

# OGRANICZENIE KALORYCZNE A PROCES STARZENIA SIĘ ORGANIZMU

## CALORIC RESTRICTION AND AGING PROCESS

Katarzyna ZGUTKA, Katarzyna PIOTROWSKA

Katedra i Zakład Fizjologii Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

*Streszczenie:* Zmniejszenie liczby spożywanych kalorii opóźnia procesy starzenia i znacznie redukuje ryzyko występowania chorób związanych z wiekiem. Liczne badania przeprowadzone na przestrzeni ostatnich lat wykazały, że restrykcja kaloryczna od 25 do 60 procent zapotrzebowania energetycznego przy jednoczesnym zachowaniu prawidłowego poziomu koniecznych dla prawidłowego funkcjonowania organizmu składników mineralnych i witamin znacznie zwiększyła długość jak i poprawiała jakość życia wielu gatunków zwierząt. W niniejszej pracy omówiono restrykcję kaloryczną w aspekcie mechanizmów molekularnych związanych ze starzeniem się organizmu.

*Słowa kluczowe:* restrykcja kaloryczna, starzenie się, teorie i mechanizmy starzenia się organizmu

*Summery:* Reducing the number of calories inhibits premature aging and significantly reduces the risk of age-related diseases. Numerous studies conducted over many years have shown that caloric restriction, from 25 to 60 percent of energy demands while maintaining the proper level of minerals and vitamins necessary for the proper functioning of the body, significantly increased length and improved the quality of life of many animal species. In this paper, we focused on caloric restriction in terms of the molecular mechanisms related to aging of the organism.

*Keywords:* caloric restriction, aging, theories and mechanisms of aging

## WSTĘP

Proces starzenia jest zjawiskiem plastycznym [27]. Wpływa na niego wiele czynników m.in. niestabilność genomu, zmiany epigenetyczne, dysfunkcja mitochondriów, starzenie komórek, wyczerpanie puli komórek macierzystych, czy chociażby zmiany w sygnalizacji międzykomórkowej [10, 21, 52]. Uważa się,

również, że wiele tzw. nutraceutyków, czyli składników pożywienia pochodzenia naturalnego, poprzez swoje działanie antyoksydacyjne i przeciwzapalne może modyfikować proces starzenia a tym samym opóźniać rozwój chorób wieku podeszłego [1]. Liczne doniesienia literaturowe poświadczają także, że ograniczenie kalorii (CR) jest obecnie jedyną niegenetyczną interwencją mającą na celu opóźnienie postępu starzenia i rozwój chorób przewlekłych związanych z wiekiem [35].

Zgodnie z definicją restrykcję kaloryczną (ang. *caloric restriction*, CR/ ang. *dietary restrictin*, DR) rozumiemy jako dietę, w której znacząco zmniejsza się wartość energetyczną pożywienia (od 30 do 60% dziennego zalecanego spożycia) ale dostarczane są wszystkie niezbędne mikro- i makroelementy, witaminy oraz inne składniki odżywcze [7]. Niektórzy badacze wykorzystując do badań modele zwierzęce stosują tzw. łagodną restrykcję kaloryczną ok. 10-15%, która również przynosi znaczne efekty [3, 26, 50]. Pierwsze doniesienia poświadczające znaczący wpływ ograniczenia kalorycznego na długość i jakość życia pochodzą już z 1935 roku, kiedy to McCay wraz ze współpracownikami zaobserwowali, że szczury poddane restrykcji kalorycznej żyją dłużej niż zwierzęta otrzymujące zalecaną dzienną dawkę pożywienia [54]. Wyniki tego doświadczenia miały przełomowe znaczenie w gerontologii i wyznaczyły nowy kierunek badań nad procesami starzenia. Od tego czasu podobne obserwacje poczyniono w stosunku do wielu różnych gatunków m.in. drożdży, robaków, ryb, myszy, szczurów i małp [9, 22, 26, 27, 30]. Zaobserwowano, że organizmy te nie tylko żyją dłużej, ale dłużej zachowują pełną aktywność.

U ludzi ocena wpływu ograniczenia kalorycznego jest dość trudna głównie z technicznego punktu widzenia. Dotyczy to przede wszystkim długoterminowości tego typu eksperymentów, przesłanek bioetycznych i kosztów. Pozostają zatem historyczne obserwacje, które poczyniono na przestrzeni lat. Wśród tych rozlicznych doniesień na plan pierwszy wysuwa się przykład mieszkańców japońskiej wyspy Okinawy, który od wielu lat fascynuje naukowców. Na podstawie obszernej analizy sporządzonej w latach 70 Kagawa odnotował, że na wyspie tej żyło najwięcej na świecie stulatków, na każde 100 tys. przypadało ich ok. 50 podczas gdy w krajach wysoko uprzemysłowionych było ich 10-20 [59]. W 2006 roku wśród 1,3 mln. mieszkańców żyło 740 stulatków w tym 90% stanowiły kobiety. Mieszkańcy Okinawy oprócz tego, że żyli dłużej to dodatkowo wykazywali zwiększoną jak na swój wiek sprawność fizyczną [59, 60]. Liczba zgonów na skutek udarów, nowotworów i chorób serca była w tej populacji o 35% niższa, a liczba zgonów osób w wieku 60-64 lat o połowę mniejsza niż na innych wyspach Japonii. Kagawa powiązał obserwowany stan rzeczy z ograniczeniem kalorycznym jakiego poddawani są mieszkańcy Okinawy już od wczesnych lat swojego życia. Ilość kalorii jaką przyjmowały dzieci w wieku szkolnym to 62% dziennej, zalecanej dawki. Dorośli natomiast spożywali o 40% mniej kalorii w stosunku do mieszkańców USA [22, 59]. W badaniach trwających ponad 25 lat, w które zaangażował się

również rząd Japonii, przebadano ludzi powyżej 70 roku życia w tym ponad 900 stulatków. Stwierdzono brak wyraźnych zaburzeń sprawności fizycznej, osoby poddane badaniu odznaczały się szczupłą sylwetką, miały drożne tętnice a tylko w nielicznych przypadkach odnotowano choroby serca czy nowotwory. Dodatkowa analiza uwzględniająca aspekt genetyczny i klimatyczny przeprowadzona przez grupę prof. Suzuki nie wykazała żadnego nietypowego genu występującego tylko w populacji żyjącej na Okinawie, ani niezwykłego składnika mikroklimatu [60]. Przedstawione powyżej dane dotyczyły osób starszych należących do tak zwanego pokolenia powojennego. Niestety, ostatnimi czasy pojawiły się doniesienia świadczące o tym, że Okinawa traci swój wysoki wskaźnik długowieczności. Zadaniem naukowców jest to głównie wynikiem „westernizacji” diety obecnego pokolenia [19].

Kontrolowane badania wpływu restrykcji kalorycznej z udziałem ludzi są nowością a czas ich przeprowadzania jest znacznie ograniczony (maksymalnie 2 lata) [28]. Trudno na ich podstawie określić wpływ restrykcji na długowieczność czy przeżywalność ludzi.

