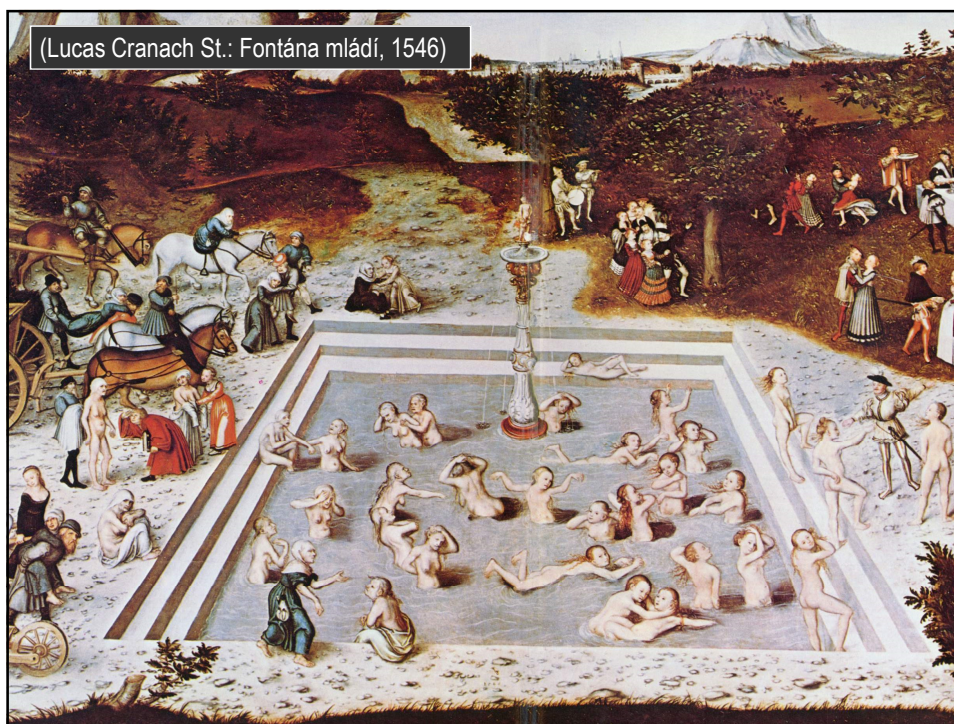


STÁRNUTÍ

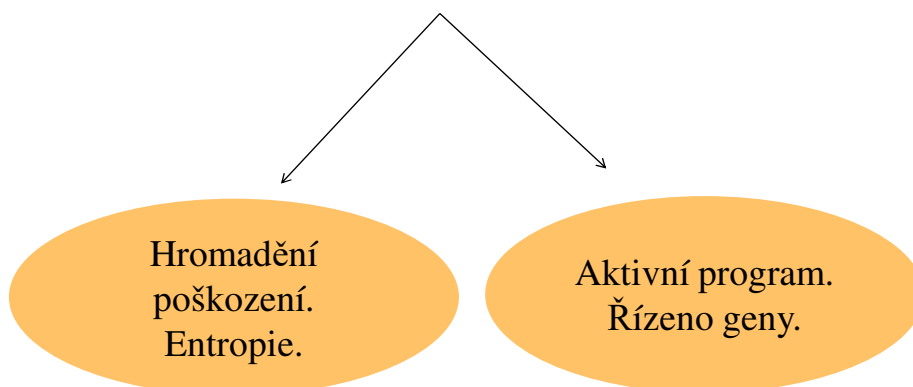
MUDr. Jan Pláteník, Ph.D.
Ústav lékařské biochemie a
laboratorní diagnostiky 1.LF UK



Co je to stárnutí

- Pokles vitality s věkem, vzestup náchylnosti k různým chorobám
- Není chorobou samo o sobě
- U různých živočichů vypadá stejně, ale probíhá různě rychle ... musí být univerzální děj
- Rozlišovat:
 - **Průměrná délka života (naděje dožití):**
 - 2000: muži 71,65 roku, ženy 78,35 roku
 - 1920: muži 47 let, ženy 49,6 roku
 - **Maximální délka života:**
 - U člověka cca 115-120 let, nemění se

K vysvětlení stárnutí formulováno nejméně 28 teorií



Co je to stárnutí

- Dosud žádný důkaz pro stárnutí jako program
- Stochastický proces, na rozdíl od embryogenese není přímo programováno genomem
- Na molekulární úrovni:
 - Neschopnost obnovovat správnou strukturu biomolekul neomezeně dlouho**
 - „systemic molecular disorder“ (Hayflick)
- Důsledky hromadění chyb a reakcí organismu na tyto chyby

Geny se vztahem k dlouhověkosti

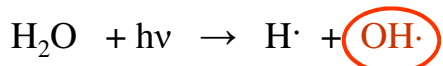
- Odolnost vůči stresu (proti tepelnému poškození, antioxidační ochrana...)
- Energetický metabolismus (insulinová signalizace, kalorický příjem, mitochondriální funkce...)
- Prevence a opravy mutací
- Hormonální homeostáza
- Regulace buněčné proliferace

Zdroje chyb/poškození biomolekul

- Chyby při kopírování/expresi genomické a epigenomické informace
- Biologické postranní reakce ...spontánní, permanentní, neenzymatické, exergonní procesy
 - Oxidace
 - Glykace

Ionizační záření:

Hydroxylový radikál vzniká ionizací vody:



Reaktivní formy kyslíku v organismu:

Jednoelektronovou redukcí kyslíku (mitochondrie, NADPH oxidasa) vzniká **superoxid** $\text{O}_2^{\cdot-}$

Dismutace superoxidu produkuje **peroxid vodíku**:



Fentonova reakce s Fe nebo Cu vytvoří z peroxidu **hydroxylový radikál**:

