

ANNA BIELAK-ŻMIJEWSKA^{1,A}

^A [HTTPS://ORCID.ORG/0000-0002-6330-4867](https://orcid.org/0000-0002-6330-4867)
e-mail: a.bielak@nencki.edu.pl

1

Pracownia Molekularnych Podstaw Starzenia, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego,
Polska Akademia Nauk

Laboratory of Molecular Basis of Aging, Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences
Pasteura Str. 3, 02-093 Warsaw, Poland

Zegar epigenetyczny i jego cofanie – nadzieja na wydłużenie zdrowego życia

The epigenetic clock and turning it backwards – a hope
for extending a healthy life

https://doi.org/10.36921/kos.2023_2975

Abstrakt

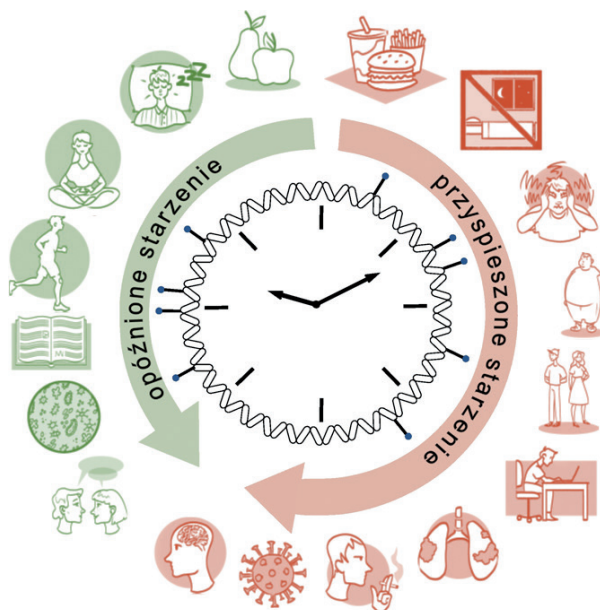
Proces starzenia organizmu jest nieunikniony, jednakże starzejemy się w różnym tempie i sporo już wiadomo jak opóźnić ten proces i zmniejszyć ryzyko wystąpienia chorób wieku podeszłego. Bardzo istotną rolę odgrywa styl życia, odpowiednia dieta, aktywność fizyczna, profilaktyka zdrowotna oraz umiejętność radzenia sobie ze stresem. U podstaw starzenia organizmu leży starzenie komórkowe i, jak pokazano na przykładzie modeli zwierzęcych, usunięcie starych komórek prowadziło do polepszenia kondycji i wydłużenia życia w zdrowiu. Wykazano, że jedną z cech starzenia jest specyficzny wzór metylacji DNA i opierając się na tym zjawisku opracowano tzw. zegar epigenetyczny. Na podstawie wybranych miejsc metylacji można określić wiek biologiczny, obrazujący rzeczywiste starzenie organizmu, który może różnić się znacznie od wieku chronologicznego. Zegary epigenetyczne mają bardzo istotne znaczenie biologiczne. Służą do identyfikacji przyspieszonego starzenia, co stanowi podstawę do poszukiwań czynników za to odpowiedzialnych, jak również do przewidywania ryzyka wystąpienia chorób, a nawet przedwczesnego zgonu. Mogą być doskonałym uzupełnieniem diagnostyki i wskazówką do podjęcia ukierunkowanego działania.

Słowa kluczowe: zegar epigenetyczny, starzenie komórkowe, starzenie organizmu, metylacja DNA, modyfikacje potranslacyjne histonów, interwencje przeciwstarzeniowe

Abstract

The aging process of the organism is inevitable. However, we age at different rates, and a lot is already known about how to delay this process and reduce the risk of age-related diseases. Lifestyle, proper diet, physical activity, preventive health care, and coping with stress play an important role in aging. Cellular senescence lies at the core of aging and, as it has been shown in animal models, the removal of senescent cells led to improved fitness and a longer healthspan. One of the hallmarks of aging is a specific pattern of DNA methylation, which has been called the epigenetic clock. Based on selected methylation sites, it is possible to determine the biological age, which indicates the actual age of the organism that may differ significantly from the chronological one. Epigenetic clocks have vital biological significance. They can be used to identify accelerated aging and predict disease risks, including premature death. Such an approach can be a perfect complementary diagnostic tool and a signal to implement countermeasures.