W 1991 roku przeprowadzono eksperyment ekologicznego pod nazwą Biosfera, który jako pierwszy pokazał wpływ restrykcji kalorycznej na niektóre parametry fizjologiczne człowieka. Biosfera była zamkniętym, odizolowanym obszarem, w którym umieszczono 8 osób (cztery kobiety i czterech mężczyzn) na okres 2 lat. W wyniku nieoczekiwanych problemów, które pojawiły się w pierwszej części eksperymentu, uczestnicy poddani zostali przymusowemu ograniczeniu kalorycznemu. Dzielne spożycie kalorii wynosiło 1750-2100 kcal [57]. Dane uzyskane po zakończeniu projektu pokazały, że obniżeniu uległy: wskaźnik masy ciała o 19% dla mężczyzn i 13% dla kobiet; ciśnienie krwi skurczowe o 25% i rozkurczowe o 22%), hormony (np. insulina, obniżona o 42%; T3, obniżona o 19%), parametry biochemiczne (np. poziom cukru we krwi obniżony o 21%; cholesterol obniżony o 30%). Szereg dodatkowych zmian, w tym wartości rT3, kortyzolu, hemoglobiny glikowanej i innych, przypominały wartości u gryzoni lub małp utrzymywanych w reżimie niskokalorycznym [57].

W 2007 roku rozpoczęto kompleksowe badanie w ramach programu CALERIE (Comprehensive Assessment of the Long-term Effects of Reducing Energy Intake). Było to pierwsze, zaprojektowane badanie mające na celu ocenę skutków długotrwałego (6, 12 i 24 miesiące) ograniczenia kalorycznego nieotyłych ludzi. W programie uczestniczyło 3 ośrodki badawcze ze Stanów Zjednoczonych łącznie w badaniu wzięło udział 220 osób (kobiet i mężczyzn) w wieku 21-50 lat [49]. Wykazano, że 2 lata umiarkowanego ograniczenia kalorii (25%) znacznie zmniejszyły wartości kardiometabolicznych czynników ryzyka u młodych, nieotyłych dorosłych. Znacznie poprawił się profil lipidowy surowicy krwi (obniżeniu uległy: wartości LDL, stosunku cholesterolu całkowitego do HDL) i funkcja rozkurczowa serca. Badania te dowodzą, że praktykowanie umiarkowanego ogranicze-

nia kalorii u młodych i zdrowych osób w średnim wieku może przynieść znaczne korzyści dla zdrowia układu sercowo-naczyniowego [28].

Pomimo, że istnieją solidne dane sugerujące, iż restrykcja kaloryczna poprawia zdrowie i może wydłużyć żywotność, trudno jednoznacznie stwierdzić, że jej efekty są uniwersalne. Wykazano, że bardzo duże znaczenie ma min.: tło genetyczne, płeć, rodzaj ograniczenia oraz czas jego rozpoczęcia [14, 38, 43].

## JAK RESTRYKCJA KALORYCZNA WPŁYWA NA MECHANIZMY ZWIĄZANE ZE STARZENIEM SIĘ ORGANIZMU?

Obecnie szeroko akceptowaną teorią na temat ograniczenia spożycia kalorii i jego wpływu na długowieczność jest hipoteza hormezy [31, 54]. Termin ten został sformułowany przez Suothama i Ehrlicha w 1943 roku i oznacza zjawisko polegające na tym, że pewne substancje – które podawane są w nadmiarze wywierają szkodliwy efekt, w małych ilościach mogą przynosić korzystne rezultaty [5, 6, 48]. I tak hipoteza hormezy w kontekście restrykcji kalorycznej, zakłada, że obniżenie ilości spożywanego kalorii jest łagodnym czynnikiem stresowym, który wywołuje w organizmie pozytywną odpowiedź obronną. W efekcie zmiana ulega metabolizm – rośnie odporność na stres, co w konsekwencji powoduje zwiększenie długości życia krytycznych dla organizmu komórek. Hipoteza hormezy dotycząca ograniczenia kalorii w diecie wysuwa cztery główne przypuszczenia. Po pierwsze, łagodny czynnik stresowy jakim jest ograniczenie kalorii indukuje sygnalizacyjne szlaki wewnątrzkomórkowe. Szlaki te zaangażowane są w mechanizm obrony komórek i tkanek przed skutkami procesu starzenia (osłabienie procesu apoptozy). Po drugie, regulują metabolizm glukozy, tłuszczów i białek w taki sposób, który zwiększa szanse na przeżycie organizmu w warunkach stresu. Całość mechanizmów zaś podlega kontroli układu hormonalnego i autonomicznego zapewniającym utrzymanie równowagi wewnętrznej organizmu [54].

Badania z ostatnich dwóch dekad dostarczyły wielu szczegółów na temat mechanizmów restrykcji kalorycznej. Ostatnie postępy w technikach bioinformatycznych, analizy zaburzeń genetycznych na poziomie organizmu, znacznie poszerzyły naszą wiedzę na temat mechanizmów molekularnych, które pośredniczą w wydłużeniu długości życia przez interwencje kaloryczne. Ze względu na fakt, że wiele genów i szlaków związanych z procesem starzenia jest w dużej mierze konserwatywne ewolucyjnie, organizmy modelowe takie jak drożdże, nicienie, *D. melanogaster* były kluczowe dla odkryć tych mechanizmów. Obecnie wiadomo, że CR działa poprzez kluczowe metaboliczne szlaki sygnałowe reagujące na składniki odżywcze i stres, w tym sirtuiny, IIS/FOXO, TOR, AMPK, i mitofagię [7, 8, 32, 58] (**Ryc. 1**).



**RYCINA 1.** Zmiany na poziomie molekularnym i metabolicznym zachodzące w organizmie pod wpływem ograniczenia kalorycznego. mTOR – ang. *mammalian target of rapamycin kinase*; IIS- ang. *insulin/IGF-1 signaling pathway*; JNK – ang. *c-Jun N-terminal kinase pathway*; ROS – ang. *reactive oxygen species*; TNF $\alpha$  – ang. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ; AMPK – ang. *AMP-activated protein kinase*; FoxO – ang. *Forkhead box protein O*

**FIGURE 1.** Changes on the molecular and metabolic level occurring in the body due to caloric restriction. mTOR – mammalian target of rapamycin kinase; IIS- insulin/IGF-1 signaling pathway; JNK – c-Jun N-terminal kinase pathway; ROS – reactive oxygen species; TNF $\alpha$  – tumor necrosis factor  $\alpha$ ; AMPK – AMP-activated protein kinase; FoxO – Forkhead box protein O

