

Patofiziologija staranja

Pathophysiology of aging

Zoran Grubič

POVZETEK Staranje je opredeljeno kot proces, v katerem postopno izgubljanje fizioloških funkcij v organizmu vodi v smrt. V tem prispevku najprej razpravljamo o tem, zakaj ima življensko obdobje starosti majhen pomen s stališča selekcije genov v procesu evolucije in kaj to pomeni za starajočega posameznika. Sledi kratek pregled molekularnih in celičnih mehanizmov, ki so po današnjem prepričanju najverjetneje vpleteni v proces staranja in kjer osrednjo vlogo pripisujejo ravnotežju med škodljivimi mehanizmi, ki jih sprožijo reaktivne kisikove spojine (ROS) in obrambi pred njimi. Večino teh mehanizmov so preučevali na preprostih živalskih modelih, zato v zadnjem delu razpravljamo še o študijah, ki so bolj povezane s staranjem pri ljudeh. Opišemo Wernerjev sindrom, kot primer pospešenega staranja in razpravljamo o pomenu telomeraz kot dejavniku, ki omejuje število celičnih delitev. Na koncu omenimo možnosti vplivanja na procese staranja in opozorimo na etične, socialne in ekonomske probleme, ki bi jih taki posegi lahko sprožili.

Ključne besede: staranje, evolucija, reaktivne kisikove spojine, Wernerjev sindrom, telomeraze

ABSTRACT Aging is defined as the progressive loss of physiological functions that culminates in death. We start our short review on this subject by explaining poor influence of aging on the evolutionary process of gene selection. We also discuss how the lack of this selection reflects at the level of aging individuals. We continue with molecular and cellular mechanisms which, to our present understanding, underlie the aging process. The balance between damaging effects of reactive oxygen species (ROS) and defense against them has been proposed as a major determinant of this process. Most of these mechanisms were investigated on the simple animal models, therefore we focus our last part of discussion on the studies related to the aging of humans. We describe Werner's syndrome as an example of accelerated aging and discuss the role of telomerases in »counting« of cell divisions. At the end we mention future prospects on how the rate of aging can be modified and also the ethical, social and economical consequences that such interventions might have.

Key words: aging, evolution, reactive oxygen species, Werner's syndrome, telomerases

1 Uvod

Ko se lotevamo procesov, ki jih pojmujemo kot staranje, se ne moremo izogniti vprašanju, zakaj so živi organizmi prav taki kot so in ne drugačni. Še posebej nas pri tem zanima, zakaj so življenske dobe teh organizmov tako dolge kot so in kaj te dolžine določa. Dokončnega odgovora na to vprašanje za zdaj še ni, številne raziskave pa so ob pomoči modernih tehnik in poskusnih modelov, ki so jim bile na voljo v zadnjem času, pomembno osvetlile to področje. Če smo še pred nekaj desetletji imeli kar okrog 300 »teorij«, ki naj bi pojasnile proces staranja (1), bi danes lahko ugotovili, da celovite podobe o procesih staranja živih organizmov sicer še ni, da pa se pred nami že kažejo njeni grobi obrisi. Od bodočih raziskav torej ne pričakujemo novih »teorij«, ampak prej zapolnitev praznih lis na tej podobi. Namen tega članka je podati kratek pregled trenutnega znanja o patofizioloških procesih staranja. Podrobneje je ta tematika obdelana v številnih preglednih člankih, ki so bili v zadnjem letu in pol objavljeni v uglednih mednarodnih revijah (2, 3, 4, 5, 6).

2 Staranje in evolucija

2.1 Staranje v luči evlucijske fiziologije

Pri iskanju odgovorov na vprašanja zakaj je človeški organizem tak kot je in kaj določa njegovo življensko dobo, ne moremo mimo teorije evolucije. Vse teorije staranja, ki so bile predlagane v preteklih letih, se opirajo na to teorijo in iščejo v njej svojo potrditev.

Po evlucijski teoriji sta zgradba in delovanje določenega organizma rezultat njegovega prilagajanja na okolje skozi vsa obdobja njegovega razvoja, pri čemer se, v evlucijskem smislu, pojem prilagoditev nanaša na vrsto (species) in ne na njene posameznike. Vrsta je prilagojena na okolje, če uspe ohraniti dovolj visoko rodno, da se njeni posamezniki vseskozi, od generacije do generacije, razmnožijo v številu, ki je dovolj veliko za nadaljnji razplod.

Kot najpomembnejše vodilo, ki določa življensko dobo posameznih vrst, se je v evlucijski fiziologiji uveljavilo načelo žrtvovanja (angl. »trade off«) ene prednosti na račun druge (2, 6). To načelo izhaja iz dveh ugotovitev: 1) v naravnem okolju stresne razmere pomorijo večino posameznikov neke živalske vrste še preden ti dosežejo obdobje starosti in 2) energijski viri, ki so v naravnem okolju na razpolago posameznim organizmom, so omejeni, to pa pomeni, da je v razvoju vsake posamezne vrste moralo priti do kompromisne odločitve, kolikšen del razpoložljive energije vložiti v rast organizma, kolikšen del v obrambne mehanizme in večjo zmožnost popravljanja škode, ki jo povzročajo zunanji dejavniki, spet kolikšen del v shranjevanje energijskih zalog in kolikšen del v reprodukcijo. Ker vsaka od naštetih usmeritev zahteva razvoj energetske zelo zahtevnih celičnih in molekularnih mehanizmov, ni mogoče maksimalno uresničiti vseh. Po darwinističnem načelu naravne selekcije je bilo za preživetje vrste bistveno, da je pri tej izbiri našla optimalno rešitev za svoj razplod. Kot primer lahko opišemo dobro raziskan primer miši. Za to vrsto je znano, da v naravnem okolju že v prvem letu življenja 90% populacije

podleže zunanjim dejavnikom kot so klimatske razmere, pomanjkanje hrane in vrsta predatorjev. V takih razmerah se je v procesih naravne selekcije izkazalo, da je za nadaljevanje vrste optimalno razporediti več energije v hiter in bolj množičen razplod na račun večje rasti in razvoja raznih obrambnih sistemov, kot so na molekularni ravni npr. boljši mehanizmi za obrambo pred oksidativnim stresom (glej spodaj), na ravni organizma pa npr. obdajanje s školjčno lupino, krila, večji možgani in drugi sistemi, ki jih najdemo v živalskem svetu. Kompromisna rešitev je torej mišim prinesla maksimalno življensko dobo 3 let, kar je bilo dovolj za očuvanje vrste vse do danes.