Keywords: epigenetic clock, senescence, aging, DNA methylation, posttranslational modifications of histones, anti-aging interventions



WPROWADZENIE

Wszyscy się starzejemy, ale tempo zmian związanych z wiekiem jest cechą indywidualną. Różnica między wiekiem chronologicznym wyznaczonym przez datę urodzenia, a wiekiem biologicznym wyznaczonym przez rzeczywiste zmiany zachodzące w organizmie, może być bardzo duża i wynosić nawet kilka lat. Proces starzenia jest wypadkową wpływu czynników genetycznych i środowiskowych, ale uważa się, że te ostatnie mają zdecydowanie większy udział. W ostatnim stuleciu znacznie zwiększyła się liczba osób 65+ w populacji społeczeństw rozwijających się. Jest to zasługą nauki, medycyny i przemiany w stylu życia. Jednakże zaawansowany wiek jest jednym z głównych czynników ryzyka wielu chorób przewlekłych, takich jak cukrzyca typu II, choroby układu sercowo-naczyniowego, pewne typy nowotworów i choroby neurodegeneracyjne. Choroby takie nie miały szansy się ujawnić w populacji ludzi, których średnia długość życia była dużo krótsza niż obecnie. Należy pamiętać, że na początku XX wieku oczekiwana długość życia wynosiła 45 lat, podczas gdy obecnie w krajach wysoko rozwiniętych przekracza 75 lat. Istnieje szereg dowodów na to, że mechanizmy epigenetyczne odgrywają rolę w regulacji starzenia, jego tempie i podatności na rozwój chorób zaliczanych do schorzeń wieku podeszłego. Okazuje się, że metylacja DNA może być dobrym biomarke-

rem do wyznaczenia wieku biologicznego i predyktorem ryzyka rozwoju chorób i przedwczesnego zgonu. Wiek biologiczny jest bardziej wiarygodnym markerem podatności na choroby i ryzyko przedwczesnej śmierci niż wiek chronologiczny, gdyż uwzględnia realne zmiany danego organizmu, a nie tylko te, które są typowe dla wieku. W celu określenia zmian zachodzących z wiekiem zebrano i opracowano wzorce zmian metylacji DNA i nazwano je zegarami epigenetycznymi. W Polsce żyje ok. 2700 stulatków, ale prognozuje się, że w roku 2040 będzie ich ponad 20 tys., a w 2060 ponad 65 tys., z czego 80 procent to kobiety (ZUS, Departament Statystyki i Prognoz Aktuarialnych). Osoby, które przeżyły 110 lat są nazywane superstulatkami. Wielokierunkowe badania parametrów fizycznych organizmu oraz zdolności poznawczych, pozwoliły stworzyć pewien profil cech związanych z długowiecznością. Badania na poziomie komórkowym pokazują, że u osób długowiecznych zmiany poziomu metylacji DNA następują wolniej, a u osób cierpiących na choroby wieku podeszłego zdecydowanie szybciej. Wiadomo już, jakie konkretnie czynniki środowiska i stylu życia wpływają na epigenom, które z nich są korzystne, a które szkodliwe dla organizmu. Pokazano również, że zmiany wywołane przez te czynniki mogą mieć charakter transgeneracyjny, czyli ujawniać się u potomstwa w kilku pokoleniach. Czy możemy świadomie wpływać na nasz epigenom? Czy możemy cofnąć ze-

gar epigenetyczny? Wiele dowodów wskazuje na to, że jest to możliwe i co ważniejsze, jest korzystne niezależnie od wieku w jakim podejmiemy taką próbę.

