatrijske i odrasle dobi u odnosu na crvuljak pedijatrijske populacije, a koja je u vezi s progresivnim promjenama izražaja gena posljedično biološkom starenju tkiva.
2. Postoje specifične razlike u izražaju gena u innocentnom crvuljku u gerijatrijskoj u odnosu na odraslu populaciju.
3. Postoje specifične razlike u izražaju gena innocentnih crvuljaka između gerijatrijske i pedijatrijske populacije koje nisu očite u usporedbi pedijatrijske s odraslom populacijom i odrasle populacije s gerijatrijskom.

2.2. Ciljevi istraživanja

Glavni ciljevi ovog istraživanja su sljedeći:

1. Ispitati razlike u izražaju gena u innocentnom crvuljku gerijatrijske i odrasle u odnosu na crvuljak pedijatrijske populacije.
2. Ispitati razlike u izražaju gena i posljedične promjene bioloških puteva, staničnih i molekularnih procesa u innocentnom crvuljku gerijatrijske i odrasle populacije.
3. Ispitati razlike u izražaju gena i posljedične promjene u biološkim putevima, staničnim i molekularnim procesima innocentnih crvuljaka u gerijatrijskoj i pedijatrijskoj populaciji.

Sporedni ciljevi istraživanja:

1. Ispitati razlike u izražaju gena innocentnog crvuljka u populaciji pacijenata s tumorima gastrointestinalnog sustava u odnosu na pacijente koji nisu oboljeli od tumora.
2. Ispitati spolno vezane promjene izražaja gena innocentnog crvuljka u odrasloj i gerijatrijskoj populaciji.
3. Ispitati pojavnost fibrozne obliteracije vrška crvuljka i redukcije limfnih folikula u uzorcima tkiva innocentnih crvuljaka prema dobnim skupinama.

3. METODE I MATERIJALI

3.1.Ustroj istraživanja

Istraživanje diferencijalnog izražaja gena u uzorku tkiva inocentnih crvuljaka kod pacijenata pedijatrijske, odrasle i gerijatrijske populacije provedeno je kao temeljno eksperimentalno istraživanje, ustrojeno kao opservacijsko kohortno istraživanje. Prema načinu prikupljanja podataka, istraživanje je bilo intervencijsko (nerandomizirano), a u odnosu na vremensku orijentaciju, prospektivno. Istraživanje je koristilo primarne izvore prikupljanjem vlastitih uzoraka i podataka, i to uzorcima tkiva crvuljaka koji su se prikupljali od pacijenata tijekom operativnog zahvata (incidentalne apendektomije) uz prateće kliničke podatke o pacijentima (visina, težina, indeks tjelesne mase, dob, spol, vrsta zahvata, komorbiditeti).

3.2.Uzorci ljudskih crvuljaka

Za istraživanje je korištena randomizirana kohorta od 20 svježe smrznutih uzoraka tkiva crvuljka pacijenata grupiranih u tri dobne skupine koje su podvrgnute operativnom zahvatu u Kliničkom bolničkom centru Split u razdoblju od listopada 2022. do kolovoza 2023. godine. Pacijenti su prema dobi svrstani u tri dobne skupine: pedijatrijsku (0-18 godina), odraslu (19-65 godina) i gerijatrijsku (>65 godina). Apendektomija u tijeku abdominalnih zahvata zbog drugih stanja predstavlja rutinsku praksu pri zahvatima u trbušnoj šupljini u Kliničkom bolničkom centru Split. Informirani pristanak za sudjelovanje u studiji dobiven je od pacijenata ili roditelja istih prije uključivanja u studiju (prilog 1). Uzorci crvuljka za izolaciju RNA uzeti su iz punog presjeka tkiva u oralnoj trećini crvuljka neposredno nakon apendektomije, pohranjeni u reagens RNeasyTM RNA Stabilization Solution (Ambion, Thermo Fisher Scientific, AM7024, Waltham, MA, SAD), i dodatno čuvani na -80 °C do same izolacije. Preostalo tkivo iz uzoraka crvuljka fiksirano je u formalinu, uklopljeno u parafin, a presjeci debljine četiri mikrometra deparafinirani, bojani hematoksilin-eozin (HE) metodom i neovisno analizirani od strane dvojice iskusnih patologa s Kliničkog zavoda za patologiju Kliničkog bolničkog centra Split. U daljnju analizu uključeni su isključivo morfološki uredni crvuljci.

3.3.Veličina uzorka

Procijenjena minimalna veličina uzorka bila je pet do sedam uzoraka tkiva po dobnoj skupini prema kalkulatoru RnaSeqSampleSize (verzija 3.23, Bioconductor, Boston, MA, SAD) (313). Izračun je napravljen koristeći podatke koji uzimaju u obzir da je prosječan broj čitanja za diferencijalno izražene gene od interesa 100, što predstavlja ekvivalent od 1 FPKM za sekvenciranje s 40 milijuna čitanja po uzorku. Pretpostavljena maksimalna disperzija iznosila je 0,04, a omjer geometrijske sredine izražaja je 1. Ako pretpostavimo ukupno 22.000 testiranih

gena i očekujemo minimalno 10 gena sa značajnim diferencijalnim izražajem, izračun zahtijeva minimalan uzorak od 5 ispitanika po ispitivanoj grupi da bismo mogli odbaciti nultu hipotezu sa snagom od 0,8. FDR značajnosti vezano uz ovo testiranje postavljena je na 0,1 (314). Osim navedenog izračuna, ova veličina uzorka u skladu je i s dostupnim podacima iz literature. Prema nedavnoj studiji, preciznost koja odražava udio stvarno pozitivno detektiranih gena raste oštro s veličinom uzorka i postiže dosljedno visoku razinu detekcije nakon najmanje 5 uključenih uzoraka (315). Analiza je provedena pomoću bioinformatičkog alata DESeq2 (verzija 1.20.0, Bioconductor, Boston, MA, SAD), koji je najprikladniji i široko korišten alat za analizu diferencijalne ekspresije gena manjih i srednjih kohorti zbog procjene disperzije i promjene izražaja temeljenih na metodama sažimanja (engl. *shrinkage based dispersion and fold change estimation*).

3.4.Kriteriji uključenja i isključenja

Kriterij uključenja u našu studiju bio je slijedeći:

1. U studiju su uključeni maloljetni i punoljetni pacijenti kojima je planirana apendektomija u sklopu elektivnog ili hitnog abdominalnog zahvata koji nije povezan s bolestima crvuljka.

Kriteriji isključenja za našu studiju bili su slijedeći:

1. Pacijenti koji boluju od diseminirane maligne bolesti i upalnih bolesti crijeva.
2. Pacijenti koji su primili neoadjuvantnu kemoradioterapiju i imunoterapiju.
3. Pacijenti kod kojih se po kirurškoj procjeni odustalo od apendektomije za vrijeme zahvata.

3.5.Sekvenciranje RNA

Uzorci crvuljka pohranjeni su u otopinu RNeasy Lysis Solution (Qiagen, Crawley, UK) i odmrznuti na ledu. Homogenizacija tkiva provedena je homogenizatorom Minilys (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Francuska), a izolacija ukupne RNA izvršena je standardnim Trizol protokolom (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) uz otapanje u vodi tretiranoj dietil pirougličnim esterom (DEPC, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, AM7024, Waltham, MA, SAD). Kvaliteta i integritet ukupne RNA procijenjeni su spektrofotometrom NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) i analizatorom Agilent 2100

Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, SAD). Selekcija poli-A repa primijenjena je za obogaćivanje ukupne RNA sa mRNA.

Sinteza prvog lanca komplementarne DNA provedena je korištenjem nasumičnih heksamernih primera nakon fragmentacije, a sinteza drugog lanca komplementarne DNA uz deoksitimidin trifosfat (dTTP) omogućila je pripremu neusmjerene knjižnice. Dodatna kontrola kvalitete knjižnice komplementarne DNA provedena je radi potvrde odgovarajuće distribucije veličine fragmenata i njihove koncentracije. Analiza sekvenciranjem provedena je na platformi Illumina NovaSeq (Illumina, San Diego, CA, SAD) s oko 40 milijuna očitavanja po uzorku (eng. *paired-end*, sekvenciranje 150 baznih parova).

Podatci sekvenciranja filtrirani su radi uklanjanja očitavanja niske kvalitete i onih s adapterskim sljedovima. Mapiranje filtriranih očitavanja na referentni ljudski genom GRCh38 izvedeno je programom HISAT2 (verzija 2.0.5, Daehwan Kim Lab, Center for Computational Biology, Johns Hopkins University, Baltimore, MD, SAD). Kvantifikacija poravnanih očitavanja provedena je programom FeatureCounts (verzija 1.5.0-p3, Wei Shi Lab, Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Melbourne, Australija), dok je analiza diferencijalnog izražaja gena provedena softverom DESeq2 (verzija 1.20.0, Bioconductor, Boston, MA, SAD). Geni s vrijednostima $\log_2$ promjene izražaja $\geq \pm 1$ (odnosno promjena izražaja ≥ 2) i korigiranom p-vrijednosti $< 0,1$ (Benjamini–Hochbergova metoda) smatrani su diferencijalno izraženi. Geni uključeni u daljnju analizu smatrani su dostatno izraženi ako je vrijednost FPKM > 1 u najmanje dva uzorka. Funkcionalna analiza ontologije gena (Gene Ontology) i KEGG analiza provedena je korištenjem internetske platforme NovoMagic (Novogene Co., Ltd., Peking, Kina). Dodatna analiza obogaćivanja genskih setova (eng. *gene set enrichment analysis*, GSEA) provedena je korištenjem zbirke gena iz baze MSigDB pomoću GenePattern GSEA modula s 1000 permutacija po genskom skupu (316).

Grafički prikazi izrađeni su korištenjem platforme NovoMagic te internetske platforme Bioinformatics (SRplot, Shenzhen, Kina). Softver GraphPad Prism (verzija 10.4, GraphPad Software, LLC, Boston, MA, SAD) korišten je za izradu grafičkih prikaza temeljenih na normaliziranim podacima RNA sekvenciranja.

3.6. Histološka analiza

Tkiva koja su korištena fiksirana su i uklopljena u parafinske blokove prema optimiziranom bolničkom protokolu Kliničkog bolničkog centra Split. Uzorci tkiva su fiksirani u 4% puferiranom formaldehidu tijekom 24 sata. Odabrani isječki tkiva su dodatno fiksirani i

dehidrirani kroz alkoholne otopine rastućeg gradijenta u histokinetu (Milestone SRL, Valbremo, Italija) te uklopljeni u parafin na 63°C. Tkivo je izrezano na rezove debljine 4 mikrometara i priliječeno na pozitivno nabijena predmetna stakalca (Superfrost plus, Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD). Obojano je standardnim hemalaun-eozinskim (HE) bojenjem u automatskom bojaču HE 600 (Ventana, Tucson, Arizona, SAD). Tkivni prerezi su potom patohistološki analizirani od strane dva stručna patologa svjetlosnim mikroskopom Olympus BX43 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan).

3.7. Statistička analiza

Kategorijske varijable prikazane su kao postoci i udjeli, dok je dob bolesnika izražena kao srednja vrijednost sa standardnom devijacijom. Normalnost osnovnih karakteristika bolesnika procijenjena je Shapiro–Wilkovim testom. Razlike između srednjih vrijednosti analizirane su Studentovim t-testom, a povezanost između kategorijskih varijabli Fisherovim egzaktnim testom. Statističke analize i izrada grafikona provedena je pomoću softvera GraphPad Prism (verzija 10.4, La Jolla, CA, SAD).

3.8. Etička načela

Provedeno istraživanje na uzorcima tkiva pacijenata odobreno je od strane Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Split (Klasa 500-03/22-01/90 Urbroj: 2181-147/01/06/M.S.-22-02) i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu (Klasa: 003-08/22-03/0003, Urbroj: 2181-198-03-04-22-0079), a svi ispitanici dali su pismeni pristanak za sudjelovanje u istraživanju (prilog 2 i 3).

4. REZULTATI

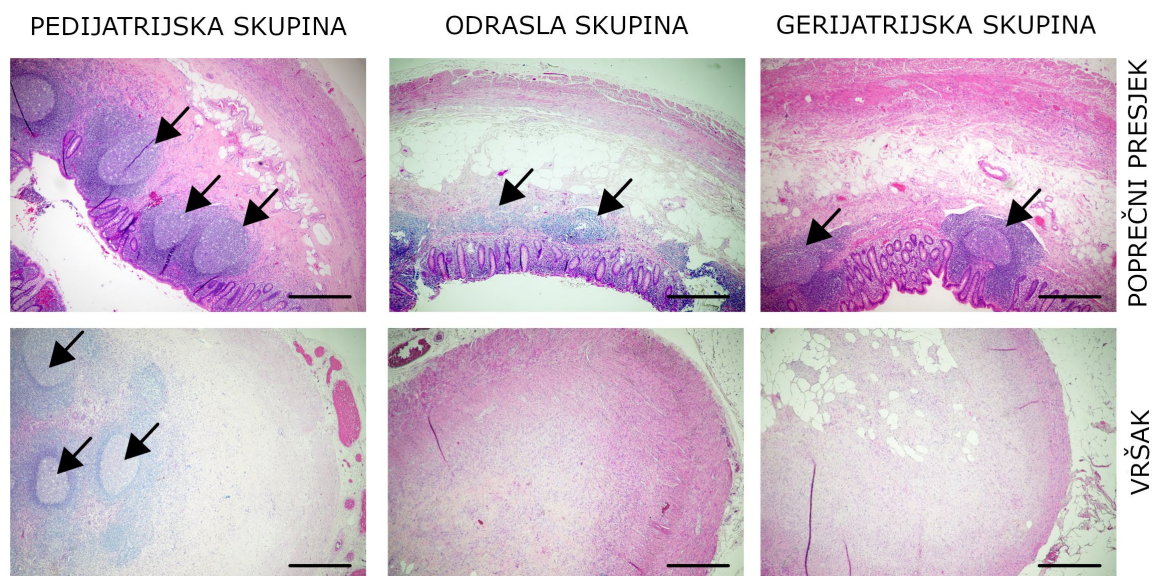
4.1. Osnovne karakteristike pacijenata

U studiji su analizirani uzorci morfološki urednih ljudskih crvuljaka pojedinaca prema definiranim dobnim skupinama (pedijatrijska 0-18, odrasla 18-65 i gerijatrijska >65 godina). Analizirano je pet uzoraka u pedijatrijskoj skupini, osam u odrasloj skupini i sedam u gerijatrijskoj skupini. Srednja dob gerijatrijske skupine bila je $74,6 \pm 8,5$ godina, uspoređujući je sa srednjom dobi od $39,5 \pm 10,6$ u odrasloj skupini i $16 \pm 2,1$ u pedijatrijskoj skupini. Prosječni indeks tjelesne mase (ITM) bio je usporediv između gerijatrijske skupine ($25,8 \pm 4,7$ kg/m²) i odrasle skupine ($26,0 \pm 5,4$ kg/m²), a bio je značajno niži u pedijatrijskoj skupini ($18,8 \pm 3,0$ kg/m²). Redukcija limfnih folikula i vezivna obliteracija vrška crvuljka s većom je učestalošću zapažena u odrasloj i gerijatrijskoj populaciji u odnosu na pedijatrijsku populaciju. Vezivna obliteracija vrška crvuljka bila je prisutna u 20% pedijatrijskih uzoraka, u usporedbi s učestalošću od 75% u odrasloj populaciji i 71,4% u gerijatrijskoj populaciji. Ukupna učestalost fibrozne obliteracije vrška crvuljka u svim našim uzorcima bila je 65% (tablica 1, slika 6). Pedijatrijska skupina se sastojala isključivo od ženskih pacijentica zbog nedostupnosti muških uzoraka.

Tablica 1. Osnove karakteristike pacijenata

	Pedijatrijska skupina	Odrasla skupina	Gerijatrijska skupina	<i>p</i>
Dob, godine				
Srednja vrijednost $\pm$ SD	16 ± 2.1	39.5 ± 10.6	74.6 ± 8.5	$p < 0.0001 *$
Spol				
Muškarci	0	4	4	
Žene	5	4	3	
ITM, kg/m ²				
Srednja vrijednost	18.8	26	25.8	$p_{PO} = 0.021 *$, $p_{PG} = 0.016 *$, $p_{AG} = 0.920$
95% CI	15.1—22.5	21.5—30.6	21.4—30.1	
Redukcija limfnih folikula	20% (1/5)	62.5% (5/8)	85.7% (6/7)	$p_{PO} = 0.265$, $p_{PG} = 0.072$, $p_{OG} = 0.569$
Vezivna obliteracija vrška	20% (1/5)	75% (6/8)	71.4% (5/7)	$p_{PO} = 0.103$, $p_{PG} = 0.242$, $p_{OG} > 0.999$

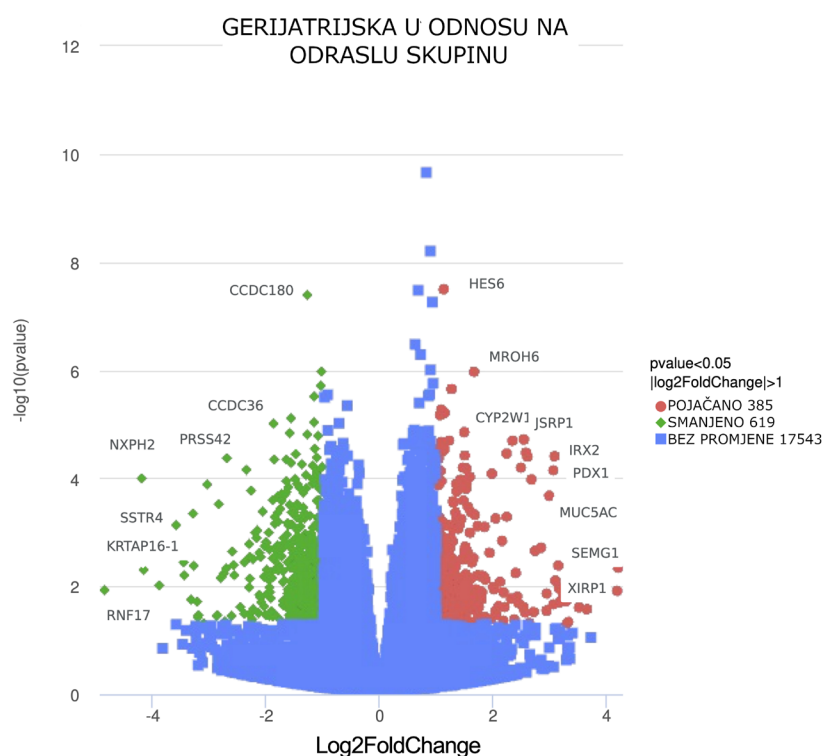
ITM —indeks tjelesne mase, SD—standardna devijacija CI - interval pouzdanosti. P—pedijatrijska, O - odrasla, G—gerijatrijska. Podatci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD ili 95% CI te analizirani koristeći Studentov t-test ili Fisherov egzaktni test. *Preuzeto i prilagođeno iz: Quien D, Korac-Prlic J, Vilović K, Pogorelić Z, Boric M, Barcot O, i sur. Age-Related Transcriptomic Changes in the Vermiform Appendix. IJMS 2025;26:11399. <https://doi.org/10.3390/ijms262311399>. Prema licenci: CC BY 4.0.*



Slika 6. Histološki prikaz tipičnih uzorka crvuljaka u pojedinim dobnim skupinama. Slika prikazuje poprečni presjek lumena i uzdužni presjek vrška crvuljka. Strelice pokazuju limfne folikule. Mjerna traka prikazuje 500 μm . *Preuzeto i prilagođeno iz: Quien D, Korac-Prlic J, Vilović K, Pogorelić Z, Boric M, Barcot O, i sur. Age-Related Transcriptomic Changes in the Vermiform Appendix. IJMS 2025;26:11399. <https://doi.org/10.3390/ijms262311399>. Prema licenci: CC BY 4.0.*

4.2. Promjene izražaja gena crvuljka gerijatrijske populacije

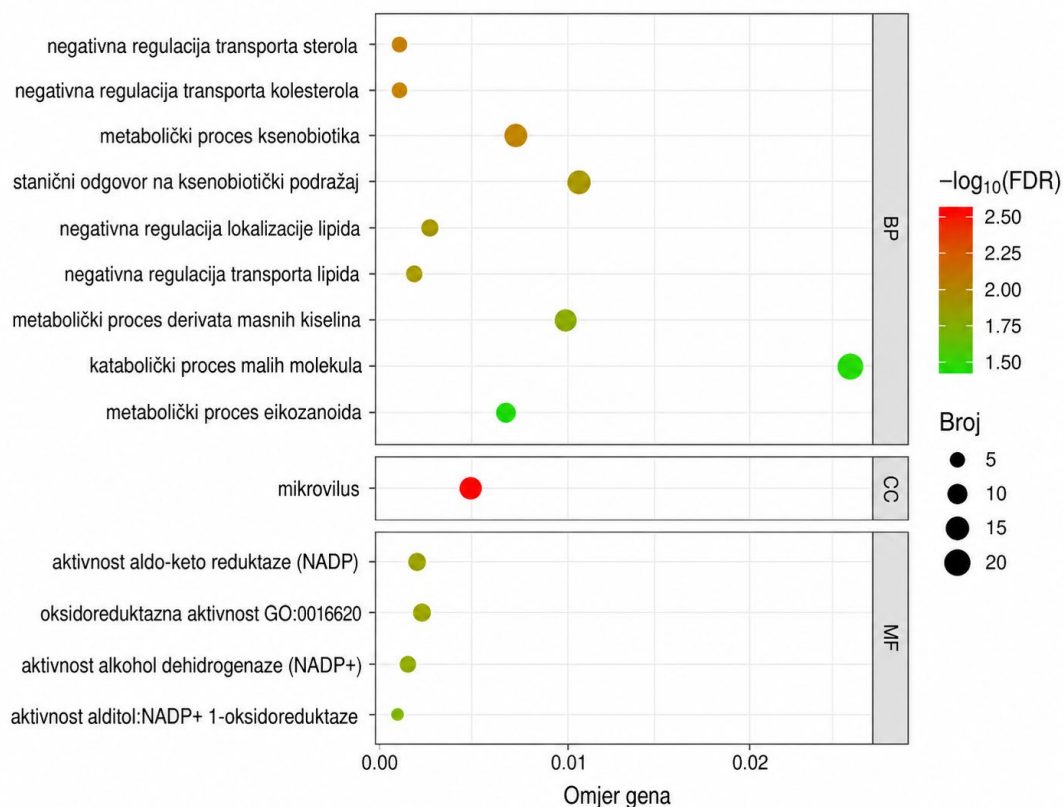
Analizirali smo tkivo zdravih crvuljaka sedam gerijatrijskih i osam odraslih pacijenata kako bismo istražili promjene transkriptoma povezane sa starenjem crvuljka. RNA sekvenciranje poprečnih prereza crvuljka pokazalo je opsežne promjene transkriptoma povezane sa uznapredovalim starenjem tkiva. Identificirali smo 385 gena koji kodiraju proteine s značajno pojačanim izražajem za više od 2 puta i 619 gena koji su značajno smanjeno izraženi, uz p-vrijednost $< 0,05$ (slika 7).



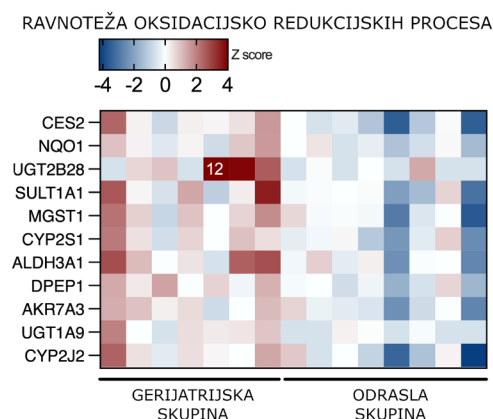
Slika 7. Promjene izražaja gena crvuljka u gerijatrijskoj populaciji. Grafički prikaz *volcano* plot koji prikazuje diferencijalno eksprimirane gene (DEG) između gerijatrijske i odrasle populacije. Preuzeto i prilagođeno iz: *Quien D, Korac-Prlic J, Vilović K, Pogorelić Z, Boric M, Barcot O, i sur. Age-Related Transcriptomic Changes in the Vermiform Appendix. IJMS 2025;26:11399. <https://doi.org/10.3390/ijms262311399>. Prema licenci: CC BY 4.0.*

Proveli smo analizu obogaćenosti skupova gena (eng. *gene set enrichment analysis*, *GSEA*) radi funkcionalne karakterizacije diferencijalno izraženih gena. Analiza obogaćenosti na skupu gena *Gene Ontology* (GO) pokazala je pojačanu aktivnost bioloških procesa povezanih s apikalnom membranom enterocita i metabolizmom kolesterola (slika 8). Nadalje,

značajno su bili pojačani procesi povezani s detoksikacijom lijekova, zaštitom od oksidativnog stresa i održavanjem crijevne homeostaze - uključujući NRF2-ciljne gene, među kojima su oksidoreduktaze *NQO1* i mikrosomalna glutation-peroksidaza *MGST1* (slike 8 i 9).

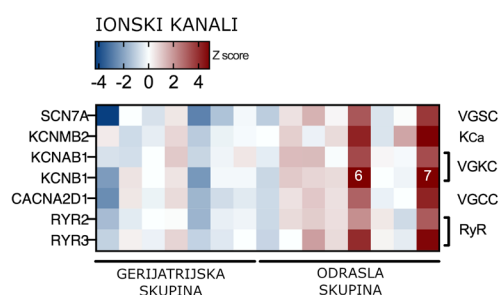


Slika 8. Promjene izražaja gena crvuljka u gerijatrijskoj populaciji prikazane *bubble* dijagramom. *Gene Ontology* analiza obogaćivanja pokazuje pojačan izražaj specifičnih genskih putova između gerijatrijske i odrasle populacije za GO kategorije biološki procesi, stanični (eng. *biological processes* - BP), stanični odjeljak (eng. *cellular compartment* CC) i molekularna funkcija (eng. *molecular function* - MF). Preuzeto i prilagođeno iz: Quien D, Korac-Prlic J, Vilović K, Pogorelić Z, Boric M, Barcot O, i sur. *Age-Related Transcriptomic Changes in the Vermiform Appendix. IJMS* 2025;26:11399. <https://doi.org/10.3390/ijms262311399>. Prema licenci: CC BY 4.0. Prijevod izvorne slike izrađen pomoću UI: Perplexity AI, San Francisco, CA, USA: Perplexity AI; 2026

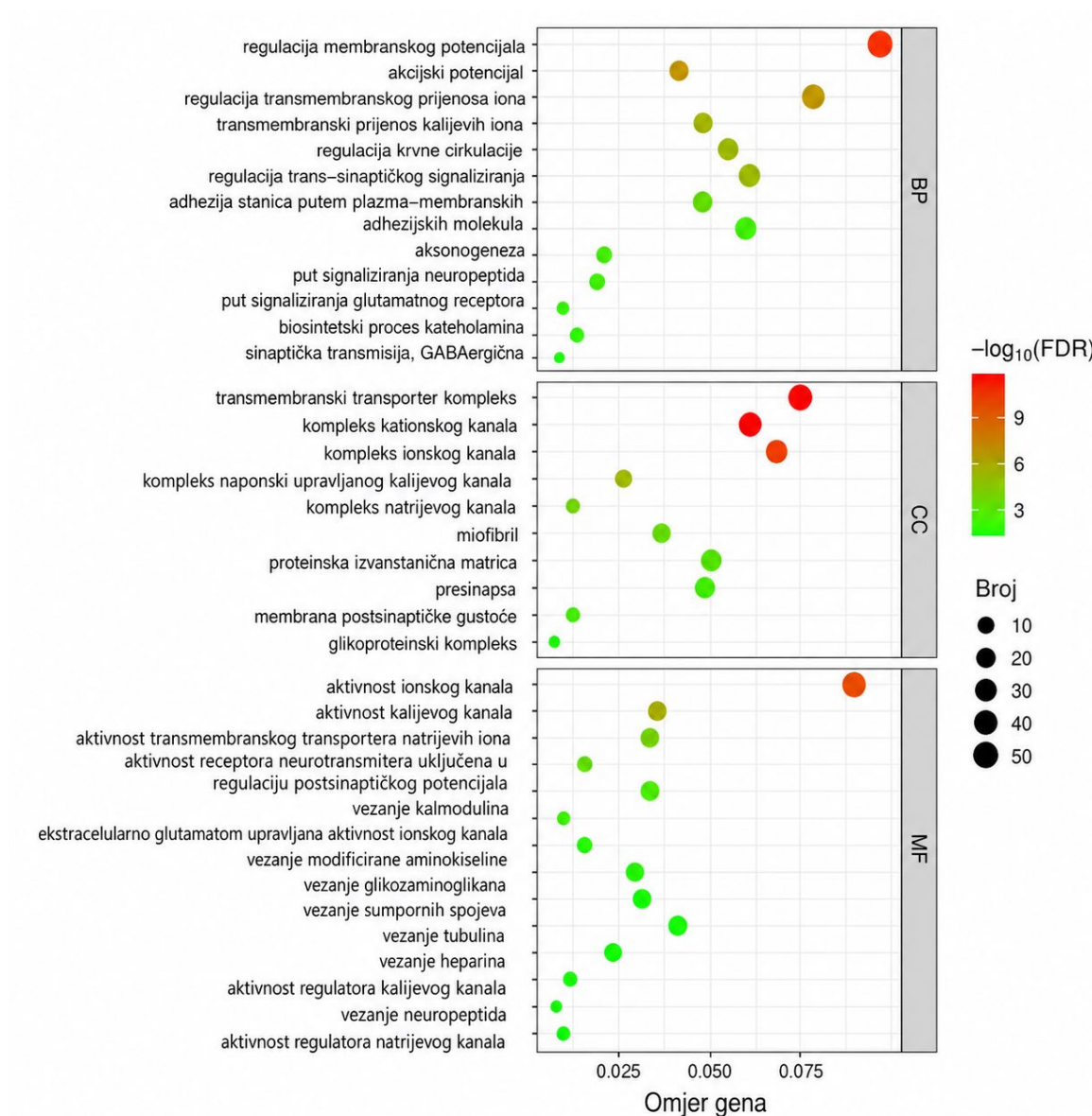


Slika 9. Promjene izražaja gena crvuljka u gerijatrijskoj populaciji prikazane toplinskom mapom specifičnih gena povezanih s detoksifikacijom lijekova, zaštitom od oksidacijskog stresa i homeostaze probave pojačano eksprimiranih u gerijatrijskoj populaciji. *Preuzeto i prilagođeno iz: Quien D, Korac-Prlic J, Vilović K, Pogorelić Z, Boric M, Barcot O, i sur. Age-Related Transcriptomic Changes in the Vermiform Appendix. IJMS 2025;26:11399. <https://doi.org/10.3390/ijms262311399>. Prema licenci: CC BY 4.0.*

Značajno smanjenje izražaja gena primijećeno je u biološkim procesima koji obuhvaćaju regulaciju membranskog potencijala i sinaptičkog prijenosa. Nekoliko ionskih kanala, uključujući podjedinice naponski vođenih kalijski, natrijevih kanala i rijanodinskih receptora, bilo je značajno smanjeno izraženo (slike 10 i 11).

