



**Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie**

PRACA DOKTORSKA

Marta Maria Kopcewicz

***Zmienność procesu gojenia urazów skóry w zależności od wieku,
otyłości oraz płci w aspekcie modulacji ekspresji
czynnika transkrypcyjnego Foxn1***

Praca doktorska wykonana
w Zakładzie Biologicznych Funkcji Żywności
Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie
pod kierunkiem
Prof. dr hab. n. med. Barbary Gawrońskiej-Kozak

Olsztyn, 2022

Szczególne podziękowania składam

Pani Profesor dr hab. n. med. Barbarze Gawrońskiej-Kozak

*za nieocenioną pomoc merytoryczną, cierpliwość,
konstruktywną krytykę oraz za kredyt zaufania, jakim zostałam obdarzona.*

Koleżankom z Zespołu Biologii Regeneracyjnej

*dziękuję za to, że jesteście, za życzliwość,
wrozumiałość i pomoc w każdej sytuacji.*

Pracownikom Zakładu Biologicznych Funkcji Żywności i Zwierzętarni

Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności

Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

dziękuję za wspaniałą atmosferę i mile spędzony czas.

Badania współfinansowano ze środków projektów badawczych Narodowego Centrum Nauki:

OPUS 3 Nr 2012/05/B/NZ5/01537

OPUS 14 Nr 2017/27/B/NZ5/02610

oraz projektu Konsorcjum Naukowego KNOW „Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność”

Nr 05-1/KNOW2/2015



Krajowy Naukowy
Ośrodek Wiodący



Spis treści	
Streszczenie	1
Summary	3
Wykaz wybranych skrótów i akronimów	5
Publikacje stanowiące rozprawę doktorską	7
1. Wstęp	8
1.1. Budowa skóry	8
1.2. Przebieg procesu gojenia urazów skórnych	9
1.3. Ogólnoustrojowe czynniki modyfikujące proces gojenia urazów skóry: wiek, płeć, otyłość	11
1.4. Gojenie bezbliznowe (regeneracja)	13
1.5. Czynniki transkrypcyjny Foxn1 (<i>ang. transcription factor Foxn1</i>)	14
2. Hipoteza i cele badawcze	17
3. Materiał i metody	18
3.1. Materiał badawczy	18
3.1.1. Zwierzęta	18
3.2. Metody	22
3.2.1. Izolacja enzymatyczna komórek skóry właściwej i naskórka	22
3.2.2. Cytometria przepływowa	23
3.2.3. Izolacja RNA oraz RT-qPCR	23
3.2.4. Histologia	24
3.2.5. Izolacja białek oraz analiza ich ekspresji przeprowadzona metodą Western Blot	26
3.2.6. Oznaczanie koncentracji MCP-1 za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA	27
3.2.7. Oznaczanie zawartości hydroksyproliny	28
3.2.8. Analiza statystyczna	28
4. Wyniki	30
4.1. Wpływ wieku, diety i płci na homeostazę niezranionej skóry (<i>Zadanie badawcze 1 i 2</i>)	30
4.2. Porównanie procesu gojenia ran skóry u młodych i starych samców i samic po 8-tygodniowej diecie nisko- lub wysokotłuszczowej (<i>Zadanie badawcze 1 i 2</i>)	30
4.2.1. Analiza przebiegu odpowiedzi immunologicznej.	31
4.2.2. Porównanie przebiegu procesu reepitelializacji	32
4.2.3. Analiza zmian ekspresji Mmp-9, Mmp-13 oraz ich inhibitora Timp-1 w przebiegu procesu gojenia ran	32

4.2.4. Analiza zmian ekspresji Tgf β -1 i Tgf β -3 w procesie gojenia ran	33
4.2.5. Analiza zawartości kolagenu w skórze niezranionej oraz w procesie gojenia ran	34
4.3. Zmiany w ekspresji czynnika transkrypcyjnego Foxn1 i Mmp-9 w niezranionej i pourazowej skórze młodych, dorosłych i starych myszy C57BL/6 (<i>Zadanie badawcze 3 i 4</i>)	36
4.3.1. Ekspresja czynnika transkrypcyjnego Foxn1 oraz Mmp- 9 w skórze niezranionej młodych, dorosłych i starych myszy	36
4.3.2. Zmiany ekspresji Foxn1 w przebiegu procesu gojenia ran skórnych u młodych, dorosłych oraz starych myszy	39
4.3.3. Zmiany ekspresji Mmp-9 w przebiegu procesu gojenia ran skórnych u młodych, dorosłych oraz starych myszy	41
5. Dyskusja	42
6. Wnioski.....	49
Bibliografia	50
Publikacje wraz z oświadczeniami autorów.....	63

Streszczenie

Skóra stanowi zewnętrzną powłokę ochronną organizmu oraz pełni funkcję neuro-, immuno- i endokrynną, zapewniając utrzymanie homeostazy pomiędzy ustrojem a otoczeniem. Zachowanie integralności skóry, szczególnie narażonej na uszkodzenia, jest kluczowe dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Proces gojenia ran prowadzi do szybkiego przywrócenia ciągłości powłok skórnych poprzez wytworzenie blizny w miejscu urazu, a w konsekwencji do odtworzenia funkcji ochronnej zranionej skóry. Prawidłowy przebieg procesu gojenia regulują czynniki lokalne oraz ogólnoustrojowe. Zaburzenia procesu gojenia mogą skutkować zakażeniem rany, powstaniem trudno gojących się ran przewlekłych lub też wytworzeniem blizn przerostowych. Pomimo, iż opisano wpływ poszczególnych czynników ogólnoustrojowych takich jak wiek, płeć lub otyłość na proces gojenia ran skórnych, ich łączny, skumulowany efekt oraz zależności pomiędzy tymi parametrami nie zostały do tej pory zbadane.

Proces gojenia ran z wytworzeniem blizny jest jednym z dwóch możliwych scenariuszy prowadzących do zamknięcia rany. Drugim z nich, znacznie rzadziej spotykanym, jest regeneracja, czyli gojenie bezbliznowe, w którym zostają odtworzone pierwotna budowa i funkcja uszkodzonych narządów. U ssaków gojenie bezbliznowe skóry jest praktycznie niespotykane. Regenerację ran obserwuje się jedynie w skórze płodów (przez pierwsze dwa trymestry rozwoju płodowego) oraz tzw. myszy nagich (*ang. nude*; *Foxn1^{-/-}*). Cechą wspólną obu modeli jest brak aktywnego czynnika transkrypcyjnego Foxn1 (*ang. forkhead box N1*). Ekspresja czynnika transkrypcyjnego Foxn1 jest swoista dla komórek nabłonka dwóch narządów: skóry i grasicy.

W niezranionej skórze Foxn1 odpowiada za indukowanie pierwszych etapów różnicowania się keratynocytów, uczestniczy w rozwoju mieszków włosowych w okresie życia płodowego oraz bierze udział w procesie pigmentacji skóry. Uzyskane przez zespół prof. Gawrońskiej-Kozak wyniki wskazują, że Foxn1 jest zaangażowany w proces gojenia ran skórnych na etapie reepitelializacji oraz przejścia epitelialno-mezenchymalnego (EMT, *ang. epithelial-mesenchymal transition*) w początkowych dniach naprawy urazów skórnych.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było wykazanie potencjalnego, skumulowanego wpływu podeszłego wieku, płci i diety oraz towarzyszących zmian ekspresji czynnika transkrypcyjnego Foxn1 na proces gojenia ran skórnych u myszy C57BL/6. W oparciu o przeprowadzone doświadczenia *in vivo* wykazano, iż najistotniejszy wpływ na przebieg procesu gojenia urazów skóry wywiera postępujący wiek, który jako pojedyncza zmienna, modyfikował ekspresję białka chemotaktycznego monocytów 1 (MCP-1, *ang. monocyte chemoattractant protein 1*), transformującego czynnika wzrostu β -1 (Tgf β -1, *ang. transforming growth factor β -1*) oraz metaloproteinaz macierzy 9 i 13 (Mmp-9, Mmp-13, *ang. matrix metalloproteinases*) oraz zawartości hydroksyproliny. Wiek i płeć jako dwa najistotniejsze, kumulujące się parametry, skutkowały znacznie podwyższoną u młodych samców ekspresją genów *podjednostki α 2 kolagenu typu 1 (Col1 α 2)* i *podjednostki α 1 kolagenu typu 3 (Col3 α 1)*, natomiast wspólny efekt wieku i diety wykazano w aspekcie postępu procesu odbudowy naskórka oraz ekspresji CD68. Zbiorczy wpływ wszystkich analizowanych parametrów: zaobserwowano jedynie w kontekście wysokiej ekspresji mRNA inhibitora metaloproteinaz *Timp-1 (ang. tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1)*.

W prezentowanej pracy wykazano, iż ekspresja czynnika transkrypcyjnego Foxn1 podlega modulacji w przebiegu procesu gojenia urazów skóry, wskazując na jego udział we wczesnej i późnej fazie procesu gojenia ran skórnych. Obecność komórek Foxn1-pozytywnych, wykazujących koekspresję E-kadheryny wraz z N-kadheryną, potwierdza zaangażowanie Foxn1 w procesie EMT w początkowych etapach procesu gojenia ran (5-7 dzień po zranieniu). Współwystępowanie Foxn1 wraz z aktyną mięśni gładkich (α SMA, *ang. smooth muscle actin a*) w komórkach warstwy brodawkowej skóry może świadczyć o udziale Foxn1 w procesie powstawania tkanki bliznowej. Wyniki zrealizowanych badań nie wykazały jednoznacznych zależności pomiędzy poziomami ekspresji czynnika transkrypcyjnego Foxn1 w skórze a wiekiem osobniczym myszy C57BL/6 w obrębie badanych grup wiekowych.

Summary

Skin is the outermost protective barrier of the body that plays an important neuro-, immuno- and endocrine role in maintaining the homeostasis between the organism and the environment. Therefore, ensuring its integrity upon disruption by an injury is crucial for a proper functioning of the body. The aim of a skin wound healing process is to rapidly restore post-injured skin integrity by forming a scar at the site of the injury, and consequently to re-establish the protective function of the skin. Cutaneous healing is regulated by local and systemic factors. Disorders in the healing process may result in wound infection, formation of chronic wounds or hypertrophic scars. While the ability of individual biological factor such as age or obesity to disrupt the subsequent phases of wound repair has already been described, comprehensive analyzes examining the combined effects of age, sex and obesity on cutaneous wound healing are still limited.

Scar-forming healing is one of the two possible resolutions of cutaneous repair. The second one, less common, is a scar-free healing (regeneration). In mammals, skin regeneration is extremely rare. The exceptions include scar-free healing of skin wounds in fetus (during the first two trimesters of fetal development) and “nude mice” (Foxn1 deficient, Foxn1^{-/-}). A characteristic feature of regenerative healing common for both models is the inactivity of transcription factor Foxn1 (forkhead box N1). Expression of Foxn1 is specific to epithelial cells of two organs: skin and thymus.

In uninjured skin Foxn1 regulates the induction of the first stages of keratinocyte differentiation, participates in embryonic development of hair follicles, and contributes to skin pigmentation. Studies by Gawrońska-Kozak et al. indicate that Foxn1 is involved in reepithelialization and epithelial-mesenchymal transition (EMT) during the early phase of cutaneous injury repair.

The aim of the present study was to explore the cumulative effect of age, sex and diet and changes in Foxn1 expression on the skin wound healing in C57BL/6J (B6) mice. Our data, based on *in vivo* experiments, indicate that age has the most fundamental impact on the course of skin wound healing process in the aspect of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), transforming growth factor β -1 (Tgf β -1), matrix metalloproteinases 9 and 13 (Mmp-9 and Mmp-13) expression and hydroxyproline content. The cumulative effect was observed for the combination of two parameters: age and sex, especially for *collagen 1 α 2* (*Coll1 α 2*) and *collagen*

3α1 (Col3α1) expression that was extremely high in young males. The combination of age and diet affected the reepithelialization process and *CD68* expression during cutaneous wound healing. The cumulative effect of the three parameters (age, diet and sex) on skin injury repair was displayed exclusively by differences in *Timp-1 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1)* mRNA levels.

The presented study shows that expression of transcription factor Foxn1 is modulated during the skin wound healing process, indicating its participation in the early and the late stages of cutaneous repair. Foxn1 positive cells co-localize with E-cadherin and N-cadherin, what confirms the involvement of Foxn1 in the epithelial-mesenchymal transition during the early phase of wound healing process (5-7 days after wounding). The co-expression of Foxn1 with smooth muscle actin (α SMA) in papillary dermis at remodelling phase suggests participation of Foxn1 in the process of scar tissue formation. However, the results did not confirm the correlation between the expression levels of transcription factor Foxn1 and the age of C57BL/6 mice within the studied groups.

Wykaz wybranych skrótów i akronimów

AMT	przejście adipocyto- mezenchymalne
αSMA	aktywa mięśni gładkich α
BSA	surowicza albumina wołowa
cDNA	komplementarne DNA
Col1α2	podjednostka α 2 kolagenu typu 1
Col 3α1	podjednostka α 1 kolagenu typu 3
DAPI	4',6-diamidyno-2-fenylindol
DHT	5 α -dihydrotestosteron
DMEM/F12	medium hodowlane Dulbecco's Modified Eagle's F-12 Ham's
dWAT	śródkórna tkanka tłuszczowa
ECM	macierz zewnątrzkomórkowa
EDTA	kwasi wersenowy
EGF	naskórkowy czynnik wzrostu
eGFP	wzmocnione białko zielonej fluorescencji
ELISA	test immunoenzymatyczny
EMT	przejście epithelialno-mezenchymalne
FABP4	białko wiążące kwasy tłuszczowe 4
FBS	plodowa surowica bydłęca
Foxn1	czynnik transkrypcyjny Forkhead Box N1
Foxo1	czynniki transkrypcyjne z rodziny Forkhead Box O
Gapdh	dehydrogenaza aldehydu 3- fosfoglicerynowego
GTT	test tolerancji glukozy
HFD	dieta wysokotłuszczowa
Hox	geny homeotyczne
Hprt1	fosforybozylotransferaza hipoksantynowo-guaninowa
IGF-1	insulinopodobny czynnik wzrostu I
LFD	dieta niskotłuszczowa
MCP-1	białko chemotaktyczne monocytów 1
Mmps	metaloproteinazy macierzy
myszki Foxn1^{-/-}	myszki z nieaktywnym czynnikiem Foxn1

NMR	jądrowy rezonans magnetyczny
PBS	bufor fosforanowy
PDGF	płytkowy czynnik wzrostu
PFA	paraformaldehyd
PPAR-γ	receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów γ
PVDF	polifluorek winylidenu
RNA	kwas rybonukleinowy
RT-qPCR	łańcuchowa reakcja polimerazy z odwrotną transkrypcją
SCID	ciężki złożony niedobór odporności
sWAT	podskórna tkanka tłuszczowa
TBP	białko wiążące sekwencję TATA
TEC	dojrzałe komórki nabłonkowe grasicy
TEPC	progenitorowe komórki nabłonkowe grasicy
Tgfβ	transformujące czynniki wzrostu β
Timps	inhibitory metaloproteinaz macierzy
VEGF	czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia

Publikacje stanowiące rozprawę doktorską

Wyniki uzyskane w ramach zadań badawczych zostały opublikowane w czasopismach indeksowanych przez ISI Web of Science:

1. Kopcewicz M, Walendzik K, Bukowska J, Kur -Piotrowska A, Machcinska S, Gimble JM and Barbara Gawronska Kozak “Cutaneous wound healing in aged, high fat diet induced obese female or male C57Bl/6 mice.” *Aging-US* 2020 Apr 15;12(8):7066-7111.

(**IF**₂₀₂₁: 5,682; **MEiN**₂₀₂₁: 140 pkt.)

2. Kopcewicz MM, Kur-Piotrowska A, Bukowska J, Gimble JM, Gawronska-Kozak B. “Foxn1 and Mmp-9 expression in intact skin and during excisional wound repair in young, adult, and old C57Bl/6 mice.” *Wound Repair Regen.* 2017 Apr;25(2):248-259

(**IF**₂₀₂₁: 3,617; **MEiN**₂₀₂₁: 100 pkt.)

Sumaryczny Impact Factor: 9,299

Sumaryczna liczba punktów MEiN: 240 pkt.

Publikacje przedstawiono w formie załączników do rozprawy doktorskiej.

1. Wstęp

1.1. Budowa skóry

Skóra stanowi zewnętrzną powłokę ciała, chroni organizm przed wpływami środowiska zewnętrznego oraz pełni funkcję neuro-, immuno- i endokrynną zapewniając utrzymanie homeostazy pomiędzy ustrojem a otoczeniem [1]. Skóra ssaków zbudowana jest z trzech warstw: naskórka (*ang. epidermis*), skóry właściwej (*ang. dermis*) i podskórnej tkanki tłuszczowej (*sWAT, ang. subcutaneous white adipose tissue*), która u gryzoni oddzielona jest od skóry właściwej cienką warstwą mięśni szkieletowych (*lac. panniculus carnosus*). Skóra jest unaczyniona i unerwiona, w jej skład wchodzi dodatkowo twory skórne: włosy, paznokcie oraz gruczoły (zapachowe, potowe, łojowe) [2].

Naskórek tworzą komórki nabłonka wielowarstwowego płaskiego - keratynocyty, a także wytwarzające pigment melanocyty, prezentujące antygeny komórki Langerhansa oraz komórki Merkla, będące nabłonkowymi komórkami zmysłu dotyku. Ze względu na fakt, iż w obrębie naskórka nie występują drobne naczynia krwionośne, składniki odżywcze oraz tlen przenikają do komórek na drodze dyfuzji [3]. Naskórek podlega ciągłej odbudowie dzięki nieustającym podziałom komórek macierzystych wchodzących w skład najgłębszej warstwy naskórka - warstwy podstawnej (bazalnej). Namnażane keratynocyty, przesuując się ku wyższym warstwom naskórka: warstwie kolczystej, ziarnistej oraz rogowej, podlegają szeregowi zmian strukturalnych i czynnościowych w procesie różnicowania (Rycina 1). Różnicujące się keratynocyty tracą zdolność do podziału, zmieniają kształt, a także, w zależności od stopnia zróżnicowania, wykazują ekspresję odmiennych markerów. Komórki warstwy podstawnej wykazują ekspresję keratyny 5 i 14, a markerami różnicujących się keratynocytów warstwy kolczystej są keratyna 1 i 10 [4]. W komórkach warstwy ziarnistej obecne są ziarna keratohialinowe bogate w profilagrynę lub w filagrynę oraz ziarna L bogate w lorikrynę. Warstwę zrogowaciałą budują wyłącznie komórki martwe i pozbawione organelli komórkowych [5].

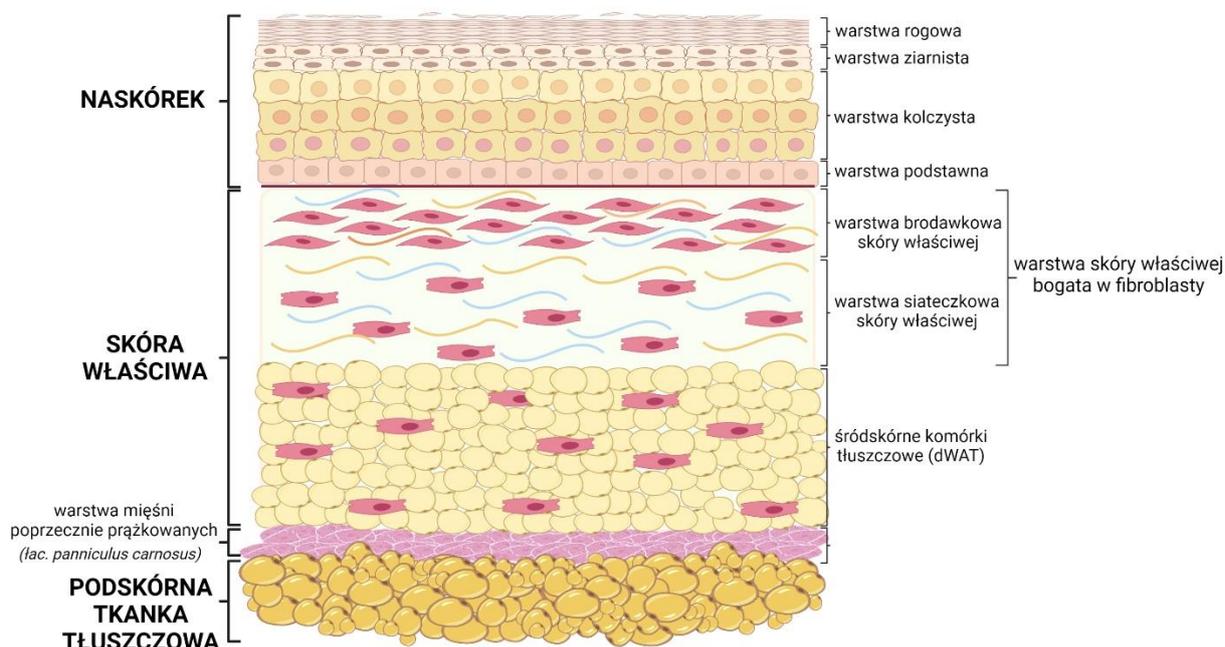
Skóra właściwa zbudowana jest z komórek tkanki łącznej (fibroblastów i fibrocytów) produkujących macierz zewnątrzkomórkową (ECM, *ang. extracellular matrix*), komórek układu odpornościowego, naczyń i nerwów. Fibroblasty są najliczniej występującymi

komórkami skóry właściwej. Syntetyzują i wydzielają większość komponentów ECM, w tym kolagenów, proteoglikanów, fibronektyny, tenascyny oraz lamininy [6]. W obrębie skóry właściwej można wyróżnić warstwę brodawkową oraz warstwę siateczkową. Leżąca pod naskórkiem warstwa brodawkowa stanowi rodzaj tkanki łącznej wiotkiej (Rycina 1). Budującą tę warstwę włókna to głównie włókna siateczkowate stanowiące rusztowanie dla fibroblastów warstwy brodawkowej [2]. Leżąca poniżej warstwy brodawkowej warstwa siateczkowa obejmuje do 80% skóry właściwej, a jej struktura i grubość różnią się w zależności od regionu skóry. Warstwa siateczkowa zbudowana jest z tkanki łącznej zbitej z licznymi włóknami kolagenowymi i elastynowymi. Zasadlające ją fibroblasty są mniej liczne i odmienne od fibroblastów warstwy brodawkowej. Fibroblasty skóry powstają z prekursorowych komórek mezenchymalnych, a w trakcie rozwoju osobniczego różnicują się w dwie odrębne linie. Z pierwszej linii powstają fibroblasty warstwy brodawkowej, komórki brodawki włosa i mięśnia wyprostnego włosa. Z drugiej linii wywodzą się fibroblasty zasiedlające warstwę siateczkową, prekursorzy komórek tłuszczowych (preadipocyty) oraz komórki tłuszczowe (adipocyty) śródskórnej tkanki tłuszczowej (dWAT, *ang. dermal white adipose tissue*) (Rycina 1) [7]. Fibroblasty pochodzące z odrębnych linii charakteryzują się ekspresją odmiennych markerów oraz różną zdolnością do produkcji kolagenu i pozostałych składników macierzy zewnątrzkomórkowej [7,8]. Badania ostatnich kilku lat wykazały, że dWAT, warstwa wchodząca w skład skóry właściwej, pełni nie tylko funkcję metaboliczną, lecz również bierze udział w termoregulacji [9,10], w cyklicznej regulacji wzrostu włosa [11- 13], procesie gojenia ran [14], a także w obronie przeciwbakteryjnej [15,16]. Najgłębszą warstwę skóry stanowi tkanka podskórna zbudowana z tkanki łącznej wiotkiej i licznie występujących komórek tłuszczowych (Rycina 1).

1.2. Przebieg procesu gojenia urazów skórnych

U dorosłych ssaków gojenie ran skórnych jest procesem, który prowadzi do szybkiego odtworzenia ciągłości powłok skórnych i przywrócenia funkcji ochronnej zranionej skórze. Proces gojenia składa się z trzech, częściowo nakładających się na siebie faz: odpowiedzi zapalnej, migracji i proliferacji komórkowej oraz przebudowy tkanki bliznowej [17,18]. W trakcie zranienia dochodzi do uszkodzenia naczyń krwionośnych, a w konsekwencji

do miejscowego krwotoku, niedokrwienia i niedotlenienia zranionych tkanek. Natychmiast po urazie zostaje zapoczątkowany proces krzepnięcia krwi. Powstały w miejscu zranienia z siatki fibryny i osadzonych w niej płytek krwi skrzep zapobiega dalszej utracie krwi i stanowi tymczasowe rusztowanie dla migrujących komórek [17,18]. W miejsce urazu napływają komórki odpowiedzi zapalnej: neutrofile, różnicujące się do makrofagów monocyty, a następnie limfocyty. Wymienione komórki układu immunologicznego zapobiegają infekcji bakteryjnej, usuwają martwe tkanki, a także są źródłem cytokin oraz czynników wzrostu niezbędnych do prawidłowego przebiegu procesu gojenia urazów skóry [19].



Rycina 1. Budowa skóry myszy¹

Peptydowe czynniki wzrostu, takie jak płytkowy czynnik wzrostu (PDGF, *ang. platelet-derived growth factor*), naskórkowy czynnik wzrostu (EGF, *ang. epidermal growth factor*), insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (IGF-1, *ang. insulin-like growth factor-I*) czy transformujące czynniki wzrostu β odgrywają kluczową rolę w inicjacji poszczególnych faz procesu, pobudzają proliferację fibroblastów oraz produkcję poszczególnych składników ECM, a także stymulują fibroblasty do różnicowania się.

¹ Schematy przygotowane przy pomocy strony BioRender.com

W drugim etapie procesu gojenia ma miejsce reepitelializacja, czyli rekonstrukcja uszkodzonego nabłonka przez migrujące do środka rany keratynocyty [17,18], odbudowa naczyń krwionośnych (angiogeneza) oraz wytworzenie tkanki ziarninowej. W skład tkanki ziarninowej wchodzi fibroblasty, granulocyty, makrofagi, nowo powstałe naczynia krwionośne, a także syntetyzowany w dużych ilościach kolagen [21]. W końcowym etapie fazy proliferacyjnej stymulowane fibroblasty różnicują się do miofibroblastów. Miofibroblasty biorą udział w obkurczaniu się rany i wraz z fibroblastami syntetyzują kolagen typu 3, który stanowi początkowe rusztowanie blizny. Ostatnia faza procesu gojenia, przebudowa tkanki bliznowej, może trwać nawet do roku po zranieniu. W tej fazie kolagen typu 3 jest zastępowany głównie przez kolagen typu 1 przy udziale enzymów, głównie metaloproteinaz macierzy oraz ich inhibitorów. Mmps są syntetyzowane i wydzielane przez keratynocyty, fibroblasty, makrofagi oraz miofibroblasty i odgrywają istotną rolę w każdym etapie procesu gojenia ran skórnych biorąc udział w modyfikacji składników ECM, umożliwianiu migracji komórek, uwalnianiu czynników wzrostu z błony komórkowej i przebudowie tkanki bliznowej [22,23].

W ostatniej fazie procesu gojenia większość komórek śródbłonkowych (endotelialnych, *ang. endothelial cells*), makrofagów i miofibroblastów ulega apoptozie. Powstała w miejscu zranienia blizna przywraca ciągłość skóry i jej funkcję ochronną, jednakże szybki proces naprawczy i wytworzenie blizny upośledza i uniemożliwia pełne odzyskanie swoistej dla niezranionej skóry funkcjonalności [18].

1.3. Ogólnoustrojowe czynniki modyfikujące proces gojenia urazów skóry: wiek, płeć, otyłość

Wielkość oraz struktura powstałej blizny zależą od obszaru powstania urazu, głębokości rany oraz osobniczego stanu fizjologicznego organizmu. Wiele czynników wpływających na naprawę uszkodzonej skóry może prowadzić do zaburzenia procesu gojenia skutkującego zakażeniem rany lub powstaniem trudno gojących się, przewlekłych ran. Czynniki wpływające na gojenie urazów skóry można sklasyfikować jako lokalne, takie jak dostępność tlenu lub infekcja, oraz ogólnoustrojowe [24], takie jak otyłość, wiek i płeć.

Światowa Organizacja Zdrowia (WHO, *ang. World Health Organization*) definiuje otyłość jako nadmierne nagromadzenie tkanki tłuszczowej w organizmie stanowiące zagrożenie dla zdrowia człowieka (<https://www.who.int/topics/obesity>). Zbyt duża akumulacja komórek tłuszczowych utrudnia prawidłowe wypełnianie naturalnych funkcji skóry [25] oraz powoduje wiele zmian dermatologicznych związanych z zaburzeniami ciągłości bariery skórnej poprzez nadmierne rogowacenie naskórka, zwiększenie aktywności gruczołów potowych, zmiany w przesnaskórkowej utracie wody (*TEWL, ang. transepidermal water loss*) [26-28]. U osób otyłych częściej pojawiają się infekcje oraz niedokrwienie powłok skórnych skutkujące powstaniem odleżyn i owrzodzeń żylnych [29]. Ponadto, towarzyszące otyłości zaburzenia związane z wydzielaniem hormonów tkanki tłuszczowej (adipokiny - związki bioaktywne wydzielane przez adipocyty) prowadzą do przewlekłego stanu zapalnego, a w konsekwencji do nieprawidłowości w procesie gojenia ran skórnych [24] polegających na wydłużeniu fazy odpowiedzi zapalnej oraz opóźnieniu odbudowy naskórka [30].

Podeszły wiek jest jednym z głównych czynników ogólnoustrojowych wpływających na proces gojenia się ran skóry. Wraz z wiekiem zmienia się struktura skóry, a zmiany te są wypadkową czynników zewnątrzpochodnych (środowiskowych, przede wszystkim promieniowanie UV) i wewnątrzpochodnych [31]. Najczęściej opisywanymi modyfikacjami procesu naprawy urazu skóry u starszych osobników są: opóźniona infiltracja limfocytów T, zmniejszona zdolność makrofagów do fagocytozy [32], opóźniona odbudowa naskórka i angiogeneza [33], zmiany ekspresji czynników wzrostu, takich jak PDGF czy EGF oraz ich receptorów [34]. Liczne badania wykazały, że gojenie się ran skóry u starszych osobników trwa dłużej, jednak podeszły wiek nie wywiera negatywnego wpływu na jakość końcowego efektu procesu gojenia [31,35], a wręcz przeciwnie - wykazano, że w podeszłym wieku gojenie urazów skórnych może zachodzić wolniej, ale z wytworzeniem zdecydowanie mniejszej, delikatniejszej blizny, o makroskopowym i mikroskopowym wyglądzie przypominającym skórę niezranioną [34,36].

Różnice w strukturze skóry i przebiegu procesu gojenia ran można zaobserwować u osobników o odmiennej płci. U ludzi skóra mężczyzn jest grubsza niż u kobiet [37], a jej grubość zmniejsza się wraz z wiekiem, począwszy od 50 roku życia u kobiet i 20 roku życia u mężczyzn [38]. Badania na modelu mysim wykazały, że samce myszy mają grubszą skórę właściwą, ale cieńszy naskórek i tkankę podskórną niż samice [39,40]. Badania

określające rolę steroidowych hormonów płciowych w skórze sugerują, że estrogen ma wpływ na grubość naskórka oraz jest uznawany za czynnik przyspieszający gojenie. Androgeny (testosteron i jego metabolit 5α -dihydrotestosteron, DHT) wpływają natomiast na grubość skóry właściwej i oddziałują hamująco na proces naprawy urazów skóry [41,42].

Pomimo, iż opisano wpływ poszczególnych czynników ogólnoustrojowych: wieku, płci oraz otyłości, na proces gojenia ran skórnych, ich łączny, skumulowany efekt oraz zależności pomiędzy tymi parametrami nie zostały do tej pory zbadane.

1.4. Gojenie bezbliznowe (regeneracja)

Regeneracja (gojenie bezbliznowe) jest to proces, w którym zostają odtworzone pierwotna budowa i funkcja uszkodzonych narządów. Zdolność do regeneracji jest cechą przede wszystkim bezkręgowców, natomiast u kręgowców jest to zjawisko spotykane znacznie rzadziej, występujące głównie u przedstawicieli ryb (Danio pręgowany, *lac. Danio rerio*) [43] oraz płazów ogoniastych [44,45]. Wśród dorosłych ssaków proces regeneracji jest właściwie nieobecny. Jednakże na szczególną uwagę zasługuje proces regeneracji pourazowej skóry płodów, charakterystyczny dla wszystkich ssaków, a opisany po raz pierwszy u ludzi w 1979 roku [46]. Bezbliznowe gojenie urazów skóry zostało opisane u płodów ludzi, myszy, szczurów, owiec, świń i małp [46-48]. U ludzi wykazano, że jeśli uraz wystąpił w ciągu pierwszych dwóch trymestrów ciąży, skóra płodu goiła się w sposób bezbliznowy. Natomiast, gdy skóra została zraniona w trzecim trymestrze, efektem procesu gojenia było wytworzenie blizny. Przełom pomiędzy drugim a trzecim trymestrem to okres przejścia od gojenia bezbliznowego (regeneracyjnego) do gojenia bliznowego (reperacyjnego) charakterystycznego dla osobników dorosłych. U myszy okres ten przypada na 16.5-18.5 dzień rozwoju płodowego [49]. Mimo, iż minęło już ponad 40 lat od opisanego fenomenu regeneracji ran skórnych płodów, dokładny mechanizm tego zjawiska, jak również czynniki stymulujące proces przejścia od gojenia bezbliznowego do bliznowego, do tej pory nie zostały poznane. Wykazano, że regeneracja urazów skóry płodu wynika z unikalnych cech własnych organizmu a nie, jak wcześniej przypuszczano, z właściwości sterylnego i bogatego w czynniki wzrostu płynu owodniowego, w którym przebywa [50].

U dorosłych ssaków gojenie bezbliznowe jest praktycznie niespotykane. Do wyjątków można zaliczyć gojenie bezbliznowe ran w małżowinie usznej królików [51] i nielicznych szczepów myszy [52-54], regenerację opuszek palców myszy i ludzi [55,56], a także regenerację ran skórnych u myszy kolczastych (myszy z rodzaju *Acomys*) [52,53] oraz u myszy pozbawionych aktywności czynnika transkrypcyjnego Foxn1 (Foxn1^{nu} ; $\text{Foxn1}^{-/-}$), tzw. myszy nagich (*ang. nude mice*) [58]. Analiza procesu gojenia urazów skórnych myszy nagich i myszy kolczastych wykazała liczne cechy wspólne, charakterystyczne dla regeneracji ran skórnych płodu, takie jak wysokie poziomy kolagenu typu 3 oraz kwasu hialuronowego [59-61], mały ubytek krwi, szybką odbudowę naskórka oraz brak blizny [62].

1.5. Czynniki transkrypcyjne Foxn1 (*ang. transcription factor Foxn1*)

Do zachowania homeostazy skóry oraz do prawidłowego przebiegu poszczególnych faz gojenia ran konieczna jest skoordynowana aktywność czynników transkrypcyjnych, które poprzez aktywację bądź supresję genów docelowych regulują proliferację, różnicowanie, apoptozę oraz migrację komórek. Wykazano, iż u myszy częściowa inaktywacja czynnika transkrypcyjnego Foxo1 skutkowałą przyspieszeniem procesu gojenia poprzez obniżenie odpowiedzi zapalnej, wzmożoną migrację keratynocytów oraz wytworzenie mniejszej tkanki ziarninowej [63]. W badaniach opisanych przez Mack i wsp. zaobserwowano, iż u dorosłych myszy, pozbawionych aktywnego genu *Hoxb13*, rany goją się szybciej, a skóra zawiera duże ilości kwasu hialuronowego, fenotypowo przypominając bardziej skórę płodu niż dorosłego osobnika [64].

Do czynników transkrypcyjnych biorących udział w zapewnieniu homeostazy skóry należy swoisty dla keratynocytów oraz komórek nabłonka grasicy czynnik Foxn1 (forkhead box N1) z rodziny forkhead/winged helix [65]. W grasicy Foxn1 jest jednym z kluczowych czynników warunkujących dojrzewanie limfocytów T oraz prawidłowy rozwój i funkcjonowanie tego narządu. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem modelu myszy $\text{Foxn1}^{-/-}$ wykazały, że pomimo braku aktywnego czynnika transkrypcyjnego Foxn1, grasica rozwija się prawidłowo do 11.5-12 dnia płodowego. Po tym czasie deficyt Foxn1 skutkuje zatrzymaniem procesu proliferacji i różnicowania progenitorowych komórek epitelialnych grasicy (TEPC, *ang. thymic epithelial progenitor cells*). W efekcie, w grasicy myszy $\text{Foxn1}^{-/-}$

nie powstają dojrzałe komórki nabłonkowe (*TEC*, ang. *thymic epithelial cells*) zdolne do wspierania rozwoju limfocytów T [66-68]. *Foxn1* pełni również rolę w utrzymaniu homeostazy grasicy oraz uznawany jest za jeden z głównych czynników zaangażowanych w involucję (zanikanie) tego narządu związaną z postępującym wiekiem. Inwolucja grasicy prowadzi do zmniejszonej produkcji limfocytów T, a jedną z najwcześniejszych oznak tego procesu jest stopniowy spadek poziomu mRNA genu *Foxn1* [69]. Udział *Foxn1* w involucji grasicy potwierdzono wykazując, iż celowe obniżenie ekspresji *Foxn1* w *TEC* nowonarodzonych myszy skutkuje zmniejszoną produkcją limfocytów T, zaś nadekspresja *Foxn1* opóźnia fizjologiczną degenerację grasicy [70-71]. Ponadto, badania Bredenkamp i wsp. ujawniły możliwość przywrócenia funkcji grasicy u starych myszy poprzez indukcję nadekspresji *Foxn1* w *TEC* [72].

W skórze, ekspresja *Foxn1* ograniczona jest do mieszków włosowych, pojedynczych komórek warstwy podstawnej oraz pierwszej warstwy komórek kolczystych (tzw. warstwy przypodstawnej) będących we wczesnych stadiach różnicowania [73,74]. Z uwagi na fakt, iż *Foxn1* odpowiedzialny jest za indukowanie pierwszych etapów różnicowania się keratynocytów, jego ekspresja wzrasta w momencie, w którym komórki nabłonkowe tracą zdolność namnażania i wkraczają w fazę różnicowania, a maleje wraz z przechodzeniem keratynocytów do kolejnych warstw naskórka [75-77]. Ponadto, *Foxn1* jest jednym z białek regulatorowych uczestniczących w rozwoju mieszków włosowych w okresie życia płodowego, jest istotnym czynnikiem biorącym udział w procesie pigmentacji skóry [78], regulacji cyklu włosa [74,79] oraz regulatorem ekspresji genów keratyny *mHa3* i *mHa5* [80-81].

Mutacja w obrębie genu *Foxn1*, opisana u ludzi, szczurów oraz myszy [82] prowadzi do powstania tzw. fenotypu *Foxn1*^{-/-} (nagiego, ang. *nude*) charakteryzującego się brakiem włosów, zmianami w budowie skóry oraz deficytem odporności immunologicznej. Badania prowadzone przez prof. Barbarę Gawrońską-Kozak [54,60,61] wykazały, że myszy *Foxn1*^{-/-} posiadają unikatową w świecie dorosłych ssaków zdolność regeneracji ran wykonanych w małżowinie usznej [54] oraz ran skórnych [60,61], które goją się w sposób bezbliznowy, przypominający regenerację u płodów. W serii eksperymentów przeprowadzonych w celu wyjaśnienia tej unikatowej zdolności zaobserwowano, iż rany skórne myszy pozbawionych limfocytów B i T (myszy *SCID* i *Rag*), myszy po usunięciu grasicy oraz te, u których zastosowano immunosupresję farmakologiczną (cyklosporyna A), goiły się w procesie

naprawczym z wytworzeniem blizny. W ten sposób wykazano, że zarówno brak grasicy, jak i niedobór odporności nie są wystarczającymi warunkami do zagojenia rany w procesie regeneracji [60]. W związku z tym zwrócono uwagę na czynnik transkrypcyjny Foxn1 i jego potencjalną rolę w procesie naprawy urazów skórnych. Następne badania prowadzone w zespole badawczym prof. Barbary Gawrońskiej-Kozak wskazują Foxn1 jako czynnik transkrypcyjny potencjalnie zaangażowany w proces gojenia ran skórnych na etapie reepitelializacji oraz przejścia epitelialno-mezenchymalnego (EMT, *ang. epithelial-mesenchymal transition*;) w początkowych dniach naprawy urazów skórnych [73].

Pomimo licznych danych literaturowych dotyczących modulacji ekspresji Foxn1 w grasicy, zmiany ekspresji i aktywności Foxn1 w skórze w ciągu życia osobniczego ludzi i zwierząt nie zostały dotychczas zbadane. Aktualnie wiadomo, iż początek ekspresji Foxn1 w skórze myszy w okolicy nosa i pyszczka przypada na 14 dzień rozwoju płodowego, a całą skórę obejmuje w 16-17 dniu rozwoju płodowego [74], pokrywając się z okresem, w którym następuje utrata zdolności do regeneracji urazów skóry. Zatem nasuwa się pytanie: czy gojenie ran skóry u osobników w podeszłym wieku, którego efektem jest powstanie bardzo delikatnej blizny [34] może być powiązane z potencjalnie obniżającą się z wiekiem ekspresją Foxn1 w skórze? Ponadto, badania Stemmer i wsp., w których opisano różnice w przyroście masy ciała pomiędzy myszami Foxn1^{+/+} a Foxn1^{-/-} karmionymi dietą wysokotłuszczową [83] mogą wskazywać na obecność zależności pomiędzy aktywnością czynnika Foxn1, procesem gojenia urazów skóry oraz statusem metabolicznym.

2. Hipoteza i cele badawcze

Na podstawie uzyskanych wyników badań własnych oraz zgromadzonych danych literaturowych, w ramach przedstawionej pracy doktorskiej, postawiono nadrzędną hipotezę badawczą, stanowiącą, iż:

Podeszły wiek i/lub otyłość oraz towarzyszące zmiany w ekspresji czynnika Foxn1 prowadzą do nieprawidłowości w procesie gojenia ran skórnych u myszy C57BL/6

Szczegółowe hipotezy:

Hipoteza I:

Postępujący wiek oraz wywołana wysokotłuszczową dietą otyłość modulują proces gojenia ran skórnych u myszy C57BL/6

Zadania badawcze:

1. Wykazanie wpływu wieku (osobniki młode oraz stare), i diety (niskotłuszczowej oraz wysokotłuszczowej) na homeostazę skóry u myszy C57BL/6.

Zaobserwowane w trakcie badań różnice pomiędzy samcami a samicami myszy C57BL/6 w przybieraniu na wadze oraz w akumulacji tkanki tłuszczowej, doprowadziło do sformułowania drugiego zadania badawczego:

2. Przeanalizowanie procesu gojenia ran skórnych samic i samców myszy C57BL/6 w kontekście wieku i diety.

Hipoteza II:

Związane z wiekiem zmiany w ekspresji czynnika transkrypcyjnego Foxn1 w skórze modyfikują proces gojenia urazów skórnych myszy C57BL/6

Zadania badawcze:

3. Wykazanie potencjalnych zmian w ekspresji czynnika transkrypcyjnego Foxn1 w niezranionej skórze: młodych, dorosłych oraz starych osobników myszy C57BL/6.
4. Analiza przebiegu procesu gojenia ran skórnych: młodych, dorosłych oraz starych osobników myszy transgenicznych Foxn1::Egfp w aspekcie zmian ekspresji czynnika transkrypcyjnego Foxn1.

3. Materiał i metody

3.1. Materiał badawczy

3.1.1. Zwierzęta

W serii doświadczeń *in vivo* zastosowano myszy szczepu C57BL/6J (B6) oraz myszy transgeniczne Foxn1::Egfp, u których transgen eGFP (wzmocnione białko zielonej fluorescencji, *ang. enhanced green fluorescent protein*) znajduje się pod kontrolą sekwencji regulatorowej genu Foxn1. Dzięki temu możliwe jest śledzenie ekspresji Foxn1 na podstawie obecności białka eGFP [84].

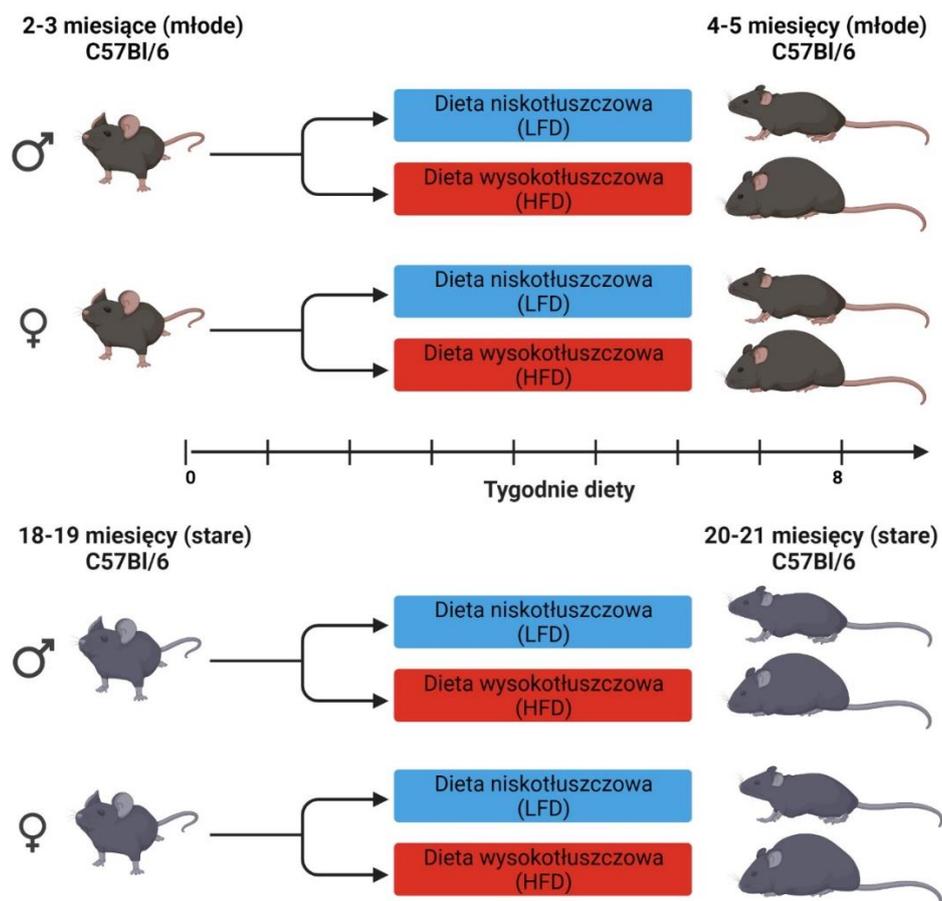
Wszystkie zwierzęta pozyskano z kolonii założonych w Zwierzętarni Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie. Myszy szczepu B6 zostały pierwotnie zakupione w The Jackson Laboratory (Stany Zjednoczone Ameryki). Cztery transgeniczne samce Foxn1::Egfp zostały wyhodowane w Instytucie Immunobiologii i Epigenetyki Maxa Plancka w Niemczech [84]. Hemizygoty Foxn1::Egfp zostały wygenerowane przez skrzyżowanie samców myszy transgenicznych Foxn1::Egfp z samicami szczepu dzikiego B6. Genotyp myszy Foxn1::Egfp został potwierdzony przy wykorzystaniu metody reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR, *ang. polymerase chain reaction*).

Doświadczenia na zwierzętach laboratoryjnych przeprowadzono w Zwierzętarni Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie. Zwierzętarnia spełnia standardy utrzymania zwierząt oraz prowadzenia doświadczeń określone w Dyrektywie Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/EU z dnia 22 września 2010 roku. Myszy przebywały w pomieszczeniach o określonej temperaturze (22-23°C) oraz wilgotności (50±10%) oraz regulowanym oświetleniu (12-godzinny cykl dzień/noc) ze stałym dostępem do wody i pożywienia. Wszystkie procedury dotyczące eksperymentów z wykorzystaniem zwierząt przeprowadzono za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Olsztynie (zgody nr: 28/2012, 22/2015).