EPIGENETYKA – KLUCZ DO POZNANIA MECHANIZMU REGULACJI WIELU PROCESÓW BIOLOGICZNYCH

Termin epigenetyka został wprowadzony w 1942 roku przez Conrada Waddingtona, który w ten sposób próbował wyjaśnić różnorodność komórkową, tkankową oraz organogenezę, której punktem wyjścia jest jedna komórka, a wszystkie potomne posiadają taką samą sekwencję DNA (Deichmann 2016). Zaproponował, że jest jakiś mechanizm, niezależny od sekwencji DNA, który odpowiada za różną ekspresję genów i różną regulację procesów prowadzących do różnicowania. Jego definicja epigenetyki brzmiała „Epigenetyka to badanie zmian w funkcji genów, które są dziedziczone mitotycznie i/lub mejotycznie i które nie pociągają za sobą zmiany w sekwencji DNA”. Kilka lat później odkryto, że takim mechanizmem jest metylacja DNA (DNAm). Metylacja DNA polega na kowalencyjnym dołączeniu grupy metylowej do atomu węgla w pozycji 5 pierścienia pirymidynowego cytozyny (jedna z czterech zasad azotowych budujących DNA), co prowadzi do powstania 5-metylocytozyny (5mC). Metylacja dotyczy cytozyn w miejscach dinukleotydów CpG (cytozyna – guanina), które często zgrupowane są w tzw. wyspy CpG. Jak określono, genom ludzki zawiera ok. 28 mln dinukleotydów CpG, z czego 1–2% wszystkich CpG znajduje się w wyspach (CpG islands, CGI). W ludzkim genomie jest takich wysp CpG ok. 28 tys. i znajdują się one w promotorach 60–70% genów. Ustalono, że 60–80% wszystkich dinukleotydów CpG jest silnie zmetylowanych, a 70% wszystkich wysp jest niezmetrylowanych (Babenko i współaut. 2017; Raj 2018). Metylacja DNA jest głównym sposobem regulacji ekspresji genów. Jej skutkiem jest kondensacja chromatyny, brak zdolności do przyłączenia maszyny transkrypcyjnej i brak ekspresji genów. Metylacja jest bardzo trwałą modyfikacją i jej wzór może być dziedziczony przez komórki potomne. Rola metylacji DNA to przede wszystkim inaktywacja chromosomu X, rozwój zarodkowy, tzw. imprinting genowy, wyciszenie sekwencji powtórzonych, wyciszenie genów tkankowo-specyficznych i regulacja ekspresji genów wynikająca z metabolizmu komórki. Jednakże wzór metylacji jest również skorelowany z wiekiem i chorobami wieku podeszłego oraz zmienia się jako efekt różnych procesów patologicznych. Z wiekiem zmianie ulega około 1/3 miejsc metylacji całego genomu. Badania wykazały, że progresja zmian me-

tylacji DNA w czasie jest częściowo kontrolowana przez genom, ale ważniejszą rolę odgrywają czynniki środowiska. Biorąc pod uwagę istnienie specyficznych dla wieku różnic w metylacji DNA, zmiany w metylacji wybranych miejsc CpG posłużyły do opracowania zegara epigenetycznego. Zegar epigenetyczny, a raczej należałoby użyć liczby mnogiej, gdyż opracowano już ich znaczną liczbę, służy do przewidywania wieku chronologicznego (gdy nie jest on znany) oraz oszacowania wieku biologicznego z uwzględnieniem ryzyka wystąpienia pewnych chorób i prognozowania zdrowia i długości życia (ang. healthspan, lifespan). Wiek epigenetyczny szacuje się za pomocą odpowiedniego algorytmu matematycznego, przeliczając stan metylacji wybranych CpG w stosunku do liczby lat.

Za metylację DNA odpowiedzialne są enzymy, metylotransferazy (ang. DNA methyltransferases, DNMTs). Metylacja *de novo*, czyli w miejscach dotychczas niemetylowanych, jest przeprowadzana przez DNMT3A i DNMT3B. Natomiast w utrzymaniu już istniejącej metylacji i odwzorowaniu jej w nowo syntetyzowanym DNA w komórce potomnej bierze udział DNMT1. Z kolei demetylacja może być procesem aktywnym i dzieje się to np. przy udziale demetylaz TET 1–3 (ang. ten-eleven translocation), ale równie może odbywać się w sposób pasywny, np. w wyniku niższej aktywności DNMT1, jak ma to miejsce podczas replikacji (Simpson i Chandra 2021; Gensous i współaut. 2019).