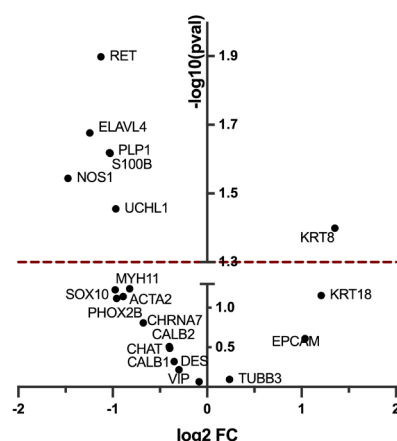


Slika 10. Promjene izražaja gena crvuljka u gerijatrijskoj populaciji prikazane toplinskom mapom koja ilustrira smanjenje izražaja specifičnih gena povezanih sa ionskim kanalima; VGSC - naponski ovisni natrijski kanali, KCa kalcijem aktivirani kalijevi kanali, VGKC - naponski ovisni kalijevi kanali, VGCC - naponski ovisni kalcijevi kanali, RyR – rijanodinski receptori. *Preuzeto i prilagođeno iz: Quien D, Korac-Prlic J, Vilović K, Pogorelić Z, Boric M, Barcot O, i sur. Age-Related Transcriptomic Changes in the Vermiform Appendix. IJMS 2025;26:11399. <https://doi.org/10.3390/ijms262311399>. Prema licenci: CC BY 4.0.*



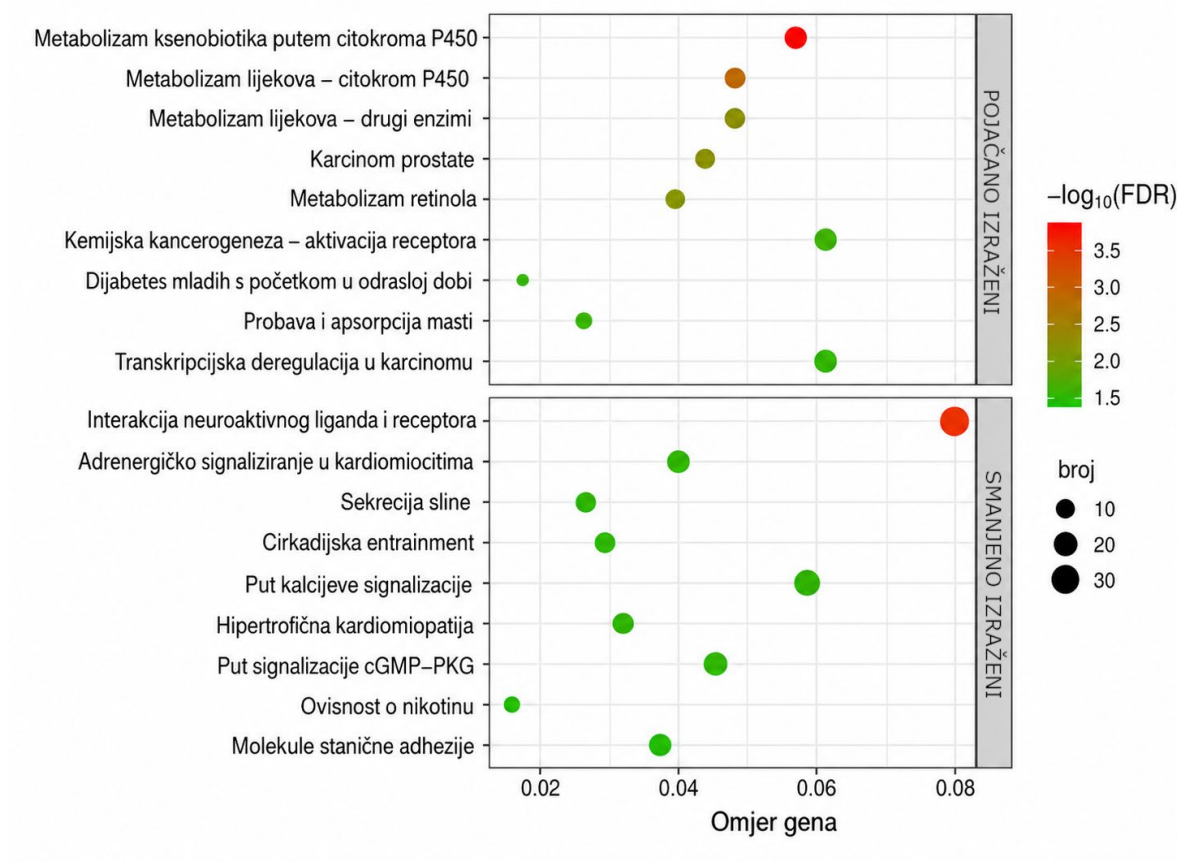
Slika 11. Promjene izražaja gena crvuljka u gerijatrijskoj populaciji *bubble* dijagramom *Gene Ontology* analize obogaćivanja pokazana je smanjena ekspresiju specifičnih genskih putova gerijatrijske populacije za GO kategorije biološki procesi (*eng. biological processes* - BP), stanični odjeljak (*eng. cellular compartment* CC) i molekularna funkcija (*eng. molecular function* - MF). Preuzeto i prilagođeno iz: Quien D, Korac-Prlic J, Vilović K, Pogorelić Z, Boric M, Barcot O, i sur. *Age-Related Transcriptomic Changes in the Vermiform Appendix. IJMS* 2025;26:11399. <https://doi.org/10.3390/ijms262311399>. Prema licenci: CC BY 4.0. Prijevod izvorne slike izrađen pomoću UI: Perplexity AI, San Francisco, CA, USA; Perplexity AI; 2026

Obzirom na dobro istraženo dobno vezano propadanje crijevnih neurona i neuromuskularne funkcije probave, zasebno smo istražili izražaj nekoliko zajedničkih markera neurona crijevnog živčanog sustava, kao i kontrole za sastav tkiva. Primijetili smo značajno smanjen izražaj RET-a, markera progenitorskih stanica crijevnog živčanog sustava, panneuronskih markera ELAVL4 i UCHL, NOS1, kao i glijalnih markera S100B i PLP1 (slika 12).

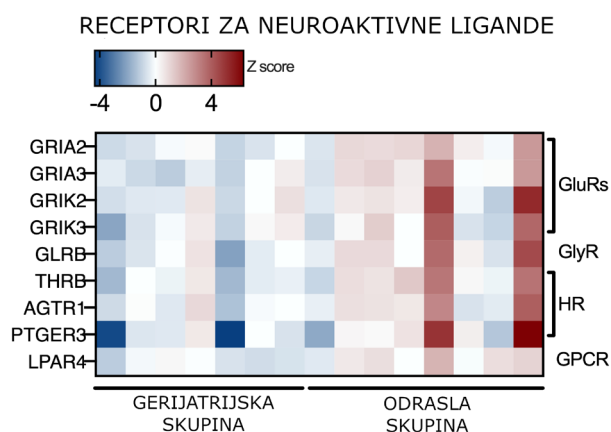


Slika 12. Promjene izražaja gena crvuljka u gerijatrijskoj populaciji: *volcano* plot dijagram za specifične genske markere neuronskih, epitelnih i mišićnih stanica. FC; *Fold change*-omjer promjene, *pval* – p vrijednost. *Preuzeto iz: Quien D, Korac-Prlic J, Vilović K, Pogorelić Z, Boric M, Barcot O, i sur. Age-Related Transcriptomic Changes in the Vermiform Appendix. IJMS 2025;26:11399. <https://doi.org/10.3390/ijms262311399>. Prema licenci: CC BY 4.0.*

Nadalje, analiza obogaćivanja koristeći KEGG funkcionalne puteve pokazala je smanjenje interakcije neuroaktivnih liganda i receptora, sa posljedično smanjenim izražajem podjedinica glutamatnih receptora (*GRIA2*, *GRIA3*, *GRIK2* i *GRIK3*) i podjedinice glicinskog receptora GLRB. Nekoliko hormonskih receptora, poput receptora hormona štitnjače THRB, receptora angiotenzina II AGTR1, receptora lizofosfatidne kiseline LPAR4 i receptora prostaglandina E PTGER3 također je značajno smanjeno izraženo (slike 13,14).

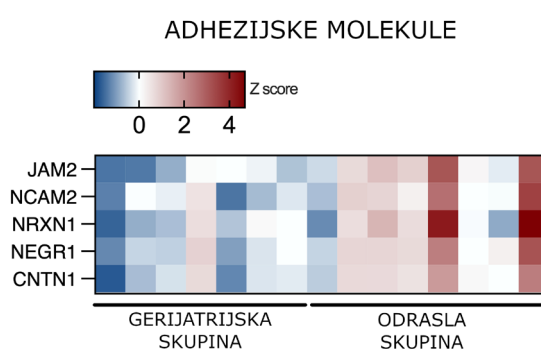


Slika 13. Promjene izražaja gena crvuljka u gerijatrijskoj populaciji: analiza KEGG puteva pojačano i smanjeno izraženih procesa u gerijatrijskoj populaciji. *Preuzeto i prilagođeno iz: Quien D, Korac-Prlic J, Vilović K, Pogorelić Z, Boric M, Barcot O, i sur. Age-Related Transcriptomic Changes in the Vermiform Appendix. IJMS 2025;26:11399. <https://doi.org/10.3390/ijms262311399>. Prema licenci: CC BY 4.0. Prijevod teksta izvorne slike izrađen pomoću UI: Perplexity AI, San Francisco, CA, USA: Perplexity AI; 2026*



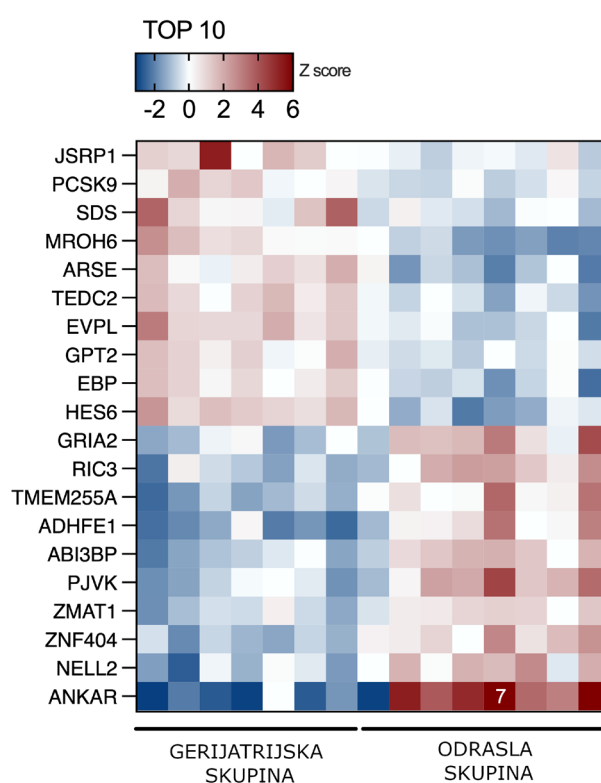
Slika 14. Promjene izražaja gena crvuljka u gerijatrijskoj populaciji: toplinska mapa prikazuje smanjenje izražaja specifičnih gena povezanih s receptorima za neuroaktivne ligande; GluRs - glutamatni receptori; GlyR - glicinski receptori; HR - histaminski receptori; GPCR - receptori povezani s G-proteinom. *Preuzeto i prilagođeno iz: Quien D, Korac-Prlic J, Vilović K, Pogorelić Z, Boric M, Barcot O, i sur. Age-Related Transcriptomic Changes in the Vermiform Appendix. IJMS 2025;26:11399. <https://doi.org/10.3390/ijms262311399>. Prema licenci: CC BY 4.0.*

Osim navedenog, smanjenje izražaja je primijećeno za važne stanične adhezijske molekule, uključujući protein *zonule occludens* JAM2 i neuronalne adhezijske molekule NCAM2, NRXN1, NEGR1 i CNTN1 (slika 15).



Slika 15. Promjene izražaja gena crvuljka u gerijatrijskoj populaciji: toplinska mapa koja prikazuje smanjenje izražaja gena adhezijskih molekula u gerijatrijskoj populaciji. *Preuzeto i prilagođeno iz: Quien D, Korac-Prlic J, Vilović K, Pogorelić Z, Boric M, Barcot O, i sur. Age-Related Transcriptomic Changes in the Vermiform Appendix. IJMS 2025;26:11399. <https://doi.org/10.3390/ijms262311399>. Prema licenci: CC BY 4.0.*

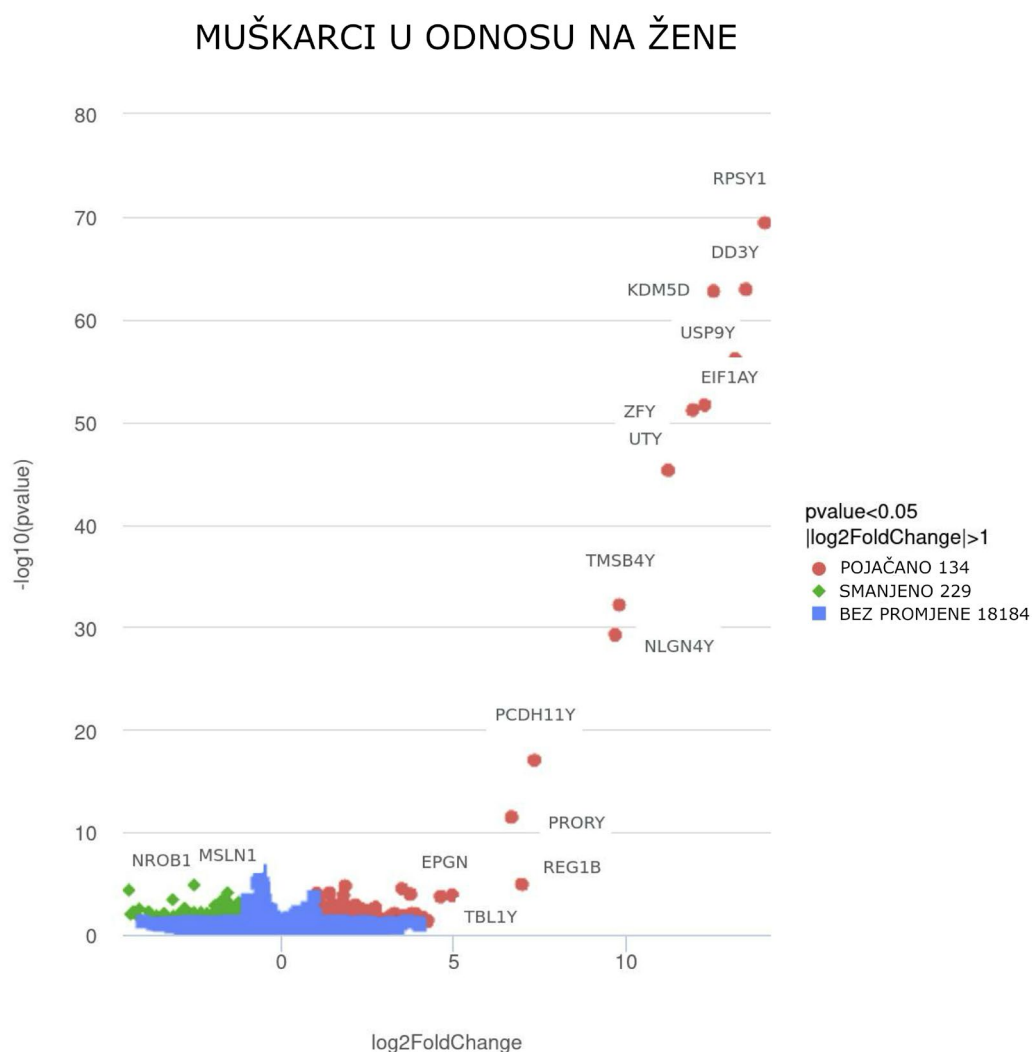
Najznačajniji dokaz za diferencijalno pojačanje izražaja ($FDR < 0.01$) uočen je kod gena važnih za metaboličko reprogramiranje, uključujući regulaciju metabolizma kolesterola, *PCSK9* i *EBP*, kao i konvertaze aminokiselina *SDS* i *GPT2*. Također je postojano pojačan izražaj u gerijatrijskoj populaciji pronađen za nekoliko gena važnih za održavanje tkivne homeostaze (*EVPL2*, *ARSE* i *TEDC2*) i remodeliranje mišića (*JSRP1* i *HES6*). Najsnažnije smanjenje izražaja otkriveno je za gene povezane sa sinaptičkom funkcijom (*GRIA2*, *NELL2*, *RIC3*), metabolički metaloenzim *ADHFE1* i strukturalne proteine *ABI3BP*, *ANKAR* i *TMEM255*. Utvrđena je i niska ukupna ekspresija gena za proteine cinkovog prsta *ZMAT1* i *ZNF404* te pejvakina (*PJVK*) (slika 16).



Slika 16. Promjene izražaja gena crvuljka u gerijatrijskoj populaciji: prikaz deset najznačajnije promijenjenih diferencijalno izraženih gena u gerijatrijskoj populaciji ($FDR < 0.01$). Preuzeto i prilagođeno iz: *Quien D, Korac-Prlic J, Vilović K, Pogorelić Z, Boric M, Barcot O, i sur. Age-Related Transcriptomic Changes in the Vermiform Appendix. IJMS 2025;26:11399. <https://doi.org/10.3390/ijms262311399>. Prema licenci: CC BY 4.0.*

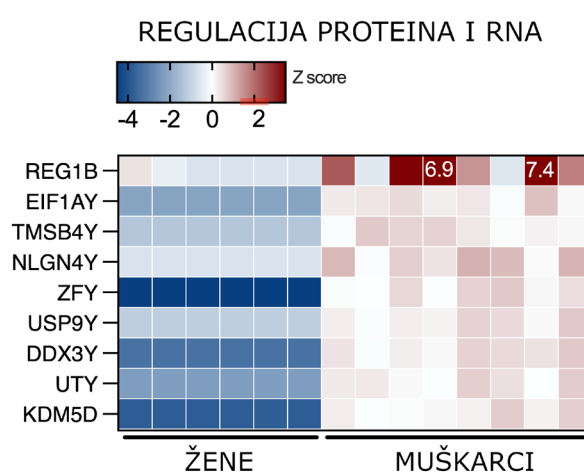
4.3. Promjene izražaja spolno vezanih gena crvuljka

U daljnjoj analizi smo zatim istražili odrasle i gerijatrijske uzorke za spolno specifične promjene izražaja gena i identificirali 363 diferencijalno izražena gena, 134 pojačano i 229 smanjeno izražena u muškaraca uz prag dvostruke promjene (eng. *2-fold change*) i odabranu p-vrijednost manju od 0.05 (slika 17).



Slika 17. Promjene izražaja spolno vezanih gena crvuljka: *volcano* plot dijagram spolno vezanih diferencijalno izraženih gena u muškoj i ženskoj populaciji. *Preuzeto i prilagođeno iz: Quien D, Korac-Prlic J, Vilović K, Pogorelić Z, Boric M, Barcot O, i sur. Age-Related Transcriptomic Changes in the Vermiform Appendix. IJMS 2025;26:11399. <https://doi.org/10.3390/ijms262311399>. Prema licenci: CC BY 4.0.*

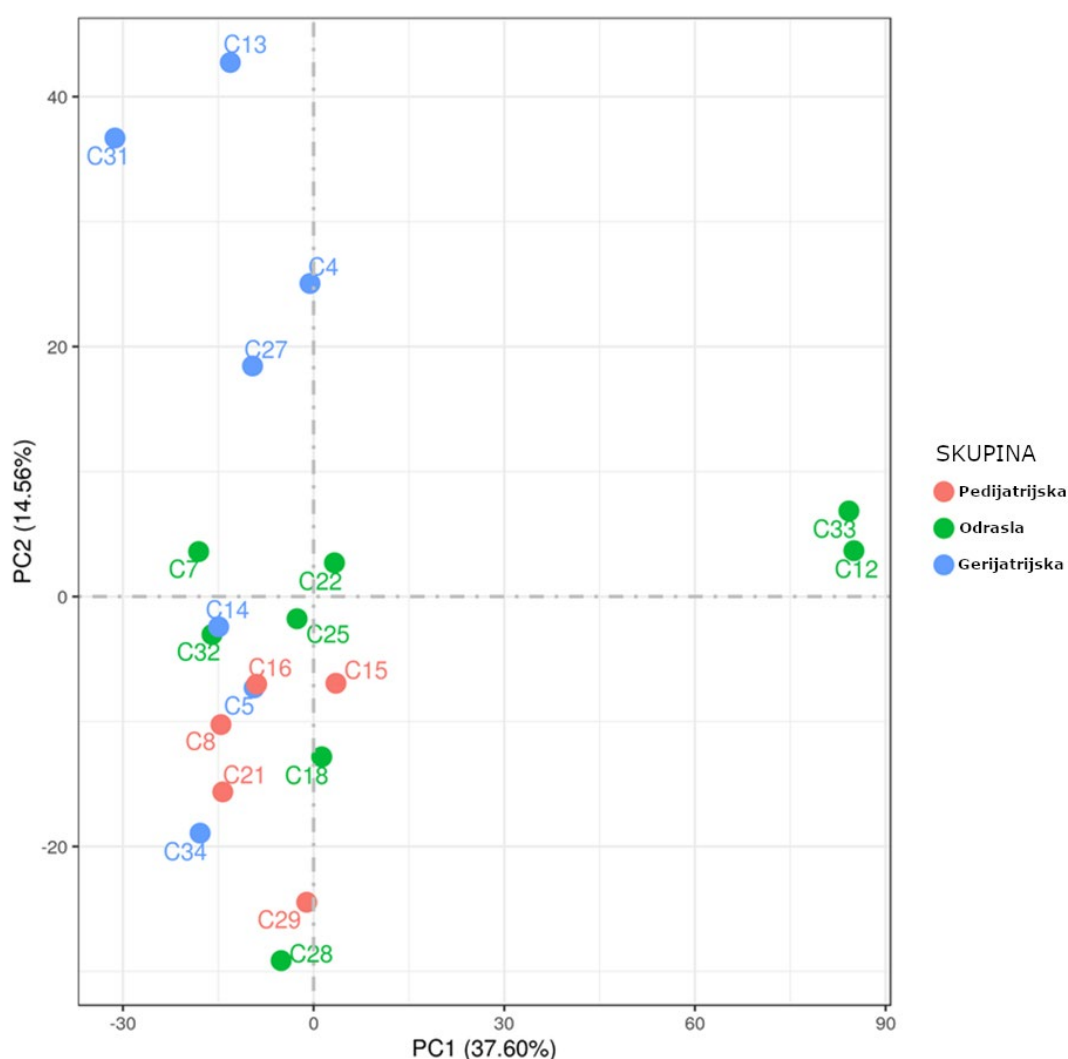
Nakon strogog filtriranja za slabo izražene gene, samo devet gena su značajno diferencijalno izraženi između muških i ženskih uzoraka uz $FDR < 0.05$. Najznačajnije pojačano izraženi geni u muškaraca su očekivano važni Y kromosom vezani geni, poput ribosomalnog proteina RPS4Y1, RNA helikaze DDX3Y, histonske demetilaze specifične za muški spol KDM5D, proteaze specifične za ubikvitin USP9Y, translacijskog inhibicijskog faktora EIF1AY, transkripcijskog faktora ZFY i protokadherina PCDH11Y i NLGN4Y (slika 18). Zbog malog broja diferencijalno izraženih gena funkcionalna analiza nije mogla biti izrađena s prikladnom pouzdanošću.



Slika 18. Promjene izražaja spolno vezanih gena crvuljka: toplinska mapa prikazuje devet značajno pojačano izraženih gena u muškoj populaciji ($FDR < 0.05$). *Preuzeto i prilagođeno iz: Quien D, Korac-Prlic J, Vilović K, Pogorelić Z, Boric M, Barcot O, i sur. Age-Related Transcriptomic Changes in the Vermiform Appendix. IJMS 2025;26:11399. <https://doi.org/10.3390/ijms262311399>. Prema licenci: CC BY 4.0.*

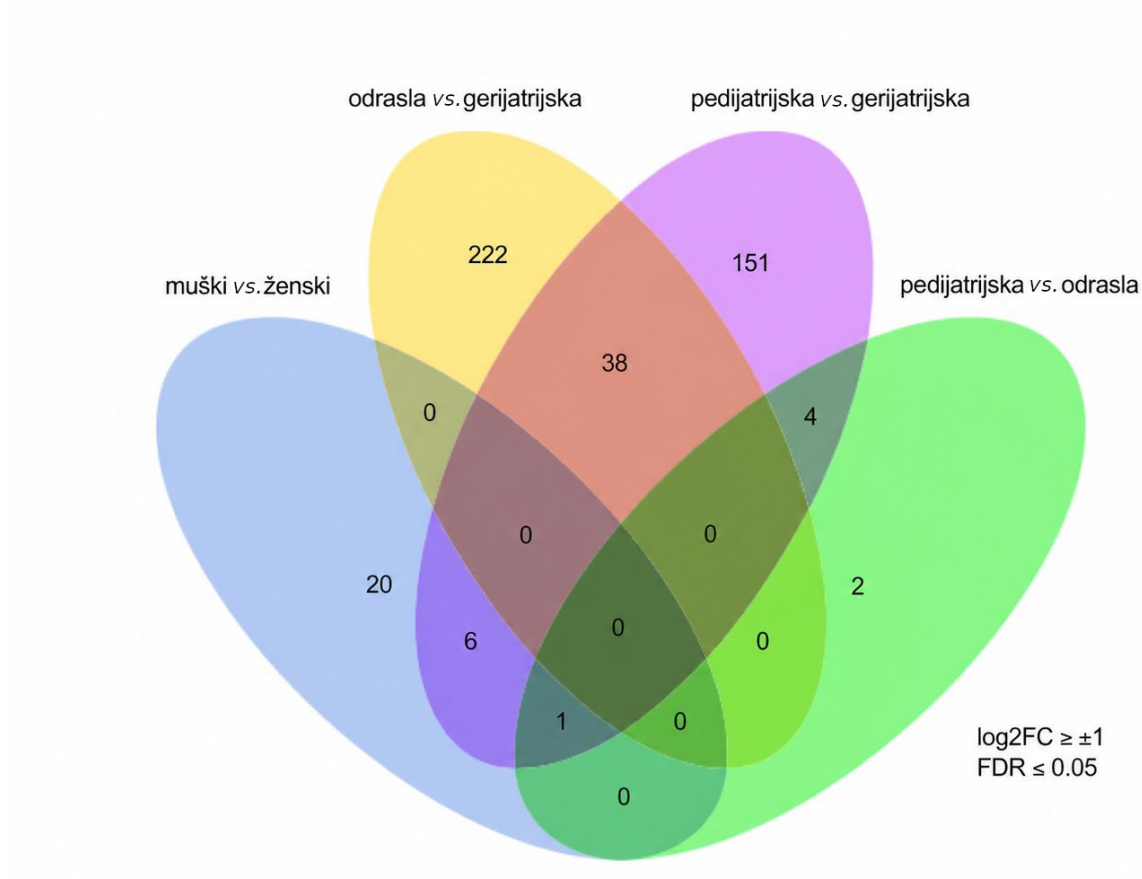
4.4. Promjene izražaja gena crvuljka progresivno uvjetovane starenjem

Izražaj gena crvuljka u pedijatrijskoj populaciji uspoređen je s izražajem u odrasloj i gerijatrijskoj populaciji kako bi se identificirali geni čiji se izražaj postupno mijenja starenjem i nisu spolno vezani. Analiza glavnih komponenti (eng. *principal component analysis*, PCA) transkriptoma crvuljka otkrila je dobno ovisno grupiranje uzoraka. Pedijatrijska populacija se grupirala oko ishodišta PCA, dok su uzorci odraslih grupirani kompaktnije, ali s 37,6% varijance duž prve glavne komponente (PC1). Gerijatrijski uzorci pokazali su najveću raspršenost s 14,6% varijance duž druge glavne komponente (PC2) (slika 19).



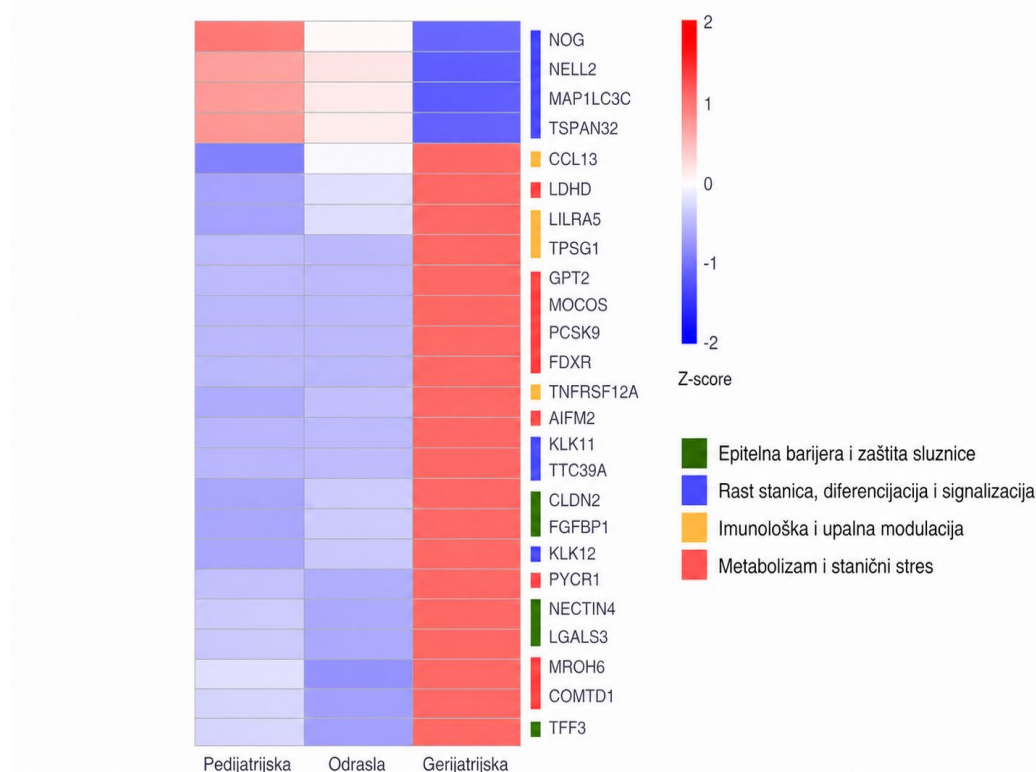
Slika 19. Promjene izražaja gena crvuljka progresivno uvjetovane starenjem: Analiza glavnih komponenta pokazala je dobno ovisno grupiranje uzoraka. *Preuzeto i prilagođeno iz: Quien D, Korac-Prlic J, Vilović K, Pogorelić Z, Boric M, Barcot O, i sur. Age-Related Transcriptomic Changes in the Vermiform Appendix. IJMS 2025;26:11399. <https://doi.org/10.3390/ijms262311399>. Prema licenci: CC BY 4.0.*

Trideset osam diferencijalno izraženih gena kroz tri dobne skupine je nadalje filtrirano za gene slabog izražaja, definirajući tako skup od dvadeset gena koji kodiraju proteine, a koji su diferencijalno regulirani tijekom starenja crvuljka (slike 20 i 21).



Slika 20. Promjene izražaja gena crvuljka progresivno uvjetovane starenjem: Vennov dijagram koji pokazuje diferencijalno izražene gene u svim skupinama unutar studije ($\log_2\text{FC} \geq \pm 1$, $\text{FDR} < 0.05$). Preuzeto i prilagođeno iz: Quien D, Korac-Prlic J, Vilović K, Pogorelić Z, Boric M, Barcot O, i sur. *Age-Related Transcriptomic Changes in the Vermiform Appendix. IJMS* 2025;26:11399. <https://doi.org/10.3390/ijms262311399>. Prema licenci: CC BY 4.0.

Pronađena je i progresivna promjena diferencijalnog izražaja za nekoliko proteina koji reguliraju stanični rast i diferencijaciju: smanjenje izražaja je primijećeno za antagonist BMP signalizacije NOG, neuralni sekretorni glikoprotein NELL2, autofagiji pridruženi protein mikrotubula MAP1LC3C i tetraspanin, membranski protein uključen u imunoregulaciju TSPAN32, dok su kalikrein-povezane peptidaze KLK11 i KLK12 te TTC39A pojačano izražene. Nekoliko proteina uključenih u epitelnu barijeru crijeva, uključujući CLDN2, NECTIN4, FGFBP1 i TFF3, bilo je značajno pojačano izraženo kroz sve dobne skupine, kao i upalni modulatori CCL13, LILRA5, TPSG1 i TNFRSF12A. Nadalje, nekoliko gena uključenih u stanični metabolizam, poput alanin aminotransferaze *GPT2*, *PCSK9*, *FDXR*, *AIFM2*, *COMTD1*, *MOCOS* i *PYCR1*, također je znatno pojačano izraženo u gerijatrijskoj populaciji (slika 21).

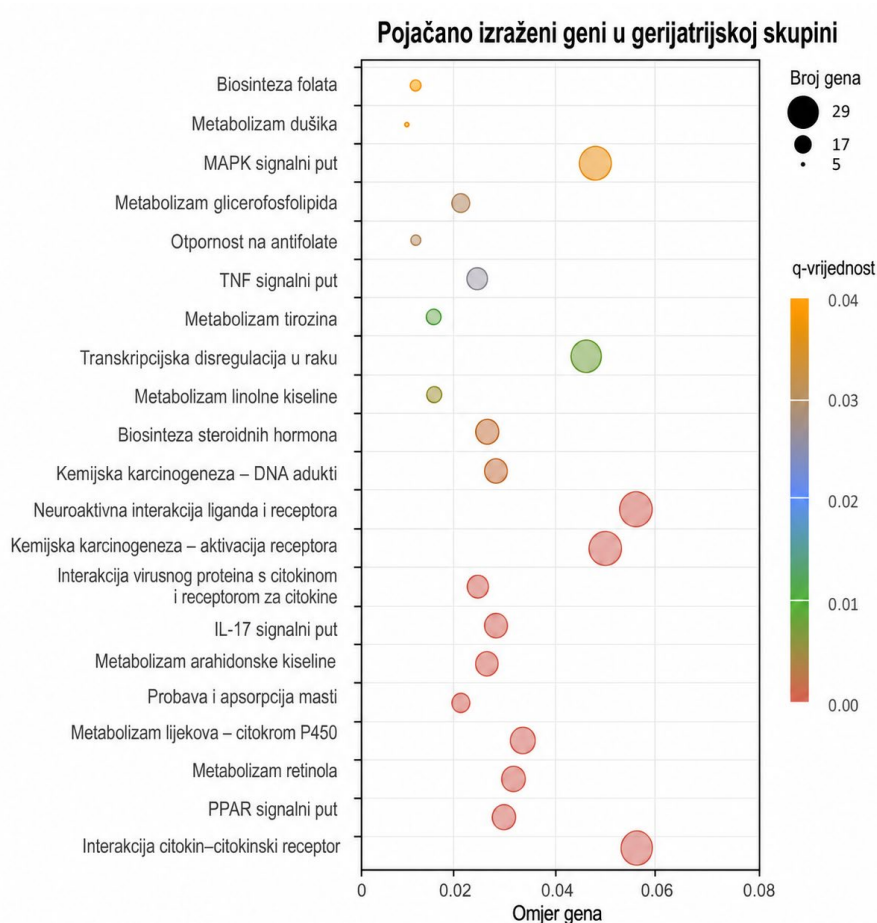


Slika 21. Promjene izražaja gena crvuljka progresivno uvjetovane starenjem: Toplinska mapa koja pokazuje gene značajnog diferencijalnog izražaja u svim dobnim skupinama.