Doświadczenia Zadania badawczego 1 i 2

1. Dieta

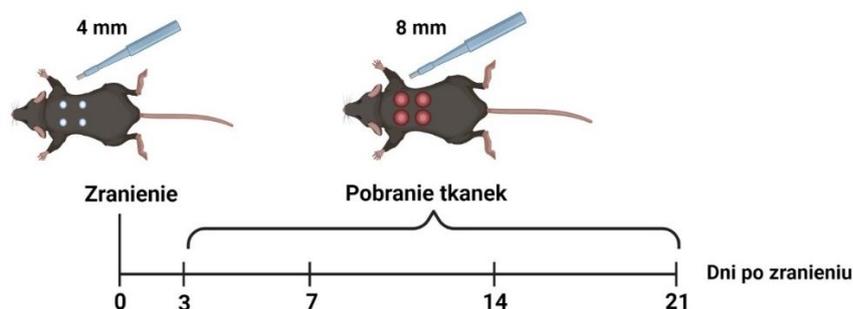
W doświadczeniu wykorzystano młode (myszy 2-3 miesięczne, n=24/grupę) oraz stare (myszy 18-19 miesięczne, n=16-24/grupę), samce i samice myszy szczepu B6. Myszy obu płci zostały podzielone na dwie grupy doświadczalne karmione przez okres 8 tygodni dietą o niskiej zawartości tłuszczu (LFD, *ang. low fat diet*; 13 % tłuszczu) bądź dietą o wysokiej zawartości tłuszczu (HFD; *ang. high fat diet*; 59 % tłuszczu) (Rycina 2). Na początku doświadczenia oraz po każdym tygodniu diety wykonywano pomiary masy ciała, a także zawartości tkanki tłuszczowej (*ang. fat mass*) i beztłuszczowej (*ang. lean mass*) przy użyciu spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR, *ang. nuclear magnetic rezonance*). Po zakończeniu ośmiotygodniowej diety przeprowadzano pomiar tolerancji glukozy we krwi (GTT, *ang. glucose tolerance test*).



Rycina 2. Schemat diety nisko- i wysokotłuszczowej

2. Procedura wykonywania ran skórnych oraz pobierania tkanek

W celu oszacowania i porównania przebiegu procesu gojenia ran skórnych, myszy zostały poddane zranieniu. Dzień przed raniem, zwierzęta usypiano poprzez podanie wziewne izofluranu (dawka początkowa 3-4 %; dawka podtrzymująca 2,5 %). Następnie, grzbiet myszy golono oraz dezynfekowano (Octenisept). W dniu ranienia, zwierzęta usypiano poprzez podawanie wziewne izofluranu (dawka początkowa 3-4%; dawka podtrzymująca 2,5%). Skórę myszy dezynfekowano 70% alkoholem, po czym na grzbietach myszy wykonywano cztery przezskórne rany o średnicy 4 mm przy użyciu stercz biopsyjnych. Wycięte w ten sposób fragmenty skóry o średnicy 4 mm stanowiły kontrolę (skóra niezraniona, dzień 0). Po zabiegu myszy umieszczano w indywidualnych klatkach i poddawano obserwacji do czasu wybudzenia. W dniach 3, 7, 14 oraz 21 po zranieniu zwierzęta usypiano przez wziewne podanie izofluranu w dawce 3-4%, a następnie uśmiercano przez dekapitację. Próbkę skóry pourazowej o średnicy 8 mm pobierano przy użyciu stercz biopsyjnych i umieszczano w ciekłym azocie do czasu izolacji RNA oraz białka, lub w 10% formalinie (Rycina 3), gdzie były przechowywane do momentu zatopienia w bloczkach parafinowych.



Rycina 3. Schemat ranienia zwierząt po diecie nisko- oraz wysokotłuszczowej oraz pobierania tkanek w kolejnych dniach po zranieniu.

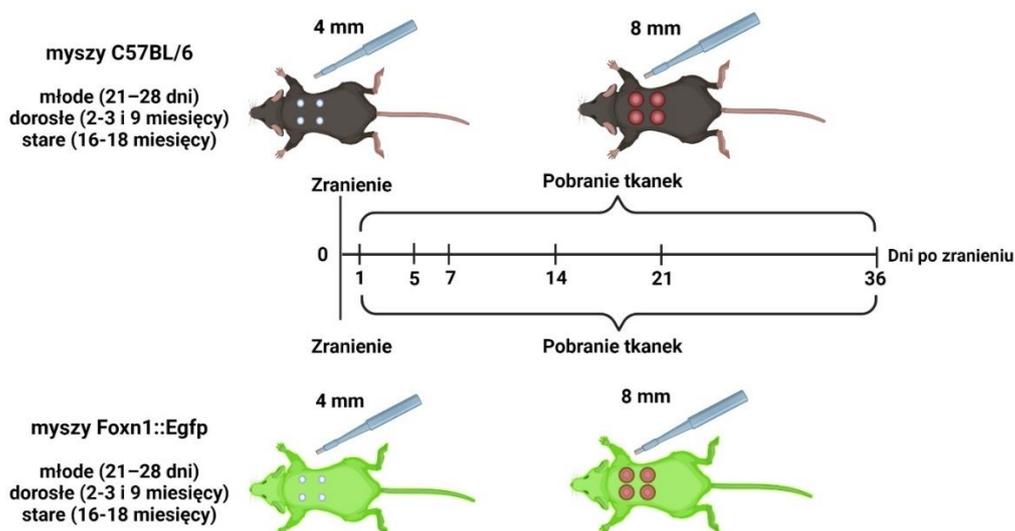
Doświadczenie Zadania badawczego 3 i 4

W celu wykazania potencjalnych zmian w ekspresji czynnika transkrypcyjnego Foxn1 w ciągu życia osobniczego myszy w doświadczeniu wykorzystano młode (21–28 dni), dorosłe (2–3 oraz 9 miesięcy) oraz stare (16–18 miesięcy) myszy transgeniczne Foxn1::Egfp

oraz myszy szczepu dzikiego B6. Materiał pochodzący od myszy Foxn1::Egfp został wykorzystany w analizach: cytometrii przepływowej, immunohisto- oraz immunofluorescencyjnej. Do analizy ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-qPCR, *ang. quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*), wykorzystano próby pobrane od myszy szczepu dzikiego B6.

3. Procedura wykonywania ran skórnych oraz pobierania tkanek

Proces ranienia zwierząt przeprowadzono zgodnie z opisem umieszczonym w Doświadczeniu zadania badawczego 1 i 2. Tkanki pobierano w dniach 1, 5, 7, 14, 21 oraz 36 po zranieniu (myszy B6 $n=6$ /dzień zranienia/grupę; myszy Foxn1::Egfp $n=3$ /dzień zranienia/grupę). Próbki skóry niezranionej (kontrola, dzień 0), a także próbki skóry po zranieniu o średnicy 8 mm, pobrane przy użyciu sztanc biopsyjnych, umieszczano w ciekłym azocie do czasu izolacji RNA oraz białka, w 4% paraformaldehydzie (PFA) lub w 10% formalinie (Rycina 4). Dodatkową grupę myszy dorosłych (2-3 miesięcznych) Foxn1::Egfp ($n=5-9$ /dzień zranienia/grupę) oraz B6 ($n=6$ /dzień zranienia/grupę) przeznaczono do przeprowadzenia analizy cytometrycznej komórek skóry wyizolowanych z prób skóry niezranionej oraz z prób pobranych w 7 i 21 dniu po zranieniu.



Rycina 4. Schemat ranienia oraz pobierania tkanek w kolejnych dniach po zranieniu od młodych, dorosłych i starych myszy B6 oraz myszy Foxn1::Egfp

3.2. Metody

3.2.1. Izolacja enzymatyczna komórek skóry właściwej i naskórka

Zwierzęta uśmiercano poprzez stopniowe przedawkowanie CO₂. Wyciętą z grzbietu skórę płukano w 70% etanolu, a następnie w sterylnym, ciepłym buforze fosforanowym (PBS) o pH 7,4 z 1% roztworem penicyliny/streptomycyny. Pobrane próby skóry oczyszczano z tłuszczu i naczyń krwionośnych.

Izolacja fibroblastów skóry właściwej

Skórę trawiono w roztworze kolagenazy (270,6 U/ml) w PBS przez godzinę w temperaturze 37°C. Uzyskaną zawiesinę komórek filtrowano kolejno przez filtry o średnicy porów: 100 µm, 70 µm oraz 40 µm. Przesącz wirowano (310 g przez 9 minut w temperaturze pokojowej), a uzyskany osad komórek zawieszano w buforze lizującym erytrocyty na 1 minutę. Działanie buforu lizującego neutralizowano poprzez dodanie medium hodowlanego Dulbecco's Modified Eagle's F-12 Ham's Medium (DMEM/F12) z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS) i 1% roztworem penicyliny/streptomycyny. Po ponownym wirowaniu komórki zawieszano w PBS. Liczbę i żywotność wyizolowanych komórek określano używając licznika komórek Countess.

Izolacja keratynocytów

Skórę trawiono w roztworze dispazy (6 U/mL) w PBS przez noc, w temperaturze 4°C. Następnego dnia odseparowany od skóry właściwej naskórek, przeznaczony do izolacji RNA, przenoszono do probówek zawierających TRIreagent i zamrażano w temperaturze -80°C do dalszych analiz. Naskórek przeznaczony do izolacji keratynocytów przepłukiwano sterylnym PBS oraz poddawano trawieniu w roztworze trypsyny (0,05%, 2mM EDTA) przez 10 minut. Działanie enzymu neutralizowano poprzez dodanie medium DMEM/F12 z dodatkiem 15% FBS i 1% roztworem penicyliny/streptomycyny. Uzyskaną zawiesinę komórek filtrowano kolejno przez filtry o średnicy porów: 100 µm, 70 µm oraz 40 µm. Uzyskany przesącz wirowano (310 g przez 9 minut w temperaturze pokojowej). Komórki

zawieszano w 1 ml PBS. Liczbę i żywotność keratynocytów określano używając licznika komórek Countess.

3.2.2 Cytometria przepływowa

Wyizolowane komórki, zawieszono w buforze PBS w koncentracji $0,5-1 \times 10^6/\text{ml}$, inkubowano z wyznakowanymi fluorochromami przeciwciałami: anti-CD324 (anty-E-kadheryna) oraz anti-CD325 (anty-N-kadheryna, Tabela 1) przez 30 minut. Do oceny niespecyficznego fluorescencji tła stosowano kontrole izotypowe w takich samych stężeniach jak przeciwciała. Następnie, komórki przepłukiwano PBS oraz utrwalano 1% roztworem PFA. Komórki analizowano za pomocą cytometru przepływowego BD LSR Fortessa wyposażonego w oprogramowanie BD FACSDiva TM v6.2.

Nazwa antygenu	Klon	Fluorochrom	Producent	Numer katalogowy
CD324 (E- kadheryna)	DECMA-1	Alexa Fluor 647	BioLegend	147308
CD325 (N- kadheryna)	Clone 8C11 (RUO)	PerCP-Cy TM 5.5	BD Biosciences	563435

Tabela 1. Lista przeciwciał wykorzystanych w analizie cytometrycznej

3.2.3. Izolacja RNA oraz RT-qPCR

Zamrożone próbki naskórka, skóry niezranionej oraz skóry po zranieniu rozdrabniano w moździerzu, w oparach ciekłego azotu. Rozkruszone próby przenoszono do próbek zawierających TRIreagent i homogenizowano przy użyciu elektrycznego homogenizatora (3x 20 sek.). Całkowite RNA ekstrahowano w oparciu o zmodyfikowaną metodę Chomczyński i Sacchi [85]. Ilość i jakość wyizolowanego RNA sprawdzano przy użyciu spektrofotometru Nano Drop oraz przeprowadzając elektroforezę w żelu agarozowym. Do syntezy cDNA wykorzystywano 500 ng RNA stosując zestaw High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit zgodnie z zaleceniami producenta. Analizę ekspresji mRNA badanych genów (*Foxn1*, *Mmp-9*,

Mmp-13, *Timp-1*, *Col1a2*, *Col3a1*, *Tgfb-1*, *Tgfb-3*, *CD68*), przeprowadzono z zastosowaniem komercyjnych sond Single Tube TaqMan® Gene Expression Assays (Tabela 2). Po dokonaniu przeglądu literaturowego, przeprowadzono ewaluację genów referencyjnych: dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (*Gapdh*, ang. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*), białka wiążącego TATA (*TBP*, ang. *TATA binding protein*) oraz genu fosforybozylotransferazy hipoksantynowo-guaninowej (*Hprt1*, ang. *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*). Na podstawie uzyskanych wyników, wyselekcjonowano *Hprt1* jako gen referencyjny. Reakcję amplifikacji przeprowadzono w termocyklerze 7900HT Fast Real-Time PCR System w następujących warunkach: wstępna denaturacja przez 10 min. w 95°C; 40 cykli po 15 sek. w 95°C i 1 min. w 60°C. Wartości ekspresji badanych genów odczytywano z krzywej standardowej, zaś normalizację wykonywano względem genu referencyjnego *Hprt1*, mnożąc wynik przez 10.

Nazwa genu	Numer zestawu
<i>Foxn1</i>	Mm01298129_m1
<i>Hprt1</i>	Mm01545399_m1
<i>Mmp-9</i>	Mm00442991_m1
<i>Mmp-13</i>	Mm00439491_m1
<i>Timp-1</i>	Mm00441818_m1
<i>Col1a2</i>	Mm00483888_m1
<i>Col3a1</i>	Mm01254476_m1
<i>Tgfb-1</i>	Mm01178820_m1
<i>Tgfb-3</i>	Mm00436960_m1
<i>CD68</i>	Mm03047343_m1
<i>TBP</i>	Mm00446971_m1
<i>Gapdh</i>	Mm99999915_g1

Tabela 2. Lista zestawów zawierających startery oraz sondy TaqMan zastosowanych w reakcji RT- qPCR

3.2.4. Histologia

Barwienie immunofluorescencyjne

Próbki skóry pobrane od transgenicznymy myszy *Foxn1::Egfp* utrwalano przez 2 godziny w 4% PFA, trzykrotnie płukano w buforze PBS i przechowywano w 18% roztworze sacharozy z dodatkiem 0,01% azydku sodowego w temperaturze 4°C. Utrwalone próby krojono na kriostacie na skrawki o grubości 8 µm i przechowywano w temperaturze -20°C. Preparaty

mrożeniowe przygotowywano do barwień poprzez 30 min. inkubacje w temperaturze pokojowej. Następnie preparaty trzykrotnie płukano w PBS (10 min.) i poddawano godzinnej inkubacji w roztworze blokującym (mieszanina 10% surowicy koziej oraz końskiej w 1% BSA) w temperaturze pokojowej. Po trzykrotnym płukaniu w buforze PBS (10 min.) skrawki inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi (anty-Mmp-9, anty-E-kadheryna, anty-SMA, Tabela 3) przez noc w temperaturze 4°C. Następnego dnia preparaty trzykrotnie płukano w buforze PBS (10 min.), po czym inkubowano z odpowiednimi przeciwciałami drugorzędowymi (Alexa Fluor 594, Tabela 3) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, chroniąc preparaty przed światłem. Po zakończeniu inkubacji skrawki płukano w buforze PBS (3x 5 min.). Do zamknięcia preparatów wykorzystywano medium zamykające ProLong™ Gold Antifade Mountant z wybarwiającym jądra komórkowe DAPI (4',6-diamidyno-2-fenylindol).

Barwienie immunohistochemiczne

Przechowywane w 10% formalinie fragmenty skóry zatapiano w parafinie zgodnie ze standardowym protokołem. Utrwalone próby krojono na mikrotomie na skrawki o grubości 5 µm. Do analizy immunohistochemicznej skrawki poddawano deparafinizacji poprzez inkubację preparatów w dwóch zmianach ksylenu (15 min.) oraz uwodnieniu w szeregu alkoholi (alkohol etylowy) o malejących stężeniach 100%, 100%, 96%, 96%, 70%, 70%, 50% (po 4 min. w każdym ze stężeń). Dla preparatów stosowano barwienie trójbarwne metodą Massona lub barwienie hematoksyliną i eozyną zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Pozostałe preparaty poddawano procedurze barwienia immunohistologicznego. Preparaty płukano w buforze PBS (3x 5 min.) a następnie gotowano w buforze cytrynianowym o pH 6.0 przez 25 min. w celu odsłonięcia determinant antygenowych. Po ostudzeniu preparaty przepłukiwano kolejno wodą destylowaną oraz PBS. Endogenną peroksydazę inaktywowano poprzez inkubację skrawków w 3% roztworze nadtlenu wodoru. Miejsca niespecyficznie wiążące antygeny blokowano poprzez godzinną inkubację w roztworze blokującym (mieszanina 10% surowicy koziej oraz końskiej w 1% BSA) w temperaturze pokojowej, po czym trzykrotnie płukano w buforze PBS (10 min.). Skrawki inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi (anty-LGALS3, anty-CD68, anty-keratyna 16, anty-eGFP, Tabela 3) przez noc w temperaturze 4°C. Po całonocnej inkubacji preparaty trzykrotnie płukano w buforze PBS

(10 min.). Do detekcji związanych przeciwciał pierwszorzędowych wykorzystywano aktywność peroksydazy chrzanowej związanej z przeciwciałami drugorzędowymi (kompleks ABC). Na skrawkach stanowiących negatywną kontrolę barwienia przeciwciała pierwszorzędowe zastępowano niespecyficzną immunoglobuliną G (IgG). Aktywność peroksydazy chrzanowej wizualizowano za pomocą 3,3'-diaminobenzydyny jako chromogenu dającego brązową reakcję barwną. Dodatkowo preparaty podbarwiano hematoksyliną w celu wybarwienia struktur komórkowych. Preparaty przepłukiwano w wodzie destylowanej oraz w buforze PBS oraz poddawano dehydratacji w szeregu wzrastających stężeń alkoholi (po 4 min. w 50%, 70%, 70%, 96%, 96%, 100%, 100% alkoholu etylowego), a następnie prześwietlano w ksylenie (2x 15 min.). Preparaty zamykano w DPX (mieszaninie toluenu, ksylenu i ftalanu dibutyli).

Nazwa antygeny	Gatunek, Monoklonalne (M) Poliklonalne (P)	Rozcieńczenie	Producent	Numer katalogowy
Mmp-9	królicze, P	1:100	Merck Millipore	AB19016
E-kadheryna	szczurze, M	1:1000	Thermo Fisher Scientific	13-1900
α SMA	królicze, P	1:200	Thermo Fisher Scientific	RB9010-P
Alexa Fluor 594	ośle, P	1:200	Thermo Fisher Scientific	A21209
Alexa Fluor 594	kozie, P	1:200	Thermo Fisher Scientific	A11037
LGALS3	szczurze, M	1:2500	LSBio	LS-C62936
CD68	królicze, P	1:200	Abcam	ab125212
keratyna 16	królicze, P	1:300	LsBio	LS-B7609
eGFP	kozie, P	1:300	Abcam	ab6673

Tabela 3. Lista przeciwciał zastosowanych w barwieniu immunofluorescencyjnym oraz immunohistochemicznym

3.2.5. Izolacja białek oraz analiza ich ekspresji przeprowadzona metodą Western Blot

Białka izolowano z prób skóry niezranionej oraz pobranej w 3 i 7 dniu po zranieniu od młodych i starych samic i samców karmionych dietą LFD lub HFD. Tkanki rozdrabniano tłuczkiem w moździerzu, w oparach ciekłego azotu. Rozkruszone próby przenoszono

do probówek zawierających bufor lizujący RIPA wraz z inhibitorami proteaz i fosfataz. Następnie próby homogenizowano przy użyciu homogenizatora elektrycznego (3x 20 sek.), poddawano procesowi sonikacji (3x 5 sek., amplituda 40%), po czym inkubowano przez godzinę na lodzie. Uzyskane lizaty wirowano przy 10000 g przez 15 min. w temperaturze 4°C. Nadsącz zbierano do nowej probówki oraz mierzono stężenia białka przy użyciu spektrometru Direct Detect. Próby o koncentracji 30 µg zawieszano w buforze redukującym Laemmliego i denaturowano poprzez gotowanie przez 5 min. w temperaturze 95°C. Rozdział elektroforetyczny białek przeprowadzono w 12% żelu poliakrylamidowym. Białka przenoszono na drodze mokrego transferu na aktywowaną w metanolu membranę PVDF o wielkości porów 0,45 µm. Membranę po transferze blokowano w roztworze blokującym zawierającym Odyssey Blocking Buffer oraz bufor PBS w stosunku 1:1. Całonocną inkubację z przeciwciałami pierwszorzędowymi (anty-Mmp-9, anty-Tgfβ-1, anty-Tgfβ-3, anty-β-aktyna, Tabela 4) przeprowadzono w temperaturze 4°C. Następnego dnia membrany inkubowano z drugorzędowymi przeciwciałami fluorescencyjnymi (IRDye 800 oraz Cy5.5, Tabela 4). Zdjęcia membran wykonywano na aparacie ChemiDoc Imaging System i analizowano za pomocą oprogramowania Image Lab wersja 6.0.

Nazwa antygeny	Gatunek, Monoklonalne (M) Poliklonalne (P)	Rozcieńczenie	Producent	Numer katalogowy
Mmp-9	królicze, P	1:1000	Merck Millipore	AB19016
Tgfβ-1	królicze, P	1:500	Biorbyt	orb11468
Tgfβ-3	królicze, P	1:100	Abcam	ab15537
β-aktyna	mysie, M	1:1000	Abcam	ab8226
IRDye 800	kozie, P	1:10000	Rockland	611-132-122
Cy5.5	kozie, P	1:10000	Rockland	610-113-121

Tabela 4. Lista przeciwciał zastosowanych w analizie Western Blot

3.2.6. Oznaczanie koncentracji białka chemotaktycznego monocytów 1 (MCP-1) za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA

W homogenatach skóry niezranionej oraz pobranej w 3 i 7 dniu po zranieniu od młodych i starych myszy karmionych dietą LFD lub HFD oznaczano koncentrację białka MCP-1.

W tym celu próby ważono, rozkruszano w oparach ciekłego azotu i homogenizowano w buforze PBS w proporcjach 100 mg tkanki na 1 ml PBS. Uzyskane homogenaty przechowywano przez noc w temperaturze -20°C , po czym dodatkowo dwukrotnie rozmrażano i zamrażano. Następnie próby wirowano przy 5000 g przez 5 min. w temperaturze 4°C . Uzyskany nadsącz zbierano, wykonywano rozcieńczenia i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu analizy. Test ELISA przeprowadzano zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta (Cusabio).

3.2.7. Oznaczanie zawartości hydroksyproliny

W próbach skóry niezranionej oraz pobranych w 14 i 21 dniu po zranieniu oznaczano zawartość kolagenu poprzez przeprowadzenie biochemicznej analizy zawartości hydroksyproliny. Tkanki rozdrabniano tłuczkiem w moździerzu, w oparach ciekłego azotu. Rozkruszone próby przenoszono do probówek zawierających 2 ml buforu PBS i przechowywano przez noc w temperaturze 4°C . Następnego dnia, 0,5 ml homogenatu przenoszono do probówek zawierających 0,25 ml 6N HCl i hydrolizowano przez 4,5 godziny w temperaturze 120°C . Do skonstruowania krzywej standardowej przygotowywano rozcieńczenia roztworu podstawowego hydroksyproliny o stężeniu 20 mg/ml (od 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ do 0,162 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) w roztworze zawierającym bufor PBS i 6N HCl w stosunku 2:1. Na płytkę 96 dołkową nanoszono w duplikatach: po 20 μl prób i po 20 μl każdego punktu krzywej standardowej a następnie dodawano po 50 μl roztworu chloraminy T. Po 20 min. inkubacji w temperaturze pokojowej dodawano 50 μl roztworu Ehrlicha, a następnie płytkę inkubowano przez 15 min. w temperaturze 65°C . Po ochłodzeniu płytkę odczytywano przy długości fali 550 nm na spektrometrze Multiskan Sky.

3.2.8. Analiza statystyczna

Analiza statystyczna wyników uzyskanych w 1 i 2 zadaniu badawczym została przeprowadzona w firmie Biostat. W celu przeanalizowania wpływu płci, wieku, diety i dnia, w którym próba została pobrana, zastosowano model liniowy efektów mieszanych, w którym badane osobniki były określone jako wyraz wolny, natomiast porównywane czynniki oraz ich możliwe powiązania jako efekty stałe. Z uwagi na fakt, iż dla obliczeń parametrów

prób skóry efekty losowe były nieistotne, zastosowano zwykłe modele regresji liniowej, sprawdzając stopień ich dopasowania. Na bazie zastosowanych modeli obliczono średnie marginalne (*ang. ls-means*) oraz porównano je ze sobą w parach (w modelu efektów mieszanych zastosowano, ze względu na mało liczne próby, przybliżenie Kenwarda-Rogera, które zwiększa precyzję oszacowania kowariancji dla parametrów opisujących efekty stałe, jak również liczbę stopni swobody mianownika w testach istotności statystycznej współczynników modelu) z korektą na wielokrotne porównania w oparciu o metodę Tukeya. Aby dopasować optymalny zbiór zmiennych objaśniających, przeprowadzono analizę regresji krokowej wstecznej. Za poziom istotności przyjęto $p=0,05$, wskazując jednak również na wyniki statystycznie istotne dla poziomów $p=0,01$ oraz $p=0,001$. Wszystkie obliczenia i wykresy wykonano z wykorzystaniem pakietu statystycznego R w wersji 3.5.3 z pomocą pakietów lme4, lmerTest, emmeans and tidyverse.

Wyniki uzyskane w ramach trzeciego i czwartego zadania badawczego poddano opracowaniu statystycznemu przy pomocy programu GraphPad Prism (wersja 6.0). W celu określenia istotnych różnic między otrzymanymi wartościami zastosowano test t-Studenta oraz jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) wraz z testem post-hoc Tukeya. W przypadku niespełnienia założeń analizy wariancji stosowano test Kruskala-Wallisa wraz z testem post-hoc Dunna. Za poziom istotności przyjęto $p=0,05$.

4. Wyniki

4.1. Wpływ wieku, diety i płci na homeostazę niezranionej skóry (*Zadanie badawcze 1 i 2*)

W trakcie trwania 8-tygodniowego eksperymentu żywieniowego zaobserwowano wzrost masy ciała u wszystkich zwierząt karmionych dietą wysokotłuszczową. Największe różnice pomiędzy masą początkową oraz po zakończeniu diety zaobserwowano w grupie starych samców myszy B6 żywionych dietą wysokotłuszczową, przy czym wzrost masy ciała w tej grupie zwierząt spowodowany był głównie rozrostem masy tłuszczowej. Pomiar histologiczne grubości naskórka oraz skóry właściwej (*publikacja 1, figura 3C-D*) przeprowadzone na preparatach barwionych hematoksyliną i eozyną oraz z zastosowaniem metody barwienia trójbarwnego wg Massona wykazały, iż u zwierząt karmionych HFD skóra właściwa jest grubsza niż u zwierząt karmionych LFD, niezależnie od wieku. Pomiar poszczególnych warstw skóry właściwej: bogatej w fibroblasty (obejmującej warstwę brodawkową i siateczkową bez dWAT) oraz dWAT, wykazał, iż u myszy wraz z wiekiem następuje redukcja grubości warstwy bogatej w fibroblasty. Jednakże u zwierząt karmionych dietą wysokotłuszczową rozrost dWAT rekompensował tę utratę. W konsekwencji cała warstwa skóry właściwej jest znacznie grubsza u starych myszy HFD w porównaniu z myszami karmionymi LFD oraz porównywalna z grubością skóry młodych zwierząt karmionych LFD (*publikacja 1, figura 3B- D*). Uzyskane wyniki wskazują, iż najistotniejszy wpływ na homeostazę niezranionej skóry wykazały dwa kumulujące się parametry: wiek oraz dieta.

4.2. Porównanie procesu gojenia ran skóry u młodych i starych samców i samic po 8-tygodniowej diecie nisko- lub wysokotłuszczowej (*Zadanie badawcze 1 i 2*)

W celu określenia wpływu wieku, diety oraz płci na proces gojenia ran skórnych u młodych i starych samic i samców myszy szczepu B6 po 8 tygodniowym okresie żywienia dietą wysoko- lub niskotłuszczową przeprowadzono analizę prób skóry pobranych od myszy na poszczególnych etapach gojenia ran.

4.2.1. Analiza przebiegu odpowiedzi immunologicznej.

W czasie odpowiedzi zapalnej, w miejscu urazu, makrofagi, monocyty różnicujące się do makrofagów, fibroblasty, komórki śródbłonkowe oraz keratynocyty produkują MCP-1, cytokinę, która stymuluje migrację do miejsca zranienia nie tylko monocytów, lecz również limfocytów T, eozynofików, bazofików oraz komórek tłuszczowych. [86]. Makrofagi rezydujące w skórze oraz te pochodzące od monocytów stymulują angiogenezę i reepitelializację oraz syntetyzują enzymy proteolityczne m.in. Mmps degradujące elementy uszkodzonych tkanek [18,87,88]. Wykazano, iż u myszy pozbawionych makrofagów występują liczne nieprawidłowości w przebiegu procesu gojenia ran związane z obniżoną syntezą kolagenu, upośledzoną angiogenezą czy obniżoną ekspresją VEGF [89-91].

W celu przeprowadzenia analizy wybranych czynników odpowiedzi immunologicznej zmierzono poziomy MCP-1 w homogenatach tkankowych z dnia 3 i 7 po zranieniu wykorzystując test immunoenzymatyczny ELISA, określono immunohistochemiczną lokalizację markerów makrofagów: Mac-2 w pourazowym dniu 3 oraz CD68 w dniu 7 po zranieniu oraz przeprowadzono analizę ekspresji genu *CD68* w skórze niezranionej oraz w skórze pobranej w 3, 7, 14 i 21 dniu po zranieniu metodą RT-qPCR. Zgodnie z danymi literaturowymi [92-94], w dniu 3 po zranieniu zaobserwowano wzrost ekspresji MCP-1 we wszystkich grupach zwierząt. Najwyższą koncentrację chemokiny MCP-1 wykryto w tkankach pobranych od myszy starych, niezależnie od zastosowanej diety (*publikacja 1, figura 4A*). Analiza ekspresji genu *CD68* wykazała, iż w dniu 3 po zranieniu we wszystkich grupach zwierząt wystąpił wyraźny wzrost poziomu mRNA *CD68*, po którym nastąpił stopniowy spadek, aż do 21 dnia po urazie (*publikacja 1, figura 4B*). Szczegółowa analiza statystyczna wykazała, iż największy wpływ na ekspresję genu *CD68* we wszystkich pourazowych dniach wywierają wiek oraz dieta (*publikacja 1, figura 4B*). Podobną zależność zaobserwowano w przypadku immunohistologicznej lokalizacji białka Mac-2 w dniu 3 oraz białka CD68 w 7 dniu po zranieniu. Akumulacja komórek wykazujących ekspresję Mac-2 oraz CD68 była największa u zwierząt w podeszłym wieku karmionych dietą wysokotłuszczową (*publikacja 1, figura 4C-D*).

4.2.2. Porównanie przebiegu procesu reepitelializacji

Reepitelializacja, czyli rekonstrukcja uszkodzonego naskórka, odbywa się poprzez migrację keratynocytów od brzegów do środka rany. Proces ten wymaga intensywnej proliferacji oraz różnicowania komórek nowo powstającego epitelium [94]. Analiza utrwalonych na preparatach tkanek pobranych w 3, 7 oraz 14 dniu po zranieniu, barwionych hematoksyliną i eozyną oraz przeprowadzona immunohistologiczna analiza lokalizacji keratyny 16, obecnej w migrujących podczas reepitelializacji keratynocytach, wykazały najszybsze tempo reepitelializacji u myszy młodych, karmionych dietą niskotłuszczową. W tej grupie zwierząt, w dniu siódmym po urazie, rana była w 100% pokryta nowym naskórkiem, podczas gdy w pozostałych grupach zwierząt wynosiła odpowiednio: 86,2% (± 14) w grupie zwierząt młodych karmionych HFD, 70,5% ($\pm 17,2$) w grupie starych myszy karmionych LFD i 78,4% ($\pm 12,2$) w grupie starych myszy karmionych HFD (*publikacja 1, figura 4E-F*).

4.2.3 Analiza zmian ekspresji Mmp-9, Mmp-13 oraz ich inhibitora Timp-1 w przebiegu procesu gojenia ran

Metaloproteinazy macierzy są grupą enzymów proteolitycznych, posiadających zdolność degradacji elementów składowych macierzy zewnątrzkomórkowej (kolagenu, lamininy, proteoglikanów i fibronektyny), co umożliwia migrację komórek, a także powoduje uwolnienie czynników wzrostu. Mmps biorą udział we wszystkich etapach procesu gojenia i należą do czynników niezbędnych do przywrócenia prawidłowej architektury skóry [22,23]. Liczne badania wskazują, iż zachwianie równowagi pomiędzy ekspresją metaloproteinaz i ich inhibitorów może doprowadzić do stanów patologicznych, takich jak blizny przerostowe, keloidy [95] czy niegojące się rany [96]. Wykazano również, iż odmienna modulacja ekspresji metaloproteinaz może stanowić istotny element procesu regeneracji u płazów i ssaków [45,60,61,97]. Podwyższone poziomy ekspresji metaloproteinaz zostały opisane w procesie bezbliznowego gojenia skóry płodów oraz w procesie gojenia urazów u starszych ludzi i zwierząt [98,99]. Uzyskane w prezentowanej pracy wyniki potwierdzają powyższe doniesienia. Analiza ekspresji Mmp-9 w przebiegu procesu gojenia urazów skóry, przeprowadzona metodami RT-qPCR oraz Western Blot wykazała, iż w dniu 3 po urazie

ekspresja Mmp-9 była najwyższa u zwierząt w podeszłym wieku, aczkolwiek zranienie wywołało podobny profil zmian ekspresji *Mmp-9* oraz *Timp-1* we wszystkich grupach zwierząt. Po znacznym podwyższeniu poziomów mRNA *Mmp-9* oraz *Timp-1* w 3 dniu po zranieniu następował stopniowy spadek, aż do dnia 21 (*publikacja 1, figura 5A-C*).

Mmp-13, zwana również kolagenazą 3, jest niemalże niewykrywalna w skórze niezranionej, a jej ekspresja gwałtownie wzrasta w pierwszej dobie po zranieniu [61]. Mmp-13 reguluje procesy związane z migracją keratynocytów [100], aktywnością miofibroblastów oraz angiogenezą [101]. W prowadzonych badaniach wzrost poziomów ekspresji mRNA *Mmp-13* zaobserwowano w 3 i 7 dniu po zranieniu we wszystkich analizowanych grupach zwierząt, jednakże gwałtowne, kilkukrotnie wyższe niż w pozostałych grupach poziomy ekspresji genu *Mmp-13* odnotowano w grupie młodych samic, niezależnie od diety (*publikacja 1, figura 5D*).

4.2.4. Analiza zmian ekspresji Tgfb-1 i 3 w procesie gojenia ran

Tgfb-1, jedna z pierwszych cytokin stymulujących napływ komórek układu odpornościowego do miejsca zranienia, bierze udział we wszystkich etapach gojenia urazu: Tgfb-1 indukuje ekspresję czynników wzrostu, stymuluje angiogenezę oraz syntezę kolagenu, a także uznawana jest za cytokinę promującą powstawanie blizny [102]. W prezentowanych badaniach, we wszystkich analizowanych grupach, profil mRNA *Tgfb-1* obejmował wyraźny wzrost w 3 i 7 dniu po zranieniu oraz stopniowy powrót do wyjściowego poziomu ekspresji w dniach od 7 do 21. Najwyższe poziomy ekspresji genu *Tgfb-1* zaobserwowano u samic w podeszłym wieku w 3 i 7 dniu po zranieniu (*publikacja 1, figura 6A-B*), przy czym w dniu 3, 7 i 14 ekspresja genu *Tgfb-1* była wyższa u starych samic żywionych HFD niż u samców w podeszłym wieku po HFD (*publikacja 1, figura 6A*).

Tgfb-3 jest uznawana za cytokinę „pro-regeneracyjną” [103]. Doświadczenia przeprowadzone przez Shah i wsp. wykazały, iż podanie egzogennej Tgfb-3 skutkuje wytworzeniem zdecydowanie mniejszej i delikatniejszej blizny [104]. Pomimo, iż ekspresja Tgfb-3 została wykazana w migrujących keratynocytach naskórka, cytokina ta nie jest niezbędna w przebiegu procesu reepitelializacji [105]. Obecność Tgfb-3 jest natomiast warunkiem koniecznym do prawidłowego zamknięcia rany. W prezentowanych badaniach

analiza profilu ekspresji genu *Tgfb-3* w przebiegu procesu gojenia urazów wykazała wzrost poziomu ekspresji w 7 dniu po zranieniu u samców w podeszłym wieku oraz u wszystkich samic, bez względu na dietę i wiek. W 14 dniu po zranieniu podwyższony poziom mRNA *Tgfb-3* zaobserwowano jedynie w grupie starych samic karmionych dietą wysokotłuszczową (publikacja 1, figura 6C-D).

4.2.5. Analiza zawartości kolagenu w skórze niezranionej oraz w procesie gojenia ran

Biosynteza kolagenu jest czynnikiem niezbędnym do prawidłowego zagojenia rany i wytworzenia blizny. Kolageny są najliczniej występującymi białkami ECM. W warunkach fizjologicznych, stanowią wsparcie dla rezydujących w skórze właściwej komórek, a także pełnią funkcję regulacyjną [106]. W procesie gojenia ran, we wczesnych etapach fazy proliferacyjnej i formowania tkanki ziarninowej, fibroblasty oraz miofibroblasty syntetyzują większe ilości kolagenu typu 3 niż kolagenu typu 1. W okresie przebudowy tkanki bliznowej włókna kolagenu typu 3 zastępowane są gęstą siecią tworzących bliznę grubych, twardych włókien kolagenu typu 1 [106]. W celu przeanalizowania zawartości kolagenu w skórze niezranionej oraz określenia dynamiki przebudowy tkanki bliznowej, oszacowano zmiany w ekspresji mRNA *Colla2* i *Col3a1* metodą RT-qPCR, oznaczono zawartość kolagenu przeprowadzając biochemiczną analizę zawartości hydroksyproliny w próbach skóry niezranionej oraz pobranych w 14 i 21 dniu po zranieniu, a także przeprowadzono histologiczną lokalizację kolagenu w obrębie zranionego obszaru na podstawie analizy preparatów barwionych wg Massona. Analiza ekspresji genu *Colla2* i *Col3a1* wykazała wysoce istotne różnice pomiędzy badanymi grupami zwierząt. Ekstremalnie wysokie poziomy mRNA *Colla2* i *Col3a1* wykazano w skórze niezranionej oraz w tkankach po zranieniu pobranych od młodych samców (publikacja 1, figura 7A-B). W skórze starych samców ekspresja *Colla2* i *Col3a1* była znacząco niższa, porównywalna do ekspresji tych transkryptów w tkankach pobranych od samic, niezależnie od wieku. Uzyskane wyniki wskazują, iż największy wpływ na ekspresję genów *Colla2* oraz *Col3a1* mają dwa kumulujące się parametry: wiek oraz płeć. Analiza zawartości hydroksyproliny nie wykazała różnic statystycznych pomiędzy badanymi grupami (publikacja 1, figura 7C), natomiast największy obszar zajęty przez bliznę zaobserwowano

na preparatach histologicznych myszy młodych, karmionych dietą niskotłuszczową, w 14 i 21 dniu po zranieniu (*publikacja 1, figura 7D*).

W powyższych badaniach przeanalizowano wpływ wieku, diety (niskotłuszczowej lub wysokotłuszczowej) oraz płci na homeostazę skóry oraz na przebieg procesu gojenia ran skóry u myszy B6. Wykazano, iż spośród analizowanych czynników najistotniejszy wpływ, na homeostazę niezranionej skóry wywierają dwa kumulujące się parametry: wiek oraz dieta, przy czym następujący w konsekwencji HFD rozrost warstwy dWAT w skórze starych zwierząt rekompensował związaną z wiekiem utratę grubości warstwy skóry właściwej bogatej w fibroblasty.

Uzyskane wyniki dotyczące wpływu wieku, diety i płci na przebieg procesu gojenia ran skóry u myszy, zostały poddane szczegółowej analizie statystycznej badającej indywidualny wpływ oraz potencjalne interakcje wieku, diety, płci na gojenie się ran skóry u młodych i starych samic i samców myszy B6, karmionych LFD lub HFD w oparciu o współczynniki modelu dla czynników mogących wpływać na poszczególne dni procesu gojenia. Analiza statystyczna, której podsumowanie zamieszczono w Tabeli 5, wykazała, iż najistotniejszy wpływ na przebieg procesu gojenia ran skórnych u myszy szczepu B6 wywiera:

1. Wiek
2. Wiek i płeć
3. Wiek i dieta

Wiek zwierząt, jako pojedyncza zmienna, obserwowany był w aspekcie: ekspresji chemokiny MCP-1 (w 3 dniu po zranieniu), ekspresji Tgf β -1 (w 3, 7 i 21 dniu po zranieniu), ekspresji Mmp-9 (w dniu 3), genu *Mmp-13* (w 3 i 7 dniu) oraz zawartości hydroksyproliny (dzień 21).

Wiek i płeć, jako dwa najistotniejsze, kumulujące się parametry, miały wpływ na ekspresję genów *Colla2* i *Col3a1*, która była kilkakrotnie wyższa u młodych samców, niż w pozostałych grupach zwierząt, zarówno w skórze niezranionej jak i podczas całego procesu gojenia ran (dzień: 3,7,14 i 21).

Wspólny efekt wieku i diety wykazano przeprowadzając analizę profilu ekspresji genu *CD68* oraz przebiegu procesu reepitelializacji. Uzyskane wyniki wskazują, iż w grupie zwierząt

młodych, żywionych LFD, proces odbudowy naskórka trwał znacznie krócej niż w pozostałych grupach zwierząt. Zbiorczy wpływ wszystkich analizowanych parametrów: wieku, diety i płci na proces gojenia ran skórnych zaobserwowano jedynie w aspekcie wysokiej ekspresji mRNA inhibitora metaloproteinaz *Timp-1* w próbach pobranych od starych samic żywionych dietą wysokotłuszczową (Tabela 5).

4.3. Zmiany w ekspresji czynnika transkrypcyjnego Foxn1 i Mmp-9 w niezranionej i pourazowej skórze młodych, dorosłych i starych myszy C57BL/6 (Zadanie badawcze 3 i 4)

4.3.1. Ekspresja czynnika transkrypcyjnego Foxn1 oraz Mmp- 9 w skórze niezranionej młodych, dorosłych i starych myszy

Analizę zmian ekspresji Foxn1 w ciągu życia osobniczego oraz podczas przebiegu procesu naprawy urazów skóry przeprowadzono na dwóch liniach myszy: myszach szczepu dzikiego B6 oraz myszach transgenicznych Foxn1::Egfp, u których ekspresja genu eGFP znajduje się pod kontrolą sekwencji regulatorowej w genie Foxn1. Zastosowanie myszy Foxn1::Egfp umożliwiało śledzenie ekspresji czynnika Foxn1 poprzez wizualizację obecności białka eGFP. Zwierzęta transgeniczne stanowiły podstawę do: (1) oznaczenia procentowej zawartości oraz charakterystyki fenotypowej komórek wykazujących ekspresję Foxn1-eGFP (analiza z zastosowaniem cytometrii przepływowej), a także (2) określenia lokalizacji komórek Foxn1-eGFP na preparatach skóry (analizy na preparatach histologicznych metodami immunohistochemicznymi i immunofluorescencyjnymi). Z uwagi na fakt, iż wstawienie konstrukt eGFP spowodowało inaktywację jednego allelu genu *Foxn1* [107], do analizy ekspresji genów przeprowadzanych metodą RT-qPCR zastosowano myszy szczepu B6.

Podczas analizy cytometrycznej mającej na celu określenie procentowej zawartości komórek wykazujących ekspresję białka eGFP wśród komórek izolowanych z naskórka transgenicznych myszy Foxn1::Egfp, najwyższy odsetek komórek Foxn1-eGFP⁺ zaobserwowano w naskórku pochodzącym od nowonarodzonych myszy (14,8% ±0,6) natomiast niższy w naskórku zwierząt dorosłych (7,2%±1,5) i starych (9,3%±1,0) (*publikacja 2, figura 2D-E*).

	Składowa procesu gojenia	Wpływ/Interakcje czynników
Dzień 3	MCP-1	Wiek
	Ekspresja mRNA <i>Mmp-9</i>	1. Wiek 2. Dieta
	Ekspresja mRNA <i>Timp-1</i>	1. Dieta 2. Płeć: Dieta 3. Wiek :Płeć: Dieta
	Ekspresja mRNA <i>Tgfb-1</i>	1. Wiek 2. Płeć
	Ekspresja mRNA <i>Mmp-13</i>	1. Wiek 2. Wiek: Płeć
Dzień 7	Ekspresja mRNA <i>Tgfb-1</i>	1. Wiek 2. Płeć 3. Dieta
	Ekspresja mRNA <i>Mmp-13</i>	1. Wiek 2. Płeć: Dieta 3. Wiek: Dieta 4. Wiek: Płeć
Dzień 14	Ekspresja mRNA <i>Tgfb-1</i>	Dieta
	Ekspresja mRNA <i>Tgfb-3</i>	1. Wiek: Płeć 2. Płeć
Dzień 21	Ekspresja mRNA <i>Tgfb-1</i>	1. Wiek 2. Wiek: Płeć
	Zawartość hydroksyproliny	1. Wiek 2. Wiek: Dieta
Dzień 3, 7, 14 i 21	Ekspresja <i>CD68</i> mRNA	Wiek: Dieta
	Ekspresja mRNA <i>Colla2</i>	Wiek: Płeć
	Ekspresja mRNA <i>Col3a1</i>	Wiek: Płeć
Dzień 3 i 7	Reepitelializacja	Wiek: Dieta

Tabela 5. Podsumowanie interakcji pomiędzy wiekiem, dietą i płcią na proces gojenia się ran skóry u młodych i starych samic i samców myszy B6 karmionych LFD lub HFD w oparciu o współczynniki modelu dla czynników oddziałujących na poszczególne dni procesu gojenia. Indywidualny wpływ poszczególnych zmiennych oraz ich interakcje są uporządkowane od największego do najmniejszego (1, 2, 3) wpływu na każdy czynnik

W następnej kolejności przeprowadzono charakterystykę fenotypową w obrębie populacji komórek Foxn1-eGFP pozytywnych, mającą na celu oznaczenie procentowej zawartości komórek wykazujących ekspresję E-kadheryny (markera komórek nabłonkowych) i/lub N-kadheryny (markera komórek mezenchymalnych). Zgodnie z danymi literaturowymi wskazującymi, iż ekspresja Foxn1 występuje w komórkach nabłonka skóry [73-77], w każdej z analizowanych grup zwierząt ponad połowa komórek Foxn1-eGFP pozytywnych wykazywała ekspresję E-kadheryny (nowonarodzone 53,65%±2,3; dorosłe 55,79%±2,35; stare 55,79±1,5), natomiast ekspresję N-kadheryny wykazywało mniej niż 1% komórek Foxn1-eGFP pozytywnych (nowonarodzone 0,68%±0,2, dorosłe 0,34%±0,1, stare 0,4%±0,1) (*publikacja 2, figura 2F*). Wysoce interesującym natomiast było zaobserwowanie istotnych różnic pomiędzy grupami zwierząt w zakresie procentowej zawartości komórek wykazujących koekspresję markerów E-kadheryny i N-kadheryny (E-kad⁺/N-kad⁺). W grupie nowonarodzonych myszy odsetek komórek pozytywnych pod względem obecności obu markerów wynosił aż 23,75%±1,8, natomiast w grupie zwierząt dorosłych jedynie 5,49%±1,0 i 10,81%±3,1 u myszy starych (*publikacja 2, figura 2F*). Immunofluorescencyjna oraz immunohistologiczna analiza lokalizacji komórek wykazujących ekspresję Foxn1-eGFP, przeprowadzona z zastosowaniem przeciwciał anti-eGFP na preparatach niezranionej skóry pobranej od myszy Foxn1::Egfp, wykazała obecność Foxn1-eGFP w naskórku oraz w mieszkach włosowych (*publikacja 2, figura 2B-C*). Analiza ekspresji genu *Foxn1* w niezranionym naskórku młodych (21 dniowych), dorosłych (2-3 i 9 miesięcznych) i starych (16-18 miesięcznych) myszy B6 wykazała porównywalne poziomy mRNA *Foxn1* w tkankach pobranych od młodych i dorosłych zwierząt oraz istotnie wyższy poziom mRNA *Foxn1* w naskórku osobników starych (*publikacja 2, figura 2A*). W obrębie badanych grup wiekowych nie wykazano związanego z wiekiem spadku ekspresji *Foxn1* mRNA w skórze myszy B6 (*publikacja 2, figura 4A-C*) oraz spadku odsetka komórek eGFP-pozytywnych (*publikacja 2, figura 2D-E*).