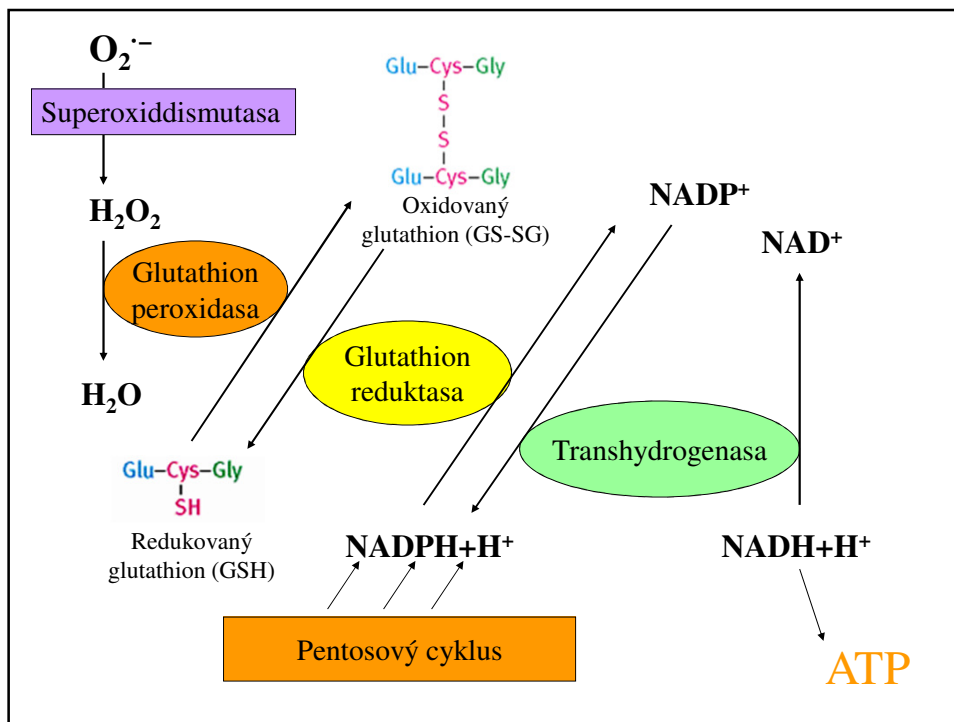


Oxidační poškození biomolekul

- **Lipidy:** peroxidace polynenasycených mastných kyselin v membránách
- **Proteiny:** oxidace -SH, karbonylace -NH₂, hydroxylace/nitrosylace aromatických AMK, zesítnění, degradace
- **Nukleové kyseliny:** zlomy v řetězci DNA, hydroxylace basí ... mutace, kancerogenese

Proč je tak obtížné úplně zabránit či opravit poškození způsobená ROS?

- Příliš mnoho reakcí – některé poškození neumíme opravit
- Omezené množství energie pro antioxidační ochranu a opravy
- **ROS zároveň nezbytné pro buněčnou signalizaci a obranu proti infekcím!**



Antioxidační ochrana V Stresová reakce

Oxidace nebo nitrosylace kritických -SH skupin



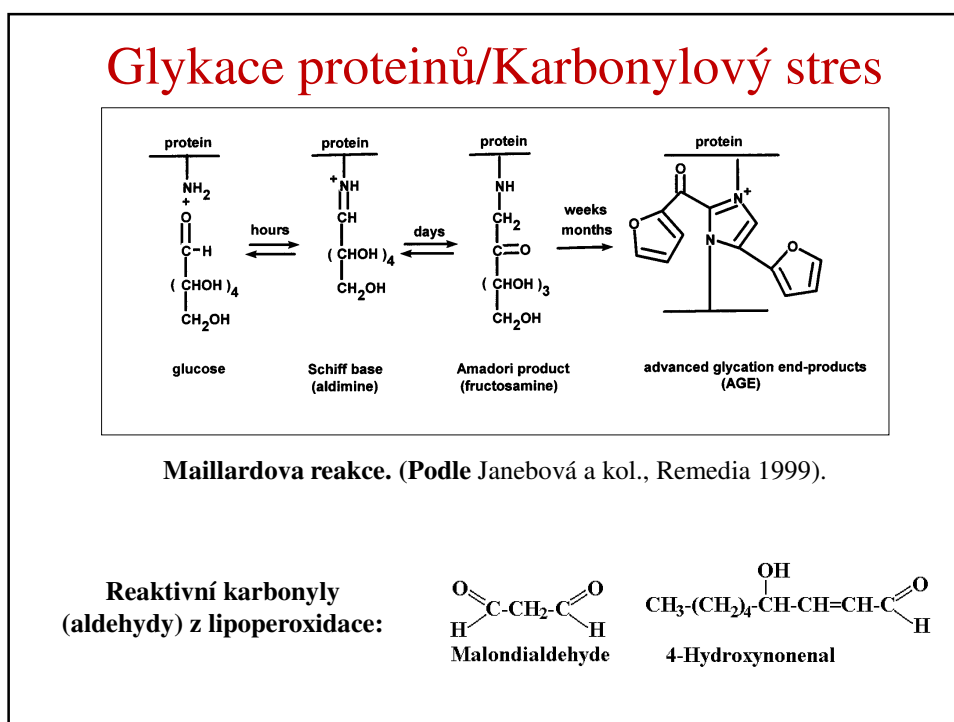
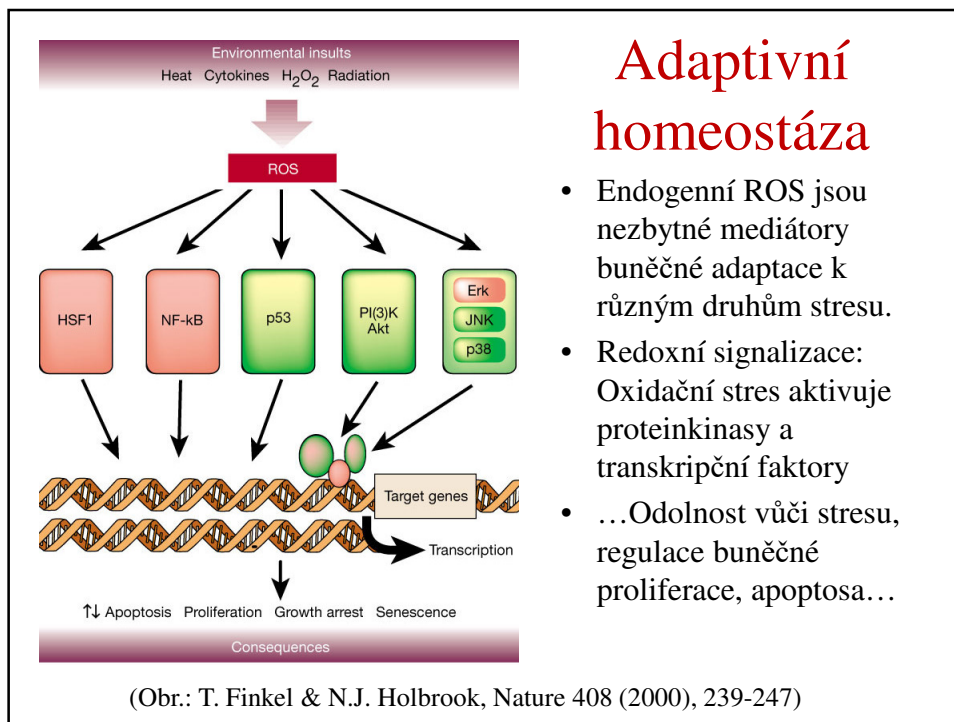
Transkripční faktory (NFκB, Nrf-2...):
aktivace, translokace do jádra