Dopiero w latach 60. ubiegłego wieku odkryto, że nie tylko metylacja DNA reguluje ekspresję genów, ale również potranslacyjne modyfikacje histonów (ang. histone posttranslational modifications, PTM) są zaangażowane w zmiany struktury chromatyny, decydując o jej dostępności dla białek zaangażowanych w transkrypcję. W celu zmieszczenia w komórce długiej, bo aż dwumetrowej nici DNA, niezbędne jest jej odpowiednie upakowanie. Dzieje się to dzięki nawinięciu podwójnej helisy DNA na kompleksy białek histonowych. Tak powstają podstawowe jednostki strukturalne, nukleosomy, składające się z 147 par zasad i oktameru histonów (po dwie cząsteczki H2A, H2B, H3, H4), stabilizowane łącznikowym histonem H1. Modyfikacje histonów są bardziej dynamiczne, mniej trwałe niż DNA i mogą zachodzić na drodze metylacji, acetylacji, fosforylacji i ubikwitynacji. Jednakże główną rolę w regulacji ekspresji genów odgrywają dwie pierwsze modyfikacje. Modyfikacje dotyczą tzw. ogonów histonowych (ang. histone tails), czyli aminowego końca tych białek (tzw. N-końca), które wystają poza część rdzeniową nukleosomu i są łatwo dostępne dla enzymów modyfikujących. Modyfikacjom podlegają takie aminokwasy jak lizyna, arginina lub

seryna. Na podstawie dotychczasowej wiedzy dotyczącej regulacji ekspresji genów wynikającej z upakowania struktury chromatyny, najistotniejszą rolę odgrywa metylacja i acetylacja lizyn histonu H3 i w mniejszym stopniu H4. W pewnych przypadkach metylacja ta, podobnie jak w przypadku DNA, jest związana z wyciszeniem genów, ale w innych prowadzi do aktywności transkrypcyjnej. Decyduje o tym lokalizacja lizyny na ogonie histonu. Poza tym istotny jest również stopień metylacji. Łańcuch boczny lizyny może być mono-, di- i trimetylowany. Przykładem metylacji prowadzącej do aktywacji transkrypcji jest monometylacja lizyny 4 histonu 3 (H3K4me1), dotycząca głównie enhancerów (wzmacniaczy transkrypcji), trimetylacja lizyny 4 histonu 3 (H3K4me3), wykrywana głównie w promotorach, trimetylacja lizyny 36 histonu 3 (H3K36me3), obserwowana przede wszystkim w egzonach oraz di- i trimetylacja lizyny 79 histonu 3 (H3K79me2/3) wykrywana w całym obszarze kodującym genu. Za wyciszenie genów odpowiedzialne są trimetylacje lizyny 9 i 27 histonu 3 (H3K9me3 i H3K27me3) wykrywane najczęściej w promotorach, ale i ciałach nieaktywnych genów. Do enzymów modyfikujących histony należą: metylotransferazy histonów (ang. histone methyltransferases, HMTs), przyłączające grupę metylową, demetylazy histonów (ang. histone demethylases, HDMs) działające przeciwstawnie do HMTs, acetylotransferazy histonów (ang. histone acetyltransferases, HATs) przyłączające grupę acetylową oraz deacetylazy histonów (ang. histone deacetylases, HDACs) usuwające grupę acetylową. Do grupy HDACs należą także sirtuiny, które są uważane za enzymy wpływające na długowieczność (Gadecka i Bielak-Żmijewska 2019; Grabowska i współaut. 2017).

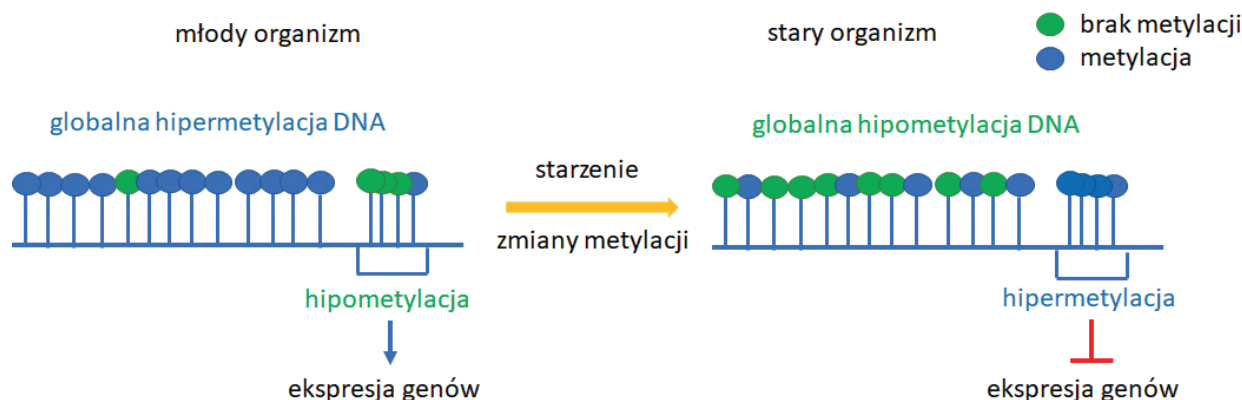
Metylacja histonów zmienia się z wiekiem oraz towarzyszy wielu stanom patologicznym. Jej zmiany