Preuzeto i prilagođeno iz: Quien D, Korac-Prlic J, Vilović K, Pogorelić Z, Boric M, Barcot O, i sur. Age-Related Transcriptomic Changes in the Vermiform Appendix. *IJMS* 2025;26:11399. <https://doi.org/10.3390/ijms262311399>. Prema licenci: CC BY 4.0.

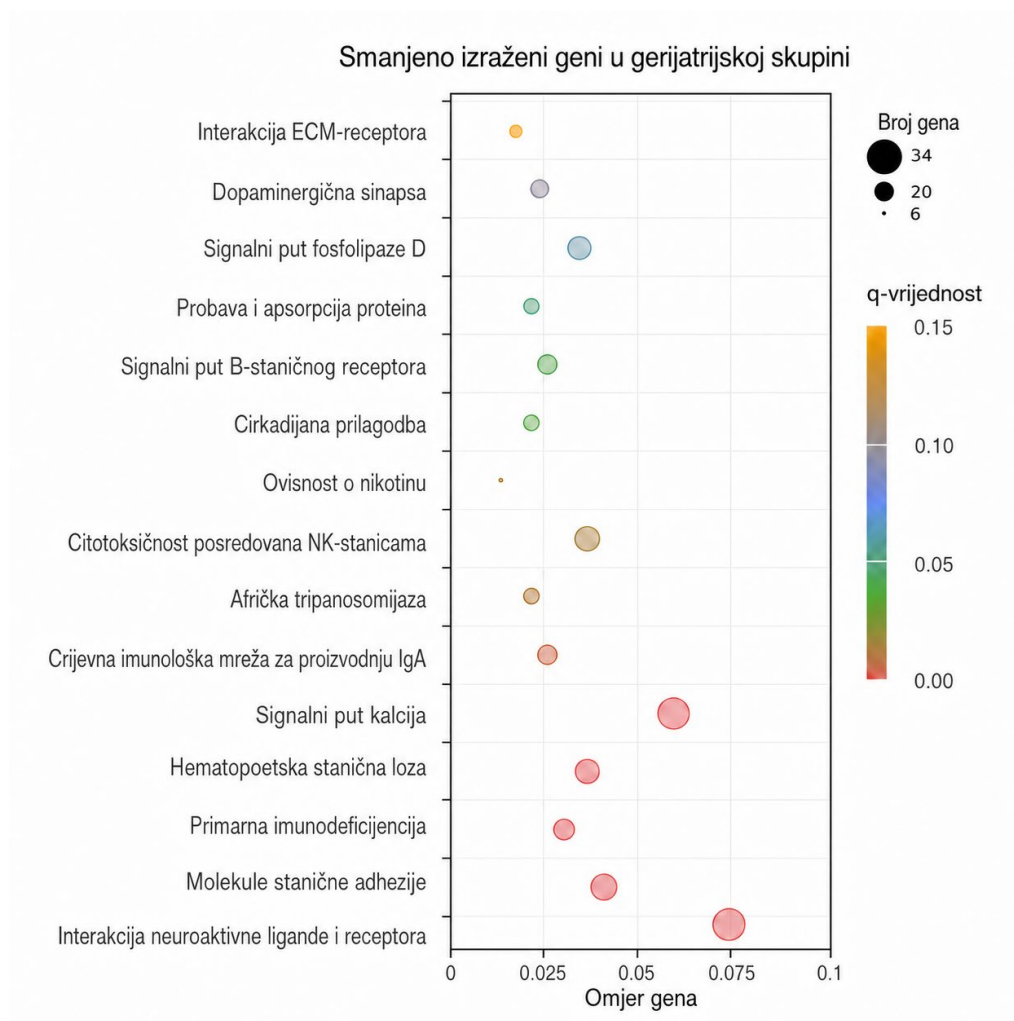
Prijevod teksta izvorne slike izrađen pomoću UI: Perplexity AI, San Francisco, CA, USA: Perplexity AI; 2026

Diferencijalna ekspresija gena je također analizirana između pedijatrijske i gerijatrijske populacije, uz izuzimanje spolno vezanih i prethodno istraženih diferencijalno izraženih gena u odrasloj i gerijatrijskoj skupini. Funkcionalna analiza KEGG putova otkrila je pojačan izražaj različitih metaboličkih i biosintetskih procesa, signalnih puteva uključujući MAPK, TNF i IL17, te neuronske i endokrine regulacijske procese. Slično funkcionalnim razlikama pronađenim između odraslih i gerijatrijskih crvuljaka, nekoliko pojačano izraženih KEGG puteva je povezano s regulacijom membranskog potencijala i razinom neurotransmitera, procesima metabolizma lipida i pozitivnom regulacijom upalnog odgovora i proizvodnjom kemokina (slika 22).



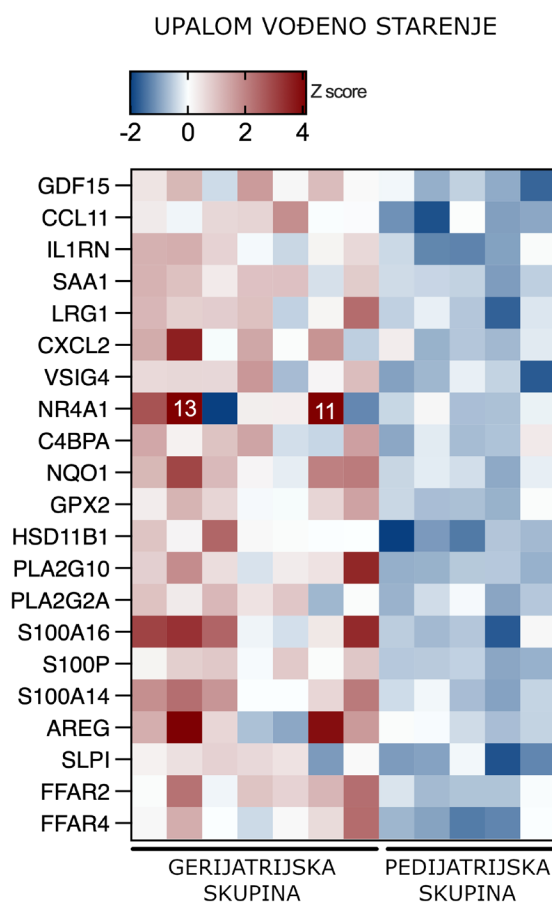
Slika 22. Promjene izražaja gena crvuljka progresivno uvjetovane starenjem: KEGG analiza puteva s prikazom pojačano izraženih gena u gerijatrijskoj u odnosu na pedijatrijsku populaciju. *Preuzeto i prilagođeno iz: Quien D, Korac-Prlic J, Vilović K, Pogorelić Z, Boric M, Barcot O, i sur. Age-Related Transcriptomic Changes in the Vermiform Appendix. IJMS 2025;26:11399. <https://doi.org/10.3390/ijms262311399>. Prema licenci: CC BY 4.0. Prijevod teksta izvorne slike izrađen pomoću UI: Perplexity AI, San Francisco, CA, USA: Perplexity AI; 2026*

Smanjenje izražaja je uočeno za puteve koji reguliraju urođeni i stečeni imunološki odgovor, prijanjanje stanica, receptore izvanstaničnog matriksa, neuronalnu te sinaptičku signalizaciju (slika 23).



Slika 23. Promjene izražaja gena crvuljka progresivno uvjetovane starenjem: Analiza KEGG puteva s prikazom smanjeno izraženih puteva u gerijatrijskoj u odnosu na pedijatrijsku skupinu. *Preuzeto i prilagođeno iz: Quien D, Korac-Prlic J, Vilović K, Pogorelić Z, Boric M, Barcot O, i sur. Age-Related Transcriptomic Changes in the Vermiform Appendix. IJMS 2025;26:11399. <https://doi.org/10.3390/ijms262311399>. Prema licenci: CC BY 4.0. Prijevod teksta izvorne slike izrađen pomoću UI: Perplexity AI, San Francisco, CA, USA: Perplexity AI; 2026*

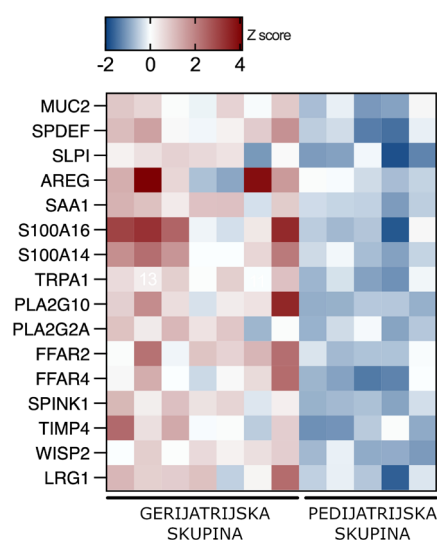
Stroga filtracija ($FDR < 0.05$, $\log_2FC > \pm 1$) postupno diferencijalno izraženih dobno vezanih gena između pedijatrijskih i gerijatrijskih crvuljaka rezultirala je 151 diferencijalno izraženim genima koji kodiraju proteine. Pojačan izražaj je uočen za gene uključene u upalne procese povezane sa starenjem, popravak mukozne barijere i fibrozu, metabolizam, hormone i signalne molekule, kao i za gene važne za stanični metabolizam, hormonsko i stanično signaliziranje, stanični ciklus, proliferaciju i rast. Odabrani geni su prikazani u toplinskim mapama (slike 24 -29).



Slika 24. Promjene izražaja gena crvuljka progresivno uvjetovane starenjem: Toplinska mapa odabranih diferencijalno izraženih gena između pedijatrijske i gerijatrijske grupe vezanih za upalne procese u starenju (eng. *inflammaging*) ($FDR < 0.05$). Brojevi na mapi pokazuju vrijednosti izvan raspona legende. Preuzeto i prilagođeno iz: *Quien D, Korac-Prlic J, Vilović K, Pogorelić Z, Boric M, Barcot O, i sur. Age-Related Transcriptomic Changes in the Vermiform Appendix. IJMS 2025;26:11399.*

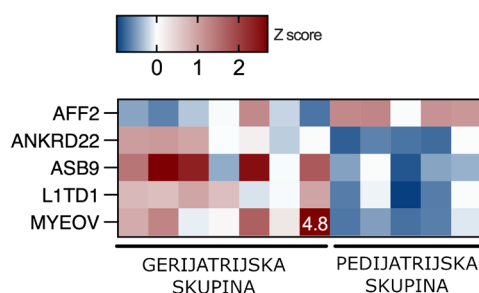
<https://doi.org/10.3390/ijms262311399>. Prema licenci: CC BY 4.0.

POPRAVAK CRIJEVNE BARIJERE I FIBROZA

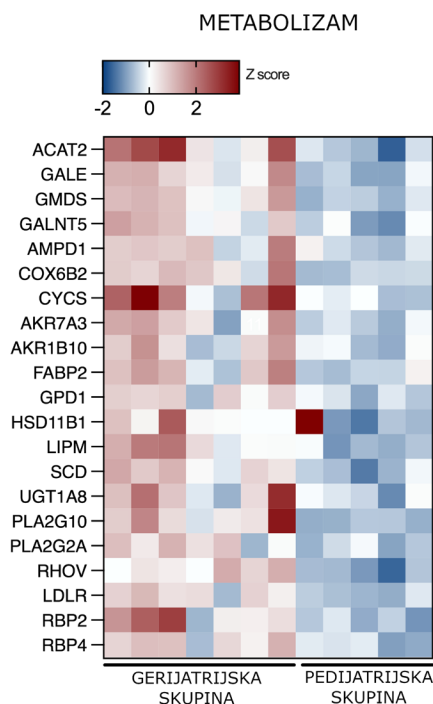


Slika 25. Promjene izražaja gena crvuljka progresivno uvjetovane starenjem: Toplinska mapa odabranih diferencijalno izraženih gena između pedijatrijske i gerijatrijske grupe vezanih za popravak crijevne barijere i fibrozu ($FDR < 0.05$). *Preuzeto i prilagođeno iz: Quien D, Korac-Prlic J, Vilović K, Pogorelić Z, Boric M, Barcot O, i sur. Age-Related Transcriptomic Changes in the Vermiform Appendix. IJMS 2025;26:11399. <https://doi.org/10.3390/ijms262311399>. Prema licenci: CC BY 4.0.*

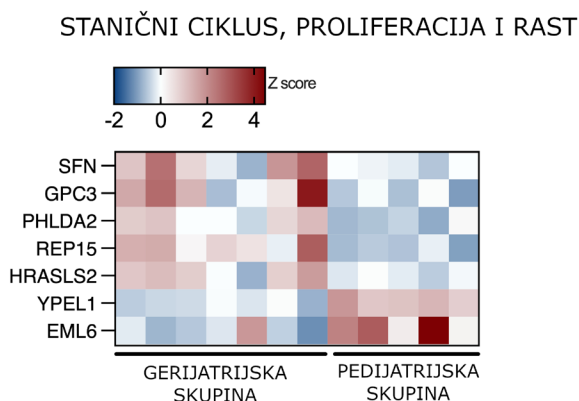
REGULACIJA RNA I PROTEINA



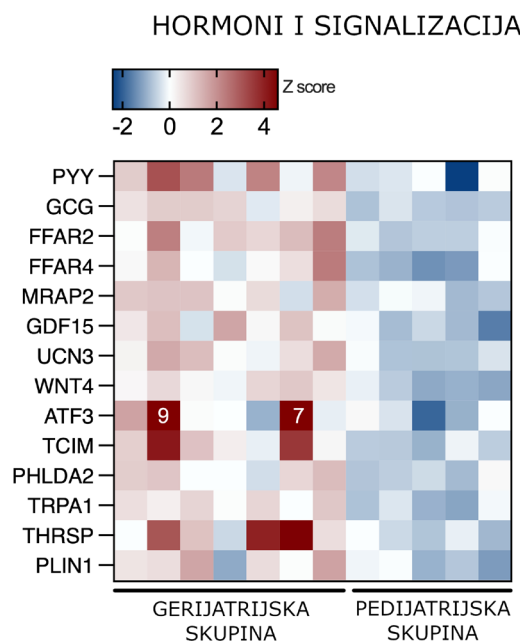
Slika 26. Promjene izražaja gena crvuljka progresivno uvjetovane starenjem: Toplinska mapa odabranih diferencijalno izraženih gena između pedijatrijske i gerijatrijske grupe vezanih za RNA i regulaciju proteina ($FDR < 0.05$); brojevi na mapi pokazuju vrijednosti izvan raspona legende. *Preuzeto i prilagođeno iz: Quien D, Korac-Prlic J, Vilović K, Pogorelić Z, Boric M, Barcot O, i sur. Age-Related Transcriptomic Changes in the Vermiform Appendix. IJMS 2025;26:11399. <https://doi.org/10.3390/ijms262311399>. Prema licenci: CC BY 4.0.*



Slika 27. Promjene izražaja gena crvuljka progresivno uvjetovane starenjem: Toplinska mapa odabranih diferencijalno izraženih gena između pedijatrijske i gerijatrijske grupe vezanih za metabolizam (FDR<0.05); brojevi na mapi pokazuju vrijednosti izvan raspona legende. *Preuzeto i prilagođeno iz: Quien D, Korac-Prlic J, Vilović K, Pogorelić Z, Boric M, Barcot O, i sur. Age-Related Transcriptomic Changes in the Vermiform Appendix. IJMS 2025;26:11399. <https://doi.org/10.3390/ijms262311399>. Prema licenci: CC BY 4.0.*



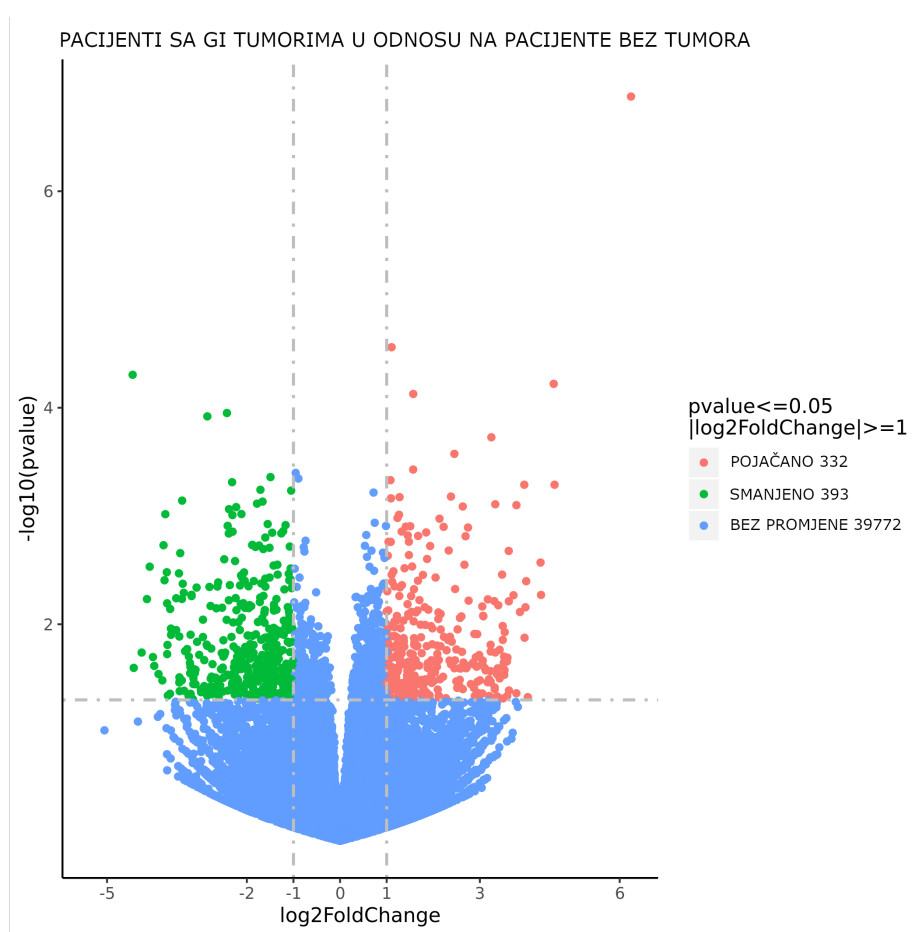
Slika 28. Promjene izražaja gena crvuljka progresivno uvjetovane starenjem: Toplinska mapa odabranih diferencijalno izraženih gena između pedijatrijske i gerijatrijske grupe vezanih za stanični ciklus, proliferaciju i rast (FDR<0.05). *Preuzeto i prilagođeno iz: Quien D, Korac-Prlic J, Vilović K, Pogorelić Z, Boric M, Barcot O, i sur. Age-Related Transcriptomic Changes in the Vermiform Appendix. IJMS 2025;26:11399. <https://doi.org/10.3390/ijms262311399>. Prema licenci: CC BY 4.0.*



Slika 29. Promjene izražaja gena crvuljka progresivno uvjetovane starenjem: Toplinska mapa odabranih diferencijalno izraženih gena između pedijatrijske i gerijatrijske grupe vezanih za hormone i signalizaciju (FDR<0.05); brojevi na mapi pokazuju vrijednosti izvan raspona legende. *Preuzeto i prilagođeno iz: Quien D, Korac-Prlic J, Vilović K, Pogorelić Z, Boric M, Barcot O, i sur. Age-Related Transcriptomic Changes in the Vermiform Appendix. IJMS 2025;26:11399. <https://doi.org/10.3390/ijms262311399>. Prema licenci: CC BY 4.0.*

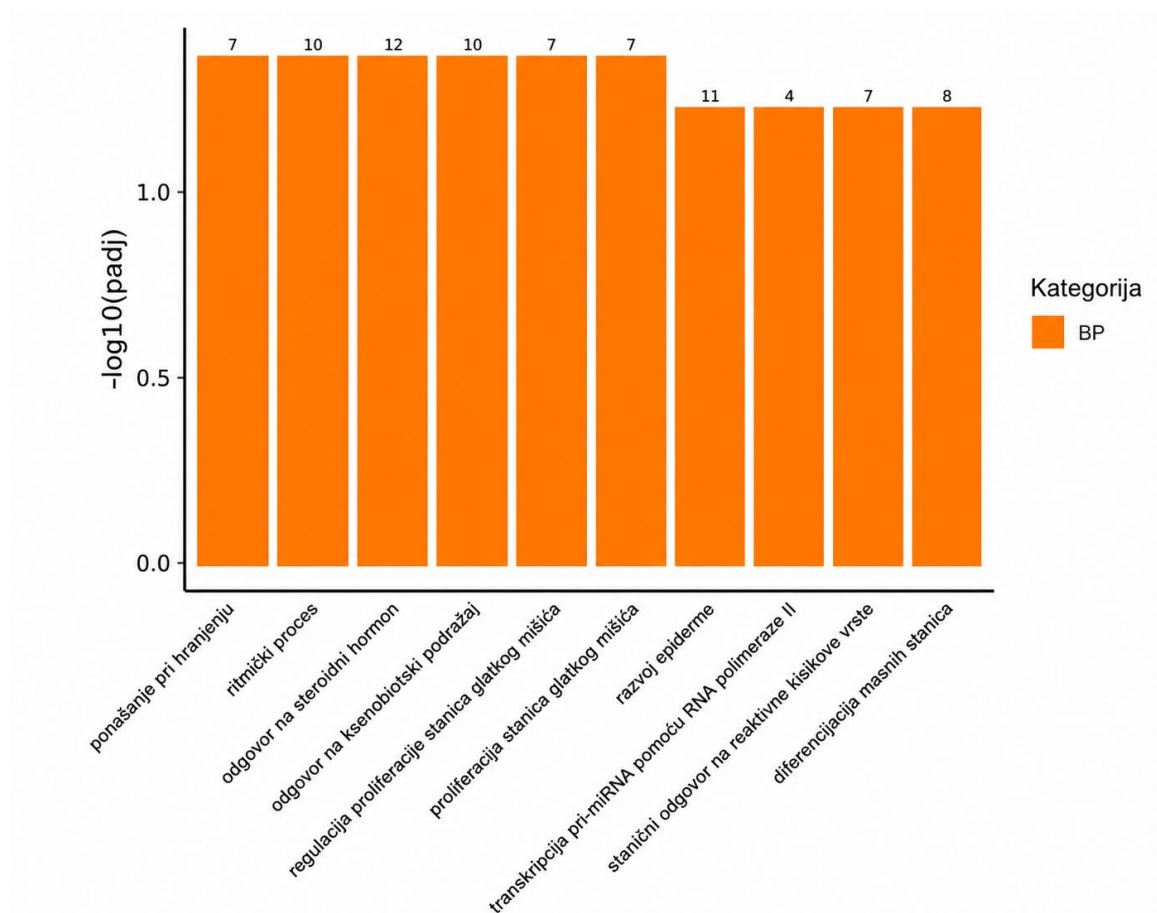
4.5. Promjene u izražaju gena crvuljka u pacijenata s gastrointestinalnim tumorima

U široj obradi podataka analizirali smo tkivo zdravih crvuljaka odrasle i gerijatrijske skupine pacijenata, koje smo podijelili u dvije skupine: pacijente s gastrointestinalnim tumorima (n=9) i one bez tumora (n=6). Navedeni gastrointestinalni tumori nisu zahvaćali crvuljak. Analiza transkriptoma pacijenata s gastrointestinalnim tumorima u odnosu na zdravu skupinu pokazala je pojačan izražaj 332 gena i smanjen izražaj 393 diferencijalno izraženih gena, uz p-vrijednost $< 0,05$. Velik broj gena, njih 39.772, nije zadovoljio kriterije za diferencijalnu ekspresiju (slika 30).



Slika 30. Promjene izražaja gena crvuljka u pacijenata s gastrointestinalnim tumorima: Volcano plot dijagram koji prikazuje diferencijalno eksprimirane gene (DEG) između pacijenata s gastrointestinalnim tumorima i onima bez tumora u gerijatrijskoj i odrasloj populaciji.

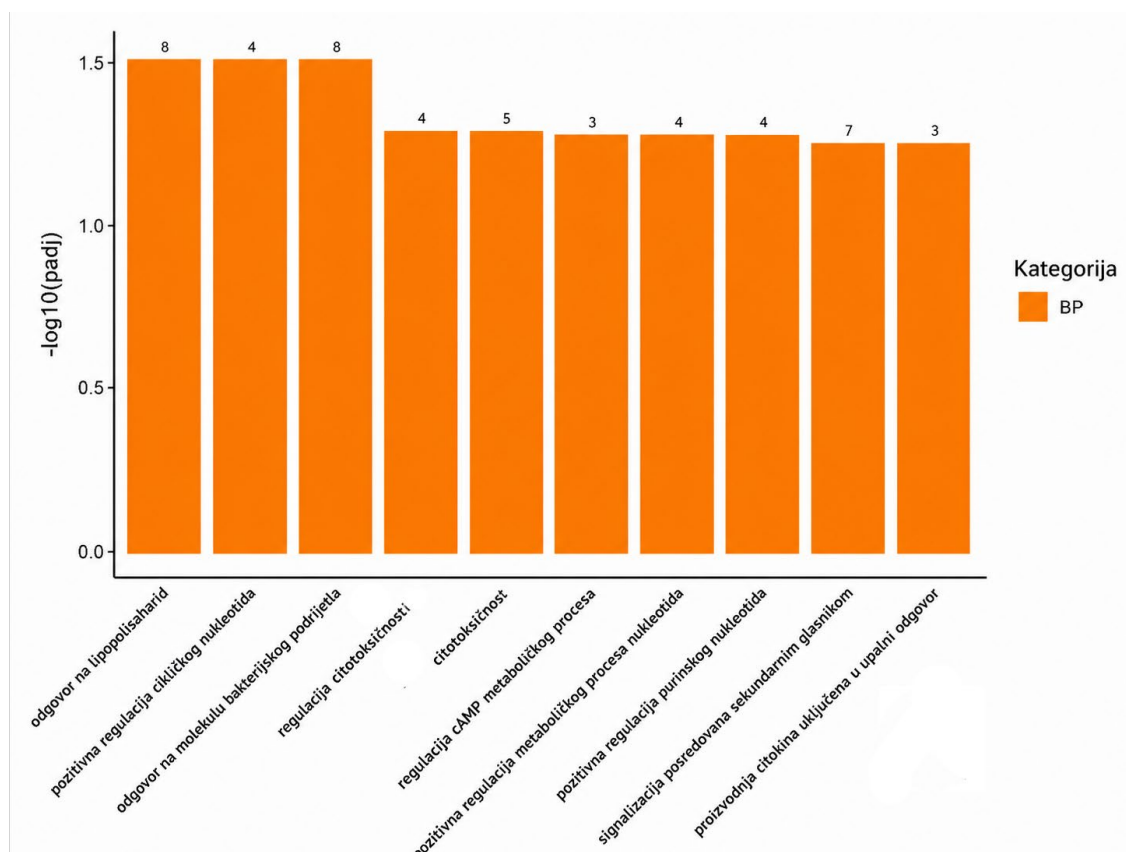
U funkcionalnoj analizi gena povećanog izražaja korišteni su *Gene Ontology* setovi gena koji su pokazali najznačajnije pojačanje izražaja genskih setova bioloških procesa (BP) vezanih uz proliferaciju glatkih mišićnih stanica, cirkadijani ritam, uzimanje hrane, odgovore na steroidne hormone i ksenobiotičke stimulanse u pacijenata s gastrointestinalnim tumorima u odnosu na one bez tumora (slika 31).



Slika 31. Promjene izražaja gena crvuljka u pacijenata s gastrointestinalnim tumorima:

Funkcionalna analiza s *Gene Ontology* skupom gena za biološke procese (BP) koji prikazuje najznačajnije pojačanje izražaja puteva vezanih za proliferaciju glatkih mišićnih stanica, cirkadijani ritam, uzimanje hrane, odgovore na steroidne hormone i ksenobiotičke stimulanse. *Prijevod teksta izvorne slike izrađen pomoću UI: Perplexity AI, San Francisco, CA, USA: Perplexity AI; 2026*

U funkcionalnoj analizi gena smanjenog izražaja kod pacijenata s gastrointestinalnim tumorima korišteni su *Gene Ontology* setovi gena koji su pokazali najznačajnije smanjenje izražaja bioloških procesa (BP) vezanih uz imunološki odgovor, posebice odgovor na bakterijske i lipopolisaharidne podražaje te citotoksično djelovanje (slika 32).



Slika 32. Promjene izražaja gena crvuljka u pacijenata s gastrointestinalnim tumorima:

Funkcionalan analiza s Gene Ontology skupom gena za biološke procese (BP) koji prikazuje najznačajnije smanjenje izražaja puteva vezanih uz imunološki odgovor.

Prijevod teksta izvorne slike izrađen pomoću UI: Perplexity AI, San Francisco, CA, USA:

Perplexity AI; 2026

Pojedinačna analiza diferencijalno izraženih gena utvrdila je ukupno jedan gen značajno pojačanog izražaja u pacijenata sa gastrointestinalnim tumorima u odnosu na zdrave pacijente i to je gen koji je dio transkripcijskog faktora AP1- *FOSB* (FDR=0.005). Za ostale analizirane gene u ovoj skupini nije nađena statistička značajnost.

5. RASPRAVA

Starenje tkiva je proces uvjetovan brojnim čimbenicima, a uključuje višestanično, strukturno i funkcionalno propadanje koje rezultira atrofijom tkiva s mogućnošću razvoja bolesti povezanih sa starenjem. Obilježja starenja tkiva crijeva obuhvaćaju nagomilavanje oštećenja DNA, metaboličke promjene, kroničnu upalu i narušavanje crijeвне barijere koja je usko povezana sa crijevnom disbiozom. Uloga crvuljka, kao specijaliziranog dijela crijeva, je u održavanju crijevnog imunološkog odgovora i mikroflore. Kao zasebni dio GALT-a, crvuljak sadrži veliki broj limfnih folikula, koji se pojavljuju u drugom tjednu nakon rođenja i najbrojniji su u pubertetu. Starenjem, smanjuje im se broj i veličina, ali mogu opstajati u starijoj dobi, što je u skladu s histološkim nalazima u našim uzorcima (148,195,317). Fibrozna obliteracija crvuljka predstavlja benigno stanje. Studije kao moguću etiologiju ovog nalaza navode hiperplaziju neuroendokrinih stanica u submukozi i lamini proprij crvuljka koja uzrokuje ponavljajuću subkliničku upalu i dovodi do zamjene tkiva fibromiksoidnom stromom (310). Dosadašnje studije opisuju prevalenciju fibrozne obliteracije nakon apendektomije od 0,8 do 20,5%, uz više stope povezane s incidentalnom apendektomijom (311,312,318). Naši rezultati na uzorcima dobivenim incidentalnom apendektomijom upućuju na to da je fibrozna obliteracija vrška crvuljka učestalija, ali ne značajno, u gerijatrijskim i odraslim uzorcima u usporedbi s pedijatrijskim uzorcima, što je u skladu s ostalim studijama s malom veličinom uzoraka (83). Međutim, veće studije na uzorcima nepromijenjenih crvuljaka trebale bi ispitati moguću vezu između smanjenja limfnih folikula te prisutnosti i opsega fibrozne obliteracije u kontekstu starenja. Naši podaci pokazuju da specifične transkriptomске promjene prate histološke nalaze u crvuljku starijih osoba.

Rezultati analize transkriptoma u odraslim i gerijatrijskim uzorcima crvuljka odražavaju složen odnos između povećanog oksidativnog oštećenja, gubitka neuronske plastičnosti i fibroznog remodeliranja u ovom dijelu crijeva. Starenje je potaknuto oštećenjem funkcije respiratornog lanca i oštećenjem mitohondrija, kao i opadanjem aktivnosti antioksidacijskih enzima (319–321). Kronična upala niskog stupnja, uzrokovana propadanjem mukozne barijere i disbiozom, dodatno povećava proizvodnju reaktivnih kisikovih radikala (ROS) (322). NRF2 je glavni transkripcijski regulator stanične obrane od oksidativnog i metaboličkog stresa. Kontrolira izražaj brojnih gena vezivanjem na elemente antioksidativnog odgovora u njihovim promotorskim regijama i posljedično pojačava njihov izražaj (323,324). Naši nalazi u crvuljku starijih osoba ukazuju na aktivaciju NRF2 signalizacije, što dokazuje pojačan izražaj nekoliko ciljnih gena NRF2, posebno *NQO1* i *MGST1*, koji imaju jedinstvenu staničnu antioksidativnu aktivnost (325). Uloga različitih ciljnih gena u regulacijskom putu NRF2 nije opsežnije

istražena u kontekstu starenja ljudske probave; međutim, poznato je da bazalni izražaj NRF2 ciljnih gena u pojedinim tkivima raste s dobi, ali aktivacija na stresni podražaj opada zbog smanjenja funkcije povezanog s životnom dobi, poznatog kao prigušivanje NRF2 (326–328). Aktivacija NRF2 uvjetovana stresnim podražajem općenito se smatra zaštitnom za tkivo, međutim, njezina uloga u probavi tijekom upale može biti zaštitna kratkoročno, dok dugoročno ima potencijalni učinak na razvoj tumora, što je prikazano u studiji Kruse i sur. koji opisuje epitelnu adaptaciju NCM460 stanica i otpornost na apoptozu pod oksidativnim stresom od strane upalnih mijeloidnih stanica (329). Studije na miševima pokazuju da aktivacija NRF2 u enterocitima pojačava izražaj *NQO1* i pokreće remodeliranje crijeva, dok farmakološka blokada NRF2 poboljšava kontraktilnost aboralnog debelog crijeva u ženskih miševa starije dobi (330,331). Uzimajući u obzir raznovrsne učinke NRF2, koji mogu biti različiti za svako tkivo, potrebne su dodatne studije da razjasne ulogu povećanog bazalnog izražaja ciljnih gena NRF2 u kontekstu upalnog starenja probave.