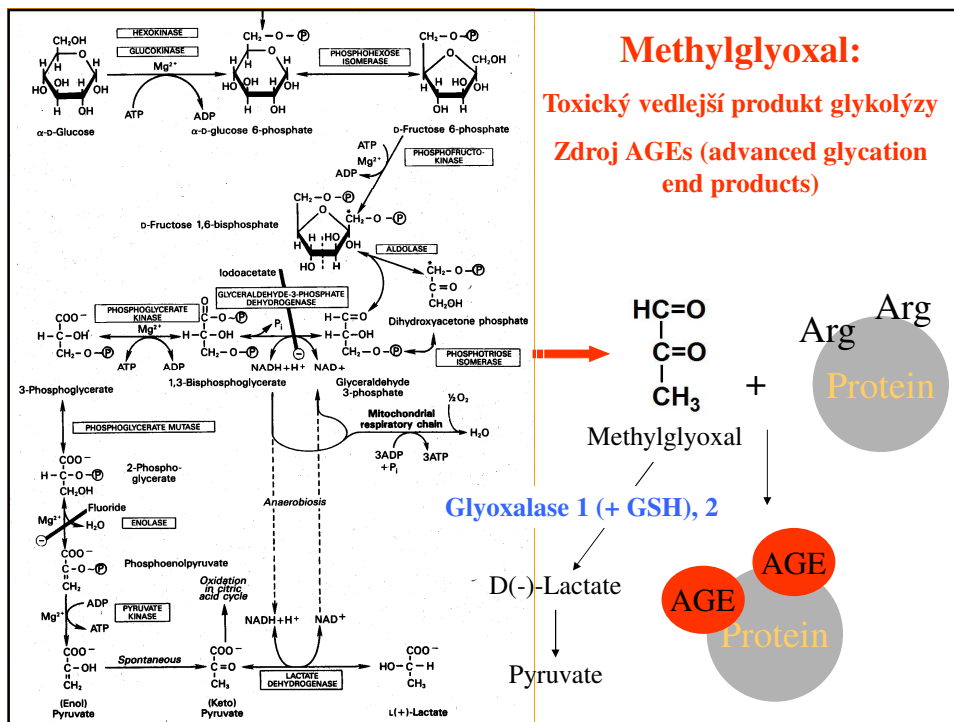


Indukce genové exprese:

- chaperony (heat shock proteiny)
- enzymy antioxidační ochrany
- metalothionein
- hemoxygenasa 1

... → vyšší odolnost vůči
dalšímu oxidačnímu stresu





Důsledky glykace (dikarbonylový stres):

- Zesítnění extracelulárních proteinů → ztuhlost
- Modifikace proteinů → proteasom ↓, špatně složené proteiny ↑, toxické agregáty
- Modifikace dýchacího řetězce → ROS↑, ATP↓
- Modifikace DNA → mutace, zlomy
- RAGE (receptor for AGE) → zánět
- ALE: methylglyoxal zároveň potřebný pro indukci Nrf2 ve stresové reakci!

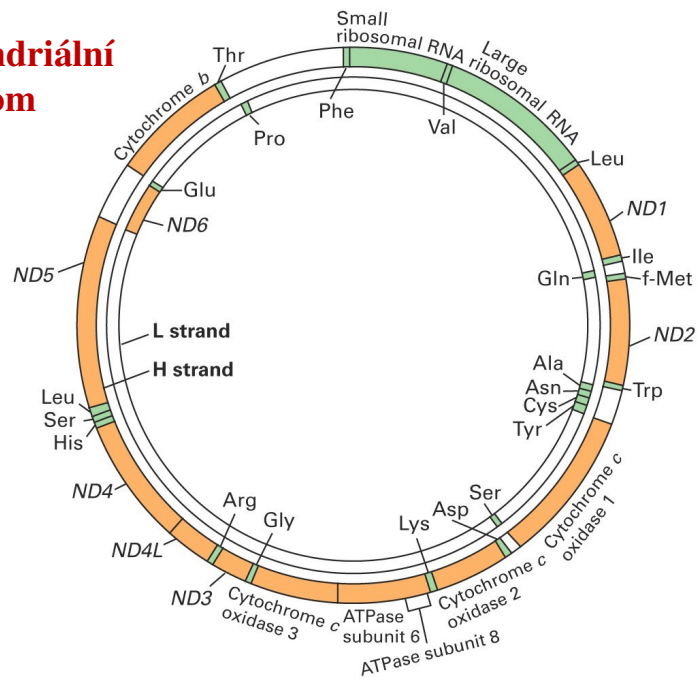
Stárnutí na úrovni buněk a tkání

- Mitochondriální dysfunkce
- Důsledky poškození DNA
- Buněčná senescence
- Změny v epigenomu
- Zhroucení proteostázy
- Zánět