Po drugi strani se je v primeru človeka, kot optimalna razporeditev razpoložljivih energetskih virov, izkazala rešitev, ko se hiter in obilen razplod žrtvuje na račun daljše, a zato večje rasti in boljših obrambnih sistemov. Človek, katerega pribl. 5 milijonov let dolg razvoj se je, razen v zelo kratkem zadnjem obdobju civilizacije, odvijal v divjini, ima tako poleg večje rasti, tudi razvitejše možgane, poleg tega pa še vrsto učinkovitejših molekularnih obrambnih sistemov proti fizikalnim, kemičnim in biološkim okoljskim dejavnikom, ki so potrebni za daljše preživetje. Ti sistemi omogočajo človeku daljše preživetje, s tem pa tudi daljše obdobje reprodukcije za zagotavljanje zadostnega potomstva. Kot vemo nastopi reproduktivno obdobje pri človeku razmeroma pozno (slika 1) in ker potomci potrebujejo daljši čas, da dosežejo sposobnost samostojnega življenja, mora človek v povprečju živeti vsaj nekaj desetletij, da uspe zagotoviti nadaljevanje vrste v naslednjo generacijo.



Slika 1: Življenska obdobja v človeški populaciji. Na sliki prikazane dolžine posameznih obdobji niso v pravih časovnih razmerjih. Embriionalno obdobje (e) od oploditve do rojstva traja 266 dni, obdobje rodnosti se (po merilu prve menstruacije) v povprečju začne med 12 in 14 letom in se v povprečju (po merilu nastopa menopavze) konča med 40 in 50 letom. Povprečna pričakovana življenska doba je v razvitem svetu 75 let, maksimalna življenska doba (najvišja starost, ki jo lahko človek doseže) pa se po današnjih ocenah giblje okrog 125 let.

Figure 1: Life periods in human population. Lengths of individual periods are not presented in scale. Embryonic period (e) lasts, from conception to birth, 266 days; fertility period begins at the age between 12 and 14 years (menarche) and ends at the age between 40 and 50 years (menopause). Average life expectancy in developed world is 75 years; maximal life span is, to our present estimation, around 125 years.

V podporo optimalni in zato kompromisni razporeditvi razpoložljivih energetskih virov, obrambni mehanizmi, ki jih imamo proti okoljskim dejavnikom, niso popolni. So le dovolj učinkoviti, da so skozi celoten človekov zgodovinski razvoj zaščitili dovolj posameznikov za nadaljevanje vrste. Tako npr. obrambni sistem proti vdoru mikroorganizmov ni dovolj močan, da bi zaščutil vsakega posameznika pred vsako obliko teh stalnih napadalcev (sredi 14. stoletja je npr. kuga pomorila

velik del vsega takratnega človeštva), a je bil skozi vso zgodovino človeštva očitno dovolj učinkovit, da je zagotovil zadosten prehod posameznikov iz generacije v generacijo vse do danes.

V smislu navedenega, se obdobje starosti izkaže ne le kot nepotrebno, ampak za nadaljevanje vrste tudi škodljivo obdobje, saj gre za porabo omejenih energetskih virov za del populacije, ki več ne pripomore k reprodukciji. Ta ugotovitev je, skupaj z odkritji vrste genov, pri katerih ena sama mutacija bodisi podaljša ali pa skrajša življensko dobo (7), pripeljala do teorije o staranju kot o genetsko programiranem procesu. Čeravno na videz logična, pa se je ta teorija iz širšega zornega kota evlucijskih dogajanj izkazala kot težko razložljiva, pa tudi študije na področju evlucijske genetike je niso uspele potrditi (glej spodaj). Danes staranje uspešneje pojasnjuje teorija »somatskega žrtvovanja« (angl. »disposable soma theory«), ki temelji na zgoraj opisanih načelih optimalnega razporejanja razpoložljivih virov. Po tej teoriji vrsta, katere posamezniki v naravnem okolju skoraj nikoli ne dočakajo starosti, svojih omejenih energetskih virov skozi evlucijski razvoj ne vložijo v izgradnjo celičnih molekularnih obrambnih mehanizmov pred zunanjimi stresorji, ki bi sicer podaljšali življensko dobo (glej spodaj), ampak raje v hitrejšo in obilnejšo reprodukcijo (2, 6). Ta odločitev pomeni »žrtvovanje« somatskih celic, saj se, zaradi pomanjkanja in neučinkovitosti teh obrambnih mehanizmov, škodljive spremembe v celicah s časom kopičijo, kar se na zunaj kaže kot staranje. Napredujoče kopičenje škodljivih sprememb (glej spodaj) končno pripelje do funkcionalne odpovedi organizma in smrti.

2.2 Staranje v luči evlucijske genetike

V procesu prilagajanja določene živalske vrste na okolje v katerem živi, je v evlucijskem smislu ključnega pomena tudi selekcija znotraj vrste, ta pa se dogaja prek selekcije genov, ki se prenašajo iz generacije v generacijo. Ko gre za preživetje v okolju, nekateri geni in genske kombinacije, oziroma njihovi fenotipi, svojim nosilcem prinašajo prednosti, drugi spet verjetnost preživetja zmanjšujejo. Ker imajo organizmi z večjo sposobnostjo preživetja tudi večjo možnost za razplod, se v neki populaciji, pod pritiski okolja, sčasoma geni, ki so ugodni za preživetje, uveljavijo, neugodni pa se odstranijo. Prav ta selekcija je osnova evlucijske plastičnosti oziroma spremenljivosti organizmov, ki omogoča, da se sčasoma izoblikuje genotip, ki omogoča optimalno izrabo razpoložljive energije ki, kot smo opisali zgoraj, tudi določa življensko dobo. Da do procesa selekcije genov sploh lahko pride, pa je potrebno, da se geni in njihove kombinacije na ravni posameznikov skozi generacije vseskozi spreminjajo. To se dogaja po eni strani na račun različnih genskih kombinacij, ki jih ob mejotičnih delitvah in združitvah zarodnih celic posamezniki podedujejo od svojih staršev, po drugi pa na račun spontanosti in iz okolja sproženih mutacij v zarodnih celicah. Na razplod znotraj posamezne vrste lahko tako gledamo kot na naravni laboratorij, kjer po slučajnem vzorcu nastajajo različne oblike in kombinacije genov, ki se nato, s stališča njihovega vpliva na preživetvene, predvsem pa na reprodukcijske sposobnosti njihovih nosilcev, preizkušajo v okolju.