U literaturi su prisutni čvrsti dokazi koji povezuju starenje s gubitkom gustoće mijenteričkih neurona (332). Promjene u crijevnom živčanom sustavu rezultiraju gastrointestinalnom disfunkcijom i mogu doprinijeti razvoju bolesti i patoloških stanja u starijoj životnoj dobi. Progresivni gubitak crijevnih neurona i smanjenje intersticijskih Cajalovih stanica rezultira razvojem gastrointestinalne disfunkcije uslijed slabljenja sekrecijske funkcije i crijevnog motiliteta (252). U vezi s navedenim, primijetili smo smanjenje izražaja tirozin kinaze RET, koja podržava sazrijevanje tkiva i proliferaciju crijevnih neurona i enteroendokrinih stanica (333). RNA sekvenciranje na razini pojedinačnih stanica ljudskog i mišjeg crijevnog živčanog sustava otkrilo je različite razine izražaja gena ovisno o lokaciji, cirkadijanom ritmu i starenju (248).

Naša analiza pokazuje smanjenje izražaja važnih gena ionskih kanala koji reguliraju ekscitabilnost neurona i homeostazu kalcija. Naponski kontrolirani kalijevi kanali su osjetljivi na oksidacijski stres, stoga smanjenje izražaja *KCNAB1*, *KCNB1*, *KCNMB2* i *CACNA2D1* u tkivu crvuljka u starijoj dobi može narušiti regulaciju neuronske ekscitabilnosti i homeostazu kalcija (334,335). Promjene u signalizaciji kalcija su usko povezane sa staničnom neravnotežom reaktivnih kisikovih vrsta, koja može dovesti do porasta razine kalcija u citosolu i uvesti stanicu u apoptozu te u konačnici dovesti do gubitka neurona i usporavanja tranzita crijevnog sadržaja zbog poremećaja peristaltike (336,337). Također, receptori glutamata, od ključnog su značaja za ekscitacijsku neurotransmisiju u ljudskoj probavi, imaju važnu ulogu u regulaciji kalcija u neuronima. Crijevni živčani sustav iskazuje nekoliko tipova glutamatnih

receptora koji posreduju brzu ekscitacijsku sinaptičku transmisiju, uključujući receptore za α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionsku kiselinu (AMPA receptori). Podjedinica AMPA receptora GRIA2 (GluA2) od presudnog je značaja za regulaciju permeabilnosti Ca^{2+} i naponski ovisnu provodljivost kanala (338–340). U našem istraživanju uočili smo smanjenje izražaja podjedinice AMPA receptora GRIA2 zajedno s njegovim transkripcijskim faktorom ADAR2 ($\log_2\text{FC}=0.8$, $\text{FDR}=0.07$), što upućuje na patološki pomak u regulaciji kalcija u neuronima koji može dovesti do ekscitacijske ranjivosti (341). Smanjenje izražaja nekoliko gena neuronskih adhezijskih molekula (*NCAM2*, *NRXN1*, *NEGR1* i *CNTN1*) dodatno upućuje na raspad sinaptičke strukture i stabilnosti (342,343). Uočili smo porast količine sarkoplazmatskog proteina JSRP1 koji regulira sprezanje CaV1.1-RyR1 kanala (344). Protein JSRP1 je primarno marker kontraktilnih stanica, što ukazuje na uzdužno vezivno remodeliranje stijenke crvuljka, najizraženije u području vrška crvuljka. Starenje obilježeno fibrozom (eng. *fibroaging*), opisivano kao pojačano nakupljanje vezivnog tkiva blagoga stupnja, pojavljuje se i u drugim probavnim organima gdje je povezano s disbiozom i upalom (345,346). Značajno smanjenje izražaja proteina izvanstaničnog matriksa ABI3BP predstavljaju dodatni pokazatelj pojačane fibroze, budući da ona potiče diferencijaciju, a ne proliferaciju, što je demonstrirano u *Abi3bp* knockout miševa nakon infarkta miokarda te na ljudskim srcima s dilatativnom kardiomiopatijom (347,348).

Promjena izražaja spolno vezanih gena kroz analizu transkriptoma otkrila je mali broj značajno diferencijalno izraženih gena, od kojih je većina, očekivano, lokalizirana na Y kromosomu te je u prethodnim studijama pokazala visok udio kod muškaraca u odnosu na žene u brojnim ljudskim tkivima (349). Spolno vezani geni *EIF1AY*, *DDX3Y*, *NLGN4Y*, *UTY* i *ZFY*, koji su pojačano izraženi kod muškaraca, često se koriste u računalnim procjenama starenja tkiva jer se status metilacije njihove DNA pouzdano mijenja tijekom starenja, te su korisni za procjenu biološkog starenja kod muškaraca (350,351). Porast izražaja gena za epitelni sekretorni protein REG1B predstavlja zanimljiv nalaz. Njegov učinak na proliferaciju i antiapoptotska svojstva pomaže u popravku oštećenja crijeвне sluznice, dok pojačan izražaj u tkivima karcinoma potiče proliferaciju i povećava invazivnost tumorskih stanica (352,353).

Uočili smo veći broj diferencijalno izraženih gena između skupina odrasle i gerijatrijske u odnosu na pedijatrijsku skupinu. Ovaj fenomen je već opisan u tkivima ljudskog mozga i epidermisa zbog povećane nasumičnosti promjena genske ekspresije tijekom starenja (354–356). Naši rezultati ukazuju na povezanost diferencijalne ekspresije gena kroz sve dobne skupine s ključnim procesima starenja crijeva. Analiza diferencijalno izraženih gena od

pedijatrijske do gerijatrijske skupine, otkrila je snižen izražaj nekoliko gena važnih za stanični rast i diferencijaciju. Sekretorni glikoprotein i opisani antagonist koštanih morfogenetskih proteina Noggin (NOG) izražen je u matičnim stanicama crijeva. NOG je potreban za održavanje pluripotentnosti Lgr5⁺ crijevnih matičnih stanica, stoga uočeni snižen izražaj može označavati smanjenje broja navedenih stanica, što je u literaturi opisano u kontekstu starenja miševa (121,357–361). NELL2 je sekretorni glikoprotein značajno pojačano izražen u neuronima i nije opsežno istražen u crijevnom živčanom sustavu. Studije na životinjama pokazuju da gubitak NELL2 uzrokuje smanjenje preživljenja i diferencijacije neurona, narušava plastičnost sinapsi te povećava ranjivost i neurotoksični stres (362,363). Povećanje staničnog stresa može biti dodatno potaknuto sniženim izražajem jednog od ključnih proteina autofagije, MAP1LC3C, što dovodi do narušene razgradnje unutar stanica putem lizosoma. Nadalje, snižena je i ekspresija tetraspanina 32 (*TSPAN32*), koji je fiziološki izražen u T-limfocitima povezanim s GALT-om, gdje djeluje kao negativni regulator T-stanica pa bi sniženje njegovog izražaja moglo rezultirati narušavanjem ravnoteže imunološkog odgovora između tolerancije na komenzalne i učinkovitog imunološkog odgovora na patogene mikroorganizme (364,365).

Ključna odrednica intestinalnog starenja je narušavanje crijevne barijere. Protein međustaničnih čvrstih spojeva kladin-2 (*CLD2*) stvara kationski selektivne kanale u paracelularnom prostoru propusne za vodu i time slabi epitelnu barijeru. Izražaj gena *CLD2* smatra se jednom od glavnih odrednica propusnosti crijevne barijere; selektivnim provođenjem natrijevih i kalijevih iona te vode, *CLD2* snižava transepitelni električni otpor (TER) i omogućuje učinkovitu resorpciju tekućine (366). Primijećeni pojačan izražaj *CLD2* povezan je u prethodnim studijama sa sniženjem TER-a i povećanim paracelularnim protokom iona, što rezultira nastankom sindroma propusnog crijeva koji pridonosi razvoju disbioze, intestinalne upale i neučinkovitoj kontroli patogena (307).

Galektin-3 (*LGALS3*) dodatni je tkivni i serumski biljeg intestinalnog starenja povezanog s upalom, a u ovom istraživanju njegov je izražaj bio pojačan u gerijatrijskoj populaciji. Galektin-3 pripada skupini lektina koje vežu β -galaktozide te sudjeluju u regulaciji staničnog prijanjanja, remodeliranju izvanstaničnog matriksa, kao i u modulaciji upalnih i fibroznih procesa. Brojna su istraživanja pokazala povezanost galektina-3 s patogenezom niza značajnih bolesti, uključujući srčano zatajivanje, kroničnu bubrežnu bolest, jetrenu i plućnu fibrozu te maligne bolesti. U crijevu je galektin-3 pretežito izražen u diferenciranim enterocitima na vršcima resica te je u interakciji s mucinom-2 (*MUC2*), zbog čega je ključan za

održavanje homeostaze između domaćina i mikrobioma (367–372). Smanjen izražaj galektina-3 opisan je u crijevnoj sluznici bolesnika s upalnim bolestima crijeva, dok su povišene razine u serumu zabilježene u bolesnika s ulceroznim kolitisom i Crohnovom bolešću (373,374). U ovom radu uočili smo pojačan izražaj galektina-3 u sluznici crvuljka starijih ispitanika, što se može tumačiti kao kompenzacijski mehanizam usmjeren na očuvanje crijeвне barijere, budući da je pokazano kako se galektin-3 veže s N-kadherinom, okludinom i drugim komponentama *zonule occludens*, čime pridonosi očuvanju integriteta epitelne barijere i potiče obnovu epitelnih stanica (374–377). Usporednom analizom pedijatrijskih i gerijatrijskih uzoraka prikazane su postupne promjene koje zahvaćaju crvuljak tijekom starenja, naglašavajući tako ključna obilježja starenja probave. Analizom GSEA, koristeći KEGG signalne puteve, otkriveno je pojačanje izražaja gena uključenih u signalne puteve povezane s upalom (TNF- α , IL-17 i MAPK) uz istodobno smanjenje izražaja signalnih puteva fosfolipaze D, pri čemu su ti procesi izravno povezani s kroničnim upalnim procesima u starijoj dobi i staničnom senescencijom (378–380). Povišen izražaj više gena, uključujući transkripcijski faktor epitela SPDEF, sekretorni ligand obitelji epidermalnog faktora rasta AREG, peptid sličan čimbeniku rasta REG4 i mucin 2 (MUC2), između ostalih, upućuje na aktivnu regeneraciju crijevne sluznice. Crijevna sluz sastoji se od glikoproteina MUC2, kojeg proizvode vrčaste stanice. Naši rezultati ukazuju na povećanu aktivnost vrčastih stanica u crvuljku tijekom starenja, što je vidljivo iz značajnog porasta izražaja *MUC2* u gerijatrijskoj skupini, a u skladu je s dosadašnjim nalazima koji pokazuju na porast broja sekretornih stanica tijekom starenja (121). *MUC2* je često pojačano izražen u kroničnoj upali, a njegov se izražaj regulira putem transkripcijskog faktora NF- κ B, koji može biti aktiviran liposaharidima ili citokinima. Istraživanja izražaja *MUC2* u debelom crijevu starih miševa pokazuju narušenu crijevnu barijeru i smanjen izražaj *MUC2*, stoga se uočeno pojačanje u crvuljku može povezati sa lokacijom unutar probavnog sustava (381). Specifičan porast izražaja *MUC2* povezan je s istovremenim povećanim izražajem proteaznih inhibitora specifičnih za vrčaste stanice tipa kazal, *SPINK4* i *SPINK1*, kao i s značajnim porastom ekspresije proteina tetraspanina-8, koji osigurava primjereno izlučivanje mucina (382). Uzimajući u obzir i pojačan izražaj antiapoptotskog inhibitora serin-proteaza SLPI, olfaktomedina-4 (OLFM4) te peptida sličnog čimbeniku rasta REG4, koji potiču epitelnu proliferaciju, u crvuljku starijih osoba zapaža se reparativni odgovor na blagu kroničnu upalu koji se pojačava sa starenjem (121,383). Osim navedenoga, primijećen je pojačan izražaj faktora rasta i diferencijacije GDF15 i kemokina CCL11, dobro opisanih biomarkera povezanih s razvojem upale tijekom starenja. Istraživanja na ljudskim modelima pokazuju snažnu pozitivnu korelaciju između razine GDF15 s kronološkom i biološkom dobi te ga se smatra

ključnim faktorom sekretornog fenotipa povezanog sa senescencijom (228,384,385). Pojačan izražaj kemokina važnog za aktivaciju eozinofila CCL11, za koji je pokazano da smanjuje neurogenezu i povećava proizvodnju kisikovih radikala u stanicama mikroglia te izaziva ekscitotoksičnu smrt neurona u mozgu zbog pretjerane aktivacije ekscitatornih receptora, mogao bi također doprinijeti promjenama povezanim sa starenjem u crijevnom živčanom sustavu (115,386).

U analizi uzoraka zdravih crvuljaka pacijenata s gastrointestinalnim tumorima u odnosu na pacijente bez tumora u odrasloj i gerijatrijskoj skupini nađen je pojačan izražaj gena *FOSB*, dijela AP-1 transkripcijskog faktora (FDR=0.005). Povišeni izražaj gena *FOSB* odraz je kombinacije učinaka imunosenescencije i karcinogeneze polja, a ne nužno direktni onkogeni signal. Karcinogeneza polja je medicinski koncept koji označava veliko područje genetski izmijenjenih stanica zbog dugotrajne izloženosti tkiva štetnim čimbenicima poput tumora. U konceptu polja karcinogeneze pokazano je da se molekularne promjene proširuju izvan makroskopski vidljivog tumora, zahvaćajući susjednu i udaljenu sluznicu s promjenama u proliferaciji, upalnim signalnim putevima i epigenetskom profilu. *FOSB*, kao član *FOS* obitelji jezgrenih transkripcijskih faktora i komponenta AP-1 kompleksa, sudjeluje u regulaciji proliferacije, diferencijacije i upalnog odgovora. U pojedinim gastrointestinalnim tumorima, *FOSB* je povezan s progresijom bolesti ili promijenjenim izražajem u tumoru u odnosu na okolna tkiva, što podupire njegovu ulogu kao osjetljivog markera tumorskog mikrokruženja (387,388). Istodobno, studije na kolorektalnim stanicama pokazuju da *FOSB* regulira ekspresiju ciklooksigenaze 2, COX-2, bez izravne promjene prostaglandina PGE2, naglašavajući funkciju AP-1 u finoj modulaciji upalnih i proliferacijskih putova važnih za karcinogenezu (389). Imunosenescencija u gerijatrijskoj dobi dodatno mijenja sposobnost odgovora na tumore. AP-1 transkripcijski faktori ključni su regulatori funkcije citotoksičnih limfocita, T stanica i NK stanica, a njihova deregulacija u starijoj dobi doprinosi promijenjenom antitumorskom imunitetu. Preklapanje AP-1 mreže sa senescentnim programima potvrđeno je i u modelima stanične senescencije, gdje AP-1 oblikuje senescentni transkripcijski program i sudjeluje u održavanju senescentnog fenotipa, što je osobito važno u gerijatrijskih bolesnika s kroničnom sistemskom upalom povezanom sa starenjem (390). Pojačan izražaj *FOSB* u crvuljku starijih bolesnika s gastrointestinalnim tumorima u našoj analizi može odražavati zajednički učinak kronične upale niskog intenziteta, promijenjenog antitumorskog imuniteta, senescentnih i regeneracijskih odgovora u crijevnoj sluznici, što ukratko označava integrirani učinak polja karcinogeneze modulirane imunosenescencijom.

U našoj smo studiji pokazali da transkriptomске promjene povezane sa starenjem crvuljka odražavaju ključne procese obilježja starenja, potvrđujući ideju da se crvuljak može koristiti kao tkivni model za starenje crijeva. Uočili smo povećan izražaj gena uključenih u uklanjanje ROS-a, biljega *inflammaginga* i vezivnog remodeliranja, kao i smanjenje izražaja gena ključnih za funkciju crijevnog živčanog sustava i održavanje crijevne barijere, uključujući receptore neuroaktivnih liganada, ionske kanale i adhezijske molekule. Sprječavanje oksidacijskog oštećenja u crijevu tijekom starenja zahtijeva usklađenu potporu endogenih antioksidativnih sustava, jačanje integriteta mukozne barijere, očuvanje funkcije mitohondrija, te smanjenje kronične upale niskog stupnja karakteristične za starenje tkiva, ukupni učinak navedenoga ograničava nakupljanje ROS-a i štiti tkivo crijeva u starijoj dobi (115,386).

Provedena studija ima nekoliko ograničenja. Veličina uzorka je relativno mala i buduće studije većeg broja ispitanika biti će potrebne kako bi se provjerila i proširila ova saznanja. Dodatno, studija je prvenstveno opisna i oslanja se na profiliranje transkriptoma bez daljnje eksperimentalne potvrde. Stoga, daljnja istraživanja će biti potrebna kako bi se objasnila funkcionalna važnost naših rezultata. Proces i povezani sa starenjem probavnog sustava mogu se značajno razlikovati prema anatomske lokaciji, a crvuljak ne mora u potpunosti prikazati sve regionalne značajke starenja crijeva. U svrhu procjene prikladnosti crvuljka kao modela za pojedine mehanizme starenja u budućnosti bit će potrebno izraditi studije usporedbe procesa starenja na raznim dijelovima probave koje uključuju crvuljak. S obzirom da starenje predstavlja rizični faktor za razvoj bolesti, razumijevanje složenih mehanizama starenja koji dovode do disfunkcije probave može u budućnosti biti ključ za bolje i kvalitetnije liječenje bolesti starije dobi.

6. ZAKLJUČAK

1. Na temelju provedenog RNA-sekvenciranja i histološke analize na uzorcima tkiva morfološki nepromijenjenog crvuljka utvrđeno je da postoji jasna razlika u izražaju gena između inocentnih crvuljaka pedijatrijske, odrasle i gerijatrijske populacije, koja slijedi progresivan obrazac promjena u skladu s biološkim starenjem tkiva.
2. Tkivo crvuljka u gerijatrijskoj skupini pokazuje pojačan izražaj gena povezanih s oksidativnim stresom, procesima povezanim s metabolizmom kolesterola i održavanjem crijevne barijere uz istodobno smanjen izražaj gena uključenih u sinaptičku signalizaciju, neuronsku adheziju i integritet crijevnog živčanog sustava, čime se potvrđuju specifične transkriptomске razlike u odnosu na odraslu populaciju.
3. Identificiran je manji skup gena koji kodiraju proteine s postupnim promjenama izražaja kroz sve dobne skupine (pojačan izražaj *CLDN2*, *MUC2* i *GDF15*, smanjen izražaj *NOG* i *NELL2*), koji odražavaju slabljenje epitelne barijere, kroničnu upalnu aktivnost niskog stupnja (eng. *inflammaging*) i smanjeni regeneracijski potencijal, pri čemu su pojedine razlike izražene između gerijatrijske i pedijatrijske populacije, ali ne nužno u međusobnoj usporedbi s odraslom skupinom, što podupire treću hipotezu o dobno specifičnim obrascima.
4. Analiza obogaćenosti skupova gena (GSEA) pokazala je da starenje inocentnog crvuljka odražava ključne procese intestinalnog starenja: pojačanu oksidacijsku aktivnost, metaboličko remodeliranje (osobito metabolizam lipida i kolesterola), narušavanje funkcije crijevne barijere te aktivaciju imunskih i upalnih puteva u skladu s kroničnom upalom u starenju.
5. Analiza transkriptoma crvuljaka u populaciji pacijenata s tumorima gastrointestinalnog sustava u odnosu na one bez tumora ukazuje na dodatne pomake u izražaju u putovima vezanim uz imunski nadzor, metaboličku preraspodjelu i stanični stres, sugerirajući da crvuljak može odražavati sistemske promjene u neoplastičnim oboljenjima.
6. Analiza izražaja spolno vezanih gena otkrila je mali broj značajno diferencijalno izraženih gena, od kojih je većina vezana za Y kromosom, što očekivano govori o relativno malim razlikama u genskom izražaju između spolova.

7. Histološkom analizom utvrđeno je da gerijatrijski uzorci pokazuju veću učestalost fibrozne obliteracije vrška crvuljka i redukcije limfnih folikula u skladu sa dosadašnjim histomorfometrijskim radovima o degeneraciji limfnog tkiva tokom starenja, čime se morfološke promjene povezuju s transkriptomskim nalazima slabljenja stečene imunosti i kronične upale niskog stupnja.

7. SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU

Uvod: Starenje predstavlja složeni proces psihofizičkog propadanja, obilježen progresivnom staničnom i organskom disfunkcijom te nagomilavanjem DNA oštećenja koja dovode do promjena u izražaju gena. Starenjem tkiva prolaze kroz niz morfoloških i funkcionalnih promjena koje mogu narušiti funkciju i homeostazu tkiva, a probavni sustav nije iznimka u ovom procesu. Starenje probavnog sustava uključuje postupne promjene u strukturi i funkciji crijeva te sastavu crijevne mikrobiote, koje pridonose nastanku poremećaja homeostaze i povećanoj sklonosti kroničnim bolestima probavnog sustava. Crvuljak je dio crijeva bogat GALT-om i djeluje kao rezervoar crijevne mikrobiote. Dosadašnje histološke studije ukazale su na involuciju limfnog tkiva i fibroznu obliteraciju crvuljka u starijoj dobi, no transkriptomska podloga tih promjena nije dosada istražena (83,198).

Ciljevi: Cilj ovog istraživanja je utvrditi dobno ovisne razlike u izražaju gena, biološkim putevima te histološkim obilježjima morfološki normalnog crvuljka usporedbom uzoraka pedijatrijske, odrasle i gerijatrijske populacije. Dodatno, istraživanje je nastojalo procijeniti utjecaj spola i prisutnosti gastrointestinalnih tumora na promjene izražaja gena te povezati molekularne promjene sa histološkim znakovima starenja.

Materijali i metode: Naše istraživanje, temeljeno na morfološki normalnim uzorcima crvuljka, obuhvatilo je histološku analizu sa RNA sekvenciranjem na ukupnom uzorku tkiva kako bi se opisale promjene strukture i izražaja gena povezane sa starenjem. U studiju je uključeno ukupno 20 uzoraka podijeljenih u tri dobne skupine: pedijatrijsku (n=5), odraslu (n=8) i gerijatrijsku (n=7).

Rezultati: Histološkom analizom u uzorcima starije dobi zabilježena je veća učestalost redukcije limfnih folikula i pojava fibrozne obliteracije vrška crvuljka, što je u skladu s ranije opisanim involutivnim promjenama limfnog tkiva i remodeliranja vezivnog tkiva u starijoj životnoj dobi. Analizom ekspresije gena RNA sekvenciranjem identificirana su 1004 diferencijalno izražena gena između odraslih i gerijatrijskih ispitanika (385 pojačano i 619 smanjeno izraženih; $p < 0,05$). Pojačano izraženi funkcionalni putevi bili su uključeni u odgovor na oksidacijski stres, metabolizam kolesterola i održavanje mukozne barijere, uključujući ciljne gene transkripcijskog faktora NRF2 (*NQO1*, *MGST1*). Navedeni rezultati upućuju na kompenzatorno pojačanje antioksidativne aktivnosti u starijem crvuljku. Nasuprot tome, smanjeno izraženi geni bili su povezani sa sinaptičkim signaliziranjem, regulacijom ionskih kanala i neuronalnom adhezijom (*GRIA2*, *RET*, *NOS1*, *NCAM2*, *CNTN1*), što odražava dobno uvjetovano slabljenje funkcije crijevnog živčanog sustava. U sve tri dobne skupine izdvojeno je 25 gena koji kodiraju proteine s progresivnim promjenama izražaja tijekom starenja, pri čemu

su *CLDN2*, *MUC2* i *GDF15* pokazali pojačanje, a *NOG* i *NELL2* smanjenje izražaja. Takav obrazac upućuje na popuštanje epitelne barijere, trajnu upalnu aktivnost povezanu sa starenjem (eng. *inflammaging*) te smanjeni regenerativni potencijal tkiva, što je u skladu sa poznatim konceptima crijevnog starenja. Spolno vezane razlike u crvuljku analizirane su usporedbom između muških i ženskih uzoraka odrasle i gerijatrijske skupine. U ovoj analizi najznačajnije pojačano izraženi geni u muškaraca su očekivano važni Y kromosom vezani geni. Analiza transkriptoma crvuljka pacijenata s gastrointestinalnim tumorima u odnosu na pacijente bez tumora pokazala je statistički značajno pojačan izražaj gena *FOSB* što se objašnjava integriranim učinkom polja karcinogeneze moduliranog imunoseneskencijom u pacijenata s neoplastičnim oboljenjima.

Zaključak: Dobiveni rezultati pokazuju da crvuljak odražava ključne procese intestinalnog starenja poput oksidativnog stresa, kronične upalne aktivacije, narušene epitelne barijere i neurodegeneracije što dodatno podupire njegovu upotrebu kao modela za istraživanje mehanizama starenja crijeva na histološkoj i molekularnoj razini.

8. LAIČKI SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU

Starenje je prirodan proces tijekom kojeg tijelo postupno gubi svoju funkciju, a to se događa i u probavnom sustavu. S godinama dolazi do promjena u strukturi crijeva, sastavu bakterija u njima i načinu na koji stanice funkcioniraju. Crvuljak, mali dio crijeva bogat imunološkim tkivom, može poslužiti kao dobar model za proučavanje tih promjena jer ima važnu ulogu u obrani organizma i održavanju crijevne ravnoteže.

U ovom istraživanju analizirani su uzorci crvuljka ljudi različite dobi. Istraživanje je pokazalo da kod starijih osoba dolazi do smanjenja imunološkog tkiva i pojave ožiljkastih promjena u crvuljku. Na razini gena uočeno je da se s godinama pojačava aktivnost sustava koji štite stanice od stresa i oštećenja, što vjerojatno predstavlja pokušaj organizma da se obrani. Istodobno, smanjuje se aktivnost gena povezanih s funkcijom živčanog sustava crijeva, što može utjecati na rad crijeva.

Istraživanjem su također identificirani geni koji se postupno mijenjaju s dobi, a koji upućuju na slabljenje zaštitne barijere crijeva, prisutnost blage kronične upale i smanjene sposobnosti obnove tkiva. Rezultati ukazuju da crvuljak odražava ključne promjene povezane sa starenjem crijeva te može biti koristan model za daljnja istraživanja procesa starenja i bolesti probavnog sustava.

9. SUMMARY

Title: Age-Related Transcriptomic Changes in the Vermiform Appendix

Introduction: Aging is a complex process of psychophysical decline characterized by progressive cellular and organ dysfunction, as well as the accumulation of DNA damage leading to alterations in gene expression. During aging, tissues undergo a range of morphological and functional changes that may impair tissue function and homeostasis, and the gastrointestinal system is not an exception. Aging of the gastrointestinal tract involves gradual changes in intestinal structure and function, as well as in the composition of the gut microbiota, contributing to disrupted homeostasis and increased susceptibility to chronic gastrointestinal diseases. The appendix is a part of the intestine rich in gut-associated lymphoid tissue (GALT) and functions as a reservoir of the gut microbiota. Previous histological studies have demonstrated involution of lymphoid tissue and fibrous obliteration of the appendix with advancing age; however, the transcriptomic basis of these changes has not yet been investigated (83,198).

Objectives: This study aimed to determine age-related differences in gene expression, biological pathways, and histological features of the morphologically normal appendix by comparing paediatric, adult, and geriatric populations. Furthermore, the study aimed to evaluate the impact of sex and the existence of gastrointestinal tumours on the transcriptomic profile, as well as to correlate molecular alterations with histological ageing features.

Materials and Methods: This study analyzed morphologically normal appendix samples by combining histological examination with bulk RNA sequencing to understand age-related structural and gene expression changes. A total of 20 samples were collected and categorized into three age groups: paediatric (n=5), adult (n=8), and geriatric (n=7).

Results: Histological analysis of older samples revealed a higher frequency of lymphoid follicle reduction and fibrous obliteration of the appendiceal tip, consistent with previously described involutional changes in lymphoid tissue and connective tissue remodelling in older age. Gene expression analysis identified 1004 differentially expressed genes between adult and geriatric subjects (385 upregulated and 619 downregulated; $p < 0.05$). Upregulated pathways were involved in oxidative stress response, cholesterol metabolism, and maintenance of the mucosal barrier, including NRF2 target genes (*NQO1*, *MGST1*), suggesting a compensatory increase in antioxidant activity in the aged appendix. In contrast, downregulated genes were associated with synaptic signalling, ion channel regulation, and neuronal adhesion (*GRIA2*, *RET*, *NOS1*, *NCAM2*, *CNTN1*), indicating an age-related decline in enteric nervous system

function. Across all age groups, 25 genes with progressive age-related expression changes were identified; *CLDN2*, *MUC2*, and *GDF15* were upregulated, while *NOG* and *NELL2* were downregulated. This pattern suggests epithelial barrier dysfunction, inflammaging, and reduced regenerative capacity. Sex-related differences showed the expected upregulation of Y chromosome-linked genes in males. The analysis of the appendiceal transcriptome in patients with gastrointestinal tumours compared with tumour-free patients showed a statistically significant upregulation of *FOSB*, which can be explained by the integrated effect of field cancerisation modulated by immunosenescence in patients with neoplastic disease.

Conclusion: The findings suggest that the appendix mirrors essential aspects of intestinal aging, such as oxidative stress, chronic inflammation, compromised epithelial barrier integrity, and neurodegeneration. This supports its suitability as a model for investigating intestinal aging through histological and molecular approaches.

10. LAY SUMMARY

Aging is a natural process in which the body gradually loses function, and this also occurs in the digestive system. Over time, changes occur in the structure of the intestines, the composition of gut bacteria, and the way cells function. The appendix, a small part of the intestine rich in immune tissue, can serve as a useful model for studying these changes because it plays an important role in immune defence and in maintaining intestinal balance.

In this study, appendiceal samples from individuals of different ages were analysed. The results showed that older individuals exhibit reduced immune tissue and fibrotic (scar-like) changes in the appendix. At the gene level, ageing was associated with increased activity of systems that protect cells from stress and damage, likely reflecting a compensatory defence mechanism. At the same time, the activity of genes related to the function of the intestinal nervous system decreased, which may affect gut function. Additionally, genes that change progressively with age were identified, indicating a weakened intestinal barrier, mild chronic inflammation, and a reduced capacity for tissue regeneration. These findings suggest that the appendix reflects key changes associated with intestinal ageing and may serve as a valuable model for further research into ageing processes and gastrointestinal diseases.

11. LITERATURA

1. Niccoli T, Partridge L. Ageing as a Risk Factor for Disease. *Current Biology*. 2012.;22(17):R741–52. doi:10.1016/j.cub.2012.07.024
2. Newman AB, Odden MC, Cauley JA. Epidemiology of Aging. U: *Handbook of Epidemiology* [Internet]. Springer, New York, NY; 2023 [citirano 24. veljača 2026.]. str. 1–37. Dostupno na: https://link.springer.com/rwe/10.1007/978-1-4614-6625-3_79-1 doi:10.1007/978-1-4614-6625-3_79-1
3. Northrop JH. THE INFLUENCE OF THE INTENSITY OF LIGHT ON THE RATE OF GROWTH AND DURATION OF LIFE OF DROSOPHILA . *Journal of General Physiology*. 20. rujan 1925.;9(1):81–6. doi:10.1085/jgp.9.1.81
4. McCay CM, Maynard LA, Sperling G, Barnes LL. Retarded Growth, Life Span, Ultimate Body Size and Age Changes in the Albino Rat after Feeding Diets Restricted in Calories. *Nutrition Reviews*. 01. kolovoz 1975.;33(8):241–3. doi:10.1111/j.1753-4887.1975.tb05227.x
5. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol. srpanj* 1956.;11(3):298–300. doi:10.1093/geronj/11.3.298 PubMed PMID: 13332224.
6. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*. 1961.;25(3):585–621. doi:[https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)
7. Olovnikov AM. A theory of marginotomy: The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *Journal of Theoretical Biology*. 1973.;41(1):181–90. doi:[https://doi.org/10.1016/0022-5193\(73\)90198-7](https://doi.org/10.1016/0022-5193(73)90198-7)
8. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*. 1990.;345(6274):458–60. doi:10.1038/345458a0
9. Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai E V, Futcher AB, i sur. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Sv. 89*. 1992.;89(November):10114–8.
10. Levy Z, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. Telomere End-replication Problem and Cell Aging. 1992.;951–60.
11. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell. prosinac* 1985.;43(2 Pt 1):405–13. doi:10.1016/0092-8674(85)90170-9 PubMed PMID: 3907856.
12. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, i sur. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 23. prosinac 1994.;266(5193):2011–5. doi:10.1126/science.7605428 PubMed PMID: 7605428.
13. Corey DR. Telomeres and Telomerase: From Discovery to Clinical Trials. *Chem Biol*. 24. prosinac 2009.;16(12):1219–23. doi:10.1016/j.chembiol.2009.12.001 PubMed PMID: 20064431; PubMed Central PMCID: PMC2810624.