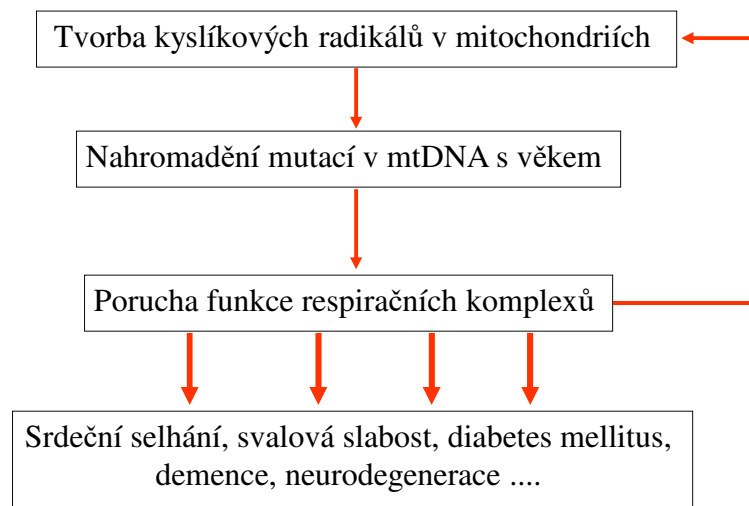
Mitochondriální dysfunkce

- Teoretická východiska:
 - Semiautonomní organely s vlastní mtDNA
 - MtDNA:
 - Mnoho kopií v buňce
 - Replikace nezávisle na buněčném cyklu, žádná rekombinace
 - Somatická buňka nemá mechanismy pro selekci nepoškozených kopií
 - Mitochondrie produkují ROS které mohou poškodit mtDNA
 - Délka života je v určitém vztahu k metabolické aktivitě/spotřebě kyslíku

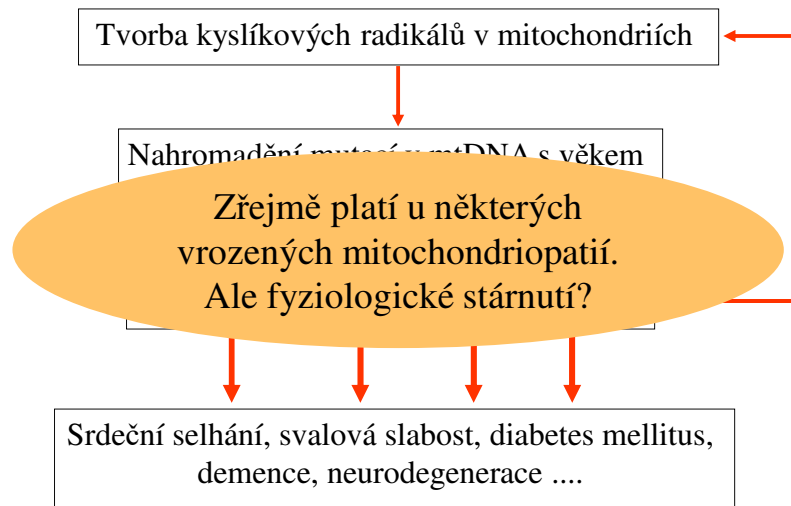
Mitochondriální genom



Bludný kruh oxidačního poškození mitochondrií



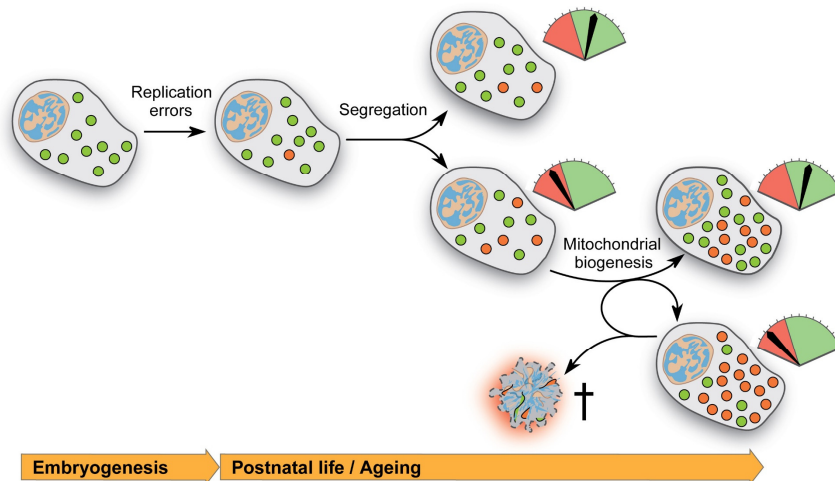
Bludný kruh oxidačního poškození mitochondrií



Mitochondriální dysfunkce

- Počet a funkce mitochondrií klesají s věkem
- V mtDNA se hromadí bodové mutace a delece
- ...ale v důsledku **replikačních chyb** při činnosti mitochondriální DNA polymerázy γ , spíše než ROS
- Ve stáří vzniká mozaikovitý deficit OXPHOS v postmitotických i jiných tkáních

Klonální expanze mutovaných kopií mtDNA vede k mitochondriální dysfunkci ve stáří



ANNIKA RÖHL

Cell Metabolism 2017 2557-71DOI: (10.1016/j.cmet.2016.09.017)

Copyright © 2017 Elsevier Inc. [Terms and Conditions](#)

Většina poškození jaderné DNA je endogenní

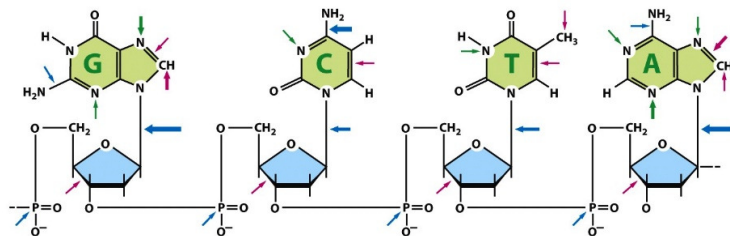


Figure 5-44 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

- Depurinace
- Deaminace cytosinů
- Oxidační modifikace basí (nejcitlivější je G)
- Reakce basí s karbonyly (aldehydy z lipoperoxidací a glykací)
- Neenzymatické alkylace (většinou methylace)
- Jedno- a dvouřetězcové zlomy

Kolik poškození?