Wykazane w poprzednich badaniach zespołu prof. Barbary Gawrońskiej- Kozak [108] zależności pomiędzy obecnością czynnika Foxn1 (myszy Foxn1^{+/+}) lub jej brakiem (myszy Foxn1^{-/-}) a towarzyszącymi zmianami w poziomach ekspresji Mmp-9 [61] skłoniły nas do przeanalizowania ekspresji Mmp-9 w skórze w zależności od wieku zwierząt. Przeprowadzona na preparatach pochodzących od myszy transgenicznym Foxn1::Egfp analiza immunofluorescencyjna wskazała na kolokalizację białka Mmp-9 z Foxn1-eGFP, obejmującą

mieszki włosowe i naskórek, z wyłączeniem warstwy podstawnej, w której ekspresja Foxn1 nie występuje (*publikacja 2, figura 3D*).

Analiza ekspresji genu *Mmp-9* w niezranionym naskórku młodych (21 dniowych), dorosłych (2-3 i 9 miesięcznych) i starych (16-18 miesięcznych) myszy B6, przeprowadzona metodą RT-qPCR, wykazała istotnie wyższe poziomy mRNA *Mmp-9* w tkankach pobranych od osobników starych niż w tkankach zwierząt młodych i dorosłych (*publikacja 2, figura 3A*). Następujące z wiekiem zmiany poziomów mRNA *Mmp-9*, odpowiadały profilowi ekspresji genu *Foxn1* w ciągu życia osobniczego myszy (*publikacja 2, figura 2A*).

4.3.2. Zmiany ekspresji Foxn1 w przebiegu procesu gojenia ran skórnych u młodych, dorosłych oraz starych myszy

W celu określenia procentowej zawartości komórek, które wykazują ekspresję Foxn1 w przebiegu gojenia ran skóry przeprowadzono analizę cytometryczną komórek wyizolowanych z prób skóry pobranych od dorosłych myszy Foxn1::Egfp w 7 i 21 dniu po zranieniu. Najwyższy odsetek komórek wykazujących ekspresję Foxn1-eGFP zaobserwowano w 21 dniu po zranieniu ($6,6\% \pm 1,0$), w porównaniu do skóry niezranionej ($3,5\% \pm 3,5$) oraz do skóry w 7 dniu po zranieniu ($2,3\% \pm 0,6$) (*publikacja 2, figura 4D,F*). Pod względem fenotypowym większość wyizolowanych komórek Foxn1-eGFP⁺ wykazywała ekspresję E-kadheryny ($57,59\% \pm 6,0$ w skórze niezranionej, $42,52\% \pm 3$ w dniu 7 i $65,5\% \pm 4,6$ w dniu 21 po zranieniu), a jedynie niewielki procent stanowiły komórki pozytywne pod względem ekspresji N-kadheryny ($1,13\% \pm 1,6$ w skórze niezranionej, $3,56\% \pm 5,0$ w 7 dniu i $1,21\% \pm 1,2$ w 21 dniu po zranieniu) (*publikacja 2, figura 4E*). Najbardziej interesujące wyniki uzyskano analizując procentową zawartość komórek wykazujących koekspresję E-kadheryny i N-kadheryny. W dniu 7 po urazie procentowa zawartość komórek E-kad⁺/N-kad⁺ wynosiła $13,88\% \pm 3,9$ i była kilkakrotnie wyższa niż zaobserwowana w skórze niezranionej ($3,27\% \pm 0,9$) czy też w dniu 21 po urazie ($4,5\% \pm 1,7$) (*publikacja 2, figura 4E*). Immunofluorescencyjna i immunohistochemiczna detekcja białka eGFP (wyznacznik Foxn1), na preparatach skóry pobranej od myszy transgenicznych Foxn1::Egfp w 5 i 7 dniu po zranieniu, wykazała ekspresję Foxn1-eGFP we wszystkich, oprócz warstwy podstawnej, warstwach nowo powstałego, migrującego naskórka, co sugeruje udział Foxn1 w odbudowie naskórka po zranieniu (*publikacja 2, figura 5A-F*). Najbardziej interesującym wynikiem analiz histochemicznych było

wykazanie reakcji pozytywnej na obecność Foxn1 (przeciwciała anty-eGFP) nie tylko w naskórku, lecz również w warstwie brodawkowej skóry właściwej (*publikacja 2, figura 5G-H*) w 7 dniu po urazie. Wynik ten jest zgodny z danymi uzyskanymi metodą analizy cytometrycznej, wskazującymi na obecność znacznego odsetka komórek wykazujących koekspresję E-kadheryny i N-kadheryny w 7 dniu po zranieniu (*publikacja 2, figura 4E*). Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze doniesienia świadczące, iż Foxn1 bierze udział w procesie przejścia epitelialno-mezenchymalnego w początkowej fazie procesu gojenia ran skóry.

Szczegółowa immunofluorescencyjna i immunohistochemiczna detekcja białka eGFP na preparatach skóry pobranej w 21 i 36 dniu po zranieniu od myszy transgenicznym Foxn1::Egfp wskazała na obecność Foxn1 nie tylko w naskórku, ale również w warstwie brodawkowej skóry właściwej (*publikacja 2, figura 6A,E*). Dalsza analiza z wykorzystaniem przeciwciał znakowanych fluorescencyjnie wskazała na kolokalizację Foxn1-eGFP z E-kadheryną (*publikacja 2, figura 6D*) oraz z aktywną mięśni gładkich α (*publikacja 2, figura 6B-C*). Wykazana po raz pierwszy kolokalizacja Foxn1-eGFP z α SMA sugeruje, iż komórki wykazujące ekspresję Foxn1-eGFP mogą być zaangażowane w EMT również w późnej fazie gojenia ran, co świadczyłoby o udziale Foxn1 w powstawaniu tkanki bliznowej.

Ekspresja genu *Foxn1* w przebiegu procesu gojenia urazów skóry została określona na podstawie analizy poziomu mRNA, w próbach skóry pobranych w 1, 5, 7, 14, 21 oraz 36 dniu po zranieniu od młodych, dorosłych oraz starych myszy B6. Uzyskane wyniki wskazują, iż ekspresja genu *Foxn1* podlega modulacji podczas procesu gojenia ran skórnych. U młodych myszy profil ekspresji genu *Foxn1* znacznie odbiega od obserwowanego u pozostałych zwierząt. W tej grupie wykazano znaczny spadek poziomów mRNA *Foxn1* w pierwszej dobie po urazie, a następnie istotny, znacznie przekraczający wyjściową ekspresję, wzrost w 5, 7 i 14 pourazowym dniu (*publikacja 2, figura 4A*). W 21 i 36 dniu po zranieniu ekspresja genu *Foxn1* ulega ponownemu obniżeniu do poziomów obserwowanych w pierwszej dobie po urazie. Poziomy mRNA *Foxn1* u dorosłych oraz starych zwierząt ulegały stopniowemu obniżeniu, począwszy od dnia zranienia aż do 7 dnia po urazie. Wzrost ekspresji genu *Foxn1* do poziomów obserwowanych przed urazem następował w 14 dniu po zranieniu, przy czym u starych myszy wyższe poziomy mRNA *Foxn1* zaobserwowano także w 21 dniu procesu gojenia (*publikacja 2, figura 4B-C*).

4.3.3. Zmiany ekspresji Mmp-9 w przebiegu procesu gojenia ran skórnych u młodych, dorosłych oraz starych myszy

Analiza ekspresji genu *Mmp-9* została przeprowadzona metodą RT-qPCR w próbach skóry pobranych w 1, 5, 7, 14, 21 oraz 36 dniu po zranieniu od młodych, dorosłych oraz starych myszy B6. Uzyskane wyniki wskazują, iż ekspresja genu *Mmp-9* podlega modulacji w czasie całego procesu gojenia. Profil ekspresji *Mmp-9* we wszystkich grupach zwierząt obejmował początkowy nagły wzrost, od 1 do 5 dnia po zranieniu, a następnie spadek poziomów mRNA *Mmp-9* od 7 dnia po zranieniu (*publikacja 2, figura 7A-C*). Najbardziej istotny wzrost ekspresji genu *Mmp-9* obserwowano w grupie myszy starych, szczególnie w pierwszym dniu po zranieniu. Przeprowadzona z wykorzystaniem wyznakowanych fluorescencyjnie przeciwciał anti-Mmp-9, detekcja białka Mmp-9 w pourazowych tkankach pobranych od myszy Foxn1::Egfp wskazuje na lokalizację Mmp-9 we wszystkich warstwach naskórka oraz w rozproszonych komórkach skóry właściwej (*publikacja 2, figura 7D-I*). W początkowych dniach procesu gojenia (od 2 do 4 dnia po zranieniu) wykazano kolokalizację białka Mmp-9 i Foxn1-eGFP w nowo powstającym naskórku (*publikacja 2, figura 7D-I*). Obecność Mmp-9 zaobserwowano we wszystkich warstwach naskórka, natomiast Foxn1 we wszystkich warstwach oprócz warstwy podstawnej (*publikacja 2, figura 7D-G*). W dniach od 14 do 36 ekspresja Mmp-9 obejmowała naskórek jednak tylko pojedyncze keratynocyty wykazywały kolokalizację Mmp-9 i Foxn1-eGFP. (*publikacja 2, figura 7H*). Powyższe dane potwierdzają, iż Mmp-9 bierze udział w procesie odbudowy naskórka, a także sugerują możliwą stymulacyjną funkcję czynnika Foxn1 zachodzącą poprzez regulację ekspresji Mmp-9 w początkowej fazie procesu gojenia ran skóry.

Uzyskane wyniki wskazują, iż Foxn1 oraz Mmp-9 podlegają modulacji w przebiegu procesu gojenia urazów skóry w zależności od wieku zwierząt. Wyniki sugerują, iż Foxn1 może regulować proces reepitelializacji na drodze modulacji ekspresji Mmp-9. Ponadto obecność komórek Foxn1-eGFP pozytywnych, wykazujących koekspresję E-kadheryny wraz z N-kadheryną, potwierdza udział Foxn1 w procesie EMT w początkowych etapach procesu gojenia ran (5-7 dzień po zranieniu), natomiast współwystępowanie Foxn1-eGFP wraz z aktywną mięśnią gładką w komórkach warstwy brodawkowej skóry może świadczyć o udziale Foxn1 w procesie powstawania blizny.

5. Dyskusja

Gojenie urazów skóry jest niezwykle złożonym procesem biologicznym zachodzącym w organizmie. Powstająca blizna stanowi fizjologiczny efekt tego procesu, umożliwiający szybkie odbudowanie bariery pomiędzy organizmem a środowiskiem zewnętrznym. Z drugiej jednak strony, rozległe blizny mogą być przyczyną zaburzeń funkcjonalnych (np. przykurcze, ograniczenie ruchomości), a także mogą być powodem problemów natury psychicznej (np. blizny pooparzeniowe) [109]. Zrozumienie mechanizmów molekularnych oraz wpływu poszczególnych czynników na proces gojenia ran umożliwiłoby sterowanie procesem naprawczym eliminując liczne problemy związane z tworzeniem nieprawidłowych blizn lub braku wytworzenia blizn w przypadku niegojących się ran.

Jednym z głównych zadań prezentowanej pracy (*Zadania badawcze 1 i 2*) było określenie wspólnego, kumulatywnego wpływu wieku, diety oraz płci na proces gojenia urazów skóry myszy B6. W tym celu próbki skóry niezranionej oraz po zranieniu, pobrane od młodych (2-3-miesięczne) oraz starych (18-19-miesięczne) samców i samic myszy B6 po diecie wysoko- lub niskotłuszczowej zostały przeanalizowane pod kątem przebiegu odpowiedzi immunologicznej, procesu reepitelializacji, dynamiki przebudowy tkanki bliznowej, oraz zmian ekspresji czynników biorących udział w procesie gojenia ran: Tgfb-1, Tgfb-3 Mmp-9, Mmp-13, Timp-1.

Transformujący czynnik wzrostu beta występuje w postaci trzech izoform: Tgfb-1, Tgfb-2, Tgfb-3, przy czym każda z nich uczestniczy w modulacji procesu gojenia ran skóry. Tgfb-1 i Tgfb-2 stymulują napływ do rany neutrofilów, makrofagów i fibroblastów [110], biorą udział w procesie odbudowy naskórka, tworzeniu tkanki ziarninowej, w angiogenezie [111-114] oraz stymulują różnicowanie fibroblastów do miofibroblastów [115,116]. W fazie przebudowy tkanki bliznowej Tgfb-1 oraz Tgfb-2 wraz z Mmps i ich inhibitorami biorą udział w regulacji procesów produkcji oraz degradacji kolagenu, przyczyniając się do wytworzenia dojrzałej blizny [17]. Podczas gdy Tgfb-1 i Tgfb-2 uznawane są za czynniki promujące powstanie blizny, Tgfb-3 opisywany jest jako cytokina „pro-regeneracyjna”. Obecność ekspresji Tgfb-3 wykazano w migrujących w trakcie reepitelializacji keratynocytach, a także w komórkach nowo powstałego naskórka już po zakończeniu tego procesu [117]. W prezentowanych badaniach została przeprowadzona analiza profilu ekspresji Tgfb-1

i Tgf β -3 w wybranych dniach procesu gojenia ran. Wzrost ekspresji Tgf β -1 zaobserwowano w 3 i 7 dniu po zranieniu, przy czym znacznie wyższe poziomy Tgf β -1 wykazano w grupie starych myszy, niezależnie od diety (*publikacja 1, figura 6A-B*). Podwyższona w 3 i 7 dniu procesu gojenia u starych zwierząt ekspresja Tgf β -1 koresponduje z wysoką ekspresją chemokiny MCP-1 oraz zwiększonym napływem makrofagów do rany w początkowej fazie procesu gojenia (*publikacja 1, figura 4A-D*). Zwiększona infiltracja makrofagów, zaobserwowana u zwierząt w podeszłym wieku, zgodna jest z danymi literaturowymi. Swift i wsp. wskazują, iż u starych (22-miesięcznych) myszy liczba makrofagów w ranie była znacznie wyższa niż u młodych, 2-miesięcznych zwierząt [32]. Wynik ten może wydawać się zaskakujący biorąc pod uwagę, że u starych zwierząt zdolności naprawcze maleją, makrofagi natomiast uznawane są za komórki przyspieszające proces gojenia urazów skóry. Już w 1975 roku badania Leibovich i Ross wykazały, iż obecność makrofagów wraz z ich właściwościami fagocytarnymi jest konieczna do prawidłowego przebiegu procesu naprawy urazu skóry [118], zaś w 1989 roku zaobserwowano przyspieszony proces gojenia u myszy w podeszłym wieku (24-27 miesięcznych) po iniekcji makrofagów do rany [119]. Zatem zwiększona liczba tych komórek w ranie starych zwierząt może być wynikiem włączenia mechanizmów kompensacyjnych związanych z obniżoną funkcjonalnością makrofagów: (1) zmniejszoną produkcją cytokin [120], (2) obniżoną ekspresją VEGF, [33] oraz (3) zmniejszonymi zdolnościami fagocytarnymi [32].

Analiza profilu ekspresji Tgf β -3, jednego z markerów gojenia bezbliznowego [103], wykazała znaczne, zależne od wieku i płci, różnice pomiędzy badanymi grupami. W dostępnej literaturze nie znaleziono danych dotyczących zmian poziomu ekspresji Tgf β -3 w procesie gojenia ran, tak więc przedstawione wyniki są najprawdopodobniej pierwszymi doniesieniami opisującymi profil ekspresji Tgf β -3 (*publikacja 1, figura 6C-D*) w procesie gojenia urazów skóry. Biorąc pod uwagę fakt, iż izoformy Tgf β regulują aktywność poszczególnych genów biorących udział w syntezie składników macierzy zewnątrzkomórkowej między innymi kolagenów [121], zmiana poziomu ekspresji Tgf β -3 może znajdować odzwierciedlenie w modyfikacjach związanych z zawartością kolagenu w pourazowej skórze. Jest to zgodne z prezentowanymi w powyższej pracy wynikami wskazującymi na znacznie wyższe poziomy mRNA *Colla2* i *Col3a1* w skórze młodych samców myszy w porównaniu ze starymi zwierzętami tej samej płci (*publikacja 1, figura 7A-B*). Wyniki te korespondują z danymi

uzyskanymi w badaniach Salzer i wsp. [122]. Autorzy, w wyniku analizy transkryptomicznej fibroblastów izolowanych ze starych, 18 miesięcznych myszy potwierdzają, iż wraz z wiekiem w fibroblastach następuje obniżenie ekspresji genów związanych z produkcją składników ECM, takich jak kolageny czy glikozaminoglikany [122].

Analiza ekspresji genów *Colla2* i *Col3a1* w skórze niezranionej oraz w kolejnych dniach po zranieniu wykazała istotną różnicę w ich poziomach pomiędzy młodymi samicami a młodymi samcami. Różnice te mogą wynikać z wykazanego w licznych doniesieniach wpływu hormonów steroidowych. Badania wskazują, iż estrogeny i androgeny mogą mieć znaczny wpływ na zawartość kolagenu w skórze [123]. W badaniach Sauerbronn i wsp. wykazano, iż skóra kobiet postmenopauzalnych, przyjmujących od co najmniej 6 miesięcy hormonalną terapię zastępczą, charakteryzowała się znacznie większą ilością włókien kolagenowych w porównaniu do skóry kobiet przyjmujących placebo [124]. Ponadto, wyniki analiz Hardman i Ashcroft wskazują, iż estrogeny wpływają na proces gojenia urazów skóry poprzez regulację ekspresji szeregu genów związanych ze stanem zapalnym, produkcją ECM oraz aktywnością proteaz [42], a obniżenie poziomu estrogenu u osób w podeszłym wieku jest głównym powodem nieprawidłowości w procesie gojenia. Biorąc pod uwagę, iż kolagen typu 1, 2 oraz 3 jest substratem dla kolagenazy 3 (Mmp-13), prezentowane wyniki dotyczące zmian poziomów ekspresji genu *Mmp-13* (publikacja 1, figura 5D) mogą również wskazywać na potencjalne zależności pomiędzy poziomem estrogenu i Mmp-13 w procesie gojenia urazów skóry. W 3 dniu po zranieniu ekspresja genu *Mmp-13* była istotnie wyższa u młodych samic w porównaniu do młodych samców, co mogłoby tłumaczyć tak duże różnice w poziomach *Colla2* i *Col3a1* między tymi grupami. Zagadnienie to może być podstawą do dalszych badań.

W 7 dniu po zranieniu poziomy ekspresji genu *Mmp-13* były najwyższe w grupie młodych samic karmionych HFD. Dane literaturowe wskazują, iż oprócz keratynocytów i fibroblastów skóry właściwej, także adipocyty mogą stanowić źródło Mmp-13 [125]. Potwierdzają to badania Ezure i Amano, w których kokultura adipocytów z fibroblastami 3T3-L1 spowodowała znaczny wzrost poziomów mRNA *Mmp-13* [126]. Badania ostatniej dekady wyraźnie wskazują na udział śródskórnych komórek tłuszczowych w procesie gojenia ran skóry. Schmidt and Horsley, wykazały, iż w fazie proliferacyjnej gojenia ran, w 5 dniu po zranieniu, adipocyty ponownie zasiedlają ranę, a ich brak prowadzi do nieprawidłowości w fazie przebudowy tkanki bliznowej [14]. Tak duży wpływ śródskórnych adipocytów

na prawidłowy przebieg późniejszych faz procesu gojenia ran może być związany z plastycznością tych komórek. Zaobserwowano, iż śródskórne adipocyty mają zdolność do przekształcania się w miofibroblasty w procesie zwanym przejściem adipocyto-mezenchymalnym (AMT, *ang. adipocyte-mesenchymal transition*). Marangoni i wsp. wykazali, że stymulacja adipocytów pro-fibrotycznym Tgf β , spowodowała zmianę ich morfologii, wpłynęła na obniżenie ekspresji genów i białek charakterystycznych dla adipocytów, takich jak perylipina, receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów γ (PPAR- γ , *ang. peroxisome proliferator activated receptor γ*), czy białko wiążące kwasy tłuszczowe 4 (FABP4, *ang. fatty acid binding protein 4*), oraz na podwyższenie ekspresji genów (*Colla1*, *Colla2*) i białek (α -SMA) charakterystycznych dla miofibroblastów [127].

Podsumowując, w prezentowanej pracy wykazano, że to wiek jest czynnikiem o nadrzędnym znaczeniu dla przebiegu procesu gojenia ran skóry, natomiast płeć oraz dieta (wysoko lub niskotłuszczowa) jako czynniki drugorzędne wykazują działanie modulujące na poszczególne etapy tego procesu (*Hipoteza 1*). Warto również zwrócić uwagę na fakt, iż u zwierząt w podeszłym wieku wykazano jedynie pewne, widoczne w reepitelializacji, opóźnienie a nie zahamowanie czy też upośledzenie procesu gojenia. Natomiast analiza histologiczna obszaru zajętego przez powstającą bliznę wykazała, iż jest on istotnie mniejszy u zwierząt w podeszłym wieku niż u osobników młodych. Wynik ten jest zgodny z obserwacjami Ashcrofta i wsp., którzy wykazali, że u osobników w podeszłym wieku powstająca blizna jest znacznie delikatniejsza niż u osobników dorosłych i przypomina skórę niezranioną [34].

Przedstawione w prezentowanej pracy dane wskazujące, iż sposób gojenia ran skórnych jest przede wszystkim zależny od wieku skłoniły mnie do przeanalizowania potencjalnych, związanych z wiekiem osobniczym zmian w ekspresji Foxn1 w skórze niezranionej oraz w procesie gojenia ran (*Zadania badawcze 3 i 4*). Dane literaturowe wskazują, że w skórze niezranionej ekspresja Foxn1 występuje jedynie w komórkach nabłonkowych skóry oraz grasicy [76,128,129]. Wykazano, iż w grasicy spadek ekspresji Foxn1 następuje wraz z wiekiem i związany jest z inwolucją tego narządu [72,130]. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono jednak badań dotyczących potencjalnej, związanej z wiekiem modulacji ekspresji czynnika Foxn1 w skórze, a prezentowana praca jest jedną z pierwszych prób określenia zmian ekspresji Foxn1 w ciągu życia osobniczego myszy (*publikacja 2*).

Analiza ekspresji Foxn1 w skórze niezranionej wskazuje, iż poziomy mRNA *Foxn1* oraz odsetek Foxn1-pozytywnych komórek u starych zwierząt (16-18 miesięcznych) nie są niższe niż w pozostałych badanych grupach zwierząt (*publikacja 2, figura 2A,D oraz figura 4A- C*). Obecność Foxn1 wykazano w mieszkach włosowych oraz we wszystkich, poza warstwą podstawną, komórkach naskórka, zarówno u myszy młodych, dorosłych jak i starych. Zatem uzyskane wyniki nie potwierdziły hipotezy dotyczącej związanego z wiekiem spadku aktywności Foxn1 (*Hipoteza II*). W prezentowanych badaniach wiek analizowanych myszy starych wahał się od 16 do 18 miesięcy. Najnowsze badania zespołu prof. Gawrońskiej-Kozak wykazały, iż obniżenie ekspresji Foxn1 w skórze następuje wraz z wiekiem, ale dotyczy zdecydowanie starszych, 21 miesięcznych myszy [107]. Wyniki te wskazują na potrzebę kontynuowania badań z uwzględnieniem myszy B6 z grupy wiekowej 24-30 miesięcy, co odpowiada wiekowi 69-81 lat u ludzi (<https://resources.jax.org/white-papers/whitepaper-aged-b6>).

Wykazana w prezentowanych badaniach kolokalizacja Foxn1-eGFP z E-kadheryną i z Mmp-9 (*publikacja 2, figura 5C-F oraz figura 7D-I*), potwierdza opisany w pracy Gawrońskiej-Kozak i wsp. [73] udział Foxn1 w procesie reepitelializacji w początkowych dniach gojenia urazów skóry. Warto zwrócić uwagę na fakt, iż obecność Foxn1-eGFP została wykryta nie tylko w naskórku, lecz również w warstwie brodawkowej skóry właściwej i to zarówno w początkowej (5-7 dzień), jak i w późnej (14-36) fazie gojenia ran. Obecność komórek wykazujących kolokalizację Foxn1-eGFP wraz z E-kadheryną i N-kadheryną, a także kolokalizacja komórek Foxn1-eGFP z markerem miofibroblastów α SMA w warstwie brodawkowej (*publikacja 2, figura 4E oraz figura 6B-D*), pozwala na stwierdzenie, iż czynnik transkrypcyjny Foxn1 jest regulatorem procesu naprawczego (bliznowego) skóry. Prezentowane w pracy wyniki rozszerzają pulę danych uzyskanych we wcześniejszych badaniach przeprowadzonych na młodych (28-35 dniowych) myszach we wczesnych etapach (dni 1-7) gojenia, których wyniki wskazywały na możliwe zaangażowanie Foxn1 w EMT. Proces EMT, polegający na zmianie fenotypu komórki z epitelialnego na mezenchymalny, początkowo zaobserwowano podczas rozwoju płodowego [131]. U dorosłych osobników EMT jest często kojarzony z procesem gojenia ran lub z przerzutami nowotworowymi [132,133]. W procesie EMT w komórkach nabłonkowych następuje przeprogramowanie prowadzące do zmiany ekspresji genów, utraty połączeń międzykomórkowych, zmiany kształtu komórek,

a w efekcie do uzyskania większej ruchliwości i tzw. fenotypu inwazyjnego [132]. Ponieważ Foxn1 jest czynnikiem stymulującym proces różnicowania keratynocytów, możliwe jest również, że uczestniczy w zmianie fenotypu komórek z nabłonkowych do mezenchymalnych. Weryfikacja tej hipotezy wymaga jednak dalszych badań.

Analiza ekspresji Foxn1 podczas dalszych etapów procesu gojenia ran (14–36 dzień po zranieniu) wykazała obecność komórek Foxn1-eGFP pozytywnych w warstwie brodawkowej skóry właściwej (*publikacja 2, figura 6*). W badaniach przeprowadzonych przez Driskell i wsp. [7], mających na celu określenie udziału dwóch linii fibroblastów: fibroblastów warstwy brodawkowej oraz warstwy siateczkowej w zasiedlaniu skóry po zranieniu, zaobserwowano, iż w początkowych etapach procesu gojenia biorą udział głównie fibroblasty warstwy siateczkowej oraz adipocyty podskórnej tkanki tłuszczowej. Fibroblasty warstwy brodawkowej ulegają ekspansji w skórze zranionej nie wcześniej niż w okresie odbudowy naskórka, w odpowiedzi na stymulację ze strony naskórkowej β -kateniny. Driskell i wsp. wykazali również, iż obecność fibroblastów warstwy brodawkowej wpływa na możliwość odtworzenia mieszków włosowych w skórze pourazowej. Powyższe dane oraz przedstawione w prezentowanej pracy wyniki wskazujące, iż ranę zasiedlają komórki wykazujące ekspresję Foxn1-eGFP oraz α SMA, mogą prowadzić do postawienia hipotezy, iż fibroblasty warstwy brodawkowej częściowo wywodzą się z komórek epitelialnych wykazujących ekspresję Foxn1, które pod wpływem czynników szlaku sygnałowego Wnt/ β -katenina ulegają procesowi przejścia epitelialno-mezenchymalnego. Można więc przypuszczać, że ekspresja Foxn1 stymuluje poszczególne szlaki sygnałowe, co prowadzi do sekrecji czynników oddziałujących na fibroblasty skóry właściwej, a w konsekwencji, do bliznowego gojenia urazów skóry.

W procesie EMT ważną rolę odgrywają metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej (Mmp-2, -9, -13, -14) [134,135], przy czym liczne dane literaturowe opisują rolę Mmp-9 jako markera EMT związanego z przebudową ECM oraz migracją komórek [132,136]. W prezentowanej pracy wyniki analiz ekspresji oraz kolokalizacja Foxn1 i Mmp-9 w naskórku w początkowych etapach procesu gojenia ran mogą wskazywać na istnienie mechanizmu łączącego czynnik transkrypcyjny Foxn1 i Mmp-9. Wykazano, iż w skórze niezranionej ekspresja Mmp-9 u myszy bez aktywnego czynnika Foxn1 (Foxn1^{-/-}) znacznie różni się od obserwowanej u myszy szczepu dzikiego (Foxn1^{+/+}) [61,137]. Różnice te związane są prawdopodobnie ze specyficznym fenotypem pochodzących od myszy Foxn1^{-/-} fibroblastów

skóry charakteryzujących się wysoką, w porównaniu do myszy szczepu dzikiego, ekspresją Mmp-9 [61,137]. Potwierdzają to wyniki uzyskane przez Kur-Piotrowską i wsp. [138] wskazujące, iż u myszy Foxn1^{-/-} ekspresja Mmp-9 jest znacznie podwyższona w skórze właściwej, a zdecydowanie obniżona w naskórku. Również w procesie gojenia ran skóry wykazano znaczne rozbieżności pomiędzy profilem ekspresji Mmp-9 myszy Foxn1^{+/+} i Foxn1^{-/-} [61]. W obu przypadkach powstanie urazu indukuje podwyższenie ekspresji Mmp-9 w pierwszych dniach po zranieniu (od 1 do 3 dnia), jednak u myszy z nieaktywnym Foxn1 wzrost poziomów Mmp-9 jest znacznie niższy niż u myszy szczepu dzikiego. Ponadto, zaobserwowany u myszy Foxn1^{-/-}, w odróżnieniu od Foxn1^{+/+}, drugi wzrost ekspresji Mmp-9 w późnej fazie gojenia (od 21-36 dnia) sugeruje powiązanie z procesem bezbliznowego gojenia ran skórnych, występującego u myszy z deficytem aktywności Foxn1 [61]. Pomimo, iż powyższe dane wskazują na istnienie zależności pomiędzy Foxn1 i Mmp-9, określenie bezpośredniej interakcji pomiędzy Foxn1 i Mmp-9 wymaga dalszych badań.

6. Wnioski

Weryfikacja postawionej w pracy hipotezy badawczej pozwoliła sformułować następujące wnioski:

1. Najistotniejszy wpływ na homeostazę niezranionej skóry wywierają dwa kumulujące się parametry: wiek oraz dieta, przy czym następujący w konsekwencji HFD rozrost warstwy dWAT w skórze starych zwierząt rekompensuje związaną z wiekiem utratę grubości warstwy skóry właściwej bogatej w fibroblasty.
2. Spośród analizowanych czynników ogólnoustrojowych (wiek, dieta oraz płeć), wiek wywiera największy wpływ na przebieg procesu gojenia urazów skóry.
3. Wiek i płeć, jako dwa kumulujące się parametry, skutkują zmianami w ekspresji genów *Colla2* i *Col3a1*, która była najwyższa w grupie młodych samców, zarówno w skórze niezranionej jak i podczas całego procesu gojenia.
4. Wykazano kumulatywny efekt wieku i diety na zmianę dynamiki procesu reepitelializacji oraz na profil ekspresji genu *CD68* w procesie gojenia urazów skóry.
5. Zbiorczy wpływ wszystkich analizowanych parametrów: wieku, diety i płci na proces gojenia ran skórnych zaobserwowano jedynie w aspekcie wysokiej ekspresji genu *Timp-1* w procesie gojenia ran.
6. Ekspresja *Foxn1* oraz *Mmp-9* podlega modulacji w przebiegu procesu gojenia urazów skóry.
7. Czynniki *Foxn1* reguluje proces odbudowy naskórka podczas gojenia urazów skórnych.
8. Czynniki transkrypcyjny *Foxn1* uczestniczy w procesie powstawania tkanki bliznowej poprzez udział w EMT w późnej fazie gojenia.
9. Nie wykazano jednoznacznych zależności pomiędzy poziomami ekspresji czynnika transkrypcyjnego *Foxn1* w skórze a wiekiem osobniczym myszy C57BL/6 w obrębie badanych grup wiekowych.

Bibliografia

1. Slominski A. Neuroendocrine system of the skin. *Dermatology*. 2005;211:199–208.
2. Cichocki. T., Litwin J., Mirecka J. *Kompendium histologii*; Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2009, wyd.4.
3. *Histologia Junqueira Podręcznik i atlas*. A L Mescher, rok wydania 2020, wydawnictwo: Edra Urban & Partner.
4. Yuspa SH, Kilkenny AE, Steinert PM, Roop DR. Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro. *J Cell Biol*. 1989 Sep;109(3):1207-17.
5. Rousselle P., Gentilhomme E., Neveux Y. (2017) Markers of Epidermal Proliferation and Differentiation. In: Humbert P., Fanian F., Maibach H., Agache P. (eds) *Agache's Measuring the Skin*. Springer, Cham.
6. McAnulty RJ. Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(4):666-71.
7. Driskell RR, Lichtenberger BM, Hoste E, Kretzschmar K, Simons BD, Charalambous M, Ferron SR, Herault Y, Pavlovic G, Ferguson-Smith AC, Watt FM. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. *Nature*. 2013 Dec 12;504(7479):277-281.
8. Rinkevich Y, Walmsley GG, Hu MS, Maan ZN, Newman AM, Drukker M, Januszyk M, Krampitz GW, Gurtner GC, Lorenz HP, Weissman IL, Longaker MT. Skin fibrosis. Identification and isolation of a dermal lineage with intrinsic fibrogenic potential. *Science*. 2015 Apr 17;348(6232):aaa2151.
9. Alexander CM, Kasza I, Yen CL, Reeder SB, Hernando D, Gallo RL, Jahoda CA, Horsley V, MacDougald OA. Dermal white adipose tissue: a new component of the thermogenic response. *J Lipid Res*. 2015 Nov;56(11):2061-9.

10. Kasza I, Suh Y, Wollny D, Clark RJ, Roopra A, Colman RJ, MacDougald OA, Shedd TA, Nelson DW, Yen MI, Yen CL, Alexander CM. Syndecan-1 is required to maintain intradermal fat and prevent cold stress. *PLoS Genet.* 2014; 10:e1004514.
11. Festa E, Fretz J, Berry R, Schmidt B, Rodeheffer M, Horowitz M, Horsley V. Adipocyte lineage cells contribute to the skin stem cell niche to drive hair cycling. *Cell.* 2011; 146:761–71.
12. Kruglikov IL, Scherer PE. Dermal adipocytes and hair cycling: is spatial heterogeneity a characteristic feature of the dermal adipose tissue depot? *Exp Dermatol.* 2016; 25:258–62.
13. Schmidt B, Horsley V. Unravelling hair follicle-adipocyte communication. *Exp Dermatol.* 2012; 21:827–30.
14. Schmidt BA, Horsley V. Intradermal adipocytes mediate fibroblast recruitment during skin wound healing. *Development.* 2013; 140:1517–27.
15. Zhang LJ, Guerrero-Juarez CF, Hata T, Bapat SP, Ramos R, Plikus MV, Gallo RL. Innate immunity. Dermal adipocytes protect against invasive *Staphylococcus aureus* skin infection. *Science.* 2015 Jan 2;347(6217):67-71.
16. Zhang LJ, Chen SX, Guerrero-Juarez CF, Li F, Tong Y, Liang Y, Liggins M, Chen X, Chen H, Li M, Hata T, Zheng Y, Plikus MV, Gallo RL. Age-Related Loss of Innate Immune Antimicrobial Function of Dermal Fat Is Mediated by Transforming Growth Factor Beta. *Immunity.* 2019; 50:121–136.e5.
17. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 1999; 341: 738-46.
- 18- Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature.* 2008; 453: 314-21).
19. Werner S, Grose R Regulation of wound healing by growth factors and cytokines..*Physiol Rev.* 2003 Jul;83(3):835-70.
20. Clark RA. Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. *Am J Med Sci.* 1993 Jul;306(1):42-8.

21. Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiol Rev* 99: 665–706, 2019. Published November 21, 2018;
22. Caley MP, Martins VL, O’Toole EA. Metalloproteinases and Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2015; 4:225–34.
23. Gill SE, Parks WC. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008; 40:1334–47.
24. Guo S, DiPietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res*. 2010; 89:219–29.
25. Shipman AR, Millington GW. Obesity and the skin. *Br J Dermatol*. 2011; 165:743–50.
26. Guida B, Nino M, Perrino NR, Laccetti R, Trio R, Labella S, Balato N. The impact of obesity on skin disease and epidermal permeability barrier status. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010 Feb;24(2):191-5.
27. Loffler H, Aramaki JU, Effendy I. The influence of body mass index on skin susceptibility to sodium lauryl sulphate. *Skin Res Technol*. 2002;8(1):19-22.
28. Hirt PA, Castillo DE, Yosipovitch G, Keri JE. Skin changes in the obese patient. *J Am Acad Dermatol*. 2019 Nov;81(5):1037-1057.
29. Wilson JA, Clark JJ. Obesity: impediment to postsurgical wound healing. *Adv Skin Wound Care*. 2004 Oct;17(8):426-35.
30. Seitz O, Schürmann C, Hermes N, Müller E, Pfeilschifter J, Frank S, Goren I. Wound healing in mice with high-fat diet or ob gene-induced diabetes-obesity syndromes: a comparative study. *Exp Diabetes Res*. 2010;2010:476969.
31. Gosain A, DiPietro LA. Aging and wound healing. *World J Surg*. 2004 Mar;28(3):321-6.
32. Swift ME, Burns AL, Gray KL, DiPietro LA. Age-related alterations in the inflammatory response to dermal injury. *J Invest Dermatol*. 2001; 117:1027–35.
33. Swift ME, Kleinman HK, DiPietro LA. Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice. *Lab Invest*. 1999; 79:1479–87.

34. Ashcroft GS, Horan MA, Ferguson MW. Aging is associated with reduced deposition of specific extracellular matrix components, an upregulation of angiogenesis, and an altered inflammatory response in a murine incisional wound healing model. *J Invest Dermatol.* 1997; 108:430–37.
35. Keylock KT, Vieira VJ, Wallig MA, DiPietro LA, Schrementi M, Woods JA. Exercise accelerates cutaneous wound healing and decreases wound inflammation in aged mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008; 294:R179–84.
36. Ashcroft GS, Kielty CM, Horan MA, Ferguson MW. Age-related changes in the temporal and spatial distributions of fibrillin and elastin mRNAs and proteins in acute cutaneous wounds of healthy humans. *J Pathol.* 1997 Sep;183(1):80-9.
37. Sandby-Møller J, Poulsen T, Wulf HC. Epidermal thickness at different body sites: relationship to age, gender, pigmentation, blood content, skin type and smoking habits. *Acta Derm Venereol.* 2003; 83:410–13.
38. Shuster S, Black MM, McVitie E. The influence of age and sex on skin thickness, skin collagen and density. *Br J Dermatol.* 1975; 93:639–43.
39. Azzi L, El-Alfy M, Martel C, Labrie F. Gender differences in mouse skin morphology and specific effects of sex steroids and dehydroepiandrosterone. *J Invest Dermatol.* 2005; 124:22–27.
40. Rønø B, Engelholm LH, Lund LR, Hald A. Gender affects skin wound healing in plasminogen deficient mice. *PLoS One.* 2013; 8:e59942.
41. Gilliver SC, Ruckshanthi JP, Hardman MJ, Nakayama T, Ashcroft GS. Sex dimorphism in wound healing: the roles of sex steroids and macrophage migration inhibitory factor. *Endocrinology.* 2008 Nov;149(11):5747-57.
42. Hardman MJ, Ashcroft GS. Estrogen, not intrinsic aging, is the major regulator of delayed human wound healing in the elderly. *Genome Biol.* 2008;9(5):R80.
43. Poss KD, Keating MT, Nechiporuk A: Tales of regeneration in zebrafish. *Dev Dyn*, 2003, 226: 202-210.

44. Brockes JP, Kumar A: Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3: 566-574.
45. Kato T, Miyazaki K, Shimizu-Nishikawa K, Koshihara K, Obara M, Mishima HK i inni: Unique expression patterns of matrix metalloproteinases in regenerating newt limbs. *Dev Dyn*, 2003, 226: 366-376.
46. Rowlatt U. Intrauterine wound healing in a 20 week human fetus. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1979; 381: 353–61.
47. Colwell AS, Longaker MT, Lorenz HP. Mammalian fetal organ regeneration. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2005; 93: 83–100.
48. Cass DL, Bullard KM, Sylvester KG, Yang EY, Longaker MT, Adzick NS. Wound size and gestational age modulate scar formation in fetal wound repair. *J Pediatr Surg* 1997; 32: 411–5.
49. Ihara S, Motobayashi Y, Nagao E, Kistler A. Ontogenetic transition of wound healing pattern in rat skin occurring at the fetal stage. *Development*. 1990; 110(3):671–80.
50. Longaker MT, Whitby DJ, Ferguson MW, Lorenz HP, Harrison MR, Adzick NS. Adult skin wounds in the fetal environment heal with scar formation. *Ann Surg* 1994; 219: 65–72.
51. Goss RJ, Grimes LN: Epidermal downgrowths in regenerating rabbit ear holes. *J Morphol*, 1975, 146: 533-542.
52. Seifert AW, Kiama SG, Seifert MG, Goheen JR, Palmer TM, Maden M. Skin shedding and tissue regeneration in African spiny mice (*Acomys*). *Nature*. 2012 Sep 27;489(7417):561-5.
53. Clark LD, Clark RK, Heber-Katz E: A new murine model for mammalian wound repair and regeneration. *Clin Immunol Immunopathol*, 1998, 88: 35-45.
54. Gawronska-Kozak B: Regeneration in the ears of immunodeficient mice: identification and lineage analysis of mesenchymal stem cells. *Tissue Eng*, 2004, 10: 1251-1265.
- 55 Han M, Yang X, Lee J, Allan CH, Muneoka K: Development and regeneration of the neonatal digit tip in mice. *Dev Biol*, 2008, 315: 125-135.

56. Han M, Yang X, Taylor G, Burdsal CA, Anderson RA, Muneoka K. Limb regeneration in higher vertebrates: developing a roadmap. *Anat Rec B New Anat.* 2005 Nov;287(1):14-24.
57. Muneoka K, Han M, Gardiner DM: Regrowing human limbs. *Sci Am*, 2008, 298: 56-63.
58. Gawronska-Kozak B, Bogacki M, Rim JS, Monroe WT, Manuel JA: Scarless skin repair in immunodeficient mice. *Wound Repair Regen*, 2006, 14: 265-276.
59. Lorenz HP, Adzick NS. Scarless skin wound repair in the fetus. *West J Med.* 1993 Sep;159(3):350-5.
60. Manuel JA, Gawronska-Kozak B. Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) is upregulated during scarless wound healing in athymic nude mice. *Matrix Biol.* 2006 Oct;25(8):505-14.
61. Gawronska-Kozak B. Scarless skin wound healing in FOXP1 deficient (nude) mice is associated with distinctive matrix metalloproteinase expression. *Matrix Biol.* 2011 May;30(4):290-300.
62. Gawronska-Kozak B, Grabowska A, Kopcewicz M, Kur A: Animal models of skin regeneration. *Reprod Biol*, 2014, 14: 61-67.
- 63 Mori R, Tanaka K, de Kerckhove M, Okamoto M, Kashiyama K, Tanaka K, Kim S, Kawata T, Komatsu T, Park S, Ikematsu K, Hirano A, Martin P, Shimokawa I. Reduced FOXO1 expression accelerates skin wound healing and attenuates scarring. *Am J Pathol.* 2014 Sep;184(9):2465-79.
64. Mack JA, Abramson SR, Ben Y, Coffin JC, Rothrock JK, Maytin EV, Hascall VC, Largman C, Stelnicki EJ. Hoxb13 knockout adult skin exhibits high levels of hyaluronan and enhanced wound healing. *FASEB J.* 2003 Jul;17(10):1352-4.
65. Nehls, M.; Pfeifer, D.; Schorpp, M.; Hedrich, H.; Boehm, T. New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat nude mutations. *Nature* 1994, 372, 103–107.
66. Blackburn CC, Augustine CL, Li R, Harvey RP, Malin MA, Boyd RL, Miller JF, Morahan G. The nu gene acts cell-autonomously and is required for differentiation of thymic epithelial progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jun 11;93(12):5742-6.

67. Cordier, A. C. and Haumont, S. M., Development of thymus, parathyroids and ultimobranchial bodies in NMRI and nude mice. *Am. J. Anat.* 1980. 157: 227–263.
68. Itoi, M., Kawamoto, H., Katsura, Y. and Amagai, T., Two distinct steps of immigration of haematopoietic progenitors into the early thymus anlage. *Int. Immunol.* 2001. 13: 1203–1211.
69. Ortman CL, Dittmar KA, Witte PL, Le PT. Molecular characterization of the mouse involuted thymus: aberrations in expression of transcription regulators in thymocyte and epithelial compartments. *Int Immunol.* 2002 Jul;14(7):813-22.
70. Chen L, Xiao S, Manley NR. Foxn1 is required to maintain the postnatal thymic microenvironment in a dosage-sensitive manner. *Blood.* 2009 Jan 15;113(3):567-74.
71. Zook EC, Krishack PA, Zhang S, Zeleznik-Le NJ, Firulli AB, Witte PL, Le PT. Overexpression of Foxn1 attenuates age-associated thymic involution and prevents the expansion of peripheral CD4 memory T cells. *Blood.* 2011 Nov 24;118(22):5723-31.
72. Bredenkamp N, Nowell CS, Blackburn CC. Regeneration of the aged thymus by a single transcription factor. *Development.* 2014 Apr;141(8):1627-37.
73. Gawronska-Kozak B., Grabowska A., Kur-Piotrowska A., Kopcewicz M.: Foxn1 transcription factor regulates wound healing of skin through promoting epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*, 2016; 11: e0150635.
74. Lee D., Prowse D.M., Brissette J.L.: Association between mouse nude gene expression and the initiation of epithelial terminal differentiation. *Dev. Biol.*, 1999; 208: 362-374.
75. Brissette JL, Li J, Kamimura J, Lee D, Dotto GP: The product of the mouse nude locus, Whn, regulates the balance between epithelial cell growth and differentiation. *Genes Dev* 1996, 10(17):2212-2221.
76. Prowse DM, Lee D, Weiner L, Jiang N, Magro CM, Baden HP, Brissette JL: Ectopic expression of the nude gene induces hyperproliferation and defects in differentiation: implications for the self-renewal of cutaneous epithelia. *Dev Biol* 1999, 212(1):54-67.
77. Baxter RM, Brissette JL: Role of the nude gene in epithelial terminal differentiation. *J Invest Dermatol* 2002, 118(2):303-309.

78. Weiner, L.; Han, R.; Scicchitano, B.M.; Li, J.; Hasegawa, K.; Grossi, M.; Lee, D.; Brisette, J.L. Dedicated epithelial recipient cells determine pigmentation patterns. *Cell* 2007, 130, 932–94.
79. Bukowska J, Kopcewicz M, Walenzik K, Gawronska-Kozak B. Foxn1 in Skin Development, Homeostasis and Wound Healing. *Int J Mol Sci.* 2018 Jul 4;19(7):1956.
80. Meier N, Dear TN, Boehm T: Whn and mHa3 are components of the genetic hierarchy controlling hair follicle differentiation. *Mech Dev* 1999, 89(1-2):215-221;
81. Schlake T, Schorpp M, Maul-Pavicic A, Malashenko AM, Boehm T: Forkhead/winged-helix transcription factor Whn regulates hair keratin gene expression: molecular analysis of the nude skin phenotype. *Dev Dyn* 2000, 217(4):368-376).
82. Adriani M, Martinez-Mir A, Fusco F, Busiello R, Frank J, Telese S i inni: Ancestral founder mutation of the nude (FOXN1) gene in congenital severe combined immunodeficiency associated with alopecia in southern Italy population. *Ann Hum Genet*, 2004, 68: 265-268.
83. Stemmer K, Kotzbeck P, Zani F, Bauer M, Neff C, Müller TD, Pfluger PT, Seeley RJ, Divanovic S. Thermoneutral housing is a critical factor for immune function and diet-induced obesity in C57BL/6 nude mice. *Int J Obes (Lond)*. 2015 May;39(5):791-7.
84. Terszowski G, Müller SM, Bleul CC, Blum C, Schirmbeck R, Reimann J, Pasquier LD, Amagai T, Boehm T, Rodewald HR. Evidence for a functional second thymus in mice. *Science*. 2006 Apr 14;312(5771):284-7.
85. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987 Apr;162(1):156-9.
86. Gołąb, Jakóbiak; Gillitzer R, Goebeler M. Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol*. 2001; 69:513–21.
87. Clark R The molecular and cellular biology of wound repair. Plenum Press, New York, 1996.
88. Peled ZM, Chin GS, Liu W, Galliano R, Longaker MT: Response to tissue injury. *Clin Plast Surg*, 2000, 27: 489-500.