Gledano s tega zornega kota, obstajajo v organizmu samo dve vrsti celic: zarodne (jajčeca pri ženskah in spermatogoniji pri moških) in somatske (vse ostale celice organizma). Pri tem so zarodne celice, ki se prenašajo iz generacije v generacijo, v nekem smislu nesmrtni, medtem ko je vloga somatskih celic zgolj v tem, da omogočijo ploditev

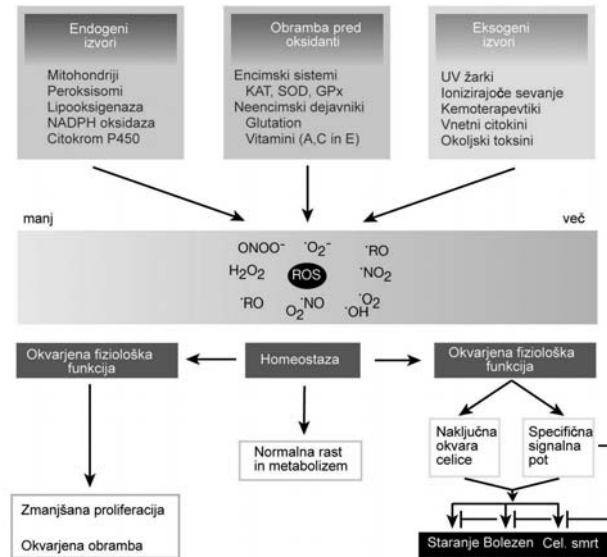
in s tem prenos genov v naslednjo generacijo. Ko govorimo o genskih mutacijah, moramo tako ločiti pomen mutacij v zarodnih celicah od pomena mutacij v somatskih celicah. Medtem ko se prve prenesejo iz generacije v generacijo in, v primeru, da niso smrtonosne, pripomorejo k večji genetski plastičnosti in raznolikosti organizmov, se druge ne dedujejo. Mutacije, ki se skozi vse življenje posameznikov kopičijo v somatskih celicah, povzročajo vse večjo »nestabilnost genoma«, ki se na celični ravni kaže kot vse večje število genskih in drugih okvar. Te se navzven kažejo kot staranje in ki na koncu privedejo do smrti. Ta razlaga daje podporo zgoraj omenjeni teoriji »somatskega žrtvovanja« tudi s stališča evolucijske genetike.

S stališča selekcije genov, so od življenjskih obdobj, prikazanih na sliki 1, pomembna samo obdobja do konca dobe razploda, medtem ko v dobi starosti, ko se geni več ne prenašajo na naslednje generacije, pritiski okolja na to selekcijo ne morejo več vplivati. Vsi tisti geni in njihovi produkti, katerih izražanje vpliva na zdravje in preživetveno sposobnost človeka šele v starosti (ponekje v literaturi jih imenujejo »gerontogeni«), se torej od genov, ki so odločilni za preživetje organizma v zgodnejših obdobjih, pomembno razlikujejo po tem, da njihove kombinacije, spremembe in mutacije niso bile podvržene selekcijskim pritiskom. Vse morebitne okvare teh genov, ki jih je človek v svojih zarodnih celicah pridobil pred ali med obdobjem plodnosti in ki do konca tega obdobja niso povzročale nobenih težav, so se neovirano prenašale na potomce in se skozi generacije, v različnih kombinacijah, kopičile v človeški populaciji. Ker v preteklosti velika večina posameznikov starosti sploh ni dočakala, so se učinki teh genov lahko pokazali le občasno in za človeško populacijo niso predstavljali težav s kakršnimi se srečujemo danes, ko večina posameznikov živi daleč preko reprodukcijskega obdobja. Velika variabilnost in pestrost, ki jo opažamo med posamezniki tako glede trajanja starostnega obdobja kot tudi glede bolezni, okvar in vzrokov smrti, ki jih prinaša to obdobje, izvira v veliki meri prav iz velike pestrosti gerontogenov in njihovih okvar, ki niso bile nikoli izpostavljene selektivnim pritiskom okolja. Tako npr. za sladkorno bolezen tipa 2, ki povzroča težave šele v starosti in ima močan dedni dejavnik, niso uspeli odkriti enoten genski vzorec, ki bi pojasnjeval dedno plat te motnje. Odkrili so sicer že vrsto mutacij na raznih genih, ki so povezani z inzulinskim signaliziranjem, ki je okvarjeno pri tej bolezni, a so bile te mutacije od družine do družine sladkornih bolnikov tipa 2 različne tako po tipu kot po lokaciji, kar je ob nabiranju mutacij po slučajnem vzorcu in njihovem prenosu od generacije do generacije tudi pričakovati. Za razliko od zgodnjih, močnih selekcij podvrženih genov, so tako gerontogeni nekakšno »smetišče« najrazličnejših mutacij, ki so se imele možnost kopičiti skozi tisočletja človekovega razvoja (2, 6). Visoka stopnja variabilnosti na ravni starostnih genov, ki jo je omogočila odsotnost selekcijskih pritiskov, je še posebej očitna, če primerjamo natančno programirano in po zaporedju dogodkov podrobno opredeljeno dogajanje v embrionalnem obdobju, s kaotičnim obdobjem staranja, ki se, tako po času, kot tudi dogajanjih v organizmu razlikuje tako rekoč od posameznika do posameznika.

Ta spoznanja so dodatno pripomogla k opuščanju koncepta o staranju kot o genetsko programiranem procesu. Danes staranje razumemo kot posledico individualističnih, stohastičnih in torej po slučajnem vzorcu nastalih okvar, ki se z leti sicer kopičijo, a se po vzorcu od posameznika do posameznika precej razlikujejo.

3 Celični in molekularni mehanizmi staranja

Že pred približno sto leti so ugotovili, da imajo živali, ki imajo hitrejši metabolizem (kalorije /kg telesne teže/dan), krajšo življensko dobo. Na podlagi te ugotovitve se je takrat razvila hipoteza »hitrosti življena«, po



Slika 2. Uravnavanje ravni reaktivnih kisikovih spojin (ROS) v celici in celični odgovori nanje. Raven ROS v celici določa ravnotežje med njihovim nastajanjem in obrambo. ROS nastajajo kot posledica znotrajceličnih procesov (zgornje levo polje) ali pa pod vplivom zunanjih dejavnikov (zgornje desno polje). Najmočnejšo obrambo pred njimi (zgornje srednje polje) predstavljajo znotrajcelični encimi oziroma encimski sistemi katalaze (KAT), superoksidne dismutaze (SOD) in glutatijske peroksidaze (GPx). Porušenje ravnotežja bodisi v eno ali drugo smer vodi v celične poškodbe takega ali drugačnega tipa (spodaj), kar se na zunan lahko kaže tudi kot staranje organizma (desno spodaj). NADPH: reducirana oblika nikotinamadenin dinucleotidfosfata. (prirejeno po Finklu in Hoolbrook: 10). Izraz reaktivne kisikove spojine ni najbolj posrečen, saj njihov glavni predstavnik, superoksidni anion, ni spojina, ker ga tvori en sam element. Prednost tega izraza je, da se kratica ROS ujema z razrišeno angl. okrajšavo ROS (angl. "reactive oxygen species") za isto skupino spojin.