- **Abasická místa (depurinace, také v důsledku ROS!):**

2 000-10 000 purinů ztraceno na buňku a den

Steady state 50 000-200 000 poškození na jaterní buňku

- **Hydrolytická deaminace:**

100-500 cytosinů deaminováno na buňku a den,

(pro methyl-C rychlejší, hůře opravováno)

- **Tvorba 8OHdG:**

Kumulativní poškození DNA (8OHdG vyloučený do moči):

140-200 guaninů oxidováno na buňku a den

Steady state 0,07 – 145,25 8OHdG na 10^6 nt

... 168 – 348 000 8OHdG na buňku (...cca 10^5 ?)

R. De Bont & N. van Larebeke: Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* (2004) 19, 169-185.

B. Halliwell & J.M.C. Gutteridge: *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th edition, Oxford University Press 2007

Dvouřetězcové DNA zlomy

- Vzácné (10-50 na buňku a den?)
- Nebezpečné: oprava pomocí NHEJ mění sekvenci!
- Pokud neopraveno: → DNA Damage Response (DDR)

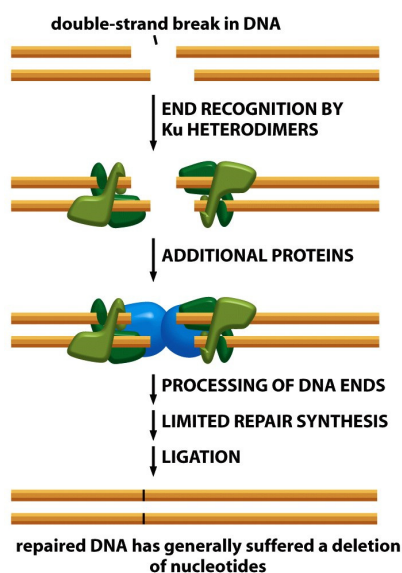


Figure 5-52a Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

DNA Damage Response (DDR)

*Přetrvávající
dvouřetězcové zlomy*

p53
protein

*Zastaví buněčný
cyklus, poskytne
čas na opravu*

Apoptosa

DNA Damage Response (DDR)

Možné výsledky:

*Buňka přežila,
může se dál dělit
(s mutací?)*



...Rakovina

Riziko rakoviny stoupá s věkem

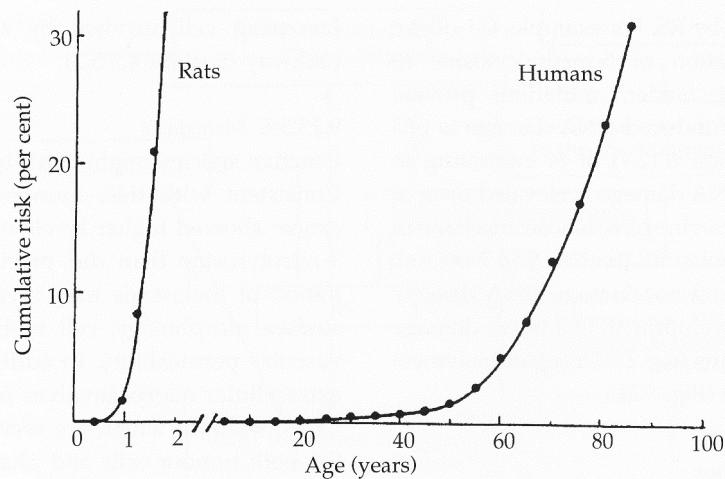


Figure from: B. Halliwell & J.M.C. Gutteridge: Free Radicals in Biology and Medicine, 4th edition, Oxford University Press 2007
(Original source: *Free Radic. Res. Commun.* (1989) 7, 122)

DNA Damage Response (DDR)

Možné výsledky:

*Buňka přežila,
může se dál dělit
(s mutací?)*



....Rakovina



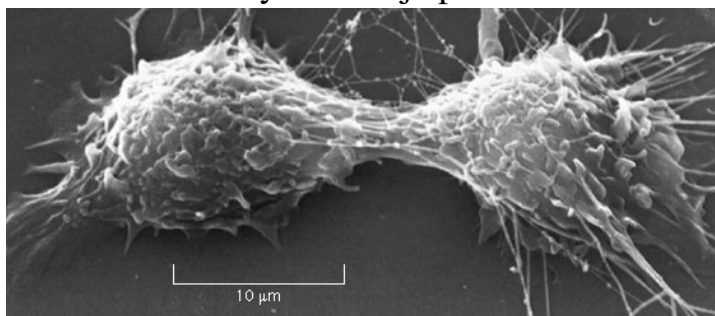
*Buňka odstraněna
apoptosou*



....Deplece
(kmenových)
buněk, atrofie

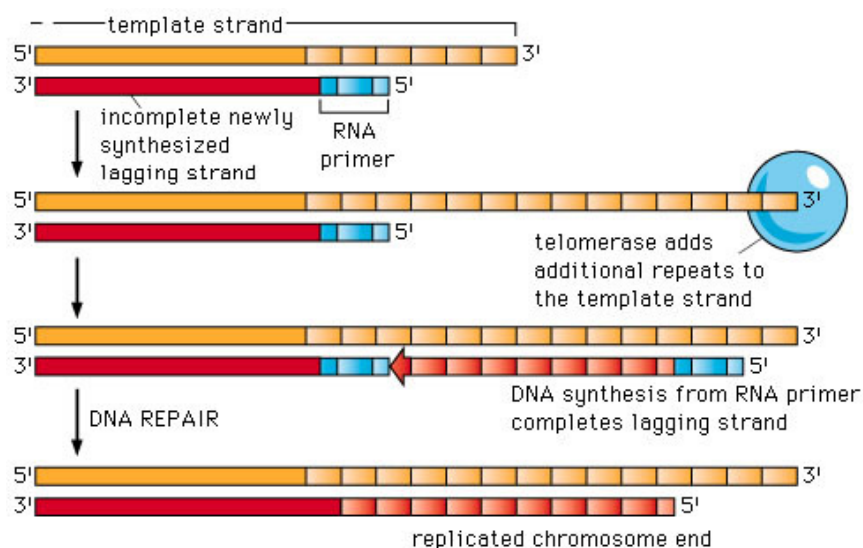
Hayflickův limit

- Lidské fibroblasty v kultuře se dělí maximálně 50-70x, pak vstupují do fenotypu **replikativní senescence**
- Platí pro všechny somatické buňky, ale ne pro nádorové buňky
- U buněk ze starých osob je počet dělení menší