### SIRTUINY A RESTRYKCJA KALORYCZNA

Ostatnie odkrycia dowodzą, że mechanizm związany z wpływem ograniczenia kalorycznego na proces starzenia jest efektem działania sirtuin (ang. *silent information regulator*; Sir). Zainteresowanie tymi białkami wzrosło po 1999 roku kiedy to zaobserwowano, że jedno z nich Sir 2 przedłuża życie drożdży *Saccharomyces cerevisiae* o ok. 30% [17]. Wiadomo, że sirtuiny należą do enzymów z rodziny NAD<sup>+</sup> – zależnych deacylaz histonowych (HDAC), co sugeruje, że ich aktywność zależy od stanu metabolicznego komórki [20]. Przypisuje się im udział w takich procesach jak: wyciszanie transkrypcyjne genów, regulacja apoptozy i homeostazy gospodarki lipidowej czy wspomniana powyżej ingerencja w proces starzenia

[29]. U ssaków zidentyfikowano siedem genów *SIRT1-7*, będących homologami odkrytego u drożdży genu *Sir2*. Geny te kodują białka o masie cząsteczkowej od 33,9kDa (*SIRT5*) do 81,7kDa (*SIRT1*) [53]. Wszystkie formy charakteryzują się występowaniem domeny wiążącej NAD, umożliwiającą aktywność enzymatyczną. Stanowią element konserwatywnego ewolucyjnie aparatu genetycznej kontroli starzenia, uruchamianego i promującego przeżycie organizmu w niekorzystnych warunkach środowiska. Poszczególne sirtuiny różnią się między sobą rodzajem aktywności, kierunkiem działania i lokalizacją w obrębie komórki (**Tab. 1**). *SIRT1* występują w jądrze komórkowym i cytoplazmie, *SIRT2* w cytoplazmie, *SIRT3, 4, 5* w mitochondriach a *SIRT6, 7* występują w jądrze komórkowym [17, 29, 32]. Funkcja enzymatyczna tych białek nie została jeszcze całkowicie zgłębiona. Wiadomo, że substratami dla tych enzymów są m.in.: związane z DNA białka histonowe, odpowiadające za strukturę chromatyny; białko p53, hamujący rozwój nowotworów, określany często mianem strażnika genomu; budujące mikrotubule białko  $\alpha$ - tubuliny; syntetaza acetylo-CoA [17, 53]. Odkrycie sirtuin odpowiadających za przebudowę struktury chromatyny i regulację transkrypcji umożliwiło nowe spojrzenie na rozumienie mechanizmu jaki łączy ograniczenie kalorii z wydłużeniem życia. Kolejne doniesienia stanowiły potwierdzenie wcześniejszych obserwacji, ponadto wykazano, że efekt wydłużenia czasu życia w odpowiedzi na redukcję kaloryczną nie występuje gdy uszkodzone są geny kodujące sirtuiny [4]. Zwiększenie ekspresji tych genów powoduje z kolei wzmocnienie obserwowanego efektu. Ograniczenie kaloryczne powoduje wzrost aktywności sirtuin. Zmniejszenie szybkości metabolizmu i zmiana stanu oksydoredukcyjnego komórek, która wiąże się ze zmianą stosunku  $NAD^+ / NADH$  zwiększa pulę wolnych koenzymów  $NAD^+$  i tym samym ich dostępność dla białek SIRT [17, 53]. W 2003 roku Sinclair i współpracownicy wykazali, że na wydłużenie życia u drożdży poza sirtuinami ogromne znaczenie ma również funkcjonalność genu *PNC1*- [2]. Produktem aktywności tego genu jest białko nikotynamidaza PNC1, katalizująca reakcję deaminacji nikotynamidu do kwasu nikotynowego. Nikotynamid poza tym, że jest produktem, to stanowi dodatkowo substancję hamującą deacylację przeprowadzaną przez sirtuiny [2]. Co ciekawe nie zaobserwowano, by podobny efekt wywoływał kwas nikotynowy. Reasumując, obniżenie stężenia nikotynamidu przez PNC1 prowadzi do wzrostu aktywności sirtuin. Teoria ta wydaje się być całkowicie zgodna z przytoczoną powyżej hipotezą hormezy- ograniczenie kaloryczne jako łagodny czynnik stresowy powoduje aktywację białek SIRT przez obniżenie stężenia inhibitorów lub zwiększenie ilości substancji aktywujących te białka [36]. Dodatkowo wiele badań wskazuje sirtuiny jako represory genów biorących udział w adipogenezie i magazynowaniu tłuszczów w komórkach [55]. Według jednej z proponowanych hipotez obserwowany efekt w przypadku redukcji kalorycznej związany jest bezpośrednio z redukcją ilości tkanki tłuszczowej [44, 53]. Ponadto w proces aktywacji sirtuin zaangażowane są rów-

**TABELA 1.** Rodzaj, klasa, lokalizacja wewnątrzkomórkowa i funkcja szczych sirtuin (opracowano na podstawie [17])  
**TABLE 1.** Type, class, intracellular localization, and function of mammalian sirtuins (based on [17])

<b>SIRTUINY</b>						
Rodzaj Klasa	<b>SIRT1 I</b>	<b>SIRT2 I</b>	<b>SIRT3 I</b>	<b>SIRT4 II</b>	<b>SIRT5 III</b>	<b>SIRT6 IV</b>
<b>Lokalizacja komórkowa</b>	<b>jądro komórkowe, cytoplazma</b>	<b>cytoplazma</b>	<b>mitochondrium</b>	<b>mitochondrium</b>	<b>mitochondrium</b>	<b>jądro komórkowe</b>
<b>Funkcja</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- reguluje glukoneogenezę poprzez deacetylację FOXO1 oraz PGC-1<math>\alpha</math>;</li> <li>- reguluje glikolizę poprzez deacetylację HIF-1 (negatywna regulacja);</li> <li>- wpływa na wydzielenie insuliny;</li> <li>- hamuje ekspresję genów związanych z lipogenezą poprzez deacetylację czynnika transkrypcyjnego SREBP-1 i adipogenezę poprzez obniżenie aktywności receptora PPAR<math>\gamma</math>;</li> <li>- bierze udział w naprawie DNA poprzez poliADP-rybozylację;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- nasila glukoneogenezę poprzez deacetylację i aktywację karboksykinazy fosfoenolopiro-gronianowej w warunkach <math>\downarrow</math> stężenia glukozy;</li> <li>- hamuje adipogenezę;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- promuje włączenie aminokwasów;</li> <li>- hamuje glikolizę;</li> <li>- jest niezbędna do prawidłowego działania trzustki;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ogranicza wydzielenie insuliny poprzez zahamowanie działania dehydrogenazy glutaminianowej (GDH);</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- wzmacnia glikolizę dzięki aktywności demalonylasy;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- w przebiegu glukoneogenezы działanie przeciwnostawne do SIRT1;</li> <li>- regulacja glikolizy poprzez deacetylację HIF-1 (negatywna regulacja);</li> <li>- hamuje adipogenezę;</li> <li>- niezbędna do prawidłowej naprawy dwuniciowych pęknięć w DNA;</li> </ul>
						<b>SIRT7 IV</b>
						<b>jądro komórkowe</b>
						<ul style="list-style-type: none"> <li>- uczestniczy w procesie naprawy DNA;</li> <li>- w komórkach nowotworowych stabilizuje transformację poprzez katalizowanie deacetylacji histonu 3;</li> <li>- jest niezbędna do regulacji epigenetycznej i odporności na stres;</li> </ul>

