



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ**

ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ

# **Η ΓΗΡΑΝΣΗ ΟΙ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ ΚΑΙ Η ΗΒΟΤ ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΑ**

**ΓΙΑΤΡΟ ΣΠΥΡΙΔΩΝ ΜΑΡΙΟΣ**  
**ΑΜ: 17014**

**Επιβλέπουσα Καθηγήτρια**  
**Σκουρολιάκου Αικατερίνη**

**Η Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή**

Η Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Αικατερίνη Σκουρολιάκου

Αν. Καθηγήτρια

Ιωάννης Καλατζής

Αν. Καθηγητής

Μίνως Ματσούκας

Επ. Καθηγητής

**ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Ο υπογράφων Γιάτρο Σπυρίδων Μάριος του Βασίλ, με αριθμό μητρώου 48017014 φοιτητής του Τμήματος Μηχανικών Βιοϊατρικής της Σχολής Μηχανικών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της διπλωματικής εργασίας και κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του διπλώματός μου».

15/7/22

Ο Δηλών



## ABSTRACT

It seems like aging at the molecular level is caused by DNA damage that leads to epigenetic alterations. A mechanism that may explain it, is that the enzymes modulating chromatin abandon their sites in order to help polymerases repair the damaged DNA. Noise arises from their absence or their relocation on the wrong site. A gradual consequence of this noise is the loss of our cells identity, tissue dysfunction, susceptibility to other diseases, organ failure and eventually death, during a long-lasting decline of physical ability and quality of life. We can delay the decline by activating the survival related repair mechanisms (autophagy, Unfolded Protein Response (UPR)) via stressors such as calorie and protein restriction, intense exercise (acute depletion of ATP) or we can use drugs that activate those pathways by boosting or inhibiting their enzymes. Boosting heterochromatin enzymes such as sirtuins may prevent loss of epigenetic information by facilitating their double duties. Another approach is the destruction of senescent cells. Combining two senolytics, dasatinib and quercetin, has proven to destroy senescent cells at least in some tissues but toxicity might be an issue that needs extra attention. Because senescent cells have a characteristic phenotype but they try to hide it to fool our immune system, developing a vaccine to target senescent antigens could be a reality soon. However the most promising approach is cellular reprogramming. The discovery of Yamanaka factors was the proof that differentiation can be altered, and stem cells can return to a more pluripotent state. Applying an appropriate combination of factors and for the suitable time, can demethylate the genome, removing epigenomic noise and rejuvenating the tissues, even injured and damaged neurons, as long as there is no excessive genomic instability. However the danger of oncogenesis is highly elevated, that's the nature of cellular regeneration. The greatest mystery in reprogramming is how the cell decides what epigenetic tags it should remove. Despite what the top scientists of the field believe, it could be argued that the removal is not based on a molecule that stores the information from the initial creation of the epigenome. If that molecule existed, it would most likely care about the remethylation and it would have been the DNA itself, recognizing its cell type using signals from neighboring cells and the transcription factors that are expressed, and commanding the appropriate methylation, as it had done previously for embryogenesis. Removal has to be either completely random (in an entropic or spacial way), or it is directed by the methyl tags themselves. A possible theory proposed in this thesis could concern master methyl tags, and initial point removal. Moreover potential mechanisms that explain epigenetic noise are presented. Finally the Hyperbaric Oxygen Therapy and its potential in antiaging is examined, concluding that it seems to have antiaging effects but the alternatives (CR, exercise and Sirt boosters) are more safe and not less effective. An explanation of the paradox that HBOT has the same benefits with hypoxia is also attempted. All in all the field has great potential and further experiments (some in the context suggested in this thesis) could help towards the answer to our questions. This technology will not come cheap though. Less food and exercise cost nothing, and most of the drugs might cost low enough to be vastly accessible, but the efficient and advanced mechanisms (reprogramming, gene editing) are far from affordable.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η καλύτερη ερμηνεία που έχουμε για την γήρανση στο μοριακό επίπεδο είναι πως προκαλείται από βλάβες στο DNA. Πιθανός μηχανισμός δράσης είναι η μετατόπιση των ρυθμιστικών ενζύμων της χρωματίνης, από τις κανονικές τους θέσεις στην θέση που υπάρχει η βλάβη, για να μπορέσουν οι πολυμεράσες να την διορθώσουν. Ο θόρυβος μπορεί να προκύπτει από την απουσία ή την λανθασμένη επανατοποθέτηση που σταδιακά συνεπάγεται απώλεια της ταυτότητας των κυττάρων, δυσλειτουργίες στους ιστούς, ευαισθησία σε άλλες ασθένειες, οργανική βλάβη και τελικά θάνατο, ενώ έχει προηγηθεί μια διαρκής πτώση των σωματικών μας δυνατοτήτων και της ποιότητας της ζωής μας. Μπορούμε να καθυστερήσουμε την παρακμή ενεργοποιώντας επιδιορθωτικούς μηχανισμούς (επιβίωση), όπως η αυτοφαγία και η UPR, με στρεσογόνους παράγοντες όπως η μείωση των θερμίδων και των αμινοξέων στην διατροφή μας και η γυμναστική υψηλής έντασης (απότομη εξάντληση ATP), ή με φάρμακα που ενεργοποιούν τις ίδιες μεταβολικές οδούς, ενισχύοντας ή καταστέλλοντας τα εμπλεκόμενα ένζυμα. Ενίσχυση ενζύμων ρυθμιστών της ετεροχρωματίνης, όπως οι σιρτουίνες, μπορεί να αποτρέψει την απώλεια επιγενετικής πληροφορίας γιατί διευκολύνει την επιδιόρθωση βλαβών και παράλληλα την διατήρηση της ετεροχρωματίνης. Άλλη προσέγγιση είναι η σενόλυση. Ο συνδυασμός Quercetin Dasatinib αποδεδειγμένα μείωσε τον αριθμό των senescent κυττάρων τουλάχιστον σε κάποιους ιστούς, αν και υπάρχει σημαντικός κίνδυνος να προκληθεί τοξικότητα. Χάρης σε κάποια μοναδικά αντιγόνα που όμως δεν τα παρουσιάζουν στο ανοσοποιητικό μας, μπορεί στο μέλλον να αναπτύξουμε εμβόλια που να στοχεύουν στα senescent κύτταρα. Βέβαια η πιο ελπιδοφόρα τεχνική είναι ο επαναπρογραμματισμός του επιγονιδιώματος. Με τους παράγοντες Yamanaka μπορέσαμε και αποδιαφοροποιήσαμε κύτταρα που πλέον μπορούσαν να διαφοροποιηθούν σε οποιαδήποτε κατηγορία. Με τον σωστό συνδυασμό και την κατάλληλη διάρκεια έκθεσης παραγόντων η απομεθυλίωση αφαιρεί τον επιγενετικό θόρυβο, η αποδιαφοροποίηση προωθεί την αναγέννηση ιστών, ακόμα και νευρώνων, με το νέο κύτταρο να είναι απαλλαγμένο από τον φαινότυπο της γήρανσης, εκτός αν υπάρχει αρκετή γονιδιακή βλάβη όπως στα δερματικά κύτταρα. Ωστόσο η ογκογένεση είναι μεγάλο εμπόδιο όντας άρρηκτα συνδεδεμένη με την ανάπλαση των ιστών. Όμως πως το κύτταρο αποφασίζει ποιά μεθύλια να αφαιρέσει; Σε αυτή τη διπλωματική προτείνεται ότι η αφαίρεση δεν γίνεται με βάση κάποιο μόριο μνήμης της αρχικής κατάστασης. Αν υπάρχει μνήμη, θα ενδιαφέρεται μόνο για την επαναμεθυλίωση όπως έγινε και κατά την αρχική διαφοροποίηση, και θα βρίσκεται στο ίδιο το DNA, που όπως και τότε θα ενεργοποιείται από εξωτερικά σήματα και εσωτερικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Η αφαίρεση μπορεί να είναι τυχαία και χωροταξική ή να κατευθύνεται από τα ίδια τα μεθύλια (όπως και η απομεθυλίωση). Επιπλέον στη διπλωματική επιχειρείται μια ερμηνεία του επιγενετικού θορύβου. Τέλος εξετάζεται η ΗΒΟΤ και η προοπτική της στην αντιγήρανση με ελπιδοφόρα αποτελέσματα αλλά συγκριτικά με πιο απλές ενέργειες, τα πλεονεκτήματα της δεν είναι αρκετά για να αιτιολογήσουν την χρήση της αντιγηραντικά. Αναλύεται και το παράδοξο των υποξικών αντιδράσεων κατά την ΗΒΟΤ. Γενικά ο τομέας έχει τεράστια προοπτική, όμως οι εφαρμογές μπορεί να μην είναι οικονομικά προσβάσιμες για πολύ καιρό.

**ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Η Μοριακή Βιολογία της Γήρανσης**

1.1 Οι πρώτες θεωρίες.....	8
1.2 Τα σημάδια του χρόνου.....	10
1.3 Η μαγιά και το γήρας.....	11
1.4 Πειραματικά.....	13
1.5 Το κύκλωμα της γήρανσης.....	15
1.6 Σιρτουίνες και ανώτεροι οργανισμοί.....	17
1.7 Η βιοχημεία του ζεύγους NAD-SIRT.....	19

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Θεραπείες για όλους**

2.1 Διατροφή και Συμπληρώματα.....	23
2.2 Θερμιδικό έλλειμμα.....	25
2.3 Πενία αμινοξέων .....	27
2.4 Σωματική Άσκηση.....	30
2.5 Θερμότητα.....	32
2.6 Biases.....	33
2.7 Βλάβες στο DNA.....	34

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Βιοτεχνολογικές θεραπείες**

3.1 Ρυθμιστές των AMPK/mTOR.....	35
3.2 Εμπόδια.....	38
3.3 Γενετική τροποποίηση.....	39
3.4 Σενόλυση.....	44
3.5 Κυτταρική αναγέννηση, Βλαστοκύτταρα.....	47
3.6 Κυτταρική αναγέννηση, παράγοντες Yamanaka.....	48

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΗΒΟΤ**

4.1 Αρχές υπερβατικής φυσικής.....	50
4.2 Επίδραση στους ιστούς.....	53
4.3 Αντιγήρανση .....	55

**ΑΝΑΦΟΡΕΣ .....**

**ΥΠΟΘΕΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΕΡΕΥΝΕΣ...66**

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Είναι καθολικά αποδεκτό πως το προλαμβάνει είναι προτιμότερο του θεραπεύειν. Ορισμένες συνήθειες μπορούν στατιστικά και συγκεντρωτικά με την πάροδο των χρόνων να προκαλέσουν σοβαρές ασθένειες. Η βέλτιστη αντιμετώπιση είναι ένας υγιεινός τρόπος ζωής, όχι μόνο γιατί αποτρέπει την εκδήλωση παθήσεων, αλλά και γιατί ενισχύει τον καλύτερο μηχανισμό καταστολής τους, το ίδιο το ανοσοποιητικό σύστημα, ένα οργανωτικό αριστούργημα που όμως ακόμη και αυτό μπορεί να εξαπατηθεί, ειδικά όταν εξασθενεί. Το βέβαιο είναι ότι όσο πιο ισχυρό είναι, τόσο πιο ευνοϊκές πιθανότητες έχει να αντιμετωπίσει παθογόνους μικροοργανισμούς, ή και τους ίδιους τους ιστούς του όταν χάνουν την ταυτότητά τους. Με την γήρανση εξασθενεί και αυτό και τα υπόλοιπα συστήματα. Έτσι εύλογα συμπεραίνεται ότι η καλύτερη αντιμετώπιση όλων των επίκτητων προβλημάτων υγείας είναι η αποτροπή της γήρανσης των κυττάρων. Το συντριπτικά μεγαλύτερο ποσοστό των νοσηλευόμενων στα νοσοκομεία είναι ηλικιωμένοι. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η εν εξέλιξη πανδημία. Η αποτροπή της φθοράς αυτής όχι απλά θα προκαλούσε απίστευτη μείωση στο ποσοστό των ασθενών στα νοσοκομεία (τεράστιο οικονομικό βάρος) και θα αύξανε το προσδόκιμο ζωής, αλλά θα βελτιωνόταν και η ποιότητα της ζωής στις μεγάλες ηλικίες που ίσως είναι και πιο σημαντικό ηθικά και οικονομικά γιατί θα μπορούσαν να είναι ενεργοί πολίτες, εργαζόμενοι και πάνω από όλα ευτυχείς. Αλλά πως εμποδίζεται η φθορά; Δεν είναι φυσικό όπως μια μηχανή μετά από πολύ χρήση έτσι και το σώμα να καταστρέφεται; Αυτή είναι μια ξεπερασμένη αντίληψη γιατί παραλείπει το ότι οι οργανισμοί έχουν μηχανισμούς επιδιόρθωσης των φθορών. Ανεξάρτητα όμως, η ανθρώπινη φύση δεν συμβιβάστηκε ποτέ με το φυσικό και δεν το χαρακτήρισε μη αντιμετωπίσιμο. Είναι φυσικό οι άνθρωποι να είναι στην γη, όχι στο διάστημα. Είναι φυσικός ο θάνατος από οποιαδήποτε ασθένεια ή τραυματισμό. Ποτέ όμως δεν είναι αποδεκτό, σε αντίθεση με την γήρανση και αυτό γιατί γενικά δεν πιστεύεται ότι μπορεί να γίνει κάτι για αυτήν. Στην εργασία αυτή θα εξεταστεί η αποτροπή της κυτταρικής γήρανσης που δεν είναι τόσο μακριά βιοτεχνολογικά όσο θεωρείται από την κοινή γνώμη. Σήμερα κιόλας, απλά με κάποιες αλλαγές στον τρόπο ζωής, είναι δυνατή η αντίσταση, ακόμη και η επιδιόρθωση των βλαβών που προκάλεσε ο χρόνος.

Για να θεραπευτεί όμως μια ασθένεια πρέπει πρώτα να γίνει κατανοητή. Έτσι πρώτα θα αναλυθεί το τι γνωρίζουμε για το γήρας σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο και μετά θα συζητηθούν οι αναπτυσσόμενες πρακτικές για την αντιμετώπισή του. Θα εξεταστεί μια διάσημη τεχνική, η υπερβαρική οξυγονοθεραπεία, εξηγώντας τα θετικά, τα αρνητικά, την προοπτική της και τους περιορισμούς της, και με βάση την θεωρία για την κυτταρική γήρανση, θα ερμηνευτούν οι ισχυρισμοί υπέρ της. Στο τέλος θα παρουσιαστούν προσωπικές σκέψεις και προτάσεις, σχετικά με πειράματα που θα μπορούσαν να αντιμετωπίσουν τα ερωτήματα που θα δημιουργηθούν, και θα σχεδιαστούν στο matlab κάποιες απλές μοντελοποιήσεις των βιολογικών θεωριών.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

### Η Μοριακή Βιολογία της Γήρανσης

#### 1.1.A ΟΙ ΠΡΩΤΕΣ ΘΕΩΡΙΕΣ

Ο Αριστοτέλης είπε πως οι άνθρωποι πεθαίνουν για το καλό του είδους, κάτι που θυμίζει φυσική επιλογή, δεκάδες αιώνες πριν αυτή οριστεί. Οι Haldane, Medawar, Williams, θεώρησαν εξελικτικά ότι τα εγωιστικά γονίδια προσδοκούν να μεταβιβάσουν όσο περισσότερα αντίγραφα τους και όσο γρηγορότερα γίνεται, χωρίς να βλάψουν τον οργανισμό. Όσο ο οργανισμός - "ξενιστής" του γονιδίου είναι νέος χρειάζεται να είναι δυνατός ώστε να πετύχουν τον σκοπό τους. Αλλά μεγαλώνοντας επειδή στατιστικά έχουν καταφέρει να πολλαπλασιαστούν, η φυσική επιλογή τον εγκαταλείπει [1].

Ο Kirkwood [2] είπε πως επειδή υπάρχουν περιορισμένα αποθέματα υπάρχουν δύο επιλογές, να αναπτυχθεί νωρίς, να αναπαραχθεί νωρίς και να πεθάνει νωρίς ή να αναπτυχθεί αργά για να δώσει έμφαση στην αυτοσυντήρηση. Αν ένας οργανισμός προσπαθούσε να αναπτυχθεί νωρίς και να ζήσει πολύ, θα είχε ξεμείνει από αποθέματα και θα πέθαινε. Η θεωρία αυτή έχει και φυσικά παραδείγματα. Τα ποντίκια αναπτύσσονται και αναπαράγονται γρήγορα, γιατί κινδυνεύουν να φαγωθούν από θηρευτές όπως ο αετός, ο οποίος όμως μπορεί και ζει περισσότερο γιατί δεν κινδυνεύει να φαγωθεί.

Όμως ενώ αυτές οι θεωρίες είναι γενικά αποδεκτές, δεν εξηγούν τον μηχανισμό της γήρανσης, αλλά γιατί η φυσική επιλογή δεν ήταν ευνοϊκή προς την μακροχρόνια ζωή των οργανισμών, έχοντας παράλληλα τον ανταγωνισμό από τους απογόνους οι οποίοι όντας νεότεροι έχουν και πλεονέκτημα επιβίωσης. Αλλά γιατί; Τι λάθος συσσωρεύεται στα κύτταρα; Αξίζει να αναφερθούν οι πρώτες αν και πλέον ξεπερασμένες θεωρίες, δεδομένου ότι υπάρχουν πρόσφατες πιο ικανοποιητικές [0].

Αρχικά από τις Medawar και Szilard κατηγορήθηκαν οι μεταλλάξεις, δηλαδή η συσσώρευση γενετικών αλλαγών [3]. Θεωρήθηκε ότι οι επιβλαβείς μεταλλάξεις εμφανίζονται αργότερα λόγω της εξασθένησης της δύναμης της φυσικής επιλογής, έχοντας ως αποτέλεσμα την μη επιδιόρθωση, την συσσώρευση και τελικά το λεγόμενο κυτταρικό senescence<sup>1</sup> μιας και ο όρος χρησιμοποιήθηκε πρώτα από αυτούς. Η θεωρία αυτή απέτυχε πειραματικά γιατί ενώ υπάρχει στατιστική σχέση

---

<sup>1</sup> Κυτταρικό Senescence: Η διακοπή της κυτταρικής ανάπτυξης και διαίρεσης του κυττάρου αλλάζοντας πλήρως τις μεταβολικές του λειτουργίες, τον φαινότυπο του (SASP) και κατά συνέπεια την λειτουργικότητα του προκαλώντας δυσλειτουργίες στους ιστούς που συσσωρεύεται και με τα χρόνια σε όλο τον οργανισμό. Θεωρείται ότι εξελικτικά προήλθε γιατί εμποδίζει την καρκινογένεση, όμως η συσσώρευση που εμφανίζεται με τα χρόνια κατηγορείται για ογκογένεση (εξασθένηση της δύναμης της φυσικής επιλογής), καθώς δεν ακολουθείται από απόπτωση (η μη απόπτωση εξηγείται από την αριθμητική ανάγκη κυττάρων σε κάποιους ιστούς λόγω κακής αναγέννησης). Δηλαδή σε μια γειτονιά υγιών κυττάρων το senescence είναι αντικαρκινικό, ενώ σε μια γειτονιά προβληματικών κυττάρων (κυρίως καρκινικών αλλά και προκαρκινικών) ενισχύει την καρκινογένεση με την έκκριση παραγόντων SASP. Μάλιστα τα senescent κύτταρα μπορεί να ξαναξεκινήσουν τις μιτώσεις (μεταγραφικοί παράγοντες Twist) και να γίνουν καρκινικά [Gorgoulis,2010].



καθώς με τα χρόνια προφανώς αυξάνονται οι μεταλλάξεις, δεν γίνεται να προκαλούν την γήρανση, όπως θα εξηγηθεί σύντομα.

Το 1950-60, οι μεταλλάξεις και συνεπώς η θεωρία αυτή ήταν συνδεδεμένη με την ιοντίζουσα ακτινοβολία, η οποία αν και προκαλεί κάποια συμπτώματα της γήρανσης, δεν μπορεί να τα εξηγήσει όλα. Το 1963 προτάθηκε από τον Leslie Orgel ότι οι μεταλλάξεις από τα σφάλματα της αντιγραφής συσσωρεύονται και με τα χρόνια οδηγούν το κύτταρο σε απώλεια της γενετικής του ταυτότητας και συνεπώς στον θάνατο [4]. Άλλη πηγή βλάβης που έχει προταθεί (Harman Denham) είναι οι ελεύθερες ρίζες (Reactive Oxygen Species - ROS) [5]. Θεωρήθηκε ότι τα ελεύθερα ηλεκτρόνια προερχόμενα είτε από φωτοηλεκτρικό φαινόμενο είτε από τις διατροφικές τοξίνες προκαλούν μεταλλάξεις και καταστρέφουν βιομόρια και ιδιαίτερα στα μιτοχόνδρια όπου υπάρχει μεγάλη συγκέντρωση λόγω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Για να ενισχυθεί η θεωρία, ο Denham μεγάλωσε ποντίκια με τροφές πλούσιες σε αντιοξειδωτικά, αλλά τελικά δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση. Στην θεωρία αυτή βασίζονται και πολλά εμπορικά προϊόντα που ισχυρίζονται ότι βοηθούν στην εξουδετέρωση των ROS. Τα περισσότερα από αυτά δεν έχουν καμία επιστημονική βάση, αλλά και κάποια που λειτουργούν όπως η βιταμίνη C που είναι αντιοξειδωτικό και σίγουρα ένα συμπλήρωμα θα αυξήσει την συγκέντρωση της στο κύτταρο, δεν έχει καμία μετρήσιμη επίδραση στην αντιγήρανση. Τουλάχιστον δεν βλάπτουν, όμως εάν μπορούσαν να κάνουν αυτό που ισχυρίζονται ίσως και να έβλαπταν<sup>2</sup>.

Οι μεταλλάξεις μπορούν να καταστρέψουν ένα κύτταρο. Αρκεί μια διαγραφή ή προσθήκη βάσης μέσα στην κωδική περιοχή ενός γονιδίου που εκφράζεται σε ένα κύτταρο αχρηστεύοντας το, με ό,τι αυτό συνεπάγεται. Αδιαμφισβήτητα η γενετική πληροφορία αλλάζει πάρα πολύ από την μέρα της σύλληψης. Όμως εφόσον αυτό γίνεται ελεγχόμενα δηλαδή αργά και όχι ακαριαία όπως σε κάποιον που θα δεχόταν σημαντική δόση ιονίζουσας ακτινοβολίας, ο οργανισμός μας μπορεί να ανταπεξέλθει, να κρατήσει τα καλά αντίγραφα και να πετάξει ή και να επιδιορθώσει τα προβληματικά. Άλλωστε η φυσική επιλογή ισχύει προσαρμοσμένα και για τον ίδιο μας τον οργανισμό. Μόνο που είναι πιο επιθετική, άμεση και βεβαιωμένη συγκριτικά με την φύση.

Το ισχυρότερο παράδειγμα είναι η κλωνοποίηση. Εφόσον γίνεται να κλωνοποιηθεί ένα κύτταρο και αυτό να επαναλάβει έναν πλήρη κύκλο ζωής, τότε οι μεταλλάξεις δεν γίνεται να είναι η αιτία της γήρανσης. Ένα ακόμη καλύτερο παράδειγμα, που συμβαίνει εδώ και εκατομμύρια χρόνια είναι η ίδια η γονιμοποίηση. Τα άωρα γεννητικά κύτταρα δέχονται και αυτά μεταλλάξεις όσο ζούμε. Σίγουρα προστατεύονται πάρα πολύ καλά και αν προέκυπτε γενετική βλάβη ο απόγονος θα πέθαινε, αλλά ακριβώς αυτό είναι και το επιχείρημα.

<sup>2</sup> Όπως εξηγείται στο κεφάλαιο 2, το οξειδωτικό στρες όχι μόνο δεν βλάπτει τον οργανισμό (σε μη ακραίες συχρότητες), αλλά ίσως είναι και ο μόνος εύκολος τρόπος να διατηρηθεί νέος. Μάλιστα υπάρχει έρευνα που καταλήγει στο ότι η πολλή κατανάλωση αντιοξειδωτικών μειώνει το προσδόκιμο. Φυσικά, η βιταμίνη C είναι η πιο διάσημη, απαραίτητη (χωρίς την λήψη της θα πεθαιναμε, με κλασικό σύμπτωμα το σκορβούτο), ευεργετική και με αντιοξειδωτική δράση υδατοδιαλυτή βιταμίνη. Όμως οι μηχανισμοί της αντιγήρανσης είναι πιο πολύ της λογικής ό,τι δεν σε σκοτώνει σε κάνει πιο δυνατό. Από την μία αποτρέπουν την γενετική ζημιά από τα ROS.

Όμως επίσης αποτρέπουν το οξειδωτικό Stress και πιθανώς προκαλούν έμμεσα αναγωγή του NAD<sup>+</sup> σε NADH που όπως θα δούμε στην συνέχεια, είναι το καύσιμο του ίσως πιο σημαντικού ενζύμου για την άμυνα κατά της γήρανσης

## 1.2 ΤΑ ΣΗΜΑΔΙΑ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ

Αργότερα ακολουθήθηκε διαφορετική προσέγγιση. Οι επιστήμονες άλλαξαν τακτική εγκαταλείποντας την αναζήτηση της μιας αιτίας για το γήρας, και θεωρήθηκε ότι απλά είναι το αποτέλεσμα όλων αυτών των αλλαγών που παρατηρούνται κατά το γήρας. Επιτάχυνση των αλλαγών αυτών επιταχύνει και την γήρανση, όμως το αντίθετο μπορεί και να μην ισχύει για τα περισσότερα [6]. Τα σημάδια αυτά είναι η γονιδιακή αστάθεια (δεν είναι το ίδιο με τις μεταλλάξεις και λογικά είναι και η εναρκτήρια αλλαγή που προκαλεί όλες τις άλλες, όπως θα αναλυθεί στην συνέχεια), η μείωση του μήκους στην τελομερική περιοχή<sup>3</sup> (μια ακόμη αιτία γονιδιακής αστάθειας), οι αλλαγές στην επιγενετική πληροφορία που είναι και το κύριο θέμα της εργασίας μου (πιθανώς προκύπτει από την γονιδιακή αστάθεια και όλα τα υπόλοιπα σημάδια προκύπτουν από αυτό), πρωτεόσταση<sup>4</sup>, η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων με αποτέλεσμα να πέφτει η απόδοση τους κυρίως λόγω προβλημάτων στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (αδυναμία δημιουργίας διαφοράς δυναμικού και κατεστραμμένα ένζυμα κυτοχρώματος) για την οποία ευθύνεται και η αστάθεια στο mtDNA που είναι και πιο ευάλωτο από το πυρηνικό που και αυτό κωδικεύει πολλές μιτοχονδριακές πρωτεΐνες αλλά και η πρωτεόσταση που δυσκολεύει την διατήρηση οξειδωτικής ισορροπίας, η αποδιοργανωμένη αναγνώριση βιομορίων μεταβολισμού με κλασικό παράδειγμα την ανοχή στην ινσουλίνη και κατώτερες μεταβολικές οδούς που θα αναλυθούν στο θέμα της διατροφής, οι αλλαγές στην διακυτταρική επικοινωνία δηλαδή στα νευρικά και στα ορμονικά σήματα με αρνητικές συνέπειες όπως η εξάπλωση φλεγμονών γειτονικά με τις κυτοκίνες αλλά ακόμη και σε απομακρυσμένους ιστούς με νευροορμονικά σήματα, μεταφέροντας έτσι τον φαινότυπο της κυτταρικής γήρανσης και το πλέον χαρακτηριστικό σημάδι της, την συσσώρευση senescent κυττάρων. Το άλλο μακροσκοπικό σημάδι είναι η εξασθένηση των βλαστοκυττάρων που συνεπάγεται αδυναμία αναγέννησης των ιστών και συνεπώς όλα τα προβλήματα που αντιμετωπίζουν οι πρεσβύτεροι. Αρκετοί ερευνητές συσχετίζουν το γήρας με την τελομερική ανεπάρκεια και το senescence που όπως εξηγήθηκε είναι εντελώς ανακριβές. Πολλά κύτταρα μπορούν και αυξάνουν το μήκος των τελομερών τους με την τελομεράση. Υπάρχει λόγος που σε κάποια κύτταρα δεν συμβαίνει και για αυτό ανθρώπινη παρέμβαση στα τελομερή πιθανώς

<sup>3</sup> Τελομερική περιοχή: Η απόληξη ενός χρωμοσώματος. Έχουν προστατευτικό ρόλο αποτελούμενα από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες λογικά μη χρήσιμης πληροφορίας ώστε να μην χάνονται χρήσιμες περιοχές κάθε φορά που διαιρείται ένα κύτταρο, καθώς οι απολήξεις μικραίνουν, κάτι που δεν συμβαίνει στα καρκινικά κύτταρα, σε αρχικά βλαστοκύτταρα και στα άωρα γεννητικά. Έτσι ο Hayflick όρισε ένα όριο διαιρέσεων στο οποίο ένα σωματικό κύτταρο δεν θα είναι πλέον ικανό να διαιρεθεί και θα εμφανίσει SASP. Η αιτία αυτού είναι η γενετική αστάθεια που προκαλείται καθώς οι ιστόνες δεν είναι πλέον καλά συνδεδεμένοι με το dna και μη συσπειρωμένο dna αναγνωρίζεται ως σπάσιμο με αποτέλεσμα να μαζεύονται επιδιορθωτικοί μηχανισμοί (όπως οι σιρτουίνες). Μπορεί να ενωθούν οι κοντινές τελομερικές απολήξεις μεταξύ τους που άμα γίνει κυτταρική διαίρεση θα σπάσουν προκαλώντας επιπλέον αστάθεια.

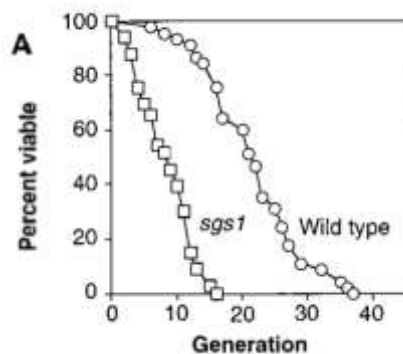
<sup>4</sup> Πρωτεόσταση: Η ομοίωση των πρωτεϊνών, δηλαδή η διαδικασία της ρύθμισης και συντήρησης των πρωτεϊνών μεταμεταφραστικά ώστε να αποκτήσουν και να διατηρήσουν την λειτουργικότητά τους. Αυτό συμπεριλαμβάνει την σταθεροποίηση της τρισδιάστατης δομής όταν αυτή είναι ορθή ή την αναδίπλωση πρωτεϊνών (chaperones) όταν είναι λανθασμένη αλλά και την πρωτεόλυση όταν δεν υπάρχει άλλη επιλογή. Η σχέση τους με την γήρανση είναι πιο εμφανής σε ιστούς που δεν αντιγράφονται πλέον (νευρώνες) και σε παθήσεις όπως το Alzheimer.

δεν θα ωφελήσει, σίγουρα όχι μακροπρόθεσμα, και σε καμία περίπτωση δεν θα διορθώσει την γήρανση γιατί οι αιτίες γονιδιακής αστάθειας είναι πολλές. Το πρόβλημα δεν είναι η εξάντληση από τις πολλές αντιγραφές και τα συμπτώματα. Ωστόσο ανέκαθεν τα συμπτώματα γίνονται αντιληπτά. Άλλωστε παθολογικά, σχεδόν πάντα ο θάνατος προκύπτει από τα συμπτώματα - συνέπειες των ασθενειών, όχι από τον μικροοργανισμό ή τον μηχανισμό της βλάβης. Όμως δεν είναι βιώσιμο να αντιμετωπίζονται μόνο τα συμπτώματα γιατί δεν θα τελειώσουν ποτέ. Η συμβίωση με ένα παθογόνο που τείνει να εξαπλωθεί δεν μπορεί να γίνει μακροπρόθεσμα. Ακόμη και να ήταν εφικτή η συνεχής επιδιόρθωση όλων των βλαβών που προκύπτουν, δεν είναι αποδοτική τακτική. Με απλά λόγια, όταν μια βάρκα βουλιάζει, ο κουβάς δεν θα αποτρέψει την καταστροφή όσο μεγάλος και αν είναι. Η μόνη λύση, αν και ιδιαίτερα δύσκολη, είναι το κλείσιμο της τρύπας. Για αυτό και η αναζήτηση της θεραπείας για την γήρανση δεν μπορεί παρά να ξεκινήσει από την τρύπα.

### 1.3 Η ΜΑΓΙΑ ΚΑΙ ΤΟ ΓΗΡΑΣ

Για να αποκρυπτογραφηθεί η γήρανση πολλοί από τους κορυφαίους ερευνητές της αντιγήρανσης όπως ο David Sinclair και ο Valter Longo ξεκίνησαν την μελέτη τους με έναν μονοκύτταρο ευκαρυωτικό οργανισμό [7]. Αν είναι άλυτο πρόβλημα η αιτία της γήρανσης ενός μύκητα, δεν θα υπάρξει καμία ελπίδα με έναν πολύ πιο σύνθετο οργανισμό όπως ο άνθρωπος.

Ναι, η μαγιά γερνάει και αυτή. Παρόλο που πολλαπλασιάζεται με μίτωση, η κυτταρική της διαίρεση γίνεται ασύμμετρα, συνεπώς ξεχωρίζεται μητρικό και θυγατρικό κύτταρο. Επίσης οι κυτταρικές της λειτουργίες δεν διαφέρουν πολύ από αυτές ενός μέσου (αν και αυτός ο όρος είναι παντελώς εσφαλμένος) ανθρώπινου κυττάρου, όντας ευκαρυωτικός οργανισμός, άλλωστε μοιραζόμαστε το 70% του γονιδιώματος μας με τον μύκητα αυτό. Ο σημαντικότερος λόγος που η έρευνα ξεκίνησε από τον *Saccharomyces cerevisiae* είναι οι προηγούμενες μελέτες που έχουν γίνει σε αυτόν. Είναι ένας από τους πρότυπους οργανισμούς και συνεπώς είναι γνωστά πάρα πολλά για αυτόν, διευκολύνοντας έτσι τα πειράματα. Επίσης είναι εύκολο να κατασκευαστεί ένας γενετικά τροποποιημένος μύκητας. Προφανώς άλλα έξοδα και χρόνο απαιτεί η καλλιέργεια μονοκύτταρων οργανισμών, και άλλα μια μελέτη σε πειραματόζωα που φυσικά ακολούθησαν μετά την αρχική επιτυχία, πόσο μάλλον και σε ανθρώπους. Η μετάλλαξη που μελετήθηκε είναι στην ουσία το αντίστοιχο του συνδρόμου Werner στον μύκητα. Το σπάνιο σύνδρομο αυτό προκαλεί πρόωρη γήρανση, λόγω ενός υπολειπόμενου αλληλόμορφου WRN, με τους ανθρώπους αυτούς να πεθαίνουν περίπου στα 50 έτη. Το αντίστοιχο γονίδιο στον μύκητα λέγεται Slow Growth Suppressor 1. Προϋπάρχουσα γνώση για αυτό ήταν η σχέση του με την παραγωγή dna ελικάσης, που καταλύει την αντιγραφή ανοίγοντας το DNA αλλά και το αποτρέπει από το να σπάσει κυρίως σε σημεία επαναλαμβανόμενων βάσεων που τείνουν να μαζεύονται σε κόμπους. Στα άτομα με προγηρία τα κύτταρα αντιγράφονται κατά 50% λιγότερο. Το μεταλλαγμένο γονίδιο εισήλθε στον μύκητα με ανταλλαγή DNA μέσω υποκινούμενου γενετικού μετασχηματισμού. Μετά από καλλιέργεια και συνεχή παρατήρηση παρατηρήθηκε πως τα μεταλλαγμένα κύτταρα επέζησαν λιγότερο από τις μισές γενιές συγκριτικά με τα φυσιολογικά κατά μέσο όρο (9.5 έναντι 24.5) όπως φαίνεται και στο διάγραμμα.



*εικόνα 1, καμπύλες επιβίωσης μαγιάς με προγηρία και φυσιολογικής*

Το αποτέλεσμα ωστόσο μπορεί να αμφισβητηθεί καθώς η αιτία του θανάτου θα μπορούσε να προκύπτει από την αλλοτρίωση του γονιδιώματος τους. Όμως τα κύτταρα αυτά δεν πέθαιναν απλά πρόωρα, είχαν και σημάδια γήρανσης. Ο κυτταρικός κύκλος μεγάλωνε, το μέγεθος μεγάλωνε και η γονιμότητα έπεφτε. Το γονίδιο της προγηρίας στην μαγιά σχετίζεται με την αποτυχία σίγασης και των δύο γονιδίων που είναι υπεύθυνα για το “φύλο” (HMRa και HMLa) που μπορεί να εμφανίσει το κύτταρο καθώς η μαγιά μπορεί και κάνει ένα είδος σύντηξης με άλλα κύτταρα για την δημιουργία νέων κυττάρων εκτός από την μίτωση. Τα αποτελέσματα της μη σίγασης είναι η έκφραση και των δύο και τελικά η στειρότητα που είναι μια από τις ενδείξεις γήρανσης στην μαγιά όπως και επιβεβαιώθηκε στο πείραμα. Αδυναμία σίγασης παρατηρείται επίσης στην τελομερική περιοχή. Στα νεαρά κύτταρα τις απενεργοποιήσεις αυτές τις ελέγχουν οι σιρτουίνες. Επίσης αποτρέπουν τον ανασυνδυασμό μεταξύ των περιοχών ριβοσωμικού DNA. Έλλειψη στα γονίδια του συμπλέγματος σιρτουινών και στο UTH4 (γονίδιο που ρυθμίζει την θέση της Sir2) συνεπάγεται γήρανση, ενώ η υπερέκφραση τους οδήγησε σε μεγαλύτερο προσδόκιμο ζωής [8]. Η εξήγηση είναι πως το σύμπλεγμα σιρτουινών σχετίζεται με την διανομή των παραγόντων σίγασης από την περιοχή HM και τα τελομερή, στον πυρηνίσκο, για την οποία το UTH4 είναι απαραίτητο. Σε αυτήν την σειρά δημοσιεύσεων έγινε προσπάθεια από τα δεδομένα να δημιουργηθεί μια θεωρία για το τι προκαλεί τελικά τον πρόωρο θάνατο χάρις σε μια σημαντική για την εξέλιξη παρατήρηση. Μετά από χρώση, ο πυρηνίσκος των φυσικά γερασμένων και sgs1 γερασμένων κυττάρων φαίνεται κατακερματισμένος. Συνεπώς ο φαινότυπος της γήρανσης αποδόθηκε στην πυρηνική καταστροφή. Όμως γιατί να μην είναι και αυτό ένα ακόμη σύμπτωμα; Όσες πειραματικές συσχετίσεις και αν παρατηρηθούν, δεν επιβεβαιώνεται καμία θεωρία. Όμως αρκεί ένα αντιπαράδειγμα για να καταρριφθεί. Το βασικότερο σημείο της έρευνας ήταν η ιχνηθέτηση των σιρτουινών οι οποίες από τα τελομερή και τα γονίδια του φύλλου μετανάστευσαν κατά πλειονότητα στον πυρηνίσκο. Έτσι οδηγήθηκαν σε 2 πιθανές ερμηνείες.

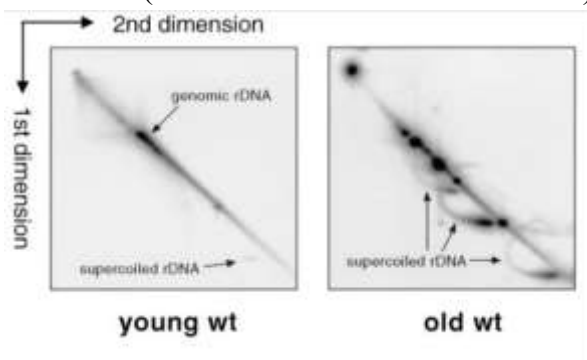
- 1) η διόγκωση και ο κατακερματισμός του πυρηνίσκου προκαλεί το γήρας και οι σιρτουίνες οδηγούνται εκεί ως αποτέλεσμα της ομοιόστασης του κυττάρου για να μετριάσει την ζημιά, ή
- 2) η ανακατανομή των σιρτουινών προκαλεί τον κατακερματισμό προκαλώντας κατά συνέπεια το γήρας. Μάλιστα οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα 1, αφού με την πρόκληση μετάλλαξης που

απενεργοποίησε την πρωτεΐνη Silence Information Regulator 3 (σιρτουίνες) και πάλι παρατηρήθηκε η καταστροφή του πυρηνίσκου. Η αλήθεια είναι πολύ πιο σύνθετη και από τις δύο εκδοχές. Όμως μέχρι να διατυπωθεί έπρεπε να γίνουν πολλά πειράματα.

## 1.4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ

Η εικασία για τα κομμάτια dna στον πυρηνίσκο ήταν ότι είναι κυκλικό rDNA προερχόμενο από την περιοχή μεταγραφής rRNA γιατί καταρχάς σε αυτήν την περιοχή γίνεται η μεταγραφή σε rRNA επίσης γιατί οι έρευνες έδειξαν ότι το σύμπλεγμα σιρτουινών αντιδρά με το rDNA. Για την επιβεβαίωση χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές απομόνωσης του dna [9]. Αυτό έγινε με gel ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων για να γίνει διαχωρισμός όχι μόνο κατά μέγεθος αλλά και με βάση την τοποισομέρια<sup>5</sup> χρησιμοποιώντας χλωροκίνη. Με λίγα λόγια η ηλεκτροφόρηση χωρίζει το DNA ασκώντας τάση καθώς ανάλογα το μέγεθος αλλάζει η τριβή με το μέσο (πόροι αγαρόζης) ενώ ο λόγος φορτίο προς αριθμό βάσεων είναι ίδιος.

Η δεύτερη διάσταση στην οποία ταξιδεύουν χρειάζεται δεύτερη ηλεκτροφόρηση. Σκοπός είναι να διαχωριστούν με βάση την τοποισομέρια δηλαδή να ξεχωρίσουν το τυλιγμένο DNA το οποίο κινείται πιο εύκολα από το ελεύθερο. Η χλωροκίνη λειτουργεί ως intercalator, δηλαδή παρεμβάλλεται ανάμεσα στα νουκλεοτίδια εκτός αν έχουν στροφή ίδιας φοράς με αυτή της διπλής έλικας που σημαίνει ότι είναι πολύ πακεταρισμένα [10]. Συνεπώς το γραμμικό (επειδή δεν κάνει κόμπους εύκολα) δεν επηρεάζεται από την δεύτερη ηλεκτροφόρηση άρα θα κινηθεί με τον ίδιο ρυθμό όπως και στην πρώτη με αποτέλεσμα να δημιουργηθεί μία διαγώνιος πάνω στο επίπεδο. Το κυκλικό DNA λόγω της χλωροκίνης γίνεται λιγότερο πεπλεγμένο και άρα πιο δυσκίνητο. Για να απομονωθεί η αλληλουχία ενδιαφέροντος δηλαδή το rDNA από όλο το υπόλοιπο DNA, χρησιμοποιήθηκε μια ραδιενεργά μαρκαρισμένη συμπληρωματική αλυσίδα του γονιδίου στόχου. Τα νεαρά κύτταρα είχαν σχεδόν εξ ολοκλήρου γραμμικό rDNA και ελάχιστα μικρότερα κυκλικά rDNA με έντονη αρνητική (αντίθετη της έλικας) πέπλεξη. Τα γηραιά είχαν πολλά και έντονα τόξα των αρνητικά πεπλεγμένων rDNA και ένα κομμάτι πάνω αριστερά στην εικόνα που είναι μεγάλο κυκλικό rDNA, τα ονόμασαν ERCs (Extrachromosomal rDNA Circles).