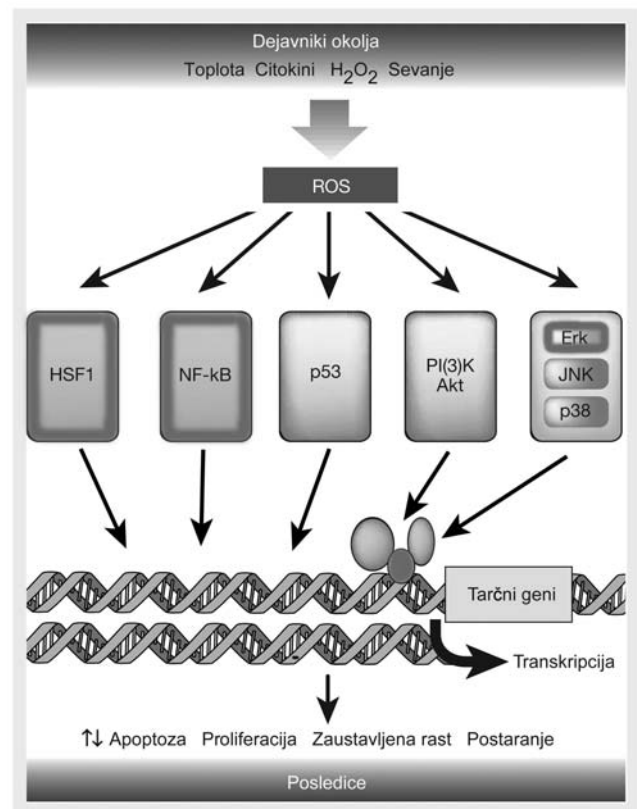
Figure 2. Regulation of the reactive oxygen species (ROS) level in the cell and cellular responses to ROS. Intracellular ROS level reflects the balance between rates of ROS formation and degradation. ROS are generated as a result of intracellular processes (upper left field) or the actions of extrinsic agents (upper right field). The strongest defense against ROS (upper middle field) are intracellular enzymes and enzyme systems: catalase (CAT); superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx). Any disruption of this balance results in cellular damage (bottom). Depending on the extent and type of damage it leads either to cell death, disease or aging. (bottom right). NADPH: reduced form of the nicotinamideadenin dinucleotide phosphate (modified after Finkel and Holbrook; 10).

kateri življensko dobo vsake živalske vrste določa hitrost njenega metabolizma. Približno 50 let pozneje je Harman (8) predlagal »teorijo prostih radikalov«, ki je prispevala prvo mehanistično povezavo med metabolizmom in »hitrostjo življenja«. Staranje naj bi bilo po tej teoriji odsev kumulativnih poškodb, ki se kopičijo v organizmu zaradi škodljivih učinkov prostih radikalov, ki nastajajo v oksidacijskih celičnih metabolnih procesih. Večja »hitrost življenja« kot hitrejši metabolizem torej vodi v hitrejšo nabiranje celičnih poškodb, te pa se na zunan kažejo kot hitrejši proces staranja, temu ustrezno pa je krajša tudi življenska doba. Po tej teoriji torej staranje ni neposreden odsev hitrosti metabolizma, ampak množine prostih radikalov, ki v teh oksidacijskih procesih nastanejo. Izkazalo se je tudi, da pri tem ni merodajna le hitrost nastajanja teh spojin, ampak tudi hitrost njihovega odstranjevanja. Odkritje encima superoksidne dismutaze (9), katerega edina naloga je odstranjevanje superoksidnega aniona, kot osrednjega predstavnika reaktivnih kisikovih spojin (ROS), kot zdaj s skupnim imenom imenujemo proste radikale, pa tudi odkritja, ki so pokazala, da so nekatere ROS udeležene v procesih celičnega signaliziranja (npr. dušikov monoksid, NO) so pripeljala do današnjega prepričanja, da je nastajanje in procesiranje ROS nadzorovan celični proces. V evolucijskem razvoju, kjer živa bitja uporabljajo oksidacijske procese kot edino pot za pridobivanje energije, so se v celicah, po eni strani razvili za ta namen specializirani sistemi (na ravni organel mitohondriji, na ravni reakcijskih sistemov pa piruvatni dehidrogenazni kompleks, b-oxidacija, ciklus trikarboksilnih kislin in dihalna veriga, ki jih najdemo v mitohondrijskem matriksu in notranji mitohondrijski membrani) po drugi pa tudi sistemi za razgradnjo ROS (encimi katalaza, superoksidna dismutaza, glutationska peroksidaza). Razmerje učinkovitosti obeh sistemov uravnava raven ROS v celici. Uravnavanje ravni ROS v celici naj bi bilo po današnjih spoznanjih vrstno specifičen proces, katerega učinkovitost se je, kot rezultat evolucijskih selekcijskih pritiskov, izselekcionirala po načelu zgoraj omenjene teorije somatskega žrtvovanja. Vsaka posamezna živalska vrsta ima torej svoji strategiji preživetja prilagojen način uravnavanja ROS (slika 2), s tem pa tudi temu ustrezno življensko dobo (10) (glej zgoraj).

3.1. Molekularni mehanizmi staranja pri preprostejših organizmih

Najučinkovitejši dejavnik, za katerega je bilo v poskusih na živalih nesporno ugotovljeno, da podaljša življensko dobo, je zmanjšan kalorični vnos (ZKV). V poskusih predstavlja to zmanjšanje dieto, ki je po kalorični vrednosti za približno 30 – 40% manjša od vrednosti, ki jo s hrano vnesejo kontrolne živali, ki so hranjene po načelu *ad libitum*. V takih razmerah so pri vseh preiskovanih vrstah: protozojih, vodnih bolhah, pajkih, ribah in tudi podganah opazili tako podaljšanje povprečne kot tudi maksimalne življenske dobe za približno enak odstotek (11). Za človeka teh podatkov ni, vendar pa je prav ponovljivost tega učinka pri vseh drugih vrstah močan argument za sklepanje, da bi poskusi, če bi bili izvedljivi, pokazali enak učinek tudi pri človeku.

V začetku so podaljšanje življenske dobe zaradi ZKV tolmačili preprosto z znižano količino ROS. Ob vsakem vnosu kaloričnih virov (ogljikovih hidratov, maščob in proteinov), se kot stranski učinek potovanja elektronov vzdolž dihalne verige, kar je končna stopnja oksidacije teh snovi, tvorijo ROS, ti pa prek škodljivih učinkov na DNK, celične membrane (lipidna peroksidacija) in beljakovinske molekule,



Slika 3. Signalne poti v celici, za katere je bilo ugotovljeno, da jih prek različnih stresnih dejavnikov iz okolja, uravnava ROS. Ti lahko nastanejo v endogenih procesih znotraj celice, ali pa kot odziv na zunanje stresne dejavnike, ki povzročajo oksidativni stres. ROS prek različnih transkripcijskih dejavnikov (HSF 1, NF- κ B, in p53) ali pa prek signalnih encimov, ki vplivajo na transkripcijske dejavnike (sistem PI(3)K/Akt, JNK, p38/MAPK), vplivajo tako na gensko podvojevanje, kot tudi na gensko prepisovanje. Kakšen bo končni odgovor celice je odvisno od jakosti in trajanja stresa pa tudi od tipa celice. Debelo obrobljeni so dejavniki, za katere so povezavo s staranjem že ugotovili. Mutacije raznih genov v signalnih poteh, kjer ti sodelujejo, so namreč povzročile bodisi podaljšanje ali skrajšanje življenske dobe poskusne vrste. (prirejeno po Finklu in Hoolbrook: 10).