niez: insulina i insulinopodobny czynnik wzrostu typu 1 (IGF-1) a dokładnie ich niskie stężenie we krwi. Warto wspomnieć, że istnieje również pogląd, że sirtuiny w szczególności SIRT1 reguluje przetrwanie komórek poprzez wpływ na czynniki indukujące zaprogramowaną śmierć komórki – apoptozę. Do takich zaliczamy czynnik transkrypcyjny O z rodziny forkhead- FoxO uczestniczący w regulacji proliferacji, różnicowania czy apoptozy komórek. SIRT1 katalizuje deacylację FoxO, w wyniku czego przyczynia się do nasilenia procesów związanych z naprawą DNA, poprzez zwiększenie ilości białka GADD45, czy wzmocnienie obrony antyoksydacyjnej [29]. Istnieją przypuszczenia sugerujące, że SIRT1 może korzystnie wpływać na związany z rodziną białek Bcl-2 szlak apoptotyczny. Białka te regulują m.in. przepuszczalność błony mitochondrialnej, jedne wykazują działanie antyapoptotyczne inne zaś promują proces apoptozy. Do drugiej grupy zaliczane jest białko Bax. Białko to podlega regulacji przy udziale czynnika Ku70. SIRT1 deacyluje dwie kluczowe reszty lizyny Ku70 przez co hamuje ten szlak apoptozy [12]. Sirtuiny to enzymy o wielu funkcjach. Biorą udział w licznych procesach komórkowych, regulując metabolizm wielu modelowych organizmów. Substratami dla sirtuin są nie tylko enzymy szlaków metabolicznych, ale również czynniki transkrypcyjne oraz histony. Biorąc zatem pod uwagę ich dużą specyficzność substratową jak i związaną z nimi ingerencję w procesy metaboliczne istnieje przypuszczenie, iż substancje te mogą stać się w niedługiej przyszłości obiecującym, molekularnym celem w terapii wielu chorób wieku podeszłego.

### ŚCIEŻKA SYGNAŁOWANIA INSULINA /IGF-1

Według rozlicznych doniesień literaturowych istnieje związek między hormonami a długowiecznością [18]. Najprawdopodobniej dzieje się tak na skutek wzrostu ekspresji niektórych genów związanych m.in. ze szlakiem sygnałowania insuliny i insulinopodobnego czynnika wzrostu (IIS). Do genów tych zaliczamy geny kodujące białka IRS 1 i/lub IRS 2 (substrat receptora insulinowego 1 i 2). Białka te ulegają fosforylacji po wcześniejszym związaniu się insuliny ze swoim receptorem zlokalizowanym na powierzchni komórki [37]. Masternak i współpracownicy odnotowali, że zarówno u myszy o fenotypie Ames, które nie wydzielają hormonu wzrostu i wskutek tego mają niski poziom IGF-1 w surowicy, jak i tych o fenotypie dzikim, restrykcja kaloryczna powoduje wzrost ekspresji wspomnianych genów [37].

U gryzoni, u których zastosowano tzw. łagodną 15% lub 40-60% restrykcję kaloryczną zaobserwowano m.in. spadek poziomu hormonu wzrostu (GH), czynnika insulinopodobnego (IGF-1) i insuliny [50]. Substancje te określane są w literaturze mianem biomarkerów restrykcji kalorycznej [22]. Zarówno insulina, insulinopodobny czynnik wzrostu typu 1 (IGF-1) i typu 2 (IGF-2) to m.in. stymulatory podziałów komórkowych, dotyczy to nie tylko komórek fizjologicznych ale również nowotworowych. Poziom wspomnianych czynników we krwi powiązany

jest ściśle z ilością przyjmowanych kalorii. Insulina wydzielana jest przez komórki beta wysp trzustkowych po dostarczeniu pokarmu do organizmu, IGF-1 natomiast jest uwalniany z komórek wątroby pod wpływem hormonu wzrostu. Szlaki sygnałowe uruchamiane przez te czynniki są wysoce konserwatywne i zbieżne. Obniżenie poziomu insuliny we krwi powoduje, że z tkanki tłuszczowej zwiększa się uwalnianie tłuszczu i wydzielanie adiponektyny będącej m.in. czynnikiem uwrażliwiającym komórki na insulinę. Co z kolei skutkuje dalszym obniżaniem poziomu insuliny we krwi [11]. Z molekularnego punktu widzenia wiadomym jest fakt, że na skutek aktywacji szlaku IIS przez hormon wzrostu, czynnik transkrypcyjny FoxO ulega fosforylacji i translokacji z jądra do cytoplazmy, co skutkuje jego unieczynnieniem. W okresie zmniejszonej podaży pożywienia obniża się sygnałowanie szlaku IIS w wyniku czego, czynnik transkrypcyjny FoxO ulega aktywacji przez deacylację w obecności sirtuin, przemieszcza się do jądra gdzie promuje ekspresję genów związanych z długowiecznością [24].

### **mTOR A OGRANICZENIE KALORYCZNE**

Kinaza serynowo – treoninowa (ang. *mammalian target of rapamycin*, mTOR) jest białkiem regulującym tempo wielu istotnych procesów wewnątrzkomórkowych. Występuje w postaci dwóch funkcjonalnie odrębnych kompleksów białkowych: mTORC1 (ang. *mammalian target of rapamycin complex 1*) i mTORC2 (ang. *mammalian target of rapamycin complex 2*). W warunkach fizjologicznych mTOR jest głównym regulatorem wzrostu i podziału komórek eukariotycznych w odpowiedzi na czynniki odżywcze (glukozę i aminokwasy), insulinę i czynniki wzrostowe. Poczynając od drożdży a na ssakach kończąc białka TOR są kolejnymi wysoce konserwatywnymi czynnikami. Kompleks mTORC1 poprzez fosforylację dwóch najlepiej scharakteryzowanych substratów – kinazy rybosomalnej S6 (ang. *ribosomal protein S6 kinase 1*, S6K1) oraz białka wiążącego eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 4E (ang. *Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*, 4E-BP1) – kontroluje syntezę białek kluczowych dla cyklu komórkowego. Kompleks ten stymuluje również biosyntezę lipidów, hamuje degradację na drodze autofagii i reguluje metabolizm glukozy [41]. Podstawową funkcją kompleksu TORC2 jest organizacja cytoszkieletu [46], jak również udział w aktywacji kinazy Akt – głównego stymulatora kompleksu TORC1 [56]. Pierwsze doniesienia pokazujące, że mTOR może regulować procesy starzenia, pochodzą z badań przeprowadzonych na drożdżach, u których wykazano, że delecja pojedynczego genu kodującego SCH9 (drożdżowy ontolog S6K,) powoduje wydłużenie życia tych organizmów o 50% [15, 34]. Ponadto farmakologiczne zablokowanie szlaku rapamycyną lub sulfaksyminą metioniny znacznie wydłuża chronologiczną długość życia (CLS) czyli czas przeżywalności komórek drożdży w fazie stacjonarnej. Zmniejszone sygnałowanie sprzyja również zwiększeniu odporności na stres organizmów modelowych. U drożdży, nicieni i ssaków mTOR

uznawany jest za negatywny regulator procesu autofagii [23]. W nawiązaniu do badań przeprowadzonych z udziałem myszy stwierdzono, że stosowanie restrykcji kalorycznej znacznie obniża sygnałowanie szlaku mTOR i korzystnie wpływa na wydłużenie długości życia. Warto wspomnieć, że oprócz aminokwasów szlak mTOR jest również regulowany przez stan energetyczny komórki w sposób zależny od kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (AMPK).