<sup>5</sup> Τοποϊσομέρια του dna: Ακόμα και το ίδιο μόριο dna διαφέρει με κλώνους του ανάλογα με το που και πόσους κόμπους έχει και αν είναι κυκλικό ή γραμμικό. Οι κόμπους που έχουν την ίδια φορά με αυτή της έλικας (δεξιόστροφη) αυξάνουν την τάση της θηλιάς με κίνδυνο να σπάσει. Για αυτό στο ανθρώπινο dna είναι αντίρροπη.



*εικόνα 2, Με gel ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων και χλωροκίνη έδειξαν πως τα κυκλικά rDNA μόρια αυξήθηκαν πάρα πολύ με τους κυτταρικούς κύκλους της μαγιάς [9]*

Η διαδικασία επαναλήφθηκε για τα SGS1 μεταλλαγμένα κύτταρα και τα αποτελέσματα για τα φυσικά γηρασμένα και τα μεταλλαγμένα ήταν σχεδόν πανομοιότυπα.

Το μεγάλο κομμάτι κυκλικού rDNA υποψιάστηκαν ότι είναι concatamer δηλαδή επαναλαμβανόμενη αλληλουχία του ίδιου γονιδίου που αποτυγχάνει να διασπαστεί. Για να το επιβεβαιώσουν το έσπασαν με μία συγκεκριμένη ενδονουκλεάση και είδαν όντως ότι προκύπτει η ίδια αλληλουχία.

Εκτός από το rDNA εξετάστηκε μήπως προκύπτουν και από άλλα γονίδια με συνεχόμενες αλληλουχίες για να δουν αν αυτό είναι η αιτία των εμφανιζόμενων κυκλικών μορίων. Τέτοια είναι τα γονίδια στα τελομερή και ενώ βρήκαν κυκλικό DNA δεν είχε τόσο μεγάλη συγκέντρωση. Αν κάτι είναι αιτία γήρανσης πρέπει να διατηρείται και μετά την αντιγραφή. Για τον λόγο αυτό δημιουργήθηκε ένα πλασμίδιο με ένα αντίγραφο rDNA και ένα marker γονίδιο - χρώση. Παρατηρήθηκε ότι τα πλασμίδια χωρίς το rDNA δεν μπορούσαν να πολλαπλασιαστούν. Επίσης, το πλασμίδιο ενσωματώνεται στο γονιδίωμα αλλά και να προκύπτει από αυτό. Συνεπώς υπάρχει αρχική εξήγηση για το πώς προκύπτουν τα ERCs. Τώρα για το αν συσσωρεύονται πρέπει να παρακολουθήσουν τις γενιές. Μελετώντας τα σημάδια που εμφανίζουν τα μητρικά κύτταρα κατά την μίτωση, που συνεπώς δείχνουν την “ηλικία” - γενιά, βρέθηκε ότι τα κύτταρα που είχαν ενσωματώσει το πλασμίδιο εμφάνιζαν κλασικό μοτίβο μιτωτικής κληρονομικότητας διπλοειδών οργανισμών δηλαδή σε κάθε γενιά τα μισά κύτταρα το είχαν σε σχέση με τα μητρικά τους. Για τα εξωχρωμοσωμικά πλασμίδια όμως είδαν συσώρευση. Δηλαδή όσο πρεσβύτερα τα κύτταρα τόσο εκθετικά μεγαλύτερη συγκέντρωση (που εδώ έχει την μορφή χρωματιστής αποικίας) πλασμιδίων. Έπειτα εξετάστηκε η κληρονομικότητα τους μετά από κάθε διαίρεση. Επιβεβαιώθηκε ότι το πλασμίδιο δεν χωρίζεται με συμμετρική πιθανότητα αφού το 78% των φορών κατέληξε στο μητρικό κύτταρο. Το μοτίβο αυτό αλλάζει μόνο όταν το κύτταρο είναι πολύ γηραιό όπου και ο διαχωρισμός είναι συμμετρικός. Αυτό είναι μια ισχυρή ένδειξη καθώς όπως έχει ήδη ειπωθεί εξηγώντας γιατί οι μεταλλάξεις δεν μπορούν να είναι η αιτία

της γήρανσης, μόνο τα γηραιά κύτταρα δίνουν θυγατρικά με μειωμένο προσδόκιμο.

Στο επόμενο πείραμα επιτεύχθηκε η προσθήκη τεχνητών ERCs με ασύμμετρο τρόπο (ανάλογα το περιβάλλον υπήρχε έκφραση ή όχι ενός γονιδίου πλασμιδίου που ήταν ενωμένο με το ERC). Επίσης εξετάστηκε κατα πόσο με η χωρίς ARS (σύστημα που έχει την πληροφορία για την αυτοαντιγραφή) θα προέκυπταν τα ίδια αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν ότι χρειάζεται και η ασύμμετρη κληρονόμηση και ένα ARS σύστημα για να παρουσιαστεί ο γηραιός φαινότυπος.

Έπειτα έπρεπε να ελεγχθεί κατά πόσο η αφαίρεση των ERCs θα αύξανε το προσδόκιμο. Προσθέτοντας θερμοευαίσθητο γονίδιο στο πλασμίδιο βρέθηκε μια θερμοκρασία που οδηγεί το πλασμίδιο σε αποσύνθεση, χωρίς να επηρεάζεται το χρωμοσωμικό dna. Από αυτό προέκυψε 25% αύξηση στο προσδόκιμο. Έτσι με σχετική ασφάλεια συμπεραίνεται ότι ο κατακερματισμός του πυρηνίσκου προκαλείται από την διόγκωση του λόγω των ERCs.

Πώς όμως αυτό προκαλεί την γήρανση και γιατί παρατηρείται συσχέτιση της έκφρασης σιρτουινών με την μακροζωία παρέμεινε μυστήριο που απαιτούσε και άλλα στοιχεία για να διαλευκανθεί. Με την λογική ότι τα ERCs προκαλούν τον θάνατο, η αποτροπή τους θα δημιουργήσει κύτταρα με μεγαλύτερο προσδόκιμο. Παρατηρήθηκε ότι η μετάλλαξη RAD52 που αποτρέπει τον ομόλογο ανασυνδυασμό αποτρέπει και την δημιουργία ERCs [11]. Άρα τα ERCs για να δημιουργηθούν χρειάζονται την διαδικασία του ομόλογου ανασυνδυασμού (μεταξύ του ίδιου χρωμοσώματος). Όμως τα κύτταρα αυτά όχι απλά δεν ζούσαν περισσότερο αλλά πέθαιναν πολύ πρόωρα. Ίσως επειδή η έλλειψη ομόλογου ανασυνδυασμού καθιστά αδύνατη την επιδιόρθωση βλάβης - σπάσιμο θηλιάς (double strand breaks, DSBs). Αυτό συμφωνεί με την παρατήρηση ότι τα κύτταρα πέθαιναν στην G2/M φάση του κυτταρικού κύκλου. Για τον λόγο αυτό προκλήθηκαν τεχνητά 2 DSBs σε ένα φυσιολογικό κύτταρο, που δεν δύνανται επιδιόρθωσης με ομόλογο ανασυνδυασμό και παρατηρήθηκε το ίδιο αποτέλεσμα. Άρα ενώ ο ομόλογος ανασυνδυασμός σε πρώτη φάση σώζει το κύτταρο από σοβαρή γονιδιακή βλάβη, έχει ως παραπροϊόν τα ERCs όταν συμβαίνει στο rDNA του μύκητα.

Παρατηρήθηκε επίσης ότι το σύμπλεγμα sir3p παρόλη την έλλειψη των ERCs ανακατανέμεται από τα τελομερή και το HMR σε όλο των πυρήνα συμπεριλαμβανομένου του πυρηνίσκου. Μια εξήγηση είναι ότι συμβαίνει λόγω των DSBs. Παρόμοιο εύρημα παρατηρήθηκε και με DSBs που προκλήθηκαν από περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Συνεπώς, μια ερμηνεία ήταν ότι στα φυσιολογικά γηρασμένα κύτταρα, τα ERCs δημιουργούνται από την προσπάθεια επιδιόρθωσης DSB στο rDNA με ομόλογο ανασυνδυασμό, καθώς χωρίς το τελευταίο δεν δημιουργούνται ERCs. Ωστόσο τα RAD52 μπορούν να επιδιορθώσουν τα σπασίματα. Έτσι δεν ξέρουν σίγουρα τι κάνει το σύμπλεγμα σιρτουινών και επιμηκύνει το προσδόκιμο. Άλλες θεωρίες προτείνουν ότι βοηθούν την σίγαση του ανασυνδυασμού στο rDNA, ή ότι καθυστερούν την δημιουργία νέων ERCs ή ότι βοηθούν στο να χωριστούν τα ERCs ποιο συμμετρικά κατά την διαίρεση. Στα θηλαστικά όμως δεν συμβαίνει συχνά ομόλογος ανασυνδυασμός για την επιδιόρθωση σπασίματος, αλλά συμβαίνει ένωση των 2 άκρων. Άρα το αποτέλεσμα δεν θα είναι ERC αλλά διαγραφή. Αυτό παρατηρήθηκε σε ανθρώπους με προγηρία (Werner syndrome), δηλαδή συχνές διαγραφές, όπως και συγκέντρωση της WRN πρωτεΐνης στον πυρηνίσκο. Όμως όπως έχει ήδη εξηγηθεί δεν πεθαίνουμε από τις μεταλλάξεις.

Με την μέχρι στιγμής προσπάθεια εύρεσης ενός μηχανισμού γήρανσης στην μαγιά δεν υπάρχει ξεκάθαρη αλληλουχία γεγονότων. Ενώ υπάρχει συσχέτιση μπορεί να μην είναι αυτή η αιτία ή τουλάχιστον όχι ακριβώς. Γιατί τα ERCs να είναι η αιτία του προβλήματος; Γιατί να μην είναι και αυτά ένα σημάδι της γήρανσης όπως όλα τα άλλα; Μήπως τελικά δεν υπάρχει μία αιτία αλλά είναι όντως το αποτέλεσμα όλων αυτών των ζημιών; Ο Sinclair είχε άλλη άποψη, και σε αυτή του την ιδέα βασίζεται και αυτή η διπλωματική εργασία.

## 1.5 ΤΟ ΚΥΚΛΩΜΑ ΤΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ

Λίγες εβδομάδες αργότερα, ο Sinclair σχεδίασε ένα κύκλωμα που ήταν ικανό, τουλάχιστον θεωρητικά, να τα εξηγήσει όλα. Πριν πάμε όμως εκεί ας δούμε τον εικονικό οργανισμό που

φαντάστηκε για να εξηγήσει την εξελικτική καταγωγή του γονιδιακού κυκλώματος που ως παραπροϊόν του έχει την γήρανση.

Πριν από δισεκατομμύρια χρόνια, μεταξύ των πολλών μικροοργανισμών που ανταγωνιζόταν για την επιβίωση ένας ξεχώρισε. Το φανταστικό αυτό κύτταρο το ονόμασε Magna superstes (μεγάλος επιζήσαντας) και αυτό γιατί είχε αποκτήσει μια ικανότητα που το έκανε να ξεχωρίσει από τα άλλα. Όλα τα κύτταρα, όταν βρίσκονται σε κυτταρικό stress, αναστέλλουν τον κυτταρικό τους κύκλο και θέτουν ως προτεραιότητα την επιβίωση (βέβαια αυτό δεν ισχύει πχ για τα λεμφοκύτταρα σε περίπτωση μόλυνσης, αλλά ισχύει γενικά και για εξελικτικά ανώτερα όντα αν δούμε τον οργανισμό ως σύνολο). Αν οι πόροι είναι λίγοι, δεν σπαταλούνται για την δημιουργία νέων κυττάρων που θα ήταν καταδικασμένα σε λιμοκτονία. Το κύκλωμα αυτό απλοποιημένα έχει ως εξής. Ένα γονίδιο A που σταματάει την αναπαραγωγή ως απάντηση κυτταρικού stress. Ένα 2ο γονίδιο B υπεύθυνο για την σίγαση του A όταν οι καιροί είναι ευνοϊκοί. Ο M. Superstes όμως ξεκίνησε κάτι extra. Αναγνώρισε και την βλάβη στο dna ως stress. Όταν εμφανίζεται βλάβη, η πρωτεΐνη του B αφήνει το A και οδεύει προς την επιδιόρθωση της ζημιάς. Εξελικτικά αυτό του έδωσε μεγάλο πλεονέκτημα καθώς και ο απόγονος και το μητρικό κύτταρο αποκτούν σωστό αντίγραφο του dna, χωρίς πλεονάσματα ή ελλείψεις που θα προέκυπταν κατά την διαίρεση εάν υπήρχε θραύση. Το γονίδιο B στην περίπτωση αυτή έχει διπλό ρόλο καθώς βοηθάει και στην διόρθωση της βλάβης. Αυτό ακριβώς παρατηρήθηκε και στο μικροσκόπιο. Η sirt είναι απόγονος του γονιδίου B. Ο λόγος που συσσωρεύεται στον πυρηνίσκο είναι όντως για να διορθωθεί η βλάβη. Όμως τι κάνουν ακριβώς; Για να γίνει αυτό αντιληπτό πρέπει να μελετηθεί η άλλη και βασική τους λειτουργία, η γονιδιακή ρύθμιση.

Ενώ όλα μας τα κύτταρα έχουν το ίδιο dna, από ιστό σε ιστό διαφέρουν εντελώς μεταξύ τους. Αυτό γιατί εκφράζονται διαφορετικά γονίδια, δίνοντάς τους πλήρως διαφορετική δομή και λειτουργία. Το σύνολο των μη γενετικών παραγόντων που καθορίζουν ποιά γονίδια θα εκφραστούν, χαρακτηρίζονται ως επιγονιδίωμα. Το πιο γνωστό παράδειγμα είναι η μεθυλίωση<sup>6</sup> που εντελώς απλοποιημένα, μαρκάρει τα γονίδια με μια μεθυλομάδα με αποτέλεσμα την σίγαση. Οι σιρτουίνες κάνουν κάτι παρόμοιο. Η sirt2 (στην μαγιά, sirt1 στον άνθρωπο) γνωστή και ως NAD εξαρτώμενη ντεακετυλάση, δηλαδή απο-ακετυλιώνει με την κατανάλωση του NAD+, δρα μεταξύ άλλων στους ιστόνες<sup>7</sup> ξετυλίγοντας τους σε μερικά σημεία, προάγοντας έτσι την μεταγραφή του / των γονιδίων στο σημείο αυτό. Το ίδιο κάνει και στην περίπτωση ζημιάς στο dna. Να σημειωθεί ότι έχει και άλλες ενζυμικές ονομασίες λόγω διαφορετικού μηχανισμού και λειτουργίας όπως μόνο ADP ριβοσυλτρανσφεράση. Η θεωρία λοιπόν που ίσως εξηγήει ολοκληρωτικά την γήρανση έχει ως εξής.

<sup>6</sup> Μεθυλίωση dna: Η προσθήκη μιας μεθυλομάδας συνήθως στον 5ο άνθρακα του κύκλου στην κυτοσίνη. Αποτρέπει τους μεταγραφικούς παράγοντες από το να ενωθούν με το μόριο και συνεπώς την μεταγραφή. Ακολουθείται από ακετυλίωση και μεθυλίωση ιστόνων.

<sup>7</sup> Ιστόνες: Σύμπλεγμα 8 πρωτεϊνών που ενώνεται με το dna για να το μαζέψουν στον μικρό χώρο του πυρήνα δημιουργώντας νουκλεοσώματα και όλα μαζί συνιστούν την χρωματίνη, προστατεύοντας το από κόμπους και σπασίματα. Κάποια ένζυμα αλλάζουν την δομή τους με σκοπό την ρύθμιση της μεταγραφής και της αντιγραφής.



Οι επιγενετικοί παράγοντες (σιρτουίνες) βρίσκονται στην θέση τους (ιστόνες) έως ότου παρατηρηθεί κάποια βλάβη για την οποία είναι αρμόδιοι (σπάσιμο DNA) οπότε και καλούνται στο σημείο (πυρηνίσκος) αφαιρώντας την ακετυλομάδα για να ξετυλιχτεί το dna ώστε να δράσουν τα επιδιορθωτικά ένζυμα. Μετά την επίλυση της βλάβης επιστρέφουν στην θέση τους, όμως η θέση τους αυτή είναι ευαίσθητη στον θόρυβο (μετατόπιση) όντας αναλογική πληροφορία καθώς η θέση τους δεν είναι κβαντισμένη (οπουδήποτε πάνω στην θηλιά). Έτσι σταδιακά με τον χρόνο τα κύτταρα χάνουν την ταυτότητά τους λόγω της ανικανότητάς τους να ρυθμίζουν την έκφρασή τους. Ως αποτέλεσμα έχουμε τα σημάδια της γήρανσης. Αυτή είναι η πληροφοριακή θεωρία για την γήρανση. Άλλη ερμηνεία είναι ότι οι βλάβες συσσωρεύονται και τα ένζυμα δεν προλαβαίνουν να γυρίσουν στην θέση τους. Στην μαγιά φαίνεται από τα πειράματα που αναλύθηκαν ότι ισχύει το 2ο καθώς οι σιρτουίνες είχαν συσσωρευτεί στον πυρηνίσκο. Εάν υπαίτιος είναι ο θόρυβος ή η αποχή ίσως μπορεί να εξεταστεί, πάντως το ένα δεν αναιρεί το άλλο. Πολύ πιθανό είναι η απόπτωση να προκαλείται από την απουσία τους, αλλά ακόμη και αν μπορούσαμε να διορθώσουμε την βλάβη ώστε να επιστρέψουν τα ένζυμα στις θέσεις τους, αυτές να ήταν εσφαλμένες (4\*).

## 1.6 ΣΙΡΤΟΥΙΝΕΣ ΚΑΙ ΑΝΩΤΕΡΟΙ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

Παρόλα αυτά, τα δισεκατομμύρια χρόνια εξέλιξης που χωρίζουν τον άνθρωπο από τους μύκητες μπορεί να έχουν δημιουργήσει χάσμα μεταξύ και του κυκλώματος της γήρανσης. Τα θηλαστικά έχουμε 7 γονίδια σιρτουινών με πολλές περισσότερες λειτουργίες από αυτές της sir2 της μαγιάς. Οι Sirt1,6,7 είναι υπεύθυνες για την επιγενετική ρύθμιση και τις βλάβες στο dna (όπως η sir2 στην μαγιά). Οι Sirt3-5 δρουν στα μιτοχόνδρια ελέγχοντας την παραγωγή και κατανάλωση ενέργειας. Η Sirt2 ελέγχει την μίτωση ή την μείωση του κυττάρου. Όμως τα πειράματα που έγιναν συνέχισαν να στηρίζουν την θεωρία. Όπως και στην μαγιά, η αφαίρεση της Sirt1,6 στα ποντίκια (ομόλογο της sir2 της μαγιάς) είχε ως αποτέλεσμα την ανικανότητα επιδιόρθωσης θραύσεων στο dna. Ομοίως η προσθήκη extra αντιγράφων αύξησε το προσδόκιμο. Σε κύτταρα ποντικών αλλά και ανθρώπων παρατηρήθηκε ότι η Sirt1 μεταναστεύει από τα γονίδια που ρυθμίζει στην περιοχή της βλάβης, με τις μεταγραφικές αλλαγές να παρατηρούνται και στα κύτταρα χωρίς βλάβη (σημάδι συσσώρευσης επιγενετικού θορύβου) [12].

Σε εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικών, η Sirt7 σταθεροποιεί το rDNA [13]. Αναλυτικότερα, η Sirt7 πέραν της αποακετυλίωσης φαίνεται πως καλεί ακετυλοτρανσφεράσες και μεθυλοτρανσφεράσες, συγκεκριμένα την DNMT1 και αυτή την Sirt1 που όλες μαζί κάνουν ετεροχρωματίνη<sup>8</sup> στην περιοχή του rDNA αποτρέποντας τον ομόλογο ανασυνδυασμό του. Με στατιστική σημαντικότητα  $p < 0.05$ , τα πειράματα έδειξαν ότι η απενεργοποίηση της Sirt7 δημιουργεί τμηματοποίηση στον πυρήνα (όπως ERCs στην μαγιά) δηλαδή αυξημένο αριθμό εκτοπισμένων πυρηνίσκων. Η εξήγηση που δίνεται είναι ότι η περιοχή του rDNA έχει αυξημένο stress αντιγραφής και λόγω της αστάθειας

<sup>8</sup> Ετεροχρωματίνη: Οι περιοχές στην χρωματίνη οι οποίες παραμένουν πακεταρισμένες μέσω των επιγενετικών παραγόντων ώστε να μην γίνει μεταγραφή. Το αντίθετο λέγεται ευχρωματίνη.

που δημιουργεί η κακή ρύθμιση με την απουσία της Sirt7 μπορεί να οδηγήσει σε παύσεις την αντιγραφή και εξωτερικοί παράγοντες όπως ακτινοβολία, να δημιουργήσουν DSBs τα οποία επιδιορθώνονται από την αδελφή χρωματίδα (ομόλογος ανασυνδυασμός) αλλά ανάλογα την θέση στον χώρο να γίνει άνισα δημιουργώντας ελλείψη ή διαγραφή. Επίσης η έλλειψη της Sirt7 προκάλεσε απουσία της DNMT1 και της Sirt1 επιβεβαιώνοντας την σύνδεση μεταξύ τους. Η έλλειψη μόνο του DNMT1 είχε παρόμοια αποτελέσματα όμως η έλλειψη και των δυο δεν εμφάνισε περαιτέρω αστάθεια, μια ακόμα ένδειξη της σχέσης τους χωρίς όμως να είναι ξεκάθαρος ο μηχανισμός της. Χωρίς τα ένζυμα αυτά παρατηρείται υπομεθυλίωση στο rDNA (λιγότερες μεθυλιωμένες κυτοσίνες σε υποκινητές του rDNA) και υπερακετυλίωση στους ιστόνες που χαλάει την ετεροχρωματίνη με αποτέλεσμα αστάθεια στο rDNA και σε όλο το γονιδίωμα, που ευθύνεται και για την αυξημένη συχνότητα των κυττάρων που εμφάνισαν ξαφνική “αθανασία” - immortalization<sup>9</sup>, η οποία με την σειρά της συσχετίζει την απώλεια της Sirt7 και με καρκινογένεση (άρα και την γήρανση με αυτήν). Έτσι με ισχυρά διαπιστευτήρια συμπεραίνεται ότι η λειτουργία της Sirt7 αποτρέπει την γήρανση και στον άνθρωπο.

Μια ισχυρότερη ένδειξη ήρθε από τον συσχετισμό της Sirt7 με την καταπολέμηση του κυτταρικού senescence [14]. Καταρχάς είναι δεδομένη η σχέση μεταξύ αστάθειας στο rDNA και senescence, σε ανώτερους οργανισμούς όχι μόνο στην μαγιά, από προηγούμενες έρευνες όπως σε γηραιά αιμοποιητικά κύτταρα αλλά και σε σύνδρομα (Bloom, ataxia) που είναι συνδεδεμένα με πρόωρη γήρανση και γονιδιακή αστάθεια. Προτάθηκε ότι η Sirt7 επηρεάζει την πρόσδεση των δυο πρωτεϊνών του NoRC, (σύμπλεγμα που καταλύει την δημιουργία ετεροχρωματίνης) την SNF2H και την TIP5, με το rDNA που φυσιολογικά είναι συνήθως κατά 50% off. Απουσία οποιασδήποτε από αυτές τις πρωτεΐνες ή της Sirt7 προκαλεί αστάθεια στο rDNA (ελλείψεις και τομές) και κατά συνέπεια senescence, πολύ πριν την εμφάνιση λόγω εξάντλησης από τις πολλές αντιγραφές (τελομερή). Στην ευχρωματίνη η Sirt7 κάνει το αντίθετο από αυτό που συνηθίζεται, δηλαδή βοηθάει να γίνει η μεταγραφή συγκεκριμένα σταθεροποιώντας την RNA πολυμεράση 1 μέσω αποακετυλίωσης της υπομονάδας PAF53. Με την μέθοδο Chromatin Immunoprecipitation (ChIP), μια τεχνική που εξετάζει την σύνδεση μιας πρωτεΐνης με συγκεκριμένες περιοχές στο γονιδίωμα με την χρήση στερεού υποστρώματος αντισωμάτων και της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων, επιβεβαιώθηκε η παρουσία της Sirt7 στους υποκινητές στο προς μεταγραφή rDNA. Για να εξεταστεί αν υπάρχει σε ετεροχρωματίνη, χρησιμοποίησαν [ChIP ChOP](#) (ελέγχει την μεθυλίωση) και είδαν ότι το 60% της Sirt7 ήταν σε ετεροχρωματίνη όπου ήταν και το 100% του NoRC. Ανάλυση επιβεβαίωσε την σύνδεση μεταξύ Sirt7 και SNF2H, TIP5. Υπερέκφραση της Sirt7 οδηγεί σε αύξηση [SNF2H] και του χρόνου ημιζωής της. Επίσης αφαιρώντας την καταλυτικότητα της Sirt7 παρατηρήθηκε η ίδια συμπεριφορά κατά την υπερέκφραση. Παρεμβάλλοντας shRNA, που είναι ειδικό τεχνητό μόριο για μεταμεταγραφική σίγαση, με το mRNA της Sirt7 συνολικά παρατηρήθηκε μέτρια μείωση των SNF2H και TIP5, αλλά όταν ελέγχθηκε συγκεκριμένα στο rDNA και ακόμη περισσότερο στους υποκινητές του, η πτώση στην

<sup>9</sup> Immortalization: Μετά από σημαντική γενετική αλλαγή και αστάθεια το κύτταρο μπορεί να χάσει την "ικανότητα" του να έχει πεπερασμένο αριθμό δυνατών διαιρέσεων. Συχνά αυτό σχετίζεται με την καρκινογένεση.

κατάληψη τους από τις πρωτεΐνες αυτές ήταν τεράστια. Τα ευρήματα δείχνουν ότι η Sirt7 μη ενζυματικά δημιουργεί το ικρίωμα για την SNF2H στην ετεροχρωματίνη του rDNA. Με παρεμβολή shRNA στο SNF2H παρατηρήθηκε λιγότερη μεθυλίωση στο rDNA περισσότερη όμως σε σύγκριση με το αντίστοιχο στην Sirt7.

Η σχέση NoRC και σταθερότητας στο rDNA ήταν γνωστή καθώς μείωση της TIP5 οδήγησε σε λιγότερα αντίγραφα στο rDNA. Με μείωση της Sirt7 το αποτέλεσμα ήταν 50% λιγότερα αντίγραφα και κομματιασμένος πυρηνίσκος. Για να εξεταστεί αν υπήρχαν DSBs αναζητήθηκε η  $\gamma$ -H2AX (φωσφορυλιωμένη μορφή πρωτεΐνης της οικογένειας των ιστόνων που σχετίζεται με τα DSBs) η οποία και βρέθηκε σε αφθονία.

Το σημαντικότερο όμως πείραμα ήταν όταν με την διάσημη ενδονουκλεάση CRISPR Cas9 έγινε ακριβώς το ίδιο πείραμα που στην μαγιά επιβεβαίωσε την σχέση DSBs - γήρανση. Προκλήθηκαν τομές στο γονιδίωμα δημιουργώντας αστάθεια και πρόωρη γήρανση σε ποντίκια. Με την υπερέκφραση όμως της SNF2H μπόρεσαν να το αντιστρέψουν (ακόμη και χωρίς την παρουσία της Sirt7 όμως με siRNA όχι shRNA, που δεν έχει την ίδια αποτελεσματικότητα).

Τελικά βέβαια δημιουργούνται ορισμένα ερωτήματα. Η Sirt7 δρα μόνο μέσω του NoRC ή έχει και άλλους μηχανισμούς, κάτι που θα εξηγούσε γιατί η αφαίρεση της έχει πιο έντονα αποτελέσματα από αυτή της SNF2H. Το DNMT1 δρα με την Sirt7 μέσω του NoRC ή και με τα δυο ανεξάρτητα;

Το σίγουρο είναι ότι οι τομές στο γονιδίωμα προκαλούν την γήρανση και ότι η Sirt7 βοηθάει στην αντιμετώπιση. Το πείραμα αυτό διεξήχθη και από το εργαστήριο του Sinclair στο [Harvard](#) όπου αντί για την Cas9 χρησιμοποίησαν το I-PpoI, που προέρχεται από ένα εγωιστικό γονίδιο μούχλας που δημιουργεί τομές και εισάγει ένα αντίγραφο του, όμως στο κύτταρο του ποντικιού δεν μπορεί να αυτοαντιγράψει και απλά δημιουργεί τομές με ακρίβεια. Υπάρχουν πολλοί τρόποι να δημιουργήσεις σπάσιμο της αλυσίδας όμως για να μην είναι biased το πείραμα, δεν πρέπει να επηρεαστεί τίποτα άλλο στο κύτταρο όπως θα γινόταν με ακτινοβολία. Έτσι το κύτταρο του ποντικιού επιδιορθώνει εύκολα την βλάβη απασχολώντας τις σιρτουίνες στο μεταξύ. Αξίζει να περιγράψει η διαδικασία του πειράματος. Το γονίδιο I-PpoI μαζί με όλα τα ρυθμιστικά στοιχεία για τον έλεγχο του εισήχθη σε ένα πλασμίδιο και μέσω αυτού σε ένα βλαστοκύτταρο ποντικιού το οποίο προστέθηκε στην βλαστοκύστη 90 κυττάρων στην μήτρα μιας ποντικίνας. Τα μωρά ήταν υγιέστατα καθώς το πλασμίδιο ήταν ανενεργό. Τους δώσανε την ονομασία ICE (Inducible Changes in the Epigenome) mice, καθώς οι ρυθμιστικοί παράγοντες στο πλασμίδιο είναι επιλεγμένοι έτσι ώστε να ενεργοποιούν το I-PpoI μόνο όταν καταναλώσουν τροφές με ταμοξιφένη. Τα αποτελέσματα ήταν σύμφωνα με την θεωρία. Τα ποντίκια εκείνα που κατανάλωσαν ταμοξιφένη γέρασαν πολύ πρόωρα ενώ τα άλλα έζησαν κανονικά.

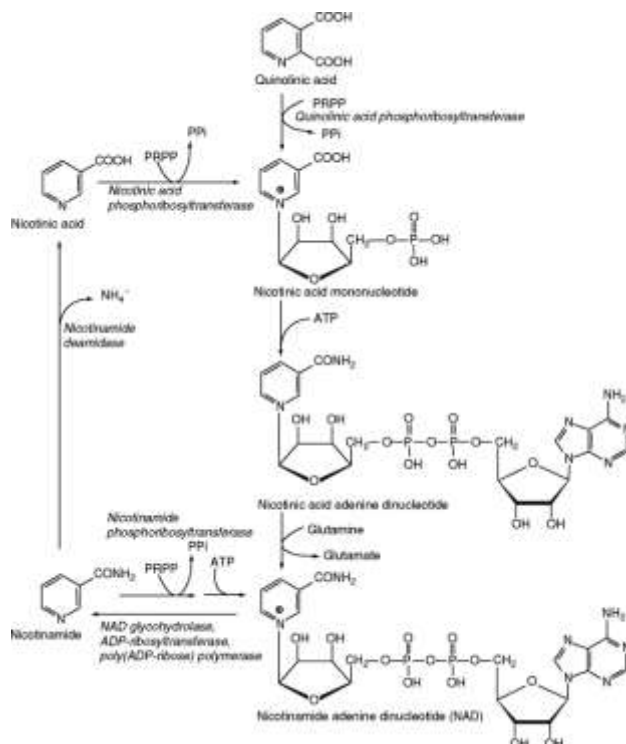
Θεωρώντας λοιπόν ότι αυτή είναι η αρχική αιτία της γήρανσης, τι μπορούμε να κάνουμε για αυτό; Για να μπορέσει να γίνει η όποια παρέμβαση πρέπει πρώτα να γίνει κατανοητή η βιοχημεία του συστήματος.

## 1.7 Η ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΤΟΥ ΖΕΥΓΟΥΣ NAD<sup>+</sup> SIRT

Το νικοτιναμίδο-δινουκλεοτίδιο είναι γνωστό για τον ρόλο του στον μεταβολισμό και ιδίως στην πορεία του κυτταρικού οξέος προς την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Με τις δύο μορφές του NAD<sup>+</sup> NADH προκαλεί οξείδωση ή αναγωγή έχοντας αμέτρητες λειτουργίες όπως στην διακυτταρική επικοινωνία άμεσα ή και μέσω ADP ribosylation σε πρωτεΐνες μεταμεταφραστικά, μια πολύ σημαντική λειτουργία που ρυθμίζει την απόπτωση αλλά και την μετάφραση και μεταγραφή.

Είναι σίγουρο πως για τις σιρτουίνες, για όποια από τις ενζυμικές λειτουργίες τους (deacylase, deacetylase, lipamidase, ADP ribosyltransferase και άλλες) είναι απαραίτητη η χρήση του NAD<sup>+</sup>, όμως ισχύει η εκδοχή ότι δρα ρυθμιστικά για αυτές;

Σίγουρα ισχύει τουλάχιστον για την αποακετυλίωση μέσω της sirt 1-3, μεταφέροντας την ακετυλομάδα από τον ιστόνα στην ADP ριβόζη του NAD<sup>+</sup> με παραπροϊόν ένα νικοτιναμίδιο και Ο-ακετυλ-ADP-ριβόζη. Η κατανάλωση αυτή και πολλών άλλων αντιδράσεων, μετριάζεται εύκολα καθώς το NAD ανακυκλώνεται και παράγεται και de novo, ωστόσο με τα χρόνια η διαθεσιμότητα του NAD<sup>+</sup> ελαττώνεται ([σημάδια γήρανσης](#)). Εκ νέου παράγεται ξεκινώντας από το αμινοξύ τρυπτοφάνη ή το ασπαρτικό οξύ μετατρέποντάς το σε κινολινικό οξύ, σε αυτό προστίθεται μια φωσφοριβόζη παίρνοντας νικοτινικό μονονουκλεοτιδικό οξύ. Με αδενολίωση μέσω τριών ενζύμων NMNAT (αδενολοτρανσφεράση) γίνεται δινουκλεοτίδιο και μετά με αμίδωση της ομάδας του νικοτινικού οξέος μετατρέπεται σε νικοτιναμίδιο και συνολικά σε NAD. Η ανακύκλωση στα θηλαστικά ξεκινά με υπόστρωμα το νικοτιναμίδιο που προκύπτει όταν χρησιμοποιείται NAD<sup>+</sup>. Μέσω του ενζύμου NAMPT (nicotinamide phosphoribosyltransferase) προκύπτει το NMN (nicotinamide mononucleotide) και η συνέχεια είναι γνωστή. Η διαδικασία απεικονίζεται καλύτερα παρακάτω.



*εικόνα 3* Αναλυτικά η μεταβολική οδός της βιοσύνθεσης του NAD, J.L. McBride, ... J.H. Kordower, 2010

Να σημειωθεί ότι σε πολλούς μικροοργανισμούς υπάρχουν μεγάλες διαφορές στην μεταβολική οδό. Επίσης άλλοι δεν ανακυκλώνουν, άλλοι δεν συνθέτουν και υπάρχει και η *Chlamydia trachomatis* που δεν κάνει τίποτα από τα δύο και εξαρτάται πλήρως από το απόθεμα του ξενιστή. Όμως τα ευρήματα που θα περιγραφούν για τα ποντίκια ισχύουν (με παραλλαγές φυσικά) γενικά και για κατώτερους ευκαρυώτες, και σύντομα με τις κλινικές δοκιμές που θα γίνουν, θα επιβεβαιωθεί αν συμβαίνει το ίδιο και σε εμάς.

Με θερμιδικό περιορισμό (CR) αλλά και άλλες αιτίες stress σε ποντίκια, παρατηρείται αύξηση της NAMPT, συνεπώς και ποντίκια με μεγαλύτερο βίο [15]. Το γονίδιο της σύνθεσης του ενζύμου ελέγχεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες CLOCK/BMAL που ελέγχουν την ένταση της έκφρασης των γονιδίων μέσα στην ημέρα (κυρκαδικός ρυθμός) κάτι που κάνει και τις σιρτουίνες κυρκαδικές (πιθανώς υπάρχει λούπα με ανάδραση των σιρτουινών στον υποθάλαμο). Επίσης παρατήρησαν ότι η Sirt1 αποακετυλιώνει την λυσίνη στην θέση 51 της ενδοκυτταρικής NAMPT σε λιπώδεις ιστούς (στους οποίους ακετυλιώνεται) κάνοντας την πιο δραστική και παρακινώντας την έκκριση της προς άλλους ιστούς, επηρεάζοντας τον υποθάλαμο την σύνθεση NAD<sup>+</sup> και τις σιρτουίνες. Αυτό εμφανίζεται έντονα κατά την CR στα ποντίκια. Έτσι δημιουργείται μία ακόμη λούπα με τον υποθάλαμο να ελέγχει μέσω τουλάχιστον της Sirt1 τον λιπώδη ιστό ο οποίος όμως με την έκκριση NAMPT ελέγχει την λειτουργία του υποθαλάμου. Αυτό το μοτίβο θα επαναληφθεί και σε άλλες οδούς στην συνέχεια.

Βέβαια το ερώτημα παραμένει, γιατί ελαττώνεται η συγκέντρωση του NAD<sup>+</sup> ή καλύτερα η σύνθεση του μέσω του NAMPT; Παρόλο που συχνά κατηγορείται το οξειδωτικό stress για τις κυτοκίνες που προκαλούν φλεγμονές και εκφυλιστικές ασθένειες, δεν υπάρχει ξεκάθαρη σχέση



μεταξύ τους, αλλά ακόμη και έτσι να ήταν, τότε το προκαλεί αυτό; Μήπως το κύκλωμα της γήρανσης; Πάντως η ρύθμιση της λειτουργίας των σιρτουινών από το NAD<sup>+</sup> δεν γίνεται να προκύπτει μόνο από την συγκέντρωση του τελευταίου.

Έχει προταθεί επίσης, ότι τα παράγωγα του NAD<sup>+</sup> επηρεάζουν και αυτά στην σχέση. Κυρίως, το παραπροϊόν της αντίδρασης, το νικοτιναμίδιο δρα ως μη ανταγωνιστικός αναστολέας στην Sir2 της μαγιάς και της ανθρώπινης Sirt1 τουλάχιστον *in vitro*. Ομοίως το NADH θεωρείται ανταγωνιστικός αναστολέας, όμως οι συγκεντρώσεις και των δύο δεν φαίνεται να είναι αρκετές για να έχουν σημαντική επίδραση (IC50 >> [*in vivo*]), τουλάχιστον όχι στα θηλαστικά.

Βέβαια η συγκέντρωση του NAD<sup>+</sup> επηρεάζεται και από τους άλλους καταναλωτές του, όπως τα PARPs (πολυ-ADP-ριβόζο πολυμεράσες) και κάποια εξωενζυμα (διακυτταρική επικοινωνία). Η αναστολή τους αύξησε την [NAD<sup>+</sup>] και τον οξειδωτικό μεταβολισμό, λογικά όμως όχι την μακροζωία του κυττάρου καθώς οι PARPs επιδιορθώνουν βλάβες στο DNA, μάλιστα με τα χρόνια η συγκέντρωσή τους αυξάνεται πιθανώς λόγω της συσσώρευσης βλαβών λιγοςτεύοντας το διαθέσιμο NAD<sup>+</sup>. Η ίδια διαδικασία δηλαδή που απασχολεί τις σιρτουίνες, καταναλώνει και τις πρώτες ύλες τους.

Η αυξημένη αναλογία NADH/NAD<sup>+</sup> δημιουργεί την εντύπωση της υποξίας (pseudohypoxia) που ελαττώνει την έκφραση της Sirt1 και αυξάνει την HIF-1α, που το όνομα του προδίδει την λειτουργία του καθώς σημαίνει παράγων που ενεργοποιείται κατά την υποξία, και κανονικά αποακετυλιώνεται (σίγαση) από την Sirt1. Αυτό δημιουργεί μια αλυσιδωτή αναστολή παραγόντων που οδηγούν στην σίγαση του πρωτοογκογονιδίου c-Myc που είναι και γονίδιο του μιτοχονδριακού μεταγραφικού παράγοντα TFAM. Συνεπώς προκαλείται μιτοχονδριακή και μεταβολική δυσλειτουργία. Το ίδιο παρατηρείται και για τα γονίδια PGC-1α και το FOXO1. Η πρωτεΐνη του FOXO1 είναι μεταγραφικός παράγων που αναστέλλει την γλυκονεογένεση και την δημιουργία λιποκυττάρων (adipocytes), ενώ το PGC-1α είναι βασικός ρυθμιστής της βιογένεσης των μιτοχονδρίων και της αυτοφαγίας (ειδικά της μιτοφαγίας) και φαίνεται πως εκτός των άλλων, ενεργοποιείται ως απάντηση στο stress λόγω αφαγίας, κρύου και σωματικής άσκησης. Επίσης φαίνεται πως προκαλεί αύξηση της Sirt3 στα μιτοχόνδρια και UPR (Unfolded Protein Response), μια αλυσίδα για την διατήρηση της ομοιόστασης του κυττάρου ως απάντηση σε ερεθίσματα που θα μελετήσουμε. Η Sirt1 ενεργοποιεί γονίδια απαραίτητα για το UPR και η Sirt3 φαίνεται να είναι μέλος της αλυσίδας του. Η Sirt3 (καλούμενη από το PGC-1α που ρυθμίζει η Sirt1 με αποακετυλίωση) εκκινεί την μιτοφαγία εάν κρίνεται απαραίτητη (λύση των πρωτεϊνών των μιτοχονδρίων) και την έκκριση αντιοξειδωτικών ενζύμων.

Άλλη αιτία UPR είναι η ανισορροπία που προκαλεί η ανεπαρκής έκφραση του μιτοχονδριακού dna συγκριτικά με το προερχόμενο από τον πυρήνα για τα μιτοχόνδρια dna και η ανεπάρκεια των chaperones (πρωτεΐνες που βοηθούν στην σωστή αναδίπλωση άλλων πρωτεϊνών), όπως και όποια συνθήκη που θα προκαλούσε οξειδωτικό stress. Η διαδικασία της UPR είναι ωφέλιμη για το κύτταρο και απ' ότι φαίνεται και για την μακροζωία [16], καθώς ελέγχει την ποιότητα των μιτοχονδρίων και άρα του μεταβολισμού μέσω των πρωτεϊνών που εφόσον δεν εισήλθαν στα μιτοχόνδρια, ενημερώνουν τον πυρήνα μέσω του hsf (Heat Shock Factor) ότι πρέπει να δράσει αναλόγως. Έτσι, παράγονται πρωτεΐνες θερμικού σοκ (hsp) για να διορθώσουν της προβληματικές

πρωτεΐνες (αναδίπλωση, Chaperone function) που ειδάλως αποσυντίθενται από πρωτεάσες. Έχει βρεθεί μετάλλαξη στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων που αύξησε το προσδόκιμο και το UPR στο σκουλήκι *C elegans*, ωστόσο υπάρχει και αντίλογος, ότι δηλαδή το UPR [δεν προσθέτει μακροζωία](#) κάτι που είναι παράλογο γιατί το UPR καταπολεμά ένα από τα βασικά σημάδια της γήρανσης, την πρωτεόσταση που βέβαια είναι περισσότερο σύμπτωμα που προκαλεί και άλλα συμπτώματα και λιγότερο αιτία της γήρανσης. Όπως και να έχει, ο κύκλος οξειδωτικό stress, NAD, Sirt και μηχανισμοί συντήρησης είναι αδιαμφισβήτητος.