mogą być bardzo charakterystyczne dla konkretnych chorób i być również znacznikiem służącym do ich wykrywania lub przewidywania, gdy dotyczy to konkretnych genów zaangażowanych w rozwój choroby (Galow i Peleg 2022). Co więcej, wykazano, że metylacja histonów może być przekazywana następnym pokoleniom (Xavier i współaut. 2019).

Cechą charakterystyczną modyfikacji, zarówno DNA jak i histonów, jest ich odwracalność, co jest niezbędne przy dynamicznej regulacji ekspresji genów, ale również może umożliwiać odwrócenie niekorzystnych zmian, które powstały na skutek negatywnych oddziaływań czynników środowiska.

DYNAMIKA METYLACJI DNA I PTM HISTONÓW PODCZAS STARZENIA

W procesie starzenia dochodzi do licznych i powtarzalnych zmian w metylacji DNA, co wykorzystano w opracowaniu zegara epigenetycznego służącego do określania wieku biologicznego i ryzyka chorób. Wraz ze starzeniem spada globalny poziom metylacji DNA (dotyczy to szczególnie sekwencji repetytywnych), jednakże pewne rejony, w tym promotory genów odpowiedzialnych za proliferację, utrzymanie homeostazy komórki oraz kodujących czynniki transkrypcyjne, ulegają hipermetylacji, co skutkuje ich wyciszeniem (Ryc. 1). Dochodzi również do zmian w histonach (ilości, składzie, modyfikacji), czego skutkiem jest zmiana struktury chromatyny. Chromatynę można podzielić na konstytutywną (trwale skondensowaną, nieaktywną transkrypcyjnie) i fakultatywną (większa dynamika pomiędzy transkrypcją i jej brakiem), za co odpowiadają opisane powyżej modyfikacje DNA i histonów. Podczas starzenia dochodzi do spadku puli heterochromatyny konstytutywnej (centromery, telomery, rejony niekodujące, pozbawione genów), czyli takiej, która w młodej dzie-



Ryc. 1. Zmiana metylacji DNA zależna od wieku. Starzeniu towarzyszy globalna hipometylacja i lokalna hipermetylacja (wzorowane na Li i Tollefsbol 2016).

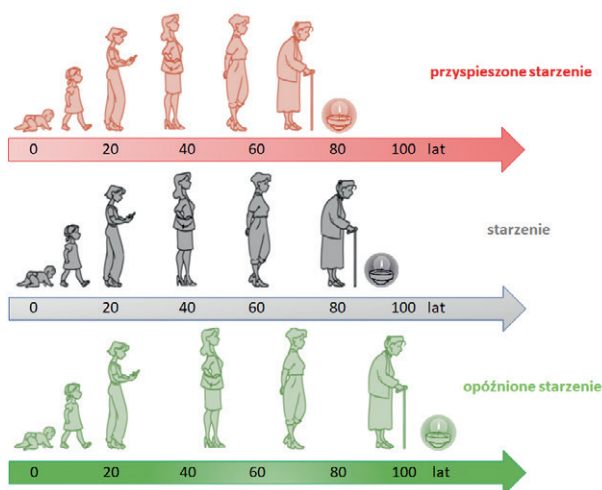
lącej się komórce jest silnie upakowana i nie ulega transkrypcji. Część chromatyny jest zorganizowana w specyficznych strukturach zwanych LADs (ang. lamin-associated domains). Są to miejsca nieaktywne transkrypcyjnie, powstałe z zakotwiczenia w otocze jądrowej fragmentów skondensowanej chromatyny, poprzez laminę tworzącą blaszkę jądrową. Ta organizacja zostaje zaburzona w starej komórce. Spada poziom laminy B1 i LADs odłączają się od blaszki jądrowej, czego efektem są zmiany uporządkowania chromatyny i ekspresji genów. Dochodzi do spadku ekspresji i poziomu histonów, gubienia nukleosomów oraz spadku poziomu znaczników heterochromatyny m.in. takich jak H₃K₉me₃ i H₃K₂₇me₃ (Ga-decka i Bielak-Zmijewska 2019).