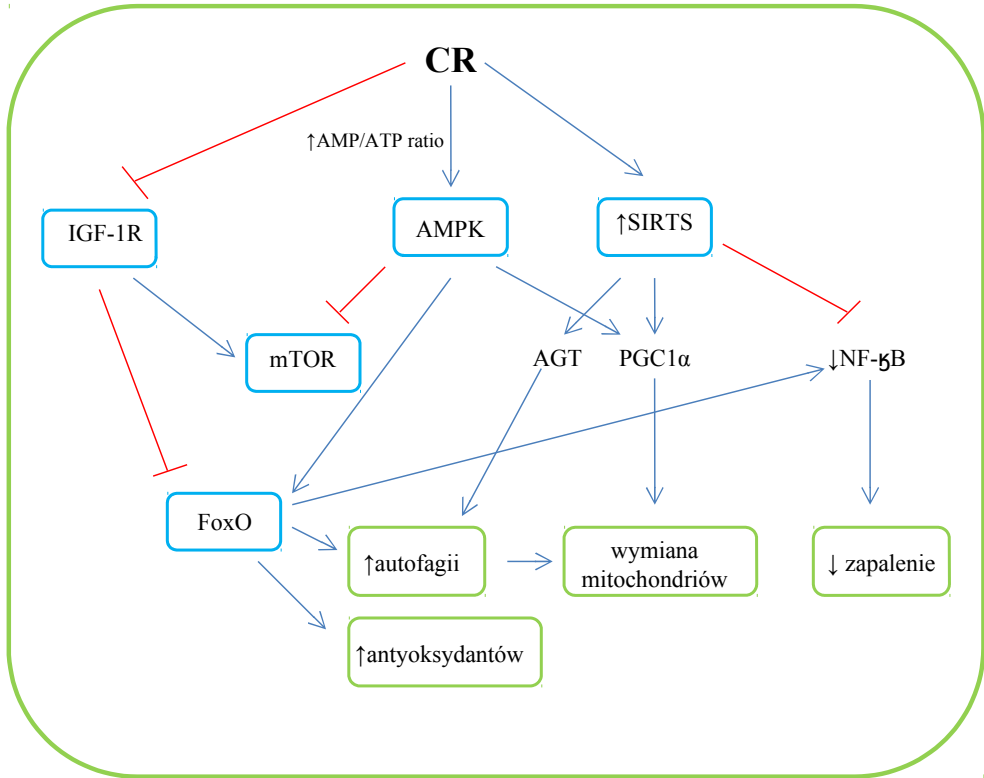
### AMPK A RESTRYKCJA KALORYCZNA

AMPK kinaza białkowa aktywowana przez AMP (ang. *AMP-activated protein kinase*) to enzym biorący udział w procesach odpowiedzialnych za utrzymanie homeostazy energetycznej zarówno na poziomie komórkowym jak i całego organizmu u eukariotów. AMPK działa jak czujnik wewnętrznego poziomu fosforanów adenozyne. Jeśli w komórce nie ma niedoboru ATP, stosunek ATP/ADP pozostaje wysoki, a reakcja przebiega z wytworzeniem ADP i obniżeniem poziomu AMP. W takim przypadku wysokie stężenie ATP zapobiega aktywacji AMPK. W przypadku restrykcji kalorycznej stosunek AMP/ATP zmienia się znacznie szybciej niż stosunek ADP/ATP, stąd AMP staje się głównym czynnikiem aktywacji AMPK [33]. U *C.elegans* znaczne ograniczenie podaży glukozy powoduje wydłużenie życia tego organizmu poprzez indukcję oddychania tlenowego w mitochondriach. Co ciekawe wykazano, że zastosowanie restrykcji kalorycznej u nicienia z mutacją w genie *aaak-2*, homologu AMPK, nie wydłuża życia organizmu. Fakt ten świadczy o niezaprzeczalnej roli AMPK w zastosowaniu ograniczenia kalorycznego u *C. elegans*.

U ssaków wykazano, że poprzez ograniczenie spożycia kalorii aktywacji ulega wątrobowa AMPK w wyniku czego znacznie spowalnia glukoneogeneza, natomiast w mięśniach dochodzi do stymulacji wychwytu glukozy poprzez wzrost syntezy jednego z jej transporterów GLUT4 [39].

Jak wspomniano powyżej, kinaza ta jest również znana jako czynnik negatywnie regulujący kompleks mTORC1. Przypuszcza się, że regulacja ta odbywa się na zasadzie co najmniej dwóch odrębnych mechanizmów. Jeden z nich związany jest z pośrednim udziałem AMPK, która aktywuje białko TSC2 (ang. *Tuberous Sclerosis Complex 2*) przez fosforylację jego reszt serynowych. W konsekwencji tego procesu dochodzi do zahamowania szlaku sygnałowania mTOR. Drugi rodzaj reakcji odbywa się na zasadzie bezpośredniego wpływu kinazy na fosforylację składnika kompleksu mTORC1- białka Raptor, co w konsekwencji upośledza przekazywanie sygnały w obrębie szlaku [62] (**Ryc. 2**).

Warto również nadmienić, że indukcja aktywności AMPK pośredniczy w syntezie cytokin przeciwzapalnych. Nadmierna podaż energii promuje przewlekły stan zapalny, który przyczynia się do przyspieszenia procesów związanych ze starzeniem się organizmu, czy też do wystąpienia chorób związanych z wiekiem podeszłym: otyłości, insulinooporności, cukrzycy typu II, miażdżycy [45].