Για άλλη μια φορά φαίνεται πόσο αλληλένδετα είναι όλα τα βιομόρια, και αυτό γιατί διατηρούν χημική ισορροπία. Όπως και όταν σε μια αντίδραση η αφαίρεση ενός αντιδρώντος μεταφέρει την χημική ισορροπία έτσι ώστε η συγκέντρωση του να αυξηθεί, έτσι και στα κύτταρα η οποία αλλαγή και βλάβη εξισορροπείται με πολύ πιο σύνθετες αλυσίδες αντιδράσεων. Βέβαια η μετατόπιση της χημικής ισορροπίας δεν μπορεί ποτέ να επαναφέρει την συγκέντρωση του αντιδρώντος. Όμως τα κύτταρα δεν είναι κλειστά συστήματα και το καταφέρνουν. Άρα ποιές εξωτερικές παρεμβάσεις μας βοηθούν στην διατήρηση αυτής της ομοιόστασης;

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### **ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ ΓΙΑ ΟΛΟΥΣ**

Το γήρας κατατάχθηκε και επίσημα σαν ασθένεια το [2018](#) κάτι που για όσους δεν θεωρούν την γήρανση ως κάτι το αποδεκτό είναι μια καθυστερημένη νίκη. Όπως για κάθε ασθένεια έτσι και εδώ είναι χρέος της επιστημονικής κοινότητας να βρεθεί η θεραπεία. Το εάν αυτό είναι ορθό βιοηθικά, είναι για κάποιους αμφιλεγόμενο. Με τον ερχομό των τεχνολογιών της αντιγήρανσης οι ιδεολογικές, οι κοινωνικές και οι οικονομικές αλλαγές είναι αναπόφευκτες. Οι κυβερνήσεις ίσως χρειαστεί να γίνουν πιο αυταρχικές εάν οι πολίτες δεν θα συμμορφωθούν με την νέα πραγματικότητα. Ίσως αυτό γίνει πολύ νωρίτερα ανεξάρτητα της αντιγήρανσης για να αποφευχθεί η κλιματική καταστροφή. Όσο για την κοινωνική διάκριση που πάντα προκύπτει στην συζήτηση όταν το θέμα αφορά την γενετική και την μοριακή βιολογία, προφανώς και οι πρώτοι που θα δεχθούν αυτά τα προνόμια θα είναι οι πλούσιοι επενδυτές και σίγουρα έπειτα θα θελήσουν να κερδοφορήσουν από την επένδυση, όμως το προϊόν - υπηρεσία, εφόσον δεν περιορίζεται από την διαθεσιμότητα των πρώτων υλών, μεγιστοποιεί το κέρδος του όταν πωλείται μαζικά. Επίσης, τουλάχιστον για τώρα, θα δούμε ότι το να διατηρείσαι νέος όχι απλά δεν σου κοστίζει, σου γλυτώνει και χρήματα. Στην τελική όμως, είναι απαράδεκτο ένας τόσο σπουδαίος στόχος να καθυστερεί λόγω συντηρητικής νομοθεσίας.

Σύμφωνα με το προηγούμενο κεφάλαιο στο οποίο βασίζεται αυτή η ενότητα, εύκολα προκύπτουν κάποιες ιδέες για την μάχη κατά της γήρανσης. Η πιο προφανής προσέγγιση είναι η αύξηση της έκφρασης των σιρτουινών. Προηγουμένως ειπώθηκε ότι στην μαγιά η προσθήκη extra αντιγράφων της Sir2 αυξάνει το προσδόκιμο. Ωστόσο αυτό δεν είναι εύκολα πραγματοποιήσιμο σε έναν άνθρωπο. Ίσως είναι εφικτό για ένα ζυγωτό αλλά και σε αυτήν την περίπτωση χρειάζεται

περισσότερη μελέτη για το πώς και τι θα τοποθετηθεί αλλά και πως πότε και πού θα ενεργοποιηθεί το [γονίδιο](#). Βέβαια υπάρχουν άνθρωποι που είναι ευλογημένοι γονιδιακά σε ότι έχει να κάνει με την μακροζωία, χάρις σε αλληλόμορφα που θα αναλυθεί αργότερα. Όμως όλα αυτά δεν είναι στο χέρι μας. Τι μπορούμε να κάνουμε εμείς για τον οργανισμό μας;

## 2.1 ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΑ

Η δεύτερη προκύπτουσα ιδέα είναι η αύξηση του NAD<sup>+</sup> (έμμεση αύξηση Sirt). Η πιο δημοφιλής μέθοδος (δεν έχουν γίνει ακόμα οι κλινικές δοκιμές) είναι με κάποιο συμπλήρωμα από τα πρόδρομα μόρια που αναφέρθηκαν, με καλύτερη επιλογή το NMN (Nicotinamide mononucleotide) καθώς παράγεται εύκολα και απορροφάται γρήγορα και αποτελεσματικά, ενώ φαίνεται να έχει προτερήματα που δεν εντοπίζονται στο NR (nicotinamide riboside) αν και το NR είναι εκείνο που έχει αποδεδειγμένα αποτελέσματα στα ποντίκια. Ορθώς βέβαια πολλοί επιστήμονες διαφωνούν με την χρήση συμπληρωμάτων διατροφής και αντί αυτών προτείνουν τροφές. Κάποιες τροφές πλούσιες σε NMN ή NR, τα οποία τα κύτταρα μπορούν και μετατρέπουν από την μια μορφή στην άλλη όταν χρειάζεται, είναι το αβοκάντο, το μπρόκολο, το λάχανο, τα γιαπωνέζικα φασολάκια και άλλα. Ενδεχομένως οι συγκεντρώσεις να μην είναι αρκετές για να προκύψουν τα επιθυμητά αποτελέσματα και όπως και στην περίπτωση των συμπληρωμάτων, δεν είναι σίγουρο ότι τελικά ο οργανισμός καταφέρνει να τα χρησιμοποιήσει. Ίσως είναι απαραίτητο να συνδυαστεί με άλλες ενώσεις που θα βοηθήσουν στην απορρόφηση του. Επιπλέον, η κατανάλωση NMN, NR και eNAMPT αυξάνει όντως το NAD<sup>+</sup> στα κύτταρα; ή μήπως ο λόγος της πτώσης δεν επηρεάζεται από τα πρόδρομα μόρια παραμόνο κατά την έλλειψη τους; Τα αποτελέσματα σε πειράματα με ποντίκια είναι ξεκάθαρα [\[1\]](#), ωστόσο αυτό δεν σημαίνει ότι θα λειτουργεί εξίσου αποτελεσματικά και σε εμάς. Άλλωστε η απορρόφηση ουσιών διαφέρει και από άνθρωπο σε άνθρωπο, πόσο μάλλον από άλλα είδη. Πάντως φαίνεται πως το κύκλωμα της γήρανσης επιβεβαιώνεται για μια ακόμη φορά. Μελέτη σε σκελετικούς μύες ποντικών [\[1β\]](#) ελέγχθηκε και επιβεβαιώθηκε ότι η Sirt1 επηρεάζει την αγγειογένεση ως αναστολέας της dll4 (delta like ligand) που είναι προσδέτης του υποδοχέα Notch1. Η διάυλος σηματοδότησης Notch είναι από τις βασικές οδούς της διακυτταρικής επικοινωνίας. Ανικανότητα αγγειογένεσης είναι ένδειξη και πρόβλημα κατά την γήρανση. Με κατανάλωση NMN βρέθηκε αύξηση της αγγειογένεσης ως έναν βαθμό. Να σημειωθεί ότι ενώ υπάρχουν έρευνες που στοχεύουν στην αφαίρεση της Sirt1 για την καταπολέμηση των καρκίνων, δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ [Sirt1] και καρκινογένεσης, απλά προκύπτει εξαιτίας της αγγειογένεσης που θέλει ο καρκινικός ιστός για να εξαπλωθεί. Δύο άλλοι παράγοντες που αυξάνουν την αγγειογένεση είναι η σωματική άσκηση, την οποία μιμείται το υδρόθειο (μείωση της αεροβικής χωρητικότητας) που είναι ίσως το μόνο ανόργανο μόριο με το οποίο φτιάχνουμε ATP, και η αφαγία που αντιστοιχεί στο NAD<sup>+</sup>. Όταν τα δύο μόρια συνδυάστηκαν η αγγειακή υγεία των ποντικών επανήλθε πλήρως. Υπάρχουν και διάφορα φαρμακευτικά μόρια (φυσικά ή τεχνητά) τα οποία στοχεύουν στην μίμηση της άθλησης και της πείνας, τα οποία αναλύονται στο [κεφάλαιο 3](#).

Άλλο συμπλήρωμα και κομμάτι της διατροφής που συνθέτουμε και de novo, είναι η σπερμιδίνη. Οι αντιγηραντικές της δράσεις προκύπτουν από την αυτοφαγία που για πολλούς είναι ο νο1 τρόπος



να ελαχιστοποιηθούν τα σημάδια της γήρανσης και άλλα θέματα υγείας όπως ο καρκίνος, καθώς γίνεται [διαλογή \(3\\*\)](#) και ανακύκλωση κυττάρων οργανιδίων και μορίων. Η σπερμιδίνη ίσως είναι αντιφλεγμονώδες και ρυθμιστής των λιπιδίων, με μηχανισμούς [ανεξάρτητους](#) της αυτοφαγίας, αν και η έρευνα έδειξε ότι με την καταστολή της αυτοφαγίας δεν παρατηρήθηκε καμία βελτίωση με την χορήγηση σπερμιδίνης. Ο μηχανισμός που ενεργοποιεί την αυτοφαγία είναι με την καταστολή ακετυλοτρανσφεράσων ιστόνων, δηλαδή του αντίθετου ενζύμου των Sirt. Ειδικά η p300 φαίνεται να είναι βασικός ρυθμιστής της αυτοφαγίας μέσω του mTORc1 που θα εξεταστεί στην συνέχεια. Βρίσκεται με φθίνουσα σειρά, στο σιτάρι, στην σόγια, σε παλιό τυρί, σε μανιτάρια ρύζι και αποδεδηγμένα η κατανάλωση της μέσω συμπληρωμάτων βελτίωσε την υγεία των πειραματόζωνων [\[2\]](#). Η σπερμιδίνη έχει και άλλους ρόλους, με τον πιο σημαντικό να είναι η διατήρηση του δυναμικού της μεμβράνης.

Πέραν όμως του τι τρώμε, για να ενεργοποιηθεί η αυτοφαγία έχει σημασία και το να μην τρώμε.

## 2.2 ΘΕΡΜΙΔΙΚΟ ΕΛΛΕΙΜΜΑ

Η πιο σημαντική ενέργεια που όμως ο καθένας μπορεί να κάνει τώρα είναι να περιορίσει την διατροφή του. Εκτός του ότι η CR αυξάνει το ένζυμο NAMPT, οι πιθανοί μηχανισμοί δράσης είναι αμέτρητοι και οι στατιστικές είναι εντυπωσιακές από μόνες τους.

Ένας από τους πρώτους που το πίστευε και το ακολούθησε χωρίς τότε να υπάρχουν στατιστικά δεδομένα ήταν ο Alexandre Gueniot της ιατρικής ακαδημίας στο Παρίσι. Πέθανε στην ηλικία των 102. Η πρώτη επιστημονική μελέτη έγινε το από τους Osborne και Mendel το [1935](#) σε ποντίκια δείχνοντας ότι αυτά που ζούσαν με CR ζούσαν και περισσότερο. Από τότε έχουν γίνει αμέτρητες άλλες μελέτες με το ίδιο αποτέλεσμα, όπως στην φρουτόμυγα και στην μαγιά. Στους ανθρώπους δυστυχώς τα στατιστικά από τους πολλούς λοιμούς ανά καιρούς δεν είναι σχετικά γιατί συνοδεύονται με κακή διατροφή και ποιότητα διαβίωσης. Ένα ιδιαίτερο πείραμα που έγινε με την συμμετοχή 8 ανθρώπων που ζούσαν με ότι παρήγαγε μια περιορισμένη έκταση για 2 χρόνια, παράγοντας ποιοτικό φαγητό αλλά όχι αρκετή ποσότητα, έδειξε βελτίωση στους βιοδείκτες τους [\[3\]](#). Η μακροζωία όμως είναι άλλη ιστορία, και ενώ χρονικά αυτά τα πειράματα είναι αδύνατα για τους ανθρώπους καθώς δεν πεθαίνουμε μέσα σε λίγα χρόνια όπως τα ποντίκια, υπάρχει ένα δείγμα που αξίζει ανάλυση, οι λεγόμενοι centenarians και η σχετική μπλε ζώνη. Προς το παρόν να σημειωθεί μόνο ότι οι κάτοικοι της Ικαρίας ως πιστοί ορθόδοξοι κάνουν νηστείες πολύ συχνά. Ομοίως, μία έρευνα το 1978 έδειξε ότι τα παιδιά στην Οκινάουα καταναλώνουν τουλάχιστον 33% λιγότερες θερμίδες συγκριτικά με το κεντρικό νησί της Ιαπωνίας, και οι ενήλικες τουλάχιστον 20% [\[4\]](#). Αν δεν μπορούμε να μελετήσουμε σε ανθρώπους, το δεύτερο καλύτερο δείγμα είναι τα ανθρωποειδή, με την μελέτη που έγινε σε μαϊμούδες ρέζους να έχει τα αναμενόμενα αποτελέσματα στο προσδόκιμο αλλά και στο ότι όσο νωρίτερα τόσο καλύτερα [\[5\]](#). Όμως άλλο η επιδημιολογία και τα στατιστικά δεδομένα που μπορεί να προκύπτουν για [άλλους λόγους](#) και άλλο να τα αποδώσουμε σε βιοχημικές διαδικασίες.

Ο μαέστρος της ενεργειακής ομοιόστασης των ιστών μας είναι το AMPK [\[6\]](#). Το όνομα αυτού του ετεροτριμερικού πρωτεϊνικού συμπλέγματος σημαίνει Κινάση που ενεργοποιείται από την Μονοφωσφορική Αδενοσίνη. Από αυτό και μόνο γίνεται κατανοητή η αρχή της λειτουργίας της

ως αισθητήρας της αναλογίας AMP/ATP. Όταν το κλάσμα μεγαλώνει η κινάση σηματοδοτεί την έναρξη ή την άρση διαδικασιών μεταβολισμού που βολεύουν το ενεργειακά ελλειμματικό κύτταρο, όπως η αναστολή της σύνθεσης λιπαρών οξέων, χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων και η έναρξη της λιπόλυσης. Ομοίως μέσω εξωκύτωσης του μεταφορέα γλυκόζης GLUT4 και ελέγχοντας την έκφραση του και των εξοκινάσεων, προωθεί την ενδοκύτωση της γλυκόζης, την φωσφορυλίωση της και της πρόδρομης μορφής της πρωτεΐνης που είναι ο αλλοστερικός ενεργοποιητής της γλυκολυτικής φωσφοφρουκτοκινάσης, καταλύοντας την γλυκόλυση. Η αναστολή της γλυκονεογένεσης γίνεται άμεσα με την φωσφορυλίωση της γλυκογονοσυνθάσης και έμμεσα μέσω μεταγραφικών παραγόντων όπως το γνωστό μας FOXO. Με την ίδια αντίδραση ενεργοποιεί και την φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταλύοντας την διάσπαση του.

Αναστολέας του AMPK δεν είναι μόνο το ATP αλλά και η ινσουλίνη όπως και άλλα μόρια που εμφανίζονται όταν υπάρχει επάρκεια γλυκόζης. Προφανώς το αντίθετο κάνει το AMP αλλά και η CR που αυξάνει την Sirt1 που μέσω αποακετυλίωσης της LKB1 [7] ενεργοποιεί το AMPK, φανερώνοντας πάλι το μοτίβο της αλληλεξάρτησης. Ωστόσο λόγω της αντιοξειδωτικής δράσης η κινάση αυξάνει το NADPH και όχι το NAD<sup>+</sup> χωρίς αυτό να επιβαρύνει τις Sirt καθώς το κύτταρο υφίσταται οξειδωτικό stress και έχει πολύ αυξημένη αναλογία λόγω έλλειψης γλυκόζης. Επηρεάζοντας το γονίδιο PGC-1α που εκτός από την Sirt1, ενεργοποιείται και άμεσα από την AMPK με φωσφορυλίωση, ρυθμίζουν και την βιογένεση των μιτοχονδρίων και πολλά άλλα όπως την οξειδοαναγωγική ρύθμιση και μέσω του FOXO και με τον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων και με την έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων. Εν ολίγοις, η επιτομή της αυτοσυντήρησης. Η αυτοφαγία που είναι συνδεδεμένη με την κάθαρση, προκαλείται από την AMPK, εκτός της PGC-1α που είναι ειδικότερη για την μιτοφαγία, μέσω της σημαντικότερης για την έναρξη της αφαγίας κινάσης που κωδικεύεται από το γονίδιο ULK1 (ομόλογο του ATG1 στην μαγιά), με την ενεργοποίησή του να είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στην [πενία αμινοξέων](#).

Εκτός της φωσφορυλίωσης, το AMPK ενεργοποιεί και έμμεσα το ULK1 και σχεδόν όλες τις άλλες διαδικασίες που ανέφερα λόγω της αναστολής του mTORc1. Το σύμπλεγμα της mammalian Target of Rapamycin είναι στην ουσία το ακριβώς αντίθετο μόριο της AMPK, όπως το γλυκαγόνο με την ινσουλίνη. Οι δύο εκδοχές, mTORc1 και c2, είναι συνδεδεμένες με την κυτταρική γήρανση. Το c1 σχετίζεται με την ανάπτυξη, την αντιγραφή του κυττάρου, την μεταγραφή σχετικών γονιδίων και την σύνθεση των πρωτεϊνών τους, όλα αντίστροφα του AMPK. Για το c2 δεν είναι τόσο καλά κατανοητή η λειτουργία του, όμως είναι γνωστό πως φωσφορυλιώνει τον υποδοχέα της ινσουλίνης, του αυξητικού παράγοντα που ομοιάζει της ινσουλίνης, igf1 (insulin like growth factor) και των Akt (protein kinase b). Η τελευταία συμμετέχει στην αλυσίδα mTOR, γλυκόλυσης, ενεργοποιώντας την GLUT4. Επίσης είναι αναστολέας της αυτοφαγίας μέσω του ρυθμιστή της λυσοσωμικής βιογένεσης TFEB και αποτρέπει την απόπτωση μέσω του αποπτωτικού παράγοντα BAD. Φαίνεται πως έχει σημαντικό ρόλο και στον κυτταρικό κύκλο και την αντιγραφή του κυττάρου, καθώς η αναστολή της Akt1 σταματάει τον κύκλο στην φάση G1 και G2, ενώ ισχύει και το αντίστροφο. Λόγω της σχέσης με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό που φαίνεται πιο ξεκάθαρα από τον igf1 που θα δούμε σε λίγο, αλλά και λόγω της αντι-αυτοφαγίας, το mTOR και οι άλλοι παράγοντες της οδού είναι συνδεδεμένοι με την ογκογένεση και ακολούθως την

καρκινογένεση, και πιθανώς ως μέτρο πρόληψης της, είναι εκκινητής της πρόκλησης SASP και άρα για έναν ακόμη λόγο, της γήρανσης.

Ο igf1 είναι μέρος της μεταβολικής οδού του αυξητικού παράγοντα GH και της ινσουλίνης (gh/igf1/insulin) που καθορίζει την ανάπτυξη στα παιδιά. Έχει συσχετιστεί με την γήρανση, πιθανώς λόγω της σχέσης του με την μεταβολική οδό του Akt/mTOR της οποίας είναι εκκινητής [8]. Έχουν γίνει πολλές στατιστικές μελέτες σε ανθρώπους και ιδιαίτερα σε αιωνόβιους αλλά και σε άτομα με Laron Syndrome στον Ισημερινό (νανισμός λόγω μετάλλαξης στον υποδοχέα της GH) που φαίνεται να εμφανίζουν υπερβολικά πολύ λιγότερα περιστατικά καρκίνου και διαβήτη, μέτρησαν πολύ λιγότερο igf1 (συνδετικός κρίκος των δύο οδών) που είναι και εύκολο να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης (σε αντίθεση με το mTOR), κάτι πολύ σημαντικό καθώς η στατιστική σε τόσο μικρό και διάσπαρτο κομμάτι πληθυσμού είναι δύσκολη. Να σημειωθεί ότι γενικά και όχι καθολικά, η μειωμένη συγκέντρωση στο πλάσμα συσχετίστηκε με την μακροζωία και εκτός του mTOR αυτό μπορεί να εξηγείται από την ανοχή στην ινσουλίνη που δημιουργούν οι αυξημένες συγκεντρώσεις, αν και το ίδιο έχει παρατηρηθεί και με την αναστολή του mTORc2. Για άλλη μια φορά γεννάται το ερώτημα ποιός ξεκινάει τι; Η ινσουλίνη καλεί το mTOR να ξεκινήσει την έκφραση αναβολικών πρωτεϊνών ή το mTOR ως ανιχνευτής που είναι, ενημερώνει τα β κύτταρα στο πάγκρεας ώστε να γίνει έκκριση ινσουλίνης; Οι μελέτες έως τώρα διαφωνούν με το δεύτερο [9], που είναι εύλογο αφού το mTOR είναι ενδοκυτταρικός ρυθμιστής.

Ενδιαφέρον έχει πως ενώ στα ποντίκια η CR είχε ως αποτέλεσμα πτώση του IGF1 στο πλάσμα, στους ανθρώπους δεν παρατηρήθηκε το ίδιο σε μια μακροπρόθεσμη μελέτη [10], αν και άλλη έρευνα έδειξε μείωση. Πιθανώς η διαφορά προκύπτει από την λέξη μακροπρόθεσμα, δηλαδή ίσως με τον καιρό ο οργανισμός καταφέρνει να προσαρμοστεί. Σε αυτό, που συμφωνούν και οι δύο έρευνες είναι ότι τα αμινοξέα επηρεάζουν και μακροπρόθεσμα την [IGF1].

## 2.3 ΠΕΝΙΑ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ

Δεν είναι μόνο η ενεργειακή κατάσταση που επηρεάζει τους δύο ανιχνευτές. Χωρίς να είναι κατανοητός ο μηχανισμός, είναι ξεκάθαρο πως και ο TOR και η AMPK αντιδρούν στην παρουσία ή μη των αμινοξέων. Αυτό είναι λογικό να συμβαίνει αν σκεφτούμε ότι δεν γίνεται να ξεκινήσουν αναβολικές διαδικασίες στον οργανισμό χωρίς την παρουσία των πρώτων υλών δηλαδή των AA. Έλλειψη στην διατροφή θα σήμαινε την ανάγκη για de novo βιοσύνθεση από τον οργανισμό. Τι γίνεται όμως με τα αμινοξέα που δεν μπορούμε να συνθέσουμε; Τότε είναι που το κύτταρο βρίσκεται σε αυξημένες συνθήκες stress καθώς όλες πρωτεΐνες αποτελούνται από τουλάχιστον ένα από τα 9 AA<sup>10</sup> που παίρνουμε μόνο από την διατροφή, την μεθειονίνη, η οποία αντιστοιχεί στο κωδικόνιο AUG που είναι μέρος κάθε γονιδίου τουλάχιστον μία φορά ως το κωδικόνιο έναρξης (μεταμεταφραστικά μπορεί να αφαιρείται και να ανακυκλώνεται, αλλά η κατανάλωση του παραμένει σημαντική). Αποτέλεσμα αυτού είναι η αυτοφαγία και η αυτοσυντήρηση με μειωμένη μεταβολική και αναπαραγωγική δραστηριότητα. Όπως λοιπόν είναι αναμενόμενο, η PR (protein restriction) έχει δείξει σημαντική βελτίωση στην υγεία και την μακροζωία σε

<sup>10</sup> Βαλίνη, Τρυπτοφάνη, Θρεονίνη, Φαινυλαλανίνη, Μεθειονίνη, Λυσίνη, Λευκίνη, Ισολευκίνη και η Ιστιδίνη

πειραματόζωα, ειδικότερα από τα διακλαδισμένα ΑΑ και την μεθειονίνη ([111],[12]), αυτά δηλαδή που υπάρχουν στο κρέας. Ωστόσο να τονιστεί ότι ο κορυφαίος στο θέμα της διατροφής για μακροζωία Valter Longo, επισημαίνει ότι στους 65+, η PR δεν φαίνεται να προκύπτουν τα ίδια θετικά με την PR πιθανώς γιατί πέφτει πολύ η [IGF1] και μάλιστα μπορεί να ενισχίσει την μυική αδυναμία έχοντας αντίθετες συνέπειες στην υγεία, για αυτό και στους πρεσβύτερους προτείνει αύξηση της κατανάλωσης πρωτεϊνών.

Μέσω της κλασικής τεχνικής στην μοριακή βιολογία “καταστολή ενός μορίου και καταγραφή των μεταβολών που προκάλεσε, επανάληψη για όλα τα εμπλεκόμενα μόρια” ερευνητές προσπάθησαν να κατανοήσουν τον μηχανισμό που το mTOR επηρεάζεται από τα αμινοξέα. Αν και καθόλου ξεκάθαρη, υπήρξε μια πρώτη εικόνα. Έδειξαν δύο μεταβολικές οδούς, μία εξαρτώμενη και μία όχι από το mTORc1, που ενεργοποιούνται από το ίδιο ερέθισμα (αμινοξέα) αλλά ανάλογα με το πόσην ώρα υπάρχει έλλειψη και με ποιό μέσο προέκυψε [13]. Αυτό το παράξενο αποτέλεσμα θα μπορούσε να μεταφραστεί ως εξής: ανάλογα πόσο απεγνωσμένο είναι το κύτταρο για να χρησιμοποιήσει τα αμινοξέα χρησιμοποιεί και διαφορετικό μονοπάτι, γιατί κάποιο μπορεί να είναι πιο σύντομο, ενεργειακά πιο κερδοφόρο και να μην ενεργοποιεί διαδικασίες πολλαπλασιασμού καθώς προηγούνται άλλες, ή απλά δεν γίνεται να πραγματοποιηθεί η άλλη οδός γιατί έχει εξαντληθεί το mTORc2. Όπως και να έχει, στην μια περίπτωση η PI3K<sup>11</sup> Class I ως απάντηση στην εμφάνιση αμινοξέων φωσφορυλιώνει την Akt στην θρεονίνη 308 και αυτή με την σειρά της αναστέλλει το FOXO3a (φωσφορυλίωση στην T32). Η χαμηλή ενεργότητα της Akt διορθώνεται με φωσ/ση στην σερίνη 473, κάτι που προκαλεί το mTORc2. Πως η class 1 ενεργοποιεί το complex 2 είναι ακόμα υπό μελέτη αν και υπάρχει [σημαντική πρόοδος](#) λόγω και του αντικαρκινικού ενδιαφέροντος. Φαίνεται επίσης ότι το c1 συμμετέχει και αυτό στην ενεργοποίηση του c2, ισχυροποιώντας την πρόταση της διπλωματικής, ότι δηλαδή πρώτα προετοιμάζει το έδαφος η μία οδός και μετά ξεκινάει και η δεύτερη (πλήρης άρση του survival mode, έναρξη proliferation). Η πρώτη οδός, ξεκινάει από την PI3K Class III και ενεργοποιεί το mTORc1, μία σχέση που αν και δεν είναι καθόλου απλή, σήμερα έχει [αποκρυπτογραφηθεί](#) τουλάχιστον πολύ καλύτερα από την class1 – c2. Το mTORc1 με την σειρά του αναστέλλει την αυτοφαγία και με φωσ/ση στην T389 της S6K1<sup>12</sup> σηματοδοτεί την κυτταρική ανάπτυξη. Να σημειωθεί ότι η αναστολή της αυτοφαγίας βρέθηκε και ανεξάρτητα της mTOR.

<sup>11</sup> PI3K: Phosphoinositide 3-kinase. Χωρίζεται σε 4 κλάσεις αναλογα την δομή και την λειτουργία τους. Η class1 και 3 που μας ενδιαφέρουν είναι φωσφατάσες. Η 1 μετατρέπει την φωσφατιδυλινοσιτόλη από (4,5) διφωσφάτη PI(4,5)P2 σε (3,4,5) τριφωσφάτη (PI(3,4,5)P3). Η 3 κάνει την PI, PI(3)P (το οποίο κάνει και η 1 αλλά μόνο in vitro). Η γνωστότερη λειτουργία τους είναι αυτή στην οδό της ινσουλίνης και του mTor δηλαδή φωσ/ση της Akt (pkb). Η Class III εμπλέκεται κυρίως με την μεταφορά πρωτεϊνών και κυστιδίων και μάλλον στην αποτελεσματικότητα κυττάρων του ανοσοποιητικού, αλλά και στην φαγοκύτωση

<sup>12</sup>

S6K1. Ριβοσωμική πρωτεΐνη S6 κινάση βήτα-1 (S6K1) ή P70S6K

Έπεται στην οδό των PIP3 και του mtorc1. Με υπόστρωμα την S6 ριβοσωμική πρωτεΐνη, την οποία φωσ/νει προωθώντας έτσι την πρωτεϊνοσύνθεση. Η φωσ/ση της p70S6K στην Thr389 σημαίνει ενεργοποίηση από το mTOR και συσχετίζεται με την αναστολή της αυτοφαγίας.

Καταστολή ή έλλειψη της S6K1 καθυστερεί την λιπογένεση. Ενεργοποιείται επίσης από την άθληση μέσα από την ίδια οδό (igf1, PIP1, Akt mTOR, S6K) ώστε να γίνει πρωτεϊνοσύνθεση για τον μυικό αναβολισμό. (Βέβαια για να ενεργοποιηθεί η οδός απαιτείται και η συνθήκη της πληθώρας αμινοξέων). Όταν είναι ανενεργό, το S6K1 δένεται στο eIF3 (βασικός παράγων μετάφρασης – κομμάτι του

Να μην λησμονηθεί όμως ότι εκτός της αυτοφαγίας και της αυτοσυντήρησης, το κύκλωμα της γήρανσης επιβεβαιώνεται σε όσα έχουν αναφερθεί για δύο λόγους. Καταρχάς οι διαδικασίες αυτές αυξάνουν το NADPH δυσκολεύοντας το έργο των σιρτουϊνών και ομοίως, θυμόμενοι την μαγιά, ο πολλαπλασιασμός από την φύση του επιφέρει επιγενετικό θόρυβο γιατί τότε συμβαίνουν πολλές βλάβες στο DNA. Πριν τις μελέτες για το mTOR ο Sinclair και η ομάδα του έδειξαν πως το CR, η αναστολή του Tor και άλλοι stressors όπως η θερμότητα, προκαλούν μετακίνηση των μεταγραφικών παραγόντων Msn2/4p από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα της μαγιάς, και η αύξηση στην ζωή της αποδίδεται στην προκύπτουσα υπερέκφραση της νικοτιναμιδάσης και συνεπώς στην Sir2p ή και άλλες σιρτουϊνες όπως η Hst2 [14]. Φυσικά υπάρχουν μεγάλες διαφορές συγκριτικά με το ανθρώπινο κύτταρο, όμως όσα ειπώθηκαν έως τώρα, επιβεβαιώνουν την γενική μορφή του κυκλώματος.

Η AMPK εκτός της έμμεσης αναστολής της από το mTOR αναστέλλεται και άμεσα από τα αμινοξέα και συγκεκριμένα από την κυστεΐνη [15], ένα αμινοξύ που μπορούμε να συνθέσουμε. Ο μηχανισμός που προτάθηκε είναι σχετικά απλός. Η συγκεκριμένη αμινο-ακυλ tRNA συνθετάση (AARS) για την κυστεΐνη (CARS), που είναι το ένζυμο που αντιστοιχεί το αμινοξύ Cys στα αντικωδικόνια της στο tRNA αλληλεπιδρά με την [CaMKK2](#) (ασβέστιο/καλμοδουλίνο εξαρτώμενη κινάση, ενεργοποιητής της AMPK, όπως η LKB1) με την κυστεΐνη να εμποδίζει το σύμπλεγμα να ενωθεί με το σύμπλεγμα του AMPK. Να σημειωθεί ότι αυτή η ενεργοποίηση είναι ανεξάρτητη της AMP/ATP. Η ειδική αυτή ανίχνευση του αμινοξέος δεν προκαλεί έκπληξη. Παρόμοιος μηχανισμός πιθανώς να υπάρχει για κάθε αμινοξύ ώστε να προλαμβάνεται η έλλειψη του. Βέβαια υπάρχει και γενική ανίχνευση που προκύπτει από την συσσώρευση tRNAs χωρίς αμινοξύ που ενεργοποιούν την κινάση General Control Nondepressible 2 (GCN2) και αυτή άλλους παράγοντες (eIF2a και αυτός το ATF4) και θα άξιζε να εξεταστεί αν υπάρχει σχέση με τους ενεργειακούς αισθητήρες mTOR, AMPK. Άλλο ερώτημα είναι ποιά αμινοξέα επηρεάζουν τις δυο κινάσες. Ειδική για ένα αμινοξύ οδός έχει βρεθεί και για το ζεύγος λευκίνη mTORc1, όπου η λευκίνη (ένα από τα διακλαδισμένα AA) παρεμβάλλεται στην ένωση ενός συμπλέγματος (sestrin2-GATOR2) που αναστέλλει το mTORc1 [16].

Τα αμινοξέα που περιέχουν θείο (SAA), η μεθειονίνη και η κυστεΐνη (υπάρχουν και μη κωδικά SAA, η ομοκυστεΐνη και η ταυρίνη) συνδέονται με το TSP (transsulfuration pathway), όπου η μεθειονίνη μετατρέπεται σε κυστεΐνη, χωρίς να γίνεται το αντίθετο (τουλάχιστον όχι σε εμάς) αλλιώς η μεθειονίνη δεν θα ήταν ζωτικό αμινοξύ. Το υδρόθειο, που σε υψηλές δόσεις είναι τοξικό, παράγεται κατά την διάσπαση ή μετατροπή των SAA. Ερευνητές θέλησαν να δείξουν πως το H<sub>2</sub>S ευθύνεται για τις ευεργετικές ιδιότητες της CysR αλλά και για ΌΛΟΥΣ τους άλλους διατροφικούς περιορισμούς [17], με σημαντικό disclaimer, ότι δεν αποκλείουν και άλλες αιτίες. Έδειξαν ότι συγκεκριμένα η TSP-ρυθμιζόμενη παραγωγή του H<sub>2</sub>S αυξήθηκε σε MetR και CR. Αλλά ακόμα πιο αναπάντεχα, με κατάργηση του TSP σταματάνε τα οφέλη της οποιας DR και μάλιστα με υπερέκφραση του πέτυχαν τα οφέλη χωρίς DR. Αρχικά αυτός ο τολμηρός ισχυρισμός έχει κάποια προβλήματα. Ας θεωρήσουμε ως δεδομένο ότι το H<sub>2</sub>S είναι ευεργετικό, για πολλούς λόγους, ένας από τους σημαντικότερους η μιτοορμηση καθώς έχει πολλές αντιοξειδωτικές δράσεις με συσχετιζόμενα ένζυμα όπως η γλουταθειόνη. Προκύπτουν όμως σημαντικά ερωτήματα, όπως

---

ριβοσώματος) και αποκολλάται όταν φωσ/θεί από το Raptor. Πλέον μπορεί και φωσ/νει πολλούς στόχους όπως το eIF4B, ένα από τα μόρια του συμπλόκου που φέρνει το mRNA σε επαφή με το ριβόσωμα.



γιατί να παράγεται H<sub>2</sub>S εφόσον υπάρχει SAA-R; Στην περίπτωση των MetR και CysR αποκλείεται το κύτταρο να θέλει να χαλάσει το λίγο απόθεμα του, άρα πως θα προέκυπτε H<sub>2</sub>S; Μια εξήγηση θα ήταν αν προέκυπτε κατα την αυτοφαγία όχι με την έννοια που εξηγούν στο άρθρο, δηλαδή από την Cys, γιατί είναι εξίσου παράλογο να γίνεται διάσπαση της (εκτός αν δεν μπορεί να την χρησιμοποιήσει αλλιώς). Ίσως όμως, κατα την διάλυση σουλφιδικών συμπλεγμάτων να προκύπτει μία σημαντική [H<sub>2</sub>S] ήτε ως παραπροϊόν, που θα σήμαινε ότι μπορεί να εξηγήσει γιατί το απλό CR να επηρεάζει το H<sub>2</sub>S, ήτε ως αυτοσκοπός, με σκοπό να χρησιμοποιηθεί η ομάδα για την σύνθεση βιομορίου, όχι όμως SAA που όπως είπαμε δεν γίνεται de novo. Αυτό θα εξηγούσε και γιατί όλες οι DR επηρεάζονται από το H<sub>2</sub>S, όμως θα σήμαινε επίσης ότι επηρεάζονται το ίδιο και κυρίως δεν εξηγεί τα αποτελέσματα της έρευνας σχετικά με το TSP. Σύμφωνα με αυτή την λογική οι ρεαλιστικές εκδοχές είναι:

1) Έγιναν πειραματικά σφάλματα, εξάλλου η H<sub>2</sub>S αναφορικά ήταν πολύ δύσκολο να μετρηθεί  
 2) Τα αποτελέσματα είναι σωστά, όμως έγινε λάθος μετάφραση τους πιθανώς λόγω κάποιας διεργασίας στο TSP που δεν γνωρίζουμε. Λογικά η λάθος ερμηνεία είναι στην σχέση DR-H<sub>2</sub>S. Τέλος να υπενθυμιστεί τι είναι το Θείο. Είναι το πιο κοντινό στο οξυγόνο μόριο. Είναι αυτό που ανέπνεαν τα πρώτα βακτήρια και χρησιμοποιούσαν στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Μήπως κατά την υποξία, ενθουμούμενα την αρχαία καταγωγή τους τα κύτταρα χρησιμοποιούν το θείο αντί του απόντος οξυγόνου; Στο άρθρο μάλιστα εξηγούν αναλυτικά πως μπορεί να γίνεται αυτό. Το H<sub>2</sub>S λειτουργεί ως δότης στό SQR<sup>13</sup> αλλά η οξειδωση σε δυο στάδια δίνει Sulfate ή Sulfite που μπορούν να λειτουργήσουν ως τελικοί αποδέκτες ηλεκτρονίων αντί του οξυγόνου δημιουργώντας αντί για H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>S. Αν ίσχυε κάτι τέτοιο όμως θα έπρεπε να εντοπίζεται το H<sub>2</sub>S κυρίως κατα τον επόμενο stressor, την γυμναστική (εκτός αν δεν το προκαλεί η υποξία). Όπως και να έχει, τα αντικρουόμενα αυτά αποτελέσματα μένει να διαλευκανθούν με επόμενες μελέτες, υπενθυμίζοντας για μία ακόμη φορά πόσα λίγα ξέρουμε, και πόσο απέχει η λήψη πειραματικών αποτελεσμάτων από την ερμηνεία με τους νόμους της φύσης. Για τον ακόλουθο stressor βέβαια η εικόνα είναι πιο ξεκάθαρη.

## 2.4 ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΑΣΚΗΣΗ

Η άσκηση ως κυτταρικός stressor μοιάζει με την CR λόγω της εξάντλησης των ενεργειακών αποθεμάτων, ενεργοποιώντας κατα συνέπεια την AMPK, με ίσως καταλυτική διαφορά, τον ρυθμό

<sup>13</sup> SQR. Sulfide Quinone Reductase

Η SQR ανήκει στις δισουλφιδικές αναγωγάσες φλαβοπρωτείνες (FDR). Βασικός σκοπός της, η αποτοξίνωση από σουλφίδια.  $nHS^- + n(\text{quinone}) \rightleftharpoons \text{polysulfide} + n(\text{quinol})$   
 Η αντίδραση της SQR έχει το στάδιο της οξειδωσης του σουλφιδίου και της αναγωγής της κινόνης. Το ενεργό κέντρο της SQR αποτελείται από μια περιοχή που βρίσκεται περιπλασματικά και το σουλφίδιο συνδεδεμένο με τον συμπαραγών FAD και με μία τρισουλφιδική γέφυρα με την κινόνη. Το FAD δέχεται 2 e<sup>-</sup> από το σουλφίδιο και τα μεταφέρει διαδοχικά στην quinone, αυξάνοντας την τάση της μεμβράνης. Οι σημαντικές διαφορές με την οργανική μεταβολική οδό: 1) Το θείο δεν έχει σχέση με την γλυκόλυση ούτε με τον κύκλο του krebs, που είναι απαραίτητα για την μεταφορά των 2 e<sup>-</sup> στο NADH με την οργανική μέθοδο. 2) Τα e<sup>-</sup> πηγαίνουν από το Sulfide στο SQR, ενώ του NADH στην NADH:quinone oxidoreductase, μπαίνοντας διαδοχικά στο Q cycle, στο c cycle, καταλήγοντας στο οξυγόνο. Έτσι εκτός της αποτοξίνωσης η SQR προσφέρει και ενεργειακά όταν υπάρχει έλλειψη. Τα (RSS) reactive sulfur species που παράγει το sqg χρησιμοποιούνται για de novo σύνθεση της cys από την cys συνθάση τουλάχιστον στον S rombe. Παρεμπόδιση του sqg οδήγησε σε απόπτωση και ίδιο φαινόμενο με την έλλειψη κυστεΐνης, ενώ προσθέτοντας κυστεΐνη διορθώθηκε, δείχνοντας την σημαντικότητα του για την υγεία των μιτοχονδρίων και την σύνθεση της κυστεΐνης [\*].