© 1998 GARLAND PUBLISHING

Telomerasa



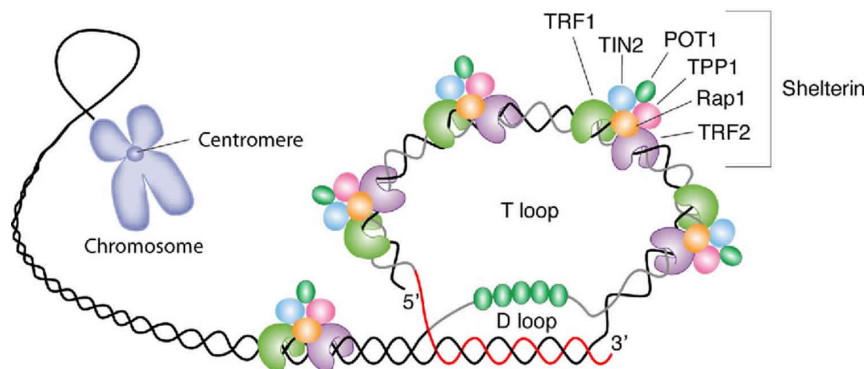
©1998 GARLAND PUBLISHING

Telomerasa není klíč k věčnému mládí !

- Většina buněk lidského těla telomerasu nepotřebuje (dělí se málo nebo vůbec)
- Kmenové, germinální a aktivované imunitní buňky telomerasu mají
- Fibroblasty a epiteliální buňky nikdy Hayflickova limitu nedosáhnou
- Myši somatické buňky telomerasu mají, přesto žije myš kratší dobu než člověk
- K.O. myšního genu pro telomerasu: předčasné stárnutí až po několika generacích, výskyt lidských epiteliálních nádorů (karcinomů)

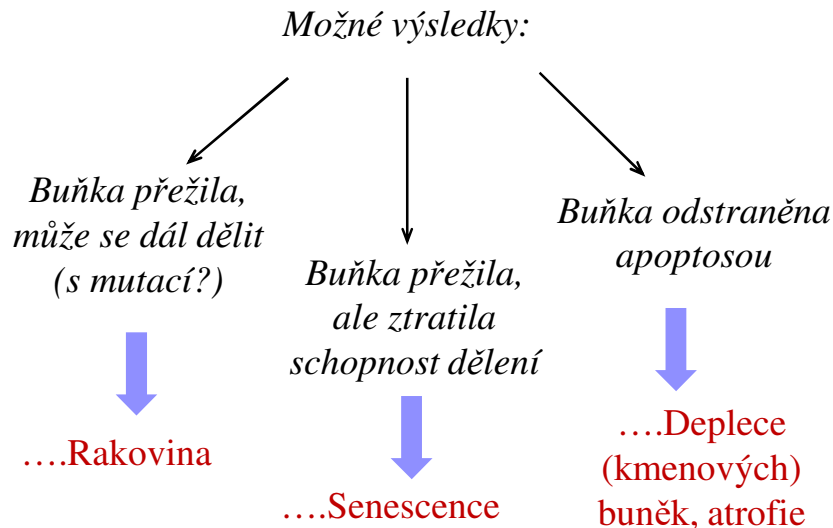
Skutečná úloha telomer ve stárnutí

- (TTAGGG) $_n$...velmi náchylné k oxidaci
- Při zlomu telomery shelterin inhibuje opravu → DDR
- Telomery jsou citlivé **detektory oxidačního stresu!**



Obr.: <https://healthjade.com/telomere/>

DNA Damage Response (DDR)



Buněčná senescence

- Zástava buněčného cyklu, ale buňky přežívají ve změněné podobě
- SASP (Senescence-associated secretory phenotype): prozánětlivé faktory
- Fyziologické role během vývoje a hojení ran
- Hromadění ve stárnoucích tkáních (1-5%) je ale škodlivé
 - Orgánová dysfunkce
 - Mohou podporovat růst nádorů
- Senolytika (léky eliminující senescentní buňky)?

Stárnoucí epigenom

- Regulace genů: vazba transkripčních faktorů, methylace DNA, modifikace histonů, umístění nukleosomů, nekódující RNA...
- Dysregulace s věkem, „značky“ se ztrácejí nebo stávají více náhodné
- → Narušená indukce genové exprese
- → Obecně spíše ztráta heterochromatinu
 - Ektopická exprese
 - Aktivace transpozonů

Zhroucení proteostázy

- Schopnost udržovat zdravý proteom pomocí proteosyntézy, chaperonů a degradace
- **Teoretická východiska: Model Kirkwooda a Kovalda (1995):**
 - Určité množství ROS uniká z mitochondrií a poškozuje ostatní buněčné struktury
 - Prevence tvorby ROS a systémy opravující poškození nejsou nikdy 100 % účinné
 - Mírně poškozené mitochondrie produkují méně energie, než buňka potřebuje
 - V určitém bodě deficit ATP způsobí náhlé zhroucení proteostázy v cytosolu

Zhroucení proteostázy

- Pozdní děj (poslední třetina života), pak ale stárnutí dominuje
- Oxidační poškození proteinů ↑
- Syntéza proteinů ↓
- Degradace ↓
- Chaperony jsou vysycovány poškozenými proteiny
- ...nahromadění špatně složených proteinů a toxických agregátů