14. Friedman DB, Johnson TE. A Mutation in the Age-1 Gene in *Caenorhabditis Elegans* Lengthens Life and Reduces Hermaphrodite Fertility. *Genetics*. siječanj 1988.;118(1):75–86. doi:10.1093/genetics/118.1.75 PubMed PMID: 8608934; PubMed Central PMCID: PMC1203268.
15. Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature*. 02. prosinac 1993.;366(6454):461–4. doi:10.1038/366461a0 PubMed PMID: 8247153.
16. Panwar V, Singh A, Bhatt M, Tonk RK, Azizov S, Raza AS, i sur. Multifaceted role of mTOR (mammalian target of rapamycin) signaling pathway in human health and disease. *Sig Transduct Target Ther*. 02. listopad 2023.;8(1):375. doi:10.1038/s41392-023-01608-z
17. Mannick JB, Del Giudice G, Lattanzi M, Valiante NM, Praestgaard J, Huang B, i sur. mTOR inhibition improves immune function in the elderly. *Sci Transl Med*. 24. prosinac 2014.;6(268):268ra179. doi:10.1126/scitranslmed.3009892 PubMed PMID: 25540326.
18. Selvarani R, Mohammed S, Richardson A. Effect of rapamycin on aging and age-related diseases-past and future. *Geroscience*. lipanj 2021.;43(3):1135–58. doi:10.1007/s11357-020-00274-1 PubMed PMID: 33037985; PubMed Central PMCID: PMC8190242.
19. Kaeberlein M, Galvan V. Rapamycin and Alzheimer's disease: Time for a clinical trial? *Sci Transl Med*. 23. siječanj 2019.;11(476):eaar4289. doi:10.1126/scitranslmed.aar4289 PubMed PMID: 30674654; PubMed Central PMCID: PMC6762017.
20. Kaeberlein M, Kirkland KT, Fields S, Kennedy BK. Sir2-Independent Life Span Extension by Calorie Restriction in Yeast. *PLOS Biology*. kol 2004.;2(9):e296. doi:10.1371/journal.pbio.0020296
21. Wu QJ, Zhang TN, Chen HH, Yu XF, Lv JL, Liu YY, i sur. The sirtuin family in health and disease. *Signal Transduct Target Ther*. 29. prosinac 2022.;7:402. doi:10.1038/s41392-022-01257-8 PubMed PMID: 36581622; PubMed Central PMCID: PMC9797940.
22. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 06. lipanj 2013.;153(6):1194–217. doi:10.1016/j.cell.2013.05.039 PubMed PMID: 23746838; PubMed Central PMCID: PMC3836174.
23. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*. 19. siječanj 2023.;186(2):243–78. doi:10.1016/j.cell.2022.11.001
24. Cagan A, Baez-Ortega A, Brzozowska N, Abascal F, Coorens THH, Sanders MA, i sur. Somatic mutation rates scale with lifespan across mammals. *Nature*. travanj 2022.;604(7906):517–24. doi:10.1038/s41586-022-04618-z PubMed PMID: 35418684; PubMed Central PMCID: PMC9021023.
25. Vijg J, Dong X. Pathogenic Mechanisms of Somatic Mutation and Genome Mosaicism in Aging. *Cell*. 09. srpanj 2020.;182(1):12–23. doi:10.1016/j.cell.2020.06.024 PubMed PMID: 32649873.

26. Cisneros B, García-Aguirre I, De Ita M, Arrieta-Cruz I, Rosas-Vargas H. Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: Cellular Mechanisms and Therapeutic Perspectives. *Arch Med Res.* srpanj 2023.;54(5):102837. doi:10.1016/j.arcmed.2023.06.002 PubMed PMID: 37390702.
27. von Zglinicki T, Saretzki G, Ladhoff J, d'Adda di Fagagna F, Jackson SP. Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech Ageing Dev.* siječanj 2005.;126(1):111–7. doi:10.1016/j.mad.2004.09.034 PubMed PMID: 15610769.
28. Shay JW. Role of Telomeres and Telomerase in Aging and Cancer. *Cancer Discov.* lipanj 2016.;6(6):584–93. doi:10.1158/2159-8290.CD-16-0062 PubMed PMID: 27029895; PubMed Central PMCID: PMC4893918.
29. Hiyama E, Hiyama K. Telomere and telomerase in stem cells. *Br J Cancer.* travanj 2007.;96(7):1020–4. doi:10.1038/sj.bjc.6603671
30. Armanios M. Syndromes of Telomere Shortening. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2009.;10:45. doi:10.1146/annurev-genom-082908-150046 PubMed PMID: 19405848; PubMed Central PMCID: PMC2818564.
31. Xiao FH, Wang HT, Kong QP. Dynamic DNA Methylation During Aging: A “Prophet” of Age-Related Outcomes. *Front Genet.* 18. veljača 2019.;10. doi:10.3389/fgene.2019.00107
32. Jeong S, Cho S, Yang SK, Oh SA, Kang YK. Parallel shift of DNA methylation and gene expression toward the mean in mouse spleen with aging. *Aging.* 25. srpanj 2023.;15(14):6690–709. doi:10.18632/aging.204903 PubMed PMID: 37494662.
33. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* 2013.;14(10):R115. doi:10.1186/gb-2013-14-10-r115 PubMed PMID: 24138928; PubMed Central PMCID: PMC4015143.
34. Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sadda S, i sur. Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Mol Cell.* 24. siječanj 2013.;49(2):359–67. doi:10.1016/j.molcel.2012.10.016 PubMed PMID: 23177740; PubMed Central PMCID: PMC3780611.
35. Levine ME, Lu AT, Quach A, Chen BH, Assimes TL, Bandinelli S, i sur. An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan. *Aging (Albany NY).* 18. travanj 2018.;10(4):573–91. doi:10.18632/aging.101414 PubMed PMID: 29676998; PubMed Central PMCID: PMC5940111.
36. Lu AT, Quach A, Wilson JG, Reiner AP, Aviv A, Raj K, i sur. DNA methylation GrimAge strongly predicts lifespan and healthspan. *Aging (Albany NY).* 21. siječanj 2019.;11(2):303–27. doi:10.18632/aging.101684 PubMed PMID: 30669119; PubMed Central PMCID: PMC6366976.
37. Hooten NN, Fitzpatrick M, Wood WH, De S, Ejioogu N, Zhang Y, i sur. Age-related changes in microRNA levels in serum. *Aging (Albany NY).* 27. rujun 2013.;5(10):725–40. doi:10.18632/aging.100603 PubMed PMID: 24088671; PubMed Central PMCID: PMC3838776.

38. Yoo JK, Kim CH, Jung HY, Lee DR, Kim JK. Discovery and characterization of miRNA during cellular senescence in bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Exp Gerontol.* listopad 2014.;58:139–45. doi:10.1016/j.exger.2014.07.020 PubMed PMID: 25087724.
39. García-Cao M, O’Sullivan R, Peters AHFM, Jenuwein T, Blasco MA. Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. *Nat Genet.* siječanj 2004.;36(1):94–9. doi:10.1038/ng1278 PubMed PMID: 14702045.
40. Czaja W, Bessalov VA, Hinz JM, Smerdon MJ. Proficient repair in chromatin remodeling defective *ino80* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* highlights replication defects as the main contributor to DNA damage sensitivity. *DNA Repair (Amst).* 04. rujun 2010.;9(9):976–84. doi:10.1016/j.dnarep.2010.06.010 PubMed PMID: 20674516; PubMed Central PMCID: PMC2929300.
41. De Cecco M, Ito T, Petrashen AP, Elias AE, Skvir NJ, Criscione SW, i sur. L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation. *Nature.* veljača 2019.;566(7742):73–8. doi:10.1038/s41586-018-0784-9 PubMed PMID: 30728521; PubMed Central PMCID: PMC6519963.
42. Hernando-Herraez I, Evano B, Stubbs T, Commere PH, Jan Bonder M, Clark S, i sur. Ageing affects DNA methylation drift and transcriptional cell-to-cell variability in mouse muscle stem cells. *Nat Commun.* 25. rujun 2019.;10(1):4361. doi:10.1038/s41467-019-12293-4
43. Garofalo M, Pandini C, Bordoni M, Pansarasa O, Rey F, Costa A, i sur. Alzheimer’s, Parkinson’s Disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis Gene Expression Patterns Divergence Reveals Different Grade of RNA Metabolism Involvement. *Int J Mol Sci.* 14. prosinac 2020.;21(24):9500. doi:10.3390/ijms21249500 PubMed PMID: 33327559; PubMed Central PMCID: PMC7765024.
44. Ben-Zvi A, Miller EA, Morimoto RI. Collapse of proteostasis represents an early molecular event in *Caenorhabditis elegans* aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* rujun 2009.;106(35):14914–9. doi:10.1073/pnas.0902882106
45. Lipinski MM, Zheng B, Lu T, Yan Z, Py BF, Ng A, i sur. Genome-wide analysis reveals mechanisms modulating autophagy in normal brain aging and in Alzheimer’s disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 10. kolovoz 2010.;107(32):14164–9. doi:10.1073/pnas.1009485107
46. Shibata M, Lu T, Furuya T, Degterev A, Mizushima N, Yoshimori T, i sur. Regulation of intracellular accumulation of mutant Huntingtin by Beclin 1. *J Biol Chem.* 19. svibanj 2006.;281(20):14474–85. doi:10.1074/jbc.M600364200 PubMed PMID: 16522639.
47. Pyo JO, Yoo SM, Ahn HH, Nah J, Hong SH, Kam TI, i sur. Overexpression of Atg5 in mice activates autophagy and extends lifespan. *Nat Commun.* 2013.;4:2300. doi:10.1038/ncomms3300 PubMed PMID: 23939249; PubMed Central PMCID: PMC3753544.

48. Bettendi L, Foukas LC. Growth factor, energy and nutrient sensing signalling pathways in metabolic ageing. *Biogerontology*. 2017.;18(6):913–29. doi:10.1007/s10522-017-9724-6 PubMed PMID: 28795262; PubMed Central PMCID: PMC5684302.
49. Frankum R, Jameson TSO, Knight BA, Stephens FB, Wall BT, Donlon TA, i sur. Extreme longevity variants at the FOXO3 locus may moderate FOXO3 isoform levels. *GeroScience*. 26. kolovoz 2021.;44(2):1129–40. doi:10.1007/s11357-021-00431-0 PubMed PMID: 34436732; PubMed Central PMCID: PMC9135902.
50. Chen R, Morris BJ, Donlon TA, Masaki KH, Willcox DC, Davy PMC, i sur. FOXO3 longevity genotype mitigates the increased mortality risk in men with a cardiometabolic disease. *Aging (Albany NY)*. 01. prosinac 2020.;12(23):23509–24. doi:10.18632/aging.202175 PubMed PMID: 33260156; PubMed Central PMCID: PMC7762472.
51. Mattison JA, Colman RJ, Beasley TM, Allison DB, Kemnitz JW, Roth GS, i sur. Caloric restriction improves health and survival of rhesus monkeys. *Nat Commun*. 17. siječanj 2017.;8(1):14063. doi:10.1038/ncomms14063
52. Dorling JL, van Vliet S, Huffman KM, Kraus WE, Bhapkar M, Pieper CF, i sur. Effects of caloric restriction on human physiological, psychological, and behavioral outcomes: highlights from CALERIE phase 2. *Nutr Rev*. 17. rujan 2020.;79(1):98–113. doi:10.1093/nutrit/nuaa085 PubMed PMID: 32940695; PubMed Central PMCID: PMC7727025.
53. Waziry R, Ryan CP, Corcoran DL, Huffman KM, Kobor MS, Kothari M, i sur. Effect of long-term caloric restriction on DNA methylation measures of biological aging in healthy adults from the CALERIE trial. *Nat Aging*. 2023.;3(3):248–57. doi:10.1038/s43587-022-00357-y PubMed PMID: 37118425; PubMed Central PMCID: PMC10148951.
54. Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, i sur. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*. 27. svibanj 2004.;429(6990):417–23. doi:10.1038/nature02517 PubMed PMID: 15164064.
55. Tocchi A, Quarles EK, Basisty N, Gitari L, Rabinovitch PS. Mitochondrial dysfunction in cardiac aging. *Biochim Biophys Acta*. studeni 2015.;1847(11):1424–33. doi:10.1016/j.bbabo.2015.07.009 PubMed PMID: 26191650; PubMed Central PMCID: PMC4575872.
56. Ryan BJ, Hoek S, Fon EA, Wade-Martins R. Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's: from familial to sporadic disease. *Trends Biochem Sci*. travanj 2015.;40(4):200–10. doi:10.1016/j.tibs.2015.02.003 PubMed PMID: 25757399.
57. Lowell BB, Shulman GI. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science*. 21. siječanj 2005.;307(5708):384–7. doi:10.1126/science.1104343 PubMed PMID: 15662004.
58. Li QOY, Soro-Arnaiz I, Aragonés J. Age-dependent obesity and mitochondrial dysfunction. *Adipocyte*. 03. travanj 2017.;6(2):161–6.

doi:10.1080/21623945.2017.1297346 PubMed PMID: 28425849; PubMed Central PMCID: PMC5477719.

59. Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, Bennett DC, Bischof O, Bishop C, i sur. Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*. 31. listopad 2019.;179(4):813–27. doi:10.1016/j.cell.2019.10.005 PubMed PMID: 31675495.
60. Tuttle CSL, Waaijer MEC, Slee-Valentijn MS, Stijnen T, Westendorp R, Maier AB. Cellular senescence and chronological age in various human tissues: A systematic review and meta-analysis. *Aging Cell*. veljača 2020.;19(2):e13083. doi:10.1111/accel.13083 PubMed PMID: 31808308; PubMed Central PMCID: PMC6996941.
61. Storer M, Mas A, Robert-Moreno A, Pecoraro M, Ortells MC, Di Giacomo V, i sur. Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell*. 21. studeni 2013.;155(5):1119–30. doi:10.1016/j.cell.2013.10.041 PubMed PMID: 24238961.
62. Baker DJ, Wijshake T, Tchkonian T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, i sur. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*. 02. studeni 2011.;479(7372):232–6. doi:10.1038/nature10600 PubMed PMID: 22048312; PubMed Central PMCID: PMC3468323.
63. Murata K, Jadhav U, Madha S, van Es J, Dean J, Cavazza A, i sur. Ascl2-Dependent Cell Dedifferentiation Drives Regeneration of Ablated Intestinal Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 05. ožujak 2020.;26(3):377-390.e6. doi:10.1016/j.stem.2019.12.011 PubMed PMID: 32084390; PubMed Central PMCID: PMC7147146.
64. Lin B, Coleman JH, Peterson JN, Zunitch MJ, Jang W, Herrick DB, i sur. Injury Induces Endogenous Reprogramming and Dedifferentiation of Neuronal Progenitors to Multipotency. *Cell Stem Cell*. 07. prosinac 2017.;21(6):761-774.e5. doi:10.1016/j.stem.2017.09.008 PubMed PMID: 29174332; PubMed Central PMCID: PMC5722700.
65. Tata PR, Rajagopal J. Plasticity in the lung: making and breaking cell identity. *Development*. 01. ožujak 2017.;144(5):755–66. doi:10.1242/dev.143784 PubMed PMID: 28246210; PubMed Central PMCID: PMC5374348.
66. Chen Y, Lüttmann FF, Schoger E, Schöler HR, Zelarayán LC, Kim KP, i sur. Reversible reprogramming of cardiomyocytes to a fetal state drives heart regeneration in mice. *Science*. 24. rujun 2021.;373(6562):1537–40. doi:10.1126/science.abg5159 PubMed PMID: 34554778.
67. Hishida T, Yamamoto M, Hishida-Nozaki Y, Shao C, Huang L, Wang C, i sur. In vivo partial cellular reprogramming enhances liver plasticity and regeneration. *Cell Rep*. 26. travanj 2022.;39(4):110730. doi:10.1016/j.celrep.2022.110730 PubMed PMID: 35476977; PubMed Central PMCID: PMC9807246.
68. Larson A, Codden CJ, Huggins GS, Rastegar H, Chen FY, Maron BJ, i sur. Altered intercellular communication and extracellular matrix signaling as a potential disease mechanism in human hypertrophic cardiomyopathy. *Sci Rep*. 25. ožujak 2022.;12(1):5211. doi:10.1038/s41598-022-08561-x

69. Huang M, Xu L, Liu J, Huang P, Tan Y, Chen S. Cell–Cell Communication Alterations via Intercellular Signaling Pathways in Substantia Nigra of Parkinson’s Disease. *Front Aging Neurosci.* 25. veljača 2022.;14. doi:10.3389/fnagi.2022.828457
70. Nedachi T, Bonod C, Rorteau J, Chinoune W, Ishiuchi Y, Hughes S, i sur. Chronological aging impacts abundance, function and microRNA content of extracellular vesicles produced by human epidermal keratinocytes. *Aging (Albany NY).* 27. studeni 2023.;15(22):12702–22. doi:10.18632/aging.205245 PubMed PMID: 38015712; PubMed Central PMCID: PMC10713413.
71. Puzianowska-Kuźnicka M, Owczarz M, Wieczorowska-Tobis K, Nadrowski P, Chudek J, Slusarczyk P, i sur. Interleukin-6 and C-reactive protein, successful aging, and mortality: the PolSenior study. *Immun Ageing.* 2016.;13:21. doi:10.1186/s12979-016-0076-x PubMed PMID: 27274758; PubMed Central PMCID: PMC4891873.
72. Wyczalkowska-Tomasik A, Czarkowska-Paczek B, Zielenkiewicz M, Paczek L. Inflammatory Markers Change with Age, but do not Fall Beyond Reported Normal Ranges. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2016.;64:249–54. doi:10.1007/s00005-015-0357-7 PubMed PMID: 26283530; PubMed Central PMCID: PMC4863028.
73. Gewurz D, Zhou G, Endo Y, Sinha I, Gaziano JM, Sesso HD, i sur. Inflammation, Frailty, and Aspirin Use in the Physicians’ Health Study: A Pilot Study. *J Frailty Aging.* 2024.;13(4):582–5. doi:10.14283/jfa.2024.37 PubMed PMID: 39574285; PubMed Central PMCID: PMC11588030.
74. Wang T, Shi Z, Ren H, Xu M, Lu J, Yang F, i sur. Divergent age-associated and metabolism-associated gut microbiome signatures modulate cardiovascular disease risk. *Nat Med.* lipanj 2024.;30(6):1722–31. doi:10.1038/s41591-024-03038-y PubMed PMID: 38844795.
75. Jeffery IB, Lynch DB, O’Toole PW. Composition and temporal stability of the gut microbiota in older persons. *ISME J.* siječanj 2016.;10(1):170–82. doi:10.1038/ismej.2015.88
76. Ye H, Ghosh TS, Hueston CM, Vlckova K, Golubeva AV, Hyland NP, i sur. Engraftment of aging-related human gut microbiota and the effect of a seven-species consortium in a pre-clinical model. *Gut Microbes.* 18. prosinac 2023.;15(2):2282796. doi:10.1080/19490976.2023.2282796 PubMed PMID: 38010168.
77. Nood E van, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, Vos WM de, i sur. Duodenal Infusion of Donor Feces for Recurrent *Clostridium difficile*. *New England Journal of Medicine.* 31. siječanj 2013.;368(5):407–15. doi:10.1056/NEJMoa1205037
78. Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, i sur. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci.* lipanj 2000.;908:244–54. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x PubMed PMID: 10911963.
79. Karpuzoglu E, Holladay SD, Gogal RM. Inflammaging: triggers, molecular mechanisms, immunological consequences, sex differences, and cutaneous manifestations. *Front Immunol.* 05. prosinac 2025.;16. doi:10.3389/fimmu.2025.1704203

80. Roukens AH, Soonawala D, Joosten SA, de Visser AW, Jiang X, Dirksen K, i sur. Elderly subjects have a delayed antibody response and prolonged viraemia following yellow fever vaccination: a prospective controlled cohort study. *PLoS One*. 2011.;6(12):e27753. doi:10.1371/journal.pone.0027753 PubMed PMID: 22163273; PubMed Central PMCID: PMC3233541.
81. Lefebvre JS, Masters AR, Hopkins JW, Haynes L. Age-related impairment of humoral response to influenza is associated with changes in antigen specific T follicular helper cell responses. *Sci Rep*. 25. travanj 2016.;6:25051. doi:10.1038/srep25051 PubMed PMID: 27109638; PubMed Central PMCID: PMC4842996.
82. Aminova GG. [Structure and cytoarchitectonic of the lymphoid tissue of the Appendix of man in elderly and senile ages.]. *Adv Gerontol*. 2018.;31(2):273–9. PubMed PMID: 30080336.
83. Takeuchi T. Factors Involved in the Degeneration of Lymphoid Tissue in the Appendix. *The Kurume Medical Journal*. 2018.;65(4):123–7. doi:10.2739/kurumemedj.MS654006
84. Sumi SA, Khalil M, Naznin RA, Bose SK, Tripti DJ. Histomorphological Study of the Number and Location of Lymphoid Follicles in the Vermiform Appendix among Bangladeshi People of Various Ages and Genders. *Mymensingh Med J. travanj* 2025.;34(2):388–94. PubMed PMID: 40160055.
85. Ferrucci L, Fabbri E. Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nat Rev Cardiol*. rujan 2018.;15(9):505–22. doi:10.1038/s41569-018-0064-2 PubMed PMID: 30065258; PubMed Central PMCID: PMC6146930.
86. Yamashiro K, Tanaka R, Urabe T, Ueno Y, Yamashiro Y, Nomoto K, i sur. Gut dysbiosis is associated with metabolism and systemic inflammation in patients with ischemic stroke. *PLOS ONE*. velj 2017.;12(2):e0171521. doi:10.1371/journal.pone.0171521
87. Zhao Y, Wang B, Wei X, Liu D, Wang R, Xie S, i sur. Impact of gut microbiota dysbiosis on intestinal barrier integrity and systemic inflammation in a pre-eclampsia mouse model. *Microb Pathog. prosinac* 2025.;209:108053. doi:10.1016/j.micpath.2025.108053 PubMed PMID: 40975229.
88. Karpuzoglu E, Holladay SD, Gogal RM. Inflammaging: triggers, molecular mechanisms, immunological consequences, sex differences, and cutaneous manifestations. *Front Immunol*. 16:1704203. doi:10.3389/fimmu.2025.1704203 PubMed PMID: 41425557; PubMed Central PMCID: PMC12714610.
89. Mccay CM, Pope F, Lunsford W, Sperling G, Sambhavaphol P. Parabiosis between Old and Young Rats. *Gerontology*. 1957.;1(1):7–17. doi:10.1159/000210677
90. Finerty JC, Binhammer R, Schneider M. Protection of irradiated rats by parabiosis. *Tex Rep Biol Med*. 1952.;10(3):496–500. PubMed PMID: 12984326.
91. Hall CE, Hall O, Nevis AH. Prolongation of survival by parabiosis in strain 129 dystrophic mice. *Am J Physiol*. siječanj 1959.;196(1):110–2. doi:10.1152/ajplegacy.1958.196.1.110 PubMed PMID: 13617446.

92. Ludwig FC, Elashoff RM. Mortality in Syngeneic Rat Parabionts of Different Chronological Age. *Transactions of the New York Academy of Sciences*. 1972.;34(7 Series II):582–7. doi:10.1111/j.2164-0947.1972.tb02712.x
93. Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, Girma ER, Weissman IL, Rando TA. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature*. 17. veljača 2005.;433(7027):760–4. doi:10.1038/nature03260 PubMed PMID: 15716955.
94. Ximerakis M, Holton KM, Giadone RM, Ozek C, Saxena M, Santiago S, i sur. Heterochronic parabiosis reprograms the mouse brain transcriptome by shifting aging signatures in multiple cell types. *Nat Aging*. ožujak 2023.;3(3):327–45. doi:10.1038/s43587-023-00373-6
95. Zhang B. BIOLOGICAL AGE REDUCTION AND LIFESPAN EXTENSION UPON YOUTHFUL CIRCULATION EXPOSURE. *Innov Aging*. 21. prosinac 2023.;7(Suppl 1):593. doi:10.1093/geroni/igad104.1942 PubMed PMID: null; PubMed Central PMCID: PMC10737889.
96. Loffredo FS, Steinhauser ML, Jay SM, Gannon J, Pancoast JR, Yalamanchi P, i sur. Growth Differentiation Factor 11 is a Circulating Factor that Reverses Age-Related Cardiac Hypertrophy. *Cell*. 09. svibanj 2013.;153(4):828–39. doi:10.1016/j.cell.2013.04.015 PubMed PMID: 23663781; PubMed Central PMCID: PMC3677132.
97. Kang JS, Yang YR. Circulating plasma factors involved in rejuvenation. *Aging*. 16. studeni 2020.;12(22):23394–408. doi:10.18632/aging.103933 PubMed PMID: 33197235.
98. Mehdipour M, Skinner C, Wong N, Lieb M, Liu C, Etienne J, i sur. Rejuvenation of three germ layers tissues by exchanging old blood plasma with saline-albumin. *Aging*. 30. svibanj 2020.;12(10):8790–819. doi:10.18632/aging.103418 PubMed PMID: 32474458.
99. Fuentealba M, Kiproff D, Schneider K, Mu WC, Kumaar PA, Kasler H, i sur. Multi-Omics Analysis Reveals Biomarkers That Contribute to Biological Age Rejuvenation in Response to Single-Blinded Randomized Placebo-Controlled Therapeutic Plasma Exchange. *Aging Cell*. kolovoz 2025.;24(8):e70103. doi:10.1111/ace.70103 PubMed PMID: 40424097; PubMed Central PMCID: PMC12341816.
100. Kim D, Kiproff DD, Luellen C, Lieb M, Liu C, Watanabe E, i sur. Old plasma dilution reduces human biological age: a clinical study. *GeroScience*. 24. kolovoz 2022.;44(6):2701–20. doi:10.1007/s11357-022-00645-w PubMed PMID: 35999337; PubMed Central PMCID: PMC9398900.
101. Nie C, Li Y, Li R, Yan Y, Zhang D, Li T, i sur. Distinct biological ages of organs and systems identified from a multi-omics study. *Cell Reports*. 08. ožujak 2022.;38(10). doi:10.1016/j.celrep.2022.110459 PubMed PMID: 35263580.
102. Dumić I, Nordin T, Jecmenica M, Stojković Lalosević M, Milosavljević T, Milovanović T. Gastrointestinal Tract Disorders in Older Age. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 17.

- siječanj 2019.;2019:6757524. doi:10.1155/2019/6757524 PubMed PMID: 30792972; PubMed Central PMCID: PMC6354172.
103. Zhang B, Gong J, Zhang W, Xiao R, Liu J, Xu XZS. Brain-gut communications via distinct neuroendocrine signals bidirectionally regulate longevity in *C. elegans*. *Genes Dev.* 01. veljača 2018.;32(3–4):258–70. doi:10.1101/gad.309625.117 PubMed PMID: 29491136; PubMed Central PMCID: PMC5859967.
 104. McGee MD, Weber D, Day N, Vitelli C, Crippen D, Herndon LA, i sur. Loss of intestinal nuclei and intestinal integrity in aging *C. elegans*. *Aging Cell.* kolovoz 2011.;10(4):699–710. doi:10.1111/j.1474-9726.2011.00713.x PubMed PMID: 21501374; PubMed Central PMCID: PMC3135675.
 105. Höhn P, Gabbert H, Wagner R. Differentiation and aging of the rat intestinal mucosa. II. Morphological, enzyme histochemical and disc electrophoretic aspects of the aging of the small intestinal mucosa. *Mech Ageing Dev.* ožujak 1978.;7(3):217–26. doi:10.1016/0047-6374(78)90068-4 PubMed PMID: 621972.
 106. Hassan ZA, Zauszkiewicz-Pawlak A, Abdelrahman SA, Algaidi S, Desouky M, Shalaby SM. Morphological alterations in the jejunal mucosa of aged rats and the possible protective role of green tea. *Folia Histochem Cytobiol.* 2017.;55(3):124–39. doi:10.5603/FHC.a2017.0012 PubMed PMID: 28813122.
 107. Nalapareddy K, Zheng Y, Geiger H. Aging of intestinal stem cells. *Stem Cell Reports.* 2022.;17(4):734–40. doi:10.1016/j.stemcr.2022.02.003 PubMed PMID: 35276089.
 108. Lipski PS, Bennett MK, Kelly PJ, James OF. Ageing and duodenal morphometry. *J Clin Pathol.* svibanj 1992.;45(5):450–2. doi:10.1136/jcp.45.5.450 PubMed PMID: 1597527; PubMed Central PMCID: PMC495315.
 109. Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Luinetti O, Rossi M, Cifone MG, Corazza GR. Small bowel enterocyte apoptosis and proliferation are increased in the elderly. *Gerontology.* 2002.;48(4):204–8. doi:10.1159/000058351 PubMed PMID: 12053108.
 110. Baidoo N, De Rasis E, Tahiri D, Sanger GJ. The impact of ageing on the structural compositions of the mucosa of human colon. *Tissue and Cell.* 01. prosinac 2025.;97:103090. doi:10.1016/j.tice.2025.103090
 111. Ren W ying, Wu K fen, Li X, Luo M, Liu H chun, Zhang S cai, i sur. Age-related changes in small intestinal mucosa epithelium architecture and epithelial tight junction in rat models. *Aging Clin Exp Res.* travanj 2014.;26(2):183–91. doi:10.1007/s40520-013-0148-0 PubMed PMID: 24243034.
 112. Tran L, Greenwood-Van Meerveld B. Age-Associated Remodeling of the Intestinal Epithelial Barrier. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* rujanj 2013.;68(9):1045–56. doi:10.1093/gerona/glt106 PubMed PMID: 23873964; PubMed Central PMCID: PMC3738030.
 113. Fasano A, Not T, Wang W, Uzzau S, Berti I, Tommasini A, i sur. Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *The Lancet.* 29. travanj 2000.;355(9214):1518–9. doi:10.1016/S0140-6736(00)02169-3 PubMed PMID: 10801176.

114. Qi Y, Goel R, Kim S, Richards EM, Carter CS, Pepine CJ, i sur. Intestinal Permeability Biomarker Zonulin is Elevated in Healthy Aging. *J Am Med Dir Assoc*. 01. rujanj 2017.;18(9):810.e1-810.e4. doi:10.1016/j.jamda.2017.05.018 PubMed PMID: 28676292; PubMed Central PMCID: PMC5581307.
115. Thevaranjan N, Puchta A, Schulz C, Naidoo A, Szamosi JC, Verschoor CP, i sur. Age-Associated Microbial Dysbiosis Promotes Intestinal Permeability, Systemic Inflammation, and Macrophage Dysfunction. *Cell Host Microbe*. 12. travanj 2017.;21(4):455-466.e4. doi:10.1016/j.chom.2017.03.002 PubMed PMID: 28407483; PubMed Central PMCID: PMC5392495.
116. Bárcena C, Valdés-Mas R, Mayoral P, Garabaya C, Durand S, Rodríguez F, i sur. Healthspan and lifespan extension by fecal microbiota transplantation into progeroid mice. *Nat Med*. kolovoz 2019.;25(8):1234–42. doi:10.1038/s41591-019-0504-5 PubMed PMID: 31332389.
117. Biagi E, Franceschi C, Rampelli S, Severgnini M, Ostan R, Turrone S, i sur. Gut Microbiota and Extreme Longevity. *Curr Biol*. 06. lipanj 2016.;26(11):1480–5. doi:10.1016/j.cub.2016.04.016 PubMed PMID: 27185560.
118. Singh H, Torralba MG, Moncera KJ, DiLello L, Petrini J, Nelson KE, i sur. Gastro-intestinal and oral microbiome signatures associated with healthy aging. *Geroscience*. prosinac 2019.;41(6):907–21. doi:10.1007/s11357-019-00098-8 PubMed PMID: 31620923; PubMed Central PMCID: PMC6925087.
119. Salazar N, Arboleya S, Fernández-Navarro T, de los Reyes-Gavilán CG, Gonzalez S, Gueimonde M. Age-Associated Changes in Gut Microbiota and Dietary Components Related with the Immune System in Adulthood and Old Age: A Cross-Sectional Study. *Nutrients*. 31. srpanj 2019.;11(8):1765. doi:10.3390/nu11081765 PubMed PMID: 31370376; PubMed Central PMCID: PMC6722604.
120. Moorefield EC, Andres SF, Blue RE, Van Landeghem L, Mah AT, Santoro MA, i sur. Aging effects on intestinal homeostasis associated with expansion and dysfunction of intestinal epithelial stem cells. *Aging (Albany NY)*. 29. kolovoz 2017.;9(8):1898–915. doi:10.18632/aging.101279 PubMed PMID: 28854151; PubMed Central PMCID: PMC5611984.
121. Nalapareddy K, Nattamai KJ, Kumar RS, Karns R, Wikenheiser-Brokamp KA, Sampson LL, i sur. Canonical Wnt Signaling Ameliorates Aging of Intestinal Stem Cells. *Cell Rep*. 14. ožujak 2017.;18(11):2608–21. doi:10.1016/j.celrep.2017.02.056 PubMed PMID: 28297666; PubMed Central PMCID: PMC5987258.
122. Cui H, Tang D, Garside GB, Zeng T, Wang Y, Tao Z, i sur. Wnt Signaling Mediates the Aging-Induced Differentiation Impairment of Intestinal Stem Cells. *Stem Cell Rev*. 2019.;15(3):448–55. doi:10.1007/s12015-019-09880-9 PubMed PMID: 30790135; PubMed Central PMCID: PMC6534527.
123. Choi NH, Kim JG, Yang DJ, Kim YS, Yoo MA. Age-related changes in *Drosophila* midgut are associated with PVF2, a PDGF/VEGF-like growth factor. *Aging Cell*. lipanj 2008.;7(3):318–34. doi:10.1111/j.1474-9726.2008.00380.x PubMed PMID: 18284659; PubMed Central PMCID: PMC2408640.