της εξάντλησης. [18] Άλλος λόγος ενεργοποίησης του είναι η έκκριση ασβεστίου από το σαρκομέριο κατά την σύσπαση των μυών που πυροδοτούν την ασβέστιο εξαρτώμενη κινάση (CaMKK2) που φωσφορυλιώνει την AMPK. Το AMPK ενεργοποιείται σίγουρα στους σκελετικούς μύες μας, στον λιπώδη ιστό και το ήπαρ τουλάχιστον των ποντικών και πιθανώς και σε άλλους ιστούς που ενδεχομένως εξαρτώνται από το επίπεδο του stress. Όπως και στην CR, όπου υπάρχουν οι παράμετροι διάρκεια αφαγίας και ποσοστό θερμιδικής κατανάλωσης σε σύγκριση με μια τιμή αναφοράς, έτσι και στην σωματική άσκηση έχουμε την ένταση και την διάρκεια. Φυσικά και στους δυο stressors σημαντική παράμετρος είναι η συχνότητα. Όπως ήταν αναμενόμενο, για υψηλή ένταση και μεγάλη διάρκεια άσκησης, αυξάνεται η AMPK [19]. Ενδιαφέρον θα έχει να μελετηθεί η μορφή της καμπύλης μεταξύ των δύο παραμέτρων δεδομένου ότι ένταση και διάρκεια είναι πρακτικά αδύνατον να συνυπάρξουν λόγω των ανθρώπινων αθλητικών δυνατοτήτων. Δεν είναι μόνο το AMPK, σε μοριακό επίπεδο όλες οι ωφέλιμες αλλαγές συμβαίνουν κυρίως με πολλές υψηλής έντασης επαναλήψεις (HIIT) ιδίως για τους πρεσβύτερους [20]. Βέβαια και για τα άμεσα μακροσκοπικά αποτελέσματα της γυμναστικής πάλι η HIIT είναι βέλτιστη, μήπως όμως αυτό δεν είναι τυχαίο, αλλά προκύπτει από τους μοριακούς μηχανισμούς που αναλύθηκαν στα προηγούμενα κεφάλαια; Αν και στην εργασία αυτή εκφράζονται [στατιστικές αμφιβολίες](#), είναι προφανές ότι η πληροφοριακή θεωρία της γήρανσης επιβεβαιώνεται ξανά, χωρίς να αποκλείει άλλες θεωρίες. Πολλά μόρια μεταβάλλονται κατά την διάρκεια, όμως η απαρχή είναι η πτώση του ATP, της ενδοκυτταρικής γλυκόζης, και η αύξηση του NAD<sup>+</sup>, με τα υπόλοιπα να ακολουθούν, χωρίς όμως να ξέρουμε με βεβαιότητα τι καταλύει την αντιγήρανση. Σύμφωνα με την [όρμηση](#), θα σήμαινε ότι τα κύτταρα μπορούν να ανταπεξέλθουν καλύτερα σε συνθήκες χαμηλής ενέργειας και οξειδωτικού stress. Όμως πως εξηγείται η επιμήκυνση των τελομερών που παρατηρείται κατά την άσκηση [21]; Τι σχέση έχει η τελομεράση με την άθληση; Μήπως οι σιρτουίνες όπως και στην μαγιά, αναπαύονται στην τελομερική περιοχή; Αν και ο συσχετισμός αυτός είναι τολμηρός, δεν είναι καθόλου παράλογος καθώς η SIRT1 είναι απαραίτητη για την επιμήκυνση των τελομερών [22] και η SIRT6 έχει αποδειχθεί ότι ενισχύει την τελομεράση [23]. Αν ισχύει αυτό όμως θα έπρεπε να παρατηρείται και για κάθε παράγοντα που αυξάνει την έκφραση των SIRT, εκτός αν υπάρχει και άλλος ρυθμιστής πλην της SIRT που ενεργοποιείται κατά την γυμναστική και είναι απαραίτητος συνεργατικά με τις SIRT για την λειτουργία της τελομεράσης. Πάντως η CR έχει δείξει ότι και αυτή αυξάνει την λειτουργία της τελομεράσης [24]. Το ίδιο ισχύει και για μία τεχνητή συνθήκη οξειδωτικού stress την υπερβαρική οξυγονοθεραπεία η οποία είναι το θέμα του [κεφάλαιου 4](#), που εκ πρώτης όψεως φαίνεται να έχει αντίθετη δράση με την γυμναστική καθώς και διευκολύνει την οξειδωτική φωσφορυλίωση, και παρέχει υπεροξεία. Όλες αυτές οι διαδικασίες μικρο και μακροσκοπικά εντάσσονται στην γενική κατηγορία της hormesis, μια λέξη που προέρχεται από το ορμάω και στην βιολογία σημαίνει πως λίγη δόση από κάποιες ουσίες ή συνθήκες που σε μεγάλη δόση μπορεί να σε σκοτώσουν, μπορεί να έχει ευεργετικές ιδιότητες για τα κύτταρα ή τον οργανισμό. Πιο απλα θα λέγαμε πως ο οργανισμός μαθαίνει και όταν έρθουν τα δύσκολα θα είναι καλά προετοιμασμένος. Όπως έχει επαναληφθεί προηγουμένως, το κυτταρικό stress εκκινεί διαδικασίες αυτοσυντήρησης και από την λειτουργία της αναπαραγωγής πηγαίνει στην λειτουργία της επιβίωσης. Αλλιώς μπορούμε να το δούμε από

την οπτική των σιρτουινών και την μεγάλη αύξηση του NAD<sup>+</sup>, που συνεπώς λόγω πλεονάσματος δεν χρειάζεται να μεταναστεύουν αποτρέποντας έτσι την δημιουργία επιγενετικού θορύβου. Το σίγουρο είναι πως η hormesis αποδεδειγμένα έχει αποτέλεσμα όπως έδειξαν έρευνες στο *Caenorhabditis elegans* [25] αλλά και τα τόσα άλλα παραδείγματα που αναφέρθηκαν καθώς όλα εντάσσονται στην όρμεση και στο κύκλωμα της επιβίωσης προερχόμενο από τον αρχαίο μας πρόγονο. Στην συγκεκριμένη έρευνα εκτός του *cr* ελέγχθηκε και επιβεβαιώθηκε η όρμεση από το οξειδωτικό στρες προκαλούμενο από υπερβαρική οξυγονοθεραπεία, δοκιμάστηκε και απέτυχε για την ιονίζουσα ακτινοβολία (αναμενόμενο γιατί είναι καρκινογόνο και γιατί δεν βοηθάει τις σιρτουίνες το αντίθετο μάλιστα αφού προκαλεί βλάβες στο DNA) ενώ η ζουγλόνη που δημιουργεί ελεύθερες ρίζες λειτούργησε, μη έχοντας τις αρνητικές συνέπειες της ιοντίζουσας ακτινοβολίας. Τέλος αποδείχθηκε πως η αυξημένη θερμοκρασία μπορούσε να προκαλέσει αυξημένο μέγιστο και μέσο προσδόκιμο και παρατηρήθηκε και αυξημένη θερμοαντοχή. Ενεργοποιεί άραγε και η θερμότητα το κύκλωμα της επιβίωσης;

## 2.5 ΘΕΡΜΟΤΗΤΑ

Αδιαμφισβήτητα, ένας παράγοντας κυτταρικού stress είναι η θερμότητα. Τα θηλαστικά μπορεί να διατηρούμε την θερμοκρασία μας σταθερή, αλλά και οι υπόλοιποι οργανισμοί συμπεριφέρονται διαφορετικά (άλλες κυτταρικές λειτουργίες) ανάλογα την θερμότητα. Τα βακτήρια είναι ένα κλασικό παράδειγμα καθώς έχουν μία βέλτιστη θερμοκρασία πολλαπλασιασμού και σε πολύ υψηλότερες, εφόσον δεν είναι αρκετά υψηλές ώστε να πεθάνουν, επενδύουν στην αυτοσυντήρηση, όπως και σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες αδρανοποιούνται τελείως περιμένοντας καλύτερους καιρούς (εκτός από εκείνα που εξελίχθηκαν σε ακραίες συνθήκες).

Έναν πιθανό μοριακό μηχανισμό που μπορεί να εξηγήει τα οφέλη της περιστασιακής έκθεσης σε άβολες θερμοκρασίες, το αναφέρθηκε στην μιτο-όρμεση. Ο παράγων θερμικού σοκ (hsf) καλεί τις πρωτεΐνες HSPs που δρουν ως chaperones κατά το UPR. Άρα η αίσθηση του κρύου ή της ζέστης σε άβολο βαθμό, βοηθάει στην συντήρηση των μιτοχονδρίων.

Υπάρχουν και άλλες ισχυρές ενδείξεις, κυρίως για το κρύο, ότι οι σιρτουίνες και το κύκλωμα της επιβίωσης είναι και εδώ ο λανθάνων μηχανισμός. Αναφέρθηκε ο φαιός λιπώδης ιστός, που ρυθμίζει την παραγωγή θερμότητας όταν κρυώνουμε, και πώς αυτός έχει άμεση αλληλεξάρτηση με την eNAMPT. Βέβαια οι μηχανισμοί μπορεί να είναι πολλοί, όσοι και οι παράγοντες που επηρεάζονται από την θερμοκρασία. Ακόμη και η ιοντική ισορροπία επηρεάζεται από την θερμοκρασία αν και η θερμοκρασία δεν μπορεί άμεσα να προκαλέσει οξειδωτικό stress στον οργανισμό τουλάχιστον για τα θηλαστικά, παρόλο που χημικά είναι λογικό, γιατί απλά ο οργανισμός μας δεν επιτρέπει τις αλλαγές, παρά μόνο στην επιφάνεια - δέρμα και σε περιοχές που δεν αιματώνονται καλά όπως οι τα άκρα. Δηλαδή δεν υφίσταται αλλαγή της θερμοκρασίας, άρα δεν είναι οι παράγοντες που επηρεάζονται από αυτήν που πρέπει να μελετηθούν, αλλά οι ομοιοστατικοί μηχανισμοί που αποτρέπουν αυτή την αλλαγή, όπως ο καφέ λιπώδης ιστός. Ο συγκεκριμένος πλούσιος σε μιτοχόνδρια ιστός είναι από μόνος του ένας τομέας έρευνας. Βρίσκεται κυρίως στα μωρά, που έχουν μεγαλύτερη ανάγκη για θερμότητα, ενώ όσο μεγαλώνουμε τόσο λιγοστεύει και χάνεται μέσα στο λευκό λίπος. Το καφέ λιπος συνδέεται και με ένα άλλο



γονίδιο μακροζωίας, αυτό της Uncoupling Protein 2, η οποία μάλιστα χρησιμοποιήθηκε για να αποδείξει και την σχέση του κρύου με την μακροζωία. Η πρωτεΐνη αυτή αλλάζει την αναλογία θερμότητας / ενέργειας που παράγουν τα μιτοχόνδρια. Βάζοντας αντίγραφα της στον υποθάλαμο ποντικών, προκλήθηκε μεταβολή στην θερμοκρασία του προς τα πάνω. Ως αποτέλεσμα ο υποθάλαμος, ως ομοιοστατικό κέντρο, έριξε την θερμοκρασία του κύριου σώματος του ποντικιού. Η αύξηση από 0,3 - 0,5 βαθμούς είχε ως αποτέλεσμα 20% μεγαλύτερο προσδόκιμο για τα θηλυκά, και 12% για τα αρσενικά [26]. Προφανώς αυτό δεν πάει αναλογικά. Αλλαγές στην θερμοκρασία στα θηλαστικά μπορούν να προκαλέσουν θάνατο. Όμως τέτοιες μικρές μεταβολές παρατηρούνται και κατά την CR. Έχει γίνει και η ερμηνεία ότι η μακροζωία της CR προκύπτει από την πτώση αυτή [27]. Φυσικά αυτό δεν ισχύει απλά ο μηχανισμός τους είναι κοινός.

Επιστρέφοντας στην UCP2 και γενικότερα στην οικογένεια UCP, που έχει περίπλοκη ιστορία καθώς έχει κατηγορηθεί για την πρόκληση [ανοχής](#) της ινσουλίνης, διαβήτη και παχυσαρκίας ενώ σήμερα χαρακτηρίζεται ως γονίδιο μακροζωίας [28] και είναι γνωστό το αντίθετο τουλάχιστον για την παχυσαρκία, κυρίως λόγω της σχέσης της με τον καφέ λιπώδη ιστό (BAT) [29], όπως και το [PGC1-α](#) [30]. Σίγουρα δεν θα μπορούσε το UCP, που έχει ίδια δράση με την 2,4 δινιτροφαινόλη (DNP) να προξενήσει παχυσαρκία, μία ουσία που είναι γνωστή για την αύξηση του μεταβολισμού και το αδυνάτισμα [31], πλέον απαγορευμένη λόγω των παρενεργειών και των θανάτων από υπερβολική χρήση. Είχε χρησιμοποιηθεί και στον 2ο παγκόσμιο πόλεμο για να κρατήσει ζεστούς τους ρώσους στρατιώτες. Σε καμία περίπτωση το φάρμακο αυτό δεν είναι κατάλληλο για χρήση. Η καλύτερη συμβουλή για την αύξηση του BAT είναι η γυμναστική στο κρύο [32], και όπως για όλα αναφέρονται, θα χρειαστεί και άλλη μελέτη. Το ίδιο ισχύει και για την κρυοθεραπεία, για την οποία η πιο ενθαρρυντική ένδειξη ήρθε από μια πρόσφατη έρευνα που έδειξε ότι τα επίπεδα των Sirt1,3 στο αίμα αυξήθηκαν μετά από μια, και συνεχίστηκε η αύξηση τους, μετά από πολλές κρυοθεραπείες, με την μεταβολή να επηρεάζεται από την ηλικία και την άσκηση του ατόμου [33]. Τι γίνεται όμως στην άλλη άκρη του θερμομέτρου;

Συγκριτικά, το ερευνητικό ενδιαφέρον είναι πολύ λιγότερο. Ο Sinclair έχει δείξει στην μαγιά, ότι όταν καλλιεργήθηκε σε θερμοκρασίες που οριακά το επιτρέπουν (από 30°C - 37°C), τα κύτταρα επέζησαν 30% περισσότερο, το PNC1 υπερεκφράστηκε και συνεπώς και η Sir2. Παρατηρήθηκε δηλαδή ο ίδιος μηχανισμός με την CR.

Για τους ανθρώπους δεν υπάρχουν σημαντικά στατιστικά για να στηρίξουν κάτι αντίστοιχο. Μια αντίστοιχη της κρυοθεραπείας, πιο γνωστή και πιο αρχαία τακτική, η σάουνα, έχει εξεταστεί για πιθανά οφέλη, με κάποια αποτελέσματα να υποστηρίζουν μειωμένες πιθανότητες θανάτου ειδικά από καρδιαγγειακές ασθένειες [34]. Γρήγορα συμπεράσματα όμως μπορούν εύκολα να οδηγήσουν σε biases.

## 2.6 Biases

Οι μέχρι στιγμής συμβουλές για καλύτερη υγεία είναι σχετικά generic, αν και το να κρυώνεις, να ζεσταίνεσαι, και να πεινάς, σε άβολο βαθμό, θεωρείται από πολλούς παράλογο. Ωστόσο είναι κοινώς αποδεκτό ότι το να μην τρως πολύ, να τρως λαχανικά, να τρως κρέας σπάνια ή να τρως μόνο ψάρι και να γυμνάζεσαι θα σε βελτιώσει. Για αυτό και οι στατιστικές εύκολα μπορεί να

θεωρηθούν biased. Ακόμη και να μην ισχύει η όλη σχέση με τις σιρτουίνες τα αποτελέσματα ήταν φαινομενικά αναμενόμενα γιατί οι καλές αυτές συνήθειες βοηθούν το κυκλοφορικό, αποτρέπουν την καρκινογένεση, δημιουργούν ένα ισχυρό μυοσκελετικό και γενικά έχουν αμέτρητα προτερήματα. Ο ισχυρισμός ότι τα προτερήματα αυτά προκύπτουν όλα από τις άμυνες που ενεργοποιούνται κατά το stress είναι επικίνδυνος. Σημαντικό λάθος σε τέτοιες έρευνες σε ανθρώπους μπορεί να είναι και η μη ισοστάθμιση των άλλων μεταβλητών. Ένας άνθρωπος που τρώει λιγότερο, είναι πιο πιθανό να γυμνάζεται από έναν υπέρβαρο και γενικότερα να προσέχει την υγεία του ή και να έχει γενετική προδιάθεση που να τον σπρώχνει προς τις σωστές επιλογές. Για αυτό και αναλύθηκε κυρίως ο κυτταρικός μηχανισμός και τα στατιστικά είναι απλά υποστηρικτικά. Βέβαια και στο κύτταρο η πιθανότητα του bias είναι τεράστια λόγω των πολλών παραγόντων. Άλλωστε, για πολλά από όσα αναλύθηκαν, υπάρχουν και αντικρουόμενες μελέτες, όπως [αυτή](#) που αποδίδει την αύξηση του προσδόκιμου από τις DR σε πρότυπους οργανισμούς, στις κακές για την μακροζωία συνθήκες αναφοράς, μη βλέποντας σημαντική αύξηση σε άλλους οργανισμούς. Άλλα σημαντικά σημεία είναι η διαφορά μεταξύ των δύο φύλων που αποδίδεται στο ότι τα θυλικά επηρεάζονται περισσότερο από την διαδικασία της αναπαραγωγής ([σε συμφωνία με τις πρώτες θεωρίες](#)), κάτι που παρατηρείται και σε άλλα [πειράματα](#) που αναφέρθηκαν. Επίσης τονίζει ότι η PR φαίνεται να έχει καλύτερα αποτελέσματα από την CR.

Στο τέλος της εργασίας ([1\\*](#)) θα γίνει απόπειρα πρότασης πειραμάτων που μπορεί να ξεκαθαρίσουν λίγο την εικόνα.

Πριν από όλα αυτά, υπάρχει και κάτι άλλο που καλό θα ήταν να αποφεύγουμε.

## 2.7 ΒΛΑΒΕΣ ΣΤΟ DNA

Ένας εντελώς άλλος τρόπος να περιοριστεί η επιγενετική βλάβη, σύμφωνα με το κύκλωμα της γήρανσης, είναι να περιοριστεί η γενετική βλάβη.

Ενώ είναι αναπόσπαστο κομμάτι της ζωής στην γη, δεν είναι συνετό να προκαλούμε περισσότερη με ανθρώπινες δραστηριότητες και συνήθειες που μπορούμε να αποφύγουμε. Ακόμη και αν η θεωρία για την γήρανση είναι λάθος, τουλάχιστον μειώνουμε τις πιθανότητες καρκίνου. Σε συνέχεια των καθόλου πρωτότυπων συμβουλών, το τσιγάρο συν των άλλων προκαλεί γενετική βλάβη με τις αρωματικές αμίνες που περιέχει. Στις μεγάλες πόλεις, και ο αέρας που αναπνέουμε έχει παρόμοια αέρια λόγω των αυτοκινήτων [\[35\]](#) πόσο μάλλον στις βιομηχανικές περιοχές. Πολύ πιθανές καρκινογόνες και γηραντικές ουσίες είναι τα PCBs ([Polychlorinated biphenyls](#)) που μπορεί να βρίσκονται σε πλαστικά που λόγω της γνωστής κακοδιαχείρισης καταλήγουν πάλι σε εμάς μέσω της τροφικής αλυσίδας, Azo βαφές σε κίτρινη μελάνι, κοσμητικά προϊόντα [\[36\]](#) και πυροτεχνήματα, [Οργανοαλογονίδια](#) που βρίσκονται σε διαλυτικά, απολιπαντικά και εντομοκτόνα όπως το DDT [\[37\]](#) αποδεδειγμένα βλάπτουν το dna. Αν και τίποτα από αυτά δεν προσδοκάται να έρθει σε επαφή με εμάς, δεν είναι [καθόλου απίθανο](#) να συμβεί. Οι ίδιες οι τροφές που καταναλώνουμε μπορεί να μας προκαλούν γενετική βλάβη καθώς περιέχουν ενώσεις όπως το N-nitroso που υπάρχει σε τροφές που επεξεργάστηκαν με sodium nitrite όπως μπύρες και επεξεργασμένα κρέατα και ιδίως στο bacon [\[38\]](#).

Τέλος, η καθόλου αμελητέα ιοντίζουσα ακτινοβολία, που τόσο πολύ έχει μισηθεί από το ευρύ κοινό κυρίως στο άκουσμα της λέξης ραδιενέργεια. Πολλοί επαγγελματίες που εκτίθενται κάθε μέρα σε ιοντίζουσα ακτινοβολία την έχουν αποποινοικοποιήσει με το πρόσχημα ότι σε τόσο χαμηλές δόσεις η ζημιά είναι αμελητέα, άλλωστε για αυτό παίρνονται τόσα μέτρα, ώστε να ελαχιστοποιηθεί, και εξάλλου δεχόμαστε καθημερινά ακτινοβολία από φυσικές πηγές, έχουμε προσαρμοστεί σε αυτήν. Αν και ο καρκίνος ως στοχαστικό φαινόμενο μπορεί να μην εμφανιστεί ποτέ, ακόμη και αν οι περιβαλλοντολογικές μας συνθήκες δεκαπλασίασαν την πιθανότητα του, το κύκλωμα της γήρανσης δεν είναι στοχαστικό. Κάθε σπάσιμο στο DNA προκαλεί πανικό στις σιρτουίνες και τελικά επιγενετικό θόρυβο. Άλλες θεωρίες γήρανσης (που διαφωνούν με την κεντρική ιδέα της διπλωματικής αυτής), όπως η θεωρία των μεταλλάξεων, είναι λιγότερο ανεκτικές με την ιονίζουσα και όλους τους μεταλαξιογόνους παράγοντες. Παρεμπιπτόντως η θεωρία αυτή στηρίζεται με σημαντικές έρευνες και [σήμερα](#). Ωστόσο επισημαίνεται πως προφανώς δεν είναι εφικτή η συνεχής αποφυγή, κάποιες φορές είναι απλά πολύ χρήσιμη (ενέργεια, ιατρική, βιομηχανία) με τις εναλλακτικές προς το παρόν να είναι χειρότερες για την υγεία (πχ τα ορυκτά καύσιμα ή μια κακή διάγνωση) και οι τεχνικές ακτινοπροστασίας είναι γνωστές, όμως είναι ένας ακόμη λόγος μη εφησυχασμού. Το ίδιο ισχύει και για την προστασία από τον ήλιο.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3**

### **ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ**

#### **3.1 ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΤΩΝ AMPK/mTOR**

Ωστόσο η πλειονότητα των ανθρώπων δεν διαθέτει την πειθαρχία ή την διάθεση να εφαρμόσει αυτό τον τρόπο ζωής, κυρίως όταν απαιτείται η μεταβολή της αδρανειακής μας κατάστασης χωρίς να υπάρχει άμεση επιβράβευση. Είναι προτιμητέα η καταβολή της λιγότερης προσπάθειας, παίρνοντας την μέγιστη απόδοση. Αλλά ακόμη και αν ο τρόπος ζωής ήταν αψεγάδιαστος, η φαρμακευτική παρέμβαση είναι αναπόφευκτη για την μέγιστη καταπολέμηση της γήρανσης. Προηγουμένως αναφέρθηκαν τα [συμπληρώματα](#) NMN και NR, που λειτουργούν αποδεδειγμένα σε ποντίκια και με ανέκδοτα "στατιστικά" σε ανθρώπους. Όμως οι πιθανές ενώσεις που μπορεί να δρουν ενισχυτικά για τις SIRT, το AMPK, κατασταλτικά για το mTOR, και για άλλες συσχετισμένες με την γήρανση μεταβολικές οδούς, ενδέχεται να είναι αμέτρητες, φαίνεται εξάλλου από τα πόσα ένζυμα και όχι μόνο, εμπλέκονται σε αυτές, εξάλλου όποιο από αυτά και αν πειράζουμε, επηρεάζει και τις δύο οδούς. Δεν θα δοθεί έμφαση σε αυτό, καθώς απαιτεί τεράστια φαρμακευτική ανάλυση. Όμως θα αναλυθούν οι πιο σημαντικές και ενδιαφέρουσες ουσίες. Για αρχή ας δούμε κάποια μόρια που παράγει ο ίδιος ο οργανισμός μας, αν και δεν συζητούνται τόσο στην αντιγήρανση όσο τα επακόλουθα.

Λεπτίνη, είναι ευρέως γνωστή ως η ορμόνη που σε αδυνατίζει. Εκκρίνεται από τον λιπώδη ιστό, μειώνοντας την όρεξη μας για φαγητό όταν ανιχνεύει ινσουλίνη, ώστε να μην φάμε υπερβολικά. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιεί την S6K1 για να φωσ/σει ανασταλτικά το υποθαλάμιο AMPK (στην

S491 της α2 υπομονάδας) [6]. Ωστόσο στους άλλους ιστούς όπως στους σκελετικούς μύες, φαίνεται να ενισχύει το AMPK, αν και δεν εντοπίστηκε κάποιος ξεκάθαρος μηχανισμός. Μια εξήγηση ίσως είναι η αποφυγή συσσώρευσης FAs και άρα της λιποτοξικότητας [1]. Υπάρχει και άλλη κυτοκίνη που παρουσιάζει αυτή την διαφορική συμπεριφορά ως προς το AMPK, ο ciliary neurotrophic factor, καθώς ενώ μειώνει την όρεξη, προωθεί την οξειδωση λιπαρών οξέων. Αν η θεωρία αυτή ισχύει, τότε θα είχαμε ένα πιθανό φάρμακο που θα έκανε την cι, πιο εύκολη για τους λαίμαργους ανθρώπους. Το ερευνητικό ενδιαφέρον εδώ σχετίζεται με την καταπολέμηση της παχυσαρκίας, αλλά η διπλωματική αυτή εξετάζει μόνο την γήρανση. Μια άλλη αδιποκίνη, η αδιπονεκτίνη, ανακαλύφθηκε πρόσφατα και έχει πιο ισχυρό συσχετισμό με την μακροζωία. Η λειτουργία της δεν είναι γνωστή όμως ξέρουμε ότι εκκρίνεται λιγότερο στους παχύσαρκους, έχει αντιφλεγμονώδη δράση που ίσως εξηγεί την σχέση της με την υγεία του καρδιαγγειακού, και σε συνδυασμό με το ότι προωθεί την διάσπαση τριγλυκεριδίων και την β οξειδωση, είναι ίσως εύλογο το ότι αυξάνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη. Άτομα με λιποδυστροφίες, που είναι πολύ αδύνατα γιατί δεν μπορούν να αποθηκεύσουν λίπος με κανονικό λιπώδη ιστό και το αποθηκεύουν σε μύες και όργανα όπως το ήπαρ, όπως συμβαίνει και στους παχύσαρκους αλλά σε αυτούς λόγω χωρητικότητας, εμφανίζουν και αυτά χαμηλή [αδιπονεκτίνη] και αυξημένη ανοσία στην ινσουλίνη [2α]. Η λεπτίνη φαίνεται να ελέγχει την έκφραση αδιπονεκτίνης και μαζί ίσως καθορίζουν τις λειτουργίες των λευκών λιποκυττάρων. Η αντίθετη ορμόνη της λεπτίνης λέγεται Ghrelin ή ορμόνη της πείνας καθώς είναι ορεξιογόνο που εκκρίνει το στομάχι. Στον υποθάλαμο προωθεί την ενεργοποίηση της AMPK μέσω CaMKK2, ενώ στο υπόλοιπο σώμα ξεκινάει την λιπογένεση (ενισχύει το mTOR τουλάχιστον στο ήπαρ) και γενικά ρίχνει τον μεταβολισμό [2β].

Τα δεδομένα είναι λίγο περίεργα. Γιατί όταν έχουμε τραφεί να ξεκινάει η λιπόλυση και ο μεταβολισμός των λιπαρών οξέων ενώ όταν πεινάμε να γίνεται το αντίθετο; Πιθανώς αν απαντηθούν δύο ερωτήματα, θα επιλυθεί και το “παράδοξο”. Σε ποιο στάδιο της πέψης η λεπτίνη ενεργοποιεί το AMPK, και τι γίνεται αν δεν τραφούμε όταν το προστάζουν (2\*);

Μπαίνοντας στα βαριά χαρτιά για την καταπολέμηση της γήρανσης, θα μελετήσουμε τους αναστολείς του mTOR. TOR σημαίνει στόχος της ραπαμυκίνης. Η ραπαμυκίνη είναι ο πιο γνωστός καταστολέας του TOR, άρα αναμένεται να επιμηκύνει και το προσδόκιμο. Πράγματι στην μαγιά [3] στην φρουτόμυγα [4] και σε ποντίκια που ήταν ήδη γερασμένα [5] υπήρξε σημαντική αύξηση. Ωστόσο για ζώα με μεγαλύτερο προσδόκιμο, η ιστορία είναι διαφορετική. Η ραπαμυκίνη πρώτα αναγνωρίστηκε ως αντιμυκητιακό, όσο οξύμωρο και αν είναι, για τον ίδιο λόγο που επιμηκύνει την ζωή στην μαγιά, επιβραδύνει τον πολλαπλασιασμό της. Όμως κατά την χορηγία της για την θεραπεία μυκητιάσεων, παρατηρήθηκε και ότι καταστέλλει το ανοσοποιητικό σύστημα, [6] κρίνοντας το ακατάλληλο, όχι όμως άχρηστο, καθώς χρησιμοποιείται στις μεταμοσχεύσεις. Άλλο πρόβλημα είναι η τοξικότητα που προκαλεί στους νεφρούς. Παρόλα αυτά, σε χαμηλές δόσεις είναι ευεργετική για την υγεία και ειδικότερα το γήρας και είναι εγκεκριμένο για ασφαλή χρήση από τον FDA. Η ανικανότητα της να χρησιμοποιηθεί σε μεγάλες δόσεις περιορίζει και την χρησιμότητά της. Για αυτό αναζητούνται παρόμοιες ενώσεις (Rapalogs) που ίσως να έχουν καλύτερη ειδικότητα και όχι παρενέργειες.

Ίσως η πιο ενδιαφέρουσα ένωση είναι η μετοφορμίνη. Η ουσία αυτή χορηγείται στα άτομα με διαβήτη τύπου 2 καθώς αυξάνει την γλυκόλυση. Αυτό το επιτυγχάνει με παρόμοιο τρόπο με την DNP και την UCP2, δηλαδή ενισχύοντας το uncoupling [7]. Επιτρέπει στα κατιόντα υδρογόνου να εισέλθουν στο εσωτερικό, χαλώντας την διαφορά δυναμικού που χρειάζεται για να περνούν από την αντλία πρωτονίων και να δίνουν ενέργεια στην ATP συνθάση. Έτσι μειώνεται η παραγωγή ATP και ως απάντηση σε αυτό, τα κύτταρα αυξάνουν την γλυκόλυση. Συνεπώς, μειωμένη [ATP] σημαίνει και ενεργοποίηση του AMPK με ότι αυτό συνεπάγεται. Ωστόσο οι μηχανισμοί δράσεις της μπορεί να είναι και άλλοι. Αποδεδειγμένα επίσης μπορεί να χαρακτηριστεί αντικαρκινική και ειδικά για την γήρανση, φαίνεται πως έχει άμεσα αποτελέσματα στην επιγενετική πληροφορία [8] αλλά και σε όλες τις κυτταρικές ενδείξεις της [9] εμπλέκοντας σχεδόν όλες τις ενώσεις που έχουμε συναντήσει. Ίσως πιο σημαντικό από όλα είναι ότι κατασκευάζεται ήδη σε μεγάλες ποσότητες και κοστίζει πολύ λίγο. Βέβαια δεν γίνεται ακόμα συνταγογράφηση για αντιγήρανση, όμως γίνονται κλινικές δοκιμές και το γεγονός ότι χρησιμοποιείται εδώ και πολύ καιρό σε μια τόσο μεγάλη ομάδα πληθυσμού (29εκ αμερικανοί έχουν DT2) θα διευκολύνει πάρα πολύ την έγκριση του. Μεταξύ των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται είναι με διαφορά το πιο ελπιδοφόρο [10].

Η άλλη σημαντική κατηγορία είναι οι ενεργοποιητές των σιρτουινών ή STACs (sirtuin activating compounds). Η πιο γνωστή ένωση είναι η ρεσβερατρόλη, αν και δεν ενεργοποιεί ακριβώς τις σιρτουίνες. Η αλληλεπίδραση της με τις σιρτουίνες δεν αυξάνει την συγκέντρωσή τους, αλλά επιταχύνει τις αντιδράσεις τους - πιο δραστικές. Ο λόγος της υψηλής δημοτικότητας της έχει να κάνει αρκετά με το ότι βρίσκεται στο κόκκινο κρασί [11]. Έτσι άρθρα του τύπου “το κρασί μπορεί να επιμηκύνει το προσδόκιμο” ήταν δελεαστικά για το ευρύ κοινό. Βέβαια η πραγματικότητα είναι πιο σύνθετη. Στο άρθρο διευκρινίζεται ότι οι συγκεντρώσεις είναι πολύ χαμηλές κυρίως γιατί δεν είναι ευδιάλυτη στο έντερο και συνεπώς μεγάλο ποσοστό δεν απορροφάται αλλά ούτε είναι αρκετά δραστική, ένας ακατάλληλος συνδυασμός για την δημιουργία φαρμάκων. Για να έχουμε τα ίδια αποτελέσματα με τα ποντίκια στην έρευνα θα θέλαμε ~1000 ποτήρια κρασί ημερησίως. Όμως, όπως και η ραπαμυκίνη, δημιουργεί προοπτικές για μόρια που δεν θα έχουν τους δικούς τους περιορισμούς. Επίσης ήταν και η αφορμή για την θεωρία της Ξενόρμεσις. Όλες οι ενώσεις που έχουν αναφερθεί και πολλές ακόμα είναι φυτοχημικά που εκκρίνουν όταν βρίσκονται σε stress. Στην αντιγήρανση δεν χρησιμεύουν τα παρασιτοκτόνα και άλλα τέτοια φυτοχημικά (χρησιμεύουν στην γεωργία), αλλά φυτοχημικά από stressors όπως η ξηρασία ή ο παγετός. Η θεωρία αυτή λέει ότι οι ετερότροφοι έχουμε μάθει να αναγνωρίζουμε αυτές τις ενώσεις από τα φυτά ώστε να προετοιμάζουμε τους οργανισμούς μας για τις επακόλουθες δύσκολες συνθήκες (ενεργοποιώντας το κύκλωμα της επιβίωσης) [12]. Δεν ακούγεται και εντελώς λογική ιδέα, καθώς θα μπορούσε πολύ απλά να έχει επίδραση σε εμάς για τον ίδιο λόγο που έχει επίδραση στα φυτά. Δεν είναι απαραίτητο δηλαδή να έχουμε αναπτύξει κάποιον ειδικό μηχανισμό. Άλλωστε το κύκλωμα της επιβίωσης είναι τόσο αρχαίο όσο και η ζωή. Ωστόσο είναι ωραία προσέγγιση που δίνει και έμπνευση για άλλες ιδέες (5\*). Είναι και μια αφορμή για άλλη μια όχι πρωτότυπη συμβουλή, να καταναλώνουμε προϊόντα από φυσικές καλλιέργειες.



STACs με καλύτερη προοπτική είναι τα συνθετικά SRT1720 και SRT2104. Η 1720 είναι η πιο μελετημένη και είναι αγωνιστής της SIRT1, δηλαδή προσδένεται σε ένα αλλοστερικό υποδοχέα της βελτιώνοντας την επαφή με το υπόστρωμα στο ενεργό της κέντρο. Ενώ έχει δοκιμαστεί επιτυχώς σε ποντίκια [13], για τις [κλινικές δοκιμές](#) έχει επιλεγθεί η SRT2104. Σημαντικός περιορισμός είναι ότι δρουν εξατομικευμένα για κάθε σιρτουίνη, σε αντίθεση με το NMN και το NR που είναι για όλες. Μια λίστα με τις κλινικές δοκιμές σε πολλά από τα αναφερθέντα μόρια μέχρι το 2017 είχε γίνει από το εργαστήριο επιγενετικής του Κιέβου [14]. Για να προκύψει το βέλτιστο αποτέλεσμα θα πρέπει και να συνδυαστούν. Οι σχέσεις αυτές όμως δεν είναι ποτέ γραμμικές. Ποιές τιμές των μεταβλητών μεγιστοποιούν την συνάρτηση της ζωής; Θα πρέπει πρώτα να ορίσουμε την συνάρτηση.

### 3.2 ΕΜΠΟΔΙΑ

Όταν συζητούνται φάρμακα, πάντα το δεύτερο κομμάτι της συζήτησης είναι η δοσολογία. Δεν είναι μόνο στα φάρμακα όμως. Μέχρι ποιόν βαθμό οι stressors μας κάνουν καλό και πότε αρχίζουν να προκαλούνται σημαντικές για την υγεία βλάβες, και όχι οι βραχυπρόθεσμες όπως ο λιμός ή η υποθερμία.

Ας υποθέσουμε (που ποτέ δεν ισχύει) ότι οι ενώσεις που εξετάστηκαν έχουν μηδενική τοξικότητα και μηδενικές παρενέργειες. Μήπως ο ίδιος ο μηχανισμός γίνεται πρόβλημα εάν ενεργοποιείται διαρκώς; Αρχικά πρέπει να απαντηθεί εάν το κύκλωμα ενεργοποιείται περισσότερο όσο προσθέτουμε stressors και συνδυάζουμε φάρμακα.

Ενώ τα μόρια επιδρούν στον ίδιο μηχανισμό, δεν μπορούμε υπερβάλλοντας στο ένα να υπερκαλύψουμε το άλλο. Ενώ υπάρχει υπερκάλυψη σε μερικά σημεία, οι αντιδράσεις που εμπλέκονται έχουν πολλά στάδια που δεν γίνονται από το ίδιο μόριο. Μελετώντας ένα πράγμα μόνο, την ενεργοποίηση του AMPK, ήταν ξεκάθαρο πως μπορεί να γίνει με πολλές διαφορετικές φωσφ/σεις σε πολλές από τις υπομονάδες του. Γι'αυτό ο συνδυασμός έχει καλύτερα αποτελέσματα ενώ η αύξηση της συγκέντρωσης μίας μόνο ένωσης θα εμφανίσει γρήγορα πλατό. Πότε θα εμφανίσουν πλατό όμως όλες μαζί; Τι απαγορεύει στο κύκλωμα να λειτουργεί διαρκώς; Η ζωή δεν είναι η αυτοσυντήρηση. Ένα ειδοποιό χαρακτηριστικό της είναι ο πολλαπλασιασμός. Αν και λογικά κανένας συνδυασμός των ενώσεων δεν μπορεί να έχει τόσο υψηλή δραστηριότητα ώστε να προκαλέσει δυσλειτουργία στον κυτταρικό κύκλο, μήπως αυτό συνεπάγεται ότι δεν έχουν και αρκετή αντιγηραντική προοπτική; Με γνώμονα την αυτοφαγία, εύκολα λέμε όχι. Η αυτοφαγία δεν σταματάει την περαιτέρω ζημία, διορθώνει την ήδη υπάρχουσα. Αρα δεν χρειάζεται το κύτταρο να παγώσει στον χρόνο για να μην αποκτήσει τα σημάδια του. Το ερώτημα για την αυτοφαγία είναι πότε ξεκινάει, πως διαλέγει τι θα “φάει” και μπορούμε αντί να αφήνουμε τον οργανισμό να επιλέγει αυτός τι θα φάει, να του προστάζουμε εμείς τι να προτιμήσει (3\*); Με γνώμονα τον επιγενετικό θόρυβο, που είναι και η θεωρία της γήρανσης που στηρίζει η εργασία αυτή, η εικόνα είναι πολύ διαφορετική. Για να μην υπάρχει επιγενετικός θόρυβος, πρέπει οι επιγενετικοί παράγοντες να μην μετακομίζουν. Δεν χρειάζεται να είναι διαρκώς ενεργό το AMPK και η αυτοσυντήρηση, χρειάζεται όμως οι σιρτουίνες να είναι στο DNA, ή μάλλον να είναι τόσο πολλές ώστε να περισσεύουν και στην περίπτωση βλάβης να μην χρειαστεί να αφήσουν την θέση

τους (αν και πλεόνασμα σιρτουινών ίσως προκαλέσει μια τάση ενεργοποίησης του AMPK, λογικά χωρίς να εμποδίζει αρκετά το mTOR). Τώρα όμως προκύπτουν νέα ερωτήματα. Μένουν όντως στην θέση τους [\(4\\*\)](#);

Αν δεν ισχύει η τελευταία αμφιβολία, τότε το πιο σημαντικό σημείο έρευνας θα είναι η υπερέκφραση σιρτουινών. Ακόμη και αν ο θόρυβος είναι αναπόφευκτος, πάλι ίσως είναι η καλύτερη (από όσες έχουν αναφερθεί έως τώρα) μέθοδος να τον καθυστερήσουμε. Εκτός από τους έμμεσους τρόπους να αυξηθεί η διαθεσιμότητα των σιρτουινών, υπάρχουν και πιο σκληροπυρηνικοί, υψηλής βιοτεχνολογίας μέθοδοι.

### 3.3 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ

Δεν είναι τυχαίο που το πρώτο πράγμα που έκαναν οι ερευνητές μετά τις ανακαλύψεις στην μαγιά ήταν η προσθήκη αντιγράφων Sir2 στο DNA της. Με στόχο την αύξηση στις συγκεντρώσεις τους, η γενετική τροποποίηση θα είναι ο πιο αποτελεσματικός τρόπος. Βέβαια δεν είναι το ίδιο εύκολο να γίνει σε ανθρώπους. Οι γενετικές θεραπείες υφίστανται από το 1970 όταν σε δύο αδελφές με υπεραργινιναιμία χορηγήθηκε ένας ιός που προσβάλλει τους λαγούς, Shope papilloma, που είχε παρατηρηθεί ότι εμποδίζει την αργινάση και ρίχνει την [Arg], χωρίς όμως καμία επιτυχία. Η πρώτη στοχευμένη και επιτυχημένη θεραπεία έγινε σε ένα τετράχρονο με πρωτογενή ανοσολογική ανεπάρκεια που της έλειπε το γονίδιο για την σύνθεση της απαμινάσης της αδενοσίνης (ADA) με αποτέλεσμα να πεθαίνουν τα Τ λεμφοκύτταρα της. Με έναν απενεργοποιημένο ιικό φορέα εισήγαγαν το γονίδιο στα αιμοποιητικά της κύτταρα, με την κοπέλα να είναι πλέον υγιέστατη στα τριάντα της. Βέβαια αυτό δεν είναι πάντα το αποτέλεσμα. Για μία άλλη μετάλλαξη της ίδιας πάθησης, 5/20 παιδιά απέκτησαν καρκίνο, ενώ σε άλλες περιπτώσεις έχει προκύψει θανάσιμη ανοσολογική απόκριση. Σίγουρα δεν είναι εύκολο εγχείρημα. Άλλο πράγμα η προσθήκη ενός γονιδίου με την crispr cas9 σε ένα ζυγωτό, ή μια απλή μετάλλαξη σε υπάρχον γονίδιο, όπως έκανε το 2018 ο He Jiankui, και τελείως άλλο η εισαγωγή του με έμμεσους τρόπους σε όλους τους ιστούς μέσα σε έναν ανεπτυγμένο άνθρωπο και στην περίπτωση μας πρεσβύτερο. Τα λάθη δεν συγχωρούνται, δεν επιτρέπεται η προσπάθεια για βελτίωση της υγείας κάποιου τελικά να την χειροτερεύσει. Όμως υπάρχει πρόοδος και θα υπάρξει περισσότερη. [\[15\]](#)

Μεγάλη μερίδα επιστημόνων έχει ως αρχική αντιγηραντική προσέγγιση την προέκταση των τελομερών. Έτσι είναι λογικό ότι η πρώτη γονιδιακή θεραπεία σχεδιάστηκε με αυτό στο μυαλό. Χρησιμοποιήθηκε ο ιικός φορέας AAV (adeno - associated virus), που έχει το πλεονέκτημα σε σύγκριση με τους αδενοϊούς, ότι η ανοσολογική αντίδραση του δέκτη είναι ελάχιστη, ενώ έχει πιο αργή έκφραση και μικρότερη χωρητικότητα dna (4,5 kb) που όμως είναι αρκετά για το γονίδιο της τελομεράσης hTERT. Η τεχνική αυτή ήταν στην [κλινική φάση 1](#) το 2019 για την καταπολέμηση νευροεκφυλιστικών παθήσεων όπως το Alzheimer. Ο νευρικός ιστός έχει ιδιαίτερες προκλήσεις και είναι ο βασικός λόγος που αυτές οι προσπάθειες καταπολέμησης της γήρανσης μπορεί να [αποτύχουν](#).