89. Lucas T, Waisman A, Ranjan R, Roes J, Krieg T, Müller W, Roers A, Eming SA. Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *J Immunol.* 2010; 184:3964–77.
90. Goren I, Allmann N, Yogev N, Schürmann C, Linke A, Holdener M, Waisman A, Pfeilschifter J, Frank S. A transgenic mouse model of inducible macrophage depletion: effects of diphtheria toxin-driven lysozyme M-specific cell lineage ablation on wound inflammatory, angiogenic, and contractive processes. *Am J Pathol.* 2009 Jul;175(1):132-47.
91. Mirza R, DiPietro LA, Koh TJ. Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice. *Am J Pathol.* 2009 Dec;175(6):2454-62.
92. DiPietro LA, Polverini PJ, Rahbe SM, Kovacs EJ. Modulation of JE/MCP-1 expression in dermal wound repair. *Am J Pathol.* 1995 Apr;146(4):868-75.
93. Low QE, Drugea IA, Duffner LA, Quinn DG, Cook DN, Rollins BJ, Kovacs EJ, DiPietro LA. Wound healing in MIP-1alpha(-/-) and MCP-1(-/-) mice. *Am J Pathol.* 2001; 159:457–63.
94. D.T.Woodley, Reepithelialization, in: R.A.F. Clark (Ed.), *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*, 2nd ed. Plenum Press, New York 1996, pp. 339–354.
95. Fujiwara M, Muragaki Y, Ooshima A. Keloid-derived fibroblasts show increased secretion of factors involved in collagen turnover and depend on matrix metalloproteinase for migration. *Br J Dermatol.* 2005 Aug;153(2):295-300.
96. Wysocki AB, Staiano-Coico L, Grinnell F. Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. *J Invest Dermatol.* 1993 Jul;101(1):64-8.
97. Yang EV, Gardiner DM, Carlson MR, Nugas CA, Bryant SV: Expression of Mmp-9 and related matrix metalloproteinase genes during axolotl limb regeneration. *Dev Dyn* 1999, 216(1):2-9.
98. Ashcroft GS, Herrick SE, Tarnuzzer RW, Horan MA, Schultz GS, Ferguson MW. Human ageing impairs injury-induced in vivo expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP)-1 and -2 proteins and mRNA. *J Pathol.* 1997 Oct;183(2):169-76.

99. Ashcroft GS, Horan MA, Herrick SE, Tarnuzzer RW, Schultz GS, Ferguson MW. Age-related differences in the temporal and spatial regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) in normal skin and acute cutaneous wounds of healthy humans. *Cell Tissue Res.* 1997 Dec;290(3):581-91.
100. Hattori N, Mochizuki S, Kishi K, Nakajima T, Takaishi H, D'Armiento J, Okada Y. MMP-13 plays a role in keratinocyte migration, angiogenesis, and contraction in mouse skin wound healing. *Am J Pathol.* 2009 Aug;175(2):533-46.
101. Toriseva M, Laato M, Carpén O, Ruohonen ST, Savontaus E, Inada M, Krane SM, Kähäri VM. MMP-13 regulates growth of wound granulation tissue and modulates gene expression signatures involved in inflammation, proteolysis, and cell viability. *PLoS One.* 2012;7(8):e42596.
102. Crowe MJ, Doetschman T, Greenhalgh DG. Delayed wound healing in immunodeficient TGF-beta 1 knockout mice. *J Invest Dermatol.* 2000 Jul;115(1):3-11.
103. Occeleston NL, O'Kane S, Lavery HG, Cooper M, Fairlamb D, Mason T, Bush JA, Ferguson MW. Discovery and development of avotermin (recombinant human transforming growth factor beta 3): a new class of prophylactic therapeutic for the improvement of scarring. *Wound Repair Regen.* 2011 (Suppl 1);19:s38-48.
104. Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci.* 1995; 108:985-1002.
105. Le M, Naridze R, Morrison J, Biggs LC, Rhea L, Schutte BC, Kaartinen V, Dunnwald M. Transforming growth factor Beta 3 is required for excisional wound repair in vivo. *PLoS One.* 2012; 7:e48040.
106. Xue M, Jackson CJ. Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2015 Mar 1;4(3):119-136.
107. Walendzik K, Kopcewicz M, Bukowska J, Panasiewicz G, Szafranska B, Gawronska-Kozak B. The Transcription Factor FOXN1 Regulates Skin Adipogenesis and Affects Susceptibility to Diet-Induced Obesity. *J Invest Dermatol.* 2020 Jun;140 (6):1166-1175.e9.

108. Kur-Piotrowska A, Bukowska J, Kopcewicz MM, Dietrich M, Nynca J, Slowinska M, Gawronska-Kozak B. Foxn1 expression in keratinocytes is stimulated by hypoxia: further evidence of its role in skin wound healing. *Sci Rep.* 2018 Apr 3;8(1):5425. 9.
109. Bayat A, McGrouther D A, Ferguson M W J. Skin scarring *BMJ* 2003; 326 :88.
110. Denton CP, Khan K, Hoyles RK, Shiwen X, Leoni P, Chen Y, Eastwood M, Abraham DJ. Inducible lineage-specific deletion of TbetaRII in fibroblasts defines a pivotal regulatory role during adult skin wound healing. *J Invest Dermatol.* 2009; 129:194–204.
111. Finnson KW, McLean S, Di Guglielmo GM, Philip A. Dynamics of Transforming Growth Factor Beta Signaling in Wound Healing and Scarring. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2013; 2:195–214.
112. Gailit J, Welch MP, Clark RA. TGF-beta 1 stimulates expression of keratinocyte integrins during re-epithelialization of cutaneous wounds. *J Invest Dermatol.* 1994; 103:221–27.
113. Evrard SM, d’Audigier C, Mauge L, Israël-Biet D, Guerin CL, Bieche I, Kovacic JC, Fischer AM, Gaussem P, Smadja DM. The profibrotic cytokine transforming growth factor- β 1 increases endothelial progenitor cell angiogenic properties. *J Thromb Haemost.* 2012; 10:670–79.
114. Thompson HG, Mih JD, Krasieva TB, Tromberg BJ, George SC. Epithelial-derived TGF-beta2 modulates basal and wound-healing subepithelial matrix homeostasis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006; 291:L1277–85.
115. Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol.* 1993; 122:103–11.
116. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmoulière A, Varga J, De Wever O, Mareel M, Gabbiani G. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol.* 2012; 180:1340–55
117. Levine JH, Moses HL, Gold LI, Nanney LB. Spatial and temporal patterns of immunoreactive transforming growth factor beta 1, beta 2, and beta 3 during excisional wound repair. *Am J Pathol.* 1993; 143:368–80.

118. Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol.* 1975 Jan;78(1):71-100.
119. Danon D, Kowatch MA, Roth GS: Promotion of wound repair in old mice by local injection of macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989 86:2018±2020.
120. Roubenoff R, Harris TB, Abad LW, Wilson PW, Dallal GE, Dinarello CA. Monocyte cytokine production in an elderly population: effect of age and inflammation. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 1998 Jan; 53(1):M20-6.
121. Quan T, Fisher GJ. Role of Age-Associated Alterations of the Dermal Extracellular Matrix Microenvironment in Human Skin Aging: A Mini-Review. *Gerontology.* 2015; 61:427–34.
122. Salzer MC, Lafzi A, Berenguer-Llargo A, Youssif C, Castellanos A, Solanas G, Peixoto FO, Stephan-Otto Attolini C, Prats N, Aguilera M, Martín-Caballero J, Heyn H, Benitah SA. Identity Noise and Adipogenic Traits Characterize Dermal Fibroblast Aging. *Cell.* 2018 Nov 29;175(6):1575-1590.e22.
123. Fitzmaurice S., Maibach H.I. (2010) Gender Differences in Skin. In: Farage M.A., Miller K.W., Maibach H.I. (eds) *Textbook of Aging Skin.* Springer, Berlin, Heidelberg.
124. Sauerbronn AV, Fonseca AM, Bagnoli VR, Saldiva PH, Pinotti JA. The effects of systemic hormonal replacement therapy on the skin of postmenopausal women. *Int J Gynaecol Obstet.* 2000 Jan;68(1):35-41.
125. Shih CL, Ajuwon KM. Inhibition of MMP-13 prevents diet-induced obesity in mice and suppresses adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *Mol Biol Rep.* 2015 Jul;42(7):1225-32.
126. Ezure T, Amano S. Increased subcutaneous adipose tissue impairs dermal function in diet-induced obese mice. *Exp Dermatol.* 2010; 19:878–82.
127. Marangoni RG, Korman BD, Wei J, Wood TA, Graham LV, Whitfield ML, Scherer PE, Tourtellotte WG, Varga J. Myofibroblasts in murine cutaneous fibrosis originate from adiponectin-positive intradermal progenitors. *Arthritis Rheumatol.* 2015 Apr;67(4):1062-73.
128. Mecklenburg L, Tychsen B, Paus R. Learning from nudity: lessons from the nude phenotype. *Exp Dermatol* 2005; 14:797–810.
129. Calderon L, Boehm T. Synergistic, context-dependent, and hierarchical functions of epithelial components in thymic microenvironments. *Cell* 2012; 149: 159–72.

130. O'Neill KE, Breidenkamp N, Tischner C, Vaidya HJ, Stenhouse FH, Peddie CD, Nowell CS, Gaskell T, Blackburn CC. Foxn1 Is Dynamically Regulated in Thymic Epithelial Cells during Embryogenesis and at the Onset of Thymic Involution. *PLoS One*. 2016 Mar 16;11(3):e0151666.
131. Hay ED. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dyn*. 2005; 233(3):706–20.
132. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014; 15(3):178–96.
133. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006; 7(2):131–42.
134. Leopold PL, Vincent J, Wang H. A comparison of epithelial-to-mesenchymal transition and re-epithelialization. *Semin Cancer Biol*. 2012; 22(5–6):471–83.
135. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol*. 2006; 172(7):973–81.
136. Joseph MJ, Dangi-Garimella S, Shields MA, Diamond ME, Sun L, Koblinski JE, Munshi HG. Slug is a downstream mediator of transforming growth factor-beta1-induced matrix metalloproteinase-9 expression and invasion of oral cancer cells. *J Cell Biochem*. 2009 Oct 15;108(3):726-36.
137. Gawronska-Kozak B, Kirk-Ballard H. Cyclosporin A reduces matrix metalloproteinases and collagen expression in dermal fibroblasts from regenerative FOXN1 deficient (nude) mice. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2013; 6: 7.
138. Kur-Piotrowska A, Kopcewicz M, Kozak LP, Sachadyn P, Grabowska A, Gawronska-Kozak B. Neotenic phenomenon in gene expression in the skin of Foxn1- deficient (nude) mice - a projection for regenerative skin wound healing. *BMC Genomics*. 2017 Jan 9;18(1):56.

Publikacje wraz z oświadczeniami autorów

Niniejszym oświadczam, że publikacja:

Kopcewicz, Marta; Walendzik, Katarzyna; Bukowska, Joanna; Kur-Piotrowska, Anna; Machcińska, Sylwia; Gimble, Jeffrey M.; Gawrońska-Kozak, Barbara „Cutaneous wound healing in aged, high fat diet induced obese female or male C57Bl/6 mice.” *Aging-US* 2020 Apr. 15; 12(8) powstała w wyniku poniżej określonego, indywidualnego wkładu współautorów:

Kopcewicz Marta - 55% - przeprowadzenie doświadczeń *in vivo*; wykonanie i analiza barwień immunohistochemicznych; wykonanie analiz molekularnych oraz biochemicznych; analiza Western Blot; zebranie, opracowanie i interpretacja wyników; przygotowanie manuskryptu; zatwierdzenie publikacji

Walendzik Katarzyna - 10% - udział w przeprowadzeniu doświadczenia *in vivo*; analiza barwień immunohistochemicznych; zatwierdzenie publikacji

Wiśniewska (rodowe Bukowska) Joanna - 5% - interpretacja wyników; korekta manuskryptu; zatwierdzenie publikacji

Kur-Piotrowska Anna - 5% - udział w przeprowadzeniu doświadczeń *in vivo*; zatwierdzenie publikacji

Machcińska Sylwia - 5% - wykonanie analiz immunohistochemicznych; zatwierdzenie publikacji

Gimble Jeffrey M. - 5% - interpretacja wyników; korekta manuskryptu; zatwierdzenie publikacji

Gawrońska-Kozak Barbara - 15% - opracowanie koncepcji badań; administracja projektu; interpretacja wyników; przygotowanie manuskryptu; zatwierdzenie publikacji

Olsztyn, 1.03.2022 r.

Marta Kopcewicz

mgr Marta Kopcewicz

Olsztyn, 1.03.2022 r.

Katarzyna Walendzik

dr Katarzyna Walendzik

Olsztyn, 1.03.2022 r.

Joanna Wiśniewska

dr Joanna Wiśniewska (Bukowska)

Olsztyn, 1.03.2022 r.

Anna Kur-Piotrowska

dr Anna Kur-Piotrowska

Olsztyn, 1.03.2022 r.

Sylwia Machcińska

mgr Sylwia Machcińska

Olsztyn, 1.03.2022 r.

Jeffrey M. Gimble MD PhD

prof. Jeffrey M. Gimble

Olsztyn, 1.03.2022 r.

Barbara Gawrońska-Kozak

prof. dr hab. n. med. Barbara Gawrońska-Kozak

Niniejszym oświadczam, że publikacja:

Kopcewicz, Marta; Kur-Piotrowska, Anna; Bukowska, Joanna; Gimble, Jeffrey M.; Gawronska-Kozak Barbara „Foxn1 and Mmp-9 expression in intact skin and during excisional wound repair in young, adult, and old C57Bl/6 mice.” *Wound Repair and Regeneration* 2017 Apr; 25(2) powstała w wyniku poniżej określonego, indywidualnego wkładu współautorów:

Kopcewicz Marta - 60% - przeprowadzenie doświadczeń *in vivo*; izolacja komórek skóry i naskórka, wykonanie i analiza barwień immunohistochemicznych i immunofluorescencyjnych; wykonanie analiz molekularnych; zebranie, opracowanie i interpretacja wyników; przygotowanie manuskryptu; zatwierdzenie publikacji

Kur-Piotrowska Anna - 10% - udział w izolacji komórek skóry i naskórka; zatwierdzenie publikacji

Wiśniewska (rodowe Bukowska) Joanna - 10% - analiza komórek z wykorzystaniem cytometrii przepływowej; zatwierdzenie publikacji

Gimble Jeffrey M. - 5% - interpretacja wyników; korekta manuskryptu; zatwierdzenie publikacji

Gawrońska-Kozak Barbara - 15% - opracowanie koncepcji badań; administracja projektu; interpretacja wyników; przygotowanie manuskryptu; zatwierdzenie publikacji

Olsztyn, 1.03.2022 r.

Marta Kopcewicz

mgr Marta Kopcewicz

Olsztyn, 1.03.2022 r.

Anna Kur-Piotrowska

dr Anna Kur-Piotrowska

Olsztyn, 1.03.2022 r.

Joanna Wiśniewska

dr Joanna Wiśniewska (Bukowska)

Olsztyn, 1.03.2022 r.

Jeffrey M. Gimble MD PhD

prof. Jeffrey M. Gimble

Olsztyn, 1.03.2022 r.

Barbara Gawronska-Kozak

prof. dr hab. n. med. Barbara Gawrońska-Kozak

Cutaneous wound healing in aged, high fat diet-induced obese female or male C57BL/6 mice

Marta Kopcewicz¹, Katarzyna Walendzik¹, Joanna Bukowska¹, Anna Kur-Piotrowska¹, Sylwia Machcinska¹, Jeffrey M. Gimble^{2,3,4}, Barbara Gawronska-Kozak¹

¹Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, Olsztyn, Poland

²LaCell LLC, New Orleans, LA 70112, USA

³Obatala Sciences Inc., New Orleans, LA 70148, USA

⁴Departments of Medicine, Structural and Cellular Biology, and Surgery and Center for Stem Cell Research and Regenerative Medicine, Tulane University School of Medicine, New Orleans, LA 70112, USA

Correspondence to: Barbara Gawronska-Kozak; email: b.kozak@pan.olsztyn.pl

Keywords: age, sex, diet, skin, wound

Received: October 22, 2019

Accepted: February 25, 2020

Published: April 15, 2020

Copyright: Kopcewicz et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Since there are limited studies analyzing the impact of age, sex and obesity on cutaneous repair, the current study evaluated excisional skin wound healing as a function of age, sex and diet in C57BL/6 mice subjected to either low (LFD) or high (HFD) fat diet. Older mice accumulated increased body fat relative to younger mice under HFD. Skin wound healing at particular stages was affected by age in the aspect of Tgf β -1, MCP-1, Mmp-9 and Mmp-13 expression. The most profound, cumulative effect was observed for the combination of two parameters: age and sex. While skin of younger males displayed extremely high collagen 1 and collagen 3 expression, younger females showed exceptionally high Mmp-13 expression at day 3 and 7 after injury. Diet as a single variable modified the thickness of dermis due to increased dermal White Adipose Tissue (dWAT) accumulation in mice fed HFD. The combination of age and diet affected the re-epithelialization and inflammatory response of injured skin. Overall, our data indicate that age has the most fundamental impact although all components (age, sex and diet) contribute to skin repair.

INTRODUCTION

In adult mammals, skin wound healing is a complex repair process which leads to rapid and effective wound closure. Cutaneous wound healing encompasses a sequence of overlapping phases, including inflammation, new tissue formation and tissue remodelling [1, 2]. The disruption of blood vessels during the skin injury causes blood and fluid loss. The formation of fibrin clot, which provides a temporary scaffold for migrating cells, re-establishes skin hemostasis [1, 2]. In the inflammatory phase, platelet aggregation is followed by the recruitment of polymorphonuclear leukocytes (neutrophils) and invasion of blood monocytes which subsequently differentiate into macrophages [3]. The components of the inflammatory response remove debris and prevent

infection. During the second stage of wound healing, the new tissue formation, different cell types are involved in order to achieve permanent closure of the wound gap and restore the protective barrier skin function. Keratinocytes proliferate and migrate over the injured dermis in the process of re-epithelialization, new blood vessels are formed and extracellular matrix is synthesized by interacting fibroblasts and myofibroblasts. Remodelling is the final stage of the skin wound healing process which may last for a year or longer. This phase serves to restore the regular architecture of the dermis following injury and reorganizes the immature extracellular matrix by re-balancing the dynamic between collagen synthesis, arrangement and degradation [4]. This remodelling phase involves apoptosis of a variety of cell types within the wound site. The scar tissue that is formed in post injured

area never achieves the strength and functionality of uninjured skin [2].

Multiple factors influencing cutaneous injury repair can lead to improper or impaired wound healing. Factors that influence skin wound healing can be categorized as local, such as oxygenation and infection, or systemic [5], such as obesity, age and sex. Obesity is defined as excessive fat accumulation, which constitutes a risk for human health (World Health Organization (WHO); <https://www.who.int/topics/obesity/en/>). In 2016 nearly half a billion adults worldwide were obese (Global Health Observatory (GHO); https://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight_text/en/). Over the past 20 years, adult and childhood obesity rates have doubled, creating a risk of heart disease, hypertension, cancer, stroke and diabetes. Obesity alters the barrier function of the skin, causing increased transepidermal water loss [6]. Moreover, obesity predispose individuals to the occurrence of impaired wound healing promoting pressure and venous ulcers [5]. Several studies indicate that the increment of adipose tissue may contribute to impaired dermal functions and defects in skin wound healing [7, 8]. Furthermore, adipocytes that are the source of multiple bioactive substances, known as adipose-derived secreted factors (adipokines), may exert pro-inflammatory or anti-inflammatory effects. Imbalanced/disrupted expression of these adipokines secondary to adipose tissue dysfunction, can be linked to a chronic low-grade inflammatory state and injury repair complications [9].

Old age is one of the main systemic factors affecting skin wound healing process. The WHO estimated that between year 2015 and 2050 the number of people aged 60 years and older will rise from 900 million to 2 billion (WHO; <https://www.who.int/features/factfiles/ageing/en/>). The skin's structure changes with advancing age due to the sum of extrinsic and intrinsic influences. Extrinsic modulators reflect the cumulative effect of environmental insults, such as UV radiation, whereas intrinsic aging relates to skin changes that are independent of environmental factors, such as genetic influences. Advancing age is accompanied by decreases in dermal cellular content, blood flow and lymphatic drainage [10], collagen content, and elasticity [11]. All these age-related changes lead to alterations in skin wound healing. Multiple clinical studies have shown that skin wound healing in healthy elderly individuals is delayed, although it is not impaired in terms of the quality of healing [10, 12]. The most commonly described modifications of cutaneous injury repair in the elderly are delayed infiltration of T-cells into the wound with reduced macrophages phagocytic capacity; [13, 14], delayed re-epithelialization and angiogenesis [14], altered expression of growth factors and their receptors, such as

platelet derived growth factor (PDGF) and epidermal growth factor (EGF) [15] as well as an imbalance in the Mmp/Timp-1 (matrix metalloproteinases/ tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1) ratio with increased levels of Mmps [16] and decreased Timp-1 expression [17]. An additional age-related modification noted in murine incisional skin wound healing has been a change in the immunolocalization of transforming growth factor beta (Tgfb) isoforms [11].

Accumulating evidence indicates that sexual dimorphism exists in the skin structure and skin wound healing process. In human, men's skin is thicker than women's at all ages [18]. Skin thickness decreases linearly with advancing age, starting at the age of 50 in women and at the age of 20 in men [19]. Likewise, murine studies have shown that male mice have thicker dermis but thinner epidermis and hypodermis than females [20, 21].

While the ability of individual biological factor, such as age or obesity, to disrupt subsequent phases of wound repair have been described, comprehensive analyzes examining the combined effects of age, sex and obesity on cutaneous wound healing are limited. Hence, the present study was designed to explore the effect of age, sex and LFD vs HFD on skin wound healing in C57BL/6J (B6) mice.

RESULTS

Young (2-3 months) and old (18-19 months) B6 mice of both sexes were assigned into groups fed for a period of 8 weeks with either chow diet (low fat diet- LFD 13 kcal% fat) or high fat diet (HFD 59 kcal% fat; Figure 1A). After 8 weeks of HFD or LFD, 4-5 months (young) and 20-21 months (old) cohorts underwent 4x4mm diameter skin punches. Skin tissues samples were collected subsequently at day 0 and 3, 7, 14 and 21 after wounding (Figure 1B).

Body composition

Over the course of the 8 week feeding experiment, an increase in body weight was stimulated by HFD in both males and females (Figure 2A, 2B; Supplementary Table 1). The most evident differences in body weight gain was detected between females (Figure 2A) and males (Figure 2B; Supplementary Table 2). The stable, linear increase in body weight was substantially greater for males relative to females, regardless of age.

The difference in body weight gain between HFD and LFD reached statistical significance within 2 weeks of diet ($p < 0.05$) for young males and 1 week for old ($p < 0.05$), whereas for females this was achieved after 4 weeks of diet for young ($p < 0.05$) and 3 weeks for old

($p < 0.05$). The different response between female and male mice to HFD indicates a clear role of sex to dietary regiment (Supplementary Tables 1–3).

Weekly body composition analyzes performed by nuclear magnetic resonance (NMR) confirmed sex differences in body weight gain (Figure 2C–2F; Supplementary Table 4–9). The increase in body weight in males and females fed HFD was achieved primarily

through fat mass accumulation (Figure 2C, 2D). The statistically significant differences in body fat mass gain between old HFD vs LFD male mice were apparent after 1 week of diet ($p < 0.001$) and continued to increase until the end of dietary program ($p < 0.001$), whereas for old females it was delayed until the 3rd week ($p < 0.05$, Figure 2C, 2D; Supplementary Table 4–6). No differences in body fat content was observed in mice fed LFD.

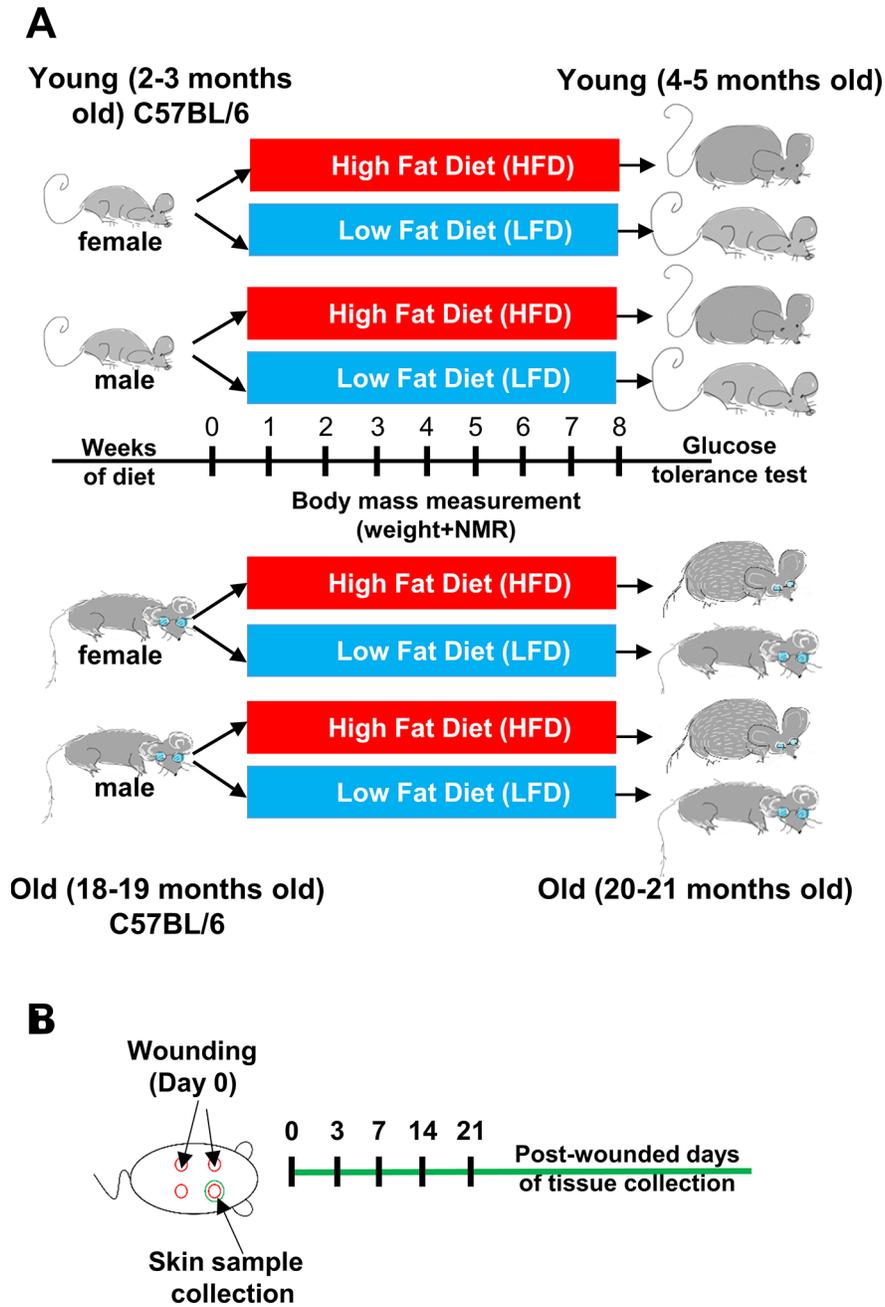


Figure 1. Scheme of the experimental design. (A) Young (2-3 months old) female ($n=48$) and male ($n=48$), and old (18-19 months old) female ($n=48$) and male ($n=48$) C57BL/6 (B6) mice were fed for 8 weeks on either LFD or HFD. (B) Mice were injured at day 0. Skin tissues were collected at day 0 (uninjured control) and post-wounded days: 3, 7, 14 and 21, $n=4-6$ mice per time point/per group.

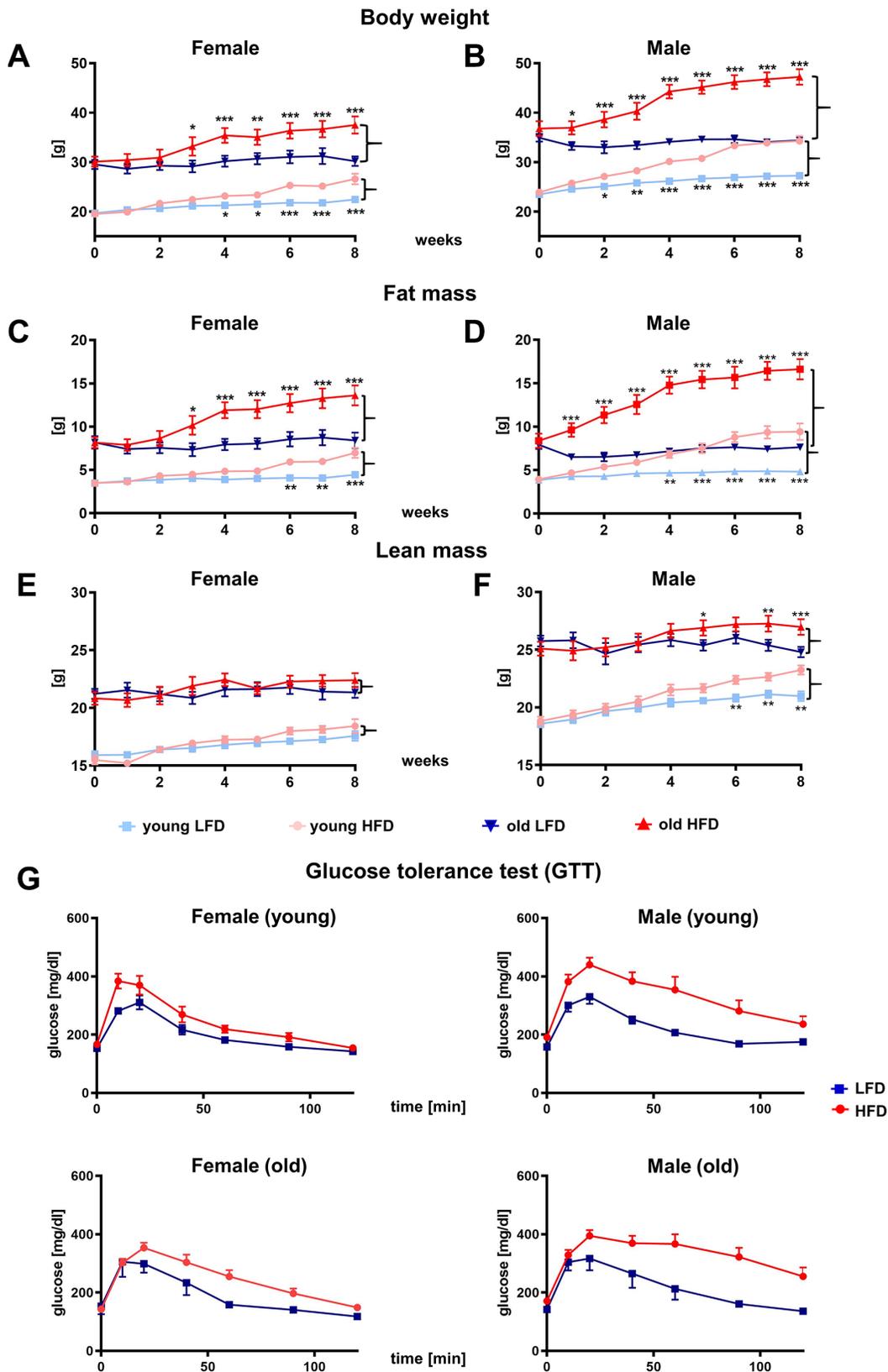


Figure 2. Effect of HFD vs. LFD on body weight (A, B), fat mass (C, D), lean mass (E, F) and glucose tolerance test (G) of B6 female (A, C, E, G) and male (B, D, F, G) mice. Body weight and body composition analyzed by nuclear magnetic resonance (NMR), were measured weekly during 8-week feeding study (n=192 total mice including: n=96 per LFD and n=96 per HFD). Data are the mean \pm SE, asterisks indicate significant differences between animals fed HFD vs LFD * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001.

The lean mass content did not change substantially during the 8 weeks of feeding study in the young or old females (Figure 2E). Interestingly, for males fed HFD, the lean mass content increased (Figure 2F) indicating that both fat and lean mass contributed to overall body weight gains (Figure 2B; Supplementary Table 7–9). The glucose tolerance test (GTT) performed at the end of the 8th week showed impaired glucose tolerance for HFD mice which was most severe for males (Figure 2G).

Histological analysis of the skin at the end of 8th week of the HFD or LFD program.

Mammalian skin is comprised of three structural layers: epidermis, dermis and subcutaneous white adipose tissue (sWAT), which in rodents is separated from dermis by a thin layer of skeletal muscle known as the *panniculus carnosus* (Figure 3A) [22]. Recent studies have further defined the heterogeneity of the dermis [22–24], pointing out its structural division into papillary and reticular dermis, and dermal white adipose tissue (dWAT) [22, 23] (Figure 3A) identified

as the layer of adipocytes within the reticular dermis of the skin [25].

To analyze the impact of age and diet on the skin of young and old mice after LFD or HFD, we performed histological measurements of the thickness of the epidermis, the dermis, and the dWAT (Figure 3A). The thickness of epidermis demonstrated no significant differences (Figure 3B–3D) among analyzed groups. The measurement of the total dermis thickness (comprising the fibroblast-rich dermis + dWAT) showed increases in mice fed HFD regardless of age (Figure 3B, 3D, Supplementary Table 10). While measurements of the fibroblast-rich dermis alone decreased in old animals, regardless of diet (Figure 3B, 3D; Supplementary Table 13), the increase in dWAT thickness, as a result of HFD in old mice, compensated for the loss of fibroblast rich dermis (Figure 3B, 3D; Supplementary Tables 11, 12). As a consequence, dermal layer was significantly thicker in HFD relative to LFD old mice and comparable to that observed in young, HFD animals (Figure 3B, 3D).

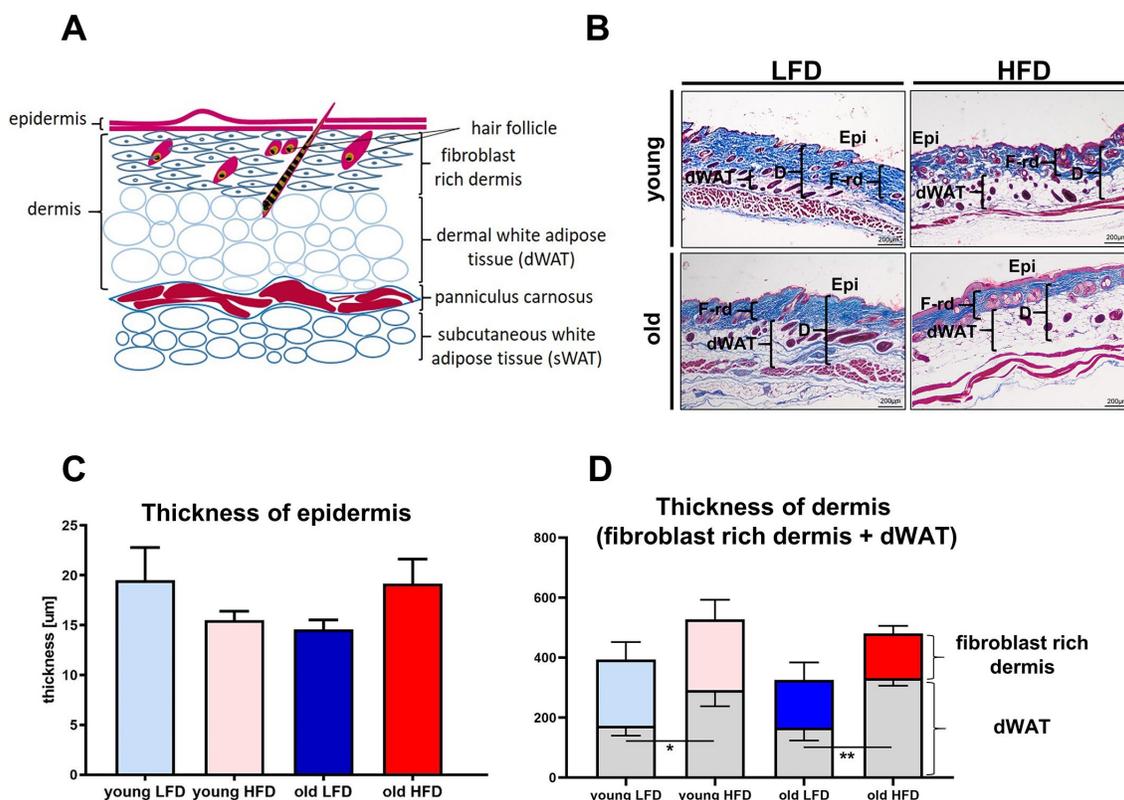


Figure 3. Histological analysis of skin structure and thickness. Scheme of skin structure (A), histological skin sections stained with Masson trichrome and collected from young or old mice fed for a period of 8 weeks LFD or HFD (B), quantification of the skin layers thickness: epidermis (C) and dermis (D). The measurement of skin thickness were performed on histological slides collected from n=24 mice (n=6 per group). Epi - epidermis, dWAT - dermal white adipose tissue, F-rd fibroblast rich dermis; scale bar 200 µm, The bars indicate \pm SE * p <0.05, ** p <0.01.

Age, sex and obesogenic environment differentially modulate skin wound healing parameters

Skin wound healing occurs in overlapping but distinct stages characterized by inflammation, new tissue formation and remodelling [2]. The inflammatory phase is marked by recruitment to the wound of monocytes which subsequently differentiate into macrophages and together with resident cells (keratinocytes at the wound edge, fibroblasts and endothelial cells) produce MCP-1 (monocytes chemoattractant protein 1), a strongly chemotactic cytokine [26] which further mediates the recruitment of monocytes, mast cells and lymphocytes to the site of injury [27]. To assess the inflammatory phase of skin wound healing in different mice cohorts we measured levels of MCP-1 (Figure 4A), the expression of *CD68* mRNA (Figure 4B) and the immunohistochemical localization of macrophage markers: Mac-2 (galectin-3) (Figure 4C) and CD68 (Figure 4D) in skin tissues. The peak of MCP-1 levels was detected at day 3 after wounding (Figure 4A; Supplementary Table 14). Skin injury in old mice evoked the highest levels of MCP-1 that was not affected by diet (LFD vs HFD) (Figure 4A; Supplementary Table 15). *CD68* mRNA analysis revealed the highest levels of expression at post-wounded day 3 which gradually decreased as the skin wound healing process progressed to day 21, falling to levels comparable to those expressed by uninjured skin (Figure 4B, Supplementary Tables 16–19). Interestingly, in contrast to MCP-1, the highest levels of *CD68* mRNA expression were detected for young mice, regardless sex (Figure 4B, Supplementary Table 19). The effect of age and diet on *CD68* mRNA expression was apparent throughout the skin wound healing process (days 3–21) (Supplementary Table 19). Immunohistological localization of Mac-2 positive cells was identified in the epidermal layer, consistent with reports associating Mac-2 epidermal expression with differentiation and maturation of suprabasal keratinocytes [28] in the wound area, in granulation tissues and in the wound margin (Figure 4C). The accumulation of Mac-2 positive cells was observed in skin sections collected at day 3 (Figure 4C) and, to a lesser extent, day 7 (data not shown) after injury. The most robust infiltration of Mac-2 was observed in old HFD mice (Figure 4C). CD68 immunoreactivity was exclusively detected in the dermal part of the skin after wounding (Figure 4D). Positivity for CD68 was observed among cells spread throughout the post wounded dermis, blood vessels and some adipose tissue (Figure 4D). The strongest CD68 reaction product deposition at post wounded day 7 was observed in dWAT tissues localized at wound margin of old HFD mice (Figure 4D).

New tissue formation involves re-epithelialization, angiogenesis, collagen synthesis and ECM production [5]. The aim of the re-epithelialization process is to

cover the wound with the new epithelium. Re-epithelialization involves keratinocyte migration, proliferation and differentiation that is essential for successful cutaneous healing [29, 30]. The analysis of post wounding skin sections stained with: hematoxylin and eosin (H&E) or immunostained for the presence of keratin 16 (Figure 4E), a marker of keratinocytes induction, showed the rate of re-epithelialization measured by percentage of area covered by newly formed epithelium in the wound. The fastest rate of wound re-epithelialization was detected for young, LFD mice: 63.4 % (± 11.5) at day 3 and 100% (± 19.9) at day 7 (Figure 4F). In the remaining groups of mice, the re-epithelialization rate was significantly slower. At day 3rd after injury, young, HFD mice displayed 24.8% (± 10.9), old LFD mice 25.9% (± 14.0) and old HFD mice 35% (± 12.2) of wound coverage. The combined effect of age and diet on re-epithelialization process was detected at day 3rd after wounding (Supplementary Table 20–22). At the day 7, the percentage of re-epithelialization were 86.2% (± 14) for young HFD, 70.5% (± 17.2) old LFD and 78.4% (± 12.2) old HFD mice. By day 14 wounds of all studied cohorts were fully re-epithelialized (Figure 4E, 4F).

The skin wound healing process is tightly coordinated by Mmps enzymes [31]. Mmps function as regulators of each phase of skin wound healing contributing to the inflammatory and remodelling stages through their participation in the degradation of structural extracellular matrix (ECM) components, activation of other Mmps, release of growth factors from the cell membrane or ECM, and the shedding of cell adhesion molecules [32]. The analysis of *Mmp-9* (Figure 5A; Supplementary Tables 23–26) and *Timp-1* (Figure 5C; Supplementary Tables 27–30) revealed a surge in mRNA expression in post-injured skin tissues at day 3 for both males and females followed by their gradual decrease to reach the initial baseline (day 0) levels at day 14. The highest levels of *Mmp-9* mRNA expression at post wounded day 3 was observed for old HFD mice, indicating the impact of two parameters: age and diet (Figure 5A; Supplementary Tables 23–26). The surge in *Mmp-9* expression at day 3 accompanied a burst of *Timp-1* mRNA where *Timp-1* expression was higher for old HFD females relative to males (Figure 5C; Supplementary Tables 27–30). The combined effect of: diet, age and sex was detected at day 3rd after wounding for *Timp-1* mRNA surge (Figure 5C; Supplementary Tables 27–30). The analysis of *Mmp-9* protein expression at day 3 by Western blot confirmed that age and HFD diet stimulated its expression (Figure 5B).

Likewise, *Mmp-13* is a metalloproteinase which regulates skin wound healing through participation in the growth of granulation tissue, organization of

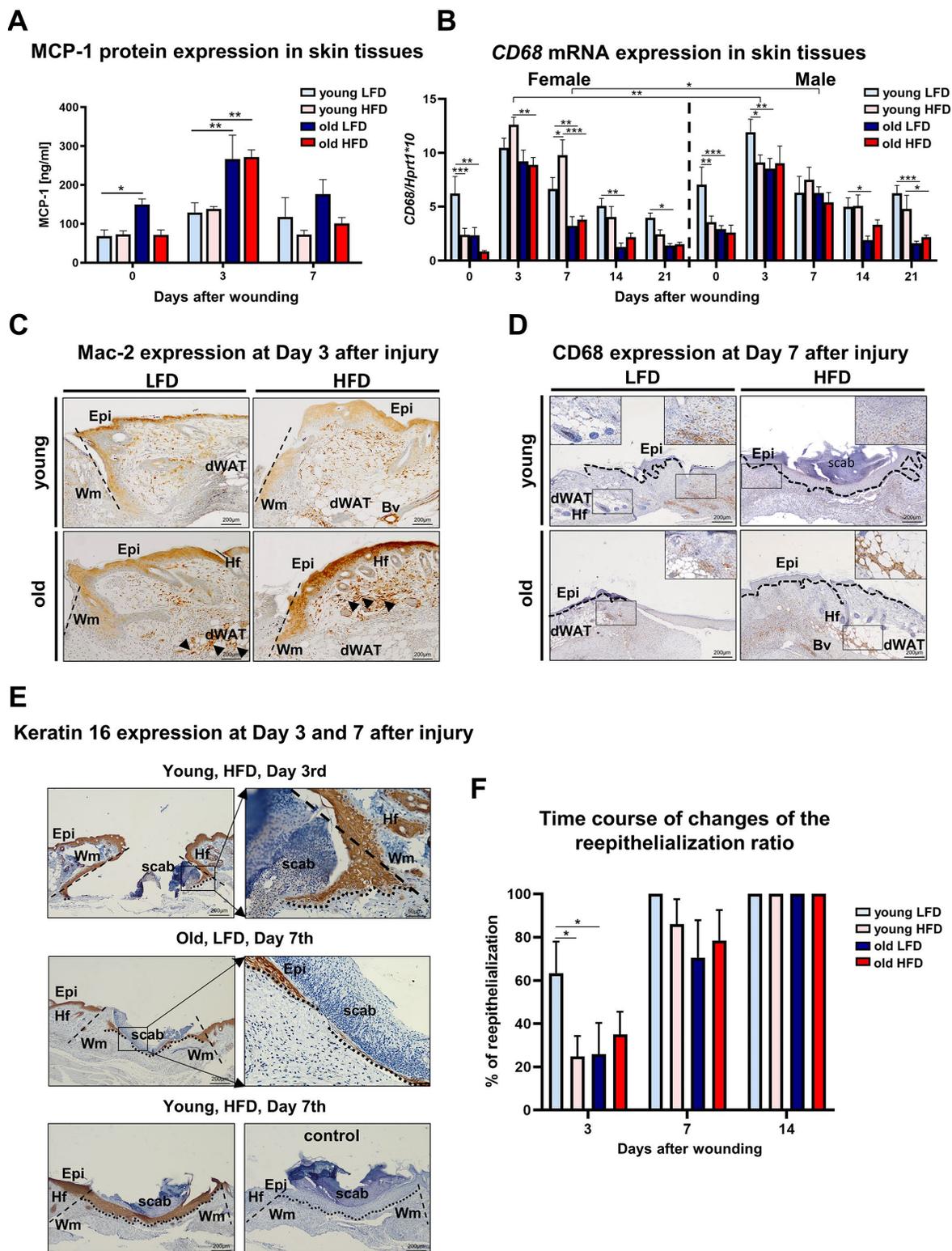


Figure 4. Inflammatory response and histological analysis of re-epithelialization during skin wound healing. (A) MCP-1 protein levels (n=6 skin samples per group); (B) CD68 mRNA expression (n=4-8 skin samples per group); (C) Mac-2 and (D) CD68 immunohistological localization on skin tissues at post-wounded day 3 (C) and day 7 (D). Immunohistochemical detection of keratin 16 (E) and morphometrical analysis (F) of the re-epithelialization process in the skin of old, young, LFD or HFD mice (n = 3-5 mice per group). Epi - epidermis, dWAT - dermal white adipose tissue, Wm - wound margin, Hf - hair follicles; control (E) of immunohistochemical reaction where the primary antibody were omitted. Histological sections were counterstain with hematoxylin. Scale bar (C-E) 200 μ m, insets (C-E) 50 μ m. The bars indicate \pm SE * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001.

myofibroblasts, and the formation of large blood vessels [33]. Similar to *Mmp-9*, peak *Mmp-13* mRNA expression for both females and males was observed in samples collected at day 3 and day 7 after injury (Figure 5D). In contrast to *Mmp-9* (compare Figure 5A), the levels of *Mmp-13* expression at post-injured day 3 and 7 was the highest in young HFD females (Figure 5D; Supplementary Tables 31–34). The two variables: age and sex at day 3 and three variables: age, sex and diet at day 7 act in combination to increase the expression of *Mmp-13* mRNA (Figure 5D; Supplementary Tables 31–34). At post-wounded days 14 and day 21 the expression of *Mmp-13* decreased and approached the baseline levels observed in non-injured skin samples (Figure 5D).