124. Wiertsema SP, van Bergenhenegouwen J, Garssen J, Knippels LMJ. The Interplay between the Gut Microbiome and the Immune System in the Context of Infectious Diseases throughout Life and the Role of Nutrition in Optimizing Treatment Strategies. *Nutrients*. 09. ožujak 2021.;13(3):886. doi:10.3390/nu13030886 PubMed PMID: 33803407; PubMed Central PMCID: PMC8001875.
125. Lyu M, Suzuki H, Kang L, Gaspar F, Zhou W, Goc J, i sur. ILC3s select microbiota-specific regulatory T cells to establish tolerance in the gut. *Nature*. listopad 2022.;610(7933):744–51. doi:10.1038/s41586-022-05141-x PubMed PMID: 36071169; PubMed Central PMCID: PMC9613541.
126. Arranz E, O'Mahony S, Barton JR, Ferguson A. Immunosenescence and mucosal immunity: significant effects of old age on secretory IgA concentrations and intraepithelial lymphocyte counts. *Gut*. srpanj 1992.;33(7):882–6. doi:10.1136/gut.33.7.882 PubMed PMID: 1644326; PubMed Central PMCID: PMC1379398.
127. Riva MA, Ceresoli M. 1522–2022: Considerations on the First Description of the Caecal Appendix by Berengario da Carpi in its 500th Anniversary. *World J Surg*. 2022.;46(11):2554–8. doi:10.1007/s00268-022-06688-6 PubMed PMID: 35939087; PubMed Central PMCID: PMC9529707.
128. Lambert SW. Description of the Vermiform Appendix from the „de Fabrica“ of Vesalius. *Ann Med Hist*. rujun 1937.;9(5):422–7. PubMed PMID: 33943956; PubMed Central PMCID: PMC7942937.
129. Ghosh SK. Giovanni Battista Morgagni (1682-1771): father of pathologic anatomy and pioneer of modern medicine. *Anat Sci Int*. lipanj 2017.;92(3):305–12. doi:10.1007/s12565-016-0373-7 PubMed PMID: 27629485.
130. Hutchinson R. Amyand's hernia. *J R Soc Med*. veljača 1993.;86(2):104–5. PubMed PMID: 8433290; PubMed Central PMCID: PMC1293861.
131. Ramachandran M, Aronson JK. John and James Parkinson's first description of acute appendicitis and its associated complications of perforation and death. *J R Soc Med*. srpanj 2011.;104(7):283–5. doi:10.1258/jrsm.2010.10k057 PubMed PMID: 21725093; PubMed Central PMCID: PMC3128875.
132. Macintyre I, Hughes S. Robert Lawson Tait (1845-1899): The true innovator of aseptic surgery? *J Med Biogr*. veljača 2024.;32(1):157–65. doi:10.1177/09677720221140085 PubMed PMID: 36536988.
133. Loveland JE. Reginald Heber Fitz, The Exponent of Appendicitis. *Yale J Biol Med*. srpanj 1937.;9(6):509.b1-520. PubMed PMID: 21433739; PubMed Central PMCID: PMC2601730.
134. Thien V. Charles McBurney: reflecting upon his life's work. *J Invest Surg*. 2000.;13(1):3–5. doi:10.1080/089419300272203 PubMed PMID: 10741946.
135. NEAGU SI, POPA CC. Acute Appendicitis Over the Time. The Impact of Scientific Discoveries and Technological Advances on the Diagnosis and Treatment of Acute Appendicitis. *Maedica (Bucur)*. rujun 2025.;20(3):575–82.

- doi:10.26574/maedica.2025.20.3.575 PubMed PMID: 41403804; PubMed Central PMCID: PMC12631586.
136. Semm K. Endoscopic appendectomy. *Endoscopy*. ožujak 1983.;15(2):59–64. doi:10.1055/s-2007-1021466 PubMed PMID: 6221925.
 137. Alvarado A. A practical score for the early diagnosis of acute appendicitis. *Ann Emerg Med*. svibanj 1986.;15(5):557–64. doi:10.1016/s0196-0644(86)80993-3 PubMed PMID: 3963537.
 138. Dai L, Shuai J. Laparoscopic versus open appendectomy in adults and children: A meta-analysis of randomized controlled trials. *United European Gastroenterol J*. lipanj 2017.;5(4):542–53. doi:10.1177/2050640616661931 PubMed PMID: 28588886; PubMed Central PMCID: PMC5446136.
 139. Liu BR, Song JT, Han FY, Li H, Yin JB. Endoscopic retrograde appendicitis therapy: a pilot minimally invasive technique (with videos). *Gastrointest Endosc*. listopad 2012.;76(4):862–6. doi:10.1016/j.gie.2012.05.029 PubMed PMID: 22840292.
 140. Uchida J. Electron microscopic study of microfold cells (M cells) in normal and inflamed human appendix. *Gastroenterol Jpn*. lipanj 1988.;23(3):251–62. doi:10.1007/BF02779467 PubMed PMID: 3402700.
 141. Corr SC, Gahan CCGM, Hill C. M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. siječanj 2008.;52(1):2–12. doi:10.1111/j.1574-695X.2007.00359.x PubMed PMID: 18081850.
 142. Spencer J, Finn T, Isaacson PG. Gut associated lymphoid tissue: a morphological and immunocytochemical study of the human appendix. *Gut*. srpanj 1985.;26(7):672–9. doi:10.1136/gut.26.7.672 PubMed PMID: 3874811; PubMed Central PMCID: PMC1433016.
 143. Tarlinton D. Germinal centers: form and function. *Curr Opin Immunol*. lipanj 1998.;10(3):245–51. doi:10.1016/s0952-7915(98)80161-1 PubMed PMID: 9638359.
 144. Sharkey KA, Mawe GM. The enteric nervous system. *Physiol Rev*. 01. travanj 2023.;103(2):1487–564. doi:10.1152/physrev.00018.2022 PubMed PMID: 36521049; PubMed Central PMCID: PMC9970663.
 145. Radenkovic G, Petrovic V, Zivanovic D, Stoilkovic N, Sokolovic D, Zivkovic N, i sur. Interstitial Cells of Cajal and Neural Structures in the Human Fetal Appendix. *J Neurogastroenterol Motil*. 30. siječanj 2021.;27(1):127–33. doi:10.5056/jnm20100 PubMed PMID: 33380557; PubMed Central PMCID: PMC7786081.
 146. de Costa A. The Exocrine Appendix. Darwin's vestige. *ANZ J Surg*. ožujak 2025.;95(3):283–5. doi:10.1111/ans.19333 PubMed PMID: 39743765; PubMed Central PMCID: PMC11937748.
 147. Berry RJA. The True Cæcal Apex, or the Vermiform Appendix: Its Minute and Comparative Anatomy. *J Anat Physiol*. listopad 1900.;35(Pt 1):83-100.9. PubMed PMID: 17232459; PubMed Central PMCID: PMC1287282.

148. Berry RJA, Lack LAH. The Vermiform Appendix of Man, and the Structural Changes therein coincident with Age. *J Anat Physiol.* travanj 1906.;40(Pt 3):247–56. PubMed PMID: 17232683; PubMed Central PMCID: PMC1287467.
149. Scott GB. The primate caecum and appendix vermiformis: a comparative study. *J Anat.* listopad 1980.;131(Pt 3):549–63. PubMed PMID: 7216918; PubMed Central PMCID: PMC1233252.
150. Randal Bollinger R, Barbas AS, Bush EL, Lin SS, Parker W. Biofilms in the large bowel suggest an apparent function of the human vermiform appendix. *Journal of Theoretical Biology.* 21. prosinac 2007.;249(4):826–31. doi:10.1016/j.jtbi.2007.08.032
151. Johansson MEV, Phillipson M, Petersson J, Velcich A, Holm L, Hansson GC. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 30. rujun 2008.;105(39):15064–9. doi:10.1073/pnas.0803124105 PubMed PMID: 18806221; PubMed Central PMCID: PMC2567493.
152. Johansson MEV. Fast renewal of the distal colonic mucus layers by the surface goblet cells as measured by in vivo labeling of mucin glycoproteins. *PLoS One.* 2012.;7(7):e41009. doi:10.1371/journal.pone.0041009 PubMed PMID: 22815896; PubMed Central PMCID: PMC3398881.
153. Smith HF, Fisher RE, Everett ML, Thomas AD, Randal Bollinger R, Parker W. Comparative anatomy and phylogenetic distribution of the mammalian cecal appendix [Internet]. [citirano 04. svibanj 2026.]. Dostupno na: <https://dx.doi.org/10.1111/j.1420-9101.2009.01809.x>
154. Radhakrishnan P, Halagowder D, Devaraj SN. Altered expression of MUC2 and MUC5AC in response to *Shigella* infection, an in vivo study. *Biochim Biophys Acta.* lipanj 2007.;1770(6):884–9. doi:10.1016/j.bbagen.2007.01.019 PubMed PMID: 17395379.
155. Vieira MAM, Gomes TAT, Ferreira AJP, Knöbl T, Servin AL, Liévin-Le Moal V. Two atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains induce the production of secreted and membrane-bound mucins to benefit their own growth at the apical surface of human mucin-secreting intestinal HT29-MTX cells. *Infect Immun.* ožujak 2010.;78(3):927–38. doi:10.1128/IAI.01115-09 PubMed PMID: 20065027; PubMed Central PMCID: PMC2825950.
156. Bollinger RR, Everett ML, Palestrant D, Love SD, Lin SS, Parker W. Human secretory immunoglobulin A may contribute to biofilm formation in the gut. *Immunology.* kolovoz 2003.;109(4):580–7. doi:10.1046/j.1365-2567.2003.01700.x PubMed PMID: 12871226; PubMed Central PMCID: PMC1782994.
157. Masahata K, Umemoto E, Kayama H, Kotani M, Nakamura S, Kurakawa T, i sur. Generation of colonic IgA-secreting cells in the caecal patch. *Nat Commun.* 10. travanj 2014.;5(1):3704. doi:10.1038/ncomms4704
158. Collard MK, Bardin J, Laurin M, Ogier-Denis E. The cecal appendix is correlated with greater maximal longevity in mammals. *J Anat.* studeni 2021.;239(5):1157–69. doi:10.1111/joa.13501 PubMed PMID: 34235746; PubMed Central PMCID: PMC8546507.

159. Wickramasinghe DP, Xavier C, Samarasekera DN. The Worldwide Epidemiology of Acute Appendicitis: An Analysis of the Global Health Data Exchange Dataset. *World J Surg.* srpanj 2021.;45(7):1999–2008. doi:10.1007/s00268-021-06077-5 PubMed PMID: 33755751.
160. Guan L, Liu Z, Pan G, Zhang B, Wu Y, Gan T, i sur. The global, regional, and national burden of appendicitis in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2019. *BMC Gastroenterol.* 22. veljača 2023.;23:44. doi:10.1186/s12876-023-02678-7 PubMed PMID: 36814190; PubMed Central PMCID: PMC9945388.
161. Wang D, Ge H, Lu Y, Gong X. Incidence trends and survival analysis of appendiceal tumors in the United States: Primarily changes in appendiceal neuroendocrine tumors. *PLoS One.* 13. studeni 2023.;18(11):e0294153. doi:10.1371/journal.pone.0294153 PubMed PMID: 37956190; PubMed Central PMCID: PMC10642837.
162. Téoule P, Laffolie J de, Rolle U, Reissfelder C. Acute Appendicitis in Childhood and Adulthood. *Dtsch Arztebl Int.* 06. studeni 2020.;117(45):764–74. doi:10.3238/arztebl.2020.0764 PubMed PMID: 33533331; PubMed Central PMCID: PMC7898047.
163. Blomqvist PG, Andersson REB, Granath F, Lambe MP, Ekblom AR. Mortality After Appendectomy in Sweden, 1987–1996. *Ann Surg.* travanj 2001.;233(4):455–60. doi:10.1097/00000658-200104000-00001 PubMed PMID: 11303128; PubMed Central PMCID: PMC1421275.
164. Strom PR, Turkleson ML, Stone HH. Safety of incidental appendectomy. *Am J Surg.* lipanj 1983.;145(6):819–22. doi:10.1016/0002-9610(83)90150-2 PubMed PMID: 6859420.
165. Fisher KS, Ross DS. Guidelines for therapeutic decision in incidental appendectomy. *Surg Gynecol Obstet.* srpanj 1990.;171(1):95–8. PubMed PMID: 2193415.
166. Di Saverio S, Podda M, De Simone B, Ceresoli M, Augustin G, Gori A, i sur. Diagnosis and treatment of acute appendicitis: 2020 update of the WSES Jerusalem guidelines. *World J Emerg Surg.* 15. travanj 2020.;15:27. doi:10.1186/s13017-020-00306-3 PubMed PMID: 32295644; PubMed Central PMCID: PMC7386163.
167. Tavra A, Quien D, Barcot O. Oncological aspect of incidental appendectomy with regard to histopathological findings: A retrospective cohort study. *Eur J Surg Oncol.* listopad 2023.;49(10):107013. doi:10.1016/j.ejso.2023.107013 PubMed PMID: 37597285.
168. Son J, Park YJ, Lee SR, Kim HO, Jung KU. Increased Risk of Neoplasms in Adult Patients Undergoing Interval Appendectomy. *Ann Coloproctol.* listopad 2020.;36(5):311–5. doi:10.3393/ac.2019.10.15.1 PubMed PMID: 32054244; PubMed Central PMCID: PMC7714372.
169. Salminen R, Alajääski J, Rautio T, Hurme S, Nordström P, Mäkäraäinen E, i sur. Appendiceal Tumor Prevalence in Patients With Periappendicular Abscess. *JAMA Surg.* 01. svibanj 2025.;160(5):526–34. doi:10.1001/jamasurg.2025.0312

170. Simonowitz DA, Rusch VW, Stevenson JK. Natural history of incidental appendectomy in patients with Crohn's disease who required subsequent bowel resection. *Am J Surg.* siječanj 1982.;143(1):171–3. doi:10.1016/0002-9610(82)90150-7 PubMed PMID: 7053649.
171. Healy JM, Olgun LF, Hittelman AB, Ozgediz D, Caty MG. Pediatric incidental appendectomy: a systematic review. *Pediatric Surgery International.* 2016.;32(4):321–35. doi:10.1007/s00383-015-3839-0 PubMed PMID: 26590816.
172. Wheeler RA, Malone PS. Use of the appendix in reconstructive surgery: A case against incidental appendectomy [Internet]. [citirano 07. svibanj 2026.]. Dostupno na: <https://dx.doi.org/10.1002/bjs.1800781103>
173. Rasmussen T, Fonnes S, Rosenberg J. Long-Term Complications of Appendectomy: A Systematic Review. *Scand J Surg.* 01. rujan 2018.;107(3):189–96. doi:10.1177/1457496918772379
174. Myrelid P, Landerholm K, Nordenvall C, Pinkney TD, Andersson RE. Appendectomy and the Risk of Colectomy in Ulcerative Colitis: A National Cohort Study. *Am J Gastroenterol.* kolovoz 2017.;112(8):1311–9. doi:10.1038/ajg.2017.183 PubMed PMID: 28653667.
175. Cosnes J, Carbonnel F, Beaugier L, Blain A, Reijasse D, Gendre JP. Effects of appendectomy on the course of ulcerative colitis. *Gut.* 2002.;51(6):803–7. doi:10.1136/gut.51.6.803 PubMed PMID: 12427780.
176. Killinger BA, Madaj Z, Sikora JW, Rey N, Haas AJ, Vepa Y, i sur. The vermiform appendix impacts the risk of developing Parkinson's disease. *Science Translational Medicine.* 31. listopad 2018.;10(465):eaar5280. doi:10.1126/scitranslmed.aar5280
177. Chin HL, Tsang YS, Shi H. Appendectomy and risk of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Front Neurol.* 21. srpanj 2025.;16. doi:10.3389/fneur.2025.1619236
178. Miller JF a. P. IMMUNOLOGICAL FUNCTION OF THE THYMUS. *The Lancet.* 30. rujan 1961.;278(7205):748–9. doi:10.1016/S0140-6736(61)90693-6
179. Kendall MD, Johnson HR, Singh J. The weight of the human thymus gland at necropsy. *J Anat.* listopad 1980.;131(Pt 3):483–97. PubMed PMID: 7216915; PubMed Central PMCID: PMC1233247.
180. Steinmann GG, Klaus B, Müller-Hermelink HK. The involution of the ageing human thymic epithelium is independent of puberty. A morphometric study. *Scand J Immunol.* studeni 1985.;22(5):563–75. doi:10.1111/j.1365-3083.1985.tb01916.x PubMed PMID: 4081647.
181. Naylor K, Li G, Vallejo AN, Lee WW, Koetz K, Bryl E, i sur. The influence of age on T cell generation and TCR diversity. *J Immunol.* 01. lipanj 2005.;174(11):7446–52. doi:10.4049/jimmunol.174.11.7446 PubMed PMID: 15905594.
182. Yoshida K, Cologne JB, Cordova K, Misumi M, Yamaoka M, Kyoizumi S, i sur. Aging-related changes in human T-cell repertoire over 20years delineated by deep sequencing

- of peripheral T-cell receptors. *Exp Gerontol.* 01. listopad 2017.;96:29–37.
doi:10.1016/j.exger.2017.05.015 PubMed PMID: 28535950.
183. Britanova OV, Putintseva EV, Shugay M, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Staroverov DB, i sur. Age-related decrease in TCR repertoire diversity measured with deep and normalized sequence profiling. *J Immunol.* 15. ožujak 2014.;192(6):2689–98.
doi:10.4049/jimmunol.1302064 PubMed PMID: 24510963.
 184. Xu Y, Xu L, Chen C, Zhang Y, Zeng C, Jin Z, i sur. Age-Related Immune Profile of the T Cell Receptor Repertoire, Thymic Recent Output Function, and miRNAs. *BioMed Research International.* 2020.;2020(1):5910823. doi:10.1155/2020/5910823
 185. Sauce D, Larsen M, Fastenackels S, Duperrier A, Keller M, Grubeck-Loebenstein B, i sur. Evidence of premature immune aging in patients thymectomized during early childhood. *J Clin Invest.* listopad 2009.;119(10):3070–8. doi:10.1172/JCI39269 PubMed PMID: 19770514; PubMed Central PMCID: PMC2752077.
 186. Kooshesh KA, Foy BH, Sykes DB, Gustafsson K, Scadden DT. Health Consequences of Thymus Removal in Adults. *N Engl J Med.* 03. kolovoz 2023.;389(5):406–17.
doi:10.1056/NEJMoa2302892 PubMed PMID: 37530823; PubMed Central PMCID: PMC10557034.
 187. Bernatz S, Prudente V, Pai S, Attermann AK, Cao Y, Chen J, i sur. Thymic health consequences in adults. *Nature.* travanj 2026.;652(8111):986–94. doi:10.1038/s41586-026-10242-y
 188. Aw D, Hilliard L, Nishikawa Y, Cadman ET, Lawrence RA, Palmer DB. Disorganization of the splenic microanatomy in ageing mice. *Immunology.* svibanj 2016.;148(1):92–101. doi:10.1111/imm.12590 PubMed PMID: 26840375; PubMed Central PMCID: PMC4819137.
 189. Richner JM, Gmyrek GB, Govero J, Tu Y, van der Windt GJW, Metcalf TU, i sur. Age-Dependent Cell Trafficking Defects in Draining Lymph Nodes Impair Adaptive Immunity and Control of West Nile Virus Infection. *PLoS Pathog.* srpanj 2015.;11(7):e1005027. doi:10.1371/journal.ppat.1005027 PubMed PMID: 26204259; PubMed Central PMCID: PMC4512688.
 190. McDonald KG, Leach MR, Huang C, Wang C, Newberry RD. Aging impacts isolated lymphoid follicle development and function. *Immun Ageing.* 07. siječanj 2011.;8:1. doi:10.1186/1742-4933-8-1 PubMed PMID: 21214915; PubMed Central PMCID: PMC3023758.
 191. Kawanishi H, Kiely J. Immune-related alterations in aged gut-associated lymphoid tissues in mice. *Dig Dis Sci.* veljača 1989.;34(2):175–84. doi:10.1007/BF01536048 PubMed PMID: 2914536.
 192. Koyama K, Hosokawa T, Aoike A. Aging effect on the immune functions of murine gut-associated lymphoid tissues. *Dev Comp Immunol.* 1990.;14(4):465–73.
doi:10.1016/0145-305x(90)90039-h PubMed PMID: 2086275.
 193. Cakala-Jakimowicz M, Kolodziej-Wojnar P, Puzianowska-Kuznicka M. Aging-Related Cellular, Structural and Functional Changes in the Lymph Nodes: A Significant

- Component of Immunosenescence? An Overview. *Cells*. 12. studeni 2021.;10(11):3148. doi:10.3390/cells10113148 PubMed PMID: 34831371; PubMed Central PMCID: PMC8621398.
194. Kooij IA, Sahami S, Meijer SL, Buskens CJ, te Velde AA. The immunology of the vermiform appendix: a review of the literature. *Clinical and Experimental Immunology*. 2016.;186(1):1–9. doi:10.1111/cei.12821 PubMed PMID: 27271818.
 195. Gebbers JO, Laissue JA. Bacterial Translocation in the Normal Human Appendix Parallels the Development of the Local Immune System. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004.;1029(1):337–43. doi:10.1196/annals.1309.015
 196. Dasso JF, Obiakor H, Bach H, Anderson AO, Mage RG. A morphological and immunohistological study of the human and rabbit appendix for comparison with the avian bursa. *Dev Comp Immunol*. prosinac 2000.;24(8):797–814. doi:10.1016/s0145-305x(00)00033-1 PubMed PMID: 10906392.
 197. Miranda R, Johnston AD, O’Leary JP. Incidental appendectomy: frequency of pathologic abnormalities. *Am Surg*. lipanj 1980.;46(6):355–7. PubMed PMID: 7396263.
 198. Andreou P, Blain S, Du Boulay CE. A histopathological study of the appendix at autopsy and after surgical resection. *Histopathology*. studeni 1990.;17(5):427–31. doi:10.1111/j.1365-2559.1990.tb00763.x PubMed PMID: 2076868.
 199. Gross PA, Hermogenes AW, Sacks HS, Lau J, Levandowski RA. The efficacy of influenza vaccine in elderly persons. A meta-analysis and review of the literature. *Ann Intern Med*. 01. listopad 1995.;123(7):518–27. doi:10.7326/0003-4819-123-7-199510010-00008 PubMed PMID: 7661497.
 200. Mangtani P, Cumberland P, Hodgson CR, Roberts JA, Cutts FT, Hall AJ. A Cohort Study of the Effectiveness of Influenza Vaccine in Older People, Performed Using the United Kingdom General Practice Research Database. *J Infect Dis*. 01. srpanj 2004.;190(1):1–10. doi:10.1086/421274
 201. Machado MA de A, Moura CS, Abrahamowicz M, Ward BJ, Pilote L, Bernatsky S. Relative effectiveness of influenza vaccines in elderly persons in the United States, 2012/2013–2017/2018 seasons. *npj Vaccines*. 24. kolovoz 2021.;6(1):108. doi:10.1038/s41541-021-00373-w
 202. Henry CJ, Casás-Selves M, Kim J, Zaberezhnyy V, Aghili L, Daniel AE, i sur. Aging-associated inflammation promotes selection for adaptive oncogenic events in B cell progenitors. *J Clin Invest*. prosinac 2015.;125(12):4666–80. doi:10.1172/JCI83024 PubMed PMID: 26551682; PubMed Central PMCID: PMC4665776.
 203. Park MD, Le Berichel J, Hamon P, Wilk CM, Belabed M, Yatim N, i sur. Hematopoietic aging promotes cancer by fueling IL-1 α -driven emergency myelopoiesis. *Science*. 05. rujun 2024.;386(6720):eadn0327. doi:10.1126/science.adn0327
 204. Hearps AC, Martin GE, Angelovich TA, Cheng WJ, Maisa A, Landay AL, i sur. Aging is associated with chronic innate immune activation and dysregulation of monocyte phenotype and function. *Aging Cell*. listopad 2012.;11(5):867–75. doi:10.1111/j.1474-9726.2012.00851.x PubMed PMID: 22708967.

205. Arnardottir HH, Dalli J, Colas RA, Shinohara M, Serhan CN. Aging delays resolution of acute inflammation in mice: reprogramming the host response with novel nano-proresolving medicines. *J Immunol.* 15. listopad 2014.;193(8):4235–44. doi:10.4049/jimmunol.1401313 PubMed PMID: 25217168; PubMed Central PMCID: PMC4185223.
206. Noh JY, Han HW, Kim DM, Giles ED, Farnell YZ, Wright GA, i sur. Innate immunity in peripheral tissues is differentially impaired under normal and endotoxic conditions in aging. *Front Immunol.* 16. kolovoz 2024.;15. doi:10.3389/fimmu.2024.1357444
207. Harman D. The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc.* travanj 1972.;20(4):145–7. doi:10.1111/j.1532-5415.1972.tb00787.x PubMed PMID: 5016631.
208. Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson JE. Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol.* 1980.;15(6):575–91. doi:10.1016/0531-5565(80)90010-8 PubMed PMID: 7009178.
209. Shokolenko I, Venediktova N, Bochkareva A, Wilson GL, Alexeyev MF. Oxidative stress induces degradation of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.* svibanj 2009.;37(8):2539–48. doi:10.1093/nar/gkp100 PubMed PMID: 19264794; PubMed Central PMCID: PMC2677867.
210. Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, Kang D, Suematsu N, Nakamura K, i sur. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ Res.* 16. ožujak 2001.;88(5):529–35. doi:10.1161/01.res.88.5.529 PubMed PMID: 11249877.
211. Kaneko T, Tahara S, Matsuo M. Non-linear accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidized DNA damage, during aging. *Mutat Res.* svibanj 1996.;316(5–6):277–85. doi:10.1016/s0921-8734(96)90010-7 PubMed PMID: 8649461.
212. Jones DP. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol.* listopad 2008.;295(4):C849-868. doi:10.1152/ajpcell.00283.2008 PubMed PMID: 18684987; PubMed Central PMCID: PMC2575825.
213. Tanase M, Urbanska AM, Zolla V, Clement CC, Huang L, Morozova K, i sur. Role of Carbonyl Modifications on Aging-Associated Protein Aggregation. *Sci Rep.* 18. siječanj 2016.;6(1):19311. doi:10.1038/srep19311
214. Mateos R, Lecumberri E, Ramos S, Goya L, Bravo L. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 15. studeni 2005.;827(1):76–82. doi:10.1016/j.jchromb.2005.06.035 PubMed PMID: 16009604.
215. Graille M, Wild P, Sauvain JJ, Hemmendinger M, Guseva Canu I, Hopf NB. Urinary 8-OHdG as a Biomarker for Oxidative Stress: A Systematic Literature Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci.* 26. svibanj 2020.;21(11):3743. doi:10.3390/ijms21113743 PubMed PMID: 32466448; PubMed Central PMCID: PMC7313038.