Οι ιοί δεν είναι απαραίτητοι, είναι όμως σχεδόν πάντα αποτελεσματικότεροι. Ένα απλό πλασμίδιο μπορεί να καταφέρει να εισαχθεί στο κύτταρο και να εκφραστεί (non viral gene therapy). Φυσικά οι πιθανότητες να τα καταφέρει είναι πολύ λίγες, όπως και ο χρόνος ζωής του μέσα στο κύτταρο.

Είναι όμως πολύ πιο εύκολο να γίνει τεχνολογικά και έχει συγκριτικά μηδενική τοξικότητα. Για να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα το πλασμίδιο μπορεί να εισαχθεί σε ένα μικκύλιο που πιθανώς θα έχει πρωτεΐνες και άλλα βιομόρια που θα βοηθήσουν στο να επιτευχθεί η διείσδυση στο κύτταρο, όπως η κάψα στους ιούς. Βέβαια τα δισεκατομμύρια χρόνια της εξέλιξης δεν συγκρίνονται με τις νανοβιοσυνθετικές δυνατότητες μας εν έτη 2022.

Επιπλέον, σε ιστούς που αυτό επιτρέπεται, όπως στο αίμα, μπορεί να εξαχθούν κύτταρα και μετά από τροποποίηση να επανενταχθούν στον οργανισμό (ex vivo γονιδιακή θεραπεία). Έτσι η διαδικασία είναι πιο ελεγχόμενη, ειδικευμένη και εμφανίζει μικρότερη ανοσοτοξικότητα καθώς όσο είναι εκτός οργανισμού, δεν βρίσκονται σε επαφή με τα λευκοκύτταρα και όταν εισέλθουν έχει περάσει η έντονη φάση της διακυτταρικής επικοινωνίας ως απάντηση στην μόλυνση.

Με όλα αυτά που περιγράφηκαν, μπορεί να συνδυαστεί μία ενδονουκλεάση [\[16\]](#) για να γίνει η εισαγωγή του γονιδίου, μέσα στο χρωμόσωμα ή η όποια γενετική τροποποίηση σε μία συγκεκριμένη θέση, όχι τυχαία σαν transposon.

Μια σκέψη για ακόμη πιο στοχευμένη γονιδιακή θεραπεία είναι αρχικά η δημιουργία του γονιδιώματος που θέλουμε με γενετική τροποποίηση, μετά η εισαγωγή του σε απύρηνο κύτταρο και τέλος η καλλιέργεια με την βοήθεια βλαστοκυττάρων ώστε να φτιαχτεί ο επιθυμητός ιστός, ή αν λύσουμε το μυστήριο της κυτταρικής διαφοροποίησης, πιθανώς χωρίς αυτά. Πρακτικά αυτό σημαίνει να καλλιεργήσουμε τον βελτιωμένο κλώνο μας και να το εισαγάγουμε στον οργανισμό μας. Πιθανώς στο μέλλον να μπορούμε να κάνουμε κάτι τέτοιο. Σημαντικό ερώτημα όμως πριν την τροποποίηση, είναι τι θα τροποποιηθεί. Η τελομεράση όπως έχει προαναφερθεί, δεν είναι σε καμία περίπτωση πανάκεια. Αν και τα πειράματα δείχνουν όντως βελτίωση στο προσδόκιμο και την υγεία, είναι ξεκάθαρο ότι αυξάνει τις πιθανότητες καρκινογένεσης. Κυρίως όμως δεν λύνει παρα ένα από τα πολλά συμπτώματα της γήρανσης. Ακόμη και με την πληροφοριακή θεωρία της γήρανσης, όπως [εξηγήθηκε](#), μόνο η υπερέκφραση των σιρτουϊνών δεν φαίνεται ικανή συνθήκη. Έτσι σημαντικό είναι να εξετάσουμε όλα τα χαρακτηριζόμενα ως γονίδια μακροζωίας. Σύμφωνα με τις μεταβολικές οδούς που αναφέρθηκαν μπορούμε να προτείνουμε πολλά για την αύξηση της έκφραση τους (FOXO, AMPK, PGC1a) ή και το αντίθετο (BECN1, mTOR, IGF1) και πολλά ακόμα, όμως ούτε εύκολο είναι, ούτε θα είχε ριζοσπαστικά αποτελέσματα, ούτε είναι εγγυημένα ασφαλές. Για μια ακόμη φορά, ο καλύτερος δάσκαλος είναι η φύση και η εξέλιξη.

Μια έρευνα κατέληξε στο ότι η γενετική πληροφορία επηρεάζει το προσδόκιμο κατά 25%. Έρευνες σε απογόνους ατόμων με μακροζωία έδειξαν χαμηλότερο ρυθμό σωματικής παρακμής [\[17\]](#). Ωστόσο οι γενετικές διαφορές δεν έχουν μελετηθεί αρκετά. Τα πιο μελετημένα αλληλόμορφα που σχετίζονται με την μακροζωία είναι το FOXO3 και το [KLOTHO](#). Το δεύτερο πήρε το όνομα του από την κλωθώ, την μοίρα που όριζε το μήκος της κλωστής της ζωής. Παρόλη την εντυπωσιακή ονομασία, αντιγηραντικά δεν φαίνεται να είναι κάτι ιδιαίτερο. Μάλλον η αντιγηραντική συσχέτιση προκύπτει από το ότι είναι καταστολέας της οδού ινσουλίνης / igf-1 όπως και τόσα άλλα μόρια που έχουμε συναντήσει. Βέβαια έχει και ομοιοστατική λειτουργία, πιθανώς και άλλες. Στο συχνά εμφανιζόμενο FOXO, συγκεκριμένα στο FOXO3a, έχει μελετηθεί κυρίως μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (SNP) όπως η αλλαγή της T σε C στην θέση rs2764264, η rs2802288\*A και άλλα αλληλόμορφα [\[18,19\]](#), ενώ για SNP σε άλλα υποψήφια



γονίδια (IGF, ADIPOQ, TERT) η ίδια έρευνα δεν βρήκε στατιστικά σημαντική διαφορά, μια παρατήρηση που προκύπτει και από άλλες έρευνες [20]. Ένα τελευταίο γονίδιο, το οποίο και δεν αναφέρθηκε έως τώρα, το APOE, έχει τα αλληλόμορφα ε2, ε3, ε4, μεταξύ των οποίων μόνο οι γονότυποι ε2ε2 και ε2ε3 εμφανίζουν αυξημένες πιθανότητες να φτάσουν το προσδόκιμο που φτάνει μόνο το 1% του πληθυσμού [21]. Μια πρόχειρη ερμηνεία θα ήταν ότι το ε2 είναι επικρατές του ε3 και όχι του ε4, και είναι η μόνη μετάλλαξη που εμφανίζει αυξημένο προσδόκιμο. Το ε4 αντίθετα εμφανίζει σημαντικά χαμηλό προσδόκιμο. Το APOE κωδικεύει την απολιποπρωτεΐνη E που εμπλέκεται στο Alzheimer και σε καρδιαγγειακές παθήσεις. Οι απολιποπρωτείνες ενώνονται με λιπίδια όπως η χοληστερόλη ώστε να ελαττώσουν την υδροφοβικότητα τους για να μπορέσουν να τα μεταφέρουν στο υδατικό περιβάλλον και να καταλογιστούν. Το APOE είναι ο κύριος μεταφορέας χοληστερόλης στον εγκέφαλο εξού και η σχέση με το Alzheimer.

Αλληλόμορφα μακροζωίας θα υπάρχουν πολλά, αλλά ο λόγος που δεν βρίσκονται είναι ο τρόπος που γίνονται οι έρευνες. Τέτοιες στατιστικές προσεγγίσεις έχουν γραμμική λογική που δεν είναι η λογική της φύσης. Ένα γονίδιο από μόνο του, μία πρωτεΐνη δηλαδή, δεν είναι τίποτα. Το αν θα κάνει καλά μια λειτουργία ή όχι εξαρτάται και από τα υπόλοιπα γονίδια. Δεν είναι τυχαίο που άλλα αλληλομορφα του FOXO3 φαίνεται να βοηθούν τους ευρωπαίους, και άλλα τους ασιατές. Για αυτό οι έρευνες πρέπει να γίνονται ολιστικά, ειδικά σήμερα που η ανάλυση τεράστιων δεδομένων γίνεται όλο και πιο εύκολη. Το γονιδίωμα δεν παίζει μόνο 25% ρόλο στο προσδόκιμο, αλλά το 100%, κάτι που δεν σημαίνει ότι το περιβάλλον και οι συνήθειές μας δεν έχουν σημασία. Σημαίνει ότι εάν οι επιστήμονες είχαν αποκρυπτογραφήσει πλήρως την γενετική πληροφορία, θα ήταν εφικτό να κατασκευαστεί πάνω σε αυτές τις συνθήκες ένας οργανισμός με ανοσία στον χρόνο. Και αυτό δεν γίνεται με γραμμικές σχέσεις και επαγωγικούς συλλογισμούς. Δεν θα προστεθούν τα “καλά” γονίδια και τα “καλά” φάρμακα αναμένοντας αναλογική αύξηση στο προσδόκιμο. Πρέπει να γίνει αντιληπτό τι είναι η γήρανση, και αφού έχει εξεταστεί το γιατί γερνάμε, ίσως το επόμενο θέμα πρέπει να είναι γιατί κάποιοι οργανισμοί δεν γερνάνε.

Το πιο πειστικό επιχείρημα πάνω σε αυτό είναι ότι υπάρχουν ήδη τέτοιοι οργανισμοί και είναι εξελικτικά πολλοί μακριά μεταξύ τους. Ο πιο μακρινός με εμάς αλλά και ο πιο εντυπωσιακός είναι το αιωνόβιο πεύκο (Bristlecone pine). Πολλά από τα δέντρα αυτά υπάρχουν πριν τον αρχαίο ελληνικό πολιτισμό. Το αρχαιότερο που έχει μετρηθεί, υπολογίζεται στα ~5000 έτη. Αν και η μακροζωία του έχει να κάνει και με τους [μηχανισμούς άμυνας](#) για έντομα και παράσιτα, το εντυπωσιακό είναι ότι δεν παρουσιάζει φαινόμενο γήρανσης [22]. Για το συμπέρασμα αυτό έλεγξαν το μερίστωμα (βλαστοκύτταρα φυτών) στο κάμβιο, δηλαδή ανάμεσα στο ξύλωμα και το φύλλωμα (αγγειακό σύστημα). Επίσης δεν βρήκαν στατιστικά σημαντική αλλαγή στην ετήσια επιμήκυνση του κορμού και κυρίως δεν βρήκαν συσσώρευση μεταλλάξεων ελέγχοντας τους σπόρους. Υπάρχουν και άλλα δέντρα με εξαιρετική μακροζωία, όπως κάποιες ελιές στην Ελλάδα. Αξίζει να επιβεβαιωθεί και ότι τα δέντρα αυτά διατηρούν επιγονιδίωμα τους. Πρωτίστως όμως πρέπει να αναλυθεί το γονιδίωμα και οι κυτταρικές λειτουργίες. Όσο περισσότερα γνωρίζουμε τόσο πιο εύκολα θα καταλάβουμε και γιατί δεν γερνάει.

Ένας εντελώς διαφορετικός οργανισμός, η ύδρα του γλυκού νερού (hydra vulgaris), έχει μια άλλη προσέγγιση στην ανοσία στον χρόνο. Είναι ένας πολύποδας με μέγεθος 1-3 cm και ενώ στην φύση

πεθαίνει για πολλούς λόγους καθώς δεν έχει τις άμυνες του αιωνόπευκου, στο εργαστήριο έχει ζήσει για 40 χρόνια με μηδενικές ενδείξεις senescence. Η ιδιαιτερότητα όμως είναι στην αναγέννηση. Τα ζώα αυτά όπως και το phylum Platyhelminthes μπορείς να τα διαχωρίσεις σε κύτταρα και άμα τα ευνοούν οι συνθήκες, τα κύτταρα αυτά θα φτιάξουν πάλι τον ίδιο οργανισμό αλλά με πολλούς κλώνους. Αυτό συμβαίνει λόγω του πολύ μεγάλου ποσοστού βλαστοκυττάρων που έχουν. Πέραν της μακροζωίας, αυτό έχει και άλλες πρακτικές εφαρμογές όπως στην προσθετική. [Μελέτες](#) έδειξαν δύο παράγοντες με σημαντικό ρόλο στην αθανασία τους, την ασυνήθιστα μεγάλη αναλογία βλαστοκύτταρα προς ειδικευμένα σωματικά κύτταρα, κάτι αδιανόητο σε εμάς γιατί το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων μας είναι πολύ διαφοροποιημένα για να είναι και λειτουργικά, συνιστώντας όλους τους διαφορετικούς ιστούς μας, και δεύτερον όταν τελικά τα κύτταρα της ύδρας φτάσουν σε ένα υψηλό επίπεδο βλάβης, τα απορρίπτει. Ο μόνος τρόπος να πεθάνει από γήρας είναι ο ρυθμός που δημιουργούνται και απορρίπτονται τα προβληματικά κύτταρα να είναι μεγαλύτερος από τον ρυθμό που φτιάχνει καινούργια, με αποτέλεσμα να συρρικνωθεί και να πεθάνει λόγω κυτταρικής ανεπάρκειας.

Η εξίσου μικρή *turritopsis dohrnii*, γνωστή ως αθάνατη μέδουσα κάνει κάτι ακόμη πιο σοκαριστικό, θυμίζοντας τον μυθικό φοίνικα. Όταν η αθάνατη μέδουσα βρεθεί σε stress είτε λόγω έλλειψης τροφής είτε λόγω συσσώρευσης επιγενετικού θορύβου μπορεί και αναγεννιέται σε μικρό πολύποδα, αλλάζοντας το είδος των ήδη διαφοροποιημένων σωματικών κυττάρων της. Η διαδικασία αυτή λέγεται transdifferentiation. Φυσικά η αλλαγή δεν γίνεται κατευθείαν, πρώτα τα κύτταρα μετατρέπονται σε μία ουδέτερη κατάσταση δημιουργώντας την λεγόμενη κύστη, μια διαδικασία που ομοιάζει πολύ στην μεταμόρφωση που κάνουν ζώα όπως τα βατράχια και οι πεταλούδες. Χωρίς να ξέρουμε ακριβώς πως γίνεται αυτό, μελετώντας την έκφραση των γονιδίων της στα διάφορα στάδια του κύκλου της ζωής της [\[23\]](#), οι ερευνητές είδαν υπερέκφραση μηχανισμών επισκευής, jumping genes, τελομεράσης, και καταστολή οδών διακυτταρικής επικοινωνίας, της μίτωσης και προφανώς της διαφοροποίησης. Το κρίσιμο ερώτημα είναι πώς ξεκινάει η διαδικασία. Η απάντηση είναι ότι αδιαφοροποίητα πολυδύναμα κύτταρα στέλνουν στα υπόλοιπα κύτταρα κάποιους μεταγραφικούς παράγοντες, ως απάντηση στο stress, προκαλώντας αλυσιδωτά αυτήν την αλλαγή. Η συνέχεια είναι στην ουσία η εμβρυογένεση. Οι παράγοντες αυτοί ([YAMANAKA](#)) θα μελετηθούν αργότερα καθώς η κατανόηση και το δάμασμα τους μπορεί να λύσει το πρόβλημα της γήρανσης.

Πιο κοντά σε εμάς αν και λιγότερο εντυπωσιακοί, υπάρχουν και άλλοι οργανισμοί που δεν τους δυσκολεύει ο χρόνος και χωρίς να χρειάζεται να γίνουν άμορφες μάζες που αναγεννιούνται χάνοντας όποια πληροφορία είχαν πριν. Όλοι αυτοί όπως και το αιωνόπευκο, εντάσσονται στην κατηγορία του αμελητέου senescence, καθώς δεν παρατηρείται κανένα από τα σημάδια της γήρανσης ούτε σε κυτταρικό επίπεδο ούτε και φαινοτυπικά, όπως θα ήταν η πτώση της γονιμότητας και η αυξημένη πιθανότητα θανάτου και η αδυναμία. Πιστεύεται ότι υπάρχει senescence απλά είναι τόσο αργό που δεν προλαβαίνει να προκαλέσει πρόβλημα στους οργανισμούς αυτούς.

Ο καρχαρίας της Γροιλανδίας είναι το σπονδυλωτό με την μεγαλύτερη καταγεγραμμένη ηλικία. Χρονολόγηση με ραδιενεργό άνθρακα, έδειξε ότι το ζώο ζούσε για 390 χρόνια με πιθανή απόκλιση

120 χρονια. Εξετάζοντας το dna από δείγμα αίματος, [ερευνητές](#) παρατήρησαν ότι ο καρχαρίας φαίνεται να μην εμφανίζει βλάβες στο dna λόγω ηλικίας και πιθανώς έχει και αυξημένη αντοχή σε γενοτοξικές χημικές ενώσεις και υπέθεσαν ότι αυτό μπορεί να προέκυψε από τις αρκτικές συνθήκες, κάτι που για να έχει περισσότερη βάση, πρέπει να παρατηρηθεί και σε άλλα ζώα του οικοσυστήματος. Πάντως ενώ υπάρχουν και άλλα ψάρια και με μεγάλο προσδόκιμο λίγα βρίσκονται στην αρκτική.

Το χερσαίο ζώο με το υψηλότερο προσδόκιμο είναι γιγαντιαία χελώνα. Τα πρεσβύτερα δείγματα είναι από τις Σεϋχέλλες (Aldabra), τα Γκαλαπαγκος, και όπως τα υπόλοιπα ζώα που αναφέρθηκαν, δεν έχουν σημάδια κυτταρικής γήρανσης, αλλά πεθαίνουν από άλλα αίτια. Προφανώς είναι εύκολο να μελετηθεί ο κύκλος της ζωής της μαγιάς που αντιγράφεται γρήγορα και πεθαίνει μετά από το πολύ 20 κύκλους, όμως πως να μελετηθεί ένα ζώο που ζει κατά μέσο όρο τα διπλά χρόνια από εμάς. Μόνο συγκρίνοντας το με μικρότερα ζώα του ίδιου είδους. Επαναλαμβάνοντας το μοτίβο, βρέθηκε ότι οι χελώνες αυτές είχαν υπερέκφραση γονιδίων σχετικών με επιδιόρθωση βλαβών, με αντιφλεγμονώδη δράση αλλά και στην προστασία από τον καρκίνο [\[24\]](#). Το πιο κοντινό σε εμάς ζώο που χαρακτηρίζεται από το λεγόμενο αμελητέο senescence είναι η φάλαινα *Balaena mysticetus*. Το transcriptome έδειξε και έχει παρόμοια τάση με τα άλλα non senescent ζώα [\[25\]](#). Το πιο σημαντικό μάθημα από την bowhead whale είναι ότι δεν χρειάζεται να ρίχνεις τον μεταβολισμό σου για να ζεις πολύ όπως κάνουν τα βραδύπορα cryptobiosis<sup>14</sup> που δεν είναι επιμήκυνση της ζωής αλλά αναστολή της. Επίσης είναι πιθανό οι stressors που αναλύθηκαν στο κεφάλαιο 2 να παίζουν ρόλο στην μακροζωία της, καθώς έχει χαμηλότερη θερμοκρασία σώματος από είδη με μικρότερο προσδόκιμο και πιθανώς οι υποξικές συνθήκες να δημιουργούν μακροπρόθεσμα ωφέλιμο οξειδωτικό stress. Σημαντικά γονίδια της που φαίνεται να έχουν την αντιγηραντική και αντικαρκινική επίδραση είναι τα ERCC1, HDAC1 και HDAC2, που έχουν επιγενετικούς και επιδιορθωτικούς ρόλους στηρίζοντας την πληροφοριακή θεωρία για την γήρανση, ενώ σχετίζονται και με την σηματοδότηση για την ανάπτυξη και την απόπτωση του κυττάρου [\[26\]](#). Ένα ακόμη μοτίβο που όμως δεν ήταν αναμενόμενο είναι ότι και η bowhead whale έχει πολλά jumping genes, όμως λογικά μπορεί και τα ελέγχει ώστε να μην δημιουργούν γενετικές βλάβες. Jumping genes ή transposable elements (TEs) ή junk (σκουπίδι) dna, θεωρούνται εξελικτικά σφάλματα, καταλαμβάνουν σχεδόν το μισό γονιδίωμα και είναι μια αιτία γονιδιακής αστάθειας και συνεπώς κυτταρικής γήρανσης [\[27\]](#). Για παράδειγμα στα ποντίκια, το εγωιστικό γονίδιο LINE-1 απενεργοποιείται από τις σιρτουίνες (ετεροχρωματίνη), όμως με την απουσία τους κατά το γήρας τα γονίδια αυτά μεταγράφονται και μετά μεταγράφονται αντίστροφα (retrotransposables) πάλι στο γονιδίωμα προκαλώντας θραύση και αστάθεια στο dna, θυμίζοντας τα ERCs που είδαμε ότι προκαλούν την γήρανση στη μαγιά. Στο κυτταρόπλασμα αναγνωρίζονται ως ιοί με αποτέλεσμα να εκκρίνονται φλεγμονογόνες κυτοκίνες. Για αυτό αντιρετροϊκά φάρμακα

<sup>14</sup> Η κρυπτοβίωση ή αναβίωση είναι η παύση κάθε μεταβολικής διαδικασίας και σχεδόν όλων των κυτταρικών λειτουργιών ως απάντηση σε ακραίες συνθήκες που φυσιολογικά θα σκότωναν τον οργανισμό. Όταν οι συνθήκες ξαναγίνουν βιώσιμες, ο οργανισμός επανέρχεται στην ζωή. Ενώ υπάρχουν πολλοί οργανισμοί που το εφαρμόζουν αυτό (όπως τα βακτήρια) ο προεξέχων οργανισμός είναι ο βραδύποδας καθώς το επίπεδο των ακραίων περιβαλλοντολογικών συνθηκών που μπορεί να αντέξει είναι ανεπανάληπτο.

μπορεί να έχουν και αντιγηραντικές ιδιότητες. Να σημειωθεί ότι τα TEs μπορεί να μην είναι **άχρηστα**. Ερευνητές έχουν δείξει ότι μια κατηγορία TEs ονόματι SINEs ρυθμίζουν την μεταγραφή των γονιδίων δίπλα στα οποία αντιγράφονται.

Γενικά η μελέτη των ζώων μπορεί να μας δείξει πάρα πολλά και λόγω των ομοιοτήτων αλλά και λόγω των διαφορών με τους ανθρώπους και στο μέλλον μπορεί και να χρησιμοποιηθούν για να βελτιωθούμε διαγονιδιακά. Ίσως αξίζει να μελετηθούν και οι οργανισμοί που εμφανίζουν ταχύτερα senescence. Άλλωστε σημαντικά συμπεράσματα βγήκαν από την μελέτη για την προγηρεία. Η μελέτη βραχύβιων οργανισμών είναι και χρονικά πιο εφικτή.

### 3.4 ΣΕΝΟΛΥΣΗ

Το να βιοσυνθεθεί ένας διαγονιδιακός άνθρωπος που θα απορρίπτει τα senescent κύτταρα, θα έχει εξαιρετικούς επιδιορθωτικούς μηχανισμούς ή θα επαναπρογραμματίζει το επιγονιδίωμα του είναι πολύ μακριά από την παρούσα γνώση και τεχνολογία. Μια πιο εύκολη προσέγγιση είναι η καταστροφή των senescent cells. Όπως γίνονται προσπάθειες για τον σχεδιασμό φαρμάκων που στοχευμένα καταστρέφουν τα καρκινικά κύτταρα, με τον ίδιο τρόπο πιθανώς θα φτιαχτούν και για τα zombie cells. Άλλωστε τα κύτταρα αυτά δεν κρύβουν την παρουσία τους. Εκπέμπουν κυτοκίνες που μπορεί να μεταδώσουν το πρόβλημα και σε γειτονικά κύτταρα, διεγείροντας το ανοσοποιητικό με μακροφάγα να μαζεύονται στην περιοχή και να δημιουργείται φλεγμονή, ένα από τα κλασικά συμπτώματα της γήρανσης που ευθύνεται και για πολλά από τα προβλήματα που προκύπτουν, όπως αδυναμία και πόνο.

Προσθήκη senescent κυττάρων σε υγιή νεαρά ποντίκια τους προκάλεσε δυσλειτουργίες που εμφανίζονται κατά την γήρανση και επιβεβαίωσαν την τάση τους να “μολύνουν” τους γειτονικούς ιστούς θυμίζοντας πάλι καρκινικά κύτταρα. Εδώ ταιριάζει και η θεωρία της εξασθένησης της δύναμης της φυσικής επιλογής με την γήρανση καθώς το senescence προστατεύει από αστάθειες όσο είμαστε νέοι, αλλά μεγαλώνοντας γίνεται αυτό η μεγαλύτερη πηγή αστάθειας. Η χορήγηση ενός συνδυασμού δυο σενολυτικών ουσιών (Quercetin, Dasatinib) στα ποντίκια κατάφερε να καθαρίσει τον οργανισμό τους και είχε και επιμήκυνση στο προσδόκιμο φυσικά γερασμένων ποντικών κατά 36% [1]. Οι πρώτες κλινικές δοκιμές έγιναν σε άτομα με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση, μια σοβαρή ασθένεια που προκύπτει από το senescence και παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση στην φυσική κατάσταση τους, ενώ επόμενες δοκιμές σε άτομα με διαβήτη τύπου 2 και χρόνια νεφροπάθεια μέτρησαν πτώση των senescent κυττάρων. Συγκεκριμένα με ημερήσια δόση 100 mg Dasatinib και δύο φορές την ημέρα 500 mg Quercetin, μετά από 11 ημέρες, παίρνοντας δείγμα αίματος, λιπώδη ιστού και δέρματος, μέτρησαν πτώση στους senescent δείκτες p16<sup>INK4A</sup>, p21<sup>CIP1</sup> και SAβgal, 35%, 17% και 62% στο υποδόριο κοιλιακό λίπος. Τα μακροφάγα στο λίπος έπεσαν 28% (βιοδείκτης CD68+) [2]. Βέβαια πολλά ερωτήματα μένει να απαντηθούν από τις επόμενες κλινικές δοκιμές. Είναι εξίσου αποτελεσματικά και σε άλλους ιστούς; Έχουν υψηλή ειδικότητα στα senescent cells ή επηρεάζουν και άλλους ιστούς; Πάντα μπορεί να εμφανιστούν και μακροπρόθεσμες παρενέργειες. Το πιο ανησυχητικό είναι μήπως δρουν και σε ιστούς που δεν αντιγράφονται φυσιολογικά, το οποίο θα ήταν και καταστροφικό. Για αυτό το επόμενο θέμα που πρέπει να κατανοηθεί είναι πως δρουν τα σενολυτικά.

Από τα δύο μόρια το πιο προβληματικό είναι η Dasatinib. Το φάρμακο αυτό χρησιμοποιείται και για την αντιμετώπιση της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (CML) και μπορεί να έχει πολύ σημαντικές παρενέργειες. Ο μηχανισμός δράσης του είναι η καταστολή κινασών τυροσίνης<sup>15</sup>, για αυτό και χρησιμοποιείται στην CML που προκύπτει από το χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια, μία μετάλλαξη μετατόπισης του γονιδίου ABL (tyrosine kinase) στο χρωμόσωμα 22 μαζί με το γονίδιο BCR που μαζί φτιάχνουν μια υβριδική πρωτεΐνη που είναι διαρκώς ενεργή και δίνει σήμα για πολλαπλασιασμό στο κύτταρο. Άλλος στόχος είναι η tyrosine kinase Src που είναι πρωτοογκογονίδιο [3]. Εκτός από αυτή του την ιδιότητα, θεωρείται ότι καταστέλλει την απόπτωση. Άρα η Dasatinib, ανταγωνίζοντας το ATP, καταστέλλει την Src και πιθανώς έτσι οδηγεί το senescent κύτταρο σε απόπτωση. Ωστόσο πολλές μελέτες δεν παρατήρησαν ισχυρή αποπτωτική δράση ενισχύοντας τις αμφιβολίες.

Η Βαλανοκετόνη (quercetin) είναι άλλο ένα φυτοχημικό (πολυφαινόλη σαν την ρεσβερατρόλη) που καταναλώνουμε καθημερινά. Παρατηρείται κυτταροτοξικότητα σε πολύ υψηλές δόσεις και συγκεκριμένα στα νεφρά, όμως γενικά φαίνεται ασφαλές. Οι γνωστές ιδιότητες της είναι κυρίως αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, ενώ συσχετίζεται και με την αύξηση της [Sirt1] (μάλλον έμμεσα) και οι σχέσεις της με την απόπτωση φαίνονται ιδανικές καθώς την αποτρέπει στο νευρικό ιστό που προκαλείται από μικρογλοιακές φλεγμονές, και την ενισχύει σε καρκινικούς ιστούς [4], και ναι στα senescent cells. Πολλές είναι οι πιθανές αντιαποπτωτικές οδοί των senescent κυττάρων (SCAPs), με τα πιο γνωστά εμπλεκόμενα μόρια να είναι οι PI3Kd/Akt που είναι μέροι της οδού του mTOR, B-cell lymphoma 2 και XL που προκαλούν απόπτωση μέσω των μιτοχονδρίων, p53/p21/ που σταματούν τον κυτταρικό κύκλο ως απάντηση σε γονιδιακή βλάβη και ελέγχουν την απόπτωση όπως και η οδός HSP-90 [5] και άλλα εκ των οποίων σχεδόν όλα είναι γνωστά λόγω της έρευνας για τον καρκίνο. Δεν λειτουργούν όλες σε όλους τους senescent ιστούς. Για παράδειγμα στα senesced πρόωρα λιποκύτταρα η καταστολή του BCL-2 δεν είχε κανένα αποτέλεσμα, ενώ τα senesced επιθηλιακά επηρεάστηκαν ειδικά από την BCL-xL, που είναι ένας από τους στόχους της quercetin. Ο συνδυασμός D+Q είναι αυτό που δίνει τα βέλτιστα αποτελέσματα. Σενολυτικά που δρουν σε ένα ή λίγα μόρια, όπως το navitoclax εκτός της λιγότερης αποτελεσματικότητας, έχουν και χειρότερες παρενέργειες. Θα υποθέταμε ότι οι παρενέργειες θα αυξάνονται με τα μόρια που εμπλέκονται. Μια εξήγηση γιατί συμβαίνει το αντίθετο είναι ότι εφόσον επιδρά σε έναν στόχο, για να έχει τα ίδια αποτελέσματα θα πρέπει να αυξήσει την συγκέντρωση του καταστέλοντας πλήρως άλλους στόχους που έχουν σημαντικές λειτουργίες σε υγιή κύτταρα, συν του ότι αυξάνεται η κυτταροτοξικότητα. Μια ακόμα φλαβοπρωτεΐνη, η φισετίνη είναι επίσης σενολυτικό.

Εκτός των σενολυτικών υπάρχουν και τα σενομορφικά. Ενώ δεν καταστρέφουν τα κύτταρα τουλάχιστον μπορούν και αποτρέπουν κάποια από τα προβλήματα που προκαλούν, όπως η φλεγμονή. Η ραπαμυκίνη είναι σενομορφικό, και χαρακτηρίζεται ως επιλεκτικός ρυθμιστής SASP καθώς καταστέλλει τις φλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως η ιντερλευκίνη IL6, που είναι στόχοι του

<sup>15</sup> Οι tyrosine kinases, είναι ένζυμα που καταλύουν την μεταφορά μιας φωσφορικής ομάδας, από ένα μόριο δότη όπως το ATP στο αμινοξύ τυροσίνη μιας πρωτεΐνης, λειτουργώντας ως διακόπτες για την συνέχεια κυτταρικών διαδικασιών όπως η απόπτωση και η αντιγραφή. Η c-Src είναι κυτταροπλασματική, ενώ υπάρχουν και τύπου υποδοχέα που είναι στην μεμβράνη.



μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. Η ραπαμυκίνη βέβαια έχει στόχο τον rapTOR άρα εμποδίζει και την ανάπτυξη του κυττάρου. Η καταστολή του NF-κB προκύπτει έμμεσα καθώς το mTORc1 επηρεάζει την σηματοδότηση της ιντερλευκίνης IL1α στην επιφάνεια του κυττάρου, η οποία καταλήγει στην πρωτεΐνη του γονιδίου [nfkb1a](#), που από το μεγάλο όνομα του γίνεται αντιληπτό ότι βοηθάει στην καταστολή του NF-κB στα B-λεμφοκύτταρα [6].

Όμως το ιδανικό θα ήταν είτε να προκληθεί απόπτωση είτε το ανοσοποιητικό μας να αναγνωρίσει και να καταστρέψει τα κύτταρα, όπως δηλαδή κάνει και για να αποτρέψει την δημιουργία καρκίνων. Τα senescent cells μπορεί να συσσωρεύονται και γιατί το ανοσοποιητικό σύστημα χειροτερεύει μεγαλώνοντας, και παρά τα σήματα και τις φλεγμονές να αδυνατεί να ολοκληρώσει την ανοσοβιολογική αποκρίση. Δεν είναι μόνο αυτός ο λόγος όμως, κρύβονται από τα λεμφοκύτταρα μας, με παρόμοιο στυλ με τα καρκινικά [7]. Παράγουν ένα μη κλασικό αντιγόνο μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας<sup>16</sup> το HLA-E που αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα των NK και πολύ διαφοροποιημένων κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων, τον NKG2A που καταστέλλει την ανοσοβιολογική απόκριση (αν και στον υποδοχέα NKG2C κάνει το αντίθετο). Το HLA-E προκύπτει από την οδό της κινάσης p38 MAP που παράγει τις φλεγμονώδεις κυτοκίνες (IL6 TNFα). Εκτός από φαρμακευτικοί στόχοι αντιγόνα σαν το HLA-E πιθανώς να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ακριβώς αντίθετη δουλειά, δηλαδή να διεγείρουν την ανοσολογική απόκριση. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με κάποιο εμβόλιο ή με μονοκλωνικά αντισώματα, όμως τα ίδια προβλήματα που εμφανίστηκαν στα σενολυτικά υπάρχουν και εδώ. Πρέπει το αντιγόνο να είναι μοναδικό για τα senescent κύτταρα αλλιώς υπάρχει ο κίνδυνος του αυτοάνοσου σε υγιής ιστούς, και ιδανικά θέλουμε να εμφανίζεται σε όλα τα senescent κύτταρα. Το 2ο αν και πολύ χρήσιμο, δεν είναι απαραίτητο, και λογικά ούτε πιθανό λόγο της ποικιλομορφίας που εμφανίζουν, θυμίζοντας για μια ακόμη φορά τον καρκινικό ιστό. Αυτό φαίνεται από τους βιοδείκτες των senescent κυττάρων που δεν είναι απόλυτα καθολικοί ούτε ειδικοί. [8]. Πάντως από τους βιοδείκτες μπορούν να σχεδιαστούν και φαρμακευτικοί ή ανοσολογικοί στόχοι. Καλός στόχος για σενολυτικά θα μπορούσε να είναι η λιποφουσκίνη που είναι βιοδείκτης αντιγραφικού senescence [9], καθώς βρίσκεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, που είναι ένα συσσωμάτωμα λιπιδίων (οξειδωμένα ακόρεστα λιπαρά οξέα και κατεστραμμένες μεμβράνες, λυσοσώματα και μιτοχόνδρια), υδατανθράκων και κατεστραμμένων πρωτεϊνών, ακόμη και μετάλλων, που φαίνεται να είναι κλασικό παράδειγμα προβληματικής απομάκρυνσης αποβλήτων, ενδεικτικό της γήρανσης. Ακόμη και αν υπάρχει παρουσία σε υγιής ιστούς, ίσως η συγκέντρωση να είναι χαρακτηριστική ή η συνύπαρξη πολλών βιοδεικτών μαζί. Βέβαια αυτό θα έριχνε σημαντικά την δραστηριότητα δεδομένης και της ποικιλομορφίας των senescent κυττάρων. Εδώ θα ταίριαζε η προσωποποιημένη προσέγγιση για τον κάθε άνθρωπο, και για τον κάθε ιστό (όπως και στον καρκίνο), αν και διαφορές παρατηρούνται ακόμη και στον ίδιο ιστό, κάτι που εξηγείται από τους πολλούς τρόπους που μπορεί να προκληθεί senescence (Oncogene Induced Senescence,

<sup>16</sup> Major Histocompatibility Complex: MHC συνήθως αναφέρεται στο σύνολο των γονιδίων που φτιάχνουν τις πρωτεΐνες Human Leukocyte Antigen, ή και κατευθείαν στις πρωτεΐνες. Γενικευμένα ο ρόλος τους είναι να παρουσιάζουν ένα επίτοπο, δηλαδή το κομμάτι του αντιγόνου που συνδέεται με το αντίσωμα με σκοπό την αναγνώριση από τα λευκοκύτταρα. Το αντιγόνο είναι δείγμα των ενδοπλασματικών πρωτεϊνών που λύθηκαν με πρωτεάσες.



Replicative Senescence etc), με διαφορετικές οδούς και φαινότυπους. Σίγουρα χρειάζεται περισσότερη μελέτη, ωστόσο ακόμη και αν επιτευχθεί η καταστροφή των senescent κυττάρων, υπάρχει ένα σημαντικότερο πρόβλημα που ευθύνεται για τα προβλήματα που έχουν οι πρεσβύτεροι.

### 3.5 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ

#### A) ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΑ

Ένα από τα κυτταρικά σημάδια της γήρανσης που δεν έχει αναφερθεί όσο πρέπει είναι η εξάντληση των βλαστοκυττάρων. Μεγαλώνοντας ελαττώνονται ποσοτικά όπως ελαττώνεται και η ικανότητα τους να παράγουν αριθμητικά πολλά κύτταρα και ποιοτικά γιατί στενεύει το φάσμα της διαφοροποίησης, με αποτέλεσμα οι ιστοί να δυσκολεύονται να αναγεννηθούν, το οποίο από μόνο του αρκεί για να προκληθούν θανάσιμες οργανικές δυσλειτουργίες και στην καλύτερη περίπτωση εξασθένηση των φυσικών ικανοτήτων. Δύο παράγοντες που υπερεκφράζονται στα εξουθενωμένα βλαστοκύτταρα είναι η Rho GTPase και ο CDC42 που επηρεάζουν την μετακίνηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η καταστολή τους φαίνεται πως είναι ευεργετική για τα βλαστοκύτταρα, ωστόσο μακροπρόθεσμα οφέλη φαίνονται αμφίβολα γιατί λογικά είναι αποτέλεσμα της εξάντλησης και όχι η αιτία της. Πάντως οι ερευνητές εντόπισαν βελτίωση σε επιγονιδιωματικά χαρακτηριστικά [10]. Καλύτερη ιδέα ίσως είναι η μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων. Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (MSC) είναι ένας καλός υποψήφιος για γενική χρήση καθώς είναι πολυδύναμα, φτιάχνοντας ινοβλάστες, οστεοκύτταρα, χονδροκύτταρα, λιποκύτταρα, μυϊκά κύτταρα, ακόμη και σε νευρικά βλαστοκύτταρα (NSC) αν και δύσκολα [11]. Έχει ήδη δοκιμαστεί για καταπολέμηση της αδυναμίας λόγω γήρανσης [2] όμως το πιο σπουδαίο είναι η πιθανότητα χρήσης στο ΚΝΣ για την δημιουργία νευρώνων καθώς εκπέμπουν νευροτροφικούς παράγοντες και αποτρέπουν φλεγμονές και συνεπώς την καταστροφή νευρικού ιστού.

Οι συνάψεις στον εγκέφαλο μας είναι η πηγή των σκέψεων και των αισθήσεων μας. Όσο είμαστε υπό ανάπτυξη αυξάνονται και αυτές, όμως όταν αυτή σταματάει, όσο περνάνε τα χρόνια περισσότερες καταστρέφονται και δεν υπάρχουν τα βλαστοκύτταρα που είχαμε μικροί για να αναδομηθούν. Αναπόφευκτα λοιπόν, ακόμη και να λειτουργούσαν τέλεια τα σενολυτικά σκοτώνοντας κάθε senescent κύτταρο, η αυτοφαγία και το UPR να είχαν καθαρίσει ότι προβληματικό είχε το σώμα και το επιγονιδίωμα να μην παρουσίαζε κανένα είδος θορύβου, πάλι ο χρόνος θα κατέστρεφε σιγά σιγά τις συνάψεις μας και όπως ο φανταστικός Benjamin Button θα φαινόμασταν νέοι αλλά το μυαλό μας θα έτεινε στην άνοια. Αν δεν καταφέρουμε να αναγενήσουμε τον εγκέφαλο μας, όλες οι τεχνικές που έχουν αναφερθεί έως τώρα εκτός των βλαστοκυττάρων, θα χαλάσουν το νόημα της παροιμίας νους υγιής εν σώματι υγιεί.

Στην πράξη όμως, δεν εισάγονται χύμα τα βλαστοκύτταρα στο σώμα κάποιου και αυτός γίνεται πιο δυνατός. Ακόμη και έτσι να ήταν, τα MSC δεν βρίσκονται ή φτιάχνονται εύκολα. Συνήθως συλλέγονται από δότες, η ποιότητα τους όπως έχουμε πεί πέφτει με την ηλικία, μικραίνοντας και άλλο την διαθεσιμότητα. Πάντως, υπάρχει η δυνατότητα εργαστηριακής καλλιέργειας MSCs ή

προτιμότερα εμβρυονικών βλαστοκυττάρων, αλλά είναι αρκετά απαιτητικό. Επίσης αν και τα MSC δεν αναγνωρίζονται ως ξένος εισβολέας και στην περίπτωση που προήλθαν από καλλιέργεια κυττάρων του ίδιου του οργανισμού ή κλώνου του, δεν είναι ξένα, ωστόσο είναι πιθανό να μην παραμένουν για πολύ στο σώμα. Η μεγαλύτερη ανησυχία όμως προκύπτει από την τοπική ανοσοκαταστολή καθώς διευκολύνει την πρόκληση όγκων που ως πολυδύναμα, είναι εύκολο να προκαλέσουν, ακόμη και τερατώματα. Πάντως η μεταμόσχευση πολυδύναμων βλαστοκυττάρων γίνεται εδώ και καιρό με την λεγόμενη μεταμόσχευση μυελού των οστών, δηλαδή αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων (HSC), βέβαια για άλλο λόγο, αλλά η αποτυχία τους είναι μια ένδειξη. Η ίδια συνταγή αλλά πολλαπλασιάζοντας τις προσδοκίες, τους κινδύνους και τις δυσκολίες, είναι η μίμηση του μηχανισμού της άλλης μέδουσας.