Cały czas toczą się dyskusje czy zmiany w metylacji DNA są stochastyczne (losowe), czy można wykazać wzór metylacji specyficzny dla wieku. Nie można wykluczyć istnienia obydwu mechanizmów, dlatego dominuje pogląd, że zmiany we wzorze metylacji związane z wiekiem można podzielić na: losowe (zwane dryfem epigenetycznym) oraz specyficzne dla wieku, występujące w określonych lokalizacjach genomu i często wspólne dla różnych typów tkanek i komórek, choć obserwowano również zmiany metylacji, które były tkankowo specyficzne. Dodatkowym argumentem przemawiającym za specyficznnością metylacji związanej z wiekiem jest międzygatunkowa powtarzalność zmian wzoru metylacji (Maegawa i współaut. 2017). Wzór metylacji zmienia się wraz z wiekiem w odpowiedzi na róż-

ne bodźce środowiska. Co więcej, niektóre zmiany epigenetyczne mogą być powiązane z ryzykiem wystąpienia wielu chorób. Można uznać, że metylom (wzór metylacji) danego człowieka jest doskonałym odzwierciedleniem przeszłego narażenia na czynniki środowiskowe i jego odczyt może posłużyć do monitorowania stanu zdrowia w celu oszacowania przyszłego ryzyka choroby lub oczekiwanej długości życia.

WIEK BIOLOGICZNY A WIEK CHRONOLOGICZNY

Tak jak już wspomniano, proces starzenia poszczególnych osób odbywa się w różnym tempie, co pokazuje, że starzenie jest procesem bardzo plastycznym. Niektórzy wyglądają młodziej, inni starzej – mimo takiej samej liczby lat. W celu obiektywnej oceny stanu organizmu powinno się określić wiek biologiczny. Odnosi się on do rzeczywistych zmian w organizmie i jest miarą kondycji ciała w stosunku do wieku chronologicznego. Takie zmiany mogą być większe lub mniejsze niż obserwowane dla konkretnej grupy wiekowej, czyli charakterystyczne dla wieku. Poznanie wieku biologicznego może wskazać, czy starzenie jest przyspieszone, zgodne z normą czy zachodzi wolniej (Ryc. 2). Na ocenę wieku biologicznego składa się wiele różnych parametrów, a jednym ze sposobów opisanego go jest określenie zmian na poziomie epigenetycznym. DNAm jest proponowana jako potencjalny wskaźnik wieku biologicznego i stała się podstawą koncepcji zegara epigenetycznego. Analiza metylomu dużych populacji ludzi w różnym wieku pozwoliła stwierdzić, że stopień metylacji pewnych miejsc CpG w genomie jest ściśle związany z wiekiem i na ich podstawie można określić wiek oraz ocenić wiek biologiczny. Zegar epigenetyczny to nic innego jak zestaw/wzór zmian metylacji konkretnych CpG zachodzących w czasie, towarzyszących upływowi lat. Z kolei szybsze zmiany towarzyszą chorobom wieku podeszłego. Dzięki takim analizom udało się pokazać, że różne narządy starzeją się w różnym tempie, czyli wykazano, że nawet jeden organizm wykazuje narządowe zróżnicowanie wieku biologicznego. Na wiek biologiczny składają się mechanizmy zaangażowane w regulację różnych procesów związanych z rozwojem, uczeniem się, metabolizmem oraz rozwojem chorób, w tym nowotworów. Wiek biologiczny i tempo starzenia są zależne od zestawu naszych genów, ale ogromny wpływ ma środowisko i styl życia, które regulują ekspresję genów. Takie wnioski wyciągnięto na podstawie badania bliźniąt na różnych etapach ich życia (Declerck i Berghe 2018). Wykazały one, że zmienność metylacji DNA w zależności od



Ryc. 2. Osoby w tym samym wieku mogą różnić się zaawansowaniem procesów starzenia. Niektórzy starzeją się szybciej i wtedy mówimy o przyspieszonym starzeniu, inni wolniej – opóźnione starzenie. Na tempo starzenia składa się wiele czynników, które zostały zobrazowane na Rycinie 3. (zainspirowane Field i współaut. 2018).