216. Pérez VI, Van Remmen H, Bokov A, Epstein CJ, Vijg J, Richardson A. The overexpression of major antioxidant enzymes does not extend the lifespan of mice. *Aging Cell*. veljača 2009.;8(1):73–5. doi:10.1111/j.1474-9726.2008.00449.x PubMed PMID: 19077044; PubMed Central PMCID: PMC2667893.
217. Van Raamsdonk JM, Hekimi S. Superoxide dismutase is dispensable for normal animal lifespan. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 10. travanj 2012.;109(15):5785–90. doi:10.1073/pnas.1116158109 PubMed PMID: 22451939; PubMed Central PMCID: PMC3326508.
218. Gladyshev VN. The Free Radical Theory of Aging Is Dead. Long Live the Damage Theory! *Antioxid Redox Signal*. 01. veljača 2014.;20(4):727–31. doi:10.1089/ars.2013.5228 PubMed PMID: 24159899; PubMed Central PMCID: PMC3901353.
219. Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol*. srpanj 2020.;21(7):363–83. doi:10.1038/s41580-020-0230-3 PubMed PMID: 32231263.
220. Matsumaru D, Motohashi H. The KEAP1-NRF2 System in Healthy Aging and Longevity. *Antioxidants (Basel)*. 30. studeni 2021.;10(12):1929. doi:10.3390/antiox10121929 PubMed PMID: 34943032; PubMed Central PMCID: PMC8750203.
221. He F, Ru X, Wen T. NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *Int J Mol Sci*. 06. srpanj 2020.;21(13):4777. doi:10.3390/ijms21134777 PubMed PMID: 32640524; PubMed Central PMCID: PMC7369905.
222. Reszka E, Wieczorek E, Jablonska E, Janasik B, Fendler W, Wasowicz W. Association between plasma selenium level and NRF2 target genes expression in humans. *J Trace Elem Med Biol*. travanj 2015.;30:102–6. doi:10.1016/j.jtemb.2014.11.008 PubMed PMID: 25524402.
223. Lindl KA, Jordan-Sciutto KL. Examining the Endogenous Antioxidant Response Through Immunofluorescent Analysis of Nrf2 in Tissue. *Methods Mol Biol*. 2008.;477:229–43. doi:10.1007/978-1-60327-517-0_18 PubMed PMID: 19082951; PubMed Central PMCID: PMC2740833.
224. Kitaoka Y, Tamura Y, Takahashi K, Takeda K, Takemasa T, Hatta H. Effects of Nrf2 deficiency on mitochondrial oxidative stress in aged skeletal muscle. *Physiol Rep*. 12. veljača 2019.;7(3):e13998. doi:10.14814/phy2.13998 PubMed PMID: 30756520; PubMed Central PMCID: PMC6372533.
225. Suh JH, Shenvi SV, Dixon BM, Liu H, Jaiswal AK, Liu RM, i sur. Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 09. ožujak 2004.;101(10):3381–6. doi:10.1073/pnas.0400282101 PubMed PMID: 14985508; PubMed Central PMCID: PMC373470.
226. Fulop GA, Kiss T, Tarantini S, Balasubramanian P, Yabluchanskiy A, Farkas E, i sur. Nrf2 deficiency in aged mice exacerbates cellular senescence promoting cerebrovascular

- inflammation. *GeroScience*. 23. studeni 2018.;40(5–6):513–21. doi:10.1007/s11357-018-0047-6 PubMed PMID: 30470983; PubMed Central PMCID: PMC6294722.
227. Hiebert P, Wietecha MS, Cangkrama M, Haertel E, Mavrogonatou E, Stumpe M, i sur. Nrf2-Mediated Fibroblast Reprogramming Drives Cellular Senescence by Targeting the Matrisome. *Dev Cell*. 16. srpanj 2018.;46(2):145-161.e10. doi:10.1016/j.devcel.2018.06.012 PubMed PMID: 30016619.
 228. Conte M, Giuliani C, Chiariello A, Iannuzzi V, Franceschi C, Salvioli S. GDF15, an emerging key player in human aging. *Ageing Research Reviews*. 01. ožujak 2022.;75:101569. doi:10.1016/j.arr.2022.101569
 229. Miyake M, Zhang J, Yasue A, Hisanaga S, Tsugawa K, Sakaue H, i sur. Integrated stress response regulates GDF15 secretion from adipocytes, preferentially suppresses appetite for a high-fat diet and improves obesity. *iScience*. 15. studeni 2021.;24(12):103448. doi:10.1016/j.isci.2021.103448 PubMed PMID: 34877504; PubMed Central PMCID: PMC8633987.
 230. Smith JLM, Tanner KT, Devine J, Monzel AS, Batjargal T, Wilson MZ, i sur. Mapping the GDF15 arm of the integrated stress response in human cells and tissues. *Commun Biol*. 27. svibanj 2026. doi:10.1038/s42003-026-10312-x
 231. López-Domínguez JA, Rodríguez-López S, Ahumada-Castro U, Desprez PY, Konovalenko M, Laberge RM, i sur. Cdkn1a transcript variant 2 is a marker of aging and cellular senescence. *Aging (Albany NY)*. 25. svibanj 2021.;13(10):13380–92. doi:10.18632/aging.203110 PubMed PMID: 34035185; PubMed Central PMCID: PMC8202863.
 232. Leontieva OV, Blagosklonny MV. CDK4/6-inhibiting drug substitutes for p21 and p16 in senescence. *Cell Cycle*. 15. rujun 2013.;12(18):3063–9. doi:10.4161/cc.26130 PubMed PMID: 23974099; PubMed Central PMCID: PMC3875680.
 233. Njemini R, Lambert M, Demanet C, Kooijman R, Mets T. Basal and infection-induced levels of heat shock proteins in human aging. *Biogerontology*. lipanj 2007.;8(3):353–64. doi:10.1007/s10522-006-9078-y PubMed PMID: 17211576.
 234. Liang V, Ullrich M, Lam H, Chew YL, Banister S, Song X, i sur. Altered proteostasis in aging and heat shock response in *C. elegans* revealed by analysis of the global and de novo synthesized proteome. *Cell Mol Life Sci*. 24. siječanj 2014.;71(17):3339–61. doi:10.1007/s00018-014-1558-7 PubMed PMID: 24458371; PubMed Central PMCID: PMC4131143.
 235. Jurivich DA, Manocha GD, Trivedi R, Lizakowski M, Rakoczy S, Brown-Borg H. Multifactorial Attenuation of the Murine Heat Shock Response With Age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 14. listopad 2019.;75(10):1846–52. doi:10.1093/gerona/glz204 PubMed PMID: 31612204; PubMed Central PMCID: PMC7750681.
 236. Nefzger CM, Jardé T, Srivastava A, Schroeder J, Rossello FJ, Horvay K, i sur. Intestinal stem cell aging signature reveals a reprogramming strategy to enhance regenerative potential. *npj Regenerative Medicine*. 2022.;7(1). doi:10.1038/s41536-022-00226-7

237. Hochmuth CE, Biteau B, Bohmann D, Jasper H. Redox regulation by Keap1 and Nrf2 controls intestinal stem cell proliferation in *Drosophila*. *Cell Stem Cell*. 04. veljača 2011.;8(2):188–99. doi:10.1016/j.stem.2010.12.006 PubMed PMID: 21295275; PubMed Central PMCID: PMC3035938.
238. Zhang H, Morgan TE, Forman HJ. Age-related alteration in HNE elimination enzymes. *Arch Biochem Biophys*. 15. ožujak 2021.;699:108749. doi:10.1016/j.abb.2020.108749 PubMed PMID: 33417945.
239. Bernard CE, Gibbons SJ, Gomez-Pinilla PJ, Lurken MS, Schmalz PF, Roeder JL, i sur. Effect of Age on the Enteric Nervous System of the Human Colon. *Neurogastroenterol Motil. srpanj 2009.*;21(7):746-e46. doi:10.1111/j.1365-2982.2008.01245.x PubMed PMID: 19220755; PubMed Central PMCID: PMC2776702.
240. Gomes OA, de Souza RR, Liberti EA. A preliminary investigation of the effects of aging on the nerve cell number in the myenteric ganglia of the human colon. *Gerontology*. 1997.;43(4):210–7. doi:10.1159/000213852 PubMed PMID: 9222749.
241. Holmqvist S, Chutna O, Bousset L, Aldrin-Kirk P, Li W, Björklund T, i sur. Direct evidence of Parkinson pathology spread from the gastrointestinal tract to the brain in rats. *Acta Neuropathol. prosinac 2014.*;128(6):805–20. doi:10.1007/s00401-014-1343-6 PubMed PMID: 25296989.
242. Kulkarni S, Micci MA, Leser J, Shin C, Tang SC, Fu YY, i sur. Adult enteric nervous system in health is maintained by a dynamic balance between neuronal apoptosis and neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 02. svibanj 2017.;114(18):E3709–18. doi:10.1073/pnas.1619406114
243. Prohazky F, Shapiro M, Chng SH, Garcia-Cassani B, Classon CH, Sevgi S, i sur. Regulation of intestinal immunity and tissue repair by enteric glia. *Nature. studeni 2021.*;599(7883):125–30. doi:10.1038/s41586-021-04006-z PubMed PMID: 34671159; PubMed Central PMCID: PMC7612231.
244. Abdo H, Derkinderen P, Gomes P, Chevalier J, Aubert P, Masson D, i sur. Enteric glial cells protect neurons from oxidative stress in part via reduced glutathione. *FASEB J. travanj 2010.*;24(4):1082–94. doi:10.1096/fj.09-139519 PubMed PMID: 19906678.
245. Savidge TC, Newman P, Pothoulakis C, Ruhl A, Neunlist M, Bourreille A, i sur. Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology. travanj 2007.*;132(4):1344–58. doi:10.1053/j.gastro.2007.01.051 PubMed PMID: 17408650.
246. Bohórquez DV, Samsa LA, Roholt A, Medicetty S, Chandra R, Liddle RA. An enteroendocrine cell-enteric glia connection revealed by 3D electron microscopy. *PLoS One*. 2014.;9(2):e89881. doi:10.1371/journal.pone.0089881 PubMed PMID: 24587096; PubMed Central PMCID: PMC3935946.
247. May-Zhang AA, Tycksen E, Southard-Smith AN, Deal KK, Benthal JT, Buehler DP, i sur. Combinatorial transcriptional profiling of mouse and human enteric neurons identifies shared and disparate subtypes in situ. *Gastroenterology. veljača 2021.*;160(3):755–770.e26. doi:10.1053/j.gastro.2020.09.032 PubMed PMID: 33010250; PubMed Central PMCID: PMC7878294.

248. Drokhlyansky E, Smillie CS, Van Wittenberghe N, Ericsson M, Griffin GK, Eraslan G, i sur. The human and mouse enteric nervous system at single cell resolution. *Cell*. 17. rujun 2020.;182(6):1606-1622.e23. doi:10.1016/j.cell.2020.08.003 PubMed PMID: 32888429; PubMed Central PMCID: PMC8358727.
249. de Souza RR, Moratelli HB, Borges N, Liberti EA. Age-induced nerve cell loss in the myenteric plexus of the small intestine in man. *Gerontology*. 1993.;39(4):183–8. doi:10.1159/000213532 PubMed PMID: 8244045.
250. Hanani M, Fellig Y, Udassin R, Freund HR. Age-related changes in the morphology of the myenteric plexus of the human colon. *Autonomic Neuroscience*. 30. lipanj 2004.;113(1):71–8. doi:10.1016/j.autneu.2004.05.007
251. Phillips RJ, Kieffer EJ, Powley TL. Loss of glia and neurons in the myenteric plexus of the aged Fischer 344 rat. *Anat Embryol (Berl)*. studeni 2004.;209(1):19–30. doi:10.1007/s00429-004-0426-x PubMed PMID: 15480773.
252. Sun T, Li D, Hu S, Huang L, Sun H, Yang S, i sur. Aging-dependent decrease in the numbers of enteric neurons, interstitial cells of Cajal and expression of connexin43 in various regions of gastrointestinal tract. *Aging*. 11. prosinac 2018.;10(12):3851–65. doi:10.18632/aging.101677 PubMed PMID: 30530917.
253. Marese ACM, de Freitas P, Natali MRM. Alterations of the number and the profile of myenteric neurons of Wistar rats promoted by age. *Auton Neurosci*. 30. prosinac 2007.;137(1–2):10–8. doi:10.1016/j.autneu.2007.05.003 PubMed PMID: 17574931.
254. Cowen T, Johnson RJ, Soubeyre V, Santer RM. Restricted diet rescues rat enteric motor neurones from age related cell death. *Gut*. studeni 2000.;47(5):653–60. doi:10.1136/gut.47.5.653 PubMed PMID: 11034581; PubMed Central PMCID: PMC1728112.
255. Phillips RJ, Martin FN, Billingsley CN, Powley TL. Alpha-synuclein expression patterns in the colonic submucosal plexus of the aging Fischer 344 rat: Implications for biopsies in aging and neurodegenerative disorders? *Neurogastroenterol Motil*. rujun 2013.;25(9):e621–33. doi:10.1111/nmo.12176 PubMed PMID: 23809578; PubMed Central PMCID: PMC3735646.
256. Delgado RA. Age-related changes in the gastrointestinal tract: a functional and immunohistochemical study in guinea-pig ileum. *Life Sciences*. 01. siječanj 2007. doi:10.1016/J.LFS.2007.04.004
257. Hetz S, Acikgoez A, Moll C, Jahnke HG, Robitzki AA, Metzger R, i sur. Age-related gene expression analysis in enteric ganglia of human colon after laser microdissection. *Front Aging Neurosci*. 2014.;6:276. doi:10.3389/fnagi.2014.00276 PubMed PMID: 25360110; PubMed Central PMCID: PMC4197768.
258. Sanders KM, Ward SM, Koh SD. Interstitial cells: regulators of smooth muscle function. *Physiol Rev*. srpanj 2014.;94(3):859–907. doi:10.1152/physrev.00037.2013 PubMed PMID: 24987007; PubMed Central PMCID: PMC4152167.
259. Gomez-Pinilla PJ, Gibbons SJ, Sarr MG, Kendrick ML, Shen KR, Cima RR, i sur. Changes in interstitial cells of cajal with age in the human stomach and colon.

- Neurogastroenterol Motil. siječanj 2011.;23(1):36–44. doi:10.1111/j.1365-2982.2010.01590.x PubMed PMID: 20723073; PubMed Central PMCID: PMC2999641.
260. Thrassivoulou C, Soubeyre V, Ridha H, Giuliani D, Giaroni C, Michael GJ, i sur. Reactive oxygen species, dietary restriction and neurotrophic factors in age-related loss of myenteric neurons. *Aging Cell*. lipanj 2006.;5(3):247–57. doi:10.1111/j.1474-9726.2006.00214.x PubMed PMID: 16842497.
 261. Kulkarni S, Saha M, Slosberg J, Singh A, Nagaraj S, Becker L, i sur. Age-associated changes in lineage composition of the enteric nervous system regulate gut health and disease. *eLife*. 12:RP88051. doi:10.7554/eLife.88051 PubMed PMID: 38108810; PubMed Central PMCID: PMC10727506.
 262. Wade PR. Aging and neural control of the GI tract. I. Age-related changes in the enteric nervous system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. rujun 2002.;283(3):G489–495. doi:10.1152/ajpgi.00091.2002 PubMed PMID: 12181159.
 263. Ferrante F, Geppetti P, Amenta F. Age-related changes in substance P and vasoactive intestinal polypeptide immunoreactivity in the rat stomach and small intestine. *Arch Gerontol Geriatr*. 1991.;13(1):81–7. doi:10.1016/0167-4943(91)90018-1 PubMed PMID: 15374438.
 264. Phillips RJ, Pairitz JC, Powley TL. Age-related neuronal loss in the submucosal plexus of the colon of Fischer 344 rats. *Neurobiol Aging*. srpanj 2007.;28(7):1124–37. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2006.05.019 PubMed PMID: 16793176.
 265. McVey Neufeld KA, Mao YK, West CL, Ahn M, Hameed H, Iwashita E, i sur. Squalamine reverses age-associated changes of firing patterns of myenteric sensory neurons and vagal fibres. *Commun Biol*. 10. siječanj 2024.;7(1):80. doi:10.1038/s42003-023-05623-2
 266. Furness JB, Jones C, Nurgali K, Clerc N. Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog Neurobiol*. veljača 2004.;72(2):143–64. doi:10.1016/j.pneurobio.2003.12.004 PubMed PMID: 15063530.
 267. Braak H, Rüb U, Gai WP, Del Tredici K. Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J Neural Transm (Vienna)*. svibanj 2003.;110(5):517–36. doi:10.1007/s00702-002-0808-2 PubMed PMID: 12721813.
 268. Hilton D, Stephens M, Kirk L, Edwards P, Potter R, Zajicek J, i sur. Accumulation of α -synuclein in the bowel of patients in the pre-clinical phase of Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*. veljača 2014.;127(2):235–41. doi:10.1007/s00401-013-1214-6 PubMed PMID: 24240814.
 269. Challis C, Hori A, Sampson TR, Yoo BB, Challis RC, Hamilton AM, i sur. Gut-seeded α -synuclein fibrils promote gut dysfunction and brain pathology specifically in aged mice. *Nat Neurosci*. ožujak 2020.;23(3):327–36. doi:10.1038/s41593-020-0589-7 PubMed PMID: 32066981; PubMed Central PMCID: PMC7065967.
 270. Liu G, Yu Q, Zhu H, Tan B, Yu H, Li X, i sur. Amyloid- β mediates intestinal dysfunction and enteric neurons loss in Alzheimer's disease transgenic mouse. *Cell Mol*

- Life Sci. 06. studeni 2023.;80(12):351. doi:10.1007/s00018-023-04948-9 PubMed PMID: 37930455; PubMed Central PMCID: PMC11072809.
271. Chen C, Zhou Y, Wang H, Alam A, Kang SS, Ahn EH, i sur. Gut inflammation triggers C/EBP β / δ -secretase-dependent gut-to-brain propagation of A β and Tau fibrils in Alzheimer's disease. *EMBO J.* 01. rujan 2021.;40(17):e106320. doi:10.15252/embj.2020106320 PubMed PMID: 34260075; PubMed Central PMCID: PMC8408610.
 272. Phillips RJ, Walter GC, Ringer BE, Higgs KM, Powley TL. Alpha-synuclein immunopositive aggregates in the myenteric plexus of the aging Fischer 344 rat. *Exp Neurol.* studeni 2009.;220(1):109–19. doi:10.1016/j.expneurol.2009.07.025 PubMed PMID: 19664623; PubMed Central PMCID: PMC2761519.
 273. Derkinderen P, Cossais F, de Guilhem de Lataillade A, Leclair-Visonneau L, Neunlist M, Paillusson S, i sur. Gastrointestinal mucosal biopsies in Parkinson's disease: beyond alpha-synuclein detection. *J Neural Transm (Vienna).* rujan 2022.;129(9):1095–103. doi:10.1007/s00702-021-02445-6 PubMed PMID: 34816335.
 274. Adams MD, Dubnick M, Kerlavage AR, Moreno R, Kelley JM, Utterback TR, i sur. Sequence identification of 2,375 human brain genes. *Nature.* 13. veljača 1992.;355(6361):632–4. doi:10.1038/355632a0 PubMed PMID: 1538749.
 275. Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science.* 20. listopad 1995.;270(5235):484–7. doi:10.1126/science.270.5235.484 PubMed PMID: 7570003.
 276. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* siječanj 2009.;10(1):57–63. doi:10.1038/nrg2484 PubMed PMID: 19015660; PubMed Central PMCID: PMC2949280.
 277. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet.* 17. svibanj 2016.;17(6):333–51. doi:10.1038/nrg.2016.49 PubMed PMID: 27184599; PubMed Central PMCID: PMC10373632.
 278. Tzecz-Interián JA, González-Padilla D, Góngora-Castillo EB. Bioinformatics perspectives on transcriptomics: A comprehensive review of bulk and single-cell RNA sequencing analyses. *Quant Biol.* lipanj 2025.;13(2):e78. doi:10.1002/qub2.78 PubMed PMID: 41675508; PubMed Central PMCID: PMC12806032.
 279. The GTEx Consortium atlas of genetic regulatory effects across human tissues. *Science.* 11. rujan 2020.;369(6509):1318–30. doi:10.1126/science.aaz1776 PubMed PMID: 32913098; PubMed Central PMCID: PMC7737656.
 280. Tang F, Barbacioru C, Wang Y, Nordman E, Lee C, Xu N, i sur. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods.* svibanj 2009.;6(5):377–82. doi:10.1038/nmeth.1315 PubMed PMID: 19349980.
 281. Klein AM, Mazutis L, Akartuna I, Tallapragada N, Veres A, Li V, i sur. Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells. *Cell.* 21.

- svibanj 2015.;161(5):1187–201. doi:10.1016/j.cell.2015.04.044 PubMed PMID: 26000487; PubMed Central PMCID: PMC4441768.
282. Elmentaite R, Kumasaka N, Roberts K, Fleming A, Dann E, King HW, i sur. Cells of the human intestinal tract mapped across space and time. *Nature*. 2021.;597(7875):250–5. doi:10.1038/s41586-021-03852-1 PubMed PMID: 34497389; PubMed Central PMCID: PMC8426186.
 283. Eraslan G, Drokhlyansky E, Anand S, Fiskin E, Subramanian A, Slyper M, i sur. Single-nucleus cross-tissue molecular reference maps toward understanding disease gene function. *Science*. 13. svibanj 2022.;376(6594):eabl4290. doi:10.1126/science.abl4290 PubMed PMID: 35549429; PubMed Central PMCID: PMC9383269.
 284. García-Ortega LF, Martínez O. How Many Genes Are Expressed in a Transcriptome? Estimation and Results for RNA-Seq. *PLoS One*. 2015.;10(6):e0130262. doi:10.1371/journal.pone.0130262 PubMed PMID: 26107654; PubMed Central PMCID: PMC4479379.
 285. Slovin S, Carissimo A, Panariello F, Grimaldi A, Bouché V, Gambardella G, i sur. Single-Cell RNA Sequencing Analysis: A Step-by-Step Overview. *Methods Mol Biol*. 2021.;2284:343–65. doi:10.1007/978-1-0716-1307-8_19 PubMed PMID: 33835452.
 286. Qiu P. Embracing the dropouts in single-cell RNA-seq analysis. *Nat Commun*. 03. ožujak 2020.;11(1):1169. doi:10.1038/s41467-020-14976-9
 287. Palmer D, Fabris F, Doherty A, Freitas AA, de Magalhães JP. Ageing transcriptome meta-analysis reveals similarities and differences between key mammalian tissues. *Aging (Albany NY)*. 11. veljača 2021.;13(3):3313–41. doi:10.18632/aging.202648 PubMed PMID: 33611312; PubMed Central PMCID: PMC7906136.
 288. Alfego D, Rodeck U, Kriete A. Global mapping of transcription factor motifs in human aging. *PLoS One*. 02. siječanj 2018.;13(1):e0190457. doi:10.1371/journal.pone.0190457 PubMed PMID: 29293662; PubMed Central PMCID: PMC5749797.
 289. Almanzar N, Antony J, Baghel AS, Bakerman I, Bansal I, Barres BA, i sur. A single-cell transcriptomic atlas characterizes ageing tissues in the mouse. *Nature*. srpanj 2020.;583(7817):590–5. doi:10.1038/s41586-020-2496-1
 290. Lukiw WJ, Bazan NG. Strong nuclear factor-kappaB-DNA binding parallels cyclooxygenase-2 gene transcription in aging and in sporadic Alzheimer's disease superior temporal lobe neocortex. *J Neurosci Res*. 01. rujanj 1998.;53(5):583–92. doi:10.1002/(SICI)1097-4547(19980901)53:5<583::AID-JNR8>3.0.CO;2-5 PubMed PMID: 9726429.
 291. Du L, Liu Q, Shen F, Fan Z, Hou R, Yue B, i sur. Transcriptome analysis reveals immune-related gene expression changes with age in giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) blood. *Aging (Albany NY)*. 14. siječanj 2019.;11(1):249–62. doi:10.18632/aging.101747 PubMed PMID: 30641486; PubMed Central PMCID: PMC6339791.
 292. Jing Y, Wang Q, Bai F, Li Z, Li Y, Liu W, i sur. Age-related alterations in gut homeostasis are microbiota dependent. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 25. ožujak

- 2025.;11:51. doi:10.1038/s41522-025-00677-y PubMed PMID: 40133348; PubMed Central PMCID: PMC11937415.
293. Daly AC, Cambuli F, Äijö T, Lötstedt B, Marjanovic ND, Fernandez S, i sur. Tissue and cellular spatiotemporal dynamics in colon aging. *Nat Biotechnol.* 22. listopad 2025.;1–13. doi:10.1038/s41587-025-02830-6
 294. Sarver DC, Saqib M, Chen F, Wong GW. Mitochondrial respiration atlas reveals differential changes in mitochondrial function across sex and age. *Elife.* 20. prosinac 2024.;13:RP96926. doi:10.7554/eLife.96926 PubMed PMID: 39704485; PubMed Central PMCID: PMC11661797.
 295. Noh SG, Kim HW, Kim S, Yu BP, Yoon JH, Chung KW, i sur. Co-regulation of Nr1d1 and Ppar α in age-related changes of lipid metabolism and its modulation by calorie restriction. *Aging (Albany NY).* 28. srpanj 2025.;17(7):1810–33. doi:10.18632/aging.206289 PubMed PMID: 40728518; PubMed Central PMCID: PMC12339034.
 296. Lomas-Soria C, Bautista CJ, Reyes-Castro LA, Ibañez-Chavez C, Rodríguez-González GL, Cox L, i sur. MATERNAL OBESITY PROGRAMS EARLY AGING OF MALE RAT OFFSPRING (F1) LIVER METABOLISM AND TRANSCRIPTOME. *Innov Aging.* 30. lipanj 2017.;1(Suppl 1):859. doi:10.1093/geroni/igx004.3092 PubMed PMID: null; PubMed Central PMCID: PMC6184803.
 297. The Tabula Sapiens Consortium. The Tabula Sapiens: A multiple-organ, single-cell transcriptomic atlas of humans. *Science.* 13. svibanj 2022.;376(6594):eabl4896. doi:10.1126/science.abl4896
 298. Quake SR. Tabula Sapiens reveals transcription factor expression, senescence effects, and sex-specific features in cell types from 28 human organs and tissues. *bioRxiv.* 27. kolovoz 2025.;2024.12.03.626516. doi:10.1101/2024.12.03.626516 PubMed PMID: 40909520; PubMed Central PMCID: PMC12407789.
 299. Bartz J, Ma X, Zhang L, Dong X. Human Cell Aging Transcriptome Atlas (HCATA): a single-cell atlas of age-associated transcriptomic alterations across human tissues. *Commun Biol.* 09. listopad 2025.;8(1):1450. doi:10.1038/s42003-025-08845-8
 300. Aging Atlas Consortium. Aging Atlas: a multi-omics database for aging biology. *Nucleic Acids Res.* 08. siječanj 2021.;49(D1):D825–30. doi:10.1093/nar/gkaa894
 301. Rao A, Barkley D, França GS, Yanai I. Exploring tissue architecture using spatial transcriptomics. *Nature.* kolovoz 2021.;596(7871):211–20. doi:10.1038/s41586-021-03634-9 PubMed PMID: 34381231; PubMed Central PMCID: PMC8475179.
 302. Širvinskis D, Omrani O, Lu J, Rasa M, Krepelova A, Adam L, i sur. Single-cell atlas of the aging mouse colon. *iScience.* 20. svibanj 2022.;25(5):104202. doi:10.1016/j.isci.2022.104202 PubMed PMID: 35479413; PubMed Central PMCID: PMC9035718.
 303. Funk MC, Gleixner JG, Heigwer F, Vonficht D, Valentini E, Aydin Z, i sur. Aged intestinal stem cells propagate cell-intrinsic sources of inflammaging in mice. *Dev Cell.*

18. prosinac 2023.;58(24):2914-2929.e7. doi:10.1016/j.devcel.2023.11.013 PubMed PMID: 38113852.
304. Choi J, Houston M, Wang R, Ye K, Li W, Zhang X, i sur. Intestinal stem cell aging at single-cell resolution: Transcriptional perturbations alter cell developmental trajectory reversed by gerotherapeutics. *Aging Cell*. svibanj 2023.;22(5):e13802. doi:10.1111/accel.13802 PubMed PMID: 36864750; PubMed Central PMCID: PMC10186593.
305. Meng L, Yang Y, He S, Chen H, Zhan Y, Yang R, i sur. Single-cell sequencing of the vermiform appendix during development identifies transcriptional relationships with appendicitis in preschool children. *BMC Med*. 12. rujan 2024.;22(1):383. doi:10.1186/s12916-024-03611-9 PubMed PMID: 39267041; PubMed Central PMCID: PMC11395239.
306. Wang Y, Zhang X, Qing M, Dang W, Bai X, Wang Y, i sur. Trends in intestinal aging: From underlying mechanisms to therapeutic strategies. *Acta Pharm Sin B*. srpanj 2025.;15(7):3372–403. doi:10.1016/j.apsb.2025.05.011 PubMed PMID: 40698139; PubMed Central PMCID: PMC12278430.
307. Luettig J, Rosenthal R, Barmeyer C, Schulzke J. Claudin-2 as a mediator of leaky gut barrier during intestinal inflammation. *Tissue Barriers*. 03. travanj 2015.;3(1–2):e977176. doi:10.4161/21688370.2014.977176 PubMed PMID: 25838982.
308. Ngo V, Duennwald ML. Nrf2 and Oxidative Stress: A General Overview of Mechanisms and Implications in Human Disease. *Antioxidants (Basel)*. 27. studeni 2022.;11(12):2345. doi:10.3390/antiox11122345 PubMed PMID: 36552553; PubMed Central PMCID: PMC9774434.
309. Wen X, Tang S, Wan F, Zhong R, Chen L, Zhang H. The PI3K/Akt-Nrf2 Signaling Pathway and Mitophagy Synergistically Mediate Hydroxytyrosol to Alleviate Intestinal Oxidative Damage. *Int J Biol Sci*. 2024.;20(11):4258–76. doi:10.7150/ijbs.97263 PubMed PMID: 39247828; PubMed Central PMCID: PMC11379072.
310. Dincel O, Göksu M, Türk BA, Pehlivanoglu B, İşler S. Incidental Findings in Routine Histopathological Examination of Appendectomy Specimens; Retrospective Analysis of 1970 Patients. *Indian J Surg*. veljača 2018.;80(1):48–53. doi:10.1007/s12262-016-1557-z PubMed PMID: 29581685; PubMed Central PMCID: PMC5866801.
311. Emre A, Akbulut S, Bozdogan Z, Yilmaz M, Kanlıoğlu M, Emre R, i sur. Routine histopathologic examination of appendectomy specimens: Retrospective analysis of 1255 patients. *International Surgery*. 2013.;98(4):354–62. doi:10.9738/INTSURG-D-13-00098.1 PubMed PMID: 24229023.
312. Albright JB, Fakhre GP, Nields WW, Metzger PP. Incidental Appendectomy: 18-Year Pathologic Survey and Cost Effectiveness in the Nonmanaged-Care Setting. *Journal of the American College of Surgeons*. 2007.;205(2):298–306. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2007.02.071 PubMed PMID: 17660077.
313. Zhao S, Li CI, Guo Y, Sheng Q, Shyr Y. RnaSeqSampleSize: real data based sample size estimation for RNA sequencing. *BMC Bioinformatics*. 30. svibanj 2018.;19(1):191.

doi:10.1186/s12859-018-2191-5 PubMed PMID: 29843589; PubMed Central PMCID: PMC5975570.

314. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014.;15(12):550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8 PubMed PMID: 25516281; PubMed Central PMCID: PMC4302049.
315. Degen PM, Medo M. Replicability of bulk RNA-Seq differential expression and enrichment analysis results for small cohort sizes. *PLoS Comput Biol.* svibanj 2025.;21(5):e1011630. doi:10.1371/journal.pcbi.1011630 PubMed PMID: 40324149; PubMed Central PMCID: PMC12077797.
316. Reich M, Liefeld T, Gould J, Lerner J, Tamayo P, Mesirov JP. GenePattern 2.0. *Nat Genet.* svibanj 2006.;38(5):500–1. doi:10.1038/ng0506-500 PubMed PMID: 16642009.
317. Aggarwal M, Vohra H, Singh P. Histomorphometry of human vermiform appendix. *International Journal of Research in Medical Sciences.* 25. siječanj 2019.;7(2):405–9. doi:10.18203/2320-6012.ijrms20190343
318. Şengiz Erhan S, Dobral A, Kulduk G, Alemdar A. Unusual Histopathological Findings in Cases with a Preliminary Clinical Diagnosis of Acute Appendicitis: What was Expected, What Did We Discover? *Istanbul Medical Journal.* 2022.;23(4):247–53. doi:10.4274/imj.galenos.2022.03342
319. Jang I, Chae K, Cho J. Effects of age and strain on small intestinal and hepatic antioxidant defense enzymes in Wistar and Fisher 344 rats. *Mechanisms of Ageing and Development.* 15. svibanj 2001.;122(6):561–70. doi:10.1016/S0047-6374(01)00236-6
320. Xu X, Pang Y, Fan X. Mitochondria in oxidative stress, inflammation and aging: from mechanisms to therapeutic advances. *Signal Transduct Target Ther.* 11. lipanj 2025.;10(1):190. doi:10.1038/s41392-025-02253-4 PubMed PMID: 40500258; PubMed Central PMCID: PMC12159213.
321. Xiao X, Hu M, Gao L, Yuan H, Chong B, Liu Y, i sur. Low-input redoxomics facilitates global identification of metabolic regulators of oxidative stress in the gut. *Sig Transduct Target Ther.* 08. siječanj 2025.;10(1):8. doi:10.1038/s41392-024-02094-7
322. Zheng H, Zhang C, Wang Q, Feng S, Fang Y, Zhang S. The impact of aging on intestinal mucosal immune function and clinical applications. *Frontiers in Immunology.* 28. studeni 2022.;13. doi:10.3389/fimmu.2022.1029948 PubMed PMID: 36524122.
323. Homolak J. Gastrointestinal redox homeostasis in ageing. *Biogerontology.* 01. listopad 2023.;24(5):741–52. doi:10.1007/s10522-023-10049-8
324. Bellezza I, Giambanco I, Minelli A, Donato R. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* 01. svibanj 2018.;1865(5):721–33. doi:10.1016/j.bbamcr.2018.02.010
325. Jaiswal AK. Regulation of genes encoding NAD(P)H:quinone oxidoreductases. *Free Radical Biology and Medicine.* 01. kolovoz 2000.;29(3):254–62. doi:10.1016/S0891-5849(00)00306-3

326. Zhou L, Zhang H, Davies KJA, Forman HJ. Aging-related decline in the induction of Nrf2-regulated antioxidant genes in human bronchial epithelial cells. *Redox Biol.* travanj 2018.;14:35–40. doi:10.1016/j.redox.2017.08.014 PubMed PMID: 28863281; PubMed Central PMCID: PMC5576992.
327. Suh JH, Shenvi SV, Dixon BM, Liu H, Jaiswal AK, Liu RM, i sur. Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 09. ožujak 2004.;101(10):3381–6. doi:10.1073/pnas.0400282101 PubMed PMID: 14985508; PubMed Central PMCID: PMC373470.
328. Gounder SS, Kannan S, Devadoss D, Miller CJ, Whitehead KJ, Odelberg SJ, i sur. Impaired transcriptional activity of Nrf2 in age-related myocardial oxidative stress is reversible by moderate exercise training. *PLoS One.* 2012.;7(9):e45697. doi:10.1371/journal.pone.0045697 PubMed PMID: 23029187; PubMed Central PMCID: PMC3454427.
329. Kruse ML, Friedrich M, Arlt A, Röcken C, Egberts JH, Sebens S, i sur. Colonic Lamina Propria Inflammatory Cells from Patients with IBD Induce the Nuclear Factor-E2 Related Factor-2 Thereby Leading to Greater Proteasome Activity and Apoptosis Protection in Human Colonocytes. *Inflamm Bowel Dis.* 01. studeni 2016.;22(11):2593–606. doi:10.1097/MIB.0000000000000925
330. Yagishita Y, McCallum ML, Kensler TW, Wakabayashi N. Constitutive Activation of Nrf2 in Mice Expands Enterogenesis in Small Intestine Through Negative Regulation of Math1. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology.* 01. siječanj 2021.;11(2):503–24. doi:10.1016/j.jcmgh.2020.08.013 PubMed PMID: 32896624.
331. Piechota-Polanczyk A, Mariwani Z, Fichna J, Polanczyk A, Jozkowicz A. Chemical Inhibition of NRF2 Transcriptional Activity Influences Colon Function and Oestrogen Receptor Expression in Mice at Different Ages. *Int J Mol Sci.* 20. prosinac 2024.;25(24):13647. doi:10.3390/ijms252413647 PubMed PMID: 39769410; PubMed Central PMCID: PMC11678879.
332. Nguyen TT, Baumann P, Tüscher O, Schick S, Endres K. The Aging Enteric Nervous System. *Int J Mol Sci.* 30. svibanj 2023.;24(11):9471. doi:10.3390/ijms24119471 PubMed PMID: 37298421; PubMed Central PMCID: PMC10253713.
333. Perea D, Guiu J, Hudry B, Konstantinidou C, Milona A, Hadjieconomou D, i sur. Ret receptor tyrosine kinase sustains proliferation and tissue maturation in intestinal epithelia. *EMBO J.* 01. listopad 2017.;36(20):3029–45. doi:10.15252/embj.201696247
334. Yu W, Zhang H, Shin MR, Sesti F. Oxidation of KCNB1 potassium channels in the murine brain during aging is associated with cognitive impairment. *Biochem Biophys Res Commun.* 14. svibanj 2019.;512(4):665–9. doi:10.1016/j.bbrc.2019.03.130 PubMed PMID: 30922570; PubMed Central PMCID: PMC6471606.
335. Urrutia J, Arrizabalaga-Iriondo A, Sanchez-Del-Rey A, Martinez-Ibargüen A, Gallego M, Casis O, i sur. Therapeutic role of voltage-gated potassium channels in age-related neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci.* 2024.;18:1406709.

doi:10.3389/fncel.2024.1406709 PubMed PMID: 38827782; PubMed Central PMCID: PMC11140135.