## **B) ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ YAMANAKA**

Είναι άλλο ένας οργανισμός να έχει πολλά αδιαφοροποίητα κύτταρα που να μπορούν να αναγενήσουν τους ιστούς του και άλλο να μπορεί τα ήδη διαφοροποιημένα κύτταρα να τα επαναφέρει σε αδιαφοροποίητη κατάσταση. Ο Shinya Yamanaka κατάφερε και έφτιαξε τα λεγόμενα iPSC (induced pluripotent stem cells) εισάγοντας με ρετροϊό τα γονίδια εικοσιτεσσάρων μεταγραφικών παραγόντων που παρατηρούνται κατά την εμβρυογένεση και αφαιρώντας ένα κάθε φορά, καταλήγοντας σε 4 iPSCs, σε ινοβλάστες αρχικά ποντικών και ένα χρόνο αργότερα, ανθρώπων [3]. Οι Oct4, Sox2, Klf4 και c-Myc ονομάστηκαν παράγοντες Yamanaka και υπάρχει μεγάλη συζήτηση στο ποιός είναι ο σωστός συνδυασμός, ή και αν τους χρειαζόμαστε όλους, για να βελτιωθεί η αποδοτικότητα της διαδικασίας και για να μην προκαλούνται όγκοι. Μεταγενέστερα, άλλη ομάδα έδειξε ότι ο Oct4 είναι ικανός και αναγκαίος παράγων για την δημιουργία iPSCs [4], χωρίς βέβαια να είναι η καλύτερη επιλογή. Άλλος συνδυασμός είναι οι παράγοντες επαναπρογραμματισμού του Thompson που περιέχει τον Oct4, Sox2 αλλά και έναν παράγοντα που δεν δήλωσε ο Yamanaka, τον Nanog που είναι απαραίτητος στα εμβρυονικά κύτταρα βοηθώντας στην διατήρηση της αδιαφοροποίητης κατάστασης εμποδίζοντας παράγοντες διαφοροποίησης, όπως και το Lin28 που κωδικεύει μια πρωτεΐνη που προσδέεται σε RNA, και στην συγκεκριμένη περίπτωση στο let-7 miRNA που επηρεάζει και την διαφοροποίηση, τον κυτταρικό κύκλο, την σηματοδότηση και είναι ογκοκατασταλτικό. Αυξάνοντας ακόμη περισσότερο την σύγχυση, πρόσφατα δημιουργήθηκαν iPSCs χωρίς τον oct4 [5], με τα υπόλοιπα βασικά 3 (SKM) και μάλιστα είχαν καλύτερη ποιότητα. Εξήγησαν τις προγενέστερες αποτυχίες σε σίγαση του ρετροϊού όταν τα C-myc και Sox2 εισάγονται μαζί. Το Sox2 λειτουργεί συνεργατικά με το Oct4, αλλά διαφέρουν στο ότι το Oct4 εντοπίζεται μόνο στα εμβρυονικά - παντοδύναμα βλαστοκύτταρα ενώ το Sox2 υπάρχει και στα πιο εξειδικευμένα. Επίσης και συγγενικές πρωτεΐνες του μπορούν να το αντικαταστήσουν με την ίδια αποτελεσματικότητα Sox1, Sox3, Sox15, κάτι που δεν ισχύει για το Oct4. Το Klf4, αν και όχι απαραίτητος, είναι ενδιαφέρον παράγων καθώς εκφράζεται και σε κύτταρα που δεν διαιρούνται και είναι ογκοκατασταλτικό, με ξεκάθαρη σχέση με το αρχαίο κύκλωμα της επιβίωσης καθώς μπορεί να διακόψει τον κυτταρικό κύκλο ως απάντηση σε γονιδιακή βλάβη [6]. Αντίθετα το c-Myc που είναι γνωστό από την οδό του mTOR, και τα εξίσου αποτελεσματικά L-Myc, N-Myc, ανήκουν σε οικογενεια

πρωτοογκογονιδίων και λογικά είναι ο βασικός λόγος που πολλά iPSCs προκαλούν τερατώματα (25% των ποντικών), όμως η παράλειψη του ρίχνει πολύ την απόδοση της μετατροπής (0.005%). Ως αντικαταστάτης του, η ομάδα του Yamanaka εξέτασε το Glis1 [7], που βρίσκεται στα ωάρια και ενεργοποιεί άλλους παράγοντες N-Myc, Myc11, c-Myc, Nanog, LIN28, και άλλους λιγότερο συζητημένους ESRRB, FOXA2, GATA4, NKX2-5 που όμως εντοπίζονται και αυτοί κατά την εμβρυογένεση. Τα ποντίκια που προήλθαν από αυτά τα iPSCs μεγάλωσαν υγιή. Όμως η αποτυχία καταστολής του Glis1 αποτρέπει την ανάπτυξη. Για αυτό άλλωστε δεν εντοπίζεται στο έμβρυο αλλά μόνο στο ζυγωτό και στο ωάριο. Αν και χρειάζεται να κατανοηθούν πολλά περισσότερα για το πως δουλεύουν, κάποιοι έχουν ήδη αρχίσει να δοκιμάζουν θεραπευτικές εφαρμογές.

Ευτυχώς, δεν χρειάζεται να μετατραπούν τα κύτταρα μας σε εμβρυονικά κύτταρα διαγράφοντας όχι μόνο τον θόρυβο, αλλά όλη την επιγενετική πληροφορία. Όπως και δεν χρειάζεται να μεταμοσχευθούν iPSCs όπως πρέπει να γίνει με τα MSCs, ελπίζοντας να διαφοροποιηθούν στον κυτταρικό τύπο του ιστού που βρίσκονται. Ο τρόπος να αφαιρέσουμε μόνο τον επιγενετικό θόρυβο, χωρίς να αποδιαφοροποιήσουμε το κύτταρο, λέγεται μερικός αναπρογραμματισμός, και στην ουσία είναι η εφαρμογή των ίδιων παραγόντων, αλλά για μικρό χρονικό διάστημα ώστε να μην προκληθεί αποδιαφοροποίηση, αλλά και να προλάβει να αφαιρέσει τον θόρυβο. Πως μπορεί και ξέρει τι είναι λάθος και τι σωστό, είναι μυστήριο. Ο Sinclair παρομοιάζει την διαδικασία αυτή, με το πρωτόκολλο μετάδοσης πληροφορίας ter/ip. Υποθέτει ότι πρέπει να υπάρχει ένα backup αρχείο που μπορεί να είναι πρωτεΐνες ή RNA, τα οποία δείχνουν στα ένζυμα τι είναι σωστό και τι όχι. Η εργασία αυτή προτείνει και άλλους μηχανισμούς (6\*). Πάντως σημασία έχει ότι γίνεται, και κάποιες ομάδες έχουν επιτυχημένες δοκιμές σε ποντίκια. Ισπανοί ερευνητές [8], μέτρησαν πτώση στα μοριακά σημάδια της γήρανσης αλλά και φαινοτυπικά, με 40% αύξηση στο μέσο προσδόκιμο (αν και αυτό είναι το λιγότερο σημαντικό). Μέτρησαν λιγότερους όλους τους προαναφερόμενους χαρακτηριστικούς της γήρανσης βιοδείκτες, Saβgal (senescence), γ-H2AH (DSBs), p53 (Επιδιόρθωση DNA βλάβης), ROS στα μιτοχόνδρια και βελτίωση της δομής του πυρηνικού φακέλου. Όλα αυτά επειδή άλλαξαν μόνο ένα από τα Hallmarks. Καταστέλοντας τις μεθυλοτρανσφεράσες των ιστονών με Chaetocin, δεν παρατηρήθηκε καμία από τις προαναφερθείσες αλλαγές. Επίσης, αν και τα κύτταρα, απέκτησαν με αυξημένο ρυθμό εκ νέου τα σημάδια της γήρανσης, μετά από επανάληψη της διαδικασίας, διορθώθηκαν ξανά και πάντα χωρίς να προκαλούνται ογκογεννήσεις, παρόλο που χρησιμοποιήθηκε και ο c-Myc. Επιπλέον, οι ίδιες παρατηρήσεις ισχύουν για όλους τους ιστούς που εξέτασαν, μυοκάρδιο, μύες, δέρμα και στα β κύτταρα στο πάγκρεας αυξάνοντας την ανοχή τους στην γλυκόζη. Τι γίνεται όμως με τον πιο δύσκολο ιστό από όλους.

Ο Yuancheng από την ομάδα του Sinclair, κατάφερε να διορθώσει την όραση σε τραυματισμένα, γηραιά ή με γλαύκωμα ποντίκια εφαρμόζοντας τους OSK στο γάγγλιο του αμφιβληστροειδούς [9]. Εφάρμοσε συνεχή θεραπεία για 10-18 μήνες, με την χρήση ενός AAV που προσβάλλει τα γάγγλια του αμφιβληστροειδούς. Μαζί με τα OSK υπήρχε ένα γονίδιο που ενεργοποιεί τον ιό στην παρουσία ή την απουσία ενός αντιβιοτικού. Δεν παρατηρήθηκαν όγκοι σε αντίθεση με όλες τις προηγούμενες προσπάθειες του που όμως είχε συμπεριλάβει και το c-Myc. Ενώ είναι καταλυτικό για την αποδοτική δημιουργία iPSCs, φαίνεται πως για την επιδιόρθωση του επιγονιδιώματος

χωρίς την αποδιαφοροποίηση του κυττάρου, μπορεί να μην χρειάζεται. Καλύτερα αποτελέσματα υπήρχαν όταν οι 3 παράγοντες εισήχθησαν με έναν ιό, ενώ μονοκυστρονικά (με έναν ιό ο καθένας) δεν παρατηρήθηκε αναγέννηση, λογικά λόγω αποσυγχρονισμού. Επίσης τα πρεσβύτερα ποντίκια είχαν μικρή διαφορά στην αναγεννητική ικανότητα από τα νεότερα. Για να επιβεβαιώσει τον επιγενετικό χαρακτήρα, όπως η προηγούμενη ομάδα κατέστειλε τις μεθυλοτρανσφεράσες, εδώ έκαναν το όδιο στις TET 1-2 (Ten - eleven - translocation methylcytosine dioxygenases) που καταλύουν την απομεθυλίωση οξειδώνοντας την μεθυλομάδα της κυτοσίνης, δηλαδή μετατρέπει την μεθυλοκυτοσίνη σε υδροξυ-μεθυλο-κυτοσίνη που στην συνέχεια αφαιρείται από μια γλυκοσυλάση [10]. Ενώ η TET είναι απαραίτητη για την αναγέννηση, δεν είναι ικανή συνθήκη καθώς η υπερέκφραση της δεν αλλάζει τίποτα. Δηλαδή δεν έχει καμία πληροφορία για τα backup data. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν με την ίδια επιτυχία και σε ανθρώπινους νευρώνες. Πότε θα είναι ασφαλές να ξεκινήσουν οι δοκιμές σε ανθρώπους; Πολλά πειράματα πρέπει να γίνουν ακόμα, και πολλά ερωτήματα να απαντηθούν. Όμως ένα πράγμα είναι ξεκάθαρο, η αναστροφή της γήρανσης δεν είναι καθόλου τρελή ιδέα.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4**

### **ΗΒΟΤ**

Μια τεχνική που τα τελευταία χρόνια έχει την φήμη ότι μπορεί να αντιστρέψει την γήρανση και γενικότερα να βελτιώσει την υγεία, είναι η υπερβαρική οξυγονοθεραπεία. Όμως πριν εξεταστεί αν οι ισχυρισμοί αυτοί είναι βάσιμοι, πρέπει να παρουσιαστούν και οι αρχές λειτουργίας του υπερβαρικού θαλάμου.

#### **4.1 ΑΡΧΕΣ ΥΠΕΡΒΑΡΙΚΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ**

Ο σκοπός του μηχανήματος είναι να αυξήσει την πίεση του αερίου στον θάλαμο. Η τεχνολογία δεν είναι κάτι το ιδιαίτερο. Πρακτικά λειτουργεί όπως ένας αναπνευστήρας, ή μια ηλεκτρική σκούπα, δηλαδή με την λογική της διαφορικής πίεσης μεταξύ δυο διαμερισμάτων. Η διαφορά με την σκούπα είναι ότι μας ενδιαφέρει τι αέρια μπαίνουν και ποιά πρέπει να απομακρύνουμε. Για να ακριβολογούμε, και στην σκούπα σήμερα επιβάλλεται να ελέγχεται τι αέρια βγαίνουν, για αυτό τοποθετούνται και τα φίλτρα HEPA καθώς είναι επιθυμητό ο χώρος μας και απαλλαγμένος από μικροσωματίδια που μπορεί να μας βλάπτουν.

Μια συνοπτική οργανολογία ενός τυπικού υπερβαρικού θαλάμου είναι αρχικά το σύστημα όπου το οξυγόνο είναι αποθηκευμένο, τα κανάλια που το μεταφέρουν στον θάλαμο, ο συμπιεστής που αυξάνει την πίεση του, το σύστημα ανάλυσης αερίων και απομάκρυνσης των αερίων αναπνοής, αισθητήρες θερμοκρασίας (T) και πίεσης (P) μαζί με τους μηχανισμούς θέρμανσης και ψύξης του θαλάμου ώστε το μικροκλίμα να διατηρείται σταθερό (T,P,[O<sub>2</sub>]), ένα σύστημα για επικοινωνία με τον ασθενή (μικρόφωνο, ηχείο) και συστήματα ασφαλείας κυρίως αισθητήρες φωτιάς και σύστημα άμεσης κατάσβεσης. Ο κίνδυνος της φωτιάς είναι και ο σοβαρότερος καθώς το οξυγόνο είναι υπερβολικά εύφλεκτο και αν γίνει η πυροδότηση με κάποιον τρόπο, πρέπει ακαριαία το

σύστημα να ενεργοποιηθεί και να σβήσει μια φωτιά μέσα σε 100% καύσιμο αέριο. Πριν μπει στον θάλαμο πρέπει να μην έχει στο δέρμα του τίποτα οινόπνευματούχο, παράγωγο πετρελαίου και γενικά εύφλεκτο όπως makeur, λάδια και αποσμητικά και δίνεται μεγάλη προσοχή σε ότι φέρνει ο ασθενής μέσα στο θάλαμο, με αυστηρά [πρωτόκολλα](#). Φυσικά μεγάλη προσοχή υπάρχει και στον στατικό ηλεκτρισμό (ειδικά ρούχα και καλή γείωση). Ατυχήματα στον HBOC μπορεί να έχουν καταστροφικές και θανάσιμες συνέπειες. Για αυτό έχει και πολλούς μηχανισμούς όπως συναγερμούς και συστήματα αυτόματου ελέγχου ώστε να διατηρούνται ιδανικές οι συνθήκες, να ελαχιστοποιηθούν οι πιθανότητες ατυχημάτων, να υπάρχει άμεση ανταπόκριση και να γίνει και πιο εύκολη η παρακολούθηση [10], δίνοντας έμφαση στον ασθενή, όχι στο μηχάνημα αλλά και δίνοντας την δυνατότητα χρήσης χωρίς επίβλεψη όπως γίνεται για εύπορα άτομα που θέλουν προσωπικό θάλαμο στο σπίτι τους.

Η φυσική του κύριου μηχανισμού [1] είναι γνωστή εδώ και 4 αιώνες σχεδόν. Σύμφωνα με τον νόμο του Boyle, το γινόμενο της πίεσης και του όγκου σε ένα μεταβαλλόμενο σύστημα είναι σταθερό,  $PV = \text{σταθ.}$  Επίσης (Gay Lussac), η πίεση αυξάνεται με την θερμοκρασία και ο λόγος τους παραμένει σταθερός,  $P/T = \text{σταθερό,}$  και κατά συνέπεια, το ίδιο ισχύει για τον όγκο (Charles). Όταν έχουμε μείγμα αερίων, η συνολική πίεση είναι ίση με το άθροισμα της πίεσης που παίρνουμε από το κάθε αέριο ξεχωριστά (Dalton). Για ένα αέριο, οι νόμοι συνοψίζονται στην πιο χρηστική μορφή τους, την καταστατική εξίσωση των αερίων:

$P \cdot V = nRT$ , όπου  $n$  τα mole του αερίου, και  $R$  μία σταθερά που εξαρτάται από το αέριο και χαρακτηρίζει την αναλογία.  $R = PV/nT$ , ( $N \cdot m^3 / m^2 \cdot mol \cdot K$ ) = ( $J/mol \cdot K$ )

Ο νόμος του Henry είναι άλλο ένα σημαντικό βήμα για την HBOT, και λέει ότι το πόσο αέριο μπορεί να διαλυθεί σε ένα υγρό είναι ανάλογο της πίεσης του, αλλιώς η συγκέντρωση του αερίου στο διάλυμα είναι ανάλογη της μερικής του πίεσης και η αναλογία αυτή εξαρτάται από το αέριο και έχει την μορφή μιας σταθεράς  $k$ ,  $C = kP$ . Δηλαδή στην περίπτωση της HBOT, όσο περισσότερη πίεση έχει ο θάλαμος, τόσο περισσότερο οξυγόνο θα μπει στο αίμα. Επίσης να σημειωθεί ότι ο θάλαμος έχει 100% οξυγόνο και όχι ατμοσφαιρικό αέρα. Η πίεση στον θάλαμο είναι συνήθως από 2 έως 3 ατμόσφαιρες και μαζί με την διάρκεια και τον αριθμό των συνεδριών καθορίζουν την αποτελεσματικότητα, ενώ παράλληλα αυξάνουν τον κίνδυνο παρενεργειών. Το οξυγόνο μπαίνει στον θάλαμο με ρυθμό 500 liters/min που θα είναι και ο ρυθμός που απομακρύνονται τα αέρια της εκπνοής για να διατηρηθεί το 100% οξυγόνο. Λόγω της πίεσης, αναπνοή γίνεται και από το δέρμα και για αυτό πρέπει να είναι εκτεθειμένο. Υπάρχουν και δωμάτια με πεπιεσμένο αέρα αλλά δεν έχουν την ίδια αποτελεσματικότητα ακόμη και αν με μια μάσκα το άτομο εισπνέει 100% οξυγόνο, γιατί δεν συμμετέχει το δέρμα. Επιπλέον, λόγω της αυξημένης πίεσης η ατμόσφαιρα είναι πολύ υγρή και γίνεται εύκολη η μετάδοση παθογόνων, ειδικά όταν είναι θάλαμος πολλών ατόμων και γενικά είναι κατώτερη τεχνική.

Στην κατάσταση ισορροπίας, η πίεση στην αναπνευστική οδό θα είναι η ίδια με του θαλάμου. Αυτό αυξάνει το έργο της αναπνοής γιατί αυξάνει τα σωματίδια που μπαίνουν μέσα στον πνεύμονα. Βέβαια δεν αλλάζει η διαφορά της πίεσης που πρέπει να δημιουργήσουν οι αναπνευστικοί μύες και για αυτό δεν υπάρχει εμφανής δύσπνοια. Η αυξημένη πίεση λογικά δεν είναι πρόβλημα για τον οργανισμό, όμως η αύξηση της πίεσης είναι. Πολλά προβλήματα προκύπτουν αν ο ρυθμός αύξησης της πίεσης είναι μεγάλος γιατί οι ιστοί δεν προλαβαίνουν να



ισοσταθμίσουν την πίεση. Σημαντικό πρόβλημα έχουν περιοχές που ο αέρας είναι παγιδευμένος εσωτερικά, κάτι που μπορεί να προέκυψε από οίδημα σε μία κοιλότητα. Ως βαρότραυμα χαρακτηρίζεται η φυσική καταστροφή που μπορεί να προκύψει από την ταχεία αλλαγή στην πίεση και συνεπάγεται μη ελεγχόμενη έκταση των κοιλοτήτων που περιέχουν αέρια και εφελκυστικές και διατμητικές δυνάμεις που όσο λιγότερο ελαστικός είναι ο χώρος, τόσο πιο πιθανό είναι να προκληθεί ρήξη. Ακόμη και ο πνεύμονας που είναι πολύ ελαστικός, μπορεί να πάθει πνευμοθώρακα ή να σπάσουν κάποιες κυψελίδες, ειδικά αν λόγω κάποιας ατέλειας υπάρξει παγιδευμένος αέρας. Περιοχές που επηρεάζονται είναι η γαστρεντερική οδός, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τα ψάρια που άμα ψαρεφθούν από βάθος και τραβηχτούν απότομα μπορεί να τους πεταχτεί το στομάχι έξω, τα μάτια που μπορεί πρηστούν ή και να σπάσουν, και ο μέσος ους - αυτί, που είναι η περιοχή όπου εμφανίζεται η χαρακτηριστική ενόχληση από την απότομη αλλαγή υψομέτρου όπως συμβαίνει σε μια πτήση, και μάλιστα κατά την HBOT είναι η πιο συχνή βλάβη που μπορεί να προκαλέσει μέχρι και ρήξη του τυμπάνου. Εκτός της μηχανικής βλάβης, υπάρχουν και ιστοχημικοί κίνδυνοι. Η νόσος της αποσυμπίεσης χαρακτηρίζεται από την δημιουργία φυσαλίδων στο αίμα καθώς ο οργανισμός δεν προλαβαίνει να εκπνεύσει το extra αέριο που στην όλο και μικρότερη πίεση που εμφανίζεται κατά την ανάδυση γίνεται αδιάλυτο στο αίμα (νόμος του Henry). Αυτό δεν είναι πρόβλημα για το οξυγόνο γιατί το μεταβολίζουν τα κύτταρα μας, και άρα δεν είναι πρόβλημα στον θάλαμο. Το άζωτο είναι το αέριο που μπορεί να δημιουργήσει πρόβλημα στους δύτες που η μπουκάλα τους έχει συνήθως μείγμα αζώτου και οξυγόνου. Η HBOT χρησιμοποιείται και για την αποσυμφόρηση των παρενεργειών της αποσυμπίεσης. Ωστόσο το οξυγόνο έχει και αυτό τοξικότητα όταν έχει αυξημένη μερική πίεση όπως παρατήρησε πρώτος ο Paul Bert για το κεντρικό νευρικό σύστημα που συμβαίνει γρήγορα λόγω υψηλών δόσεων (δηλαδή όσο αυξάνεται η πίεση αυξάνεται ο κίνδυνος) αλλά και για άλλους ιστούς όπως τα πνευμόνια (Lorrain Smith) που προκύπτει από αυξημένη διάρκεια έκθεσης και συνήθως εκδηλώνεται ως οίδημα στην αναπνευστική οδό (τραχεοβρογχίτιδα) [2]. Όντας σε αδράνεια όπως στον θάλαμο, μπορούμε να αντέξουμε μεγαλύτερη μερική πίεση από ότι ένας δύτης που βρίσκεται σε κίνηση. Ο λόγος της τοξικότητας είναι λογικά η οξειδωση και τα ROS τα οποία έχουν προαναφερθεί για την γήρανση. Δεν θα ήταν περίεργο όμως να υπάρχει και άλλη αιτία. Σε υψηλές πιέσεις ~3atm, η πιθανότητα να προκληθεί οξυγονοτοξικότητα στο ΚΝΣ είναι 1/200 θεραπείες, με 1-2/10000 να εκδηλώνεται με επιληπτική κρίση. Βέβαια είναι περίεργο που το οξυγόνο χαρακτηρίζεται τοξικό ενώ έχουμε αυξήσει την συγκέντρωση κατά 15 φορές στο αίμα και είναι το μόνο αέριο που αναπνέουμε για μεγάλο χρονικό διάστημα (συνήθως 1-2 ώρες). Τα πάντα είναι τοξικά άμα υπερβάλουμε με τις συγκεντρώσεις τους. Οι παθήσεις για τις οποίες επιτρέπεται το HBOT εκμεταλλεύονται είτε την υπεροξεία όπως η δηλητηρίαση μονοξειδίου του άνθρακα<sup>17</sup>, πληγές που

<sup>17</sup> Το μονοξείδιο του άνθρακα είναι ανταγωνιστής του οξυγόνου στην αιμοσφαιρίνη και για αυτό σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσει υποξεία και θάνατο. Η HBOT εκτός της υπεροξείας που προκαλεί, λόγω του ότι η ατμόσφαιρα έχει 100% οξυγόνο, υπάρχει και θετική πίεση προς την αποβολή του μονοξειδίου από το σώμα. Αυτό είναι πιο εμφανές στην περίπτωση του αζώτου που κανονικά καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος της ατμόσφαιρας όμως στον θάλαμο έχει μηδενική συγκέντρωση και άρα για να εξισορροπηθεί πρέπει να βγει από το αίμα και να αυξήσει την μερική του πίεση στην ατμόσφαιρα του θαλάμου.



δεν κλείνουν όπως στους διαβητικούς, αναιμία, οξεία αιμορραγία, ραδιονόσηση, εγκαύματα, οστεομυελίτιδα, νεκρωτική περιτονίτιδα, μεταμοσχεύματα δέρματος που δεν αιματώνονται καλά, είτε απλά χρειάζονται αλλαγές στην πίεση, για την νόσο της αποσυμπίεσης, αέρια στο αίμα και την ιδιοπαθή αυθόρμητη νευροαισθητήρια βαρηκοΐα, είτε εκμεταλλεύονται και τα δυο, γάγγραινα αερίων, ενδοκρανιακό απόστημα, εσωτερικά τραύματα από τροχαία και το σύνδρομο του διαμερίσματος.

Το πρώτο πείραμα διεξήχθη το 1959 από τον Ite Boerema, έναν καρδιοχειρουργό, σε γουρούνια. Το εντυπωσιακό είναι ότι είχε αφαιρέσει την αιμοσφαιρίνη από τα γουρούνια και την αντικατέστησε με πλάσμα, με μόνο 0,4% να παραμένει, και τα γουρούνια έζησαν για 45 λεπτά σε αυτές τις συνθήκες χωρίς να παρατηρηθεί κάποιο πρόβλημα και δημοσίευσε τα αποτελέσματα με ένα άρθρο ονόματι η ζωή χωρίς αίμα [3]. Από τότε έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για να καταλάβουμε τι άλλο μπορεί να συμβαίνει κατά την HBOT. Δηλαδή άλλες παρενέργειες (επικίνδυνες ή και χρήσιμες) που μπορεί να έχει η υπεροξεία και η υψηλή πίεση.

## 4.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ

Ξεχνώντας τις μηχανικές αλλαγές που μπορεί να προκαλέσει η αλλαγή της πίεσης, στον πρώτο ιστό που αλληλεπιδρά με το οξυγόνο, τον πνεύμονα και τις κυψελίδες του, ενώ υπήρξε ανησυχία ότι μπορεί να προκαλέσει μείωση στην αγωγιμότητα τους, πρόσφατες στατιστικές μελέτες σε δείγμα με και χωρίς αναπνευστικά προβλήματα έδειξαν ότι δεν ισχύει [4]. Ο επόμενος ιστός είναι το αίμα, όπου η υπεροξεία βελτιώνει την ελαστικότητα των ερυθροκυττάρων (RBCs), αποτρέπει την ένωση των αιμοπεταλίων (θρόμβος) και ενισχύει την λειτουργία των λευκοκυττάρων (WBCs). Εκτός των WBCs χρησιμεύει στις μολύνσεις και γιατί τα βακτήρια θριαμβεύουν στην υποξία και δευτερευόντως ενισχύει κάποια αντιβιοτικά. Γενικότερα, δεν έχουν βρεθεί μακροπρόθεσμες αλλαγές όπως για παράδειγμα στην συγκέντρωση των RBCs. Υπάρχει μόνο 24h μείωση στην συγκέντρωση της ερυθροποιητίνης<sup>18</sup> [5]. Άλλες μακροπρόθεσμες αλλαγές μπορεί να προέρχονται από την ιδιότητα της αντιγήρανσης που θα αναλυθεί στο τέλος. Ο μεταφορέας του αίματος, τα αγγεία, έχουν ξεκάθαρες αλλαγές από την HBOT [6]. Καταρχάς προκαλείται συστολή των αγγείων με αποτέλεσμα να δυσκολεύεται η ροή, όπως φαίνεται και μαθηματικά από τον ορισμό της αντίστασης ενός σωλήνα στο υγρό,  $R = 8\eta L/\pi r^4$ , ( $\eta$ ) το ιξώδες, ( $L$ ) το μήκος και ( $r$ ) η ακτίνα που είναι και το μεταβλητό μέγεθος. Γιατί να συμβαίνει αυτό; Ίσως είναι ομοιοστατικός μηχανισμός, το σώμα καταλαβαίνει ότι δέχεται πολύ οξυγόνο και θέλει να το περιορίσει, χωρίς όμως να προκαλέσει σημαντικές αλλαγές που θα δημιουργήσουν άλλα προβλήματα. Αυτό που ξέρουμε σίγουρα είναι ότι οξειδώνει το νιτρικό οξύ με αποτέλεσμα να αποτρέπει τις αγγειοδιασταλτικές του ιδιότητες. Ομοίως φαίνεται πως προκαλεί αλλαγές στις

<sup>18</sup> EPO: Είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που δρα ως κιτοκίνη και εκκρίνεται από τα νεφρά με σκοπό να προκαλέσει την σύνθεση ερυθροκυττάρων από HPSCs σε συνθήκες υποξίας. Σε μικρές ποσότητες εκκρίνεται διαρκώς για να εξισορροπήσει τις απώλειες. Είναι και μια από τις κλασικές μεθόδους doping των αθλητών. Είναι λογικό να πέφτει η συγκέντρωση μετά από την HBOT. Συνεπάγεται έλεγχος της απόλυτης τιμής της [O<sub>2</sub>] και όχι των διαφορών της.

προσταγλανδίνες<sup>19</sup>. Ένα θετικό αποτέλεσμα της αγγειοσυστολής είναι η μείωση των οιδημάτων γιατί οι ιστοί δέχονται λιγότερο αίμα (ειδικά ο εγκέφαλος), χωρίς να μειώνεται η παροχή οξυγόνου στους ιστούς (χρήσιμο και για την αντιγήρανση). Μπορεί σε αυτό να συνεισφέρει και η μείωση των προσταγλανδινών. Η συστολή προκαλεί και αύξηση της αρτηριακής πίεσης, όμως όχι σε σημαντικό βαθμό, εκτός αν τα άτομα είναι υπέρτασικά [7]. Επίσης η HBOT προκαλεί, κυρίως λόγω της υπεροξίας αλλά και σε μετρήσιμο βαθμό λόγω της πίεσης, κολπική βραδυκαρδία ενεργοποιώντας κέντρα του παρασυμπαθητικού από το στέλεχος, τον προμήκη μυελό μέχρι την σπονδυλική στήλη. Το έργο που παράγει η καρδιά μειώνεται και αυτό, και είναι πιθανό να προκύψουν και αρρυθμίες. Η πίεση από μόνη της φαίνεται πως μπορεί να αλλάξει την διεγερσιμότητα των μυοκυττάρων λόγω αλλαγών στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Ακόμη, η HBOT προωθεί την αγγειογένεση [8]. Αρχικά αυτό ακούγεται παράλογο γιατί ο VEGF<sup>20</sup> εκφράζεται κατά την υποξία, όπως δηλαδή στην γυμναστική. Μια απάντηση στο παράδοξο είναι ότι η αγγειοσυστολή μειώνει την διάχυση οξυγόνου στα επιθηλιακά κύτταρα των αγγείων, και κατα συνέπεια ενεργοποιείται η VEGF ενώ παράλληλα λόγω της αύξησης της [O<sub>2</sub>], αυξάνεται η διαφορική πίεση του οξυγόνου στις περιοχές που δεν αιματώνονται. Άλλες απαντήσεις ακούγονται πιο λογικές όπως ότι η υπεροξία ενεργοποιεί και αυτή τον VEGF, ή τον HIF1α που σε κανονικές συνθήκες υδροξυλιώνεται και καταστρέφεται κάτι που αποφεύγει κατά την υποξία λόγω τον ROS. Οι κυκλικές διακυμάνσεις υπεροξίας - υποξίας πριν και μετά την HBOT, μπορεί να δημιουργούν ψευδουποξία όπως θα συζητηθεί στην συνέχεια.

Αναγεννητικές ιδιότητες παρατηρούνται και στον νευρικό ιστό [9]. Ένας προτεινόμενος μηχανισμός λέει πως η HBOT αποτρέπει την συσσώρευση του HIF1α που προκαλεί κυτταρικό θάνατο, όμως δεν την καταστρέφει αλλά την διατηρεί σε ισορροπημένη συγκέντρωση ώστε να ενεργοποιεί την EPO και τον VEGF, ενώ πιστεύεται ότι η HIF1α αυξάνει και την έκφραση της οδού του wnt, ενεργοποιώντας την β κατενίνη, μια οδό που σηματοδοτεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ασχέτως αν ο HIF1α είναι η αιτία, η HBOT συσχετίζεται με την αύξηση της β - κατενίνης [10]. Εύλογες ανησυχίες για προώθηση της καρκινογένεσης δεν έχουν υποστηριχθεί στατιστικά. Τέλος, αξιοσημείωτη είναι η βελτίωση της ανάπλασης των μυών με την χρήση HBOT, μια τεχνική που έχουν χρησιμοποιήσει κάποιοι κορυφαίοι αθλητές. Η αιτία δεν είναι μόνο το οξυγόνο (αποτροπή νέκρωσης μυοκυττάρων λόγω υποξίας), αλλά και η μείωση της φλεγμονής που εν τέλει επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό των δορυφορικών κυττάρων (μυοβλάστες που παράγουν σκελετικούς μύες) [11].

<sup>19</sup> Οι προσταγλανδίνες είναι λιπίδια που έχουν ρόλους σηματοδότησης και επικοινωνίας. Βρίσκονται σχεδόν σε όλους τους ιστούς όλων των ζώων και οι λειτουργίες τους ποικίλουν με τον υποδοχέα στον οποίο προσδένονται. Κυρίως γνωστές για την συμβολή τους στην πρόκληση φλεγμονών, με φάρμακα όπως η ασπιρίνη να στοχεύουν στην μείωση τους συγκεκριμένα καταστέλλοντας την κυκλοοξυγενάση (COX) που καταλύει την δημιουργία τους από κατώτερα λιπίδια. Βέβαια αυτό έχει και παρενέργειες καθώς όπως είπαμε οι ρόλοι των PGs είναι πάρα πολλοί. Για την HBOT ωστόσο σημασία έχει κυρίως ότι προκαλούν διαστολή των αγγείων.

<sup>20</sup> Vascular Endothelial Growth Factor: Είναι μια πρωτεΐνη που εκφράζουν πολλά κύτταρα για να ζητήσουν την δημιουργία αγγείων (προέκταση ήδη υπάρχοντων ή δημιουργία εντελώς νέων) στην περιοχή όταν εντοπίζεται υποξία αλλά και κατά την εμβρυογένεση. Οι καρκίνοι που μπορούν και ελέγχουν την VEGF είναι πολύ επικίνδυνοι γιατί έτσι αυξάνουν την αναπαραγωγή τους.

### 4.3 ΑΝΤΙΓΗΡΑΝΣΗ

Γενικότερα όλες αυτές οι αλλαγές βοηθούν τα βλαστοκύτταρα. Δεν αρκεί να υπάρχει αρκετό οξυγόνο για να επουλωθούν οι πληγές, πρέπει να υπάρχουν και ινοβλάστες. Η HBOT επιταχύνει την επούλωση πιθανώς όχι μόνο διευκολύνοντας τα βλαστοκύτταρα με την υπεροξία, αλλά και με αλλαγές ανώτερου επιπέδου. Όπως ειπώθηκε νωρίτερα, η υπεροξία αυξάνει κατά πολύ την οξειδωση του N σε NO. Η [NO] αυξάνεται ειδικά στην περιοχή της πληγής, παραμένει αυξημένη για 1-4 εβδομάδες μετά την HBOT και συσχετίζεται με την μείωση της πληγής, ενώ δεν παρατηρήθηκε αύξηση της L-αργινίνης που είναι υπόστρωμα για την σύνθεση του NO [12]. Αυτό σημαίνει είτε ότι το υπόστρωμα αυτό είναι ήδη υπεραρκετό (πολύ πιθανό ενδεχόμενο γιατί έχει αποδειχθεί πως η αύξηση του δεν συνεπάγεται αύξηση του NO) είτε ότι υπάρχει και μηχανισμός που οξειδώνει το N κατά την υπεροξία και δεν χρειάζεται αυτή την οδό, ενώ είναι πιθανό να συμβαίνουν και τα δυο. Επιπλέον, ερευνητές μέτρησαν μεγάλη αύξηση σε πολλούς βιοδείκτες βλαστοκυττάρων κατά την HBOT, κάτι που δεν συνέβει όταν μπλόκαραν την συνθάση του NO [13] (δεν σημαίνει ότι με την υπερέκφραση συμβαίνει το αντίστροφο). Όμως τι το ιδιαίτερο προκαλεί το NO στα βλαστοκύτταρα;

Το NO επηρεάζει την γονιδιακή έκφραση στο επίπεδο της μεταγραφής και της μετάφρασης σε πολλά κύτταρα καθορίζοντας την επιβίωση των πολλαπλασιασμό τους και την διαφοροποίηση (στα ESCs). Οι μηχανισμοί δράσης του δεν είναι διασαφηνισμένοι [14]. Είναι γνωστό ότι καταστέλλει την τελευταία πρωτεΐνη του κυτοχρώματος (οι πρωτεΐνες που μεταφέρουν τα ηλεκτρόνια στο οξυγόνο για την κυτταρική αναπνοή) όταν υπάρχει υποξία και άρα είναι ρυθμιστικό μόριο για την παραγωγή ενέργειας. Με ποιο μόριο θα αντιδράσει (αμινομάδα αμινοξέος, μεταλλικό ιόν, ιόντα οξυγόνου) και κατα συνέπεια ποιά αντίδραση θα γίνει και ποιά οδός θα σηματοδοτηθεί εξαρτάται από την συγκέντρωση του και δεν έχει γραμμική λογική. Για παράδειγμα, σε υψηλές συγκεντρώσεις το NO αντιδρά με ROSs. Αυτό δεν ισχύει για την sGC (soluble guanylylcyclase) που είναι υποδοχέας του NO. Γενικά χαμηλές συγκεντρώσεις σχετίζονται με το κύκλωμα της επιβίωσης, ενώ υψηλές με αποπτωτικές οδούς και senescence. Με αύξουσα σειρά, από 1-30 nM προσδένεται στην κυκλάση sGC που συνθέτει το cGMP<sup>21</sup>, από 30 έως 100 nM οδηγεί την φωσφορυλίωση της Akt, 100-300nM την σταθεροποίηση του HIF1α, άνω των 400nM την φωσφορυλίωση της p53 και από το 1μM ξεκινάει το νιτρόδες stress [15]. Ποιός από όλους τους μηχανισμούς επηρεάζει τα βλαστοκύτταρα δεν είναι γνωστό, αλλά έχουν καταγραφεί οι μεταβολές. Μικρές συγκεντρώσεις DETA-NO, δότης NO (διεθυλενετριάμίνη 1-20μM) εμποδίζουν την διαφοροποίηση (το ίδιο ισχύει και για την υποξία κατά την εμβρυογένεση), με τους παράγοντες Oct4, Sox2 και Nanog να αυξάνουν την συγκέντρωσή τους (κάποιοι από τους Yamanaka factors), ενώ η διατήρηση των ESCs κατά την καλλιέργεια τους με την παρουσία NO επιβεβαιώνεται καθώς ανιχνεύεται και το αντιγόνο SSEA-4 που είναι μοναδικό

<sup>21</sup> cGMP: Η κυκλική μονοφωσφορική γουανωσίνη (αντίστοιχη του cAMP) προκύπτει από το GTP και είναι ενδοκυτταρικό μόριο σηματοδότησης, ενεργοποιώντας των πρωτεϊνικές κινάσες που φωσφορυλιώνουν άλλες πρωτεΐνες. Η σύνθεση της ξεκινάει με την κυκλοποίηση του GTP με την κυκλάση GC και μετά με την ενεργοποίηση της sGC από το NO, προκύπτει το cGMP. Ρυθμίζουν λειτουργίες όπως η διαπερατότητα των ιοντικών διαύλων, η γλυκογονόλυση, η απόπτωσης η χάλαση των λείων μυών κα.

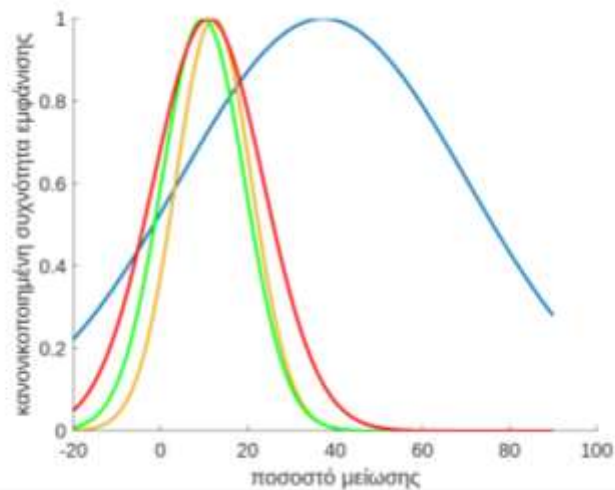
για την επιφάνεια τους. Τα ESCs υπερεκφράζουν την συνθάση του νιτρικού οξέος, ενώ πέφτει όταν διαφοροποιούνται [16]. Από την άλλη, υψηλές συγκεντρώσεις DETA-NO προωθούν την διαφοροποίηση, καταστέλοντας τους παράγοντες Yamanaka. Στα ειδικά SCs, από τα BSCs μέχρι και τα NPCs, το NO πάλι ανάλογα την συγκέντρωση του προωθεί την διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό ή την επιβίωση - διατήρηση τους, φυσικά χωρίς καμία ένδειξη αποδιαφοροποίησης. Ωστόσο υπάρχουν MAPCs (πολυδύναμα προγεννητικά κύτταρα ενηλίκων) που εκφράζεται ο Oct4, και σε αντίθεση με τα ESCs, οι υψηλές συγκεντρώσεις NO είναι αυτές που σχετίζονται με την αποτροπή της διαφοροποίησης. Έχει προταθεί επίσης ότι η Oct4 ενεργοποιείται από την HIF2α με την γενικότερη υποξική απόκριση να σηματοδοτείται και από την διεπαφή CeO - NO με το NO να ρυθμίζει την HIF1α και με ανεξάρτητους των μιτοχονδρίων μηχανισμούς, ενώ σίγουρα το AMPK αισθάνεται την υποξία λόγω της αύξησης της [AMP]. Άλλωστε χαρακτηριστικό των βλαστοκυττάρων είναι η μειωμένη οξειδωτική φωσφορλίωση, χρησιμοποιώντας κατά βάση την γλυκόλυση για τις ενεργειακές ανάγκες τους, εκτός άμα ξεκινήσουν τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση. Θα μπορούσε άραγε η υποξεία και η τάση προς τους μηχανισμούς επιβίωσης να αποδιαφοροποιεί τα κύτταρα, δηλαδή τον μηχανισμό αυτό να τον έχουν όλα τα έμβια όντα, όχι μόνο η μέδουσα, απλά να μην έχει αναπτυχθεί ή να έχει υποβαθμιστεί λόγω της εξέλιξης; Σημαντικό είναι και ότι στον καρκινικό ιστό, έναν κλασσικά υποξικό ιστό, χαμηλές [NO] σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό και υψηλές συγκεντρώσεις είναι τοξικές, έχοντας δηλαδή το ίδιο αποπτωτικό profile με τα βλαστοκύτταρα, αναφορικά με την [NO]. Άλλωστε αυτοί οι δυο ιστοί έχουν πολλά κοινά.