Figure 3: ROS mediated stress signalling in the cell. ROS are formed either in endogenous cellular processes or as a result of exogenous stress stimuli resulting in oxidative stress. ROS affects DNA replication or transcription through the action of various transcription factors (HSF 1, NF- κ B, in p53) or signaling enzymes controlling transcription factors (PI(3)K/Akt, JNK, p38/MAPK). The ultimate cell response depends on the nature and duration of the stress as well as on the cell type. Pathways demonstrated to influence aging processes are indicated. by bold frame. Mutations of various genes involved in these pathways have been demonstrated to influence longevity (modified after Finkel and Holbrook; 10).

kopičijo okvare v celici, kar pospeši staranje in vodi v zgodnjo smrt. Ob ZKV je teh okvar manj in življenje zato daljše (11).

Čeravno na videz prepričljiva, se gornja razlaga ni uspela potrditi v poskusih. Poleg tega je vrsta študij pokazala, da ZKV ni edini dejavnik, ki podaljša življensko dobo. Na preprostih živalskih modelih je bilo to mogoče doseči tudi z vzpostavljanjem najrazličnejših drugih razmer, katerih skupni imenovalec pa je bil stresni dejavnik. Ko so po drugi strani ugotovili, da je v teh modelih možno življensko dobo podaljševati ali pa tudi skrajševati tudi z mutacijo določenih genov, med katerimi prevladujejo taki, ki so prek svojih beljakovinskih produktov vključeni v uravnavanje metabolnih procesov in torej ravni ROS, je začelo prevladovati mnenje, da se za podaljšano življensko dobo v razmerah ZKV skriva širše delujoči in izdelan molekularni mehanizem. Po današnjih spoznanjih naj bi ta mehanizem, kot odgovor na stresne razmere, prilagodil procese v organizmu na način, ko se začasno žrtvuje reproduksijske sposobnosti posameznikov na račun njihovega daljšega preživetja. Tako žrtvovanje (angl. »trade off«) je v naravi razširjen pojav. Bakterije v neugodnih razmerah tvorijo dolgožive a v smislu razmnoževanja neaktivne spore, vrsta valjastega črva *Caenorhabditis elegans* v takih razmerah preide v stanje imenovano »dauer«, v katerem se tako oksidacijski procesi kot tudi staranje močno upočasnijo (12), podobno vlogo pa ima tudi hibernacija, ki jo srečamo pri nekaterih sesalcih. Visoka konzervativnost genov, ki so udeleženi v procese, ki uravnavajo opisani pojav, govori v prid hipotezi, da se je tak odgovor na stresne razmere v evolucijskih procesih uveljavil že zelo zgodaj in se ohranil vse do danes, a je zaradi prevlade višjih mehanizmov v uravnavanju metabolizma, ki so se razvili pri bolj razvitih vrstah, kot je npr. človek, postal pri teh vrstah vse bolj prikrit. Logičen je tak mehanizem tudi s stališča zakonov evolucije, saj omogoča posameznikom znotraj vrst, da »prevedrijo« neugodne razmere, svoje reproduksijske sposobnosti, ki ostanejo ob upočasnjenem staranju v takih razmerah ohranjene dalj časa, pa prihranijo za poznejša, ugodnejša obdobja. V zadnjem času se je nabralo precej podatkov, ki kažejo na to, da različne stresne razmere najprej povzročijo »oksidativni stres«, ta pa nato prek ravni ROS vpliva na celo vrsto pomembnih metabolnih poti v organizmu, ki so jih pred tem prepoznali že na drugih raziskovalnih področjih in ki so odgovorne za zgoraj opisane spremembe, (10) (slika 3).

Podrobnejše študije so pokazale, da pri poskusnih glodalcih in celo primatih zmanjšan kalorični vnos (ZKV) zniža incidenco za starost značilnih karcinomov, kot tudi incidenco srčno-žilnih obolenj in upočasnjuje pešanje imunskega sistema, ki je značilno za starost (13). Iz tega sklepajo, da fiziološke spremembe, ki jih povzroči ZKV, prispevajo k boljšemu splošnemu zdravstvenemu stanju, kar ima za posledico podaljšano življensko dobo. To se ujema tudi z izkušnjami pri človeku, kjer je znano, da je kronično zvečan vnos kalorij dejavnik tveganja za srčno-žilna obolenja, več tipov raka, sladkorno bolezen tipa 2 in še nekatera obolenja, ki bremenijo predvsem starostnike.

Okvir tega pisanja ne dopušča, da bi v podrobnosti opisovali številne hipoteze, poskuse in poskusne modele, ki poskušajo najti razlago za opisane pojave. Omejili se bomo le na nekaj dognanj, ki so bila v zadnjem času deležna večje pozornosti.

3.1.1 Vloga sistema Sir pri povezavi zmanjšane kaloričnega vnosa s podaljšano življensko dobo

Iskanje molekularnih mehanizmov, ki bi povezali ZKV z opisanimi učinki in podaljšano življensko dobo, je v poskusih na kvasovkah

(*Saccharomyces cerevisiae*), pripeljalo do odkritja sistema Sir (angl. »silent information regulator«), ki ga sestavlja kompleks beljakovin Sir2, Sir3 in Sir4. Ko so kvasovke iz hranilnega medija z 2% glukozo prenesli v medij z 0,5% glukozo, so ugotovili za okrog 50% podaljšano življensko dobo, ta učinek pa je spremljalo utišanje genov rDNK, s katerih se prepisuje ribozomalna RNK (rRNK). Vlogo sistema Sir pri tem učinku močno podpirajo rezultati poskusov, v katerih so z odstranitvijo beljakovine Sir2 kvasovkam življensko dobo skrajšali, medtem ko so jo pri kvasovkah z dodano kopijo gena SIR2, močno podaljšali (12). Danes je znano, da Sir2 deluje kot od NAD-odvisna deacetilaza. Pri tem NAD ne opravlja vloge prejemnika elektronov in protonov, kar je njegova vloga, kadar deluje kot koencim raznih dehidrogenaz v katabolnih reakcijah, ampak deluje kot aktivator deacetilazne encimske aktivnosti Sir2, tarča deacitiliranja pa so histonske molekule v kromatinu, kar pripelje do utišanja genov za rDNK. Prav odvisnost aktivnosti Sir2 od koencima NAD povezuje ta encim z metabolizmom, kjer je razmerje NAD/NADH pomemben pokazatelj energetskega statusa v celici in je večje ob zmanjšanju vnosa energijskih virov. Izkazalo se je, da je mehanizem Sir zelo konzervativen. Najdemo ga tako pri nižjih kot tudi višjih vrstah, zaradi česar lahko pričakujemo podoben učinek morda tudi pri človeku, čeprav za zdaj še ni znano, katere predele genoma bi Sir2 utišal v teh višjih organizmih in kako bi to utišanje podaljšalo njihovo življensko dobo. V najnovejši literaturi (13) najdemo vrsto predlaganih modelov, kjer se sesalska oblika Sir2, imenovana SIRT1, vključuje v najrazličnejše metabolne poti, pripisujejo pa mu tudi zaščitno vlogo pred nevrodegeneracijo. Raven ROS v celici, ki je pomemben dejavnik v procesu staranja, naj bi SIRT1 zniževal prek uravnavanja izražanja odklopnih proteinov v notranji mitohondrijski membrani. Zvečano število teh beljakovin bi pripeljalo do zmanjšane depolarizacije notranje mitohondrijske membrane, ki jo ustvarja gradient protonov, to pa bi pripeljalo do znižane hitrosti nastajanja ROS.