Other factors that affect the skin wound healing process are transforming growth factors beta 1 and 3 (*Tgfb-1* and *Tgfb-3*). *Tgfb-1*, so called pro-scarring, is one of the first cytokines to elicit inflammatory cell recruitment. The skin wound healing process evokes *Tgfb-1* mRNA (Figure 6A) and protein (Figure 6B) expression at post-wounded days 3 and 7. The highest expression of *Tgfb-1* was detected in post-wounded skin from old female mice regardless of diet (Figure 6A). The upregulated *Tgfb-1* gene expression at day 3 ($p < 0.001$), 7 ($p < 0.01$) and 14 ($p < 0.05$) is substantially greater in old HFD females than relative to old HFD males (Figure 6A; Supplementary Tables 35–38). The expression levels of *Tgfb-3*, a cytokine which plays an important role in wound repair and is presumed to be a potential mediator of scar reduction and skin healing improvement [34], showed the increase for both females and males at post-wounding day 7 (Figure 6C, 6D; Supplementary Tables 39–42). For old HFD females *Tgfb-3* mRNA expression remained elevated at day 14 after injury (Figure 6C) indicating the interaction among: sex (female) and diet (HFD) and post-wounding day (day 14) (Supplementary Table 42).

The restoration of post-injured skin tissues requires collagen biosynthesis and turnover that affect the post-wounded skin quality and outcome. To evaluate collagen content during skin wound healing, we analyzed *collagen 1* and 3 mRNA expression, total collagen content through hydroxyproline assays, and analysis of post-wounded area on Masson's trichrome stained histological sections (Figure 7). The highest levels of *collagen 1* and 3 mRNA in uninjured and post-injured skin tissue samples were detected in young male mice (Figure 7A, 7B, Supplementary Tables 43–50) whereas the expression in aged males was significantly lower and comparable to young and old females (Figure 7A, 7B; Supplementary Tables 43–50). Evidently, age (young) and sex (males) but not diet have the combined effect on the *collagen1* and 3 gene expression in the skin (Figure 7A–7B; Supplementary Table 46–50). Further

analysis of collagen was performed through hydroxyproline content measurement (Figure 7C) and the histological analysis of Masson's Trichrome stained skin sections (Figure 7D, 7E) at post-wounded day 14 and 21. The combined effect of age and diet for hydroxyproline content was detected at day 21 after wounding (Supplementary Table 51). The highest percentage of fibrosis area analyzed in histological sections was quantified for young and low fat diet mice at both day 14 and 21 (Figure 7D, 7E; Supplementary Tables 52, 53).

DISCUSSION

In this study, we have compared the skin wound healing process as a function of age (younger vs older), sex (females vs males) and diet (LFD vs HFD) in C57BL/6 mice in order to determine the cumulative effect of age, sex and diet on cutaneous wound healing.

Overall, our data indicate that although all three components: age, sex and diet affect the quality of the skin before and after wounding, it is age that has the most fundamental impact (Table 1; Supplementary Tables 1–53). First of all, older mice displayed a greater body fat mass accumulation when placed in an obesogenic environment accompanied by an increased reduction in the thickness of the fibroblast-rich dermis in the intact skin. Skin wound healing at particular stages was affected by age in the aspect of *Tgfb-1* (days 3, 7 and 21); MCP-1 (day 3), *Mmp-9* (day 3) and *Mmp-13* (days 3, 7) expression and hydroxyproline content (day 21) (Table 1).

The most pronounced cumulative effect was observed for the combination of two parameters: age and sex. The effect predominantly was detected for *collagen 1* and *collagen 3* expression which was extremely high in younger males before injury and throughout the entire process of skin wound healing (Tables 1). Likewise, the combined effect of age and sex impacted *Mmp-13* expression at day 3 and day 7 after injury was significantly higher for younger females. Diet as a single variable modified the thickness of dermis as a result of increased dWAT accumulation in animals fed HFD. In injured skin, diet had an impact on the expression of *Timp-1* (day 3), and *Tgfb-1* (day 14). The combination of age and diet affected the re-epithelialization process and inflammatory response based on *CD68* mRNA expression during the skin wound healing process. Interestingly, the only cumulative effect combining three parameters (age, diet and sex) on the cutaneous wound healing process was displayed exclusively by *Timp-1* mRNA for which high levels were observed for older HFD females at day 3 after wounding (Table 1).

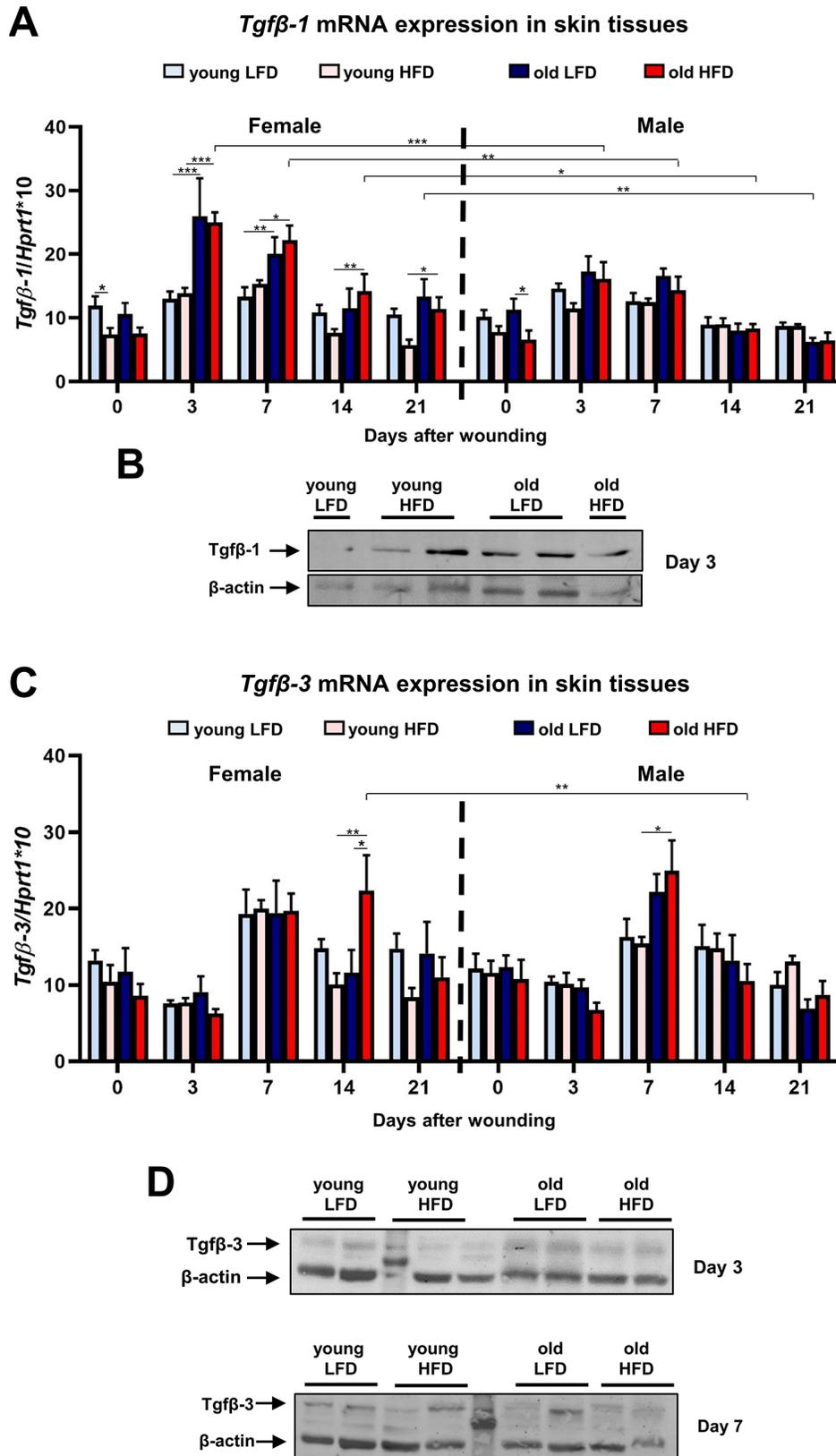


Figure 6. *Tgfb-1* and *Tgfb-3* expression during skin wound healing. qRT-PCR mRNA expression of *Tgfb-1* (A) and *Tgfb-3* (C) in uninjured and post-injured skin tissues collected from female, male, young, old, fed LFD or HFD mice (n=4-8 skin samples per group). Representative Western blot analysis of *Tgfb-1* (B) and *Tgfb-3* (D) protein expression at post-wounded day 3 (B, D) and day 7 (D). The bars indicate \pm SE * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

The fastest rate of wound re-epithelialization was detected in young LFD mice ($63.4\% \pm 11.5$) at day 3rd that was substantially reduced by age ($25.9\% \pm 14.0$) in old LFD mice. Komi-Kuramochi et al. [35], comparing the 6 mm wound closure between young (8-weeks) vs old (35-weeks) mice, found the rate of 50% at post-wounded day 3rd for young mice. Similarly, a comparably fast rate of 3 mm skin wound re-epithelialization by day 3rd for young mice was also detected for C57BL/6 ($79 \pm 14\%$)

[26] and BALB/c (60%) [36] mice regardless genetic background.

The growth factor TGF β comprises three isoforms: TGF β -1, TGF β -2, TGF β -3 which modulate skin and cutaneous wound healing. Two isoforms, TGF β -1 and TGF β -2, attract neutrophils, macrophages and fibroblasts into the wound [37], contribute to the resolution of inflammation [38] and orchestrate re-epithelialization,

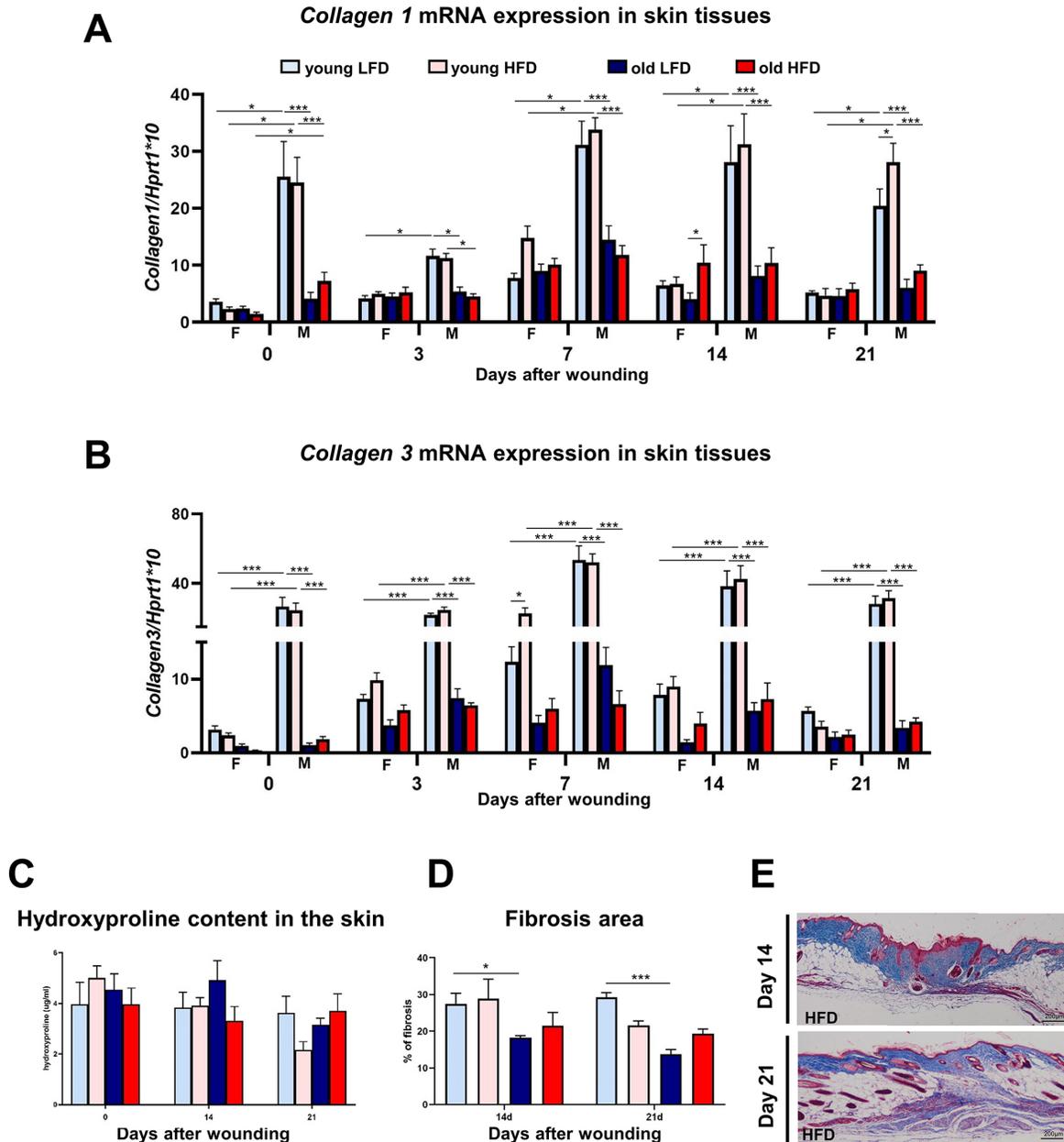


Figure 7. Collagen expression, hydroxyproline content and fibrosis localization in uninjured and post-injured skin. *Collagen 1* (A) and *collagen 3* (B) mRNA expression (n=4-8 skin samples per group) in skin tissues of old, young, male (M), female (F), LFD or HFD mice. Hydroxyproline (C) content (n=4-8 skin samples per group) in skin tissues of old, young, LFD or HFD mice. Histological skin sections stained with Masson trichrome collected from young or old mice fed LFD or HFD at post-injured day 14 and 21 (D), followed by quantification of the fibrosis area (E) (n=3 mice per group). Scale bar (E) 200 μ m. The bars indicate \pm SE *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Table 1. The summary of the impact/interactions of age, diet, sex on skin wound healing in young or old, fed the LFD or HFD, females or males B6 mice based on coefficients of model for factors affecting the particular days of the process. Impact/interactions is arranged from the most to the least (1, 2, 3) influential for each factor.

Day of wound healing	Factor/process	Impact/Interactions
Day 3	MCP-1	Age
	<i>Mmp-9</i> mRNA expression	1. Age 2. Diet
	<i>Timp-1</i> mRNA expression	1. Diet 2. Sex:diet 3. Age:sex:diet
	<i>Tgfβ-1</i> mRNA expression	1. Age 2. Sex
	<i>Mmp-13</i> mRNA expression	1. Age 2. Age:sex
Day 7	<i>Tgfβ-1</i> mRNA expression	1. Age 2. Sex 3. Diet
	<i>Mmp-13</i> mRNA expression	1. Age 2. Sex:diet 3. Age:diet 4. Age:sex
Day 14	<i>Tgfβ-1</i> mRNA expression	Diet
	<i>Tgfβ-3</i> mRNA expression	1. Age:sex 2. Sex
Day 21	<i>Tgfβ-1</i> mRNA expression	1. Age 2. Age:sex
	Hydroxyproline content	1. Age 2. Age:diet
Days 3, 7, 14 and 21	<i>CD68</i> mRNA expression	Age:diet
	<i>Collagen 1</i> mRNA expression	Age:sex
	<i>Collagen 3</i> mRNA expression	Age:sex
Days 3 and 7	Re-epithelialization	Age:diet

angiogenesis and granulation tissue formation [39–41]. TGFβ-1 and TGFβ-2 promote fibroblasts differentiation into their active state as myofibroblasts, which regulate connective tissue remodelling by combining production of ECM components with characteristics of contractile smooth muscle cells [42–44]. During the last phase of cutaneous wound repair, remodelling, TGFβ-1 and 2,

together with Mmps and Timps regulate collagen production and degradation, leading to formation of mature scar [1]. While TGFβ-1 and TGFβ-2 promote scar formation, TGFβ-3 acts as anti-fibrotic agent. This cytokine appears early after injury, particularly in the migrating epidermis [45] and is present in the neo-epidermis when re-epithelialization is completed.

Experiments performed by Le et al [46] have shown that although TGF β -3 does not promote re-epithelialization, it is necessary for wound closure. Data obtained by Shah et. al [47] indicates that exogenous addition of neutralizing antibody to TGF β -1 and TGF β -2 reduces scarring. Similar results were obtained after exogenous addition of the TGF β -3 peptide to the wound what caused diminished scarring and improved the architecture of the scar. In our studies, we analyzed the expression profile of Tgf β -1 and Tgf β -3 during cutaneous wound healing. The peak of Tgf β -1 was observed at day 3 and 7 after injury with higher expression in post-wounded skin tissues collected from old mice. Increased levels of Tgf β -1 in aged mice 3 and 7 days after wounding corresponded to an enhanced inflammatory response characterized by a higher level of MCP-1 and increased macrophage infiltration. The expression pattern of Tgf β -3, a potential mediator of scar reduction and skin healing improvement [34], varied significantly depending on age and sex, that was particularly detected at post-wounding day 14. According to our knowledge, this is the first report describing the differential expression profile of Tgf β -3 during skin wound healing process between young and aged mice. Further studies exploring the impact of biological aging on this skin wound biomarker are warranted.

Since Tgf β isoforms are involved in the ECM synthesis by upregulating multiple extracellular matrix genes including collagens, [48], altered levels of circulating Tgf β in old animals can modify the collagen content in the post-injured skin of aged individuals. This is consistent with our results which showed much higher levels of *collagen 1* and *3* mRNA in the skin of young male mice when compared to old mice of matched sex. The analysis of transcriptome data published by Salzer et al. performed on fibroblasts isolated from aged mice further confirms the decreased expression of ECM genes including collagens and glycosaminoglycans [49]. Our studies of collagen content showed differences in total skin concentration between male and female mice, independent of age-related changes. The data collected from multiple experiments suggest that sex steroids may account for the difference in the skin collagen content between males and females. While a series of studies have identified estrogens as enhancers of healing, androgens (testosterone and its metabolite 5 α -dihydrotestosterone (DHT) are postulated to serve as negative regulators of the repair process [50, 51].

The main aim of our study was to define the combined impact of age, sex and diet on skin characteristics. We observed that young females fed HFD showed the levels of *Mmp-13* mRNA expression at post-wounded day 7 that were more than four times higher than in any other groups of animals. While the collagenase *Mmp-13* is almost undetectable in intact mouse skin, its expression is

induced by injury [52]. Two cell types express *Mmp-13* during the early phase of cutaneous healing: keratinocytes at the leading epithelial tongue of neopidermis [53] and dermal fibroblasts, regulating angiogenesis, proteolysis and myofibroblasts motility during granulation tissue formation [33]. Several studies indicate that adipocytes may serve as another source of *Mmp-13*. Unpublished data by Shih et al. has suggested that epididymal white adipose tissue of mice fed HFD express *Mmp-13* [54]. Data by Ezure and Amano demonstrated that co-culture of enlarged adipocytes with 3T3-L1 fibroblasts significantly increased the mRNA levels of *Mmp-13* [7]. Results published by Schmidt and Horsley indicated that during the proliferative phase of healing, at day 5 after injury, small adipocytes repopulate skin wounds [55]. In our study, high mRNA levels of *Mmp-13* detected in young females fed HFD may originate not only from keratinocytes and fibroblasts but also from repopulating intradermal adipocytes. dWAT, the separate layer presented within reticular dermis, was defined initially by Wojciechowicz et al. [23]. Since then multiple reports have linked the dWAT to the inflammatory response [25], thermogenesis [56, 57], hair cycling [58–61], aging [62, 63], wound healing, fibrosis and scarring [55, 64].

The contribution of dWAT in the skin wound healing process in old HFD mice warrants additional attention. However, accumulating evidence suggests that the presence of dermal adipocytes during cutaneous injury repair may be beneficial for the healing outcome. In current studies, we showed that mice fed HFD displayed thicker dermis than animals fed LFD, regardless of age. The increase in dWAT thickness, as a result of HFD, may have compensated for the age-related loss in fibroblasts-rich dermis. Moreover, in old HFD mice we observed the tendency towards a faster rate of re-epithelialization comparing to old LFD animals. Experiments performed by Schmidt and Horsley [55] confirmed the role of dermal adipocytes in injury repair by showing that the lack of adipocytes in the wound leads to invalid dermal remodelling, skin failure, and reopening of the wound. A recently described feature of skin adipocytes, which may prove crucial for cutaneous healing, is their plasticity, after the exposure to pro-fibrotic agents such as TGF β , characterized by their ability to transition into myofibroblasts (adipocyte-myofibroblasts transition - AMT) [64], and reprogramming of myofibroblasts into adipocytes by activation the BMP2 pathway [60].

In conclusion, our data in a murine model have shown that while diet and sex have considerable impact on skin wound healing, advancing age exerts the most profound effect. These findings suggest that further mechanistic

studies exploring the dynamics between these biological variables in pre-clinical animal models and in human subjects are warranted.

MATERIALS AND METHODS

Animals

The experimental animal procedures performed in these studies were approved by the Ethics Committee of University of Warmia and Mazury (Olsztyn, Poland), No. 22/2015.

The C57BL/6J (B6) mice for the study were generated through colonies established at the animal facility in Institute of Animal Reproduction and Food Research of Polish Academy of Sciences. B6 mice were originally purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME USA). At the beginning of the experiment, adult (2-3 months), and old (16-18 months), male and female (young; n=24 per group and old; n=16-24 per group) B6 mice were assigned into separated groups fed for a period of 8 weeks either a low fat diet (LFD, 13 kcal% fat; PicoLab Rodent Diet 20 5053) or high fat diet (HFD 59 kcal% fat; TestDiet AIN-76A; LabDiet) (scheme of the experiment Fig. 1). At the end of every week of a diet (LFD or HFD), body mass was measured and body composition was analyzed. Measurements of lean and fat mass were acquired by nuclear magnetic resonance (NMR) using the Minispec LF90II (Bruker Optics). After 8 weeks of diet, glucose tolerance test (GTT) was performed, as described by Anunciado-Koza et al. [65]. Briefly, after fasting for 4 h from 8:00 to 12:00, mice received an intraperitoneal injection of 20% glucose solution (2 g/kg of body weight; Sigma-Aldrich by Merck). Blood glucose levels were determined using a blood glucose monitor (Accu-chek, Roche).

Wounding and collecting skin tissue samples

The day before wounding 5 months old (young) and 21 months old (old) female and male B6 mice, fed LFD or HFD were anesthetized with isoflurane and shaved in the dorsal area. On the following day (day 0), mice were anesthetized with isoflurane and four full-thickness excisional wounds were created on the back of mice using a 4 mm biopsy punch (Miltex). Excised skin samples (4 mm in diameter) were collected, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis (day 0, uninjured control). B6 mice were sacrificed at days 3, 7, 14 and 21 after wounding. Post-injured skin areas were collected with 8 mm diameter biopsy punches. Tissue samples (n=6-8 per time point) for RNA or protein isolation were immediately frozen in liquid nitrogen and stored in -80°C till further use. Samples for histology were fixed in formalin (n=3-6 per time point).

Masson trichrome staining, histological measurement of the thickness of layers of the skin and analysis of fibrosis

Formalin-fixed sections of uninjured and post-injured skin tissues were deparaffinized by immersion in xylene and then rehydrated. The samples were stained with Trichrome Stain Kit (Modified Masson's) (ScyTek Laboratories, Inc.) For the histological analysis of uninjured skin and measurements of fibrosis in post-injured skin tissues, Image J image analysis software was used (National Institutes of Health (NIH) Image).

Analysis of re-epithelialization

The percentage of re-epithelialization was calculated as previously described by Low et al. [26] and Noguchi et al. [66]. Briefly, the width of wounds and the distance of migrating epithelium were measured on post-injured skin sections (days 3, 7, 14 after injury) stained with hematoxylin and eosin (H&E). The percentage of re-epithelialization was calculated according to the formula: [length of the extending epidermal tongues]/[length of the wound] x100% (number of mice n = 3-5 per group, number of measurements n = 3-10 per group) Measurements were performed using ImageJ software (NIH Image).

Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) detection assay

The ELISA assay for quantitative determination of MCP-1 concentrations in tissue homogenates was performed according to the manufacturer's protocol (Cusabio). Collected skin tissue samples from day 0 (controls), and post-wounded day 3 and day 7 were weighed before further preparation. The samples were homogenized in PBS using 100 mg tissue per 1ml of PBS. The average weight of skin tissue samples varied between 30 and 80 mg therefore an appropriately adjusted volume (between 0.3 to 0.8 ml) of PBS was used for each tissue sample. Tissue homogenates were stored overnight at -20°C. After two freeze and thaw cycles, the homogenates were centrifuged (5 minutes/5000 x g, 2-8°C) and the supernatant was collected, aliquoted and stored at -80°C until performing the assay.

Immunohistochemistry

Formalin-fixed sections of post-injured (day 3 and 7) skin tissues were processed, embedded in paraffin and sectioned. Slides were stained with Masson's trichrome (Trichrome Stain Kit, Abcam) for collagen presence using standard protocol. Immunohistochemical staining for the presence of Mac-2 was performed with anti-LGALS3 (1:2500, mouse monoclonal, LSBio), CD68

(1:200, rabbit polyclonal, Abcam) and Cytokeratin 16 (1:300, rabbit polyclonal, LsBio). Antibody binding was detected with the ABC complex (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, Inc.). In control sections primary antibodies were substituted with non-specific-immunoglobulin G (IgG). Peroxidase activity was revealed using 3,3'-diaminobenzidine (Sigma-Aldrich by Merck) as a substrate. Slides were counterstained with hematoxylin (Sigma-Aldrich by Merck). Sections were visualized using Olympus microscope (BX43), photographed with Olympus digital camera (XC50) and analyzed with Olympus CellSens Software.

RNA isolation and quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from skin samples using TRI Reagent (Sigma-Aldrich by Merck) according to the manufacturer's instructions. Quantity and quality of RNA was verified on NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) and through analysis of agarose gel after electrophoresis. cDNA was synthesized from 500 ng of total RNA using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific). To measure the levels of *Collagen 1*, *Collagen 3*, *Hprt-1*, *Mmp-9*, *Mmp-13*, *Tgfb-1*, *Tgfb-3* and *Timp-1*, mRNA expression, Single Tube TaqMan® Gene Expression Assays (Life Technologies Thermo Fisher Scientific) were used. Amplification was performed using 7900HT Fast Real-Time PCR System under conditions: initial denaturation for 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 sec at 95°C and 1 min at 60°C. Each run included standard curve based on aliquots of pooled skin RNA. All samples were analyzed in duplicates. *Hprt-1* was chosen as the most stable housekeeping gene during cutaneous wound healing after analysis described previously [67]. mRNA expression levels were normalized to the reference gene *Hprt-1* and multiplied by 10.

Protein isolation and western blot analysis

Frozen post-injured skin samples collected at day 0, 3 and 7 were homogenized in liquid nitrogen with mortar and pestle in 500 µl of RIPA buffer containing protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich by Merck), Phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich by Merck) and Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF, Sigma-Aldrich by Merck) further sonicated (3 × 20 s, 20 kHz) with Vibro-Cell VCX 130 PB ultrasound sonicator (Sonics). Protein concentration was measured by the infrared (IR)-based protein quantitation method using a Direct Detect® Infrared Spectrometer (Merck) as previously described [68]. Thirty micrograms of proteins were separated on 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Merck Millipore). The membranes were

incubated separately with antibodies: anti-Mmp-9 (1:1000, rabbit polyclonal, Merck Millipore), anti-Tgfb-1 (1:500, rabbit polyclonal, Biorbyt), anti-Tgfb-3 (1:200, rabbit polyclonal, Abcam) and anti-β-actin (1:1000 mouse monoclonal, Abcam), followed by fluorescent secondary antibodies IRDye 800 (1:5000 goat anti-rabbit, Rockland) and Cy5.5 (1:10000, goat anti-mouse, Rockland). Bands were visualized using the ChemiDoc™ Touch Imaging System (Bio-Rad) and analyzed using Image Lab Software (Bio-Rad) according to the manufacturer's protocol.

Measurement of hydroxyproline

Collagen assay was prepared as described before [69]. Briefly, 8 mm diameter frozen skin punches, were homogenized in 2 ml of phosphate buffered saline (Sigma-Aldrich by Merck) and stored in 4 °C overnight. The next day, 0.5 ml aliquots were hydrolyzed with 0.25 ml of 6N HCL for 4.5 h at 120 °C. To construct a standard curve hydroxyproline concentrations from 0 to 20 µg/ml were used (Sigma-Aldrich by Merck). 20 µl of each sample and standard curve point was added to a 96 well plate and incubated for 20 min at room temperature with 50 µl of chloramine T solution (282 mg chloramine T, 2 ml n-propanol, 2 ml distilled water and 16 ml citrate acetate buffer [5% citric acid, 7.24% sodium acetate, 3.4% sodium hydroxide and 1.2% glacial acetic acid]). Next, 50 µl of Ehrlich's solution (2.5 g 4-(dimethylamino) benzaldehyde, 9.3 ml n-propanol and 3.9 ml 70% perchloric acid) was added and the plate was incubated for 15 min at 65°C. After cooling down the samples the plate was read at 550 nm on a microplate reader (Multiskan Sky Microplate Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific™).

Statistical analysis

In order to analyze impact of gender, age, diet and timepoint on body parameters linear mixed-effects models were used, in which mice were included as random intercept and mentioned factors and all possible interactions were included as fixed effects. Similarly, mixed-effect models were prepared for skin tissues parameters; however the random effects were insignificant, so linear models were used instead. Based on such models, lsmeans were calculated (least-squared means - means calculated based on model's coefficients) and compared (for mixed-effects models Kenward-Roger method for degrees of freedom was used; Tukey p-value adjustment used where appropriate). Results are presented in tables and plots (lsmeans with standard error). Moreover, optimal models were obtained using backward stepwise method. All calculations were performed in R (ver. 3.5.3) using packages: lme4, lmerTest, emmeans and tidyverse.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: BGK, MK; Data Curation: MK, KW, JB, AKP, SM, BGK; Formal Analysis: MK, KW, JB, BGK; Funding Acquisition: BGK; Investigation: MK, KW, JB, AKP, SM, BGK; Project Administration: BGK, MK; Resources: BGK; Supervision: JMG, BGK; Validation: MK, KW, JB, JMG, BGK Visualization: MK; Writing – Original Draft Preparation: MK; Writing - Review and Editing: MK, KW, JB, JMG, BGK.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to dr Anita Jablonowska-Kosek for graphical illustration of young, old, LFD and HFD mice.

CONFLICTS OF INTEREST

JMG is the co-owner, co-founder, and an employee of LaCell LLC, Obatala Sciences Inc., and Talaria Antibodies Inc which are for-profit biotechnology companies involved in regenerative medical research and discovery. He is additionally an inventor on multiple patents relating on adipose derived cells and products. All other authors state that they have no conflicts of interest.

FUNDING

The research in the Gawronska-Kozak laboratory is supported by the National Science Centre, Poland (Grant OPUS 14 No.2017/27/B/NZ5/02610) and Internal project of IAR&FR PAS (GW21/2014; Poland).

REFERENCES

1. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 1999; 341:738–46.
<https://doi.org/10.1056/NEJM199909023411006>
PMID:10471461
2. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature.* 2008; 453:314–21.
<https://doi.org/10.1038/nature07039>
PMID:18480812
3. Lucas T, Waisman A, Ranjan R, Roes J, Krieg T, Müller W, Roers A, Eming SA. Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *J Immunol.* 2010; 184:3964–77.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903356>
PMID:20176743
4. Shaw TJ, Martin P. Wound repair at a glance. *J Cell Sci.* 2009; 122:3209–13.

- <https://doi.org/10.1242/jcs.031187> PMID:19726630
5. Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010; 89:219–29.
<https://doi.org/10.1177/0022034509359125>
PMID:20139336
6. Shipman AR, Millington GW. Obesity and the skin. *Br J Dermatol.* 2011; 165:743–50.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2011.10393.x>
PMID:21564065
7. Ezure T, Amano S. Increased subcutaneous adipose tissue impairs dermal function in diet-induced obese mice. *Exp Dermatol.* 2010; 19:878–82.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2009.00970.x>
PMID:19758317
8. Juge-Aubry CE, Henrichot E, Meier CA. Adipose tissue: a regulator of inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2005; 19:547–66.
<https://doi.org/10.1016/j.beem.2005.07.009>
PMID:16311216
9. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 2011; 11:85–97.
<https://doi.org/10.1038/nri2921> PMID:21252989
10. Gosain A, DiPietro LA. Aging and wound healing. *World J Surg.* 2004; 28:321–26.
<https://doi.org/10.1007/s00268-003-7397-6>
PMID:14961191
11. Ashcroft GS, Horan MA, Ferguson MW. The effects of ageing on cutaneous wound healing in mammals. *J Anat.* 1995; 187:1–26.
PMID:7591970
12. Keylock KT, Vieira VJ, Wallig MA, DiPietro LA, Schrementi M, Woods JA. Exercise accelerates cutaneous wound healing and decreases wound inflammation in aged mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008; 294:R179–84.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00177.2007>
PMID:18003791
13. Swift ME, Burns AL, Gray KL, DiPietro LA. Age-related alterations in the inflammatory response to dermal injury. *J Invest Dermatol.* 2001; 117:1027–35.
<https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01539.x>
PMID:11710909
14. Swift ME, Kleinman HK, DiPietro LA. Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice. *Lab Invest.* 1999; 79:1479–87.
PMID:10616199
15. Ashcroft GS, Horan MA, Ferguson MW. Aging is associated with reduced deposition of specific extracellular matrix components, an upregulation of angiogenesis, and an altered inflammatory response in

- a murine incisional wound healing model. *J Invest Dermatol.* 1997; 108:430–37.
<https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12289705>
PMID:9077470
16. Ashcroft GS, Mills SJ, Ashworth JJ. Ageing and wound healing. *Biogerontology.* 2002; 3:337–45.
<https://doi.org/10.1023/A:1021399228395>
PMID:12510172
17. Ashcroft GS, Herrick SE, Tarnuzzer RW, Horan MA, Schultz GS, Ferguson MW. Human ageing impairs injury-induced in vivo expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP)-1 and -2 proteins and mRNA. *J Pathol.* 1997; 183:169–76.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199710\)183:2<169::AID-PATH915>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199710)183:2<169::AID-PATH915>3.0.CO;2-Q)
PMID:9390029
18. Sandby-Møller J, Poulsen T, Wulf HC. Epidermal thickness at different body sites: relationship to age, gender, pigmentation, blood content, skin type and smoking habits. *Acta Derm Venereol.* 2003; 83:410–13.
<https://doi.org/10.1080/00015550310015419>
PMID:14690333
19. Shuster S, Black MM, McVitie E. The influence of age and sex on skin thickness, skin collagen and density. *Br J Dermatol.* 1975; 93:639–43.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1975.tb05113.x>
PMID:1220811
20. Azzi L, El-Alfy M, Martel C, Labrie F. Gender differences in mouse skin morphology and specific effects of sex steroids and dehydroepiandrosterone. *J Invest Dermatol.* 2005; 124:22–27.
<https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23545.x>
PMID:15654949
21. Rønø B, Engelholm LH, Lund LR, Hald A. Gender affects skin wound healing in plasminogen deficient mice. *PLoS One.* 2013; 8:e59942.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059942>
PMID:23527289
22. Driskell RR, Jahoda CA, Chuong CM, Watt FM, Horsley V. Defining dermal adipose tissue. *Exp Dermatol.* 2014; 23:629–31.
<https://doi.org/10.1111/exd.12450>
PMID:24841073
23. Wojciechowicz K, Gledhill K, Ambler CA, Manning CB, Jahoda CA. Development of the mouse dermal adipose layer occurs independently of subcutaneous adipose tissue and is marked by restricted early expression of FABP4. *PLoS One.* 2013; 8:e59811.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059811>
PMID:23555789
24. Driskell RR, Lichtenberger BM, Hoste E, Kretzschmar K, Simons BD, Charalambous M, Ferron SR, Haurat Y, Pavlovic G, Ferguson-Smith AC, Watt FM. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. *Nature.* 2013; 504:277–81.
<https://doi.org/10.1038/nature12783>
PMID:24336287
25. Chen SX, Zhang LJ, Gallo RL. Dermal White Adipose Tissue: A Newly Recognized Layer of Skin Innate Defense. *J Invest Dermatol.* 2019; 139:1002–09.
<https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.12.031>
PMID:30879642
26. Low QE, Drugea IA, Duffner LA, Quinn DG, Cook DN, Rollins BJ, Kovacs EJ, DiPietro LA. Wound healing in MIP-1alpha(-/-) and MCP-1(-/-) mice. *Am J Pathol.* 2001; 159:457–63.
[https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61717-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61717-8)
PMID:11485904
27. Gillitzer R, Goebeler M. Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol.* 2001; 69:513–21.
PMID:11310836
28. Larsen L, Chen HY, Saegusa J, Liu FT. Galectin-3 and the skin. *J Dermatol Sci.* 2011; 64:85–91.
<https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2011.07.008>
PMID:21889881
29. Aragona M, Dekoninck S, Rulands S, Lenglez S, Mascré G, Simons BD, Blanpain C. Defining stem cell dynamics and migration during wound healing in mouse skin epidermis. *Nat Commun.* 2017; 8:14684.
<https://doi.org/10.1038/ncomms14684>
PMID:28248284
30. Bellavia G, Fasanaro P, Melchionna R, Capogrossi MC, Napolitano M. Transcriptional control of skin reepithelialization. *J Dermatol Sci.* 2014; 73:3–9.
<https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2013.08.007>
PMID:24012494
31. Caley MP, Martins VL, O'Toole EA. Metalloproteinases and Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2015; 4:225–34.
<https://doi.org/10.1089/wound.2014.0581>
PMID:25945285
32. Gill SE, Parks WC. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40:1334–47.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.10.024>
PMID:18083622
33. Toriseva M, Laato M, Carpén O, Ruohonen ST, Savontaus E, Inada M, Krane SM, Kähäri VM. MMP-13 regulates growth of wound granulation tissue and modulates gene expression signatures involved in inflammation, proteolysis, and cell viability. *PLoS One.* 2012; 7:e42596.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042596>

- PMID:[22880047](#)
34. Occlleston NL, O’Kane S, Laverty HG, Cooper M, Fairlamb D, Mason T, Bush JA, Ferguson MW. Discovery and development of avotermin (recombinant human transforming growth factor beta 3): a new class of prophylactic therapeutic for the improvement of scarring. *Wound Repair Regen.* 2011 (Suppl 1); 19:s38–48.
<https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2011.00711.x>
PMID:[21793965](#)
35. Komi-Kuramochi A, Kawano M, Oda Y, Asada M, Suzuki M, Oki J, Imamura T. Expression of fibroblast growth factors and their receptors during full-thickness skin wound healing in young and aged mice. *J Endocrinol.* 2005; 186:273–89.
<https://doi.org/10.1677/joe.1.06055> PMID:[16079254](#)
36. Chen L, Schrementi ME, Ranzer MJ, Wilgus TA, DiPietro LA. Blockade of mast cell activation reduces cutaneous scar formation. *PLoS One.* 2014; 9:e85226.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085226>
PMID:[24465509](#)
37. Denton CP, Khan K, Hoyles RK, Shiwen X, Leoni P, Chen Y, Eastwood M, Abraham DJ. Inducible lineage-specific deletion of TbetaRII in fibroblasts defines a pivotal regulatory role during adult skin wound healing. *J Invest Dermatol.* 2009; 129:194–204.
<https://doi.org/10.1038/jid.2008.171>
PMID:[18563179](#)
38. Finsson KW, McLean S, Di Guglielmo GM, Philip A. Dynamics of Transforming Growth Factor Beta Signaling in Wound Healing and Scarring. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2013; 2:195–214.
<https://doi.org/10.1089/wound.2013.0429>
PMID:[24527343](#)
39. Gailit J, Welch MP, Clark RA. TGF-beta 1 stimulates expression of keratinocyte integrins during re-epithelialization of cutaneous wounds. *J Invest Dermatol.* 1994; 103:221–27.
<https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12393176>
PMID:[8040614](#)
40. Evrard SM, d’Audigier C, Mauge L, Israël-Biet D, Guerin CL, Bieche I, Kovacic JC, Fischer AM, Gaussem P, Smadja DM. The profibrotic cytokine transforming growth factor-β1 increases endothelial progenitor cell angiogenic properties. *J Thromb Haemost.* 2012; 10:670–79.
<https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2012.04644.x>
PMID:[22284809](#)
41. Thompson HG, Mih JD, Krasieva TB, Tromberg BJ, George SC. Epithelial-derived TGF-beta2 modulates basal and wound-healing subepithelial matrix homeostasis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006; 291:L1277–85.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00057.2006>
PMID:[16891397](#)
42. Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol.* 1993; 122:103–11.
<https://doi.org/10.1083/jcb.122.1.103>
PMID:[8314838](#)
43. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmoulière A, Varga J, De Wever O, Mareel M, Gabbiani G. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol.* 2012; 180:1340–55.
<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.02.004>
PMID:[22387320](#)
44. Gilbert RW, Vickaryous MK, Vitoria-Petit AM. Signalling by Transforming Growth Factor Beta Isoforms in Wound Healing and Tissue Regeneration. *J Dev Biol.* 2016; 4:4.
<https://doi.org/10.3390/jdb4020021>
PMID:[29615587](#)
45. Levine JH, Moses HL, Gold LI, Nanney LB. Spatial and temporal patterns of immunoreactive transforming growth factor beta 1, beta 2, and beta 3 during excisional wound repair. *Am J Pathol.* 1993; 143:368–80.
PMID:[8342593](#)
46. Le M, Naridze R, Morrison J, Biggs LC, Rhea L, Schutte BC, Kaartinen V, Dunnwald M. Transforming growth factor Beta 3 is required for excisional wound repair in vivo. *PLoS One.* 2012; 7:e48040.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048040>
PMID:[23110169](#)
47. Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci.* 1995; 108:985–1002.
PMID:[7542672](#)
48. Quan T, Fisher GJ. Role of Age-Associated Alterations of the Dermal Extracellular Matrix Microenvironment in Human Skin Aging: A Mini-Review. *Gerontology.* 2015; 61:427–34.
<https://doi.org/10.1159/000371708>
PMID:[25660807](#)
49. Salzer MC, Lafzi A, Berenguer-Llargo A, Youssif C, Castellanos A, Solanas G, Peixoto FO, Stephan-Otto Attolini C, Prats N, Aguilera M, Martín-Caballero J, Heyn H, Benitah SA. Identity Noise and Adipogenic Traits Characterize Dermal Fibroblast Aging. *Cell.* 2018; 175:1575–1590.e22.

- <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.012>
PMID:[30415840](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30415840/)
50. Gilliver SC, Ruckshanthi JP, Hardman MJ, Nakayama T, Ashcroft GS. Sex dimorphism in wound healing: the roles of sex steroids and macrophage migration inhibitory factor. *Endocrinology*. 2008; 149:5747–57.
<https://doi.org/10.1210/en.2008-0355>
PMID:[18653719](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18653719/)
51. Hardman MJ, Ashcroft GS. Estrogen, not intrinsic aging, is the major regulator of delayed human wound healing in the elderly. *Genome Biol*. 2008; 9:R80.
<https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-5-r80>
PMID:[18477406](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18477406/)
52. Toriseva M, Kähäri VM. Proteinases in cutaneous wound healing. *Cell Mol Life Sci*. 2009; 66:203–24.
<https://doi.org/10.1007/s00018-008-8388-4>
PMID:[18810321](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18810321/)
53. Hartenstein B, Dittrich BT, Stickens D, Heyer B, Vu TH, Teurich S, Schorpp-Kistner M, Werb Z, Angel P. Epidermal development and wound healing in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. *J Invest Dermatol*. 2006; 126:486–96.
<https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700084>
PMID:[16374453](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16374453/)
54. Shih CL, Ajuwon KM. Inhibition of MMP-13 prevents diet-induced obesity in mice and suppresses adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *Mol Biol Rep*. 2015; 42:1225–32.
<https://doi.org/10.1007/s11033-015-3861-2>
PMID:[25682268](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25682268/)
55. Schmidt BA, Horsley V. Intradermal adipocytes mediate fibroblast recruitment during skin wound healing. *Development*. 2013; 140:1517–27.
<https://doi.org/10.1242/dev.087593>
PMID:[23482487](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23482487/)
56. Kasza I, Suh Y, Wollny D, Clark RJ, Roopra A, Colman RJ, MacDougald OA, Shedd TA, Nelson DW, Yen MI, Yen CL, Alexander CM. Syndecan-1 is required to maintain intradermal fat and prevent cold stress. *PLoS Genet*. 2014; 10:e1004514.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004514>
PMID:[25101993](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25101993/)
57. Alexander CM, Kasza I, Yen CL, Reeder SB, Hernando D, Gallo RL, Jahoda CA, Horsley V, MacDougald OA. Dermal white adipose tissue: a new component of the thermogenic response. *J Lipid Res*. 2015; 56:2061–69.
<https://doi.org/10.1194/jlr.R062893>
PMID:[26405076](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26405076/)
58. Festa E, Fretz J, Berry R, Schmidt B, Rodeheffer M, Horowitz M, Horsley V. Adipocyte lineage cells contribute to the skin stem cell niche to drive hair cycling. *Cell*. 2011; 146:761–71.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.019>
PMID:[21884937](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21884937/)
59. Kruglikov IL, Scherer PE. Dermal adipocytes and hair cycling: is spatial heterogeneity a characteristic feature of the dermal adipose tissue depot? *Exp Dermatol*. 2016; 25:258–62.
<https://doi.org/10.1111/exd.12941>
PMID:[26781768](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26781768/)
60. Plikus MV, Mayer JA, de la Cruz D, Baker RE, Maini PK, Maxson R, Chuong CM. Cyclic dermal BMP signalling regulates stem cell activation during hair regeneration. *Nature*. 2008; 451:340–44.
<https://doi.org/10.1038/nature06457>
PMID:[18202659](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18202659/)
61. Schmidt B, Horsley V. Unravelling hair follicle-adipocyte communication. *Exp Dermatol*. 2012; 21:827–30.
<https://doi.org/10.1111/exd.12001>
PMID:[23163647](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23163647/)
62. Wollina U, Wetzker R, Abdel-Naser MB, Kruglikov IL. Role of adipose tissue in facial aging. *Clin Interv Aging*. 2017; 12:2069–76.
<https://doi.org/10.2147/CIA.S151599>
PMID:[29255352](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29255352/)
63. Zhang LJ, Chen SX, Guerrero-Juarez CF, Li F, Tong Y, Liang Y, Liggins M, Chen X, Chen H, Li M, Hata T, Zheng Y, Plikus MV, Gallo RL. Age-Related Loss of Innate Immune Antimicrobial Function of Dermal Fat Is Mediated by Transforming Growth Factor Beta. *Immunity*. 2019; 50:121–136.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.11.003>
PMID:[30594464](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30594464/)
64. Marangoni RG, Korman BD, Wei J, Wood TA, Graham LV, Whitfield ML, Scherer PE, Tourtellotte WG, Varga J. Myofibroblasts in murine cutaneous fibrosis originate from adiponectin-positive intradermal progenitors. *Arthritis Rheumatol*. 2015; 67:1062–73.
<https://doi.org/10.1002/art.38990>
PMID:[25504959](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25504959/)
65. Anunciado-Koza R, Ukropec J, Koza RA, Kozak LP. Inactivation of UCP1 and the glycerol phosphate cycle synergistically increases energy expenditure to resist diet-induced obesity. *J Biol Chem*. 2008; 283:27688–97.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M804268200>
PMID:[18678870](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18678870/)
66. Noguchi F, Nakajima T, Inui S, Reddy JK, Itami S. Alteration of skin wound healing in keratinocyte-specific mediator complex subunit 1 null mice. *PLoS One*. 2014; 9:e102271.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102271>
PMID:[25122137](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25122137/)
67. Kopcewicz MM, Kur-Piotrowska A, Bukowska J, Gimble JM, Gawronska-Kozak B. Foxn1 and Mmp-9 expression

in intact skin and during excisional wound repair in young, adult, and old C57Bl/6 mice. *Wound Repair Regen.* 2017; 25:248–59.

<https://doi.org/10.1111/wrr.12524>

PMID:[28371152](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28371152/)

68. Bukowska J, Kopcewicz M, Kur-Piotrowska A, Szostek-Mioduchowska AZ, Walendzik K, Gawronska-Kozak B. Effect of TGF β 1, TGF β 3 and keratinocyte conditioned media on functional characteristics of dermal fibroblasts derived from reparative (Balb/c) and regenerative (Foxn1 deficient; nude) mouse models.

Cell Tissue Res. 2018; 374:149–63.

<https://doi.org/10.1007/s00441-018-2836-8>

PMID:[29637306](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29637306/)

69. Gawronska-Kozak B. Scarless skin wound healing in FOXN1 deficient (nude) mice is associated with distinctive matrix metalloproteinase expression. *Matrix Biol.* 2011; 30:290–300.