Τι σημαίνουν όλα αυτά για την HBOT και τις φημισμένες αντιγηραντικές της ιδιότητες; Τελικά με την αύξηση του NO προωθείται η απόπτωση και το senescence και καταστέλλονται οι παράγοντες Yamanaka; το αντίθετο; ή μήπως τα πράγματα είναι πολύ πιο περίπλοκα. Ναι μεν το οξυγόνο βοηθάει στην σύνθεση του NO, αλλά τα ROS το οξειδώνουν σε NO<sub>2</sub> και να προστεθεί ότι επειδή η μερική πίεση του αζώτου έξω από το σώμα είναι 0, θα τείνει να διαχυθεί προς τον θάλαμο. Άρα τελικά τι κάνει η HBOT στην [NO]; Η ερώτηση αυτή είναι παραπλανητική, γιατί κρύβει πολλές μεταβλητές. Σε κάποιους ιστούς η συμπεριφορά θα είναι διαφορετική, και ίσως αλλάζει με την χρονική στιγμή και την ένταση. Δεν γίνεται να δοθεί απάντηση με τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν έως τώρα, όμως μπορούν να γίνουν υποθέσεις ακόμη και για αντιστροφή του επιγενετικού θορύβου. Πριν τις υποθέσεις αυτές, ας παρουσιαστεί το άρθρο που πρώτο πρότεινε πως η HBOT μπορεί να έχει και αντιγηραντικές ιδιότητες.

Η έρευνα αυτή εξέτασε την μείωση των senescent λευκοκυττάρων και την επιμήκυνση των τελομερών μετά από 30 και 60 ημερήσιες HBOTs και 1 με 2 εβδομάδες μετά την θεραπεία, πάντα συγκριτικά με τις τιμές τους προγενέστερα της θεραπείας [17]. Το δείγμα τους ήταν 30 άτομα >=64 ετών χωρίς σοβαρά προβλήματα υγείας. Ενδεικτικά παρουσιάζονται κάποια αποτελέσματά τους με ένα γράφημα και συγκεκριμένα μόνο τα στατιστικά των senescent κυττάρων για συντομία και γιατί θεωρείται πιο σημαντική και γενική ένδειξη για την γήρανση σε όλους τους ιστούς, ενώ το μικρότερο μήκος των τελομερών είναι μια από τις πολλές ενδείξεις γονδιακής αστάθειας που δεν εμφανίζεται σε όλα τα κύτταρα. Τα κύτταρα επιμηκύνουν τα τελομερή, όταν είναι υγιή. Αν επιμηκυνθούν τεχνικά τα τελομερή σε μη υγιή κύτταρα δεν θα μετατραπούν σε λειτουργικά

κύτταρα, αντιθέτως μπορεί να δημιουργηθεί μεγαλύτερο πρόβλημα. Επίσης θα αναφερθούν μόνο τα αποτελέσματα με στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0.05$ ). Τα δεδομένα είναι με αυτήν την σειρά: T-βοηθητικά μετά την HBOT ( $p < 0.0001$ ), και T κυτταροτοξικά μετά από 30, 60 συνεδρίες και αρκετές μέρες μετά την ολοκλήρωση των συνεδριών με  $p < 0.0001$ ,  $< 0.002$  και  $< 0.0004$  αντίστοιχα.

```
mv=[37.3 12.2 9.8 11]; %percentage of the decrease in senescence
s=[33 8.7 9.5 12.6]; %standard deviation of their values
hold on
for i = 1 : 4
    x=[-20:0.1:90];
    y=gaussmf(x,[s(i) mv(i)]); % they confirmed that
    plot(x,y) % the distribution was normal
end
```



εικόνα 4, Το ποσοστό μείωσης των senescent T βοηθητικών μέρες μετά την ολοκλήρωση των συνεδριών(μπλε), και των T κυτταροτοξικών μετά από 30 (πράσινο), 60 (κίτρινο) συνεδρίες και μετά το τέλος των συνεδριών (κόκκινο). Στον άλλο άξονα φαίνεται η συχνότητα εμφάνισης της κάθε τιμής. Τις τιμές πτώσεις τις έλαβαν χρησιμοποιώντας τον βιοδείκτη των senescent λευκοκυττάρων CD28

Φαίνεται και γραφικά πως για τους περισσότερους συμμετέχοντες τα senescent λευκοκύτταρα μειώθηκαν σημαντικά, κυρίως τα T βοηθητικά μετά την θεραπεία, αλλά πάντως όχι για όλους, και αν όντως η τιμή του  $\sigma$  που έβγαλαν είναι σωστή, σε κάποιους αυξήθηκαν κιόλας, χωρίς αυτό να έχει κάποια σχέση με την θεραπεία βέβαια, απλά δείχνει πως δεν είναι και τόσο αποτελεσματική και καθολική. Πάντως δεν αναγνωρίζεται κάποιο μοτίβο στις 30, στις 60, και μετά την θεραπεία, τα ποσοστά είναι πολύ κοντά μεταξύ τους. Κατά πάσα πιθανότητα και μετά από ελάχιστες συνεδρίες πάλι παραπλήσια αποτελέσματα θα προέκυπταν γιατί η συνάρτηση θα είναι εκθετική με τα κοίλα άνω, και άρα η μεγάλη διαφορά θα δημιουργείται στις πρώτες θεραπείες. Δηλαδή θα έχουμε την εμφάνιση του plateau που συζητήθηκε και στο [\[κεφάλαιο 3\]](#). Όμως το ενδιαφέρον κομμάτι είναι η εξήγηση που δίνουν. Οι ερευνητές εξετάζουν το παράδοξο που αναφέρθηκε νωρίτερα. Πως γίνεται η υπερβαρική οξυγονοθεραπεία, που είναι κλασική περίπτωση υπεροξείας



να έχει αποτελέσματα στα κύτταρα που θυμίζουν υποξικό stress; Υπερεκφράζονται σιρτουίνες, VEGF, ακόμη και οι HIF. Πως ερμηνεύεται η αλλοπρόσαλλη συμπεριφορά των βλαστοκυττάρων και πως συγκρίνεται μεταξύ υποξείας και HBOT;

Η πρόταση τους, και η πιο αποδεκτή από την επιστημονική κοινότητα είναι ότι ο οργανισμός αντιδρά στην διαφορά στην συγκέντρωση του οξυγόνου και όχι στην απόλυτη τιμή της. Απλοποιημένα ας πούμε ότι ο οργανισμός μαθαίνει στην υψηλή οξυγόνωση όσο είναι στον θάλαμο και όταν επανέλθει στις φυσιολογικές συνθήκες αισθάνεται την πτώση ως υποξία και ενεργοποιούνται οι ίδιοι μηχανισμοί προστασίας όπως και με την hormesis κατά την γυμναστική ή την αφαγία. Αυτό σημαίνει ότι η hormesis θα ξεκινάει μετά την θεραπεία. Κατά την διάρκεια της θεραπείας και όχι μετά, παρατηρείται η γρήγορη επούλωση των πληγών και η υπερενεργητικότητα των βλαστοκυττάρων στην περιοχή της πληγής. Αυτό δεν αντιτίθεται με την θεωρία γιατί δεν είναι χαρακτηριστικό της hormesis, το αντίθετο μάλιστα. Μπορεί η HBOT να προωθεί τον πολλαπλασιασμό των ιστών, και όταν σταματάει, με το ψευδο-υποξικό περιβάλλον να ενεργοποιεί τους μηχανισμούς αυτοσυντήρησης. Όμως γιατί να ανιχνεύεται η διαφορά; Εξετάζοντας το παράδειγμα του AMPK που ενεργοποιείται από το ADP ή το AMP, όσο περισσότερα είναι αυτά, τόσο περισσότεροι προσδέτες θα καλυφθούν. Αυτό είναι θέμα απόλυτης τιμής, όχι διαφοράς. Για να υπάρχει διαφορά πρέπει να υπάρχει και μνήμη. Πως θα ήταν ένα σύστημα με μνήμη; Μια ιδέα ίσως είναι πως αναγνωρίζει τους μηχανισμούς υπεροξείας που ήταν ενεργοποιημένοι για πολύ ώρα και πρέπει να τους σταματήσει για να μην προκαλέσουν κάποια βλάβη τώρα που δεν υπάρχει πληθώρα οξυγόνου. Αυτό μπορεί να σημαίνει την ενεργοποίηση της αντίθετης οδού η οποία μπορεί να κάνει overshoot μέχρι να σταθεροποιηθεί στις φυσιολογικές συνθήκες. Ο οργανισμός θα προτιμάει να κάνει overshoot προς την συντηρητική μεριά ώστε να προστατέψει τα κύτταρα του από το να χαλάσουν extra οξυγόνο ενώ πλέον είναι περιορισμένο. Η μνήμη εδώ είναι η ήδη υπάρχουσα απόκριση, και γίνεται σύγκριση με τις συνθήκες που έχει την στιγμή αυτή, αντιδρώντας συντηρητικά και ίσως με χρονοκαθυστέρηση. Άλλο ενδεχόμενο είναι η μνήμη να προέρχεται από το όργανο που έχει όντως μνήμη, τον εγκέφαλο. Για πολύ ώρα είχε προσαρμόσει τον οργανισμό στις συνθήκες υπεροξείας, τώρα πρέπει να ενεργοποιήσει το συμπαθητικό, να ξανα ανοίξει την διάμετρο των αγγείων και προστάζει τους υπόλοιπους ιστούς να χαλαρώσουν με την κατανάλωση και ότι άλλο συνεπάγεται για να διασφαλίσει την ενεργειακή του παροχή. Εδώ συγκρίνει την συχνότητα των σημάτων που λάμβανε από τους ιστούς ενημερώνοντας τον ότι υπάρχει αρκετό οξυγόνο, με την συχνότητα που λαμβάνει τώρα και βλέπει ότι τα σήματα έχουν μειωθεί κατά 15 φορές. Αμέσως στέλνει μηνύματα έκτακτης ανάγκης σε όλους τους ιστούς. Μέχρι να επανέλθει η ομοιόσταση και ο εγκέφαλος να σταματήσει να τρομοκρατεί τους ιστούς, η όρμεση έχει κάνει την δουλειά της. Αυτό φαίνεται να είναι και η πιθανότερη εξήγηση γιατί τα ένζυμα δεν λειτουργούν με συγκρίσεις, αν υπάρχει σύγκριση αυτή γίνεται μόνο από νευρικά κύτταρα.

Ωστόσο είναι πιθανό να μην γίνεται καμία σύγκριση με την προηγούμενη κατάσταση και δηλαδή, κατά την διάρκεια των υπεροξικών συνθηκών, να έχουμε υποξικές αντιδράσεις. Με βάση αυτό προκύπτουν τρία ενδεχόμενα. Πρώτον, η υπεροξία να αυξάνει πολύ την κατανάλωση του οξυγόνου και με άλλες αντιδράσεις που σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις το οξυγόνο δεν μπορεί



να κάνει, καταναλώνοντας εν τέλη περισσότερο από ότι έχει αυξηθεί η συγκέντρωση του. Αυτό είναι απίθανο γιατί η αύξηση του οξυγόνου είναι πολύ μεγάλη και γιατί αν ίσχυε θα είχε ήδη παρατηρηθεί από τα παραπροϊόντα των αντιδράσεων. Δεύτερον, σε μερικούς ιστούς να υπάρχει υποξία, όπως συμβαίνει με τα επιθηλιακά κύτταρα που φτιάχνουν τα αγγεία λόγω μεγάλης αύξησης των τοιχωμάτων των αγγείων από την αγγειοσυστολή. Το πρόβλημα με αυτή την θεωρία είναι ότι οι ιστοί αυτοί θα είναι ελάχιστοι, ενώ τα κύτταρα που εμφανίζουν υποξική αντίδραση είναι παντού. Θα μπορούσαν τα υποξικά κύτταρα να στέλνουν κυτοκίνες στα υπόλοιπα όμως και πάλι η επιρροή θα ήταν περιορισμένη. Τέλος, η μόνη άλλη λογική εξήγηση είναι η υπεροξία να προκαλεί έμμεσα την ενεργοποίηση υποξικών μηχανισμών, και ο πιο πιθανός διαμεσολαβητής είναι το NO. Μια γενική παρατήρηση ήταν ότι η HBOT αυξάνεται η [NO]. Το ίδιο ισχύει και κατά την υποξία, και ξέρουμε ότι η [NO] είναι καταλυτική για την σηματοδότηση της απόκρισης, άρα μπορεί να είναι και ο λόγος που γίνεται παρά την υπεροξία. Ωστόσο οι μετρήσεις δείχνουν μεγαλύτερη αύξηση μετά την HBOT [18], που είναι ένδειξη ότι η υποξική αντίδραση συμβαίνει κυρίως μετά την θεραπεία. Προαναφέρθηκε ότι το NO έχει διάφορες επιδράσεις ανάλογα το κύτταρο και την συγκέντρωση (σίγουρα υπάρχουν και άλλες μεταβλητές όπως η συγκέντρωση άλλων μορίων), άρα θα μπορούσε στις συγκεντρώσεις που βρίσκεται πριν ή μετά την HBOT να προκαλεί απόπτωση σε senescent κύτταρα, να ενεργοποιεί μηχανισμούς αυτοσυντήρησης σε άλλους ιστούς, με επιτομή όλων την έκφραση κάποιων παραγόντων Yamanaka, αν και λογικά δεν μπορούν να εκφραστούν σε μη ESC απλά λόγω της συγκέντρωσης O<sub>2</sub> και NO, και αν γινόταν κάτι τέτοιο, τουλάχιστον σε αξιοσημείωτο βαθμό, θα είχε μετρηθεί ήδη έως τώρα.

Η λογικότερη ερμηνεία από όλες είναι και η απλούστερη. Η υπεροξία προκαλεί οξειδωτικό στρες [ROS], όπως αναφέρουν και στην έρευνα [17]. Το στρες αυτό είναι αρκετό για να προκαλέσει hormesis, δηλαδή να δυναμώσει τους μηχανισμούς αυτοάμυνας, και είναι αρκετά μικρό ώστε να μην προκαλέσει σημαντικά προβλήματα. Οι μηχανισμοί αυτοάμυνας που ενισχύονται μπορεί να είναι τα αντιοξειδωτικά και σιρτουίνες. Επειδή ο χρόνος ημιζωής των μορίων αυτών είναι πολύ μεγαλύτερος από των ROS, όταν επιστρέφουν στα φυσιολογικά επίπεδα οξυγόνου, υπάρχει πληθώρα αντιοξειδωτικών και πολύ λιγότερα ROS. Κυρίως όμως, η υπερέκφραση σιρτουινών οδηγεί σε λιγότερο επιγενετικό θόρυβο σύμφωνα με την πληροφοριακή θεωρία του Sinclair. Αυτό από μόνο του μπορεί να ευθύνεται για τις αντιγηραντικές ιδιότητες. Τι σχέση έχουν όλα αυτά με τα senescent κύτταρα; Υπάρχουν δύο εκδοχές, είτε κάποιος από τους παράγοντες (NO, O<sub>2</sub>, sirtuins και άλλα ένζυμα που έχουν σχέση με το AMPK) προκαλούν απόπτωση στα συγκεκριμένα κύτταρα, κάτι πολύ απίθανο, είτε ο ρυθμός παραγωγής των senescent κυττάρων μειώνεται αρκετά λόγω της hormesis και το ανοσοποιητικό προλαβαίνει να αφαιρέσει περισσότερα από όσα δημιουργούνται, συν του ότι ενισχύεται και το ίδιο το ανοσοποιητικό. Το ενδεχόμενο τα κύτταρα από senescent να έγιναν φυσιολογικά είναι απίθανο. Σίγουρα ο μηχανισμός θα έχει άμεση σχέση με τις σιρτουίνες ή χρήσιμα για αυτές μόρια όπως το NAD<sup>+</sup> και όντως θα μειώνει τον επιγενετικό θόρυβο με την επάρκεια των ενζύμων αυτών, όμως πάντα με το plateau που δεν μπορεί να ξεπεραστεί γιατί ο θόρυβος λογικά δεν προκύπτει μόνο από την απουσία (4\*). Ωστόσο δεδομένου ότι ο μηχανισμός είναι ο ίδιος, σε άτομα που δεν έχουν προβλήματα υγείας, δεν μπορεί να προσφέρει πολλά περισσότερα από την άθληση, την καλή διατροφή και τα φάρμακα που

ενισχύουν της οδούς αυτές. Δηλαδή αν ήταν να συγκριθούν άτομα που γυμνάζονται, κάνουν διαλειμματικές νηστείες και παίρνουν για παράδειγμα NMN, με άτομα που κάνουν το ίδιο αλλά δέχονται και συχνά HBOT, μάλλον δεν θα εντοπιζόταν στατιστικά σημαντική διαφορά, γιατί φαίνεται να βασίζονται στον ίδιο μηχανισμό.

Ανεξάρτητα του μηχανισμού, πρέπει και να επιβεβαιωθεί ότι η HBOT έχει όντως αντιγηραντικές ιδιότητες. Ένα από τα καλύτερα πειράματα θα ήταν η μέτρηση του Horvath clock πριν και μετά την θεραπεία (αν και ιδανικά χρειάζεται δυναμική παρακολούθηση κατά την θεραπεία που όμως είναι τεχνολογικά αδύνατο). Ωστόσο τα οφέλη της μπορεί να είναι ανεξάρτητα του επιγενετικού θορύβου, που σημαίνει ότι δεν θα άλλαζε την γήρανση σε μοριακό επίπεδο, όμως είναι σίγουρα πολύ σημαντικά για την ποιότητα της ζωής των πρεσβύτερων, όπως το [inflammaging](#) και γενικότερα η βελτίωση της λειτουργίας των ιστών, τουλάχιστον προσωρινά γιατί η αυξημένη λειτουργία των βλαστοκυττάρων σχετίζεται με την εξάντληση τους, και άρα μπορεί μακροπρόθεσμα να έχει τις αντίθετες συνέπειες για τον φαινότυπο της γήρανσης. Πάντως έχουν γίνει αρκετές έρευνες για άλλα προβλήματα που σχετίζονται με την γήρανση όπως η αγγειακή άνοια [\[19\]](#), και οι ενδείξεις είναι ενθαρρυντικές για την HBOT, επιβεβαιώνοντας ότι ακόμη και αν δεν μπορεί να βοηθήσει στην γήρανση, βοηθάει τουλάχιστον στα συμπτώματα της.

## Αναφορές - Πηγές

- [0] Sinclair, D. "LIFESPAN". (2019) <https://lifespansbook.com/>
- [1] Williams, George C. "Pleiotropy, Natural Selection, and the Evolution of Senescence." *Evolution* 11, no. 4 (1957): 398–411. <https://doi.org/10.2307/2406060>.
- [2] Kirkwood, T. Evolution of ageing. *Nature* 270, 301–304 (1977). <https://doi.org/10.1038/270301a0>
- [3] Medawar, Peter Brian. "An unsolved problem of biology." (1952)
- [footnote 1] Gorgoulis, Vassilis G, and Thanos D Halazonetis. "Oncogene-induced senescence: the bright and dark side of the response." *Current opinion in cell biology* vol. 22,6 (2010): 816-27. doi:10.1016/j.ceb.2010.07.013
- [4] ORGEL, L E. "The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 49,4 (1963): 517-21. <https://doi:10.1073/pnas.49.4.517>
- [5] Harman, D. Free radical theory of aging: Consequences of mitochondrial aging. *AGE* 6, 86–94 (1983). <https://doi.org/10.1007/BF02432509>
- [6] López-Otín, Carlos et al. "The hallmarks of aging." *Cell* vol. 153,6 (2013): 1194-217. doi:10.1016/j.cell.2013.05.039
- [7] Sinclair, D A et al. "Accelerated aging and nucleolar fragmentation in yeast sgs1 mutants." *Science (New York, N.Y.)* vol. 277,5330 (1997): 1313-6. doi:10.1126/science.277.5330.1313
- [8] Kennedy, B K et al. "Redistribution of silencing proteins from telomeres to the nucleolus is associated with extension of life span in *S. cerevisiae*." *Cell* vol. 89,3 (1997): 381-91. doi:10.1016/s0092-8674(00)80219-6
- [9] Sinclair, D A, and L Guarente. "Extrachromosomal rDNA circles--a cause of aging in yeast." *Cell* vol. 91,7 (1997): 1033-42. doi:10.1016/s0092-8674(00)80493-6
- [10] Gibson, Elizabeth G et al. "Two-Dimensional Gel Electrophoresis to Resolve DNA Topoisomers." *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* vol. 2119 (2020): 15-24. doi:10.1007/978-1-0716-0323-9\_2
- [11] Park, P U et al. "Effects of mutations in DNA repair genes on formation of ribosomal DNA circles and life span in *Saccharomyces cerevisiae*." *Molecular and cellular biology* vol. 19,5 (1999): 3848-56. doi:10.1128/MCB.19.5.3848

- [12] Oberdoerffer, Philipp et al. "SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging." *Cell* vol. 135,5 (2008): 907-18. doi:10.1016/j.cell.2008.10.025
- [13] Ianni, Alessandro et al. "Sirt7 stabilizes rDNA heterochromatin through recruitment of DNMT1 and Sirt1." *Biochemical and biophysical research communications* vol. 492,3 (2017): 434-440. doi:10.1016/j.bbrc.2017.08.081
- [14] Paredes, Silvana et al. "The epigenetic regulator SIRT7 guards against mammalian cellular senescence induced by ribosomal DNA instability." *The Journal of biological chemistry* vol. 293,28 (2018): 11242-11250. doi:10.1074/jbc.AC118.003325
- [15] Imai, Shin-Ichiro, and Leonard Guarente. "It takes two to tango: NAD<sup>+</sup> and sirtuins in aging/longevity control." *NPJ aging and mechanisms of disease* vol. 2 16017. 18 Aug. 2016, doi:10.1038/npjamd.2016.17
- [16] Schulz, Anna M, and Cole M Haynes. "UPR(mt)-mediated cytoprotection and organismal aging." *Biochimica et biophysica acta* vol. 1847,11 (2015): 1448-56. doi:10.1016/j.bbabi.2015.03.008

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

- [1] Mills, Kathryn F., et al. "Long-term administration of nicotinamide mononucleotide mitigates age-associated physiological decline in mice." *Cell metabolism* 24.6 (2016): 795-806.
- [1β] Das, Abhirup et al. "Impairment of an Endothelial NAD<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>S Signaling Network Is a Reversible Cause of Vascular Aging." *Cell* vol. 173,1 (2018): 74-89.e20. doi:10.1016/j.cell.2018.02.008
- [2] Madeo, Frank et al. "Spermidine: a physiological autophagy inducer acting as an anti-aging vitamin in humans;." *Autophagy* vol. 15,1 (2019): 165-168. doi:10.1080/15548627.2018.1530929
- [3] Walford, Roy L et al. "Calorie restriction in biosphere 2: alterations in physiologic, hematologic, hormonal, and biochemical parameters in humans restricted for a 2-year period." *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* vol. 57,6 (2002): B211-24. doi:10.1093/gerona/57.6.b211
- [4] Kagawa, Y. "Impact of Westernization on the nutrition of Japanese: changes in physique, cancer, longevity and centenarians." *Preventive medicine* vol. 7,2 (1978): 205-17. doi:10.1016/0091-7435(78)90246-3
- [5] Mattison, Julie A et al. "Caloric restriction improves health and survival of rhesus monkeys." *Nature communications* vol. 8 14063. 17 Jan. 2017, doi:10.1038/ncomms14063
- [6] Jeon, SM. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Exp Mol Med* 48, e245 (2016). <https://doi.org/10.1038/emm.2016.81>
- [7] Lan, Fan et al. "SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation." *The Journal of biological chemistry* vol. 283,41 (2008): 27628-27635. doi:10.1074/jbc.M805711200
- [8] Vitale, Giovanni et al. "ROLE of IGF-1 System in the Modulation of Longevity: Controversies and New Insights From a Centenarians' Perspective." *Frontiers in endocrinology* vol. 10 27. 1 Feb. 2019, doi:10.3389/fendo.2019.00027
- [9] Gleason, Catherine E et al. "The role of AMPK and mTOR in nutrient sensing in pancreatic beta-cells." *The Journal of biological chemistry* vol. 282,14 (2007): 10341-51. doi:10.1074/jbc.M610631200
- [10] Fontana, Luigi et al. "Long-term effects of calorie or protein restriction on serum IGF-1 and IGFBP-3 concentration in humans." *Aging cell* vol. 7,5 (2008): 681-7. doi:10.1111/j.1474-9726.2008.00417.x
- [11] Fontana, Luigi et al. "Decreased Consumption of Branched-Chain Amino Acids Improves Metabolic Health." *Cell reports* vol. 16,2 (2016): 520-530. doi:10.1016/j.celrep.2016.05.092
- [12] Hine, Christopher, and James R Mitchell. "Calorie restriction and methionine restriction in control of endogenous hydrogen sulfide production by the transsulfuration pathway." *Experimental gerontology* vol. 68 (2015): 26-32. doi:10.1016/j.exger.2014.12.010
- [13] Tato, Irantzu et al. "Amino acids activate mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) via PI3K/Akt signaling." *The Journal of biological chemistry* vol. 286,8 (2011): 6128-42. doi:10.1074/jbc.M110.166991
- [14] Medvedik, Oliver et al. "MSN2 and MSN4 link calorie restriction and TOR to sirtuin-mediated lifespan extension in *Saccharomyces cerevisiae*." *PLoS biology* vol. 5,10 (2007): e261. doi:10.1371/journal.pbio.0050261
- [15] Yuan, Mengqiu et al. "CARS senses cysteine deprivation to activate AMPK for cell survival." *The EMBO journal* vol. 40,21 (2021): e108028. doi:10.15252/embj.2021108028
- [16] Wolfson, Rachel L et al. "Sestrin2 is a leucine sensor for the mTORC1 pathway." *Science (New York, N.Y.)* vol. 351,6268 (2016): 43-8. doi:10.1126/science.aab2674

- [17] Hine, Christopher et al. “Endogenous hydrogen sulfide production is essential for dietary restriction benefits.” *Cell* vol. 160,1-2 (2015): 132-44. doi:10.1016/j.cell.2014.11.048
- [18] Richter, Erik A, and Neil B Ruderman. “AMPK and the biochemistry of exercise: implications for human health and disease.” *The Biochemical journal* vol. 418,2 (2009): 261-75. doi:10.1042/BJ20082055
- [19] Sriwijitkamol, Apiradee et al. “Effect of acute exercise on AMPK signaling in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes: a time-course and dose-response study.” *Diabetes* vol. 56,3 (2007): 836-48. doi:10.2337/db06-1119
- [20] Robinson, Matthew M et al. “Enhanced Protein Translation Underlies Improved Metabolic and Physical Adaptations to Different Exercise Training Modes in Young and Old Humans.” *Cell metabolism* vol. 25,3 (2017): 581-592. doi:10.1016/j.cmet.2017.02.009
- [21] Tucker, Larry A “Physical activity and telomere length in U.S. men and women: An NHANES investigation.” Elsevier. (2017): <https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2017.04.027>
- [22] De Bonis, Maria Luigia et al. “SIRT1 is necessary for proficient telomere elongation and genomic stability of induced pluripotent stem cells.” *Stem cell reports* vol. 2,5 690-706. 17 Apr. 2014, doi:10.1016/j.stemcr.2014.03.002
- [23] Chen, Jianwei et al. “SIRT6 enhances telomerase activity to protect against DNA damage and senescence in hypertrophic ligamentum flavum cells from lumbar spinal stenosis patients.” *Aging* vol. 13,4 (2021): 6025-6040. doi:10.18632/aging.202536
- [24] Makino, Naoki et al. “Calorie restriction increases telomerase activity, enhances autophagy, and improves diastolic dysfunction in diabetic rat hearts.” *Molecular and cellular biochemistry* vol. 403,1-2 (2015): 1-11. doi:10.1007/s11010-015-2327-0
- [25] Cypser, James R, and Thomas E Johnson. “Multiple stressors in *Caenorhabditis elegans* induce stress hormesis and extended longevity.” *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* vol. 57,3 (2002): B109-14. doi:10.1093/gerona/57.3.b109
- [26] Conti, Bruno et al. “Transgenic mice with a reduced core body temperature have an increased life span.” *Science (New York, N.Y.)* vol. 314,5800 (2006): 825-8. doi:10.1126/science.1132191
- [27] Carrillo, Andres E, and Andreas D Flouris. “Caloric restriction and longevity: effects of reduced body temperature.” *Ageing research reviews* vol. 10,1 (2011): 153-62. doi:10.1016/j.arr.2010.10.001
- [28] Ulgherait, M., Chen, A., McAllister, S.F. et al. Circadian regulation of mitochondrial uncoupling and lifespan. *Nat Commun* 11, 1927 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15617-x>
- [29] Pravednikova, A.E., Shevchenko, S.Y., Kerchev, V.V. et al. Association of uncoupling protein (Ucp) gene polymorphisms with cardiometabolic diseases. *Mol Med* 26, 51 (2020). <https://doi.org/10.1186/s10020-020-00180-4>
- [30] de Oliveira Bristot, Viviane José et al. “The Role of PGC-1 $\alpha$ /UCP2 Signaling in the Beneficial Effects of Physical Exercise on the Brain.” *Frontiers in neuroscience* vol. 13 292. 29 Mar. 2019, doi:10.3389/fnins.2019.00292
- [31] Cutting W, Mehrtens H, Tainter M. “Actions and uses of dinitrophenol: Promising metabolic applications”. (1933). doi:10.1001/jama.1933.02740280013006
- [32] May, Francis J et al. “Lipidomic Adaptations in White and Brown Adipose Tissue in Response to Exercise Demonstrate Molecular Species-Specific Remodeling.” *Cell reports* vol. 18,6 (2017): 1558-1572. doi:10.1016/j.celrep.2017.01.038
- [33] Wojciak, Gabriela et al. “The Effect of Repeated Whole-Body Cryotherapy on Sirt1 and Sirt3 Concentrations and Oxidative Status in Older and Young Men Performing Different Levels of Physical Activity.” *Antioxidants (Basel, Switzerland)* vol. 10,1 37. 31 Dec. 2020, doi:10.3390/antiox10010037
- [34] Laukkanen, Tanjaniina et al. “Association between sauna bathing and fatal cardiovascular and all-cause mortality events.” *JAMA internal medicine* vol. 175,4 (2015): 542-8. doi:10.1001/jamainternmed.2014.8187
- [35] Huang, Han-Bin et al. “Traffic-related air pollution and DNA damage: a longitudinal study in Taiwanese traffic conductors.” *PloS one* vol. 7,5 (2012): e37412. doi:10.1371/journal.pone.0037412
- [36] Chequer, Farah Maria Drumond et al. “The cosmetic dye quinoline yellow causes DNA damage in vitro.” *Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis* vol. 777 (2015): 54-61. doi:10.1016/j.mrgentox.2014.11.003
- [37] Yáñez, Leticia et al. “DDT induces DNA damage in blood cells. Studies in vitro and in women chronically exposed to this insecticide.” *Environmental research* vol. 94,1 (2004): 18-24. doi:10.1016/s0013-9351(03)00047-1



[38] Lijinsky, W. “N-Nitroso compounds in the diet.” *Mutation research* vol. 443,1-2 (1999): 129-38. doi:10.1016/s1383-5742(99)00015-0

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

[1] Minokoshi, Yasuhiko et al. “Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase.” *Nature* vol. 415,6869 (2002): 339-43. doi:10.1038/415339a

[2α] Haque, Wasim A et al. “Serum adiponectin and leptin levels in patients with lipodystrophies.” *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* vol. 87,5 (2002): 2395. doi:10.1210/jcem.87.5.8624

[2β] Ibrahim Abdalla, Mona Mohamed. “Ghrelin - Physiological Functions and Regulation.” *European endocrinology* vol. 11,2 (2015): 90-95. doi:10.17925/EE.2015.11.02.90

[3] Powers, R Wilson 3rd et al. “Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling.” *Genes & development* vol. 20,2 (2006): 174-84. doi:10.1101/gad.1381406

[4] Bjedov, Ivana et al. “Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly *Drosophila melanogaster*.” *Cell metabolism* vol. 11,1 (2010): 35-46. doi:10.1016/j.cmet.2009.11.010

[5] Bitto, Alessandro et al. “Transient rapamycin treatment can increase lifespan and healthspan in middle-aged mice.” *eLife* vol. 5 e16351. 23 Aug. 2016, doi:10.7554/eLife.16351

[6] Dumont, F J, and Q Su. “Mechanism of action of the immunosuppressant rapamycin.” *Life sciences* vol. 58,5 (1996): 373-95. doi:10.1016/0024-3205(95)02233-3

[7] Andrzejewski, Sylvia et al. “Metformin directly acts on mitochondria to alter cellular bioenergetics.” *Cancer & metabolism* vol. 2 12. 28 Aug. 2014, doi:10.1186/2049-3002-2-12

[8] Elbere, I., Silamikelis, I., Ustinova, M. et al. Significantly altered peripheral blood cell DNA methylation profile as a result of immediate effect of metformin use in healthy individuals. *Clin Epigenet* 10, 156 (2018). <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0593-x>

[9] Kulkarni, Ameya S et al. “Benefits of Metformin in Attenuating the Hallmarks of Aging.” *Cell metabolism* vol. 32,1 (2020): 15-30. doi:10.1016/j.cmet.2020.04.001

[10] Kulkarni, Ameya S et al. “Benefits of Metformin in Attenuating the Hallmarks of Aging.” *Cell metabolism* vol. 32,1 (2020): 15-30. doi:10.1016/j.cmet.2020.04.001

[11] Baur, Joseph A et al. “Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet.” *Nature* vol. 444,7117 (2006): 337-42. doi:10.1038/nature05354

[12] Howitz, Konrad T, and David A Sinclair. “Xenohormesis: sensing the chemical cues of other species.” *Cell* vol. 133,3 (2008): 387-91. doi:10.1016/j.cell.2008.04.019

[13] Mitchell, Sarah J et al. “The SIRT1 activator SRT1720 extends lifespan and improves health of mice fed a standard diet.” *Cell reports* vol. 6,5 (2014): 836-43. doi:10.1016/j.celrep.2014.01.031

[14] Vaiserman, A., Lushchak, O. Implementation of longevity-promoting supplements and medications in public health practice: achievements, challenges and future perspectives. *J Transl Med* 15, 160 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1259-8>

[15] Vaiserman, Alexander et al. “Anti-ageing gene therapy: Not so far away;.” *Ageing research reviews* vol. 56 (2019): 100977. doi:10.1016/j.arr.2019.100977

[16] Wang, M., Glass, Z. & Xu, Q. Non-viral delivery of genome-editing nucleases for gene therapy. *Gene Ther* 24, 144–150 (2017). <https://doi.org/10.1038/gt.2016.72>

[17] Ayers, Emmeline et al. “Association of exceptional parental longevity and physical function in aging.” *Age (Dordrecht, Netherlands)* vol. 36,4 (2014): 9677. doi:10.1007/s11357-014-9677-5

[18] Sun, Liang et al. “FOXO3 variants are beneficial for longevity in Southern Chinese living in the Red River Basin: A case-control study and meta-analysis.” *Scientific reports* vol. 5 9852. 27 Apr. 2015, doi:10.1038/srep09852

[19] Kolovou, Vana et al. “Five gene variants in nonagenarians, centenarians and average individuals.” *Archives of medical science : AMS* vol. 13,5 (2017): 1130-1141. doi:10.5114/aoms.2017.68942

[20] Brooks-Wilson, Angela R. “Genetics of healthy aging and longevity.” *Human genetics* vol. 132,12 (2013): 1323-38. doi:10.1007/s00439-013-1342-z

[21] Sebastiani, Paola et al. “APOE Alleles and Extreme Human Longevity.” *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* vol. 74,1 (2019): 44-51. doi:10.1093/gerona/gly174

- [22] Lanner, R M, and K F Connor. “Does bristlecone pine senesce;” *Experimental gerontology* vol. 36,4-6 (2001): 675-85. doi:10.1016/s0531-5565(00)00234-5
- [23] Matsumoto, Yui, and Maria Pia Miglietta. “Cellular Reprogramming and Immortality: Expression Profiling Reveals Putative Genes Involved in *Turritopsis dohrnii*'s Life Cycle Reversal.” *Genome biology and evolution* vol. 13,7 (2021): evab136. doi:10.1093/gbe/evab136
- [24] Quesada, Víctor et al. “Giant tortoise genomes provide insights into longevity and age-related disease.” *Nature ecology & evolution* vol. 3,1 (2019): 87-95. doi:10.1038/s41559-018-0733-x
- [25] Keane, Michael et al. “Insights into the evolution of longevity from the bowhead whale genome.” *Cell reports* vol. 10,1 (2015): 112-22. doi:10.1016/j.celrep.2014.12.008
- [26] Lagunas-Rangel, Francisco Alejandro. “Deciphering the whale's secrets to have a long life.” *Experimental gerontology* vol. 151 (2021): 111425. doi:10.1016/j.exger.2021.111425
- [27] De Cecco, Marco et al. “Genomes of replicatively senescent cells undergo global epigenetic changes leading to gene silencing and activation of transposable elements.” *Aging cell* vol. 12,2 (2013): 247-56. doi:10.1111/accel.12047

### 3.4 ΣΕΝΟΛΥΣΗ

- [1] “Senolytic drugs reverse damage caused by senescent cells in mice.” National Institutes of Health (NIH), 9 July 2018, <https://www.nih.gov/news-events/news-releases/senolytic-drugs-reverse-damage-caused-senescent-cells-mice>.
- [2] Ellison-Hughes, Georgina M. “First evidence that senolytics are effective at decreasing senescent cells in humans.” *EBioMedicine* vol. 56 (2020): 102473. doi:10.1016/j.ebiom.2019.09.053
- [3] König, Heiko et al. “Effects of dasatinib on SRC kinase activity and downstream intracellular signaling in primitive chronic myelogenous leukemia hematopoietic cells.” *Cancer research* vol. 68,23 (2008): 9624-33. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1131
- [4] Batiha, Gaber El-Saber, et al. “The Pharmacological Activity, Biochemical Properties, and Pharmacokinetics of the Major Natural Polyphenolic Flavonoid: Quercetin.” *Foods*, vol. 9, no. 3, Mar. 2020, p. 374. Crossref, <https://doi.org/10.3390/foods9030374>.
- [5] Wissler, Zhu, et al. “Discovery, development, and future application of senolytics: theories and predictions.” (2020). <https://doi.org/10.1111/febs.15264>
- [6] Laberge, Remi-Martin et al. “MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation.” *Nature cell biology* vol. 17,8 (2015): 1049-61. doi:10.1038/ncb3195
- [7] Pereira, Campisi, et al. “Senescent cells evade immune clearance via HLA-E-mediated NK and CD8+ T cell inhibition”. *Nat Commun* 10, 2387 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10335-5>
- [8] Gorgoulis, Vassilis et al. “Cellular Senescence: Defining a Path Forward.” *Cell* vol. 179,4 (2019): 813-827. doi:10.1016/j.cell.2019.10.005
- [9] Georgakopoulou, E A et al. “Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues.” *Aging* vol. 5,1 (2013): 37-50. doi:10.18632/aging.100527

### ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ

- [1] Fu, Lijuan et al. “Derivation of neural stem cells from mesenchymal stemcells: evidence for a bipotential stem cell population.” *Stem cells and development* vol. 17,6 (2008): 1109-21. doi:10.1089/scd.2008.0068
- [2] Zhu, Yingqian et al. “Application of mesenchymal stem cell therapy for aging frailty: from mechanisms to therapeutics.” *Theranostics* vol. 11,12 5675-5685. 31 Mar. 2021, doi:10.7150/thno.46436
- [3] Takahashi, Kazutoshi, and Shinya Yamanaka. “Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.” *Cell* vol. 126,4 (2006): 663-76. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024
- [4] Kim, Jeong Beom et al. “Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells.” *Cell* vol. 136,3 (2009): 411-9. doi:10.1016/j.cell.2009.01.023
- [5] Velychko, Sergiy et al. “Excluding Oct4 from Yamanaka Cocktail Unleashes the Developmental Potential of iPSCs.” *Cell stem cell* vol. 25,6 (2019): 737-753.e4. doi:10.1016/j.stem.2019.10.002
- [6] Chen, X et al. “Krüppel-like factor 4 (gut-enriched Krüppel-like factor) inhibits cell proliferation by blocking G1/S progression of the cell cycle.” *The Journal of biological chemistry* vol. 276,32 (2001): 30423-8. doi:10.1074/jbc.M101194200



- [7] Maekawa, Momoko et al. “Direct reprogramming of somatic cells is promoted by maternal transcription factor Glis1.” *Nature* vol. 474,7350 225-9. 8 Jun. 2011, doi:10.1038/nature10106
- [8] Ocampo, Alejandro et al. “In Vivo Amelioration of Age-Associated Hallmarks by Partial Reprogramming.” *Cell* vol. 167,7 (2016): 1719-1733.e12. doi:10.1016/j.cell.2016.11.052
- [9] Lu, Yuancheng et al. “Reprogramming to recover youthful epigenetic information and restore vision.” *Nature* vol. 588,7836 (2020): 124-129. doi:10.1038/s41586-020-2975-4
- [10] Müller, Udo et al. “TET-mediated oxidation of methylcytosine causes TDG or NEIL glycosylase dependent gene reactivation.” *Nucleic acids research* vol. 42,13 (2014): 8592-604. doi:10.1093/nar/gku552
- 4 ΥΠΕΡΒΑΡΙΚΗ ΟΞΥΓΟΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ**
- [0] Gracia, Luis et al. “Identification and control of a multiplace hyperbaric chamber.” *PloS one* vol. 13,8 e0200407. 3 Aug. 2018, doi:10.1371/journal.pone.0200407
- [1] Jones, Brett, et al. “Hyperbaric Physics”. [Updated 2021 Sep 28]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448104/>
- [2] Cooper, Phuyal, Shah. “Oxygen Toxicity”. [Updated 2022 Feb 7]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430743/>
- [3] BOEREMA, I et al. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde* vol. 104 (1960): 949-54.
- [4] Hadanny, et al. “Hyperbaric oxygen therapy effects on pulmonary functions: a prospective cohort study”. *BMC Pulm Med* 19, 148 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12890-019-0893-8>
- [5] Balestra, Costantino et al. “Serum erythropoietin levels in healthy humans after a short period of normobaric and hyperbaric oxygen breathing: the "normobaric oxygen paradox".” *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985) vol. 100,2 (2006): 512-8. doi:10.1152/jappphysiol.00964.2005
- [6] Goyal, et al. “Hyperbaric Cardiovascular Effects”. [Updated 2022 May 10]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482231/>
- [7] Schiavo, Simone et al. “Magnitude and Clinical Predictors of Blood Pressure Changes in Patients Undergoing Hyperbaric Oxygen Therapy: A Retrospective Study.” *International journal of environmental research and public health* vol. 17,20 7586. 19 Oct. 2020, doi:10.3390/ijerph17207586
- [8] Buckley, Christopher J. and Jeffrey S. Cooper. “Hyperbaric Affects On Angiogenesis.” StatPearls, StatPearls Publishing, 11 August 2021.
- [9] Mu, Jun et al. “Hyperbaric oxygen therapy promotes neurogenesis: where do we stand;.” *Medical gas research* vol. 1,1 14. 27 Jun. 2011, doi:10.1186/2045-9912-1-14
- [10] Zhang, Xiao-Ying et al. “The role of  $\beta$ -catenin signaling pathway on proliferation of rats neural stem cells after hyperbaric oxygen therapy in vitro.” *Cellular and molecular neurobiology* vol. 31,1 (2011): 101-9. doi:10.1007/s10571-010-9559-z
- [11] Oyaizu, Enomoto, Yamamoto, et al. “Hyperbaric oxygen reduces inflammation, oxygenates injured muscle, and regenerates skeletal muscle via macrophage and satellite cell activation”. *Sci Rep* 8, 1288 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19670-x>
- [12] Boykin, Joseph V Jr, and Chris Baylis. “Hyperbaric oxygen therapy mediates increased nitric oxide production associated with wound healing: a preliminary study.” *Advances in skin & wound care* vol. 20,7 (2007): 382-8. doi:10.1097/01.ASW.0000280198.81130.d5
- [13] Thom, Stephen R et al. “Stem cell mobilization by hyperbaric oxygen.” *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* vol. 290,4 (2006): H1378-86. doi:10.1152/ajpheart.00888.2005
- [14] Beltran-Povea, Amparo et al. “Role of nitric oxide in the maintenance of pluripotency and regulation of the hypoxia response in stem cells.” *World journal of stem cells* vol. 7,3 (2015): 605-17. doi:10.4252/wjsc.v7.i3.605
- [15] Thomas, Douglas D et al. “The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling.” *Free radical biology & medicine* vol. 45,1 (2008): 18-31. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.03.020
- [16] Tejedo, J R et al. “Low concentrations of nitric oxide delay the differentiation of embryonic stem cells and promote their survival.” *Cell death & disease* vol. 1,10 e80. 7 Oct. 2010, doi:10.1038/cddis.2010.57
- [17] Hachmo, Yafit et al. “Hyperbaric oxygen therapy increases telomere length and decreases immunosenescence in isolated blood cells: a prospective trial.” *Aging* vol. 12,22 (2020): 22445-22456. doi:10.18632/aging.202188