**RYCINA 2.** Wpływ restrykcji kalorycznej na szlaki sygnałowania komórkowego i czynniki z nimi związane. Niebieskimi strzałkami zaznaczono działanie aktywujące, czerwonymi regulację negatywną. CR – ang. *calorie restriction*; IGF-1R – ang. *insulin-like growth factor 1 receptor*; AMPK – ang. *AMP-activated protein kinase*; SIRT6 – ang. *sirtuins*; mTOR – ang. *mammalian target of rapamycin kinase*; AGT – ang. *autophagy-related proteins*; PGC1α – ang. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1α*; NF-κB – ang. *nuclear factor kappa-light-chain- enhancer of activated B cells*, FoxO – ang. *Forkhead box protein O*

**FIGURE 2.** Effect of caloric restriction on cell signaling pathways and factors associated with them. Activating action is marked with blue arrows, negative adjustment with red. CR – calorie restriction; IGF-1R – insulin-like growth factor 1 receptor; AMPK – AMP-activated protein kinase; SIRT6 – sirtuins; mTOR – ang. mammalian target of rapamycin kinase; AGT – autophagy-related proteins; PGC1α- peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1α; NF-κB – nuclear factor kappa-light-chain- enhancer of activated B cells, FoxO – Forkhead box protein O

W licznych badaniach dowiedziono, że AMPK jest istotnym, choć pośrednim, regulatorem ścieżki sygnałowej NF-κB zaangażowanej w odpowiedź immunologiczną organizmu [51]. W komórkach mięśni szkieletowych wykazano, że na skutek wzrostu ilości glukozy dochodzi do wzrostu wytwarzania reaktywnych form tlenu (ROS), które z kolei promują sygnałowanie szlaku NF-κB. Dowiedziono tym

samym, że NF- $\kappa$ B upośledza homeostazę mitochondrialną. Podjednostki budujące ten czynnik transkrypcyjny są regulowane przez m.in.: SIRT1, PGC-1 $\alpha$ , p53 czy FoxO czyli białka regulowane przez AMPK [41] (**Ryc. 2**). Co ciekawe, wiadomo, że kinaza ta ma kluczowe znaczenie dla mitofagii – procesu niezbędnego do utrzymania prawidłowej homeostazy energetycznej na poziomie komórkowym. Dzięki mitofagii możliwe jest systematyczne i wydajne usuwanie niesprawnych bądź uszkodzonych mitochondriów. Wiele badań wskazuje, że szybkość usuwania wadliwych mitochondriów obniża szybkość procesów prowadzących do starzenia się komórek [16]. W warunkach stresu energetycznego AMPK reguluje kształt sieci mitochondrialnej. Dzięki AMPK, białko MFF (ang. *mitochondrial fission factor*) będące składnikiem zewnętrznej błony mitochondrialnej, rekrutuje białko DRP1 (ang. *dynamin related protein 1*) pośredniczące we fragmentacji mitochondriów i peroksysomów [25, 42]. Ponadto wykazano, że u ssaków brak AMPK powoduje nadmierną akumulację białka adaptorowego p62/SQSTM1 i wadliwą mitofagię [13]. AMPK jest również niezbędna do rekrutacji kinazy ULK1 do mitochondriów, gdzie dochodzi do fosforylacji białka FUNDC1 będącego receptorem mitofagicznym w zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Dzięki temu procesowi możliwa jest interakcja FUNDC1 i LC3 (białko związane z mikrotubulami (ang. *microtubule-associated protein light chain 3*), prowadząca do mitofagii [61]. Ponadto, AMPK jest niezbędna do aktywacji kompleksu kinazy 3-fosfatydyloinozytolu- PIK3 i kaskady białek ATG, które odgrywają istotną rolę w wydłużaniu i dojrzewaniu autofagosomu. Jednakże, mimo tych wszystkich doniesień, nasza wiedza dotycząca efektu restrykcji kalorycznych na sam proces mitofagii jest ograniczona. Priece i współ. zaobserwowali, że po zastosowaniu restrykcji kalorycznych u myszy, czas połowicznego rozpadu białek mitochondrialnych hepatocytów uległ znacznemu wydłużeniu [47]. Cui odnotował, że ekspresja PINK1 (kinaza indukowana przez fosfatazę PTEN ang. *PTEN induced putative kinase*) w nerkach u szczurów poddanych restrykcji kalorycznej była znacząco obniżona, co może wskazywać na to, że restrykcja łagodzi uszkodzenia mitochondriów. Ponadto, w tym samym badaniu zaobserwowano wzrost ekspresji białka BNIP3 (ang. *Bcl-2/adenovirus E1B-19kDa interacting protein 3*, wcześniej Nip3) inicjującego pierwsze etapy autofagii [40]. Zhao stwierdził, u 8 tygodniowych myszy poddanych restrykcji kalorycznych, znaczny wzrost mitofagii w obszarze serca na skutek wzrostu ekspresji białka DRP1 [63]. Na podstawie nielicznych doniesień można wysunąć jednak wniosek, że interwencje związane z ograniczeniem kalorycznym wpływają na autofagię mitochondriów poprzez wzrost ekspresji markerów tego procesu. Jak widać, powyższe przykłady wskazują, że AMPK jest istotnym czynnikiem związanym z mechanizmami uruchamianymi podczas restrykcji kalorycznych. Wydaje się, że AMPK stanowi kluczowe ogniwo łączące ze sobą szlaki sygnałowania ściśle powiązane z ograniczeniem kalorycznym i długowiecznością.

## PODSUMOWANIE

Starzenie, czyli utrata fizjologicznej integralności organizmu prowadząca do upośledzenia funkcji życiowych i znacznej zapadalności na różnego rodzaju schorzenia, jest obecnie jednym z najistotniejszych wyzwań dla świata nauk biologicznych i medycznych. Przytoczone powyżej przykłady po raz kolejny przedstawiają restrykcję kaloryczną jako działanie sprzyjające poprawie zdrowia. Jednakże należy pamiętać, że kolejne badania są niezbędne aby opracować model najbardziej efektywny i w miarę możliwości uniwersalny. Obecne doniesienia pokazują, jak duże znaczenie ma czas, rodzaj interwencji jak również populacja poddana ograniczeniu kalorycznemu. **Rycina 2** przedstawia zbiorcze zestawienie omówionych powyżej czynników, które modulowane są przez ograniczenie kalorii. Wnikliwsze poznanie ich mechanizmów molekularnych, jak również interakcji jakim ulegają wzajemnie mogłoby okazać się przełomem w medycynie, gerontologii i istotnie wpłynąć na poprawę jakości i długości życia.

## PODZIĘKOWANIA

Pracę sfinansowano z tematu statutowego Katedry i Zakładu Fizjologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego

## LITERATURA

- [1] AKHTAR N, HAQI TM. Current nutraceuticals in the management of osteoarthritis: a review. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2012; **4**: 181-207.
- [2] ANDERSON RM, BITTERMAN KJ, WOOD JG, MEDVEDIK O, SINCLAIR DA. Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 2003; **423**: 181-5.
- [3] BARTKE A, MASTERNAK MM, AL-REGAIEY KA, BONKOWSKI MS. Effects of dietary restriction on the expression of insulin-signaling-related genes in long-lived mutant mice. *Interdiscip Top Gerontol* 2007; **35**: 69-82.
- [4] BLANDER G, GUARENTE L. The Sir2 family of protein deacylases. *Annu. Rev. Biochem* 2004; **73**: 417-435.
- [5] CALABRESE EJ, MATTSON MP. How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine? *NPJ Aging Mech Dis* 2017; **3**: 13.
- [6] CALABRESE EJ. Hormesis: from marginalization to mainstream: a case for hormesis as the default dose-response model in risk assessment. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; **197**: 125-36.
- [7] CANTÓ C, AUWERX J. Calorie restriction: is AMPK a key sensor and effector? *Physiology* 2011; **26**: 214-24.
- [8] CARMONA JJ, MICHAN S. Biology of Healthy Aging and Longevity. *Rev Invest Clin* 2016; **68**: 7-16.