3.1.2 Vloga signalne poti inzulin/inzulinu podoben rastni dejavnik (IGF-1) pri povezavi zmanjšane kaloričnega vnosa in podaljšano življensko dobo

Poleg kvasovk in vinske mušice, je zelo uporaben model za proučevanje molekularnih mehanizmov staranja tudi že omenjena vrsta valjastega črva *Caenorhabditis elegans* (CAEL) (el). Pri CAEL, ki so jim mutirali gen DAF-2, ki kodira receptor za inzulin/IGF-1 oziroma za ustrezne ligande v tem organizmu, so opazili ne le dvakrat daljšo življensko dobo, ampak tudi mladostno obnašanje, ki bi, po analogiji s človekom, pomenilo vedenje in izgled štiridesetletnika pri starosti devetdeset let. Iz opisanih ugotovitev bi lahko torej sklepali, da signaliziranje prek hormonov ne služi le metabolni koordinaciji ampak tudi koordinaciji starostnih procesov med tkivi. Mutacije, ki vplivajo na življensko dobo, so pri CAEL sorazmerno šibke. Močnejše mutacije v tej signalni poti pa povzročijo, da se ličinke teh živali spremenijo v dormantno, stanje, imenovano »dauer«, kjer je rast zaustavljena, obramba proti stresu pa povečana. Prehod v tako stanje je značilen za okoliščine ko gre za pomanjkanje hrane.

Po aktivaciji receptorja inzulin/IGF-1 pride do aktivacije reakcijske kaskade, v kateri ima ključno vlogo fosfatidilinozitol -3-OH kinaza (PI(3)K), končni vpliv na prepis genov pa se s te kaskade prenese prek transkripcijskega dejavnika DAF-16, ki je bistven za opisano podaljšanje življenske dobe (12). Življensko dobo določa prek te

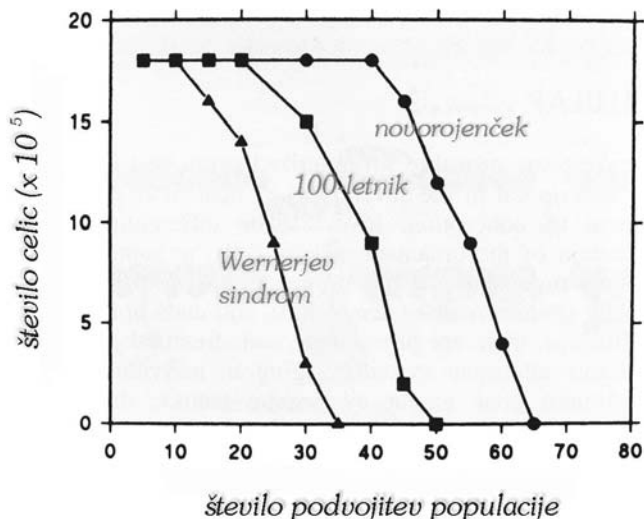
kaskade dvoje tkiv: senzorični sistem, prek katerega žival zaznava spremembe v okolju in njen reprodukcijski aparat, kar kaže na hormonsko uravnavanje procesov staranja pri teh živalih in kar spet pomeni, da lahko reprodukcijski aparat prek ustreznih signalov koordinira čas reprodukcije z procesom staranja. To ne preseneča, saj so tudi pri človeku starostno-specifične spremembe kot npr. puberteta in menopauza uravnavane hormonsko. Če pri CAEL kak dejavnik iz okolja zadrži reprodukcijo, se začnejo izločati signalne molekule, ki upočasnijo staranje na ravni posameznih celic. Tako se žival začne starati počasneje s tem pa ohrani reproduktivno sposobnost za čase, ko bo za razplod več možnosti, kar prinaša prednost tudi v evlucijskem smislu.

3.2 Molekularni mehanizmi staranja pri človeku

Kvasovke, vinska mušica in valjasti črv so enostavni in za poskuse dostopni organizmi, poleg tega pa njihova sorazmerno kratka življenjska doba omogoča spremljanje sprememb v njihovih organizmijski skozi celo življenjsko obdobje in tudi skozi več generacij. Vse to so za raziskovanje molekularnih mehanizmov staranja pomembne prednosti, kot vedno pa se ob uporabi takih modelov sprašujemo o veljavnost dobljenih izsledkov na človeškem organizmu. V tem smislu so sicer obetavna opažanja, da so nekateri elementi signalnih sistemov, ki uravnavajo staranje v preprostih živalih, visoko konzervativni in so jih odkrili pri vseh do zdaj proučevanih vrstah. To bi lahko pomenilo, da bi vsaj do neke mere lahko bili vključeni tudi v procese staranja pri človeku, vendar ustreznih dokazov za to še ni. Prav zato je še posebej pomembno ugotoviti, ali obstajajo pri človeku stanja in mehanizmi, ki bi povezovali spoznanja, pridobljena na enostavnejših modelih, s procesom staranja pri človeku.

V raziskavah staranja sta bila do zdaj pri človeku v ospredju dva modela: progerije, ki jih v ožjem smislu pojmuje kot genetske motnje, ki se kažejo kot pospešeno staranje in kulture človeških celic. Med progerijami, ki jih je sicer več, je bilo do zdaj največ raziskav posvečenih Wernerjevemu sindromu (14). Bolniki s tem sindromom so homozigoti za mutacijo v genu, ki kodira encim RecQ iz družine helikaz (15). Helikaze so encimi, ki se v procesu replikacije, torej podvojevanja DNK, vežejo na eno verigo dvojne vijačnice in se, korak za korakom, premikajo vzdolž te verige pri čemer potrebujejo energijo v obliki ATP. Njihovo delovanje razklene dvojno vijačnico, kar je pomembno za nemoten proces podvojevanja DNK. Na klinične znake, ki jih najdemo pri Wernerjevem sindromu, je torej treba gledati kot na posledice motenj v podvojevanju DNK, kar ima za posledico tudi motnje v procesu celičnih delitev. S tem se ujema poskusi, kjer so primerjali delitvene sposobnosti humanih fibroblastov, ki so jih pridobili iz podkožja novorojenčka, stoletne osebe in osebe z Wernerjevim sindromom (slika 4).