<https://doi.org/10.1016/j.matbio.2011.04.004>

PMID:[21539913](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21539913/)

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary Tables

Statistically significant differences for body weight by diet, sex and age

Supplementary Table 1. Comparisons by diet for body weight.

diet	age	sex	timepoint	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
HFD	old	female	W3	33.6	31.4	35.8	1.1	873.4	0.013
LFD	old	female	W3	29.4	26.8	32.0	1.3	1005.6	
HFD	old	female	W4	35.6	34.0	37.3	0.9	581.6	<0.001
LFD	old	female	W4	30.5	28.3	32.6	1.1	873.3	
HFD	old	female	W5	35.3	33.6	37.0	0.9	616.8	0.001
LFD	old	female	W5	31.0	28.8	33.1	1.1	873.3	
HFD	old	female	W6	36.6	34.9	38.4	0.9	616.8	<0.001
LFD	old	female	W6	31.3	29.2	33.5	1.1	873.3	
HFD	old	female	W7	36.9	35.2	38.6	0.9	616.8	<0.001
LFD	old	female	W7	31.2	28.8	33.6	1.2	964.2	
HFD	old	female	W8	37.7	36.0	39.4	0.9	581.6	<0.001
LFD	old	female	W8	30.7	28.8	32.6	1.0	736.8	
HFD	old	male	W1	37.4	35.4	39.3	1.0	781.0	0.011
LFD	old	male	W1	33.9	31.8	35.9	1.0	826.8	
HFD	old	male	W2	39.0	37.1	41.0	1.0	781.0	<0.001
LFD	old	male	W2	33.7	31.7	35.8	1.0	826.8	
HFD	old	male	W3	40.7	38.8	42.7	1.0	781.0	<0.001
LFD	old	male	W3	34.0	31.9	36.1	1.0	826.8	
HFD	old	male	W4	44.3	42.8	45.8	0.8	440.0	<0.001
LFD	old	male	W4	34.3	32.6	36.0	0.9	581.6	
HFD	old	male	W5	45.2	43.7	46.7	0.8	440.0	<0.001
LFD	old	male	W5	34.5	32.6	36.4	1.0	736.8	
HFD	old	male	W6	46.2	44.7	47.7	0.8	440.0	<0.001
LFD	old	male	W6	34.6	32.7	36.4	1.0	736.8	
HFD	old	male	W7	46.8	45.3	48.3	0.8	464.3	<0.001
LFD	old	male	W7	34.3	32.6	35.9	0.9	581.6	
HFD	old	male	W8	47.4	45.8	48.9	0.8	490.5	<0.001
LFD	old	male	W8	34.6	32.9	36.3	0.9	581.6	
HFD	young	female	W4	23.2	21.7	24.7	0.8	440.0	0.039
LFD	young	female	W4	21.2	19.8	22.7	0.7	400.4	
HFD	young	female	W5	23.5	22.0	25.0	0.8	440.0	0.036
LFD	young	female	W5	21.5	20.1	22.9	0.7	400.4	
HFD	young	female	W6	25.3	23.8	26.8	0.8	440.0	<0.001
LFD	young	female	W6	21.8	20.3	23.2	0.7	400.4	
HFD	young	female	W7	25.2	23.7	26.7	0.8	440.0	<0.001
LFD	young	female	W7	21.7	20.3	23.1	0.7	400.4	
HFD	young	female	W8	26.7	24.9	28.6	0.9	695.1	<0.001
LFD	young	female	W8	22.7	21.0	24.4	0.9	616.8	
HFD	young	male	W2	27.2	25.6	28.9	0.8	548.8	0.029
LFD	young	male	W2	25.0	23.4	26.5	0.8	464.1	

HFD	young	male	W3	28.4	26.7	30.0	0.8	548.8	0.009
LFD	young	male	W3	25.7	24.2	27.2	0.8	464.1	
HFD	young	male	W4	30.2	28.6	31.9	0.8	548.8	<0.001
LFD	young	male	W4	26.0	24.5	27.5	0.8	464.1	
HFD	young	male	W5	30.9	29.2	32.5	0.8	548.8	<0.001
LFD	young	male	W5	26.5	25.0	28.0	0.8	464.1	
HFD	young	male	W6	33.4	31.8	35.1	0.8	548.8	<0.001
LFD	young	male	W6	26.8	25.2	28.3	0.8	464.1	
HFD	young	male	W7	34.0	32.4	35.6	0.8	548.8	<0.001
LFD	young	male	W7	27.0	25.5	28.6	0.8	464.1	
HFD	young	male	W8	34.5	32.4	36.6	1.0	826.9	<0.001
LFD	young	male	W8	27.2	25.2	29.1	1.0	781.3	

Supplementary Table 2. Comparisons by sex for body weight.

sex	diet	age	timepoint	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
female	HFD	old	W0	30.3	28.6	32.0	0.9	581.6	<0.001
male	HFD	old	W0	36.8	35.3	38.3	0.8	440.0	
female	HFD	old	W1	30.8	28.7	33.0	1.1	873.4	<0.001
male	HFD	old	W1	37.4	35.4	39.3	1.0	781.0	
female	HFD	old	W2	31.4	29.2	33.7	1.2	919.6	<0.001
male	HFD	old	W2	39.0	37.1	41.0	1.0	781.0	
female	HFD	old	W3	33.6	31.4	35.8	1.1	873.4	<0.001
male	HFD	old	W3	40.7	38.8	42.7	1.0	781.0	
female	HFD	old	W4	35.6	34.0	37.3	0.9	581.6	<0.001
male	HFD	old	W4	44.3	42.8	45.8	0.8	440.0	
female	HFD	old	W5	35.3	33.6	37.0	0.9	616.8	<0.001
male	HFD	old	W5	45.2	43.7	46.7	0.8	440.0	
female	HFD	old	W6	36.6	34.9	38.4	0.9	616.8	<0.001
male	HFD	old	W6	46.2	44.7	47.7	0.8	440.0	
female	HFD	old	W7	36.9	35.2	38.6	0.9	616.8	<0.001
male	HFD	old	W7	46.8	45.3	48.3	0.8	464.3	
female	HFD	old	W8	37.7	36.0	39.4	0.9	581.6	<0.001
male	HFD	old	W8	47.4	45.8	48.9	0.8	490.5	
female	LFD	old	W0	30.0	28.1	31.9	1.0	736.8	<0.001
male	LFD	old	W0	35.2	33.5	36.8	0.9	581.6	
female	LFD	old	W1	29.2	27.0	31.4	1.1	873.3	0.001
male	LFD	old	W1	33.9	31.8	35.9	1.0	826.8	
female	LFD	old	W2	29.8	27.7	32.0	1.1	873.3	0.007
male	LFD	old	W2	33.7	31.7	35.8	1.0	826.8	
female	LFD	old	W3	29.4	26.8	32.0	1.3	1005.6	0.005
male	LFD	old	W3	34.0	31.9	36.1	1.0	826.8	
female	LFD	old	W4	30.5	28.3	32.6	1.1	873.3	0.003
male	LFD	old	W4	34.3	32.6	36.0	0.9	581.6	
female	LFD	old	W5	31.0	28.8	33.1	1.1	873.3	0.010
male	LFD	old	W5	34.5	32.6	36.4	1.0	736.8	
female	LFD	old	W6	31.3	29.2	33.5	1.1	873.3	0.020
male	LFD	old	W6	34.6	32.7	36.4	1.0	736.8	

female	LFD	old	W7	31.2	28.8	33.6	1.2	964.2	0.033
male	LFD	old	W7	34.3	32.6	35.9	0.9	581.6	
female	LFD	old	W8	30.7	28.8	32.6	1.0	736.8	0.001
male	LFD	old	W8	34.6	32.9	36.3	0.9	581.6	
female	HFD	young	W0	19.5	18.0	21.0	0.8	440.0	<0.001
male	HFD	young	W0	24.0	22.4	25.6	0.8	548.8	
female	HFD	young	W1	19.9	18.5	21.4	0.8	440.0	<0.001
male	HFD	young	W1	25.9	24.2	27.5	0.8	548.8	
female	HFD	young	W2	21.7	20.2	23.2	0.8	440.0	<0.001
male	HFD	young	W2	27.2	25.6	28.9	0.8	548.8	
female	HFD	young	W3	22.4	20.9	23.9	0.8	440.0	<0.001
male	HFD	young	W3	28.4	26.7	30.0	0.8	548.8	
female	HFD	young	W4	23.2	21.7	24.7	0.8	440.0	<0.001
male	HFD	young	W4	30.2	28.6	31.9	0.8	548.8	
female	HFD	young	W5	23.5	22.0	25.0	0.8	440.0	<0.001
male	HFD	young	W5	30.9	29.2	32.5	0.8	548.8	
female	HFD	young	W6	25.3	23.8	26.8	0.8	440.0	<0.001
male	HFD	young	W6	33.4	31.8	35.1	0.8	548.8	
female	HFD	young	W7	25.2	23.7	26.7	0.8	440.0	<0.001
male	HFD	young	W7	34.0	32.4	35.6	0.8	548.8	
female	HFD	young	W8	26.7	24.9	28.6	0.9	695.1	<0.001
male	HFD	young	W8	34.5	32.4	36.6	1.0	826.9	
female	LFD	young	W0	19.7	18.2	21.1	0.7	400.4	<0.001
male	LFD	young	W0	23.4	21.8	24.9	0.8	464.1	
female	LFD	young	W1	20.3	18.9	21.7	0.7	400.4	<0.001
male	LFD	young	W1	24.4	22.9	25.9	0.8	464.1	
female	LFD	young	W2	20.6	19.2	22.0	0.7	400.4	<0.001
male	LFD	young	W2	25.0	23.4	26.5	0.8	464.1	
female	LFD	young	W3	21.0	19.6	22.5	0.7	400.4	<0.001
male	LFD	young	W3	25.7	24.2	27.2	0.8	464.1	
female	LFD	young	W4	21.2	19.8	22.7	0.7	400.4	<0.001
male	LFD	young	W4	26.0	24.5	27.5	0.8	464.1	
female	LFD	young	W5	21.5	20.1	22.9	0.7	400.4	<0.001
male	LFD	young	W5	26.5	25.0	28.0	0.8	464.1	
female	LFD	young	W6	21.8	20.3	23.2	0.7	400.4	<0.001
male	LFD	young	W6	26.8	25.2	28.3	0.8	464.1	
female	LFD	young	W7	21.7	20.3	23.1	0.7	400.4	<0.001
male	LFD	young	W7	27.0	25.5	28.6	0.8	464.1	
female	LFD	young	W8	22.7	21.0	24.4	0.9	616.8	<0.001
male	LFD	young	W8	27.2	25.2	29.1	1.0	781.3	

Supplementary Table 3. Comparisons by age for body weight.

age	diet	sex	timepoint	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
old	HFD	female	W0	30.3	28.6	32.0	0.9	581.6	<0.001
young	HFD	female	W0	19.5	18.0	21.0	0.8	440.0	
old	HFD	female	W1	30.8	28.7	33.0	1.1	873.4	<0.001
young	HFD	female	W1	19.9	18.5	21.4	0.8	440.0	

old	HFD	female	W2	31.4	29.2	33.7	1.2	919.6	<0.001
young	HFD	female	W2	21.7	20.2	23.2	0.8	440.0	
old	HFD	female	W3	33.6	31.4	35.8	1.1	873.4	<0.001
young	HFD	female	W3	22.4	20.9	23.9	0.8	440.0	
old	HFD	female	W4	35.6	34.0	37.3	0.9	581.6	<0.001
young	HFD	female	W4	23.2	21.7	24.7	0.8	440.0	
old	HFD	female	W5	35.3	33.6	37.0	0.9	616.8	<0.001
young	HFD	female	W5	23.5	22.0	25.0	0.8	440.0	
old	HFD	female	W6	36.6	34.9	38.4	0.9	616.8	<0.001
young	HFD	female	W6	25.3	23.8	26.8	0.8	440.0	
old	HFD	female	W7	36.9	35.2	38.6	0.9	616.8	<0.001
young	HFD	female	W7	25.2	23.7	26.7	0.8	440.0	
old	HFD	female	W8	37.7	36.0	39.4	0.9	581.6	<0.001
young	HFD	female	W8	26.7	24.9	28.6	0.9	695.1	
old	LFD	female	W0	30.0	28.1	31.9	1.0	736.8	<0.001
young	LFD	female	W0	19.7	18.2	21.1	0.7	400.4	
old	LFD	female	W1	29.2	27.0	31.4	1.1	873.3	<0.001
young	LFD	female	W1	20.3	18.9	21.7	0.7	400.4	
old	LFD	female	W2	29.8	27.7	32.0	1.1	873.3	<0.001
young	LFD	female	W2	20.6	19.2	22.0	0.7	400.4	
old	LFD	female	W3	29.4	26.8	32.0	1.3	1005.6	<0.001
young	LFD	female	W3	21.0	19.6	22.5	0.7	400.4	
old	LFD	female	W4	30.5	28.3	32.6	1.1	873.3	<0.001
young	LFD	female	W4	21.2	19.8	22.7	0.7	400.4	
old	LFD	female	W5	31.0	28.8	33.1	1.1	873.3	<0.001
young	LFD	female	W5	21.5	20.1	22.9	0.7	400.4	
old	LFD	female	W6	31.3	29.2	33.5	1.1	873.3	<0.001
young	LFD	female	W6	21.8	20.3	23.2	0.7	400.4	
old	LFD	female	W7	31.2	28.8	33.6	1.2	964.2	<0.001
young	LFD	female	W7	21.7	20.3	23.1	0.7	400.4	
old	LFD	female	W8	30.7	28.8	32.6	1.0	736.8	<0.001
young	LFD	female	W8	22.7	21.0	24.4	0.9	616.8	
old	HFD	male	W0	36.8	35.3	38.3	0.8	440.0	<0.001
young	HFD	male	W0	24.0	22.4	25.6	0.8	548.8	
old	HFD	male	W1	37.4	35.4	39.3	1.0	781.0	<0.001
young	HFD	male	W1	25.9	24.2	27.5	0.8	548.8	
old	HFD	male	W2	39.0	37.1	41.0	1.0	781.0	<0.001
young	HFD	male	W2	27.2	25.6	28.9	0.8	548.8	
old	HFD	male	W3	40.7	38.8	42.7	1.0	781.0	<0.001
young	HFD	male	W3	28.4	26.7	30.0	0.8	548.8	
old	HFD	male	W4	44.3	42.8	45.8	0.8	440.0	<0.001
young	HFD	male	W4	30.2	28.6	31.9	0.8	548.8	
old	HFD	male	W5	45.2	43.7	46.7	0.8	440.0	<0.001
young	HFD	male	W5	30.9	29.2	32.5	0.8	548.8	
old	HFD	male	W6	46.2	44.7	47.7	0.8	440.0	<0.001
young	HFD	male	W6	33.4	31.8	35.1	0.8	548.8	
old	HFD	male	W7	46.8	45.3	48.3	0.8	464.3	<0.001
young	HFD	male	W7	34.0	32.4	35.6	0.8	548.8	

old	HFD	male	W8	47.4	45.8	48.9	0.8	490.5	<0.001
young	HFD	male	W8	34.5	32.4	36.6	1.0	826.9	
old	LFD	male	W0	35.2	33.5	36.8	0.9	581.6	<0.001
young	LFD	male	W0	23.4	21.8	24.9	0.8	464.1	
old	LFD	male	W1	33.9	31.8	35.9	1.0	826.8	<0.001
young	LFD	male	W1	24.4	22.9	25.9	0.8	464.1	
old	LFD	male	W2	33.7	31.7	35.8	1.0	826.8	<0.001
young	LFD	male	W2	25.0	23.4	26.5	0.8	464.1	
old	LFD	male	W3	34.0	31.9	36.1	1.0	826.8	<0.001
young	LFD	male	W3	25.7	24.2	27.2	0.8	464.1	
old	LFD	male	W4	34.3	32.6	36.0	0.9	581.6	<0.001
young	LFD	male	W4	26.0	24.5	27.5	0.8	464.1	
old	LFD	male	W5	34.5	32.6	36.4	1.0	736.8	<0.001
young	LFD	male	W5	26.5	25.0	28.0	0.8	464.1	
old	LFD	male	W6	34.6	32.7	36.4	1.0	736.8	<0.001
young	LFD	male	W6	26.8	25.2	28.3	0.8	464.1	
old	LFD	male	W7	34.3	32.6	35.9	0.9	581.6	<0.001
young	LFD	male	W7	27.0	25.5	28.6	0.8	464.1	
old	LFD	male	W8	34.6	32.9	36.3	0.9	581.6	<0.001
young	LFD	male	W8	27.2	25.2	29.1	1.0	781.3	

Statistically significant differences for fat mass by diet, sex and age

Supplementary Table 4. Comparisons by diet for fat mass.

diet	age	sex	timepoint	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
HFD	old	female	W3	10.3	9.0	11.7	0.7	1024.1	0.014
LFD	old	female	W3	7.9	6.4	9.4	0.8	1049.8	
HFD	old	female	W4	11.9	10.9	13.0	0.5	893.9	<0.001
LFD	old	female	W4	8.1	6.8	9.4	0.7	1024.1	
HFD	old	female	W5	12.1	11.0	13.1	0.5	915.0	<0.001
LFD	old	female	W5	8.2	6.9	9.5	0.7	1024.1	
HFD	old	female	W6	12.8	11.7	13.8	0.5	915.0	<0.001
LFD	old	female	W6	8.7	7.4	10.0	0.7	1024.1	
HFD	old	female	W7	13.3	12.3	14.4	0.5	915.0	<0.001
LFD	old	female	W7	8.7	7.4	10.0	0.7	1024.1	
HFD	old	female	W8	13.6	12.6	14.7	0.5	893.9	<0.001
LFD	old	female	W8	8.1	6.7	9.5	0.7	1037.9	
HFD	old	male	W1	9.7	8.4	11.0	0.6	1008.9	<0.001
LFD	old	male	W1	6.7	5.4	8.0	0.7	1024.1	
HFD	old	male	W2	11.4	10.2	12.7	0.6	1008.9	<0.001
LFD	old	male	W2	6.8	5.5	8.2	0.7	1024.1	
HFD	old	male	W3	12.6	11.4	13.9	0.6	1008.9	<0.001
LFD	old	male	W3	6.9	5.6	8.3	0.7	1024.1	
HFD	old	male	W4	14.8	13.8	15.8	0.5	893.9	<0.001
LFD	old	male	W4	7.3	6.2	8.3	0.5	914.5	
HFD	old	male	W5	15.5	14.4	16.5	0.5	893.9	<0.001
LFD	old	male	W5	7.6	6.4	8.8	0.6	992.3	

HFD	old	male	W6	15.7	14.7	16.7	0.5	893.9	<0.001
LFD	old	male	W6	7.7	6.5	9.0	0.6	992.3	
HFD	old	male	W7	16.5	15.5	17.6	0.5	914.9	<0.001
LFD	old	male	W7	7.5	6.4	8.6	0.5	914.5	
HFD	old	male	W8	16.6	15.5	17.7	0.6	935.7	<0.001
LFD	old	male	W8	7.7	6.7	8.8	0.5	914.5	
HFD	young	female	W6	5.9	5.0	6.8	0.5	817.8	0.003
LFD	young	female	W6	4.1	3.2	4.9	0.4	757.5	
HFD	young	female	W7	6.0	5.1	6.9	0.5	817.8	0.002
LFD	young	female	W7	4.0	3.2	4.9	0.4	777.3	
HFD	young	female	W8	7.1	5.9	8.2	0.6	977.8	<0.001
LFD	young	female	W8	4.5	3.5	5.5	0.5	911.3	
HFD	young	male	W4	6.8	5.8	7.8	0.5	874.0	0.003
LFD	young	male	W4	4.7	3.7	5.8	0.5	914.5	
HFD	young	male	W5	7.5	6.5	8.5	0.5	874.0	<0.001
LFD	young	male	W5	4.8	3.7	5.9	0.5	914.5	
HFD	young	male	W6	8.8	7.8	9.8	0.5	874.0	<0.001
LFD	young	male	W6	4.9	3.9	6.0	0.5	914.5	
HFD	young	male	W7	9.4	8.4	10.4	0.5	893.9	<0.001
LFD	young	male	W7	4.9	3.9	6.0	0.5	914.5	
HFD	young	male	W8	9.5	8.3	10.8	0.6	1009.6	<0.001
LFD	young	male	W8	4.9	3.3	6.5	0.8	1059.4	

Supplementary Table 5. Comparisons by sex for fat mass.

sex	diet	age	timepoint	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
female	HFD	old	W2	8.9	7.5	10.3	0.7	1037.9	0.006
male	HFD	old	W2	11.4	10.2	12.7	0.6	1008.9	
female	HFD	old	W3	10.3	9.0	11.7	0.7	1024.1	0.011
male	HFD	old	W3	12.6	11.4	13.9	0.6	1008.9	
female	HFD	old	W4	11.9	10.9	13.0	0.5	893.9	<0.001
male	HFD	old	W4	14.8	13.8	15.8	0.5	893.9	
female	HFD	old	W5	12.1	11.0	13.1	0.5	915.0	<0.001
male	HFD	old	W5	15.5	14.4	16.5	0.5	893.9	
female	HFD	old	W6	12.8	11.7	13.8	0.5	915.0	<0.001
male	HFD	old	W6	15.7	14.7	16.7	0.5	893.9	
female	HFD	old	W7	13.3	12.3	14.4	0.5	915.0	<0.001
male	HFD	old	W7	16.5	15.5	17.6	0.5	914.9	
female	HFD	old	W8	13.6	12.6	14.7	0.5	893.9	<0.001
male	HFD	old	W8	16.6	15.5	17.7	0.6	935.7	
female	HFD	young	W3	4.5	3.6	5.4	0.5	817.8	0.032
male	HFD	young	W3	5.9	4.9	6.9	0.5	874.0	
female	HFD	young	W4	4.8	3.9	5.8	0.5	817.8	0.003
male	HFD	young	W4	6.8	5.8	7.8	0.5	874.0	
female	HFD	young	W5	4.9	3.9	5.8	0.5	838.6	<0.001
male	HFD	young	W5	7.5	6.5	8.5	0.5	874.0	
female	HFD	young	W6	5.9	5.0	6.8	0.5	817.8	<0.001
male	HFD	young	W6	8.8	7.8	9.8	0.5	874.0	

female	HFD	young	W7	6.0	5.1	6.9	0.5	817.8	<0.001
male	HFD	young	W7	9.4	8.4	10.4	0.5	893.9	
female	HFD	young	W8	7.1	5.9	8.2	0.6	977.8	0.004
male	HFD	young	W8	9.5	8.3	10.8	0.6	1009.6	

Supplementary Table 6. Comparisons by age for fat mass.

age	diet	sex	timepoint	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
old	HFD	female	W0	8.2	7.2	9.2	0.5	893.9	<0.001
young	HFD	female	W0	3.5	2.5	4.4	0.5	817.8	
old	HFD	female	W1	8.1	6.7	9.4	0.7	1024.1	<0.001
young	HFD	female	W1	3.6	2.7	4.5	0.5	817.8	
old	HFD	female	W2	8.9	7.5	10.3	0.7	1037.9	<0.001
young	HFD	female	W2	4.3	3.4	5.3	0.5	817.8	
old	HFD	female	W3	10.3	9.0	11.7	0.7	1024.1	<0.001
young	HFD	female	W3	4.5	3.6	5.4	0.5	817.8	
old	HFD	female	W4	11.9	10.9	13.0	0.5	893.9	<0.001
young	HFD	female	W4	4.8	3.9	5.8	0.5	817.8	
old	HFD	female	W5	12.1	11.0	13.1	0.5	915.0	<0.001
young	HFD	female	W5	4.9	3.9	5.8	0.5	838.6	
old	HFD	female	W6	12.8	11.7	13.8	0.5	915.0	<0.001
young	HFD	female	W6	5.9	5.0	6.8	0.5	817.8	
old	HFD	female	W7	13.3	12.3	14.4	0.5	915.0	<0.001
young	HFD	female	W7	6.0	5.1	6.9	0.5	817.8	
old	HFD	female	W8	13.6	12.6	14.7	0.5	893.9	<0.001
young	HFD	female	W8	7.1	5.9	8.2	0.6	977.8	
old	LFD	female	W0	8.3	7.0	9.7	0.7	1024.1	<0.001
young	LFD	female	W0	3.5	2.6	4.3	0.4	757.5	
old	LFD	female	W1	8.0	6.5	9.5	0.8	1049.8	<0.001
young	LFD	female	W1	3.7	2.9	4.6	0.4	757.5	
old	LFD	female	W2	8.1	6.6	9.6	0.8	1049.8	<0.001
young	LFD	female	W2	3.9	3.0	4.7	0.4	757.5	
old	LFD	female	W3	7.9	6.4	9.4	0.8	1049.8	<0.001
young	LFD	female	W3	4.0	3.2	4.9	0.4	757.5	
old	LFD	female	W4	8.1	6.8	9.4	0.7	1024.1	<0.001
young	LFD	female	W4	3.9	3.0	4.7	0.4	757.5	
old	LFD	female	W5	8.2	6.9	9.5	0.7	1024.1	<0.001
young	LFD	female	W5	4.0	3.1	4.9	0.4	757.5	
old	LFD	female	W6	8.7	7.4	10.0	0.7	1024.1	<0.001
young	LFD	female	W6	4.1	3.2	4.9	0.4	757.5	
old	LFD	female	W7	8.7	7.4	10.0	0.7	1024.1	<0.001
young	LFD	female	W7	4.0	3.2	4.9	0.4	777.3	
old	LFD	female	W8	8.1	6.7	9.5	0.7	1037.9	<0.001
young	LFD	female	W8	4.5	3.5	5.5	0.5	911.3	
old	HFD	male	W0	8.4	7.4	9.4	0.5	893.9	<0.001
young	HFD	male	W0	4.0	3.0	5.0	0.5	874.0	
old	HFD	male	W1	9.7	8.4	11.0	0.6	1008.9	<0.001
young	HFD	male	W1	4.7	3.7	5.7	0.5	874.0	

old	HFD	male	W2	11.4	10.2	12.7	0.6	1008.9	<0.001
young	HFD	male	W2	5.4	4.4	6.4	0.5	874.0	
old	HFD	male	W3	12.6	11.4	13.9	0.6	1008.9	<0.001
young	HFD	male	W3	5.9	4.9	6.9	0.5	874.0	
old	HFD	male	W4	14.8	13.8	15.8	0.5	893.9	<0.001
young	HFD	male	W4	6.8	5.8	7.8	0.5	874.0	
old	HFD	male	W5	15.5	14.4	16.5	0.5	893.9	<0.001
young	HFD	male	W5	7.5	6.5	8.5	0.5	874.0	
old	HFD	male	W6	15.7	14.7	16.7	0.5	893.9	<0.001
young	HFD	male	W6	8.8	7.8	9.8	0.5	874.0	
old	HFD	male	W7	16.5	15.5	17.6	0.5	914.9	<0.001
young	HFD	male	W7	9.4	8.4	10.4	0.5	893.9	
old	HFD	male	W8	16.6	15.5	17.7	0.6	935.7	<0.001
young	HFD	male	W8	9.5	8.3	10.8	0.6	1009.6	
old	LFD	male	W0	8.0	6.9	9.1	0.5	914.5	<0.001
young	LFD	male	W0	3.9	2.9	5.0	0.5	914.5	
old	LFD	male	W1	6.7	5.4	8.0	0.7	1024.1	0.005
young	LFD	male	W1	4.3	3.3	5.4	0.5	914.5	
old	LFD	male	W2	6.8	5.5	8.2	0.7	1024.1	0.003
young	LFD	male	W2	4.4	3.3	5.4	0.5	914.5	
old	LFD	male	W3	6.9	5.6	8.3	0.7	1024.1	0.008
young	LFD	male	W3	4.7	3.6	5.8	0.5	914.5	
old	LFD	male	W4	7.3	6.2	8.3	0.5	914.5	<0.001
young	LFD	male	W4	4.7	3.7	5.8	0.5	914.5	
old	LFD	male	W5	7.6	6.4	8.8	0.6	992.3	<0.001
young	LFD	male	W5	4.8	3.7	5.9	0.5	914.5	
old	LFD	male	W6	7.7	6.5	9.0	0.6	992.3	<0.001
young	LFD	male	W6	4.9	3.9	6.0	0.5	914.5	
old	LFD	male	W7	7.5	6.4	8.6	0.5	914.5	<0.001
young	LFD	male	W7	4.9	3.9	6.0	0.5	914.5	
old	LFD	male	W8	7.7	6.7	8.8	0.5	914.5	0.003

Statistically significant differences for lean mass by diet, sex and age

Supplementary Table 7. Comparisons by diet for lean mass.

diet	age	sex	timepoint	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
HFD	old	male	W5	26.8	26.0	27.7	0.5	566.9	0.018
LFD	old	male	W5	25.3	24.3	26.3	0.5	747.6	
HFD	old	male	W7	27.2	26.3	28.2	0.5	599.0	0.002
LFD	old	male	W7	25.4	24.5	26.3	0.5	598.9	
HFD	old	male	W8	26.9	26.0	27.8	0.5	633.1	<0.001
LFD	old	male	W8	24.8	23.9	25.7	0.5	598.9	
HFD	young	male	W6	22.3	21.5	23.2	0.4	537.1	0.007
LFD	young	male	W6	20.8	19.9	21.7	0.5	566.9	
HFD	young	male	W7	22.6	21.7	23.5	0.5	566.9	0.010
LFD	young	male	W7	21.1	20.2	22.0	0.5	566.9	
HFD	young	male	W8	23.2	22.1	24.2	0.5	789.3	0.003

Supplementary Table 8. Comparisons by sex for lean mass.

sex	diet	age	timepoint	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
female	HFD	old	W0	20.8	19.9	21.7	0.5	566.9	<0.001
male	HFD	old	W0	25.0	24.2	25.9	0.5	566.9	
female	HFD	old	W1	20.7	19.6	21.9	0.6	831.6	<0.001
male	HFD	old	W1	24.9	23.9	26.0	0.5	789.3	
female	HFD	old	W2	21.1	19.9	22.3	0.6	874.1	<0.001
male	HFD	old	W2	25.2	24.1	26.3	0.5	789.3	
female	HFD	old	W3	22.0	20.9	23.1	0.6	831.6	<0.001
male	HFD	old	W3	25.7	24.6	26.7	0.5	789.3	
female	HFD	old	W4	22.4	21.5	23.3	0.5	566.9	<0.001
male	HFD	old	W4	26.6	25.7	27.5	0.5	566.9	
female	HFD	old	W5	21.6	20.7	22.5	0.5	598.9	<0.001
male	HFD	old	W5	26.8	26.0	27.7	0.5	566.9	
female	HFD	old	W6	22.2	21.3	23.1	0.5	598.9	<0.001
male	HFD	old	W6	27.1	26.3	28.0	0.5	566.9	
female	HFD	old	W7	22.3	21.4	23.2	0.5	598.9	<0.001
male	HFD	old	W7	27.2	26.3	28.2	0.5	599.0	
female	HFD	old	W8	22.3	21.5	23.2	0.5	566.9	<0.001
male	HFD	old	W8	26.9	26.0	27.8	0.5	633.1	
female	LFD	old	W0	21.0	19.7	22.3	0.7	955.6	<0.001
male	LFD	old	W0	25.7	24.8	26.7	0.5	598.9	
female	LFD	old	W1	21.7	20.5	22.8	0.6	874.1	<0.001
male	LFD	old	W1	25.9	24.8	27.0	0.6	831.6	
female	LFD	old	W2	21.1	19.7	22.6	0.7	991.8	<0.001
male	LFD	old	W2	24.6	23.2	26.1	0.7	991.8	
female	LFD	old	W3	20.9	19.5	22.4	0.7	991.8	<0.001
male	LFD	old	W3	25.5	24.4	26.7	0.6	831.6	
female	LFD	old	W4	21.6	20.5	22.8	0.6	874.1	<0.001
male	LFD	old	W4	25.8	24.9	26.7	0.5	598.9	
female	LFD	old	W5	21.3	20.2	22.5	0.6	874.1	<0.001
male	LFD	old	W5	25.3	24.3	26.3	0.5	747.6	
female	LFD	old	W6	21.6	20.4	22.8	0.6	874.1	<0.001
male	LFD	old	W6	26.0	24.9	27.0	0.5	747.6	
female	LFD	old	W7	21.4	20.1	22.8	0.7	955.6	<0.001
male	LFD	old	W7	25.4	24.5	26.3	0.5	598.9	
female	LFD	old	W8	21.2	20.0	22.5	0.6	915.9	<0.001
male	LFD	old	W8	24.8	23.9	25.7	0.5	598.9	
female	HFD	young	W0	15.6	14.7	16.4	0.4	460.2	<0.001
male	HFD	young	W0	18.8	17.9	19.6	0.4	537.1	
female	HFD	young	W1	15.1	14.3	15.9	0.4	438.9	<0.001
male	HFD	young	W1	19.3	18.4	20.2	0.4	537.1	
female	HFD	young	W2	16.5	15.7	17.3	0.4	460.2	<0.001
male	HFD	young	W2	19.9	19.0	20.7	0.4	537.1	
female	HFD	young	W3	17.0	16.2	17.8	0.4	460.2	<0.001
male	HFD	young	W3	20.5	19.6	21.3	0.4	537.1	
female	HFD	young	W4	17.3	16.5	18.1	0.4	460.2	<0.001
male	HFD	young	W4	21.5	20.6	22.3	0.4	537.1	

female	HFD	young	W5	17.4	16.6	18.2	0.4	484.5	<0.001
male	HFD	young	W5	21.6	20.7	22.5	0.4	537.1	
female	HFD	young	W6	18.1	17.3	18.9	0.4	460.2	<0.001
male	HFD	young	W6	22.3	21.5	23.2	0.4	537.1	
female	HFD	young	W7	18.2	17.4	19.0	0.4	460.2	<0.001
male	HFD	young	W7	22.6	21.7	23.5	0.5	566.9	
female	HFD	young	W8	18.6	17.6	19.6	0.5	709.0	<0.001
male	HFD	young	W8	23.2	22.1	24.2	0.5	789.3	
female	LFD	young	W0	15.9	15.2	16.7	0.4	383.4	<0.001
male	LFD	young	W0	18.5	17.6	19.4	0.5	566.9	
female	LFD	young	W1	15.9	15.2	16.7	0.4	383.4	<0.001
male	LFD	young	W1	18.9	18.0	19.8	0.5	566.9	
female	LFD	young	W2	16.4	15.6	17.1	0.4	383.4	<0.001
male	LFD	young	W2	19.6	18.7	20.5	0.5	566.9	
female	LFD	young	W3	16.5	15.8	17.3	0.4	383.4	<0.001
male	LFD	young	W3	19.9	19.0	20.8	0.5	566.9	
female	LFD	young	W4	16.8	16.0	17.5	0.4	383.4	<0.001
male	LFD	young	W4	20.4	19.5	21.3	0.5	566.9	
female	LFD	young	W5	17.0	16.2	17.7	0.4	383.4	<0.001
male	LFD	young	W5	20.5	19.6	21.4	0.5	566.9	
female	LFD	young	W6	17.1	16.4	17.9	0.4	383.4	<0.001
male	LFD	young	W6	20.8	19.9	21.7	0.5	566.9	
female	LFD	young	W7	17.3	16.5	18.0	0.4	383.4	<0.001
male	LFD	young	W7	21.1	20.2	22.0	0.5	566.9	
female	LFD	young	W8	17.6	16.8	18.5	0.5	573.4	<0.001
male	LFD	young	W8	20.8	19.6	22.1	0.6	915.8	

Supplementary Table 9. Comparisons by age for lean mass.

age	diet	sex	timepoint	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
old	HFD	female	W0	20.8	19.9	21.7	0.5	566.9	<0.001
young	HFD	female	W0	15.6	14.7	16.4	0.4	460.2	
old	HFD	female	W1	20.7	19.6	21.9	0.6	831.6	<0.001
young	HFD	female	W1	15.1	14.3	15.9	0.4	438.9	
old	HFD	female	W2	21.1	19.9	22.3	0.6	874.1	<0.001
young	HFD	female	W2	16.5	15.7	17.3	0.4	460.2	
old	HFD	female	W3	22.0	20.9	23.1	0.6	831.6	<0.001
young	HFD	female	W3	17.0	16.2	17.8	0.4	460.2	
old	HFD	female	W4	22.4	21.5	23.3	0.5	566.9	<0.001
young	HFD	female	W4	17.3	16.5	18.1	0.4	460.2	
old	HFD	female	W5	21.6	20.7	22.5	0.5	598.9	<0.001
young	HFD	female	W5	17.4	16.6	18.2	0.4	484.5	
old	HFD	female	W6	22.2	21.3	23.1	0.5	598.9	<0.001
young	HFD	female	W6	18.1	17.3	18.9	0.4	460.2	
old	HFD	female	W7	22.3	21.4	23.2	0.5	598.9	<0.001
young	HFD	female	W7	18.2	17.4	19.0	0.4	460.2	
old	HFD	female	W8	22.3	21.5	23.2	0.5	566.9	<0.001
young	HFD	female	W8	18.6	17.6	19.6	0.5	709.0	

old	LFD	female	W0	21.0	19.7	22.3	0.7	955.6	<0.001
young	LFD	female	W0	15.9	15.2	16.7	0.4	383.4	
old	LFD	female	W1	21.7	20.5	22.8	0.6	874.1	<0.001
young	LFD	female	W1	15.9	15.2	16.7	0.4	383.4	
old	LFD	female	W2	21.1	19.7	22.6	0.7	991.8	<0.001
young	LFD	female	W2	16.4	15.6	17.1	0.4	383.4	
old	LFD	female	W3	20.9	19.5	22.4	0.7	991.8	<0.001
young	LFD	female	W3	16.5	15.8	17.3	0.4	383.4	
old	LFD	female	W4	21.6	20.5	22.8	0.6	874.1	<0.001
young	LFD	female	W4	16.8	16.0	17.5	0.4	383.4	
old	LFD	female	W5	21.3	20.2	22.5	0.6	874.1	<0.001
young	LFD	female	W5	17.0	16.2	17.7	0.4	383.4	
old	LFD	female	W6	21.6	20.4	22.8	0.6	874.1	<0.001
young	LFD	female	W6	17.1	16.4	17.9	0.4	383.4	
old	LFD	female	W7	21.4	20.1	22.8	0.7	955.6	<0.001
young	LFD	female	W7	17.3	16.5	18.0	0.4	383.4	
old	LFD	female	W8	21.2	20.0	22.5	0.6	915.9	<0.001
young	LFD	female	W8	17.6	16.8	18.5	0.5	573.4	
old	HFD	male	W0	25.0	24.2	25.9	0.5	566.9	<0.001
young	HFD	male	W0	18.8	17.9	19.6	0.4	537.1	
old	HFD	male	W1	24.9	23.9	26.0	0.5	789.3	<0.001
young	HFD	male	W1	19.3	18.4	20.2	0.4	537.1	
old	HFD	male	W2	25.2	24.1	26.3	0.5	789.3	<0.001
young	HFD	male	W2	19.9	19.0	20.7	0.4	537.1	
old	HFD	male	W3	25.7	24.6	26.7	0.5	789.3	<0.001
young	HFD	male	W3	20.5	19.6	21.3	0.4	537.1	
old	HFD	male	W4	26.6	25.7	27.5	0.5	566.9	<0.001
young	HFD	male	W4	21.5	20.6	22.3	0.4	537.1	
old	HFD	male	W5	26.8	26.0	27.7	0.5	566.9	<0.001
young	HFD	male	W5	21.6	20.7	22.5	0.4	537.1	
old	HFD	male	W6	27.1	26.3	28.0	0.5	566.9	<0.001
young	HFD	male	W6	22.3	21.5	23.2	0.4	537.1	
old	HFD	male	W7	27.2	26.3	28.2	0.5	599.0	<0.001
young	HFD	male	W7	22.6	21.7	23.5	0.5	566.9	
old	HFD	male	W8	26.9	26.0	27.8	0.5	633.1	<0.001
young	HFD	male	W8	23.2	22.1	24.2	0.5	789.3	
old	LFD	male	W0	25.7	24.8	26.7	0.5	598.9	<0.001
young	LFD	male	W0	18.5	17.6	19.4	0.5	566.9	
old	LFD	male	W1	25.9	24.8	27.0	0.6	831.6	<0.001
young	LFD	male	W1	18.9	18.0	19.8	0.5	566.9	
old	LFD	male	W2	24.6	23.2	26.1	0.7	991.8	<0.001
young	LFD	male	W2	19.6	18.7	20.5	0.5	566.9	
old	LFD	male	W3	25.5	24.4	26.7	0.6	831.6	<0.001
young	LFD	male	W3	19.9	19.0	20.8	0.5	566.9	
old	LFD	male	W4	25.8	24.9	26.7	0.5	598.9	<0.001
young	LFD	male	W4	20.4	19.5	21.3	0.5	566.9	
old	LFD	male	W5	25.3	24.3	26.3	0.5	747.6	<0.001
young	LFD	male	W5	20.5	19.6	21.4	0.5	566.9	

old	LFD	male	W6	26.0	24.9	27.0	0.5	747.6	<0.001
young	LFD	male	W6	20.8	19.9	21.7	0.5	566.9	
old	LFD	male	W7	25.4	24.5	26.3	0.5	598.9	<0.001
young	LFD	male	W7	21.1	20.2	22.0	0.5	566.9	
old	LFD	male	W8	24.8	23.9	25.7	0.5	598.9	<0.001
young	LFD	male	W8	20.8	19.6	22.1	0.6	915.8	

Statistically significant differences for dermis (fibroblast rich dermis +dWAT) by diet and age

Supplementary Table 10. Summary of coefficients of model for dermis (fibroblast rich dermis + dWAT): diet.

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	504	37.7	13.38	0.000
diet - LFD	-144	53.3	-2.71	0.013

Statistically significant differences for dWAT by diet and age

Supplementary Table 11. Comparisons by diet for dWAT.

diet	age	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
HFD	old	331.3	247.4	415.2	40.2	20.0	0.009
LFD	old	167.2	83.3	251.2	40.2	20.0	
HFD	young	291.5	207.6	375.4	40.2	20.0	0.049
LFD	young	172.4	88.5	256.3	40.2	20.0	

Supplementary Table 12. Summary of coefficients of model for dWAT: diet.

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	311	27.5	11.34	0.000
diet - LFD	-142	38.8	-3.65	0.001

Statistically significant differences for fibroblasts rich dermis by diet and age

Supplementary Table 13. Summary of coefficients of model for fibroblasts rich dermis: age.

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	153.9	23.9	6.43	0.000
age - young	74.9	33.8	2.21	0.038

Statistically significant differences for MCP-1 by diet and age

Supplementary Table 14. Comparisons by age for MCP-1.

age	diet	day	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
old	HFD	D3	271.5	214.8	328.2	28.3	60.0	0.002
young	HFD	D3	138.5	81.8	195.1	28.3	60.0	
old	LFD	D0	149.4	92.8	206.1	28.3	60.0	0.047
young	LFD	D0	68.2	11.6	124.9	28.3	60.0	

old	LFD	D3	266.3	209.6	322.9	28.3	60.0	0.001
young	LFD	D3	128.9	72.2	185.6	28.3	60.0	

Supplementary Table 15. Summary of coefficients of model for MCP-1: age + diet + day + age:day.

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	95.83	21.7	4.417	0.000
age - young	-40.02	28.4	-1.409	0.164
diet - LFD	29.73	16.4	1.813	0.074
dayD3	158.21	28.4	5.569	0.000
dayD7	28.20	28.4	0.993	0.325
age - young:dayD3	-95.19	40.2	-2.370	0.021
age - young:dayD7	-3.69	40.2	-0.092	0.927

Statistically significant differences for CD68 mRNA expression by diet, sex and age

Supplementary Table 16. Comparisons by diet for CD68 mRNA expression.

diet	age	sex	day	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
HFD	young	female	D0	2.4	0.8	4.0	0.8	192.0	<0.001
LFD	young	female	D0	6.2	4.7	7.8	0.8	192.0	
HFD	young	female	D7	9.8	7.7	11.8	1.0	192.0	0.027
LFD	young	female	D7	6.6	4.8	8.5	0.9	192.0	
HFD	young	male	D0	3.6	1.9	5.3	0.9	192.0	0.005
LFD	young	male	D0	7.0	5.4	8.7	0.9	192.0	
HFD	young	male	D3	9.1	7.3	11.0	0.9	192.0	0.023
LFD	young	male	D3	11.9	10.4	13.5	0.8	192.0	

Supplementary Table 17. Comparisons by sex for CD68 mRNA expression.

sex	diet	age	day	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
female	LFD	old	D7	3.2	1.5	4.9	0.9	192.0	0.013
male	LFD	old	D7	6.3	4.6	8.0	0.9	192.0	
female	HFD	young	D3	12.6	10.8	14.5	0.9	192.0	0.009
male	HFD	young	D3	9.1	7.3	11.0	0.9	192.0	

Supplementary Table 18. Comparisons by age for CD68 mRNA expression.

age	diet	sex	day	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
old	HFD	female	D3	8.9	7.2	10.6	0.9	192.0	0.004
young	HFD	female	D3	12.6	10.8	14.5	0.9	192.0	
old	HFD	female	D7	3.8	1.7	5.9	1.0	192.0	<0.001
young	HFD	female	D7	9.8	7.7	11.8	1.0	192.0	
old	LFD	female	D0	2.3	0.6	4.0	0.9	192.0	0.001
young	LFD	female	D0	6.2	4.7	7.8	0.8	192.0	
old	LFD	female	D7	3.2	1.5	4.9	0.9	192.0	0.008
young	LFD	female	D7	6.6	4.8	8.5	0.9	192.0	
old	LFD	female	D14	1.3	-0.4	3.0	0.9	192.0	0.002

young	LFD	female	D14	5.1	3.4	6.8	0.9	192.0	
old	LFD	female	D21	1.4	-0.3	3.1	0.9	192.0	0.035
young	LFD	female	D21	4.0	2.3	5.7	0.9	192.0	
old	HFD	male	D21	2.2	0.3	4.0	0.9	192.0	0.040
young	HFD	male	D21	4.8	3.1	6.5	0.9	192.0	
old	LFD	male	D0	2.9	1.4	4.5	0.8	192.0	<0.001
young	LFD	male	D0	7.0	5.4	8.7	0.9	192.0	
old	LFD	male	D3	8.5	6.9	10.2	0.9	192.0	0.004
young	LFD	male	D3	11.9	10.4	13.5	0.8	192.0	
old	LFD	male	D14	1.9	0.2	3.6	0.9	192.0	0.016
young	LFD	male	D14	5.0	3.1	6.8	0.9	192.0	
old	LFD	male	D21	1.6	-0.1	3.3	0.9	192.0	<0.001
young	LFD	male	D21	6.3	4.6	7.9	0.9	192.0	

Supplementary Table 19. Summary of coefficients of model for CD68 mRNA expression: age + sex + diet + day + age:sex + age:diet + age:day + sex:day + diet:day + age:sex:day + age:diet:day.

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	1.099	0.658	1.671	0.096
age - young	1.377	0.958	1.437	0.152
sex - male	1.207	0.796	1.515	0.131
diet - LFD	0.904	0.799	1.133	0.259
dayD3	7.970	1.003	7.949	0.000
dayD7	2.227	1.081	2.059	0.041
dayD14	1.201	0.992	1.210	0.228
dayD21	0.536	0.997	0.538	0.591
age - young:sex - male	-0.205	1.148	-0.179	0.858
age - young:diet - LFD	2.761	1.148	2.405	0.017
age - young:dayD3	0.761	1.458	0.522	0.602
age - young:dayD7	4.501	1.560	2.885	0.004
age - young:dayD14	0.639	1.425	0.448	0.654
age - young:dayD21	-0.536	1.488	-0.360	0.719
sex - male:dayD3	-1.420	1.205	-1.178	0.240
sex - male:dayD7	1.193	1.205	0.990	0.324
sex - male:dayD14	-0.319	1.171	-0.273	0.785
sex - male:dayD21	-0.792	1.186	-0.668	0.505
diet - LFD:dayD3	-1.033	1.207	-0.856	0.393
diet - LFD:dayD7	-0.675	1.207	-0.560	0.576
diet - LFD:dayD14	-2.061	1.172	-1.758	0.080
diet - LFD:dayD21	-1.242	1.187	-1.046	0.297
age - young:sex - male:dayD3	-0.290	1.705	-0.170	0.865
age - young:sex - male:dayD7	-3.440	1.753	-1.963	0.051
age - young:sex - male:dayD14	-0.193	1.681	-0.115	0.909
age - young:sex - male:dayD21	2.098	1.705	1.230	0.220
age - young:diet - LFD:dayD3	-2.205	1.708	-1.291	0.198
age - young:diet - LFD:dayD7	-5.096	1.752	-2.908	0.004
age - young:diet - LFD:dayD14	-1.107	1.681	-0.659	0.511
age - young:diet - LFD:dayD21	-0.940	1.705	-0.552	0.582

Statistically significant differences for re-epithelialization by diet and age

Supplementary Table 20. Comparisons by diet for reepithelialization.

diet	age	day	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
HFD	young	D3	24.8	2.9	46.7	10.9	46.0	0.019
LFD	young	D3	63.4	40.3	86.4	11.5	46.0	

Supplementary Table 21. Comparisons by age for re-epithelialization.

age	diet	day	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
old	LFD	D3	25.9	-2.4	54.2	14.0	46.0	0.045
young	LFD	D3	63.4	40.3	86.4	11.5	46.0	

Supplementary Table 22. Summary of coefficients of model for re-epithelialization: age + diet + day + age:diet.