- [9] CEFALU WT, WAGNER JD, BELL-FARROW AD, EDWARDS IJ, TERRY JG, WEINDRUCH R, KEMNITZ JW. Influence of caloric restriction on the development of atherosclerosis in nonhuman primates: progress to date. *Toxicol Sci* 1999; **52**: 49-55.
- [10] CHAPMAN J, FIELDER E, PASSOS JF. Mitochondrial dysfunction and cell senescence: deciphering a complex relationship. *FEBS Lett* 2019; **593**: 1566-1579.
- [11] CHO Y, HONG N, KIM KW, CHO SJ, LEE M, LEE YH, KANG ES, CHA BS, LEE BW. The Effectiveness of Intermittent Fasting to Reduce Body Mass Index and Glucose Metabolism: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Med* 2019; **8**: 1645.
- [12] COHEN HY, MILLER C, BITTERMAN KJ, WALL NR, HEKKING B, KESSLER B, HOWITZ KT, GOROSPE M, DE CABO R, SINCLAIR DA. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* 2004; **305**: 390-2.
- [13] EGAN DF, SHACKELFORD DB, MIHAYLOVA MM ET AL. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* 2011; **331**: 456-461.
- [14] ESCRIVA F, GAVETE ML, FERMIN Y, PEREZ C, GALLARDO N, ALVAREZ C, ANDRES A, ROS M, CARRASCOS JM. Effect of age and moderate food restriction on insulin sensitivity in Wistar rats: role of adiposity. *J Endocrinol* 2007; **194**: 131-141.
- [15] FABRIZIO P, POZZA F, PLETCHER SD, GENDRON CM, LONGO VD. Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science* 2001; **292**: 288-90.
- [16] FIVERSON EM, LAUTRUP S, SUN N, SCHEIBYE-KNUDSEN M, STEVNSNER T, NILSEN H, BOHR VA FANG EF. Mitophagy in neurodegeneration and aging. *Neurochem Int* 2017; **109**: 202-209.
- [17] FRYDZIŃSKA Z, OWCZAREK A, WINIARSKA K. Sirtuiny i ich rola w regulacji metabolizmu. *Post Bioch* 2019; **65**: 31-40.
- [18] GABEL K, KROEGER CM, TREPANOWSKI JF, HODDY KK, CIENFUEGOS S, KALAM F, VARADY KA. Differential Effects of Alternate-Day Fasting Versus Daily Calorie Restriction on Insulin Resistance. *Obesity*. 2019; **27**: 1443-1450.
- [19] GAVRILOVA NS, GAVRILOV LA. Comments on Dietary Restriction, Okinawa Diet and Longevity. *Gerontology* 2012; **58**: 221-223.
- [20] GAWECKA A, STACHOWSKA E. Molekularny mechanizm działania restrykcji kalorycznych. *Ann Acad Med Stetin* 2014; **60**: 25-8.
- [21] GOODELL MA, RANDO TA. Stem cells and healthy aging. *Science* 2015; **4**: 1199-204.
- [22] HEILBRONN LK, RAVUSSIN E. Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. *Am J Clin Nutr* 2003; **78**: 361-9.
- [23] HOSOKAWA N, HARA T, KAIZUKA T, KISHI C, TAKAMURA A, MIURA Y, IEMURA S, NATSUME T, TAKEHANA K, YAMADA N, GUAN JL, OSHIRO N, MIZUSHIM N. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell* 2009; **20**: 1981-91.
- [24] HWANGBO DS, LEE HY, ABOZAIID LS, MIN KJ. Mechanisms of Lifespan Regulation by Calorie Restriction and Intermittent Fasting in Model Organisms. *Nutrients* 2020; **12**: 1194.
- [25] JANKIEWICZ J, SZYMAŃSKI J, MICHALSKA D, PATALAS-KRAWCZYK P, MICHALSKA B, DUSZYŃSKI J, GIORGI C, BONORA M, DOBRZYN A, WIECKOWSKI MR. Mitochondria-associated membranes in aging and senescence: structure, function, and dynamics. *Cell Death Dis* 2018; **9**: 332.
- [26] KEMNITZ JW. Calorie restriction and aging in nonhuman primates. *ILAR J* 2011; **52**: 66-77.
- [27] KENYON C. The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell* 2005; **25**: 449-60.
- [28] KRAUS WE, BHAPKAR M, HUFFMAN KM, PIEPER CF, KRUPA DAS S, REDMAN LM, VILLAREAL DT, ROCHON J, ROBERTS SB, RAVUSSIN E, HOLLOSZY JO, FONTANA L. CALERIE Investigators. 2 years of calorie restriction and cardiometabolic risk (CALERIE): exploratory outcomes of a multicentre, phase 2, randomised controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2019; **7**: 673-683.
- [29] KUCIŃSKA M, PIOTROWSKA H, MURIAS M. Sirtuiny- modulacja aktywności jako nowy cel terapeutyczny. *Pol Merk. Lek* 2010; **165**: 231-235.
- [30] LANE MA, BLACK A, HANDY A, TILMONT EM, INGRAM DK, ROTH GS. Caloric restriction in primates. *Ann N Y Acad Sci* 2001; **928**: 287-95.