wieku jest głównie wynikiem działania czynników środowiskowych. Odgrywają one dużo istotniejszą rolę niż czynniki genetyczne i mogą odpowiadać za nawet 90% zmian. Epigenetyczną ocenę wieku można uznać za analogiczny sposób oszacowania tempa starzenia, jak to ma miejsce w przypadku skracania telomerów. Telomery są powtarzalnymi sekwencjami obecnymi na końcach chromosomów i są nazywane replikometrem, czyli wyznacznikiem zdolności komórki do replikacji DNA. Jednakże te dwa sposoby oceny wieku (DNAm i długość telomerów) nie pokrywają się, co pokazano np. w przypadku zespołu kruchości (ang. fragility syndrome), który jest zależny od wieku epigenetycznego, ale nie od skracających się telomerów (Raj 2018).

Szczególnie wrażliwy na zmiany metylacji DNA pod wpływem bodźców środowiskowych jest rozwój prenatalny. Narażenie na czynniki wpływające na zmianę metylacji DNA w tym okresie może determinować przyszłe życie w zdrowiu lub chorobie. Co ciekawe, są dowody pokazujące, że takie zmiany mogą być dziedziczone przez następne pokolenia, co jasno pokazuje ich istotność na tle populacji. Na epigenom wpływa to co jemy, co bezpośrednio przekłada się na aktywację czy wyciszenie genów. Wpływ środowiska, które jest zanieczyszczone szkodliwymi związkami, zależnie od naszej woli (palenie) lub nie (tereny przemysłowe), może wynikać nie tylko z bezpośredniego uszkodzenia struktury DNA, ale również ze zmian epigenetycznych prowadzących do różnic w ekspresji genów. Ogromny wpływ, również bezpośredni, ma aktywność fizyczna, redukująca skutki niewłaściwej diety, zapobiegająca rozwojowi chorób nazywanych cywilizacyjnymi, a nawet chroniąca przed starzeniem komórek. Starzenie komórek, jak udowodniono, zmienia funkcjonalność tkanek i narządów i jest jedną z podstawowych przyczyn starzenia się organizmu i towarzyszy rozwojowi chorób wieku podeszłego (Baker i współaut. 2016; López-Otín i współaut. 2023).

ZEGARY EPIGENETYCZNE

W ciągu ostatnich kilkunastu lat opracowano liczne zegary epigenetyczne. Ażeby w pełni docenić przydatność różnych zegarów epigenetycznych, pomocne jest podzielenie ich na dwa typy. Zegary pierwszej generacji, służące do szacowania wieku chronologicznego oraz zegary nowej generacji, służące do przewidywania długości życia i ryzyka zgonu z powodu różnych przyczyn zdrowotnych. Zegary pierwszej generacji wykorzystują jednoetapowe szacowanie wieku, odnosząc je do wzorca zmian w metylacji DNA rozpoznanego dla dużej populacji w konkretnej grupie wiekowej. Taka metoda jest

bardziej pomocna w przypadku oceny wieku chronologicznego, gdy nie jest on znany, ale nadal pozostaje cennym sposobem oceny wieku biologicznego, ponieważ odchylenie od zmian typowych dla wieku chronologicznego może dostarczyć informacji o tempie starzenia danej osoby. Zegary następnej generacji wykorzystują dwuetapową ocenę w celu przewidywania długości życia (czas do śmierci) i zdrowia (śmiertelność z dowolnej przyczyny). Najpierw porównuje się dane dla osób w tym samym wieku chronologicznym, a następnie identyfikuje się specyficzne dla ryzyka śmiertelności miejsca CpG.

Pierwsze próby oceny wieku na podstawie zmian epigenetycznych miały miejsce kilkanaście lat temu. Zespół Bocklandta i współaut. (Bocklandt i współaut. 2011) zaproponował pierwszy predyktor oparty o metylację 88 miejsc CpG znajdujących się w obrębie 80 genów (lub w ich pobliżu), uznawanych za związane z wiekiem. Zostały one zidentyfikowane w ramach przesiewowych badań całego genomu (próbki śliny) u identycznych (monozygotycznych) par bliźniąt. Średnia dokładność szacowania wieku wyniosła 5,2 roku. W celu rozszerzenia analiz na inne tkanki, w tym samym roku Koch i Wagner wykorzystali 5 miejsc CpG, które były wspólne dla wielu komórek i tkanek (Koch i Wagner 2011).