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	32.82	9.68	3.390	0.001
age - young	-2.91	11.96	-0.243	0.809
diet - LFD	-8.20	13.61	-0.602	0.550
dayD7	47.82	9.56	5.001	0.000
age - young:diet - LFD	38.85	18.70	2.078	0.043

Statistically significant differences for *Mmp-9* mRNA expression by diet, sex and age

Supplementary Table 23. Comparisons by diet for *Mmp-9* mRNA expression.

diet	age	sex	day	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
HFD	old	female	D3	42.6	35.8	49.4	3.5	197.0	0.003
LFD	old	female	D3	27.1	19.6	34.5	3.8	197.0	
HFD	old	male	D7	11.5	4.7	18.3	3.5	197.0	0.008
LFD	old	male	D7	24.5	17.7	31.3	3.5	197.0	

Supplementary Table 24. Comparisons by sex for *Mmp-9* mRNA expression.

sex	diet	age	day	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
female	LFD	old	D3	27.1	19.6	34.5	3.8	197.0	0.001
male	LFD	old	D3	43.7	36.9	50.5	3.5	197.0	
female	HFD	young	D3	22.3	15.5	29.1	3.5	197.0	0.014
male	HFD	young	D3	35.0	27.5	42.5	3.8	197.0	

Supplementary Table 25. Comparisons by age for *Mmp-9* mRNA expression.

age	diet	sex	day	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
old	HFD	female	D3	42.6	35.8	49.4	3.5	197.0	<0.001
young	HFD	female	D3	22.3	15.5	29.1	3.5	197.0	
old	HFD	male	D3	45.9	39.1	52.7	3.5	197.0	0.034
young	HFD	male	D3	35.0	27.5	42.5	3.8	197.0	

old	LFD	male	D3	43.7	36.9	50.5	3.5	197.0	<0.001
young	LFD	male	D3	25.5	19.2	31.8	3.2	197.0	

Supplementary Table 26. Summary of coefficients of model for *Mmp-9* mRNA expression: age + sex + diet + day + age:day + diet:day.

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	4.202	2.00	2.100	0.037
age - young	1.238	2.31	0.536	0.593
sex - male	1.801	1.10	1.631	0.104
diet - LFD	4.696	2.31	2.032	0.043
dayD3	37.676	2.87	13.117	0.000
dayD7	10.926	2.99	3.653	0.000
dayD14	0.197	2.88	0.069	0.945
dayD21	-0.703	2.92	-0.240	0.810
age - young:dayD3	-14.272	3.39	-4.211	0.000
age - young:dayD7	-3.215	3.45	-0.932	0.352
age - young:dayD14	0.238	3.41	0.070	0.944
age - young:dayD21	-0.890	3.41	-0.261	0.794
diet - LFD:dayD3	-9.791	3.39	-2.889	0.004
diet - LFD:dayD7	-0.292	3.45	-0.084	0.933
diet - LFD:dayD14	-4.087	3.41	-1.200	0.231
diet - LFD:dayD21	-3.718	3.41	-1.091	0.276

Statistically significant differences for *Timp-1* mRNA expression by diet, sex and age

Supplementary Table 27. Comparisons by diet for *Timp-1* mRNA expression.

diet	age	sex	day	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
HFD	old	female	D3	157.2	136.8	177.6	10.3	197.0	<0.001
LFD	old	female	D3	44.4	22.1	66.8	11.3	197.0	
HFD	young	female	D3	82.4	62.0	102.8	10.3	197.0	0.011
LFD	young	female	D3	44.9	24.5	65.3	10.3	197.0	
HFD	young	female	D7	57.5	35.2	79.9	11.3	197.0	0.019
LFD	young	female	D7	19.5	-2.9	41.8	11.3	197.0	
HFD	young	male	D3	76.7	54.4	99.1	11.3	197.0	0.042
LFD	young	male	D3	46.4	27.5	65.3	9.6	197.0	

Supplementary Table 28. Comparisons by sex for *Timp-1* mRNA expression.

sex	diet	age	day	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
female	HFD	old	D3	157.2	136.8	177.6	10.3	197.0	<0.001
male	HFD	old	D3	88.0	67.6	108.4	10.3	197.0	

Supplementary Table 29. Comparisons by age for *Timp-1* mRNA expression.

age	diet	sex	day	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
old	HFD	female	D3	157.2	136.8	177.6	10.3	197.0	<0.001
young	HFD	female	D3	82.4	62.0	102.8	10.3	197.0	

Supplementary Table 30. Summary of coefficients of model for *Timp-1* mRNA expression: age * sex * diet * day.

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	1.993	8.96	0.222	0.824
age - young	0.380	13.12	0.029	0.977
sex - male	0.239	13.12	0.018	0.985
diet - LFD	3.203	13.69	0.234	0.815
dayD3	155.186	13.69	11.335	0.000
dayD7	30.090	15.52	1.938	0.054
dayD14	4.785	13.69	0.350	0.727
dayD21	7.882	13.69	0.576	0.565
age - young:sex - male	0.560	19.26	0.029	0.977
age - young:diet - LFD	-1.877	19.26	-0.097	0.922
sex - male:diet - LFD	-4.006	19.26	-0.208	0.835
age - young:dayD3	-75.128	19.66	-3.822	0.000
age - young:dayD7	25.045	21.48	1.166	0.245
age - young:dayD14	3.341	20.19	0.165	0.869
age - young:dayD21	-8.121	20.19	-0.402	0.688
sex - male:dayD3	-69.406	19.66	-3.531	0.001
sex - male:dayD7	-22.419	20.97	-1.069	0.286
sex - male:dayD14	5.978	19.66	0.304	0.761
sex - male:dayD21	-8.068	20.19	-0.400	0.690
diet - LFD:dayD3	-115.937	20.57	-5.637	0.000
diet - LFD:dayD7	11.831	21.34	0.555	0.580
diet - LFD:dayD14	-6.906	20.04	-0.345	0.731
diet - LFD:dayD21	-8.225	20.04	-0.410	0.682
age - young:sex - male:diet - LFD	9.248	27.73	0.334	0.739
age - young:sex - male:dayD3	62.913	28.65	2.196	0.029
age - young:sex - male:dayD7	1.109	29.57	0.037	0.970
age - young:sex - male:dayD14	-8.604	28.65	-0.300	0.764
age - young:sex - male:dayD21	10.156	29.02	0.350	0.727
age - young:diet - LFD:dayD3	77.065	28.65	2.690	0.008
age - young:diet - LFD:dayD7	-51.200	29.93	-1.711	0.089
age - young:diet - LFD:dayD14	0.732	28.65	0.026	0.980
age - young:diet - LFD:dayD21	8.596	28.65	0.300	0.764
sex - male:diet - LFD:dayD3	97.531	28.65	3.404	0.001
sex - male:diet - LFD:dayD7	13.657	29.21	0.468	0.641
sex - male:diet - LFD:dayD14	-0.840	28.27	-0.030	0.976
sex - male:diet - LFD:dayD21	8.937	28.65	0.312	0.755
age - young:sex - male:diet - LFD:dayD3	-95.603	40.66	-2.351	0.020
age - young:sex - male:diet - LFD:dayD7	26.887	41.50	0.648	0.518
age - young:sex - male:diet - LFD:dayD14	0.889	40.85	0.022	0.983
age - young:sex - male:diet - LFD:dayD21	-8.808	40.85	-0.216	0.829

Statistically significant differences for *Mmp-13* mRNA expression by diet, sex and age

Supplementary Table 31. Comparisons by diet for *Mmp-13* mRNA expression.

diet	age	sex	day	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
HFD	young	female	D7	228.5	181.0	276.0	24.1	193.0	<0.001
LFD	young	female	D7	42.2	-5.3	89.7	24.1	193.0	

Supplementary Table 32. Comparisons by sex for *Mmp-13* mRNA expression.

sex	diet	age	day	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
female	HFD	young	D3	214.6	171.3	258.0	22.0	193.0	<0.001
male	HFD	young	D3	88.3	40.8	135.8	24.1	193.0	
female	HFD	young	D7	228.5	181.0	276.0	24.1	193.0	<0.001
male	HFD	young	D7	41.0	-2.4	84.3	22.0	193.0	
female	LFD	young	D3	154.3	110.9	197.6	22.0	193.0	<0.001
male	LFD	young	D3	42.2	2.1	82.3	20.3	193.0	

Supplementary Table 33. Comparisons by age for *Mmp-13* mRNA expression.

age	diet	sex	day	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
old	HFD	female	D3	83.9	40.5	127.2	22.0	193.0	<0.001
young	HFD	female	D3	214.6	171.3	258.0	22.0	193.0	
old	HFD	female	D7	43.7	-9.4	96.8	26.9	193.0	<0.001
young	HFD	female	D7	228.5	181.0	276.0	24.1	193.0	
old	LFD	female	D3	42.1	-5.4	89.6	24.1	193.0	<0.001
young	LFD	female	D3	154.3	110.9	197.6	22.0	193.0	

Supplementary Table 34. Summary of coefficients of model for *Mmp-13* mRNA expression: age + sex + diet + day + age:sex + age:diet + sex:diet + age:day + sex:day + diet:day + age:sex:day + age:diet:day + sex:diet:day.

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	3.464	20.4	0.169	0.866
age - young	-4.597	26.6	-0.173	0.863
sex - male	-4.017	26.0	-0.155	0.877
diet - LFD	-3.861	26.6	-0.145	0.885
dayD3	78.814	29.0	2.718	0.007
dayD7	63.007	31.9	1.974	0.050
dayD14	7.473	29.0	0.258	0.797
dayD21	4.276	29.1	0.147	0.883
age - young:sex - male	8.778	30.2	0.291	0.771
age - young:diet - LFD	7.300	30.2	0.242	0.809
sex - male:diet - LFD	6.534	30.2	0.216	0.829
age - young:dayD3	138.544	37.9	3.653	0.000
age - young:dayD7	148.365	40.2	3.693	0.000
age - young:dayD14	3.324	38.6	0.086	0.931
age - young:dayD21	-1.659	39.6	-0.042	0.967
sex - male:dayD3	-11.268	37.5	-0.301	0.764

sex - male:dayD7	-54.900	39.2	-1.399	0.163
sex - male:dayD14	7.608	37.5	0.203	0.840
sex - male:dayD21	-2.421	38.3	-0.063	0.950
diet - LFD:dayD3	-34.428	38.5	-0.893	0.373
diet - LFD:dayD7	-43.419	39.7	-1.094	0.275
diet - LFD:dayD14	-4.227	38.0	-0.111	0.911
diet - LFD:dayD21	0.119	38.1	0.003	0.998
age - young:sex - male:dayD3	-123.338	43.6	-2.826	0.005
age - young:sex - male:dayD7	-103.912	44.5	-2.336	0.020
age - young:sex - male:dayD14	-12.133	43.8	-0.277	0.782
age - young:sex - male:dayD21	-1.981	44.2	-0.045	0.964
age - young:diet - LFD:dayD3	-32.576	43.6	-0.746	0.456
age - young:diet - LFD:dayD7	-109.833	44.4	-2.474	0.014
age - young:diet - LFD:dayD14	-5.003	43.8	-0.114	0.909
age - young:diet - LFD:dayD21	-2.948	44.2	-0.067	0.947
sex - male:diet - LFD:dayD3	14.236	43.6	0.326	0.745
sex - male:diet - LFD:dayD7	120.216	44.5	2.700	0.008
sex - male:diet - LFD:dayD14	-7.140	43.8	-0.163	0.871
sex - male:diet - LFD:dayD21	-2.235	44.2	-0.051	0.960

Statistically significant differences for *Tgfb-1* mRNA expression by diet, sex and age

Supplementary Table 35. Comparisons by diet for *Tgfb-1* mRNA expression.

diet	age	sex	day	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
HFD	old	male	D0	6.6	3.5	9.7	1.6	199.0	0.038
LFD	old	male	D0	11.3	8.2	14.4	1.6	199.0	
HFD	young	female	D0	7.4	4.3	10.5	1.6	199.0	0.043
LFD	young	female	D0	11.9	8.8	15.0	1.6	199.0	

Supplementary Table 36. Comparisons by sex for *Tgfb-1* mRNA expression.

sex	diet	age	day	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
female	HFD	old	D3	25.0	21.7	28.4	1.7	199.0	<0.001
male	HFD	old	D3	16.2	12.8	19.5	1.7	199.0	
female	HFD	old	D7	22.2	18.1	26.3	2.1	199.0	0.004
male	HFD	old	D7	14.4	11.0	17.7	1.7	199.0	
female	HFD	old	D14	14.2	10.8	17.5	1.7	199.0	0.016
male	HFD	old	D14	8.3	5.0	11.7	1.7	199.0	
female	LFD	old	D21	13.3	10.0	16.7	1.7	199.0	0.004
male	LFD	old	D21	6.3	2.9	9.7	1.7	199.0	

Supplementary Table 37. Comparisons by age for *Tgfb-1* mRNA expression.

age	diet	sex	day	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
old	HFD	female	D3	25.0	21.7	28.4	1.7	199.0	<0.001
young	HFD	female	D3	13.8	10.5	17.2	1.7	199.0	
old	HFD	female	D7	22.2	18.1	26.3	2.1	199.0	0.014

young	HFD	female	D7	15.3	11.6	19.0	1.9	199.0	
old	HFD	female	D14	14.2	10.8	17.5	1.7	199.0	0.008
young	HFD	female	D14	7.7	4.3	11.0	1.7	199.0	
old	HFD	female	D21	11.4	8.0	14.7	1.7	199.0	0.020
young	HFD	female	D21	5.7	2.4	9.1	1.7	199.0	
old	LFD	female	D3	26.0	22.3	29.7	1.9	199.0	<0.001
young	LFD	female	D3	13.0	9.6	16.4	1.7	199.0	
old	LFD	female	D7	20.1	16.7	23.4	1.7	199.0	0.008
young	LFD	female	D7	13.3	9.6	17.0	1.9	199.0	

Supplementary Table 38. Summary of coefficients of model for *Tgfb-1* mRNA expression: age + sex + diet + day + age:sex + age:day + sex:day + diet:day + age:sex:day.

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	7.272	1.20	6.053	0.000
age - young	0.522	1.56	0.335	0.738
sex - male	-0.204	1.56	-0.131	0.896
diet - LFD	3.717	1.12	3.308	0.001
dayD3	17.694	1.81	9.762	0.000
dayD7	13.821	1.92	7.186	0.000
dayD14	5.549	1.79	3.094	0.002
dayD21	4.233	1.79	2.360	0.019
age - young:sex - male	-0.470	2.25	-0.209	0.835
age - young:dayD3	-12.600	2.32	-5.429	0.000
age - young:dayD7	-7.168	2.42	-2.967	0.003
age - young:dayD14	-4.081	2.29	-1.780	0.076
age - young:dayD21	-4.718	2.29	-2.058	0.041
sex - male:dayD3	-8.583	2.32	-3.698	0.000
sex - male:dayD7	-5.267	2.36	-2.235	0.026
sex - male:dayD14	-4.462	2.29	-1.947	0.053
sex - male:dayD21	-5.828	2.32	-2.511	0.013
diet - LFD:dayD3	-2.637	1.65	-1.599	0.111
diet - LFD:dayD7	-3.983	1.68	-2.373	0.019
diet - LFD:dayD14	-3.682	1.65	-2.237	0.026
diet - LFD:dayD21	-2.044	1.65	-1.242	0.216
age - young:sex - male:dayD3	9.062	3.29	2.753	0.006
age - young:sex - male:dayD7	4.185	3.36	1.246	0.214
age - young:sex - male:dayD14	4.810	3.29	1.461	0.145
age - young:sex - male:dayD21	7.095	3.29	2.155	0.032

Statistically significant differences for *Tgfb-3* mRNA expression by diet, sex and age

Supplementary Table 39. Comparisons by diet for *Tgfb-3* mRNA expression.

diet	age	sex	day	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
HFD	old	female	D14	22.4	16.6	28.2	2.9	199.0	0.010
LFD	old	female	D14	11.6	5.8	17.4	2.9	199.0	

Supplementary Table 40. Comparisons by sex for *Tgfb-3* mRNA expression.

sex	diet	age	day	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
female	HFD	old	D14	22.4	16.6	28.2	2.9	199.0	0.005
male	HFD	old	D14	10.5	4.7	16.3	2.9	199.0	

Supplementary Table 41. Comparisons by age for *Tgfb-3* mRNA expression.

age	diet	sex	day	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
old	HFD	female	D14	22.4	16.6	28.2	2.9	199.0	0.003
young	HFD	female	D14	10.1	4.3	15.9	2.9	199.0	
old	HFD	male	D7	24.9	19.1	30.7	2.9	199.0	0.023
young	HFD	male	D7	15.4	9.6	21.2	2.9	199.0	

Supplementary Table 42. Summary of coefficients of model for *Tgfb-3* mRNA expression: age + sex + diet + day + age:sex + age:diet + sex:diet + age:day + sex:day + age:sex:diet + age:sex:day.

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	10.098	2.10	4.806	0.000
age - young	0.361	3.01	0.120	0.905
sex - male	5.087	3.00	1.693	0.092
diet - LFD	-0.357	1.90	-0.188	0.851
dayD3	-2.401	2.92	-0.822	0.412
dayD7	9.642	3.02	3.194	0.002
dayD14	7.071	2.85	2.477	0.014
dayD21	2.655	2.85	0.930	0.353
age - young:sex - male	-3.564	4.35	-0.819	0.414
age - young:diet - LFD	3.079	2.67	1.155	0.249
sex - male:diet - LFD	3.288	2.66	1.238	0.217
age - young:dayD3	-1.757	4.08	-0.431	0.667
age - young:dayD7	-1.819	4.26	-0.427	0.669
age - young:dayD14	-6.468	4.04	-1.603	0.110
age - young:dayD21	-2.885	4.04	-0.715	0.475
sex - male:dayD3	-6.050	4.08	-1.482	0.140
sex - male:dayD7	-2.736	4.15	-0.659	0.511
sex - male:dayD14	-11.855	4.04	-2.938	0.004
sex - male:dayD21	-11.690	4.08	-2.862	0.005
age - young:sex - male:diet - LFD	-6.229	3.76	-1.656	0.099
age - young:sex - male:dayD3	8.675	5.79	1.497	0.136
age - young:sex - male:dayD7	-1.104	5.92	-0.187	0.852
age - young:sex - male:dayD14	14.318	5.79	2.471	0.014
age - young:sex - male:dayD21	11.601	5.79	2.002	0.047

Statistically significant differences for *Collagen 1* mRNA expression by diet, sex and age

Supplementary Table 43. Comparisons by diet for *Collagen 1* mRNA expression.

diet	age	sex	day	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
HFD	old	female	D14	10.5	5.9	15.0	2.3	199.0	0.050
LFD	old	female	D14	4.1	-0.5	8.6	2.3	199.0	
HFD	young	male	D21	28.1	23.5	32.6	2.3	199.0	0.019
LFD	young	male	D21	20.4	15.9	24.9	2.3	199.0	

Supplementary Table 44. Comparisons by sex for *Collagen 1* mRNA expression.

sex	diet	age	day	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
female	HFD	old	D0	1.5	-2.4	5.4	2.0	199.0	0.049
male	HFD	old	D0	7.3	3.1	11.4	2.1	199.0	
female	HFD	young	D0	2.4	-1.8	6.6	2.1	199.0	<0.001
male	HFD	young	D0	24.6	20.0	29.1	2.3	199.0	
female	HFD	young	D7	14.8	9.8	19.7	2.5	199.0	<0.001
male	HFD	young	D7	33.8	29.3	38.4	2.3	199.0	
female	HFD	young	D14	6.8	2.2	11.3	2.3	199.0	<0.001
male	HFD	young	D14	31.2	26.7	35.7	2.3	199.0	
female	HFD	young	D21	4.7	0.1	9.2	2.3	199.0	<0.001
male	HFD	young	D21	28.1	23.5	32.6	2.3	199.0	
female	LFD	young	D0	3.6	-0.6	7.8	2.1	199.0	<0.001
male	LFD	young	D0	25.5	21.0	30.1	2.3	199.0	
female	LFD	young	D3	4.2	-0.3	8.8	2.3	199.0	0.018
male	LFD	young	D3	11.7	7.5	15.9	2.1	199.0	
female	LFD	young	D7	7.8	2.8	12.8	2.5	199.0	<0.001
male	LFD	young	D7	31.2	26.7	35.7	2.3	199.0	
female	LFD	young	D14	6.4	1.9	11.0	2.3	199.0	<0.001
male	LFD	young	D14	28.1	23.2	33.1	2.5	199.0	
female	LFD	young	D21	5.2	0.7	9.7	2.3	199.0	<0.001
male	LFD	young	D21	20.4	15.9	24.9	2.3	199.0	

Supplementary Table 45. Comparisons by age for *Collagen 1* mRNA expression.

age	diet	sex	day	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
old	HFD	male	D0	7.3	3.1	11.4	2.1	199.0	<0.001
young	HFD	male	D0	24.6	20.0	29.1	2.3	199.0	
old	HFD	male	D3	4.5	0.0	9.1	2.3	199.0	0.049
young	HFD	male	D3	11.3	6.3	16.3	2.5	199.0	
old	HFD	male	D7	11.8	7.3	16.3	2.3	199.0	<0.001
young	HFD	male	D7	33.8	29.3	38.4	2.3	199.0	
old	HFD	male	D14	10.4	5.9	14.9	2.3	199.0	<0.001
young	HFD	male	D14	31.2	26.7	35.7	2.3	199.0	
old	HFD	male	D21	9.1	4.1	14.0	2.5	199.0	<0.001
young	HFD	male	D21	28.1	23.5	32.6	2.3	199.0	
old	LFD	male	D0	4.2	-0.0	8.4	2.1	199.0	<0.001
young	LFD	male	D0	25.5	21.0	30.1	2.3	199.0	

old	LFD	male	D3	5.4	0.8	9.9	2.3	199.0	0.045
young	LFD	male	D3	11.7	7.5	15.9	2.1	199.0	
old	LFD	male	D7	14.4	9.9	19.0	2.3	199.0	<0.001
young	LFD	male	D7	31.2	26.7	35.7	2.3	199.0	
old	LFD	male	D14	8.1	3.6	12.7	2.3	199.0	<0.001
young	LFD	male	D14	28.1	23.2	33.1	2.5	199.0	
old	LFD	male	D21	6.1	1.5	10.6	2.3	199.0	<0.001
young	LFD	male	D21	20.4	15.9	24.9	2.3	199.0	

Supplementary Table 46. Summary of coefficients of model for *Collagen 1* mRNA expression: age + sex + diet + day + age:sex + age:day + sex:day + age:sex:day.

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	2.521	1.519	1.659	0.098
age - young	1.220	2.104	0.580	0.563
sex - male	3.938	2.104	1.871	0.063
diet - LFD	-1.510	0.722	-2.092	0.038
dayD3	3.079	2.243	1.373	0.171
dayD7	7.845	2.308	3.399	0.001
dayD14	5.500	2.190	2.511	0.013
dayD21	3.424	2.190	1.563	0.119
age - young:sex - male	18.123	3.037	5.967	0.000
age - young:dayD3	-1.468	3.134	-0.468	0.640
age - young:dayD7	0.457	3.261	0.140	0.889
age - young:dayD14	-1.879	3.097	-0.607	0.545
age - young:dayD21	-1.479	3.097	-0.477	0.634
sex - male:dayD3	-3.826	3.134	-1.221	0.223
sex - male:dayD7	-0.431	3.181	-0.135	0.892
sex - male:dayD14	-1.925	3.097	-0.622	0.535
sex - male:dayD21	-1.630	3.134	-0.520	0.604
age - young:sex - male:dayD3	-11.187	4.448	-2.515	0.013
age - young:sex - male:dayD7	-0.400	4.538	-0.088	0.930
age - young:sex - male:dayD14	2.989	4.448	0.672	0.502
age - young:sex - male:dayD21	-1.122	4.448	-0.252	0.801

Statistically significant differences for *Collagen 3* mRNA expression by diet, sex and age

Supplementary Table 47. Comparisons by diet for *Collagen 3* mRNA expression.

Diet	age	sex	day	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
HFD	young	female	D7	22.8	16.5	29.0	3.2	199.0	0.021
LFD	young	female	D7	12.3	6.1	18.6	3.2	199.0	

Supplementary Table 48. Comparisons by sex for *Collagen 3* Mrna expression.

sex	diet	age	day	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
female	HFD	young	D0	2.4	-2.9	7.7	2.7	199.0	<0.001
male	HFD	young	D0	24.5	18.8	30.2	2.9	199.0	
female	HFD	young	D3	9.9	4.1	15.6	2.9	199.0	<0.001
male	HFD	young	D3	24.7	18.4	30.9	3.2	199.0	
female	HFD	young	D7	22.8	16.5	29.0	3.2	199.0	<0.001
male	HFD	young	D7	52.1	46.3	57.8	2.9	199.0	
female	HFD	young	D14	9.0	3.2	14.7	2.9	199.0	<0.001
male	HFD	young	D14	42.5	36.8	48.3	2.9	199.0	
female	HFD	young	D21	3.6	-2.1	9.3	2.9	199.0	<0.001
male	HFD	young	D21	31.5	25.8	37.2	2.9	199.0	
female	LFD	young	D0	3.2	-2.1	8.5	2.7	199.0	<0.001
male	LFD	young	D0	26.6	20.8	32.3	2.9	199.0	
female	LFD	young	D3	7.4	1.6	13.1	2.9	199.0	<0.001
male	LFD	young	D3	21.8	16.5	27.2	2.7	199.0	
female	LFD	young	D7	12.3	6.1	18.6	3.2	199.0	<0.001
male	LFD	young	D7	53.5	47.8	59.3	2.9	199.0	
female	LFD	young	D14	7.8	2.1	13.6	2.9	199.0	<0.001
male	LFD	young	D14	38.3	32.0	44.6	3.2	199.0	
female	LFD	young	D21	5.7	-0.0	11.4	2.9	199.0	<0.001
male	LFD	young	D21	28.3	22.6	34.0	2.9	199.0	

Supplementary Table 49. Comparisons by age for *Collagen 3* mRNA expression.

age	diet	sex	day	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
old	HFD	female	D7	6.0	-1.0	13.0	3.6	199.0	<0.001
young	HFD	female	D7	22.8	16.5	29.0	3.2	199.0	
old	HFD	male	D0	1.9	-3.4	7.2	2.7	199.0	<0.001
young	HFD	male	D0	24.5	18.8	30.2	2.9	199.0	
old	HFD	male	D3	6.4	0.7	12.2	2.9	199.0	<0.001
young	HFD	male	D3	24.7	18.4	30.9	3.2	199.0	
old	HFD	male	D7	6.6	0.9	12.3	2.9	199.0	<0.001
young	HFD	male	D7	52.1	46.3	57.8	2.9	199.0	
old	HFD	male	D14	7.3	1.5	13.0	2.9	199.0	<0.001
young	HFD	male	D14	42.5	36.8	48.3	2.9	199.0	
old	HFD	male	D21	4.2	-2.1	10.5	3.2	199.0	<0.001
young	HFD	male	D21	31.5	25.8	37.2	2.9	199.0	
old	LFD	male	D0	1.0	-4.3	6.3	2.7	199.0	<0.001
young	LFD	male	D0	26.6	20.8	32.3	2.9	199.0	
old	LFD	male	D3	7.4	1.7	13.1	2.9	199.0	<0.001
young	LFD	male	D3	21.8	16.5	27.2	2.7	199.0	
old	LFD	male	D7	11.9	6.1	17.6	2.9	199.0	<0.001
young	LFD	male	D7	53.5	47.8	59.3	2.9	199.0	
old	LFD	male	D14	5.7	-0.0	11.4	2.9	199.0	<0.001
young	LFD	male	D14	38.3	32.0	44.6	3.2	199.0	
old	LFD	male	D21	3.4	-2.3	9.1	2.9	199.0	<0.001
young	LFD	male	D21	28.3	22.6	34.0	2.9	199.0	

Supplementary Table 50. Summary of coefficients of model for *Collagen 3* mRNA expression: age + sex + day + age:sex + age:day + sex:day + age:sex:day.

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	0.575	1.86	0.309	0.758
age - young	2.195	2.63	0.833	0.406
sex - male	0.880	2.63	0.334	0.739
dayD3	4.279	2.81	1.524	0.129
dayD7	4.287	2.88	1.486	0.139
dayD14	2.119	2.74	0.773	0.440
dayD21	1.766	2.74	0.644	0.520
age - young:sex - male	21.874	3.80	5.753	0.000
age - young:dayD3	1.558	3.92	0.397	0.692
age - young:dayD7	10.489	4.08	2.570	0.011
age - young:dayD14	3.514	3.88	0.906	0.366
age - young:dayD21	0.099	3.88	0.026	0.980
sex - male:dayD3	1.199	3.92	0.305	0.760
sex - male:dayD7	3.485	3.98	0.876	0.382
sex - male:dayD14	2.920	3.88	0.753	0.452
sex - male:dayD21	0.557	3.92	0.142	0.887
age - young:sex - male:dayD3	-9.533	5.57	-1.712	0.088
age - young:sex - male:dayD7	9.017	5.68	1.587	0.114
age - young:sex - male:dayD14	6.525	5.57	1.172	0.243
age - young:sex - male:dayD21	1.953	5.57	0.351	0.726

Statistically significant differences for hydroxyproline content by diet and age

Supplementary Table 51. Summary of coefficients of model for hydroxyproline content: age + sex + diet + day + age:diet + age:day + diet:day + age:diet:day.

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	3.967	0.570	6.963	0.000
age- young	1.031	0.806	1.279	0.205
diet- LFD	0.577	0.806	0.716	0.476
dayD14	-0.655	0.834	-0.785	0.435
dayD21	-0.268	0.987	-0.271	0.787
age- young:diet- LFD	-1.602	1.160	-1.382	0.171
age- young:dayD14	-0.440	1.160	-0.380	0.705
age -young:dayD21	-2.563	1.274	-2.012	0.048
diet -LFD:dayD14	1.030	1.160	0.888	0.377
diet- LFD:dayD21	-1.117	1.292	-0.864	0.390
age- young:dietLFD:dayD14	-0.076	1.640	-0.046	0.963
age- young:dietLFD:dayD21	3.607	1.736	2.078	0.041

Statistically significant differences for fibrosis by diet and age

Supplementary Table 52. Comparisons by age for fibrosis.

age	diet	day	lsmean	lower.CL	upper.CL	SE	df	p.value
old	LFD	D14	18.3	12.7	23.9	2.7	16.0	0.028
young	LFD	D14	27.4	21.8	33.0	2.7	16.0	
old	LFD	D21	13.8	8.1	19.4	2.7	16.0	<0.001
young	LFD	D21	29.2	23.6	34.9	2.7	16.0	

Supplementary Table 53. Summary of coefficients of model for fibrosis: age * diet * day.

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	21.54	2.66	8.111	0.000
age - young	7.36	3.76	1.961	0.068
diet - LFD	-3.23	3.76	-0.860	0.402
dayD21	-2.19	3.76	-0.583	0.568
age - young:diet - LFD	1.73	5.31	0.326	0.749
age - young:dayD21	-5.10	5.31	-0.960	0.351
diet - LFD:dayD21	-2.36	5.31	-0.444	0.663
age - young:diet - LFD:dayD21	11.49	7.51	1.529	0.146



Foxn1 and Mmp-9 expression in intact skin and during excisional wound repair in young, adult, and old C57Bl/6 mice

Marta M. Kopcewicz, MSc¹; Anna Kur-Piotrowska, MSc¹; Joanna Bukowska, PhD¹;
Jeffrey M. Gimble, MD, PhD^{2,3}; Barbara Gawronska-Kozak, PhD¹

1. Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, Olsztyn, Poland,

2. LaCell LLC, New Orleans, Louisiana, USA, and

3. Departments of Medicine, Structural and Cellular Biology, and Surgery and Center for Stem Cell Research and Regenerative Medicine, Tulane University School of Medicine, New Orleans, Louisiana, USA

Reprint requests:

Barbara Gawronska-Kozak, Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, ul. Tuwima 10 10-748, Olsztyn, Poland. Tel: (4889) 5234634; Fax: (4889) 5240124; Email: b.kozak@pan.olsztyn.pl

Manuscript received: June 23, 2016

Revised: December 21, 2016

Accepted in final form: January 31, 2017

DOI:10.1111/wrr.12524

ABSTRACT

The transcription factor Foxn1 is essential for skin development. Our previous studies performed on young C57BL/6J mice model showed that Foxn1 acts as a regulator of the skin wound healing process. The present study extended our initial research regarding the expression and potential role of Foxn1 in the intact and wounded skin as a function of animal age and stage of the wound healing process. We analyzed Foxn1 and Mmp-9 expression in the intact and postinjured skin of young, adult, and old C57BL/6J and transgenic Foxn1::Egfp mice. The similar levels of epidermal *Foxn1* mRNA expression were detected in young and adult C57BL/6J mice and higher levels in old animals. Postinjured skin tissues displayed a gradual decrease of *Foxn1* mRNA expression at Days 1, 5, and 7 after injury. Foxn1-eGFP positive cells were abundant at wound margin and in re-epithelialized epidermis at postwounded Days 1, 5, and 7 and colocalized with E-cadherin and Mmp-9. Postwounded skin at Days 14–36 displayed Foxn1-eGFP cells in the epidermis and in the dermal part of the skin (papillary dermis). A subset of Foxn1-eGFP positive cells in the papillary dermis expressed the myofibroblast marker α SMA. Flow cytometric analysis of cells isolated from postwounded (Day 7) skin tissues showed a significant increase in the percentage of Foxn1-eGFP positive cells with phenotype of double positivity for E-cadherin/N-cadherin (epithelial/mesenchymal markers). Collectively, these data identify the transcription factor Foxn1 as a potential key epidermal regulator modifying both epidermal and dermal healing processes after cutaneous wounding.

Cutaneous wound healing in mammals is a highly coordinated physiological process which restores tissue integrity. The process consists of three overlapping stages: inflammation, new tissue formation, and remodeling.¹ Immediately after injury, the components of the coagulation pathways and inflammatory response act to prevent blood loss, remove debris, and prevent infection. In the second stage of wound repair new tissue formation occurs, whereby keratinocytes, dermal fibroblasts, and other cells proliferate and migrate to fill the wound gap and re-establish the skin barrier. During this phase, extracellular matrix is synthesized by interacting fibroblasts and myofibroblasts. In the third and final stage of wound repair, remodeling occurs with reorganization of the immature extracellular matrix, apoptosis of a variety of cell types at the wound site, and the formation of scar tissue which never achieves the strength and functionality of the original uninjured skin.^{2,3}

In contrast, the wound healing process in mammals can follow a different pathway of resolution that restores post-wounded skin tissues through a process of regeneration/

scar-free healing. More than 35 years ago, Rowlett reported the seminal finding that mammalian fetuses re-establish the integrity of postwounded skin through process of regeneration that does not form a scar.⁴ Since then, scar-less wound healing has been reported in the fetuses of mice, rats, sheep, pigs, monkeys, and humans.^{5,6} Mammalian fetuses display scar-free healing only during the first two trimesters of gestational development. By the third trimester, cutaneous wounds heal with a scar, the healing pattern characteristic for adult mammals. Comprehensive studies have recognized several factors and pathways participating in regenerative and reparative skin wound healing processes. However, understanding of the molecular mechanisms that redirect the healing pathway from scar-forming to scar-free remains to be determined. Transcription factors, such as PPARs, Smads, and Homeobox, synchronize the events of the skin wound healing process controlling the expression of effector genes including cytokines, growth factors, and proteolytic enzymes (i.e., matrix metalloproteinases [Mmps]).^{7,8} However, none of the transcription factors involved in the skin wound healing

process have yet to provide a satisfactory explanation accounting for the different pathways of skin wound healing resolution over the course of an individual's lifetime.

Our attention has been focused on transcription factor Foxn1 which belongs to the forkhead gene family that comprises a diverse group of winged-helix transcription factors. The expression of Foxn1 is limited to epithelial cells of skin and thymus.⁹ In the skin, Foxn1 regulates the balance between keratinocytes growth and differentiation in the epidermis and participates in normal hair follicle development. In the interfollicular epidermis, Foxn1 expression is restricted mainly to the first suprabasal layer, which contains cells in the early stages of terminal differentiation.⁹ Remarkably the analysis of postwounded skin tissues of Foxn1 deficient (nude) adult mice revealed their ability to undergo a scar-free skin wound healing process in a manner similar to mammalian fetuses.^{10,11}

A characteristic of regenerative healing common to both mammalian fetuses and nude mice is the deficiency (nude mice) or inactivity (fetuses) of the transcription factor Foxn1. Moreover, our recent experiments performed on young (28- to 35-day old) mice showed that Foxn1 acts as regulator of the skin wound healing process through engagement in re-epithelization and in the epithelial-mesenchymal transition (EMT) process during the early stage (Days 1–7) of skin wound healing.¹²

The present study performed on young, adult and old mice focused on ¹ determining Foxn1 expression in intact skin across the lifespan; ² estimating changes in Foxn1 expression and localization during skin wound healing process with correlation to animal age; and ³ examining concomitant changes in Mmp-9 expression as a part of the tissue response to injury.

MATERIALS AND METHODS

Animals

The study was performed on young (21–28 days), adult (2–3 months and 9 months), and old (16–18 months) C57BL/6J (B6) wild type and Foxn1::Egfp transgenic mice. In Foxn1::Egfp mice enhanced green fluorescent protein transgene is driven by *Foxn1* regulatory sequence.^{13,14} Transgenic mice were used for flow cytometry and immunohisto- and immunofluorescent analyses to determine the percent of Foxn1-eGFP positive cells and the localization of Foxn1 in skin tissues. To eliminate the possible effect of genetic modification caused by eGFP transgene insertion in *Foxn1* promoter region (Foxn1::Egfp mice), wild type B6 mice were used for qRT-PCR analysis.¹² All mice were obtained from colonies established at the animal facility of the Institute of Animal Reproduction and Food Research of Polish Academy of Sciences. B6 mice were originally purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Four Foxn1::Egfp transgenic males were a kind gift from Professor Thomas Boehm (Max-Planck Institute of Immunobiology and Epigenetics, Germany). The Foxn1::Egfp hemizygotes were generated by breeding Foxn1::Egfp males with B6 females. Foxn1::Egfp genotype was confirmed by PCR (forward primer: GTC CCT AAT CCG ATG GCT AGC TC; reverse primer: GTG CAG ATG AAC TTC AGG GTC) (Genomed, Poland).

DNA for genotyping assay was extracted from tail-clipped tissues using the proteinase K (Sigma-Aldrich, MO) and standard phenol-chloroform-isoamyl alcohol DNA (Sigma-Aldrich, MO) isolation protocol. PCR reactions were set up with 2 ng of genomic DNA [10 ng/ μ L].

All experimental animal procedures were approved by the Ethics Committee of the University of Warmia and Mazury, No. 28/2012.

Epidermis and keratinocytes isolation from uninjured skin tissues for qRT-PCR and flow cytometry analyses

Young, adult, and old ($n = 6$ per age group) B6 mice were used for qRT-PCR analysis. New born ($n = 11$), adult ($n = 10$), and old ($n = 6$) Foxn1::Egfp transgenic mice were applied for flow cytometry assay. Mice were sacrificed using CO₂ asphyxiation and shaved with electric shaver. Using forceps and scissors a full length dorsal midline incision from the head to the tail was made. Starting from the dorsal incision, two circumferential incisions (one just behind the forepaws and the other just before the hind paws) were created. Skin was collected in PBS with 1% penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, MO). Fat and blood vessels covering the dermis were scraped away until the dermis was clearly and uniformly exposed. Skin tissues were incubated overnight in 6 U/mL dispase (Life Technologies, CA) in Hanks' balanced salt solution (HBSS; Sigma-Aldrich, MO) at 4 °C. The following day, using scalpel and forceps, the epidermis was separated from the dermis. For qRT-PCR analysis, the epidermis from B6 mice was immediately stored in TRI reagent (Sigma-Aldrich, MO) in –80 °C for subsequent RNA isolation. For flow cytometry assay, the epidermis was digested in 0.05% trypsin (Sigma-Aldrich, MO) for 10 minutes. The trypsin was neutralized with culture medium containing DMEM/F12 (Life Technologies, CA), 15% fetal bovine serum (FBS; Life Technologies, CA), and 1% penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, MO). The resulting cell suspensions were filtered through a series of cell strainers (100, 70, and 40 μ m; BD Biosciences, NJ) and then centrifuged at 1,300 rpm for 9 minutes. Pelleted cells were resuspended in 1 mL of PBS (Gibco, MA) with 0.5% FBS. The number and viability of isolated keratinocytes was determined with a Countess (Invitrogen, CA).

Wound model

Young, adult, and old B6 and Foxn1::Egfp mice were used for skin wound healing experiment (Figure 1; The scheme of the experimental design). The day before wounding mice were anesthetized with isoflurane and shaved in the dorsal area. The following day, mice were anesthetized with isoflurane and four full-thickness excisional wounds were created on the back of individual mice using a sterile 4 mm biopsy punch (Miltex, PA). The surgical procedures were designed to minimize the suffering of the experimental animals. After wounding mice were placed in a warmed cage until recovery before being transferred to individual cages where they were housed separately for the duration of the study. Experimental animals were monitored daily for any signs of infection. Mice were sacrificed at Days 1, 5, 7, 14, 21, and 36 after wounding. 8 mm diameter biopsy punches were used to collect postwounded skin area.

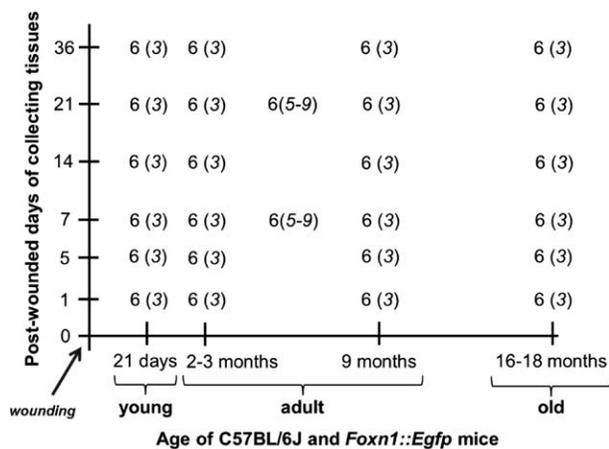


Figure 1. The scheme of experimental design. Young (21-day old), adult (2- to 3- and 9-month old), and old (16- to 18-month old) B6 and Foxn1::Egfp mice were injured at Day 0. Skin tissues were collected at Day 0 (uninjured control) and postwounded Days: 1, 5, 7, 14, 21, and 36; $n=6$ for B6, $n=3$ for Foxn1::Egfp per time point. At postwounded Days: 7 and 21 skin tissues collected from Foxn1::Egfp ($n=5-9$) and control B6 ($n=6$) adult mice were used for flow cytometry analyses.

Tissue samples ($n=6$ per time point) for total RNA isolation and gene expression analysis were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further use. Samples for histology were fixed in 10% formalin (Sigma-Aldrich, MO) ($n=3-6$ per time point) or 4% paraformaldehyde (PFA; Sigma-Aldrich, MO; $n=3-6$ per time point). Adult Foxn1::Egfp mice at postwounded Days 7 and 21 ($n=5-9$ per group) and B6 ($n=6$; control for eGFP specificity signal) were used for flow cytometry assay. Cells were isolated from postwounded total skin samples as previously described.¹²

RNA isolation and quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from skin samples and enzymatically separated epidermis using TRI Reagent (Sigma-Aldrich, MO) according to the manufacturer's instructions. Quantity and quality of RNA was checked on NanoDrop 1000 (ThermoFisher, MA) and agarose gel electrophoresis. cDNA was synthesized from 500 ng of total RNA using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied Biosystem, MA). To measure the levels of *Foxn1*, *Mmp-9*, and *Hprt1* mRNA expression, Single Tube TaqMan® Gene Expression Assays (Life Technologies, CA) were used. Amplification was performed using 7900HT Fast Real-Time PCR System under conditions: initial denaturation for 10 minutes at 95°C , followed by 40 cycles of 15 seconds at 95°C and 1 minute at 60°C . Each run included standard curve based on aliquots of pooled skin RNA. All samples were analyzed in duplicates. After literature review¹⁵ and evaluation of different housekeeping genes: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*), TATA-binding protein (*Tbp*), and hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1 (*Hprt1*) for their expression stability, *Hprt1* was chosen as it was the

most stable gene during cutaneous wound healing. mRNA expression levels were normalized to the reference gene *Hprt1* and multiplied by 10.

Immunofluorescence and immunohistochemistry

Skin tissue samples from Foxn1::Egfp mice were fixed for 2 hours in 4% PFA (Sigma-Aldrich, MO), washed twice in PB buffer (pH = 7.4, 0.1 M) and -incubated in PB overnight at $+4^{\circ}\text{C}$. On the next day, tissue samples were transferred into 18% sucrose in PB with 0.01% sodium azide (Sigma-Aldrich, MO) and stored at $+4^{\circ}\text{C}$ until cryosectioned. Immunofluorescence and immunohistochemistry was performed on $8\ \mu\text{m}$ cryostat sections. For immunofluorescence, the following primary antibodies were used: α SMA (rabbit anti-mouse, ThermoFisher, MA) E-cadherin (rat anti-mouse, Invitrogen, MA), Mmp-9 (rabbit anti-mouse, Millipore, MA). The following secondary antibodies were used: Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG (Life Technologies, CA) and Alexa Fluor 594 donkey anti-rat IgG (Life Technologies, CA). Nuclei were counterstained with ProLong® Gold Antifade Mountant with DAPI (Life Technologies, CA). Immunohistochemical staining for the presence of eGFP was performed with anti-eGFP polyclonal antibodies (Abcam, Cambridge, UK). Antibody binding was detected with the ABC complex (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, Inc., CA). In control sections primary antibodies were substituted with non-specific-immunoglobulin G (IgG). Peroxidase activity was revealed using 3,3'-diaminobenzidine (Sigma-Aldrich, MO) as a substrate. Slides counterstained with hematoxylin were visualized using Olympus microscope (BX43), photographed with Olympus digital camera (XC50) and analyzed with Olympus CellSens Software). Confocal images were scanned and digitalized using an F10i-LIV Laser Scanning Microscope integrated with FLUOVIEW Software (Olympus), with a 60x objective lens. The sequential scans were acquired with Z spacing of $0.5\ \mu\text{m}$ and $1,024 \times 1,024$ pixel size at room temperature.

Flow cytometry analysis

Keratinocytes from Foxn1::Egfp mice were analyzed for expression of E-cadherin and N-cadherin using flow cytometry based on methods described previously by Gawronska-Kozak et al.¹² Briefly, freshly isolated cells were suspended at a concentration of $0.5 - 1.0 \times 10^6$ cells in warm PBS and incubated for 30 minutes with the following antibodies: CD324 (E-cadherin) -Alexa Fluor 647 (BioLegend, CA) and CD325 (N-cadherin) - PerCP-Cy 5.5 (BD Biosciences, NJ). Isotype-matched immunoglobulins, used in same concentrations as that of the primary antibody, served as controls for non-specific immunofluorescence. After incubation cells were analyzed using BD LSRFortessa Cell Analyser flow cytometer and BD FACS-Diva™ v6.2 software.