Zhroucení proteostázy: Limity autofagie

- Proteiny s dlouhým poločasem a celé organely odstraňovány mechanismy autofagie
- Strávení ne vždy kompletní...postmitotické buňky hromadí ‚odpad‘
- ...→ lysosomální/mitochondriální nedostatečnost

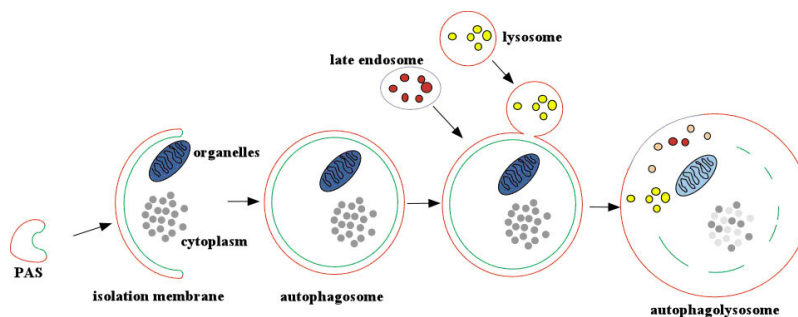
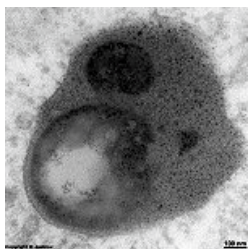


Fig.: <http://cpmcnet.columbia.edu/dept/gsas/anatomy/Faculty/Kessin/autophagy.html>

Stárnutí jako katabolické selhání

Nekompletní degradace v lysosomech, uvolnění Fe z mito, ROS, lipoperoxidace, cross-linking, agregace a polymerace zoxidovaných proteinů a lipidů



↑ LIPOFUSCIN (v lysosomech)
V cytosolu defektní mito a
proteinové agregáty

Deficit hydroláz dodávaných do defektních lysosomů
Poškozené a hypertrofované (obří) mito nelze odbourat

Méně ATP, více ROS, poškozené mito a lysosomy mohou
iniciovat apoptosu..

Obr.: <http://www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/workshop/EM/EMtLyso.html>

Zánět (inflammaging)

- Starý organismus se nachází ve stavu chronického zánětu
- Příčiny?
 - Sekrece senescentních buněk (SASP) a tukové tkáně
 - ↑ mito ROS → trvalá stresová reakce
 - Narušená regulace genů stresové reakce
 - AGE-RAGE interakce
 - ...

Obnova života v přírodě

- Stálé buněčné dělení
- Genetická rekombinace
- Selektce proti mutacím

... Každý organismus závislý na postmitotických buňkách je smrtelný!

... Nejvíce stárnou specializované postmitotické buňky nervové, srdečního a kosterního svalu

... Asi konečný limit trvání našich těl

Je stárnutí nevyhnutelné ?

Nezmar (Hydra)



- Jednoduchý tělesný plán, rychlá a úplná obnova všech somatických buněk z kmenových buněk
- Rozptýlená nervová soustava, žádný mozek ani sval
- Rozmnožování převážně nepohlavní (pučením)
- Žádné známky stárnutí

I kdybychom dokázali totéž uměle (kmenové buňky), náhrada buněk v CNS musí vést ke ztrátě paměti...

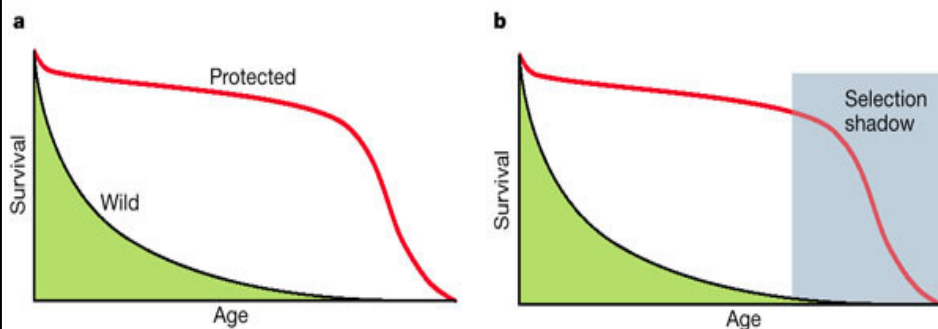
Evoluce stárnutí

Stárnutí jako programovatelná vlastnost organismů, která podporuje jejich evoluci tím, že urychluje střídání generací?

(August Weissman, 1891)

Stárnutí je v přírodě vzácné!

- Drtivá většina divokých zvířat se svého stáří nedožije
....Žádná významná selekce vůči mutacím s negativními účinky v pozdní fázi života



(T.B.L.Kirkwood & S.N. Austad, Nature 408 (2000), 233-238)

Disposable soma theory (tělo na vyhození)

- **Bakterie:** nestárnou za cenu vysoké mortality
- **Vyšší organismy:**
 - Specializace

GAMETY: haploidní (filtr genetických defektů), obrovská redundance a velká selekce, DNA pro další generace.

SOMA: diploidní, trvalejší struktura, která se ale opotřebovává, DNA není určena pro další generace.

Disposable soma theory: Jak dlouho má tělo vydržet?