Motnje se pri bolniku z Wernerjevim sindromom začnejo v obdobju odrasčanja, ko ne pride do obdobja hitre rasti, ki je značilno za zdrave mladostnike, nizka telesna višina pa se tudi pozneje ne nadoknadi. Že pri tridesetih letih se pri praktično vseh bolnikih pojavijo katarakte, poznejše motnje pa so že bolj raznolike. Najpogostejši znak, ki je v poznejšem obdobju skupen vsem bolnikom, so hude kožne ulceracije v področju gležnjev. Bolniki imajo tipične bolezni starostnega obdobja kot so osteoporozna, sladkorna bolezen tipa 2, ateroskleroza



Slika 4: Delitvene sposobnosti humanih fibroblastov, izoliranih iz podkožja novorojenčka, 100 let stare osebe in dvajsetletne osebe z Wernerjevim sindromom. Zmožnost celic, da zrastejo v petrijevki z radijem 100 mm do konfluente (pribl. 1.8×10^6 celic) se zmanjšuje z večanjem števila podvojitve populacij. Po določenem in za vsako od omenjenih treh populacij značilnem številu delitev, celice izgubijo delitveno sposobnost in ostanejo ujete v dokončnem stanju poimenovanem celična ostarelost (angl. "senescence"). (prirejeno po Diceu: 16).

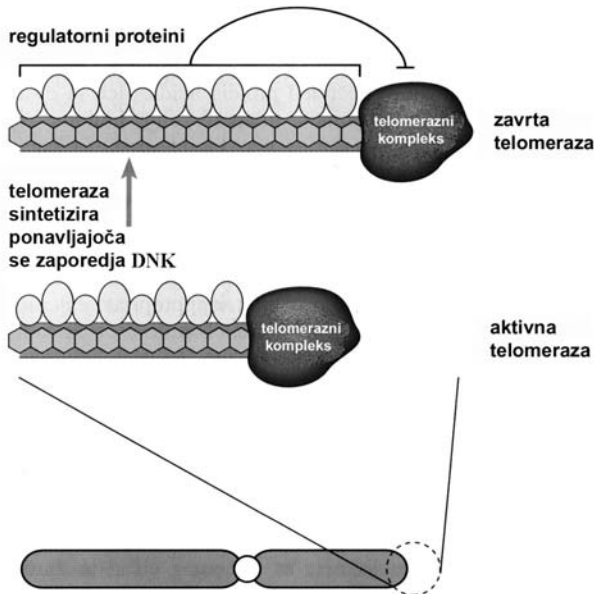
Figure 4: Division potential of human fibroblasts isolated from newborn, 100 year old, and 20 year old patient with Werner's syndrome. Cell capacity to grow to confluence (appr. 1.8×10^6 cells) decreases by the number of population doublings. After certain number of cell divisions, which is different for each of the three conditions, cells stop to divide and remain captured in a final state named cellular senescence. (modified after Dice: 16).

kot tudi zvečano pojavnost benignih in malignih neoplazem. Vzrok smrti, ki tipično nastopi okrog 47 leta, je ponavadi miokardni infarkt ali kaka od oblik raka.

Čeravno se v splošnem Wernerjev sindrom kaže kot pospešeno staranje, je za zdaj težko najti molekularne mehanizme, ki bi povezali osnovno motnjo na ravni RecQ helikaze z znaki staranja. Motnje na ravni podvajanja DNK bi lahko bile vzrok za pogoste maligne spremembe pri teh bolnikih, kožne spremembe, vključno z ulceracijami v področju gležnjev, pa so najbrž posledica zmanjšane delitvene sposobnosti celic. Ostale motnje je težje pojasniti in so najverjetneje sekundarnega značaja. Trenutne raziskave so usmerjene v iskanje povezav med motnjami na ravni podvojevanja DNK in učinki ROS, ki bi lahko pojasnili to stanje; morda bi v tej povezavi lahko imel svojo vlogo prej omenjeni sistem SIRT2. Seveda pa Wernerjevega sindroma ne gre razumeti kot zgolj pospešeno obliko normalnega staranja, saj gre za redko osnovno motnjo, ki je drugi starostniki nimajo.

Povezavo med motnjami na ravni podvajanja DNK in staranjem ponuja tudi koncept skrajšanja telomer. To so kratke, ponavljajoče se

sekvence DNK (TTAGGG), ki tvorijo linearne konce kromosomov in so pomembne: 1) za zagotavljanje kompletnega podvajanja DNK na koncih kromosomov; opisane sekvence zasidrajo kromosome na nuklearni matriks in razmejujejo kodirajočo DNK od končičev kromosomov in: 2) za zaščito kromosomskih koncev pred fuzijo in razgradnjo; telomere preprečujejo kromosomsko nestabilnost, fragmentacijo in prerazporeditev. Delovanje telomeraz je prikazano na sliki 5.



Slika 5: Vloga telomeraze pri "štetju" celičnih delitev. Telomere so kratke, ponavljajoče se sekvence DNK (TTAGGG), ki tvorijo linearne konce kromosomov (spodaj). Za sintezo opisanih sekvenc je odgovoren poseben ribonukleoprotein, imenovan telomeraza, ki stabilizira dolžino telomer tako, da z dodajanjem teh sekvenc podaljšuje njihove konce. Aktivnost telomeraze zavrejo regulatorne beljakovine, ki na neki stopnji omejuje nadaljnje podaljševanje telomer, kar je torej mehanizem, ki zaznava dolžino telomer (zgoraj). V odsotnosti delovanja telomeraz, se z vsako celično delitvijo izgubi nekaj baznih parov telomer, tako da postajajo le-te s postopnimi delitvami vse krajše in krajše dokler na neki stopnji tega skrajšanja, delitev ni več možna. Celica zastane v G1/S fazi celičnega ciklusa in preide v stanje celične ostarelosti. (prirejeno po Cotranu in sod: 17).

Figure 5: The role of telomerase at "counting" cell divisions. Telomeres are short, repeating DNA sequences (TTAGGG), forming linear chromosomal ends at their tips (bottom). These sequences are synthesized by special ribonucleoprotein called telomerase, which stabilizes telomere length by adding new repeats of these sequences. Telomerase activity is inhibited by regulatory proteins which, at certain stage, stop further telomere lengthening, acting in this way as a mechanism sensing telomerase length (top). In the absence of telomerase, telomeres are losing a couple of base pairs after each division so that telomeres become shorter and shorter until, at the certain level of shortening, division is not possible any more. Cell is captured in G1/S phase of cell cycle and enters the stage of cellular senescence (modified after Cotran et al: 17).