Statistical analysis

Quantitative RT-PCR and flow cytometry data were analyzed using GraphPad Prism, version 6.0 (GraphPad Software Inc, CA). The means and SEM were calculated for each data set. One-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's multiple comparisons tests and Student's

t test were used for analyzing differences between experimental groups as indicated in the figure legends. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Age-related changes in Foxn1 and Mmp-9 expression in uninjured skin

Analysis of *Foxn1* mRNA expression in skin tissues was performed on enzymatically isolated epidermis collected from young, adult, and old B6 mice (Figure 2A). The similar levels of epidermal Foxn1 expression was detected in young and adult animals and higher levels in old mice (Figure 2A). To explore the localization of Foxn1-eGFP positivity, fluorescent and immunohistochemical detection assays were performed on uninjured skin sections from Foxn1::Egfp mice (Figure 2B and C). Foxn1-eGFP signal localized to the interfollicular epidermis and to hair follicles (Figure 2B). The fluorescent signal of eGFP specificity was confirmed using anti-eGFP immunohistochemical detection assays showing brown reactivity deposits localized to the epidermis and hair follicles (Figure 2C).

Flow cytometric analysis was performed to determine the percentage and phenotype of Foxn1 expressing cells in uninjured skin tissues (Figure 2D–F, Supporting Information Figure 1). Foxn1::Egfp new born, adult, and old mice were used for epidermis collection followed by keratinocyte isolation and subsequent flow cytometric analyses (Figure 2 D–F). The highest percentage of Foxn1-eGFP positive cells was detected in the epidermis of new born mice ($14.8\% \pm 0.6$; Figure 2D and E). Adult and old animals showed $7.2\% \pm 1.5$ and $9.3\% \pm 1.0$ of Foxn1-eGFP positive cells, respectively (Figure 2D and E).

Within the Foxn1-eGFP positive cell population, phenotypic characterization revealed the highest percentage category as epithelial marker E-cadherin¹⁶ positive cells (Figure 2F, Supporting Information Figure 1). There were no statistically significant differences in the E-cadherin positive cell content between new born ($53.65\% \pm 2.3$), adult ($54.37\% \pm 2.3$), and old ($55.79\% \pm 1.5$) animals (Figure 2F). In contrast, the mesenchymal marker N-cadherin¹⁶ positive cells comprised $0.68\% \pm 0.2$, $0.34\% \pm 0.1$, and $0.4\% \pm 0.1$ for new born, adult, and old mice, respectively. Interestingly, within the Foxn1-eGFP positive cell population, double positive E-cadherin/N-cadherin cells accounted for $23.75\% \pm 1.8$ in new born mice which is more than four and two times more relative to adult and old animal groups, respectively; adult animals showed $5.49\% \pm 1.0$ of E-cadherin/N-cadherin positivity whereas $10.81\% \pm 3.1$ was displayed by old animals (Figure 2F, Supporting Information Figure 1).

Since our published data¹² suggested a possible link between Foxn1 and Mmp-9, we next investigated the expression of *Mmp-9* (Figure 3A). Analysis of enzymatically separated epidermis showed the highest levels of *Mmp-9* expression in the young and old animals (Figure 3A).

Immunofluorescent analysis of uninjured skin tissues from Foxn1-eGFP animals showed Mmp-9 expression in all layers of epidermis and in hair follicles (Figure 3B–D). Colocalization of Foxn1-eGFP and Mmp-9 signals was

detected in the suprabasal but not the basal (eGFP-free) layer of epidermis (Figure 3B–D).

Foxn1 expression in postwounded skin tissues in relation to animal age

Generally, levels of *Foxn1* expression change during the course of the skin wound healing process regardless of the animal's age (compare Figure 4A–C). qRT-PCR analysis demonstrated a gradual decrease of *Foxn1* expression from Day 0 (uninjured skin samples) through Days 1, 5 and 7 after injury, followed by its increase at Day 14 and 21 after injury (Figure 4B and C). This pattern of *Foxn1* expression was characteristic for postwounded skin samples of adult (Figure 4B), and old (Figure 4C) mice. Young mice displayed a slightly different profile of *Foxn1* expression (Figure 4A). After the initial decrease at Day 1, a robust increase in *Foxn1* expression was detected at postwounded Days 5, 7, and 14 (Figure 4A). The lowest levels of *Foxn1* expression in postwounded skin samples from young animals were observed at postwounded Days 21 and 36 (Figure 4A).

Flow cytometric analysis of cells isolated from postwounded (Days 7 and 21) skin tissues of adult Foxn1::Egfp mice showed a significant increase in the percentage of eGFP positive cells at postwounded Day 21 (Figure 4D and F; compare: control (uninjured skin; $3.5\% \pm 3.5$), postwounded Day 7 ($2.3\% \pm 0.6$) and postwounded Day 21 ($6.6\% \pm 1.0$)).

These data are in agreement with qRT-PCR analysis for adult and old mice showing low (Day 7) and then higher (Day 21) *Foxn1* mRNA expression (see Figure 4B and C). The majority of Foxn1-eGFP cells were E-cadherin positive comprising $57.59\% \pm 6.0$ for uninjured controls, $42.52\% \pm 3.8$ for Day 7 and $65.5\% \pm 4.6$ for Day 21 after injury (Figure 4E, Supporting Information Figure 2). However, the most substantial changes in phenotype of Foxn1-eGFP cells were observed for E-cadherin/N-cadherin double positive cells. Cells isolated at postwounded Day 7 showed an increase in E-cadherin/N-cadherin positive cells ($13.88\% \pm 3.9$) vs. uninjured (3.27 ± 0.9). Cells isolated at postwounded Day 21 displayed $4.55\% \pm 1.7$ of E-cadherin/N-cadherin positive cells (Figure 4E).

Changes in Foxn1 expression during the early (Days 1–7) stage of skin wound healing

Next, we examined Foxn1 localization through eGFP fluorescence and eGFP immunohistological detection in postwounded skin tissues of Foxn1::Egfp mice (Figure 5). At postinjured Day 5, the full thickness wound margins and the fully re-epithelialized epidermis were characterized by evident Foxn1-eGFP expression (Figure 5A and B). Foxn1-eGFP signal was present through all layers of the neo-epidermis except the basal layer (Figure 5C–F). E-cadherin staining was detected throughout the entire epidermis and colocalized with Foxn1-eGFP positive epidermal cells (Figure 5C–F). Interestingly, skin tissues of adult and old animals at postwounded Day 7 showed Foxn1-eGFP positivity not only in neo-epidermis but in the dermal part adjacent to the epidermis (Figure 5G and H).

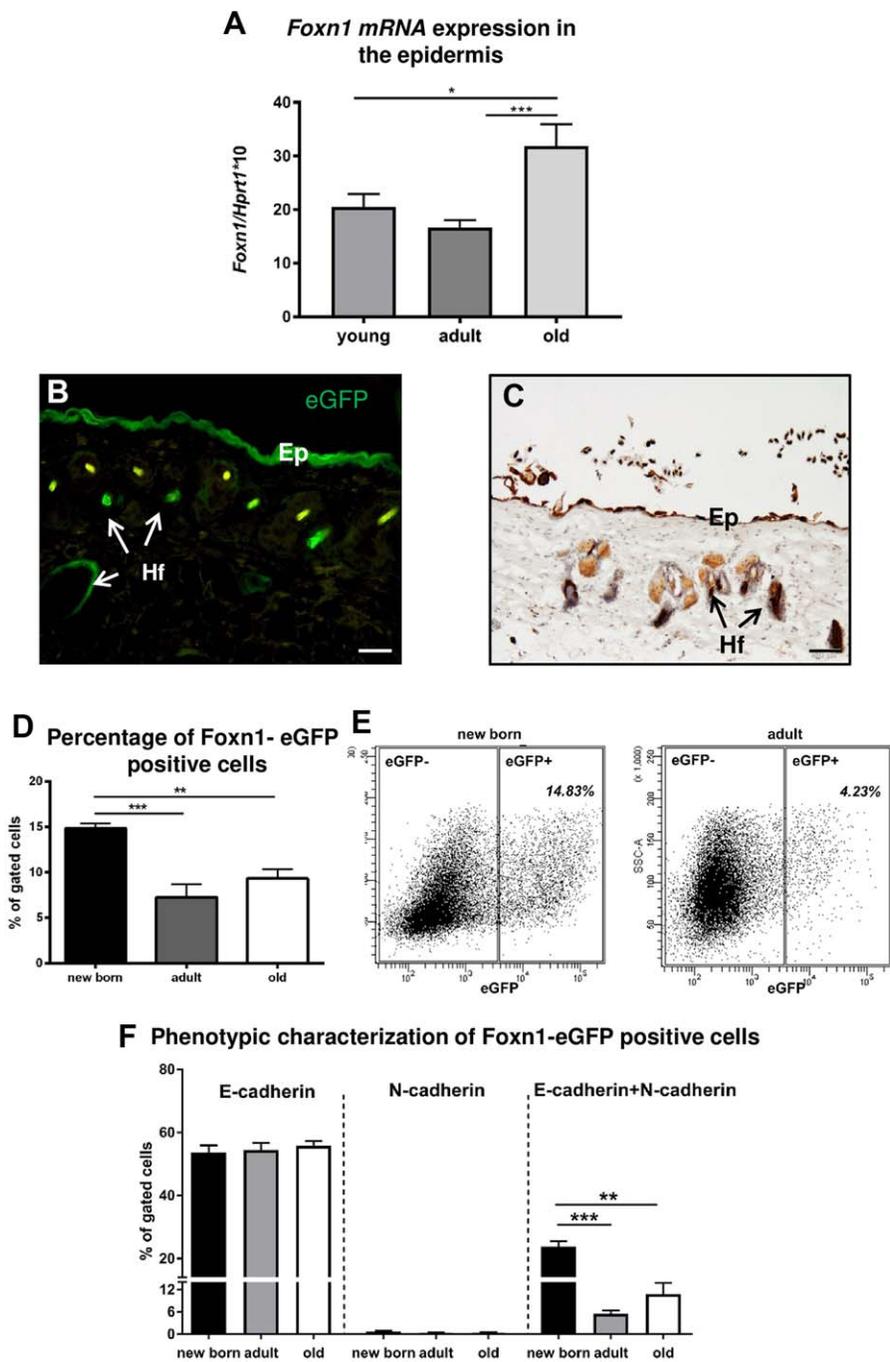


Figure 2. Analysis of Foxn1 expression in uninjured skin tissues from B6 (A) and Foxn1::Egfp (B–F) mice in relation to animal age. qRT-PCR analysis of *Foxn1* mRNA expression in isolated epidermis (A) of young, adult, and old mice. Immunofluorescent (B) and immunohistochemical (C) detection of Foxn1-eGFP signal in skin tissues from adult Foxn1::Egfp mice; scale bar (B) 50 μ m, (C) 200 μ m. Flow cytometric analysis of keratinocytes isolated from the skin of new born, adult, and old Foxn1::Egfp mice (D–F): percentage of Foxn1-eGFP positive keratinocytes (D, E), percentage of E-cadherin, N-cadherin, and E-cadherin/N-cadherin positive keratinocytes within eGFP+ population (F). Values are the mean \pm SEM; $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***). [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Changes in Foxn1 expression during the late (Days 14–36) stage of skin wound healing

At postwounded Days 14, 21, and 36, a thin epidermis covered the wound area with detectable Foxn1-eGFP expression (Figure 6). The dermal part of the postwounded skin formed two layers: an upper, papillary dermis and a

lower, reticular dermis which were clearly distinguishable at postwounded Day 21 (Figure 6A–C). Counterstaining with DAPI showed that the papillary layer consisted of cells with nuclei oriented perpendicular to the epidermis (Figure 6C and D). The papillary dermis was formed by densely packed cells, some of which showed Foxn1-eGFP positivity (Figure 6B–D). Immunofluorescent detection

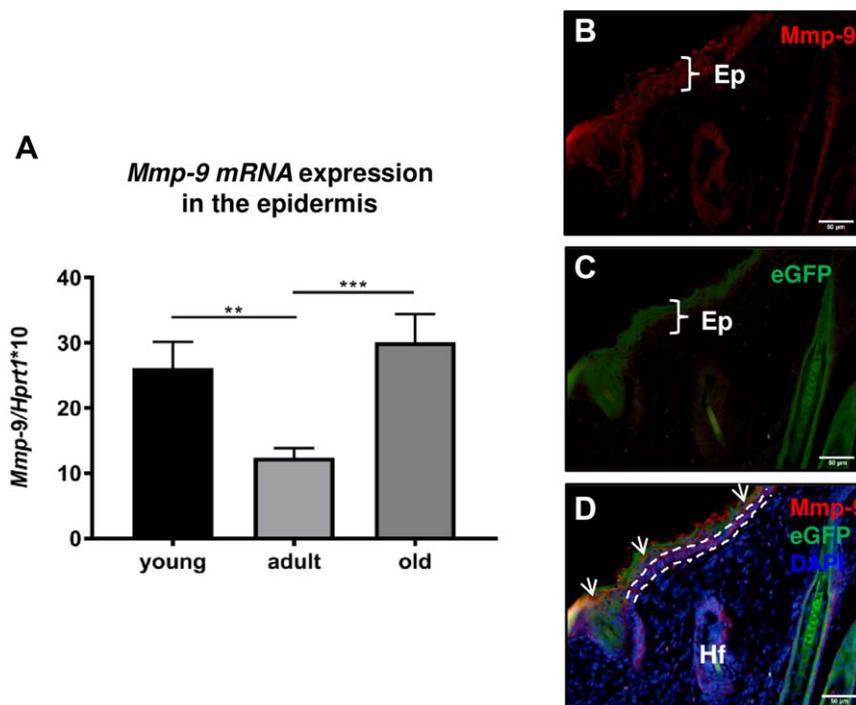


Figure 3. *Mmp-9* mRNA expression in isolated epidermis (A) and *Mmp-9* and Foxn1 colocalization (B–D) in uninjured skin from B6 (A) and Foxn1::Egfp (B–D) mice. (A) values are the mean \pm SEM; $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***)). Fluorescent colocalization (D) of Foxn1-eGFP (green); (C) and *Mmp-9* (red); (B) in epidermal part of the skin of Foxn1::Egfp mice. Dashed lines delineate epidermal basal layer (D), white arrows indicate colocalization (orange) of Foxn1-eGFP (green) and *Mmp-9* (red) positivity. Scale bar 50 μ m. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

assays showed colocalization of α SMA with some Foxn1-eGFP positive cells present in the papillary dermis (Figure 6B and C). Few Foxn1-eGFP cells in the papillary dermis displayed E-cadherin positivity (Figure 6D). Postwounded skin tissues at Day 36 displayed thin layers of Foxn1-eGFP positive epidermis of equal thickness along the entire length of the healed wound (Figure 6E). However, the newly formed epidermis covering the wound was thinner than the epidermis of uninjured area (Figure 6E).

Changes in *Mmp-9* expression in postwounded skin tissues

Mmp-9 plays a key role during skin wound healing process, participating in migratory and remodeling events.¹⁷ The analysis of *Mmp-9* in postwounded skin tissues revealed changes in the mRNA expression levels during the course of the skin wound healing process. We observed a surge in *Mmp-9* expression during postwounded Days 1–5 followed by a gradual decrease between Days 5 and 14 (Figure 7A–C). While an increase in *Mmp-9* expression levels was detected at postwounded Days 21 and 36, this did not achieve statistical significance. Nevertheless, this pattern of *Mmp-9* expression was observed in all groups, regardless of animal age (Figure 7A–C). Immunofluorescent detection of *Mmp-9* in postwounded skin samples from Foxn1::Egfp mice showed its localization to the epidermis and to cells dispersed through the dermis (Figure 7D–I). *Mmp-9* colocalized with Foxn1-eGFP in the epidermis except in the basal layer, which showed positivity for *Mmp-9* but was negative for Foxn1-eGFP expression (Figure 7D–E and G). However, the leading epithelial tongue at postwounded Days 2–4 showed

colocalization of Foxn1-eGFP and *Mmp-9* through its entire extent and thickness (Figure 7F). Postwounded tissues at Days 14–36 showed a thin layer of epidermis where some *Mmp-9* positive cells colocalized with Foxn1-eGFP bearing cells (Figure 7H and I). Papillary dermis at postwounded Day 21 displayed Foxn1-eGFP positive cells, some with colocalized *Mmp-9* expression (Figure 7H). Interestingly, postwounded skin tissues at Day 36, collected from old animals did not show two layers of dermis as observed for adult animals (compare Figure 6D and E). Instead, uniformly dispersed Foxn1-eGFP negative cells with few *Mmp-9* positive cells repopulated the wound bed (Figure 7I).

DISCUSSION

The present study examined the spatial and temporal expression of Foxn1 and *Mmp-9* in the intact and wounded skin as a function of animal age and stages of the wound healing. Our study revealed that *Foxn1* mRNA expression levels were modulated in young, adult, and old mice by the skin wound healing process. Foxn1-eGFP positive cells colocalized with E-cadherin and *Mmp-9* during the first stage of wound healing process implying involvement of Foxn1 in the re-epithelialization process. The presence of Foxn1-eGFP and E-cadherin/N-cadherin (epithelial/mesenchymal markers) positive cells together with colocalization of Foxn1-eGFP and myofibroblast marker α SMA cells in papillary dermis at remodeling phase identified the transcription factor Foxn1 as a potential regulator of the skin wound healing process. The present data support and expand our earlier studies performed on young (28- to 35-day old) mice at the early stages (Days 1–7) of skin

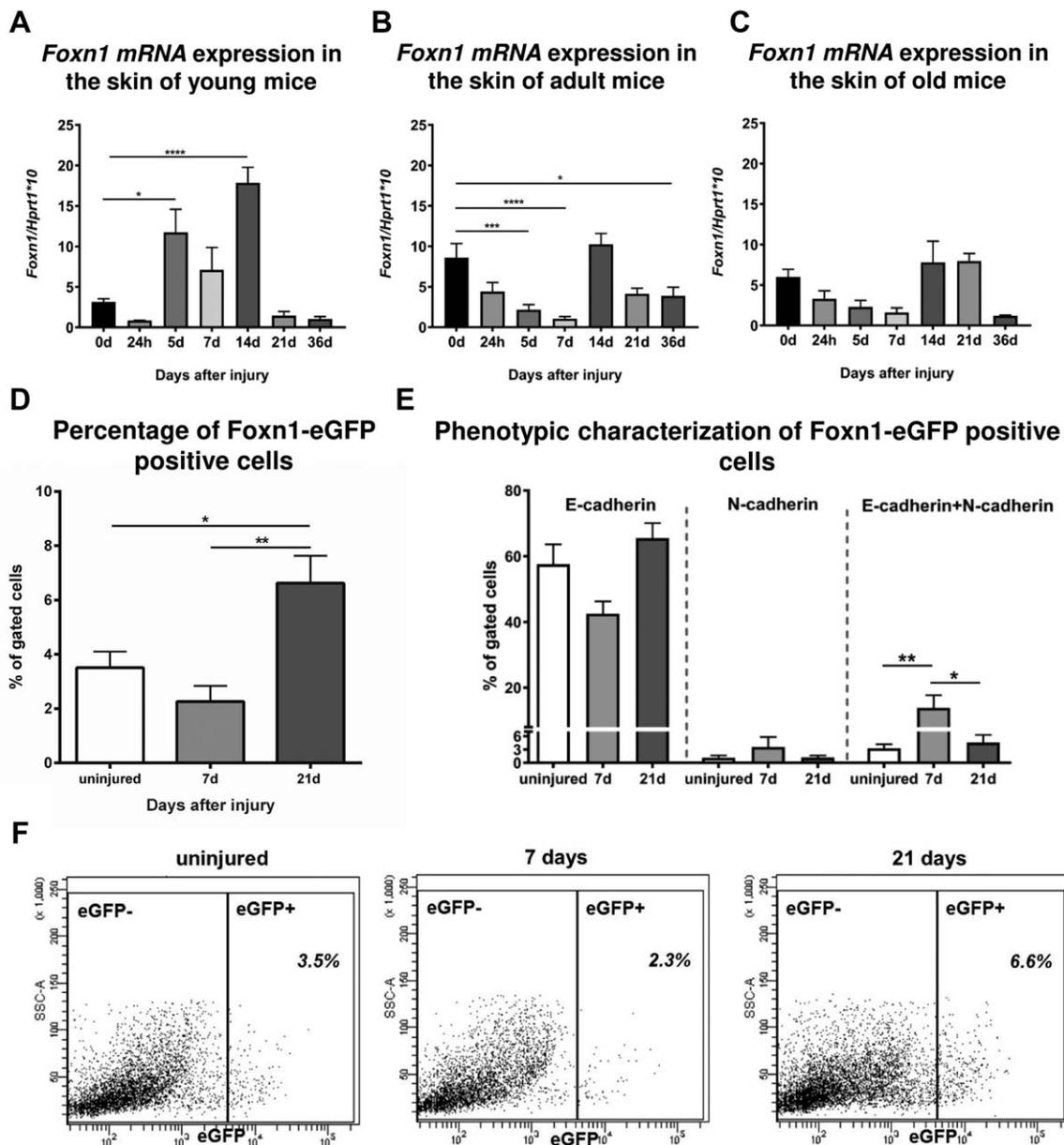


Figure 4. qRT-PCR *Foxn1* mRNA expression (A–C) and flow cytometry characterization of Foxn1-eGFP positive cells (D–F) in uninjured and postinjured skin tissues. Skin samples collected from: (A) young, (B) adult, and (C) old B6 mice. Values are the mean \pm SEM; $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***) ; $p < 0.0001$ (****); p value calculated from the differences between control (0d/uninjured) and postwounded (Days 1, 5, 7, 14, 21, 36) tissues. Flow cytometry analysis of cells isolated from uninjured ($n = 6$) and postwounded skin tissues of adult Foxn1::Egfp mice at postwounded Day 7th and 21th ($n = 5$ –9 per group). Percentage of Foxn1-eGFP positive cells (D and F). Percentage of E-cadherin, N-cadherin, and E-cadherin/N-cadherin positive cells within Foxn1-eGFP+ populations. Data represents mean \pm SEM; $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**).

wound healing showing Foxn1 engagement in re-epithelialization and in the EMT processes.¹²

Foxn1 expression in uninjured skin of young, adult, and old mice

Foxn1 expression is restricted to epithelial cells, both in the skin and in the thymus.^{9,14,18} In the thymus, a

comprehensive analysis showed that the progressive decline of Foxn1 expression is associated with age-related degeneration of the thymus.^{19,20} Our analysis of skin tissues confirmed Foxn1 localization to epithelial cells, particularly the suprabasal layer of epidermis, and to hair follicles, regardless of the animal's age.²¹ However, in contrast to the thymus, measurements of *Foxn1* mRNA

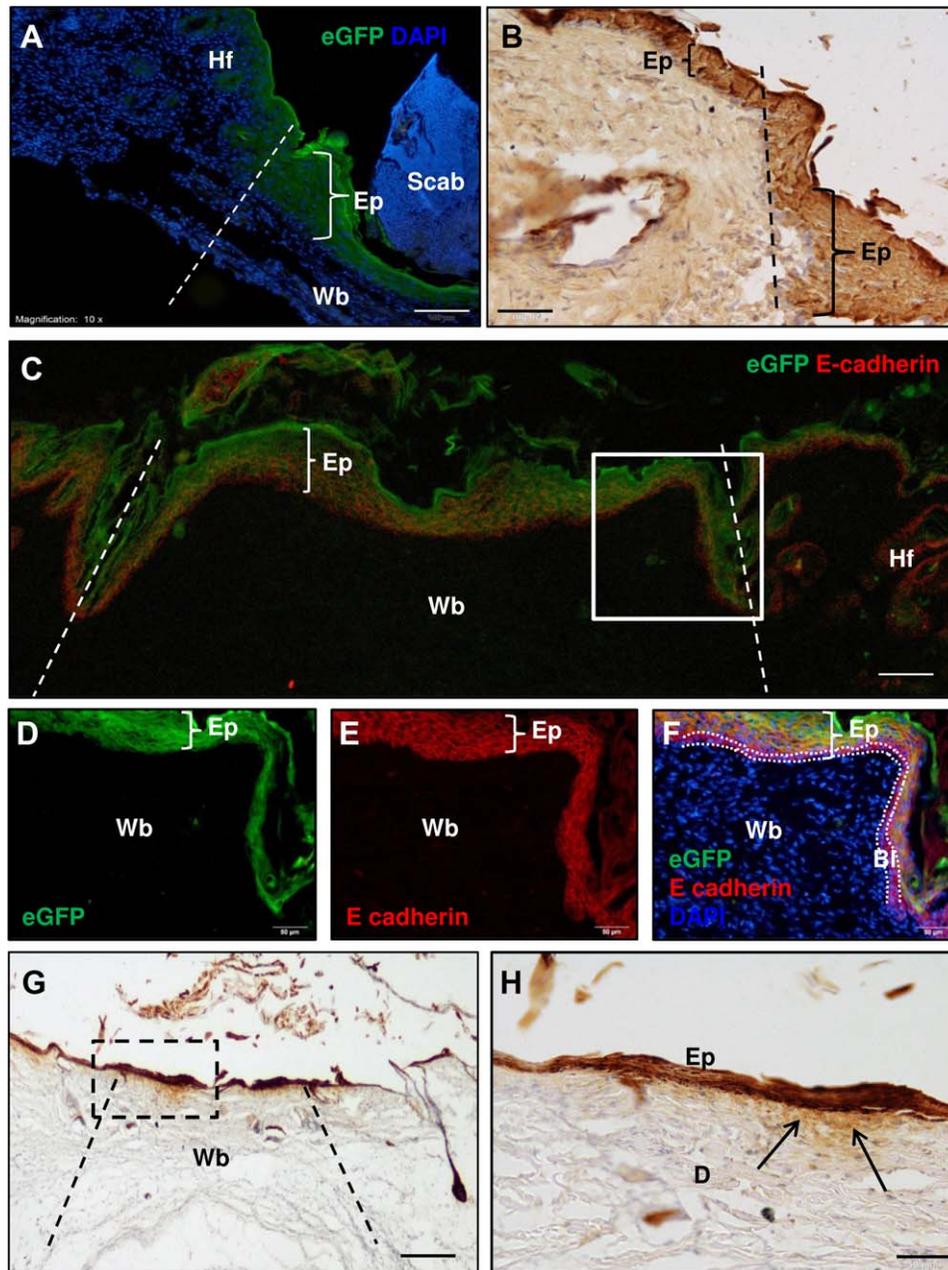


Figure 5. Immunofluorescent (A, C–F) and immunohistochemical (B, G–H), characteristics of skin tissues from Foxn1::Egfp mice at postwounded Days 1–7. Skin tissues collected at Day 5 (A, B) and Day 7 (C–H) after injury from young (C–F), adult (A–B), and old (G–H) animals. Figures (D–F) are a magnification of a box marked at Figure (C); Figure (H) is a magnification of a box marked at Figure (G) Hf - hair follicles, Ep - epidermis, Wb - wound bed, D - dermis, dashed lines indicate wound margins (A, B, C, and G), dotted lines delineate epidermal basal layer (F), black arrows indicate positive immunohistochemical reaction for eGFP positivity in dermis (G, H). Scale bars 50 μ m (B, D, E, F, H); 100 μ m (A, G.); 200 μ m (C). [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

expression levels by qRT-PCR analysis in uninjured epidermis samples did not show expected decline with animal age. Our study is among the first to investigate Foxn1 expression in mouse skin up to the 18th month of age. Since our study was restricted to qRT-PCR analyses, the lack of Foxn1 protein analysis reflects a potential limitation of the study; however, Western blot analyses performed with commercially available Foxn1 antibodies led to false positive results as described previously.¹² Consequently, we instead used a flow cytometric assay to estimate the percentage of Foxn1-eGFP positive cells and

characterized this phenotype as a surrogate for direct Foxn1 protein analyses. Flow cytometric analysis of keratinocytes isolated from the skin of Foxn1::Egfp mice confirmed that Foxn1 mRNA expression results showed no differences in the percentage of Foxn1-eGFP positive cells between adult and old mice. However, a relatively high percentage of Foxn1-eGFP positive cells was detected in the cell isolates from the epidermis of new born mice. Interestingly, phenotypic characterization of Foxn1-eGFP positive cells from new born mice revealed a large population of E-cadherin/N-cadherin double positive cells.

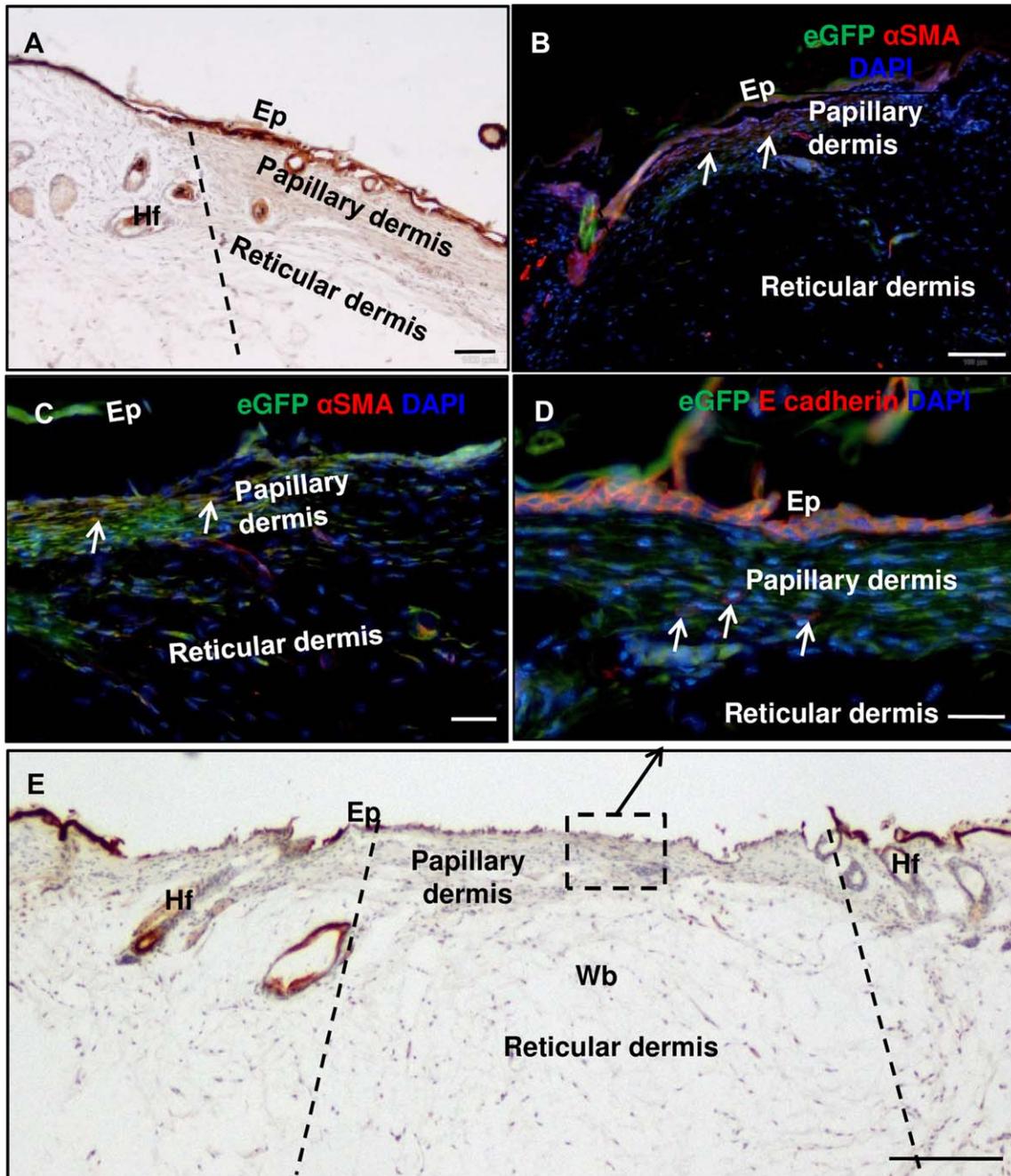


Figure 6. Immunohistochemical (A, E) and immunofluorescent (B–D) characteristics of skin tissues from Foxn1::Egfp mice at postwounded Days 14–36. Skin tissues collected at Day 21 (A–C) and Day 36 after injury (D–E) from adult (A–C) and old (D–E) animals. Figure (D) is a consecutive slide of tissue presented at figure (E). Hf - hair follicles, Wb - wound bed, Ep - epidermis, dotted lines indicate wound margin, white arrows point at: eGFP and α SMA colocalization (B–C), E-cadherin positive cells (D). Scale bars 50 μ m (D); 100 μ m (B); 200 μ m (A, E). [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Whether the presence of Foxn1/E-cadherin/N-cadherin triple positive cells is indicative of the EMT process, as suggested by Kong et al. in studies of murine skin between embryonic day 18.5 to postnatal Day 9,²² will require further study.

Foxn1 expression in postwounded skin tissues in relation to animal age

The analysis of postwounded skin tissues showed that during the course of the wound healing process, levels of

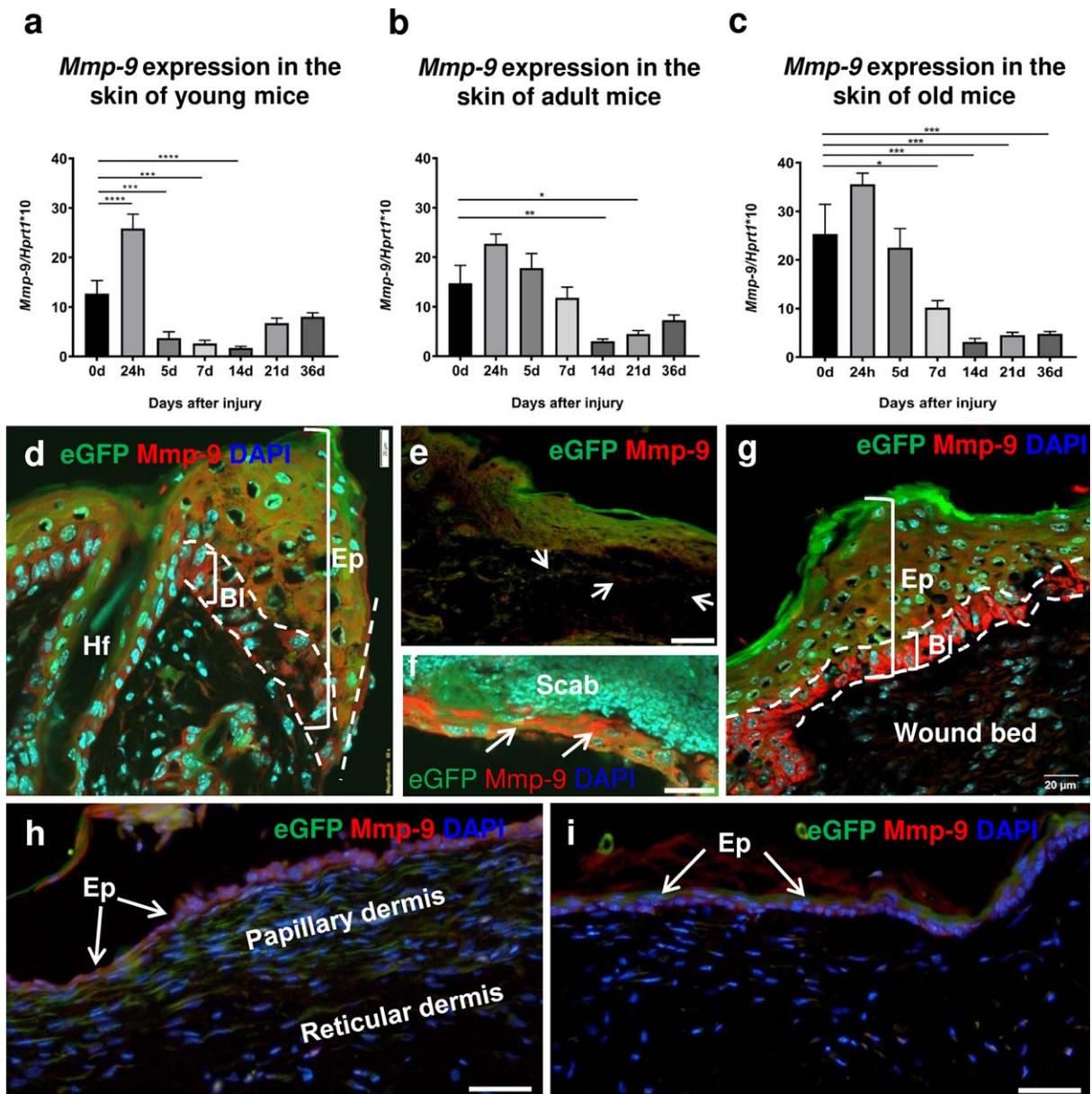


Figure 7. qRT-PCR (A–C) and immunofluorescent (D–I) analysis of *Mmp-9* expression in postwounded skin of B6 (A–C) and *Foxn1::Egfp* (D–I) mice. qRT-PCR analysis of *Mmp-9* expression in young (A), adult (B), and old (C) B6 mice. Values are the mean \pm SEM; $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***) ; $p < 0.0001$ (****); p value calculated from the differences between control and postwounded tissues. Immunofluorescent detection of *Mmp-9* in skin tissues collected from adult (D–G) and old (H–I) *Foxn1::Egfp* mice at 2 (D), 3 (E), 4 (f), 6 (G), 21 (H), and 36 days (I) after injury. Ep - epidermis, BI - basal layer of epidermis, Hf - hair follicles, Wb - wound bed, Wm - wound margin, arrowheads—cells positive for *Mmp-9* (E), arrows—leading epithelial tongue (F). Scale bars 20 μ m (D, E, F); 50 μ m (H, I); 100 μ m (E). [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Foxn1 gene expression changed, showing profile similarities between adult and old mice. Slightly different profiles of *Foxn1* expression were observed in young animals. This discrepancy can be related to the highly synchronized first cycles of hair follicle development during which *Foxn1* plays a crucial role. mRNA expression levels of *Foxn1* in the follicular epithelium declines during the catagen phase

(which lasts from Days 16 to 20 after birth) and is very low in telogen phase (from Days 21 to 25–28 after birth).^{23,24} The highest *Foxn1* expression in hair follicles has been detected in the anagen phase which begins Days 25–28 after birth and coincides with the age of the youngest animals used in our study. Considering that Days 25–28 after birth are characterized by the highest *Foxn1*

expression in hair follicles,²⁵ we hypothesize that our observed discrepancy in *Foxn1* expression profile between the young and older age groups can be correlated with the hair growth phase. This intriguing question remains a topic for future investigations.

Our previous studies in which we investigated the changes in Foxn1 expression during the skin wound healing process were performed on young (4- to 5- week old) animals.¹² The study showed that Foxn1 positive cells are involved in the re-epithelialization process during early phase of healing (Days 1–3) and contribute to the EMT process (Days 4–7). We proposed that Foxn1 may participate in scar formation due to its activity in EMT, possibly through Mmp-9 stimulation facilitating epithelial (keratinocytes) to mesenchymal (activated dermal fibroblasts) transition.¹² The present study confirmed and extended our previous analyses. Investigating Foxn1 expression during the remodeling stage of the wound healing process (Days 14–36), we detected Foxn1-eGFP positive cells in the dermal layer of the skin in proximity to the neo-epidermis (papillary dermis). Two distinct lineages of dermal fibroblasts populating the upper, papillary dermis and the lower, reticular dermis were analyzed during age-related skin development and during postwounded skin repair.²⁶ Driskell et al., demonstrated that epidermal β -catenin activation led to the expansion of the upper, papillary layers by increasing the number of integrin $\beta 8$ (Itga8+) and Lrig1+ fibroblasts in the wound bed. Consistent with this, our current data shows that Foxn1-eGFP positive cells repopulate the dermal, upper part of postwounded tissues (papillary dermis), displaying the myofibroblast marker α SMA. Using our current observations as a springboard for hypothesis generation, we postulate that the upper, papillary dermis fibroblasts derive in part from a keratinocyte origin. Future studies in our laboratory beyond the scope of the current work will explore the question of whether epidermal β -catenin activation may stimulate Foxn1 positive keratinocytes repopulating the wound neo-epidermis to undergo EMT. We speculate that Foxn1-positivity, together with modulated by Foxn1 signaling pathways via secreted factors that impact dermal fibroblasts, stimulate reparative (scar-forming) skin healing. Our novel data provide evidence for the Foxn1 transcription factor's participation in both the proliferative and remodeling stages of skin wound healing process. Although the mechanism of Foxn1 action will require further investigation, the studies strongly support its role in skin injury repair.

Well documented data of the age related decrease in Foxn1 expression in the thymus epithelium, which correlates with thymus involution,^{19,20} spurred our study toward possible age-related changes in skin Foxn1 expression. However, neither gene expression data nor flow cytometric analysis of Foxn1-eGFP positive cells detected an age related decrease in Foxn1 expression in intact skin or differences in Foxn1 modulation during the skin wound healing process in adult vs. old animals. Nevertheless histological analysis showed the temporary and spatial differences in Foxn1-eGFP expressing cells in postwounded skin. In old animals, Foxn1-eGFP signal was detected in the dermis one week earlier than in other groups of mice (14 days comparing to 21 after wounding) and was undetectable at Day 36. This may account for the age-dependent changes occurring in the skin wound healing in

aged mice.²⁷ Further examination will be required to evaluate the role of Foxn1 in skin wound healing process in aged animals.

Age-related changes in Mmp-9 expression in uninjured and in postwounded skin tissues

Another interesting aspect of the present study is the Mmp-9 expression and localization in skin tissue. Foxn1 and Mmp-9 expression in uninjured epidermis and their colocalization during the re-epithelialization process suggest that a molecular pathway links Foxn1 and Mmp-9.

In fact, the analysis of skin Mmp-9 expression showed substantial differences between Foxn1 deficient (nude) and wild type mice.^{11,28} Uninjured skin of nude displayed higher than wild type mice levels of Mmp-9 expression.¹¹ This difference has been attributed to nude dermal fibroblasts which express much higher levels of Mmp-9 than B6 mice.^{11,28} Moreover, next-generation high-throughput DNA sequencing analysis revealed up-regulation of Mmp-9 expression in the total skin samples from nude (Foxn1 deficient) mice but down-regulation in enzymatically separated epidermis (unpublished data). Further differences between Foxn1 deficient (nude) and wild type mice were revealed analyzing Mmp-9 expression profile during skin wound healing process.¹¹ Although skin injury evoked up-regulation of Mmp-9 expression (postwounded Days 1–3) in both mouse strains, the magnitude of up-regulation was much lower in Foxn1 deficient animals. Also, nude mice showed a second surge of Mmp-9 during the late, remodeling phase of wound healing (postwounded Days 21–36). It has been suggested that second wave of Mmp-9 induction can be associated with the ability for scarless healing in nude mice.¹¹

Although beyond the scope of the current study, our laboratory will pursue the novel concept that Foxn1 may regulate Mmp-9 expression in the healing epithelium.

In conclusion, the transcription factor Foxn1 participates in the skin wound healing process through engagement in the re-epithelialization process in the early proliferative phase, and in the late, remodeling phase of wound healing. Further studies will be required to identify the mechanisms of Foxn1 action in cutaneous healing which may shed light on treatment approaches to re-direct the wound healing process from one of scar formation toward regeneration.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Professor Thomas Boehm (Max Planck Institute of Immunobiology and Epigenetics, Germany) for generously providing Foxn1::Egfp transgenic mice.

Source of Funding: This study was supported by the National Science Centre Poland Grant OPUS No. DEC-2012/05/B/NZ5/01537. The article processing charge was covered by the KNOW Consortium: “Healthy Animal - Safe Food” (Ministry of Sciences and Higher Education; Dec: 05-1/KNOW2/2015).

Conflict of Interest: Dr. Gimble is the cofounder, co-owner, and Chief Scientific Officer of LaCell LLC. All other authors have no conflict of interest to declare.

REFERENCES

- Clark RA, Ashcroft GS, Spencer MJ, Larjava H, Ferguson MW. Re-epithelialization of normal human excisional wounds is associated with a switch from alpha v beta 5 to alpha v beta 6 integrins. *Br J Dermatol* 1996; 135: 46–51.
- Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999; 341: 738–46.
- Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature* 2008; 453: 314–21.
- Rowlatt U. Intrauterine wound healing in a 20 week human fetus. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1979; 381: 353–61.
- Colwell AS, Longaker MT, Lorenz HP. Mammalian fetal organ regeneration. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2005; 93: 83–100.
- Cass DL, Bullard KM, Sylvester KG, Yang EY, Longaker MT, Adzick NS. Wound size and gestational age modulate scar formation in fetal wound repair. *J Pediatr Surg* 1997; 32: 411–5.
- Schafer M, Werner S. Transcriptional control of wound repair. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; 23: 69–92.
- Bellavia G, Fasanaro P, Melchionna R, Capogrossi MC, Napolitano M. Transcriptional control of skin reepithelialization. *J Dermatol Sci* 2014; 73: 3–9.
- Mecklenburg L, Tychsen B, Paus R. Learning from nudity: lessons from the nude phenotype. *Exp Dermatol* 2005; 14: 797–810.
- Gawronska-Kozak B, Bogacki M, Rim JS, Monroe WT, Manuel JA. Scarless skin repair in immunodeficient mice. *Wound Repair Regen* 2006; 14: 265–76.
- Gawronska-Kozak B. Scarless skin wound healing in FOXN1 deficient (nude) mice is associated with distinctive matrix metalloproteinase expression. *Matrix Biol* 2011; 30: 290–300.
- Gawronska-Kozak B, Grabowska A, Kur-Piotrowska A, Kopcewicz M. Foxn1 transcription factor regulates wound healing of skin through promoting epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 2016; 11: e0150635.
- Terszowski G, Muller SM, Bleul CC, Blum C, Schirmbeck R, Reimann J, et al. Evidence for a functional second thymus in mice. *Science* 2006; 312: 284–7.
- Calderon L, Boehm T. Synergistic, context-dependent, and hierarchical functions of epithelial components in thymic microenvironments. *Cell* 2012; 149: 159–72.
- Turabelidze A, Guo S, DiPietro LA. Importance of house-keeping gene selection for accurate reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction in a wound healing model. *Wound Repair Regen* 2010; 18: 460–6.
- Kumarswamy R, Mudduluru G, Ceppi P, Muppala S, Kozlowski M, Niklinski J, et al. MicroRNA-30a inhibits epithelial-to-mesenchymal transition by targeting Snai1 and is downregulated in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 2012; 130: 2044–53.
- Clark R. *The molecular and cellular biology of wound repair*. New York: Plenum Press, 1996.
- Prowse DM, Lee D, Weiner L, Jiang N, Magro CM, Baden HP, et al. Ectopic expression of the nude gene induces hyperproliferation and defects in differentiation: implications for the self-renewal of cutaneous epithelia. *Dev Biol* 1999; 212: 54–67.
- Bredenkamp N, Nowell CS, Blackburn CC. Regeneration of the aged thymus by a single transcription factor. *Development* 2014; 141: 1627–37.
- O'Neill KE, Bredenkamp N, Tischner C, Vaidya HJ, Stenhouse FH, Peddie CD, et al. Foxn1 is dynamically regulated in thymic epithelial cells during embryogenesis and at the onset of thymic involution. *PLoS One* 2016; 11: e0151666.
- Lee D, Prowse DM, Brissette JL. Association between mouse nude gene expression and the initiation of epithelial terminal differentiation. *Dev Biol* 1999; 208: 362–74.
- Kong W, Li S, Liu C, Bari AS, Longaker MT, Lorenz HP. Epithelial-mesenchymal transition occurs after epidermal development in mouse skin. *Exp Cell Res* 2006; 312: 3959–68.
- Meier N, Dear TN, Boehm T. Wnt and mHa3 are components of the genetic hierarchy controlling hair follicle differentiation. *Mech Dev* 1999; 89: 215–21.
- Muller-Rover S, Handjiski B, van der Veen C, Eichmuller S, Foitzik K, McKay IA, et al. A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 3–15.
- Lin KK, Chudova D, Hatfield GW, Smyth P, Andersen B. Identification of hair cycle-associated genes from time-course gene expression profile data by using replicate variance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 15955–60.
- Driskell RR, Lichtenberger BM, Hoste E, Kretschmar K, Simons BD, Charalambous M, et al. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. *Nature* 2013; 504: 277–81.
- Swift ME, Kleinman HK, DiPietro LA. Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice. *Lab Invest* 1999; 79: 1479–87.
- Gawronska-Kozak B, Kirk-Ballard H. Cyclosporin A reduces matrix metalloproteinases and collagen expression in dermal fibroblasts from regenerative FOXN1 deficient (nude) mice. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2013; 6: 7.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site