- V evoluci rozhoduje úspěch v rozmnožování!
- Omezené množství metabolické energie se musí dělit mezi reprodukci a údržbu organismu (**trade-off**)
 - Úmrtnost z vnějších příčin vysoká: lépe investovat víc do reprodukce (r-strategie)
 - Úmrtnost z vnějších příčin nízká: lépe investovat více do udržování organismu (K-strategie)

Katastrofické stárnutí: Tichomořský losos



Živočichové, kteří žijí déle než by měli:
Výjimky ze vztahu délka života – spotřeba kyslíku

- Krunýř



- Křídla



- Vyspělý mozek



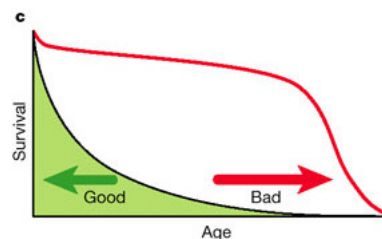
Obr.: <http://www.discovergalapagos.com/tortoise.html>
http://www.ctrl-c.liu.se/ftp/images/animals/misc/*.*
<http://www.african-safari-pictures.com>

Důkazy pro ,trade-off‘ mezi délkou života a plodností

- V laboratoři lze vyselektovat *Drosophily* žijící 2x déle asi po 10 generacích:
 - Asociováno s pozdější reprodukcí, celkový počet potomstva stejný
- Genealogické studie britské aristokracie:
 - Ti, kteří žili nejdéle, měli zároveň největší problémy s plodností

Teorie antagonistické pleiotropie

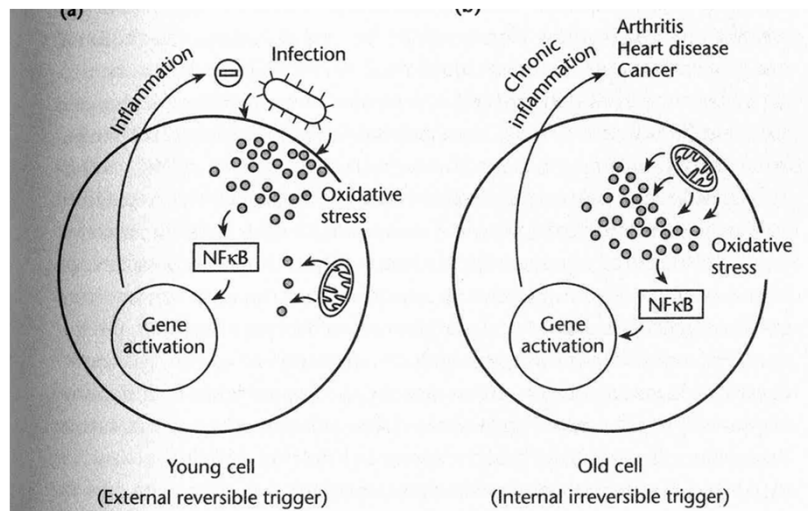
- Geny poskytující výhodu v reprodukci, ale poškozující nositele později



(T.B.L.Kirkwood & S.N. Austad, *Nature* 408 (2000), 233-238)

- Příklady u lidí:
 - Huntingtonova chorea
 - Hemochromatosa

V mládí dobrá obrana proti infekci Chronický zánět/oxidační stres ve stáří ?



Nick Lane: Oxygen. The Molecule that made the World. Oxford University Press 2002

Antioxidanty jako elixíry mládí ?

- Vitamín E (tokoferol)
- Vitamín C (askorbát)
- β -karoten
- Selen



Obr.: <http://www.osel.cz>

Antioxidační potravní doplňky mohou dokonce škodit !

- Meta-analýza celkové mortality v 68 studiích s podáváním antioxidačních potravních doplňků (232 606 účastníků, 385 publikací):
 - β -karoten, vitamín A a vitamín E signifikantně **zvyšují** mortalitu
 - Vitamín C a selen nemají vliv

(Bjelakovic G et al., JAMA 2007; 297: 842-857)

Proč antioxidynty nepomáhají nebo dokonce škodí ???

- Ve vyšších dávkách už nedělají nic
- Působí tam kde nemají
 - Inhibice stresové reakce
 - Brání boji proti infekci, nádorovým buňkám, oprávněné apoptose ?
- Mají i jiné účinky než antioxidační
 - tokoferoly: protizánětlivé
 - β -karoten: ko-karcinogen (dohromady s kouřením nebo environmentálními toxiny)

Kalorická restrikce prodlužuje život

- Omezení množství potravy při zachování její biologické kvality
- Funguje i u teplokrevných živočichů (myš, makak rhesus) s konstantní intenzitou metabolismu
 - Myš žije 28 měsíců, ale omezení potravy na 25% jí prodlouží život na 47 měsíců
- Skutečně prodlužuje maximální délku života, snižuje oxidační stres, výskyt nádorů a zpomaluje stárnutí

Kalorická restrikce prodlužuje život

- Organismus „přečkávající“ nepříznivé období věnuje více metabolické energie na údržbu.
- Mechanismus:
 - Určité potlačení signalizace **IGF-I** (somatomedin C) a **inzulínu**
 - Stimulace **autofagie**
 - **Sirtuiny** – enzymy deacetylující histony, p53 apod., inhibované NADH
- Studie CALERIE na lidských dobrovolnících:
 - Zlepšení kardiometabolického zdraví, nižší markery oxidačního stresu, žádné nežádoucí účinky na náladu, spánek nebo sexuální funkce

HORMEZE

- Mírný stres (teplo, chlad, ozáření, ischemie, oxidanty...) zvyšuje odolnost k dalšímu stresu (...**co tě nezabije, to tě posílí**...)
- Mechanismy: adaptivní homeostáza/stresová reakce
- Příklad u lidí: **fyzická aktivita**
 - ↑ ROS → stresová reakce
 - ↓ ATP → stimulace biogeneze a obnovy svalových mitochondrií
 - ...



<http://www.calpoly.edu/~lcimarel/know.htm>

Dieta bohatá na ovoce a zeleninu (optim. 5x 80 g denně) je spojena s nižším rizikem kardiovaskulárních chorob, diabetu a některých typů rakoviny (plíce, ústa/hltan)

(ale nevíme proč)



Závěr?

- Nesmrtelnost ani věčné mládí nejsou na dosah. Stárnutí je zřejmě nevyhnutelným důsledkem přirozených limitů údržby organismu
- Rychlost stárnutí ale ovlivnit lze:
 - Vyvážená dieta
 - Kalorická restrikce
 - Fyzická aktivita
- Budoucnost ?
 - Senolytika, kmenové buňky, stimulatory autofagie, CR mimetika ... ?

Člověk by neměl zestárnout,
dokud nezmoudří