Telomerazna aktivnost je izražena v zarodnih celicah, ob nekoliko nižji aktivnosti jo najdemo tudi v nekaterih matičnih celicah, v somatskih celicah pa je ni. Pomen telomeraznega mehanizma pri pojavu celične ostarelosti podpira ugotovitev, da je v nesmrtnih, rakastih celicah, kjer število delitev ni omejeno, telomeraza ponovno aktivna, tako da se v teh celicah telomere ne krajšajo. Pomen telomeraz v procesu staranja po drugi strani zmanjšuje ugotovitev, da ima oksidativni stres večji učinek na hitrost izgube telomer, kot izguba telomerazne aktivnosti (18).

4 Zaključek

Spoznanja, ki so se o patofizioloških mehanizmih staranja nabrala v zadnjih letih, so zanikala prej popularno teorijo, da je staranje genetsko programiran proces. Danes je po splošnem prepričanju proces staranja odsev stohastičnih in torej po slučajnem vzorcu nastalih celičnih sprememb, ki se od posameznika do posameznika dogajajo različno, zaradi česar najdemo tudi glede trajanja starostnega obdobja in dogajanj, ki ga spremljajo, velike individualne razlike. Po drugi strani pa pred sto leti predlagana teorija »hitrosti življenja«, po kateri življensko dobo določa hitrost metaboličnih procesov, vsaj v grobih potezah, še vedno velja. Približno 50 let mlajše ugotovitve, da za okrog 30% znižan vnos kalorij za približno enak odstotek podaljša življensko dobo, so pripeljale do prve mehanistične povezave med hitrostjo metabolizma (pri tem so mišljeni predvsem oksidacijski procesi) in dolžino življenja. Prva, enostavna razlaga, tega pojava, po kateri zmanjšan vnos kalorij zniža raven ROS v celicah, zaradi česar se škodljive spremembe v organizmu nabirajo počasneje in zato ta živi dlje, se ni uspela potrditi v poskusih. Novejše raziskave, ki so jim bile že na voljo moderne molekularno biološke in druge tehnike so po eni strani ugotovile, da raven ROS v celicah ne določa le hitrost njihovega nastanka ampak tudi delovanje encimskih obrambnih sistemov, ki so se kot zaščita pred ROS razvili v celici. Če se raven ROS zaradi neuravnoteženosti med njihovim nastajanjem in njihovim odstranjevanjem zaradi kakršnegakoli vzroka spremeni, pride do proženja kompleksnih mehanizmov, ki v celici uravnavajo metabolne poti in se prek proženja s strani ROS vključujejo v raznih stresnih razmerah. Ti mehanizmi delujejo tudi na ravni genov, kjer prek aktivacije in inaktivacije raznih transkripcijskih dejavnikov, vplivajo na gensko prepisovanje pa tudi podvojevanje in s tem na delitveno sposobnost celic in vrsto drugih procesov, ki so povezani s staranjem. Povezave med procesi staranja in motnjami na ravni DNK so bile ugotovljene tako na ravni samih genov, kjer lahko mutacije enega samega gena močno skrajša ali podaljša življensko dobo, kot tudi na celični ravni, kjer so ugotovili, da je število delitev povezano z aktivnostjo telomeraz. Wernerjev sindrom pa je primer, kjer se dedna motnja na ravni podvajanja DNK, kaže kot hitrejša postaravnost celega organizma.

Med preprostimi živalskimi modeli, kjer je bilo pridobljenega največ znanja o molekularnih mehanizmih staranja in človekom, obstajajo velike razlike, kar vzbuja dvom o možnosti da bi ti mehanizmi na enak način delovali tudi pri človeku. Po drugi strani pa visoka konzervativnost komponent teh mehanizmov v posameznih živalskih vrstah in ugotovitve, da so nekateri od teh mehanizmov v nekoliko preurejeni obliki in v nekoliko drugačni soodvisnosti z drugimi sistemi prisotni tudi pri človeku, vzbujajo upanje, da bi bilo možno z ustreznimi posegi na farmakološki ravni ali kakimi drugimi sredstvi,

vplivati na procese staranja tudi pri človeku. Mnogi raziskovalci pa seveda že zdaj opozarjajo na vrsto etičnih, socialnih in ekonomskih problemov, ki bi jih taki posegi utegnili povzročiti.

Zahvala Avtor se zahvaljuje dr. Katarini Miš, asist. dr. Tomažu Maršu in asist. mag. Marku Jevšku za njihov trud pri izdelavi slik.

5 Literatura

1. Medvedev ZA. An attempt at a rational classification of theories of aging. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 1990; 65: 375 – 398.
2. Kirkwood TBL. Understanding the odd science of aging. *Cell*, 2005; 120: 437-447.
3. Nemoto S, Finkel T. Ageing and the mystery of Arles. *Nature*, 2004; 429: 149-152.
4. Dufour E, Larsson N-G. Understanding aging: revealing order out of chaos. *Biochim Biophys Acta*, 2004; 1658: 122-132.
5. Rattan SI. Aging, anti-aging, and hormesis. *Mech Ageing Dev*, 2004; 125: 285-289.
6. Kirkwood TB, Austad SN. Why do we age? *Nature*, 2000; 408: 233-238.
7. Browner WS, Kahn AJ, Ziv E, Reiner AP, Oshima J, Cawthon RM, Hsueh WC, Cummings SR. The genetics of human longevity. *Am J Med*, 2004; 117: 851-860.
8. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol*, 1957; 2: 298-300.
9. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyperin (hemocuperin). *J Biol Chem*, 1969; 244, 6049-6055.
10. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 2000; 408: 239-247.
11. Weindruch R. Caloric restriction and aging. *Scient American*, 1996; Jan: 32 – 38.
12. Guarente L, Kenyon C. Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature*, 2000; 408: 255-262.
13. Bordone L, Guarente L. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005; 6: 298-305.
14. Martin GM, Oshima J. Lessons from human progeroid syndromes. *Nature*, 2000; 408: 263-266.
15. Epstein CJ, Motulsky AG. Werner syndrome: entering helicase era. *Bioessays* 1996; 18:1025-1027
16. Dice JF. Cellular and molecular mechanisms of aging. *Physiol Rev*, 1993; 73: 149-159.
17. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Cellular pathology II: Adaptation, Intracellular Accumulations, and Cell Aging. In: Robbins pathologic basis of disease. 6th ed. Philadelphia: W.B.Saunders Company, 1999: 31-49.
18. von Zglinicki T. Replicative senescence and the art of counting. *Exp Gerontol*, 2003; 38: 1259-1264.