336. Delfino G, Briand JB, Oullier T, Nienkemper L, Greig J, Véziers J, i sur. Characterization of mitochondria-associated ER membranes in the enteric nervous system under physiological and pathological conditions. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. ožujak 2024.;326(3):G330–43. doi:10.1152/ajpgi.00224.2023
337. Görlach A, Bertram K, Hudecova S, Krizanova O. Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol.* prosinac 2015.;6:260–71. doi:10.1016/j.redox.2015.08.010 PubMed PMID: 26296072; PubMed Central PMCID: PMC4556774.
338. Seifi M, Swinny JD. Immunolocalization of AMPA receptor subunits within the enteric nervous system of the mouse colon and the effect of their activation on spontaneous colonic contractions. *Neurogastroenterology & Motility*. 2016.;28(5):705–20. doi:10.1111/nmo.12768
339. Filpa V, Moro E, Protasoni M, Crema F, Frigo G, Giaroni C. Role of glutamatergic neurotransmission in the enteric nervous system and brain-gut axis in health and disease. *Neuropharmacology*. prosinac 2016.;111:14–33. doi:10.1016/j.neuropharm.2016.08.024 PubMed PMID: 27561972.
340. Liu SJ, Savtchouk I. Ca(2+) permeable AMPA receptors switch allegiances: mechanisms and consequences. *J Physiol*. 01. siječanj 2012.;590(1):13–20. doi:10.1113/jphysiol.2011.213926 PubMed PMID: 21893602; PubMed Central PMCID: PMC3300041.
341. Peterson L, Coca R, Parikh S, McCarthy K, Man HY. ADAR2-mediated Q/R editing of GluA2 in homeostatic synaptic plasticity. *Science Signaling*. 13. svibanj 2025.;18(886):eadr1442. doi:10.1126/scisignal.adr1442
342. Sytnyk V, Leshchyns'ka I, Schachner M. Neural Cell Adhesion Molecules of the Immunoglobulin Superfamily Regulate Synapse Formation, Maintenance, and Function. *Trends Neurosci.* svibanj 2017.;40(5):295–308. doi:10.1016/j.tins.2017.03.003 PubMed PMID: 28359630.
343. Kozlova I, Sah S, Keable R, Leshchyns'ka I, Janitz M, Sytnyk V. Cell Adhesion Molecules and Protein Synthesis Regulation in Neurons. *Front Mol Neurosci*. 2020.;13:592126. doi:10.3389/fnmol.2020.592126 PubMed PMID: 33281551; PubMed Central PMCID: PMC7689008.
344. Yasuda T, Delbono O, Wang ZM, Messi ML, Girard T, Urwyler A, i sur. JP-45/JSRP1 variants affect skeletal muscle excitation-contraction coupling by decreasing the sensitivity of the dihydropyridine receptor. *Hum Mutat.* siječanj 2013.;34(1):184–90. doi:10.1002/humu.22209 PubMed PMID: 22927026; PubMed Central PMCID: PMC3519957.
345. Selman M, Pardo A. Fibroageing: An ageing pathological feature driven by dysregulated extracellular matrix-cell mechanobiology. *Ageing Research Reviews*. 01. rujan 2021.;70:101393. doi:10.1016/j.arr.2021.101393

346. Jang DH, Shin JW, Shim E, Ohtani N, Jeon OH. The connection between aging, cellular senescence and gut microbiome alterations: A comprehensive review. *Aging Cell*. 2024.;23(10):e14315. doi:10.1111/accel.14315
347. Hodgkinson CP, Gomez JA, Payne AJ, Zhang L, Wang X, Dal-Pra S, i sur. Abi3bp Regulates Cardiac Progenitor Cell Proliferation and Differentiation. *Circulation Research*. 05. prosinac 2014.;115(12):1007–16. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.304216
348. DeAgüero JL, McKown EN, Zhang L, Keirseý J, Fischer EG, Samedi VG, i sur. Altered protein levels in the isolated extracellular matrix of failing human hearts with dilated cardiomyopathy. *Cardiovascular Pathology*. 01. siječanj 2017.;26:12–20. doi:10.1016/j.carpath.2016.10.001
349. Godfrey AK, Naqvi S, Chmátal L, Chick JM, Mitchell RN, Gygi SP, i sur. Quantitative analysis of Y-Chromosome gene expression across 36 human tissues. *Genome Res*. 01. lipanj 2020.;30(6):860–73. doi:10.1101/gr.261248.120 PubMed PMID: 32461223.
350. Vidaki A, González DM, Jiménez BP, Kayser M. Male-specific age estimation based on Y-chromosomal DNA methylation. *Aging*. 11. ožujak 2021.;13(5):6442–58. doi:10.18632/aging.202775 PubMed PMID: 33744870.
351. Li G, Wang C, Guan X, Bai Y, Feng Y, Wei W, i sur. Age-related DNA methylation on Y chromosome and their associations with total mortality among Chinese males. *Aging Cell*. 2022.;21(3):e13563. doi:10.1111/accel.13563
352. Liu Z, Zhang Y, Xie J, Li C, Wang X, Shen J, i sur. Regenerating gene 1B silencing inhibits colon cancer cell HCT116 proliferation and invasion. *Int J Biol Markers*. 26. svibanj 2015.;30(2):e217-225. doi:10.5301/jbm.5000133 PubMed PMID: 25768000.
353. Gazi MA, Alam MA, Fahim SM, Wahid BZ, Khan SS, Islam MO, i sur. Infection With *Escherichia Coli* Pathotypes Is Associated With Biomarkers of Gut Enteropathy and Nutritional Status Among Malnourished Children in Bangladesh. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022.;12:901324. doi:10.3389/fcimb.2022.901324 PubMed PMID: 35873159; PubMed Central PMCID: PMC9299418.
354. Dönertaş HM, İzgi H, Kamacıoğlu A, He Z, Khaitovich P, Somel M. Gene expression reversal toward pre-adult levels in the aging human brain and age-related loss of cellular identity. *Sci Rep*. 19. srpanj 2017.;7(1):5894. doi:10.1038/s41598-017-05927-4
355. Holzschek N, Söhle J, Kristof B, Grönniger E, Gallinat S, Wenck H, i sur. Multi-omics network analysis reveals distinct stages in the human aging progression in epidermal tissue. *Aging*. 18. lipanj 2020.;12(12):12393–409. doi:10.18632/aging.103499 PubMed PMID: 32554863.
356. Qiu A, Zhang H, Kennedy BK, Lee A. Spatio-temporal correlates of gene expression and cortical morphology across lifespan and aging. *NeuroImage*. 01. siječanj 2021.;224:117426. doi:10.1016/j.neuroimage.2020.117426
357. Sailaja BS, He XC, Li L. The regulatory niche of intestinal stem cells. *J Physiol*. 01. rujun 2016.;594(17):4827–36. doi:10.1113/JP271931 PubMed PMID: 27060879; PubMed Central PMCID: PMC5009778.

358. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, i sur. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*. 14. svibanj 2009.;459(7244):262–5. doi:10.1038/nature07935 PubMed PMID: 19329995.
359. Qi Z, Li Y, Zhao B, Xu C, Liu Y, Li H, i sur. BMP restricts stemness of intestinal Lgr5+ stem cells by directly suppressing their signature genes. *Nat Commun*. 06. siječanj 2017.;8:13824. doi:10.1038/ncomms13824 PubMed PMID: 28059064; PubMed Central PMCID: PMC5227110.
360. Igarashi M, Miura M, Williams E, Jaksch F, Kadowaki T, Yamauchi T, i sur. NAD+ supplementation rejuvenates aged gut adult stem cells. *Aging Cell*. 2019.;18(3):e12935. doi:10.1111/acer.12935
361. Annunziata F, Rasa SMM, Krepelova A, Lu J, Minetti A, Omrani O, i sur. Paneth cells drive intestinal stem cell competition and clonality in aging and calorie restriction. *European Journal of Cell Biology*. 01. rujan 2022.;101(4):151282. doi:10.1016/j.ejcb.2022.151282
362. Liu J, Liu D, Zhang X, Li Y, Fu X, He W, i sur. NELL2 modulates cell proliferation and apoptosis via ERK pathway in the development of benign prostatic hyperplasia. *Clin Sci (Lond)*. 07. srpanj 2021.;135(13):1591–608. doi:10.1042/CS20210476
363. Aihara K, Kuroda S, Kanayama N, Matsuyama S, Tanizawa K, Horie M. A neuron-specific EGF family protein, NELL2, promotes survival of neurons through mitogen-activated protein kinases. *Brain Res Mol Brain Res*. 19. kolovoz 2003.;116(1–2):86–93. doi:10.1016/s0169-328x(03)00256-0 PubMed PMID: 12941464.
364. Qiu Q, Sun Y, Yang L, Li Q, Feng Y, Li M, i sur. TSPAN32 suppresses chronic myeloid leukemia pathogenesis and progression by stabilizing PTEN. *Sig Transduct Target Ther*. 01. ožujak 2023.;8(1):90. doi:10.1038/s41392-022-01290-7
365. Lombardo SD, Mazzon E, Basile MS, Campo G, Corsico F, Presti M, i sur. Modulation of Tetraspanin 32 (TSPAN32) Expression in T Cell-Mediated Immune Responses and in Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci*. 04. rujan 2019.;20(18):4323. doi:10.3390/ijms20184323 PubMed PMID: 31487788; PubMed Central PMCID: PMC6770290.
366. Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol*. 29. lipanj 1998.;141(7):1539–50. doi:10.1083/jcb.141.7.1539 PubMed PMID: 9647647; PubMed Central PMCID: PMC2132999.
367. Nio-Kobayashi J, Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T. Immunohistochemical Localization of Six Galectin Subtypes in the Mouse Digestive Tract. *J Histochem Cytochem*. 01. siječanj 2009.;57(1):41–50. doi:10.1369/jhc.2008.952317
368. Proteolytic processing of galectin-3 by meprin metalloproteases is crucial for host-microbiome homeostasis. *Science Advances* [Internet]. [citirano 17. travanj 2026.]. Dostupno na: <https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.adf4055>

369. Mey A, Leffler H, Hmama Z, Normier G, Revillard JP. The animal lectin galectin-3 interacts with bacterial lipopolysaccharides via two independent sites [Internet]. [citirano 17. travanj 2026.]. Dostupno na: <https://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.156.4.1572>
370. Detection of Galectin-3 Interaction with Commensal Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* [Internet]. [citirano 17. travanj 2026.]. Dostupno na: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.03694-12>
371. Gupta SK, Masinick S, Garrett M, Hazlett LD. Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide binds galectin-3 and other human corneal epithelial proteins. *Infection and Immunity*. srpanj 1997.;65(7):2747–53. doi:10.1128/iai.65.7.2747-2753.1997
372. Bresalier RS, Byrd JC, Wang L, Raz A. Colon cancer mucin: a new ligand for the beta-galactoside-binding protein galectin-3. *Cancer Res*. 01. listopad 1996.;56(19):4354–7. PubMed PMID: 8813123.
373. Yu TB, Dodd S, Yu LG, Subramanian S. Serum galectins as potential biomarkers of inflammatory bowel diseases. *PLOS ONE*. sij 2020.;15(1):e0227306. doi:10.1371/journal.pone.0227306
374. Argüeso P, Mauris J, Uchino Y. Galectin-3 as a regulator of the epithelial junction: Implications to wound repair and cancer. *Tissue Barriers*. 03. srpanj 2015.;3(3):e1026505. doi:10.1080/21688370.2015.1026505
375. Puthenedam M, Wu F, Shetye A, Michaels A, Rhee KJ, Kwon JH. Matrilysin-1 (MMP7) cleaves galectin-3 and inhibits wound healing in intestinal epithelial cells. *Inflamm Bowel Dis*. 01. siječanj 2011.;17(1):260–7. doi:10.1002/ibd.21443
376. Cao Z, Said N, Amin S, Wu HK, Bruce A, Garate M, i sur. Galectins-3 and -7, but not Galectin-1, Play a Role in Re-epithelialization of Wounds *. *Journal of Biological Chemistry*. 01. studeni 2002.;277(44):42299–305. doi:10.1074/jbc.M200981200
377. Mauris J, Woodward AM, Cao Z, Panjwani N, Argüeso P. Molecular basis for MMP9 induction and disruption of epithelial cell–cell contacts by galectin-3. *J Cell Sci*. 15. srpanj 2014.;127(14):3141–8. doi:10.1242/jcs.148510
378. Li X, Li C, Zhang W, Wang Y, Qian P, Huang H. Inflammation and aging: signaling pathways and intervention therapies. *Signal Transduct Target Ther*. 08. lipanj 2023.;8(1):239. doi:10.1038/s41392-023-01502-8 PubMed PMID: 37291105; PubMed Central PMCID: PMC10248351.
379. Lee YH, Bae YS. Phospholipase D2 downregulation induces cellular senescence through a reactive oxygen species-p53-p21Cip1/WAF1 pathway. *FEBS Lett*. 25. kolovoz 2014.;588(17):3251–8. doi:10.1016/j.febslet.2014.07.009 PubMed PMID: 25064843.
380. Park JH, Park JW, Lee JH, Kim DY, Hahm JH, Bae YS. Role of phospholipase D in the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Exp Mol Med*. travanj 2018.;50(4):1–10. doi:10.1038/s12276-017-0015-8

381. Sang X, Wang Q, Ning Y, Wang H, Zhang R, Li Y, i sur. Age-Related Mucus Barrier Dysfunction in Mice Is Related to the Changes in Muc2 Mucin in the Colon. *Nutrients*. 11. travanj 2023.;15(8). doi:10.3390/nu15081830
382. Wojnacki J, Lujan AL, Brouwers N, Aranda-Vallejo C, Bigliani G, Rodriguez MP, i sur. Tetraspanin-8 sequesters syntaxin-2 to control biphasic release propensity of mucin granules. *Nat Commun*. 22. lipanj 2023.;14(1):3710. doi:10.1038/s41467-023-39277-9
383. Wang X, Chen S, Wang J, Chen Y, Guo Y, Wang Q, i sur. Olfactomedin-4 deletion exacerbates DSS-induced colitis through a matrix metalloproteinase-9-dependent mechanism. *International Journal of Biological Sciences*. 09. travanj 2023.;19(7):2150–66. doi:10.7150/ijbs.80441
384. Kim Y, Kang B, Kim JC, Park TJ, Kang HY. Senescent Fibroblast–Derived GDF15 Induces Skin Pigmentation. *J Invest Dermatol*. 01. prosinac 2020.;140(12):2478–2486.e4. doi:10.1016/j.jid.2020.04.016 PubMed PMID: 32416083.
385. Pence BD. Growth Differentiation Factor-15 in Immunity and Aging. *Front Aging*. 2022.;3:837575. doi:10.3389/fragi.2022.837575 PubMed PMID: 35821815; PubMed Central PMCID: PMC9261309.
386. Branca JJV, Gulisano M, Nicoletti C. Intestinal epithelial barrier functions in ageing. *Ageing Res Rev*. rujun 2019.;54:100938. doi:10.1016/j.arr.2019.100938 PubMed PMID: 31369869.
387. Zhao Y, Tang H, Kuai Y, Xu J, Sun B, Li Y. Identification of the function of FOSB in cholangiocarcinoma using bioinformatics analysis. *Transl Cancer Res*. 31. prosinac 2023.;12(12):3629–40. doi:10.21037/tcr-23-829 PubMed PMID: 38192979; PubMed Central PMCID: PMC10774044.
388. Tang C, Jiang Y, Shao W, Shi W, Gao X, Qin W, i sur. Abnormal expression of FOSB correlates with tumor progression and poor survival in patients with gastric cancer. *Int J Oncol*. listopad 2016.;49(4):1489–96. doi:10.3892/ijo.2016.3661 PubMed PMID: 27633497.
389. Cervantes-Madrid DL, Nagi S, Asting Gustafsson A. FosB transcription factor regulates COX-2 expression in colorectal cancer cells without affecting PGE2 expression. *Oncol Lett*. ožujak 2017.;13(3):1411–6. doi:10.3892/ol.2017.5571 PubMed PMID: 28454270; PubMed Central PMCID: PMC5403621.
390. Martínez-Zamudio RI, Roux PF, de Freitas JANLF, Robinson L, Doré G, Sun B, i sur. AP-1 imprints a reversible transcriptional programme of senescent cells. *Nat Cell Biol*. srpanj 2020.;22(7):842–55. doi:10.1038/s41556-020-0529-5 PubMed PMID: 32514071; PubMed Central PMCID: PMC7899185.

12. ŽIVOTOPIS

Damir Quien

Doktor medicine, specijalist abdominalne kirurgije

Klinički bolnički centar Split, Klinika za kirurgiju, Zavod za abdominalnu kirurgiju

Adresa: Spinčićeva 1

e-mail: dquien@kbsplit.hr

Radno iskustvo

- Travanj 2018. godine do danas :
Specijalist abdominalne kirurgije, Klinički bolnički centar Split
 - Siječanj 2012 do travanj 2018:
Specijalizant abdominalne kirurgije, Klinički bolnički centar Split
 - Studeni 2010 do prosinac 2011:
Medicinski prodajni predstavnik, Krka Farma D.O.O.
 - Rujan 2009 do rujan 2010:
Pripravnički staž, Klinički bolnički centar Split
-

Obrazovanje

- 2002 do 2009
Doktor medicine, Medicinski Fakultet Sveučilišta u Splitu
 - 2016 do danas
Poslijediplomski studij medicina utemeljena na dokazima, Medicinski Fakultet Sveučilišta u Splitu
 - 2017 do 2018
Poslijediplomski specijalistički studij abdominalna kirurgija, Medicinski Fakultet Sveučilišta u Rijeci
-

Stručno osposobljavanje i edukacije

- Osnovni tečaj laparoskopske kirurgije, Aesculap akademija, Klinički bolnički centar sestre milosrdnice, 04. Veljače 2015. – 06. Veljače 2015., Zagreb, Hrvatska
 - Advanced life support (ALS), Simulacijski centar Rijeka - Kabinet vještina, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, 12. Siječnja 2018. – 14. Siječnja 2018., Rijeka, Hrvatska
 - 26th EAES congress, European Association for Endoscopic Surgery (EAES), 30. Svibnja 2018. – 01. Lipnja 2018. – London, Ujedinjeno Kraljevstvo
 - Minimally invasive colorectal surgery course, National institute of oncology Budapest, 05. Studenoga 2019. – 06. Studenoga 2019., Budimpešta, Mađarska
 - Hernia TEP cadaveric masterclass, 4. Do 5. Rujna 2023, Istanbul, Turska
 - European colorectal congress, 29 studeni do 3. Prosinca 2025, St Gallen, Švicarska
-

Publikacije

Radovi u indeksiranim publikacijama

1. Tavra A, Quien D, Barcot O. Oncological aspect of incidental appendectomy with regard to histopathological findings: A retrospective cohort study. *European Journal of Surgical Oncology* 2023;49:107013. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2023.107013>.
2. Quien D, Korac-Prlic J, Vilović K, Pogorelić Z, Boric M, Barcot O, i sur. Age-Related Transcriptomic Changes in the Vermiform Appendix. *IJMS* 2025;26:11399. <https://doi.org/10.3390/ijms262311399>.

Radovi u ostalim časopisima

1. Karlović D, Kršul D, Borić M, Quien D, Barčot O, Ibukić A i sur. Smjernice za liječenje benignih bolesti anorektalne regije. *Liječnički vjesnik* [Internet]. 2024;146(3-4):77-90. <https://doi.org/10.26800/LV-146-3-4-1>

13. DODATAK

Prilog 1. Informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju

Klinika za kirurgiju

Zavod za abdominalnu kirurgiju

Odjel za koloproktološku kirurgiju

u suradnji s

Klinikom za dječju kirurgiju,

Zavodom za patologiju, sudsku medicinu i citologiju

Kliničkog bolničkog centra Split

i

Medicinskim fakultetom Sveučilišta u Splitu

OBAVIJEST

ZA ISPITANIK /RODITELJA/ ZAKONSKOG ZASTUPNIKA /SKRBNIKA

(zaokružiti odgovarajuće)

Naslov istraživanja

Promjene u izražaju gena crvuljka izazvane imunoseneskencijom i starenjem

Voditelj istraživanja:

Damir Quien, dr. med.

Specijalist abdominalne kirurgije

Klinika za kirurgiju; KBC Split

POZIV ZA SUDJELOVANJE

Poštovana / poštovani, pozivamo Vas da sudjelujete u znanstvenom istraživanju u kojem će se na Vašem uzorku crvuljka, uzetom tijekom abdominalnog zahvata, laboratorijskom, patohistološkom i imunohistokemijskom metodom te analizom transkriptoma, odrediti izražaj RNA molekula i proteina. Ova obavijest sadrži podatke čija je svrha pomoći Vam odlučiti želite li sudjelovati u ovom znanstvenom istraživanju. Prije nego odlučite, želimo da shvatite zašto se

to istraživanje provodi i što ono uključuje. **Zato Vas molimo da pažljivo pročitate ovu obavijest.**

DOSADAŠNJE SPOZNAJE O OVOM PROBLEMU

Sluznica probavnog sustava je imunološki vrlo aktivno tkivo koje predstavlja nepropusnu barijeru te štiti organizam od progutanih patogena i njihovih toksina. Imunološki odgovor sluznice crijeva slabi starenjem u procesu tzv. imunološke senescencije koja je kod ljudi vrlo slabo opisana, a rezultira narušavanjem integriteta epitelne barijere probavnog sustava koji doprinosi razvoju kronične upale kod starije populacije (1,2). Funkcija imunološkog sustava 2

unutar probave vezana je uz razvoj tolerancije za komenzalne mikroorganizme te pružanje adekvatnog imunološkog odgovora na patogene. S obzirom na iznimno aktivnu imunološku osnovu, crvuljak predstavlja odličan model za proučavanje progresivne imunosenescencije crijeva koja se odražava aberantnom ekspresijom imunoloških receptora, upalnih citokina i defenzina, ali i strukturalnih proteina tkiva crvuljka. Usprkos nekim poznatim činjenicama o morfološkim i imunološkim posljedicama starenja, koje su utvrđene prvenstveno na životinjskim modelima poput miša, imunosenescencija probavnog sustava kod ljudi nije detaljno proučena. Naš pristup problematici stoga obuhvaća proučavanje ekspresije proteina u tkivu crvuljka u pedijatrijskoj populaciji u odnosu na srednju i kasnu životnu dob.

1. Jasper H. Annual Review of Physiology Intestinal Stem Cell Aging: Origins and Interventions. Annu Rev Physiol is online. 2019;82:203–29.

2. Mabbott NA, Kobayashi A, Sehgal A, Bradford BM, Pattison M, Donaldson DS. Aging and the mucosal immune system in the intestine. Biogerontology 2014 162. 2014;16(2):133–45.

OBRAZLOŽENJE CILJA / SVRHE ISTRAŽIVANJA

Istraživanje imunosenescencije i integriteta crijevne barijere ključno je za razumijevanje starenja ljudskog probavnog sustava te prevencije i liječenja upalom vođenih malignih bolesti, stoga su ciljevi ovog istraživanja sljedeći:

1. Ispitati ukupni izražaj gena u tkivu inoentnih crvuljaka kod pacijenata pedijatrijske i odrasle populacije te istražiti razlike u ekspresiji gena prilikom starenja tkiva

2. Potvrditi diferencijalnu ekspresiju ključnih gena, koja je utvrđena ispitivanje ukupnog izražaja, na širem uzorku arhivskih tkiva inocentnih crvuljaka uklopljenih u parafin

Ispitivanje obuhvaća analizu uzoraka zdravih (makroskopski urednih) crvuljka uzetih u tijeku abdominalnih zahvata zbog drugih stanja i bolesti u trbušnoj šupljini.

MOGUĆI RIZICI I PREDNOSTI SUDJELOVANJA ZA VAS KAO ISPITANIKA

Moguća prednost je za ispitanika je što će se svi uzorci koji budu uzeti u analizu patohistološki analizirati te se na ovaj način mogu otkriti druge bolesti (tumori, upalne bolesti crijeva...).

Nema rizika povezanih sa sudjelovanjem u ovoj studiji obzirom da se planira uzorkovanje tkiva koje se ionako odstranjuje prema indikaciji. 3

VAŠA ULOGA ISPITANIKA U OVOM ZNANSTVENOM ISTRAŽIVANJU

Na Vama je da odlučite hoćete li sudjelovati u ovom istraživanju. Ako odlučite sudjelovati dobit ćete na potpis ovu obavijest. **Vaše sudjelovanje je dobrovoljno.**

POVJERLJIVOST I UVID U DOKUMENTACIJU

Vaši osobni podatci se čuvaju sukladno Zakonu o zaštiti podataka koji se provodi u KBC Split. Svi podatci će biti elektronski obrađeni i nisu dostupni za javnost. Pristup dokumentaciji ima patolog iz Zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC Split gdje se podatci čuvaju u elektronskom obliku sukladno Zakonu o zaštiti podataka.

ZA ŠTO ĆE SE KORISTITI PODACI DOBIVENI U OVOM ZNANSTVENOM ISTRAŽIVANJU?

Podatci dobiveni ovim znanstvenim istraživanjem mogu biti praktične i znanstvene koristi. Objavit će se u znanstvenim publikacijama. Identitet ispitanika ostaje anoniman.

TKO ORGANIZIRA I FINANCIRA ISPITIVANJE?

Ispitivanje se provodi u okviru doktorske disertacije pod nazivom „Promjene u izražaju gena crvuljka izazvane imunosenescencijom i starenjem“, a financirano je iz sredstava Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

TKO JE PREGLEDAO OVO ISPITIVANJE?

Ovo ispitivanje pregledalo je Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Split, koje je nakon uvida u dokumentaciju odobrilo ispitivanje. Ispitivanje se provodi u skladu sa svim primjenjivim smjernicama, čiji je cilj osigurati pravilno provođenje i sigurnost osoba koje sudjeluju u ovom znanstvenom istraživanju, uključujući Osnove dobre kliničke prakse i Helsinšku deklaraciju.

KOGA KONTAKTIRATI ZA DALJNJE OBAVIJESTI?

Za sve dodatne informacije kontaktirajte

Damir Quien, dr. med.

Klinika za kirurgiju; Zavod za abdominalnu kirurgiju, Odjel koloproktološke kirurgije

Tel: 021/556 420

e-mail:dquien@kbsplit.hr

Preslik potpisane obavijesti dobiva ispitanik. Originalni primjerak potpisane obavijesti zadržava i čuva glavni ispitivač.

Hvala što ste pročitali ovaj dokument i razmotrili sudjelovanje u ovom znanstvenom istraživanju.

Ova obavijest je sastavljena u skladu s Zakonom o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN 150/08), Zakonom o pravima pacijenata Republike Hrvatske (NN 169704) i Zakonom o zaštiti osobnih podataka NN 106/12.

SUGLASNOST ZA SUDJELOVANJE

1. Potvrđujem da sam pročitao/pročitala ovu obavijest za gore navedeno znanstveno istraživanje te sam imao/imala priliku postavljati pitanja.
2. Razumijem da je moje sudjelovanje dobrovoljno te se mogu povući u bilo koje vrijeme, bez navođenja razloga i bez ikakvih posljedica po zdravstvenom ili pravnom pitanju.
3. Razumijem da mojoj medicinskoj dokumentaciji imaju pristup odgovorni pojedinci, tj. glavni istraživač i njegovi suradnici, članovi Etičkog povjerenstva ustanove u kojoj se istraživanje obavlja te članovi Etičkog povjerenstva koje je odobrilo ovo znanstveno istraživanje. Dajem dozvolu tim pojedincima za pristup mojoj medicinskoj dokumentaciji.

4. Pristajem da moj obiteljski liječnik (odnosno član obitelji) bude upoznat s mojim sudjelovanjem u navedenom znanstvenom istraživanju.

5. Želim sudjelovati u navedenom znanstvenom istraživanju.

Ime i prezime Ispitanika / Roditelja / Zakonskog zastupnika / Skrbnika (zaokružiti odgovarajuće)

Potpis: _____

Ime i prezime (tiskanim slovima)_____

Datum:_____

Osoba koja je vodila postupak obavijesti za ispitanika i suglasnosti za sudjelovanje:

Uloga u istraživanju: _____

Potpis: _____

Ime i prezime (tiskanim slovima)_____

Datum:_____

Prilog 2. Odobrenje Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Split



KLINIČKI BOLNIČKI CENTAR SPLIT
ETIČKO POVJERENSTVO

Klasa: 500-03/22-01/90
Urbroj: 2181-147/01/06/M.S.-22-02

Split, 14.06.2022.

IZVOD IZ ZAPISNIKA SJEDNICE ETIČKOG POVJERENSTVA KBC SPLIT 8/2022

13.

Damir Quien, dr.med. iz Klinike za kirurgiju KBC-a Split je uputio Etičkom povjerenstvu zamolbu za odobrenje provedbe istraživanja:

"Promjene u izražaju gena crvuljka izazvane imunosenescencijom i starenjem"

Istraživanje u svrhu doktorske disertacije će se provesti u Klinici za kirurgiju, Klinici za dječju kirurgiju i Zavodu za patologiju, sudsku medicinu i patologiju KBC-a Split.

Suradnici u istraživanju su prof.dr.sc. Katarina Vilović, prof.dr.sc. Zenon Pogorelić, doc.dr.sc. Ognjen Barčot, dr.sc. Matija Borić.

Nakon razmatranja zamolbe, donesen je sljedeći

Zaključak

Iz priložene dokumentacije razvidno je da je Plan istraživanja usklađen s odredbama o zaštiti prava i osobnih podataka ispitanika iz Zakona o zaštiti prava pacijenata (NN169/04, 37/08) i Zakona o provedbi Opće uredbe o zaštiti podataka (NN 42/18), te odredbama Kodeksa liječničke etike i deontologije (NN55/08, 139/15) i pravilima Helsinške deklaracije WMA 1964-2013 na koje upućuje Kodeks.

Etičko povjerenstvo je suglasno i odobrava provođenje istraživanja.

PREDSJEDNIK ETIČKOG POVJERENSTVA
KLINIČKOG BOLNIČKOG CENTRA SPLIT
PROF. DR. SC. MARIJAN SARAGA

Prilog 3. Odobrenje Etičkog povjerenstva Medicinskog Fakulteta Sveučilišta u Splitu



Etičko povjerenstvo

Klasa: 003-08/22-03/0003

Ur. br.: 2181-198-03-04-22-0079

Split, 9. prosinca 2022.

MIŠLJENJE

Etičkog povjerenstva povodom prijave istraživanja:

Promjene u izražaju gena crvuljka izazvane imunosenescencijom i starenjem

- I. Zaprimljen je zahtjev doc. dr. sc. Marine Degoricija za odobrenjem znanstvenog istraživanja pod nazivom **Promjene u izražaju gena crvuljka izazvane imunosenescencijom i starenjem** – provedba znanstvenog istraživanja na ljudima. Predviđeno je da ovo istraživanje započne u ožujku 2023. godine te da traje dvije godine., a provodit će se u Laboratoriju za biokemiju i Laboratoriju za istraživanje raka, Medicinskog fakulteta u Splitu te u Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, Klinici za kirurgiju, Zavodu za abdominalnu kirurgiju, Odjelu za koloproktološku kirurgiju, te u Klinici za dječju kirurgiju, KBCa Split. Glavni ciljevi ovog istraživanja su ispitati ukupni izražaj gena u tkivu Inocentnih crvuljaka kod pacijenata pedijatrijske i odrasle populacije te istražiti razlike u ekspresiji gena prilikom starenja tkiva te potvrditi diferencijalnu ekspresiju ključnih gena, koja je utvrđena ispitivanjem ukupnog izražaja, na širem uzorku arhivskih tkiva inocentnih crvuljaka uklopljenih u parafin.
- II. Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu je, prilikom raspravljanja o ovom predmetu, uzelo u obzir izjavu prijavitelja da ispitanici u okviru predloženog istraživanja neće biti izloženi dodatnom riziku u odnosu na već planirani operativni zahvat. Također je uzeta u obzir izjava da će identitet ispitanika uvijek ostati anoniman.
- I. Sukladno odredbi članka 16. Etičkog kodeksa Medicinskog fakulteta u Splitu Povjerenstvo je zauzelo stajalište kako je predmetno istraživanje **u skladu s odredbama Etičkog kodeksa** koje reguliraju istraživanja na ljudima u znanstvenom, istraživačkom i stručnom radu te važećim pravnim propisima i etičkim načelima i smjernicama čiji je cilj osigurati pravilno provođenje istraživanja, sigurnost sudionika i istraživačku čestitost.
- II. Mišljenje je doneseno jednoglasno.

Predsjednik Povjerenstva:


prof. dr. sc. Marko Ljubković



Dostaviti:

- doc. dr. sc. Marina Degoricija
- arhiv Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta
- arhiv Fakulteta