[18] Boykin, Joseph V Jr, and Chris Baylis. "Hyperbaric oxygen therapy mediates increased nitric oxide production associated with wound healing: a preliminary study." *Advances in skin & wound care* vol. 20,7 (2007): 382-8. doi:10.1097/01.ASW.0000280198.81130.d5

[19] You, Qiang et al. "Meta-Analysis on the Efficacy and Safety of Hyperbaric Oxygen as Adjunctive Therapy for Vascular Dementia." *Frontiers in aging neuroscience* vol. 11 86. 17 Apr. 2019, doi:10.3389/fnagi.2019.00086

## 5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ. ΥΠΟΘΕΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

- 1) Biases. Ενώ τα στατιστικά στο κεφάλαιο 2 μπορεί να είναι biased, στο 3 δεν υπάρχει το ίδιο πρόβλημα. Η επιμήκυνση της ζωής από φάρμακα που επηρεάζουν την ίδια μεταβολική οδό με την γυμναστική την αφαγία και το κρύο, είναι ισχυρή στατιστική απόδειξη και για τα δυο. Το μόνο ερώτημα είναι κατά πόσο είναι συνεργατικά και κατά πόσο υπάρχει υπερκάλυψη. Υπάρχουν τρία πειράματα που θα μπορούσαν να γίνουν.
  - α) Να συγκριθεί το PR (και ξεχωριστά τα AA) με το CR με βάση την αυτοφαγία και με βάση το Horvath clock (επιγενετικός θόρυβος) όχι το πόσο θα ζήσουν τα πειραματόζωα. Θα πρέπει η CR να μην συμπεριλαμβάνει PR, και να είναι αρκετή ώστε να προκληθεί αυτοφαγία, χωρίς όμως να γίνει ανθυγιεινή διατροφή. Καλύτερα με fasting. Το ίδιο και για την PR, να συγκριθεί η απόδοση. Επίσης θα πρέπει να συγκριθούν συνδυαστικά με άθληση και να ελεγχθεί αν η αναβολική άθληση αυξάνει τα όρια των πρωτεϊνών που μπορούμε να καταναλώσουμε και να βρισκόμαστε σε PR.
  - β) Ένα ερώτημα που προκύπτει είναι γιατί οι βόρειοι δεν ζούνε περισσότερο εφόσον βιώνουν το κρύο περισσότερο. Μάλιστα η μπλε ζώνη είναι πιο κοντά στον ισημερινό. Μια πρόχειρη και ίσως ανακριβής απάντηση είναι ότι δεν βιώνουν το κρύο γιατί προστατεύονται με τεχνητά μεσα. Μια καλή στατιστική προσέγγιση θα ήταν να μελετήσουμε το ποσοστό καφέ λίπους (πάντα συγκριτικά με την ηλικία και το λευκό λίπος) σε έλληνες που ζουν σε νησιά με σταθερά καλό καιρό, και σε έλληνες που από μικροί έχουν μεταναστεύσει σε κρύες χώρες. Όπως και το ίδιο για βόρειους που μετανάστευσαν στο νότο. Ο λόγος που η εθνικότητα πρέπει να είναι ίδια είναι για να περιοριστούν πιθανοί γενετικοί παράγοντες. Θα μπορούσε βέβαια το BAT να μην παίζει ρόλο στην γήρανση, όμως είναι μια καλή και αρκετά unbiased ένδειξη.
  - γ) Να χρησιμοποιηθούν τα ICE (induced changes in the epigenome) πειραματόζωα και να γίνουν προσπάθειες να μετριάσει η βλάβη με τους stressors που αναλύθηκε, συγκρίνοντας τους, ώστε να ποσοτικοποιηθεί την επιρροή τους.
- 2) Λεπτίνη και Ghrelin. Σε άτομα υπό 24h fasting, η συγκέντρωση της ghrelin δεν επηρεάστηκε από τις συγκεντρώσεις ινσουλίνης και γλυκόζης και εμφάνισε το κλασικό κερκαδικό της μοτίβο με παλμικές εκκρίσεις ([Nataluchi, 2005](#)). Αντίθετα η λεπτίνη παρατηρούμενη σε 72h fasting που όμως τα επίπεδα γλυκόζης - ινσουλίνης στο πλάσμα ήταν ελεγχόμενα, δεν είχε περιοδικότητα αλλά εξάρτηση από την ινσουλίνη ([Boden, 1996](#)). Ωστόσο και οι δυο ορμόνες έχουν κερκαδικό μοτίβο. Συνεπώς μία υπόθεση μου είναι ότι επειδή ξέρουν το πρόγραμμά μας ή μάλλον αυτές το φτιάχνουν, ξέρουν πότε θα κοιμηθούμε και τι ώρα θα φάμε. Υποθέτω πως πριν ξεκινήσει το γεύμα, δηλαδή ταυτόχρονα με την αύξηση της [ghrelin] ο οργανισμός πρέπει να προσαρμόσει τις λειτουργίες του στις συνθήκες που περιμένει πως θα ακολουθήσουν, το ίδιο και για την

λεπτίνη. Αυτό μπορούμε να το δούμε και μακροσκοπικά, αν σκεφτούμε ότι για το γεύμα θέλουμε να λειτουργήσει το γαστρεντερικό (παρασυμπαθητικό), μειώνοντας τον μεταβολισμό στους άλλους ιστούς, και μετά από αυτό (εφόσον γίνει η χώνεψη) το γαστρεντερικό εξασθενεί και αυξάνεται η λειτουργία στα άλλα όργανα (συμπαθητικό) ώστε ο άνθρωπος να κάνει σωματικές δραστηριότητες. Η επιστημονική κοινότητα έχει μια πιο λογική ερμηνεία. Καταρχάς η ghrelin ρίχνει τον μεταβολισμό για να μην σπαταληθεί παραπάνω ενέργεια. Η λιπογένεση δεν είναι προσπάθεια αναβολισμού. Όπως η λεπτίνη προκαλεί FAO για να μειώσει την λιποτοξικότητα και να αυξήσει την ενέργεια - μεταβολισμό, έτσι και η ghrelin με την λιπογένεση αποτρέπει την συσσώρευση FA και παράλληλα αποθηκεύει ενέργεια για μελλοντική χρήση δεδομένου ότι τώρα ρίχνει τον μεταβολισμό. Είναι δηλαδή μέθοδος επιβίωσης.

- 3) Η αυτοφαγία είναι ένας ανεπαρκώς κατανοητός μηχανισμός (Yin, 2016). Χωρίζεται σε πολύ επιλεκτική και ελάχιστα επιλεκτική αυτοφαγία. Η δεύτερη ενεργοποιείται όταν το κύτταρο βρίσκεται σε επίπεδα θερμιδικού, αμινοξικικού ή αζωτικού, ελλείμματος, και πιστεύεται ότι δεν κάνει ιδιαίτερη διάκριση στα μακρομόρια που καταβολίζει. Σκοπός της ειδικής είναι η λύση προβληματικών και πλεονασματικών μακρομορίων ώστε να μην συσσωρευτούν και να γίνουν κυτταροτοξικά. Είναι μια μέθοδος συντήρησης και διασφάλισης ποιότητας για τις κυτταρικές διαδικασίες, κάτι που έχει μεγάλη σημασία στα μεταμιτωτικά κύτταρα όπως οι νευρώνες και το μυοκάρδιο. Παθήσεις όπως το Alzheimer είναι και αποτέλεσμα ανεπαρκούς αυτοφαγίας. Κάποια γνωστά παραδείγματα ειδικής αυτοφαγίας είναι η μιτοφαγία και η λιποφαγία (FAs). Πολύ απλοποιημένα, η διαδικασία μοιάζει με την ενδοκύττωση. Το γνωστό μας γονίδιο ATG (ρυθμιστής της αυτοφαγίας, καταστέλλεται από την οδό mTOR) μαζί με άλλες πρωτεΐνες δημιουργούν ένα σύμπλοκο που μαζεύει τα μακρομόρια, που αν είναι επιλεκτική διαδικασία έχει υποδοχείς για προσδέτες τον μακρομορίων στόχων, και ξεκινάει να δημιουργείται μια διπλή μεμβράνη (φαγοφόρο) που οδηγεί την κύστη στα λυσοσώματα όπου διαλύονται από πρωτεάσες υδρολάσες και άλλα ένζυμα. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται μακρο-αυτοφαγία, ενώ υπάρχουν και άλλες μορφές αυτοφαγίας που είναι λιγότερο μελετημένες, μικρο - αυτοφαγία, η Chaperone Mediated Autophagy που έχει προαναφερθεί και η κρινοφαγία που είναι η πιο άγνωστη και ανακυκλώνει κυστίδια που ήταν προς έκκριση - εξοκύττωση. Η αυτοφαγία έχει και ρόλο στην κυτταρική διαφοροποίηση και την εμβρυογένεση. Ένα παράδειγμα είναι στην ερυθροποίηση όταν παράγονται ερυθροβλάστες από ερυθροκύτταρα. Οι ερυθροβλάστες έχουν πολλά οργανίδια που δεν χρειάζονται τα ερυθροκύτταρα και άρα μεταβολίζονται. Επίσης, το ζυγωτό πολλαπλασιάζεται σε 8 πανομοιότυπα κύτταρα, και για να σταματήσει αυτό και να αρχίσει η διαφοροποίηση πρέπει καταναλώνονται διαφορετικά κάποιοι μεταγραφικοί παράγοντες. Ομοίως κατά την γονιμοποίηση, τα μιτοχόνδρια του σπερματοζωαρίου καταναλώνονται ώστε να μην υπάρχουν μιτοχόνδρια με διαφορετικό dna. Η αυτοφαγία έχει και άμεση σχέση με την απόπτωση. Αρχικά καταστέλλει την απόπτωση προσπαθώντας να διορθώσει το πρόβλημα του κυττάρου. Αν αποτύχει, τότε ξεκινάει η απόπτωση, με τον μηχανισμό. Η σχέση αυτή πάντως δεν είναι ξεκάθαρη και ποικίλει μεταξύ ιστών. Φυσικά η αυτοφαγία μπορεί να προκαλέσει τον κυτταρικό θάνατο τύπου 2 ή αλλιώς αύτωση, μια μη αποπτωτική και μη

νεκρωτική οδό που ρυθμίζεται από την αντλία NA/K (Liu, 2014). Αν και πολύ το βλέπουν με κακό μάτι, μπορεί να είναι χρήσιμο, αρκεί να έχει ειδικότητα, όπως έχει στον καρκίνο (υποξία). Αντίθετα υπάρχει η πιθανότητα αυτό να μην είναι μηχανισμός κυτταρικού θανάτου, αλλά η τελευταία προσπάθεια του κυττάρου να επιβιώσει, ρίχνοντας όλα του τα χαρτιά στην μάχη, και η αλήθεια είναι ότι βιολογικά είναι πολύ πιθανό. Είναι γνωστό ότι μπορεί να προκληθεί από ακραίο ενεργειακό έλλειμμα στο κύτταρο, από υποξία, από τα ένζυμα που προκαλούν αυτοφαγία. Επίσης φαίνεται πως βοηθάει στον θάνατο κατά την φερόπτωση, δηλαδή την συσσώρευση οξειδωμένων φωσφολιπιδίων, που εξαρτάται από τα κατιόντα σιδήρου. Πολλά από αυτά κρύβουν πληροφορίες για την γήρανση και την αντιγήρανση. Θα πρέπει να ελεγχθεί αν η αυτοφαγία προκαλείται κατά την μερική αποδιαφοροποίηση (yamanaka). Επίσης πρέπει να εξεταστεί αν σε συνθήκες μεγάλης αφαγίας, ο οργανισμός προκάλει διαφορική αύτωση μεταξύ των κυττάρων ή αν χρησιμοποιεί τα φαγοκύτταρα. Ενώ σίγουρα θα υπάρχει διαφορά μεταξύ ιστών το θέμα είναι πως γίνεται η επιλογή. Είναι απλά ο πιο αιματωμένος ιστός που επιβιώνει; Έχει προτεραιότητα η ζωτικότητα; Μήπως αναγνωρίζει τον προβληματικό ιστό (senescent, cancer), και σε ποιο στάδιο γίνεται;

- 4) Αν η απουσία των σιρτουινών είναι το πρόβλημα θα έπρεπε να λύνεται όταν επανέρχονται ή όταν περισσεύουν, κάτι που δεν συμβαίνει. Μήπως ο θόρυβος προκύπτει κατά τις επαναλαμβανόμενες επιστροφές; Αν παρέμεναν στην θέση τους, θα σταμάταγε ο θόρυβος; Αν και αυτό δεν γίνεται γιατί έχουν και άλλες λειτουργίες, ο μόνος λόγος να προκύπτει πάλι θόρυβος είναι η αιτία του θορύβου να είναι και άλλη. Θα μπορούσε ένα ηλεκτρομαγνητικό κύμα να μετατοπίσει την ετεροχρωματίνη ή να την διεγείρει σε ένα σημείο; Ίσως ένα φορτισμένο μόριο στο κύτταρο να κάνει το ίδιο. Τότε πως εξηγείται ότι στα ποντίκια που έπαιρναν NMN, παρατηρήθηκε βελτίωση στο Horvath clock; Τελικά όμως υπέκυψαν στην αύξηση επιγενετικού θορύβου. Μπορεί αυτό να σημαίνει ότι υπάρχει πλατό; Στην συνέχεια αναλύονται τα πιο πιθανά ενδεχόμενα για να γίνει απόπειρα να σχεδιαστεί ένα απλοποιημένο μοντέλο.

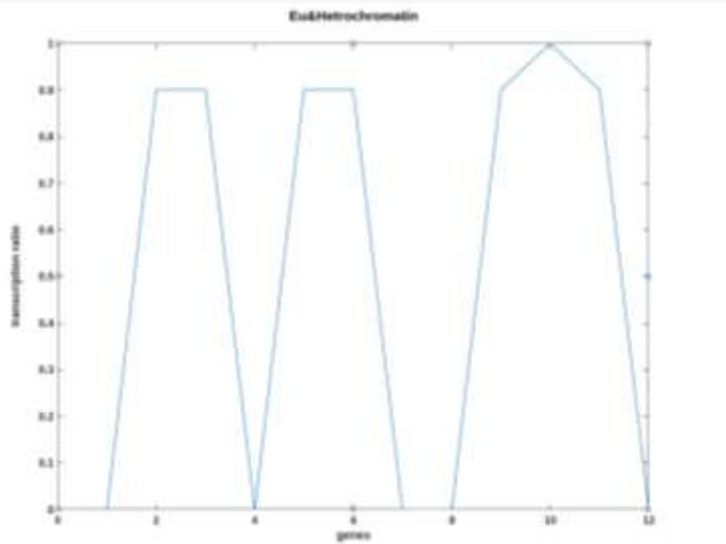
Η απουσία των σιρτουινών χαλάει την ετεροχρωματίνη. Εδώ βοηθάει η Hormesis και τα φάρμακα που αναφέρθηκαν. Με την επαναφορά (η οποία γίνεται πιο σπάνια με τα χρόνια) διορθώνεται η ετεροχρωματίνη όμως με πιθανά λάθη. Τα λάθη αυτά συσσορεύονται με τον χρόνο προκαλώντας επιγενετικό θόρυβο. Η hormesis το NAD<sup>+</sup> και τα υπόλοιπα, δεν γίνεται άμεσα να διορθώσουν αυτόν τον θόρυβο και για αυτό μπορεί να παρατηρείται αυτό το plateau. Εκτός αν βοηθούν στην αυτοφαγία προβληματικών ιστών και ενζύμων που επηρεάζουν την δομή του νουκλεοσώματος, όμως αυτό μοιάζει απίθανο ενδεχόμενο. Ας προσομοιάσω καταρχάς το νουκλεόσωμα. MATLAB

```
x=10; chrom=[1:x]; %Suppose we have a chromosome with x genes
epig=round(rand(1,x)); %Setting an epigenome tag for every gene
% Some genes are muted. I set them randomly as i have examine no specific cell
%plot(chrom,epig,'*'); % a perfect binary on/off activation
% but the system isn't binary. There is some grey zone between %eu/hetero-
chromatin
epig=[ 0 epig 0]; %telomeres
L=length(epig);
```

```

for i = 1 : L
    if epig(i)==0
        nbr(i)=-0.1; %reduction due to heterochromatin in proximity
    end
end
b4=[0 nbr(1:L-1)];
aftr=[nbr(2:L) 0];
epig2=epig+b4+aftr;
epig2=max(zeros(1,L),epig2);
plot(epig2)

```



εικόνα 5, αναπαράσταση της χρωματίνης με διαφορετική λογική από το on/off, γιατί κάποια σημεία είναι πιο ανοιγμένα από άλλα, όπως ένας κόμπος μπορεί να είναι από πολύ σφιχτός μέχρι εντελώς λυμένος, με όλα τα ενδιάμεσα στάδια δυνατά. Για αυτό ο θόρυβος δεν είναι δυαδικός αλλά μπορεί να έχει την λογική της χάλασης.

Συνολικά στο κύτταρο κατά την γήρανση παρατηρείται υπομεθυλίωση και γενικά λιγότερη ετεροχρωματίνη. Μια ερμηνεία είναι η απουσία των ενζύμων που καθορίζουν την δομή των ιστόνων. Ένας λόγος απουσίας μπορεί να είναι η γονιδιακή βλάβη.

```

dsb=round(rand-0.45) %there is a small possibility that a dsb will occur
sirt=[4 7]; %suppose those are two deacetylation locis
if dsb==1
    epig2(sirt(1))=1; epig2(sirt(7))=1;
end

```

Κατά την επιστροφή όμως μπορεί να βρεθούν σε λάθος θέση. Υπάρχουν δυο πιθανοί τρόποι, το ένζυμο να πηγαίνει σε εντελώς άλλη θέση, ή να πηγαίνει στην ίδια θέση αλλά με μικρή απόκλιση. Για να ισχύει το δεύτερο ο θόρυβος δεν μπορεί να είναι τυχαίος γιατί αυτό θα σήμαινε ότι είναι ισοπίθανος και προς τις δύο κατευθύνσεις. Πρέπει να έχει πρόσημο - φορά, για αυτό και φαίνεται παράλογο. Μια εξήγηση πάντως θα ήταν ότι για να βρει την θέση του διαβάζει το dna ή την χρωματίνη με μια standard κατεύθυνση, και κάθε φορά αργεί να φρενάρει. Την επόμενη φορά αναζητά την αλληλουχία στην οποία



έμεινε πριν. Αυτό όμως και πάλι θα είχε ξεκάθαρο μοτίβο, κάτι που δεν παρατηρείται καθώς οι επιγενετικές αλλαγές ποικίλουν από κύτταρο σε κύτταρο ακόμη και του ίδιου ιστού. Για αυτό το επόμενο μου [μουντέλο](#) θα σχεδιαστεί με ψηφιακό θόρυβο. Μια ιδέα είναι κατά την απουσία των ενζύμων να προκαλούνται αλλαγές στην περιοχή, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να προσδεθούν κατά την επιστροφή. Αυτό μάλιστα φαίνεται πιο πιθανό δεδομένου ότι και η λυσίνη στην ουρά του ιστόνα και το dna μένουν ελεύθερα και μπορεί να αλληλεπιδράσουν με άλλα μακρομόρια. Με την ίδια λογική το επιγονιδίωμα θα άλλαζε όταν απουσιάζουν τα ένζυμα και το κύτταρο ξεκινήσει μίτωση. Φυσικά η απουσία τους συνεπάγεται γονιδιακή βλάβη και υπάρχουν μηχανισμοί που αποτρέπουν την αντιγραφή όπως στην μαγιά όπου απουσία της Sir2 σταματάει την αναπαραγωγή. Έχουν αναφερθεί και πρωτεΐνες που προκαλούν διακοπή του κυτταρικού κύκλου ως απόκριση στην γονιδιακή βλάβη (p53), όμως δεν είναι καθόλου απίθανο σπάνια να προκύπτουν δυσλειτουργίες. Ίσως με το θερμιδικό πλεόνασμα και την υπερέκφραση του mTOR να παραβλέπονται αρχικά μικρές βλάβες, που όμως επαρκούν για να απασχολήσουν τα ένζυμα. Αυτό θα εξηγούσε και γιατί η CR και οι άλλοι stressors είναι ωφέλιμοι.

Τέλος, αξίζει να εξεταστεί η πιθανότητα θορύβου από ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Πρέπει να απαντηθούν 2 ερωτήματα, μπορεί ο δεσμός του μεθυλίου CH<sub>3</sub>-R να σπάσει από φωτόνιο ενέργειας ίση με την ενέργεια του δεσμού. Φυσικά και μπορεί. Όμως πόσο πιθανό είναι; Αυτό εξαρτάται από την ένταση αυτού του μήκους κύματος στο περιβάλλον.

Κατα προσέγγιση ο δεσμός άνθρακα - άνθρακα είναι 347KJ/mol

Διαιρώντας με τον NA  $6.022 \times 10^{23} = 5.76 \times 10^{-19}$  Joule

$$E=hf \rightarrow E=h \cdot c / \lambda \rightarrow \lambda = h \cdot c / E = 6.626 \cdot 10^{-34} \text{ (J}\cdot\text{s)} \cdot 3 \cdot 10^8 \text{ (m/s)} / 5.76 \cdot 10^{-19} \text{ J} \\ = (6.626 \cdot 3 / 5.76) \cdot 10^{(19+8-34)} \text{ (m)} = \sim 3.451 \cdot 10^{-7} \text{ m} = 345,1 \text{ nm} = \text{uv}$$

Ξέρουμε ότι αυτή η ακτινοβολία είναι επικίνδυνη γιατί μπορεί να προκαλέσει γενετική βλάβη. Μήπως όμως προκαλεί και επιγενετική βλάβη;

Η πιθανότητα μάλλον μικραίνει λόγω επιδιορθωτικών μηχανισμών. Άλλη πιθανή αιτία αφαίρεσης του μεθυλίου είναι η οξειδωση, όπως δηλαδή κάνει και φυσιολογικά το κύτταρο [TET](#). Δεν ξέρω όμως κατα πόσο μπορούν να βρεθούν οξειδωτικά μέσα στον πυρήνα, ούτε αν η ενέργεια ενεργοποίησης της οξειδωσης του CH<sub>3</sub> είναι αρκετά χαμηλή. Πάντως είναι άλλο ένα σημείο που αξίζει μελέτη.

- 5) Μια ακόμα πιο ακραία ιδέα θα ήταν ότι τα φυτά ελέγχουν τους ετερότροφους οργανισμούς με αυτές τις ενώσεις ώστε να διατηρείται μια περιβαλλοντολογική ισορροπία. Σε συνθήκες χαμηλής παραγωγής μπορεί να δίνουν σήμα στους άλλους οργανισμούς να μην υπερτραφούν και να ριξουν τον μεταβολισμό τους ώστε να μην καταστρέψουν ολόκληρη την πανίδα, προστατεύοντας το οικοσύστημα.
- 6) Πώς γίνεται να αφαιρούνται τα tags μεθυλίου που αντιστοιχούν σε θόρυβο. Η πρόταση της διπλωματικής αυτής είναι άλλη. Αφαιρεί τυχαία, καθαρά εντροπικά, όσα tags προλαβαίνει καθώς ο σκοπός των παραγόντων είναι να προκαλέσουν αποδιαφοροποίηση. Αν έχει σειρά αυτή μπορεί να είναι χωροταξική ή να καθορίζεται από κάποια εναρκτήρια σημεία όπως αυτά της αντιγραφής. Θα μπορούσε επίσης να αφαιρεί με σειρά τέτοια ώστε να πηγαίνει ένα στάδιο πριν την διαφοροποίηση, κατευθυνόμενο προς βλαστοκύτταρο που σταδιακά

γίνεται ολοδύναμο. Αν γίνεται αυτό, τότε δυστυχώς κάθε φορά αφαιρούνται τα ίδια μεθύλια, με αποτέλεσμα να υπάρχουν κάποια στα οποία ο θόρυβος συσσωρεύεται παρά τις θεραπείες, εκτός αν ο [θόρυβος δεν είναι ισοπίθανος](#). Το άλλο ερώτημα είναι πως τελικά κάνει τις σωστές μεθυλίώσεις; Εδώ προτείνεται πιο απλή απάντηση, όπως συμβαίνει και φυσιολογικά όταν ένα λιγότερο διαφοροποιημένο κύτταρο διαφοροποιείται (που βέβαια είναι ένας μηχανισμός που δεν κατανοείται ακόμα επαρκώς). Δηλαδή με τους μεταγραφικούς παράγοντες και με σήματα από τα γειτονικά κύτταρα (internal and external cues). Ωστόσο, πρέπει να γίνει ένα πείραμα και να απαντήσει με ποιά σειρά γίνεται η απομεθυλίωση; Επίσης πρέπει να καταλάβουμε καλύτερα την διαδικασία της διαφοροποίησης μελετώντας την εμβρυογένεση. Αν το πείραμα δείξει τυχαία αφαίρεση, είναι καλά νέα. Αν αφαιρεί μόνο τα λάθος tags ακόμη καλύτερα, αν και θα σημαίνει ότι οι προτάσεις της εργασίας αυτής είναι εσφαλμένες. Αν έχει όμως σειρά, αυτή υποθέτω θα είναι είτε χωροταξική, είτε με βάση το επίπεδο της διαφοροποίησης. Τέλος υπενθυμίζω ότι βασικό επιγενετικό πρόβλημα είναι η υπομεθυλίωση. Οι OSK προκαλούν ακόμη μεγαλύτερη υπομεθυλίωση. Ίσως υπάρχει ένα κατώφλι που το κύτταρο αναγνωρίζει ότι έχει υπομεθυλωθεί και ξεκινάει τους μηχανισμούς μεθυλίωσης.

Η διαφοροποίηση θα παρομοιαστεί με τους δυαδικούς αριθμούς. Θέτω 8 ψηφία. Ένα ESC θα είναι 00000000. Έστω ότι τα MSCs είναι 00010000. Τότε οι οστεοβλάστες πχ που προήλθαν από αυτά θα πρέπει να κρατήσουν την βάση 0001 \_ \_ \_ \_ προσθέτοντας λεπτομέρειες, έστω 00010010, και τα οστεοκύτταρα θα πρέπει να είναι 00010011. Ομως που θα εισαχθεί ο επιγενετικός θόρυβος; Θεωρώ πως δεν είναι ισοπίθανα όλα τα ψηφία. Τα λάθη θα εμφανίζονται στις περιοχές που εκφράζονται περισσότερο ή μάλλον αυτές που έχουν την περισσότερη κινητικότητα μακρομορίων. Για παράδειγμα αν η ετεροχρωματινή 000 \_ \_ \_ \_ \_ , δεν επηρεάζεται από όσα συμβαίνουν στο κύτταρο, και παραμένει σταθερή, τότε δεν θα αποκτήσει και θόρυβο (βέβαια εξηγηθεί ότι μπορεί να μην παραμένει αν τα ένζυμα της καλούνται σε άλλες αποστολές). Για να χαλάσει ο δίσκος βινυλίου θα πρέπει να τον παίξεις πολλές φορές, αν είναι στο ράφι προστατευμένος θα παραμένει καινούργιος. Ίσως κατά την μίτωση να μπορεί να προκληθεί θόρυβος. Πάντως σίγουρα δεν είναι εντελώς τυχαίος γιατί έχουν παρατηρηθεί κάποια μοτίβα ([Sinclair, 2019](#)) που όμως δεν είναι standard ούτε σε κύτταρα του ίδιου ιστού. Με βάση κάποιες από τις υποθέσεις αυτές, σχεδιάστηκε άλλο ένα απλοποιημένο μοντέλο.

```

oc=[0 0 0 1 0 0 1 1]; %osteocyte epigenome
ob=[0 0 0 1 0 0 1 0]; %osteoblast epig
ms=[0 0 0 1 0 0 0 0]; %mesenchymal SC epig
%Suppose a post mitotic cell & the 4 significant bits are immune to noise
j=find(oc==1,4); s=0;
for i=5:8 %Simulation of the enzymes returning to their genes
    p=rand %with small possibility of mistake
    if p<0.5 && oc(i)==0 %It needs to be a silenced loci
        s=s+1; J=j(s);
        if s<=length(j); % Conservation of the total 0/1 ratio
            oc(i)= 1; oc(J)=0;% That's not the case though in aging
        end %but it is for this swapping way
    end
end
end

```

Εφαρμόζοντας yamanaka factors με ποια σειρά θα αφαιρέσουν τον θόρυβο που προστέθηκε;

```
%a completely random way of demethylation
```

```
osk=round(rand*(8));
```

```
oc(osk)=NaN;
```

Αφαίρεση ώστε να προκύει σταδιακή αποδιαφοροποίηση

```
%progressive dedifferentiation
```

```
osk=ob-osk;
```

```
oc2ob=oc+osk;
```

```
osk=ms-ob;
```

```
ob2ms=ob+osk;
```

Κανονικά βέβαια το μοντέλο πρέπει να είναι δυναμικό. Αυτά δεν γίνονται ακαριαία, άρα τι γίνεται άμα οι OSK σταματήσουν πριν φτάσουμε στο στάδιο της 1ης αποδιαφοροποίησης.

```
for i=1:10
```

```
    oc(8)=oc(8)-0.1; %lets say that there are 10 demethylations needed for the change
```

```
    x=input('OSK on or off;');
```

```
    if x==0; break; end; %checking if there is still [OSK]
```

```
end
```

```
oc(8)=round(oc(8)) % maybe there is a threshold that decides if the cell will change (more demethylations) or remethylate
```

Τελευταία εκδοχή, να απομεθυλιώνει ξεκινώντας από συγκεκριμένα σημεία

```
x=1; ip1=7; ip2=5; %initial points
```

```
while ip1<9 && x||0
```

```
    oc(ip1)=NaN; oc(ip2)=NaN;
```

```
    x=input('OSK availability;');
```

```
    ip1=ip1+1; ip2=ip2+1;
```

```
end
```

Τέλος, πώς γίνεται η επαναμεθυλίωση; Όπως βλέπετε έχει γίνει overwrite στην μεταβλητή OSK, και το ίδιο κάνει και το κύτταρο. Άραγε υπάρχει αντίγραφο ασφαλείας, όπως προτείνει ο Sinclair; Αν ίσχυε η πρόταση ότι παίρνει την πληροφορία από γειτονικά κύτταρα, τότε αν το απομονώσουμε δεν θα μπορεί να κάνει τις σωστές μεθυλίώσεις. Αντίθετα, θα μπορούσε να γίνει σύμφωνα με την λογική του [κατώφλιου](#). Αν προκληθεί πλήρης αποδιαφοροποίηση, τότε δεν ξέρει πως να γίνει πάλι το είδος που ήταν. Μπορεί να γίνει με τον κλασικό τρόπο που όμως προϋποθέτει επικοινωνία με άλλα κύτταρα και μεταγραφικούς παράγοντες που ναι μεν προϋπήρχαν στο διαφοροποιημένο κύτταρο αν δεν έχουν αποσυνδεθεί, αλλά συντελούσαν ένα προβληματικό επιγονιδίωμα. Αν προκαλέσουμε αλλαγή μικρότερη από το κατώφλι, τότε το κύτταρο έχει την πληροφορία για το είδος του και αναγνωρίζει με κάποιον μηχανισμό ότι είναι υπομεθυλιωμένο, με αποτέλεσμα να ζητάει την πληροφορία από το dna (backup data, digital form, less noise) για την μεταγραφή και μετά την μετάφραση των σωστών παραγόντων, σχεδόν των ίδιων που προέκυψαν και κατά την εμβρυογένεση. Αν δεν είναι στο dna, τότε μπορεί να υπάρχει σε ένα master epigenome mark, δηλαδή σε ένα tag στο οποίο βασίζονται οι μεθυλοτρανσφεράσες για να βάλουν πολλά κατώτερα (με βάση την διαφοροποίηση) tags. Τελευταία ιδέα, η υπερβολική υπομεθυλίωση μπορεί να προκαλεί υπερέκφραση των ενζύμων, όπως οι σιρτουίνες και οι μεθυλοτρανσφεράσες και κατα συνέπεια να καλύπτονται τα κενά που δημιούργησε η απουσία

τους, εαν τελικά αυτή είναι η πηγή της επιγενετικής αλλαγής. Επειδή όμως δεν διορθώνεται η γενετική βλάβη, τελικά θα ξαναδημιουργηθεί το πρόβλημα, όπως και παρατηρείται. Άλλωστε, σε κύτταρα με έντονη γενετική βλάβη, όπως σε αυτά της επιδερμίδας, δεν λειτουργούν καθόλου οι OSK. Πάντως η υπερέκφραση των ενζύμων είναι δεδομένη και η πειραματική επιβεβαίωση του δεν θα επιβεβαίωνε την θεωρία αυτή.

Μπορεί η απάντηση να είναι αποτέλεσμα συνδυασμού κάποιων από αυτά (master tag, maintenance protein, information stored in dna). Για την ώρα σχεδιάστηκε η ιδέα του master methyl tag:

```
mem=[1 0 1 0 1]; %5 master epigenome marks
%normally the downstream marks would have been
n=[1 0 1 0 1; % mem
    1 0 1 0 1 %same as their master tag
    0 0 0 0 1]; %but noise could have messed them
% but osk treatment removed the downstream tags
n=[1 0 1 0 1
    0 0 1 0 1 %removed some tags
    0 0 0 0 0];
s=sum(n);
for i = 1:5
    if n(1,i)==1 & s(i)>1 %threshold for remethylation initiation
        n(:,i)=n(1,i);
    end
end
```

- 7) Ο ρυθμός με τον οποίο θα μεταβληθεί η  $[O_2]$  στο αίμα εξαρτάται από τις μερικές πιέσεις του και μία σταθερά διάχυσης για το οξυγόνο από τον αέρα προς το αίμα, που δείχνει πόσο  $O_2$  μπαίνει ανά μονάδα χρόνου.

$$\Delta C_{O_2 \text{ blood}} = s \cdot \left( \frac{P_{O_{air}}}{P_{O_{blood}}} - 1 \right) \cdot \delta t$$

Όταν σταματήσει η HBOT το s δεν θα είναι ίδιο γιατί η διάχυση από το υγρό διάλυμα στο αέριο είναι πολύ πιο αργή.

Ο λόγος αύξησης των ROS  $r=[ROS]_{\text{μετά}}/[ROS]_{\text{πριν}}$  είναι αρχικά ίδιος με τον αυτόν του οξυγόνου, δεδομένου ότι οι άλλες συνθήκες χημικής ισορροπίας είναι σταθερές, και έπειτα θα μειώνεται από τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Ο ρυθμός μείωσης τους όταν θα σταματήσει η υπεροξεία είναι ανάλογος του χρόνου ημιζώης τους ( $\ln 2/m$ ), και της ενεργότητας των αντιοξειδωτικών ( $\alpha$ ) που λογικά δεν είναι σταθερή.

$$r_{ROS} = r_{O_2 \text{ blood}} - a \cdot [\text{antioxidants}] - [ROS] \cdot (1 - e^{-m \cdot \delta t})$$

Ο ρυθμός αύξησης της συγκέντρωσης των αντιοξειδωτικών ενζύμων υποθέτω πως δεν θα έχει αναλογική σχέση με τα ROS αλλά λογική κατωφλίου, που όταν ξεπεραστεί το κύτταρο θα ξεκινήσει άμεσα πρωτεϊνοσύνθεση. Αρχικά ο ρυθμός θα είναι μικρός λόγω περιορισμένων

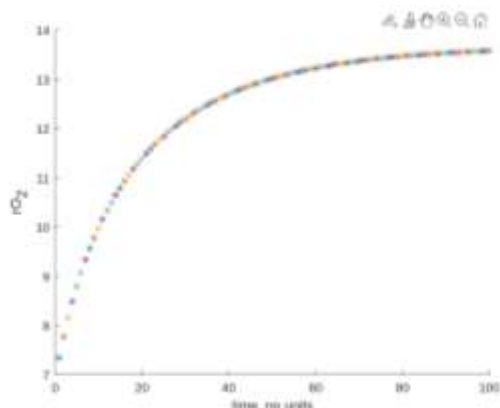
mRNAs και ριβοσωμάτων, μετά θα φτάσει στο μέγιστο και όταν αναδραστικά καταλάβει ότι υπάρχει μεγάλη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών θα σταματήσει η παραγωγή ή θα εξισορροπηθεί με την κατανάλωση. Μετά την HBOT τα ένζυμα θα μείνουν στο κύτταρο μέχρι να αποσυντεθούν ή αυτοφαγωθούν.

Η υποξική απόκριση μπορεί να προκύπτει με κάποιον από τους [μηχανισμούς](#) που εξηγήθηκαν, (NO, overshoot, οξειδωτικό stress). Το overshoot ίσως είναι εννοιολογικά λάθος και για αυτό θα δοθεί λίγο διαφορετική ερμηνεία.

Προσομοιώσεις: Ενδεικτική τιμή της μερικής πίεσης του οξυγόνου στο αίμα είναι 100mmHg, όταν στην ατμόσφαιρα είναι 160mmHg. 1atm = 760 mmHg, άρα στις 3atm με 100% O<sub>2</sub> η μερική πίεση θα είναι 2280mmHg και επειδή στο αίμα αυξάνεται ~15φορές, θα γίνει 1500mmHg.

```
POg=2280; POB=100; s=0.3; % s=diffusion index. I don't know the real value
o2=1; %that's the ratio. I examine the [o2] relatively to the initial [o2]
for t=1:10 % it doesn't refer to a unit, it just shows the progression in time
    O2=o2+(s*((POg/POB)-1)-0.2); %suppose that 0.2 is the part of O2 we consume
    POB=POB*(O2/o2); o2=O2; ros(t)=o2; %ROS increase alongside O2
    hold on; plot(t,O2, '*');
end
```

Οι τιμές δόθηκαν έτσι ώστε το plateau να εμφανίζεται περίπου στις 15 φορές περισσότερο O<sub>2</sub>, εδώ εμφανίζεται στις ~14



εικόνα 6, η [O<sub>2</sub>] στο αίμα συγκριτικά με την φυσιολογική του τιμή, ως κάποια μονάδα χρόνου, κατά την HBOT

Τίθεται ως κατώφλι ο διπλασιασμός των ROS για την σύνθεση αντιοξειδωτικών, η οποία για απλότητα θα θεωρηθεί γραμμική αύξηση.

```
find(ros>2,1); %threshold for antioxidants synthesis initiation
antox=0.2*[1:length(ros)-ans]; %0.2 is used to demonstrate the slower synthesis
%of antioxidants in comparison with oxidation that occurs instantly
zeros(1,ans); antox=[ans antox];
a=3; % the ability of x mols of antiox to reduce a*x mols of ROS
ros=ros-(a.*antox);
% half life isn't important in this face
```



Όσο υπάρχει υπεροξεία θα έχουμε και μηχανισμούς που θα προσπαθούν να την περιορίσουν, με συμπεριφορά παρόμοια με τα αντιοξειδωτικά, αν και η ποσοτικοποίηση κάτι τόσο γενικού είναι κακή τακτική. Η μεταβολή του NO δεν εξεταστεί γιατί είναι περίεργο και χρειάζονται περισσότερα δεδομένα.

Με την διακοπή της υπεροξείας, καταρχάς η [O<sub>2</sub>] θα αρχίσει την κατηφόρα. Τα ROS ακολουθούν με τα αντιοξειδωτικά να τα εξαφανίσουν πολύ εύκολα.

Για να περιορίσουν τους μηχανισμούς περιορισμού της υπεροξείας που πλέον μπορεί να δημιουργήσουν πρόβλημα, ίσως ενεργοποιούνται αντίθετοι μηχανισμοί (υποξίας). Όταν τελικά τους σταματήσουν, επειδή οι υποξικοί μηχανισμοί δεν είναι κίνδυνος για το κύτταρο, μπορεί να παραμένουν μέχρι να καταναλωθούν ή να αποσυνθεθούν.

```
P0g2=P0g/3; s2=0.05; %1 atm; s must be much lower from liquid to gas diffusion
while O2>1
    O2=o2-(s2*(P0b/P0g2))-0.2;
    P0b=P0b*(O2/o2); o2=O2;
    t=t+1; plot(t,O2, '*');
end
```

Με βάση τις τιμές που χρησιμοποιήθηκαν, η πτώση προκύπτει όχι λόγω διάχυσης, αλλά κυρίως λόγω κατανάλωσης.

Εφόσον πέφτει το οξυγόνο, τα ros θα κρατήσουν την τελευταία τιμή τους και θα εξουδετερωθούν από τα αντιοξειδωτικά. Θεωρείται πάλι ότι ο χρόνος ημιζωής τους δεν έχει τόσο μεγάλη σημασία.

```
l=length(ros); ros=ros(l); antox=antox(l);
while ros>2
    ros=ros-(a*antox);
    antox=antox+0.2; %it will grow as long as the threshold is surpassed
end
m=0.1; % decomposition of antioxidants
antox*exp(-m*[0:20]) % t->∞ antioxidants->0
```

Την ίδια λογική με τα αντιοξειδωτικά έχουν και οι μηχανισμοί που καταστέλλουν τους μηχανισμούς υπεροξείας, μόνο που αυτοί θα εμφανίζονται αποκλειστικά μετά την HBOT