- [31] LE BOURG E. Hormesis, aging and longevity. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1790**: 1030-9.
- [32] LEE SH, LEE JH, LEEHY, MIN KJ. Sirtuin signaling in cellular senescence and aging. *BMB Rep* 2019; **52**: 24-34.
- [33] LIN SC, HARDIE DG. AMPK: Sensing Glucose as well as Cellular Energy Status. *Cell Metab* 2018; **27**: 299-313.
- [34] LONGO VD, FABRIZIO P. Chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Subcell Biochem* 2012; **57**: 141-21.
- [35] LÓPEZ-LLUCH G, NAVAS P. Calorie restriction as an intervention in ageing. *J Physiol* 2016; **594**: 2043-60.
- [36] MASORO EJ. Role of sirtuin proteins in life extension y caloric restriction. *Mech. Ageing Dev.* 2004; **125**: 591-594.
- [37] MASTERNAK MM, PANICI JA, BONKOWSKI MS, HUGHES LF, BARTKE A. Insulin sensitivity as a key mediator of growth hormone actions on longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2009; **64**: 516-21.
- [38] MATTISON JA, COLMAN RJ, BEASLEY TM, ALLISON DB, KEMNITZ JW, ROTH GS, INGRAM DK, WEINDRUCH R DE CABO R, ANDERSON RM. Caloric restriction improves health and survival of rhesus monkeys. *Nat Commun* 2017; **8**: 14063.
- [39] McCARTY MF. Chronic activation of AMP-activated kinase as a strategy for slowing aging. *Med Hypotheses* 2004; **63**: 334-9.
- [40] MEHRABANI S, BAGHERNIYA M, ASKARI G, READ MI, SAHEBKAR A. The effect of fasting or calorie restriction on mitophagy induction: a literature review. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2020; **11**: 1447-1458.
- [41] MICHALAK A, JARZYNA R. The role of AMP-activated protein kinase (AMPK) in aging process. *Post Bioch* 2016; **62**: 459-470.
- [42] MICHALSKA B, DUSZYŃSKI J, SZYMAŃSKI J. Mechanism of mitochondrial fission – structure and function of Drp1 protein. *Post Bioch* 2016; **62**: 127-137.
- [43] MITCHELL SJ, MADRIGAL- MATUTE J, SCHEIBYE-KNUDSEN M, FANG E, AON M, GONZALEZ-REYES JA, CORTASSA S, KAUSHK S, GOZALEZ-FREIRE M, PATEL B, WAHL D, ALI A, CALVO-RUBIO M, BURÓN MI, GUITERREZ V, WARD MT, PALACIOS HH, CAI H, FREDERICK DW, HINE C, ET AL. Effects of sex, strain, and energy intake on hallmarks of aging in mice. *Cell Metab* 2016; **23**: 1093-1112.
- [44] NAKAGAWA T, GUARENTE L. SnapShot: sirtuins, NAD, and aging. *Cell Metab.* 2014; **20**: 192-192.
- [45] NISR RB, SHAH DS, GANLEY IG, HUNDAL HS. Proinflammatory NFκB signalling promotes mitochondrial dysfunction in skeletal muscle in response to cellular fuel overloading. *Cell Mol Life Sci* 2019; **76**: 4887-4904.
- [46] PAN D, MATSUURA Y. Structures of the pleckstrin homology domain of *Saccharomyces cerevisiae* Avo1 and its human orthologue Sin1, an essential subunit of TOR complex 2. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 2012; **68**: 386-92.
- [47] PRICE JC, KHAMBATTA CF, LI KW, BRUSS MD, SHANKARAN M, DALIDD M, FLOREANI NA, ROBERTS LS, TURNER SM, HOLMES WE, HELLERSTEIN MK. The effect of long term calorie restriction on in vivo hepatic proteostasis: a novel combination of dynamic and quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2012; **11**: 1801-1814.
- [48] RATTAN SI. Biogerontology: research status, challenges and opportunities. *Acta Biomed* 2018; **89**: 291-301.
- [49] RICKMAN AD, WILLIAMSON DA, MARTIN CK, GILHOOLY CH, STEIN RI, BALES CW, ROBERTS S, DAS SK. The CALERIE Study: design and methods of an innovative 25% caloric restriction intervention. *Contemp Clin Trials* 2011; **32**: 874-81.
- [50] ROCHA JS, BONKOWSKI MS, DE FRANCA LR, BARTKE A. Effects of mild calorie restriction on reproduction, plasma parameters and hepatic gene expression in mice with altered GH/IGF-I axis. *Mech Ageing Dev* 2007; **128** :317-31.
- [51] SALMINEN A, HYTTINEN JM, KAARNIRANTA K. AMP-activated protein kinase inhibits NF-κB signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan. *J Mol Med* 2011; **89**: 667-676.

- [52] SCHMEER C, KRETZ A, WENGERODT D, STOJILJKOVIC M, WITTE OW. Dissecting Aging and Senescence-Current Concepts and Open Lessons. *Cells* 2019; **8**: 1446.
- [53] SIEDLECKA K, BOGUSŁAWSKI W. Sirtuiny- enzymy długowieczności? *Gerontologia Polska* 2005; **13**: 147-152.
- [54] SINCLAIR DA. Toward a unified theory of caloric restriction and longevity regulation. *Mech Ageing Dev* 2005; **126**: 987-1002.
- [55] SONG J, LI J, YANG F, NING G, ZHEN L, WU L, ZHENG Y, ZHANG Q, LIN D, XIE C, PENG L. Nicotinamide mononucleotide promotes osteogenesis and reduces adipogenesis by regulating mesenchymal stromal cells via the SIRT1 pathway in aged bone marrow. *Cell Death Dis* 2019; **10**: 336.
- [56] SWIECH L, PERYCZ M, MILIK A, JAWORSKI J. Role of mTOR in physiology and pathology of the nervous system. *Biochim Biophys Acta* 2008; **1784**: 116-32.
- [57] WALFORD RL, HARRIS SB, GUNION MW. The calorically restricted low-fat nutrient-dense diet in biosphere 2 significantly lowers blood glucose, total leukocyte count, cholesterol, and blood pressure in humans. *Proc Natl Acad Sci* 1992; **89**: 11533-7.
- [58] WEICHHART T. mTOR as Regulator of Lifespan, Aging, and Cellular Senescence: A Mini-Review. *Gerontology* 2018; **64**: 127-134.
- [59] WILLCOX DC, WILLCOX BJ, TODORIKI H, CURB JD, SUZUKI M. Caloric restriction and human longevity: what can we learn from the Okinawans? *Biogerontology* 2006; **7**: 173-7.
- [60] WILLCOX DC, WILLCOX BJ, TODOROKI H, SUZUKI M. The Okinawan diet: health implications of a low-calorie, nutrient-dense, antioxidant-rich dietary pattern low in glycemic load. *J Am Coll Nutr* 2009; **28**: 500-516.
- [61] WU W, TIAN W, HU Z, CHEN G, HUANG L, LI W, ZHANG X, XUE P, ZHOU CH, LIU L, ZHU Y, ZHANG X, LI LONGXUAN, ZHANG L, SUI S, ZHAO B, FENG D. ULK1 translocates to mitochondria and phosphorylates FUNDC1 to regulate mitophagy. *EMBO Rep* 2014; **15**: 566-575.
- [62] XU J, JI J, YAN XH. Cross-talk between AMPK and mTOR in regulating energy balance. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2012; **52**: 373-81.
- [63] ZHAO Y, ZHU Q, SONG W, GAO B. Exercise training and dietary restriction affect PINK1/Parkin and Bnip3/Nix-mediated cardiac mitophagy in mice. *Gen Physiol Biophys* 2018; **37**: 657-666.

*Redaktor prowadzący – Maciej Zabel*

*Otrzymano: 04.10.2021*

*Przyjęto: 26.10.2021*

*Katarzyna Zgutka*

*Katedra i Zakład Fizjologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie  
al. Powstańców Wielkopolskich 72, 70-111 Szczecin*

*tel.: 091-466-16-24*

*e-mail: katgrymula@tlen.pl*