Najbardziej rozpoznawalnymi badaczami zaangażowanymi w opracowanie zegara epigenetycznego jako sposobu na określanie wieku są Gregory Hannum i Steve Horvath (Hannum i współaut. 2013; Horvath 2013, Duan i współaut. 2022). Pierwszy z nich w 2013 roku zaproponował model do oceny wieku w próbkach krwi oparty na stopniu metylacji 71 miejsc CpG. Model ten cechował się dużą dokładnością, wykazując 96% korelację pomiędzy wiekiem rzeczywistym a przewidywanym, przy błędzie wynoszącym 3,9 roku. Zmiany w metylacji uwzględnionych miejsc CpG zostały również potwierdzone jako typowe dla innych tkanek. Model Hannuma obejmował dwa miejsca CpG genu *ELOVL2*, który jest powiązany z fotostarzeniem się ludzkiej skóry i jest obecnie uważany za jeden z najlepszych predyktorów ze względu na jego silną korelację z wiekiem. Z kolei zegar zaproponowany przez Horvatha uwzględnia 353 miejsc CpG i jest uniwersalny dla 51 tkanek i typów komórek, a jego dokładność wynosi 96%, przy błędzie 3,6 roku. Spośród CpG ustalonych przez Horvatha, pozytywnie korelują z wiekiem 193 miejsca (hipermetylowane) a 160 negatywnie (hipometylowane). Geny, których metylacja zmienia się z wiekiem, są zaangażowane w przeżycie i śmierć komórki, w jej podział i wzrost, w rozwój organizmu i tkanek oraz w proces nowotworzenia. Horvath stworzył przyjazny dla użytkownika internetowy kalkulator, który może ocenić wiek epigenetyczny

i ewentualne jego przyspieszone tempo. Ogólnie rzecz biorąc, 353 miejsca CpG zegara Horvatha mają tę samą charakterystykę, co specyficzne miejsca CpG związane z wiekiem opisane przez Hannuma. Dodatkowo skorelowane miejsca CpG to np. docelowe geny grupy Polycomb (ang. Polycomb Repressive Complex 1, 2 – represyjny kompleks PRC1 i PRC2 zaangażowany w regulację transkrypcji). Co zaskakujące, miejsca CpG zegara nie pokrywały się z genami, których poziom ekspresji jest skorelowany z wiekiem. Sześć miejsc CpG było wspólnych dla zegara epigenetycznego Horvatha i Hannuma. W 2014 roku Weidner i współaut. podjęli próbę opracowania modelu mniej kosztownego i mniej czasochłonnego (Weidner i współaut. 2014). Wykorzystali komórki krwi i model składający się ze 102 miejsc CpG związanych z wiekiem, który wykazał 98% korelację pomiędzy wiekiem szacunkowym a rzeczywistym i średni błąd wynoszący 3,34 roku. Po modyfikacji zmniejszono liczbę CpG do 99 związanych z wiekiem, a zgodność wynosiła 87% z błędem 4,12 roku.

Zegary pierwszej generacji nie umożliwiały znalezienia związku między przyspieszonym starzeniem a różnymi chorobami. Celem stało się więc opracowanie modeli oceny ryzyka zachorowania. Poszukiwano miejsc CpG, których poziom metylacji, lepiej niż czas chronologiczny, odzwierciedla zmiany fizjologiczne wśród osób w tym samym wieku. Takiego zadania podjął się Zhang i współaut., którzy zidentyfikowali 58 miejsc CpG związanych ze śmiertelnością z różnych przyczyn. Ostatecznie wykorzystano 10 starannie wybranych miejsc CpG (ocena ryzyka 0–10), stanowiących silny czynnik prognostyczny śmiertelności z dowolnej przyczyny, chorób układu krążenia i nowotworów (Zhang i współaut. 2017a). Do opracowania kolejnych zegarów epigenetycznych drugiej generacji wykorzystano miejsca CpG, których stopień metylacji był powiązany z klinicznymi biomarkerami przeżycia. Do takich narzędzi należy zegar zaproponowany przez Levine'a i współaut. Opracowali oni epigenetyczny sposób oceny wieku fenotypowego, służący przewidywaniu ryzyka zgonu, jak i zachorowalności na różne choroby. Nazwany przez nich zegar PhenoAge (od "phenotypic age") opiera się na wybranym zestawie 513 miejsc CpG i mierzy oczekiwaną długość życia. PhenoAge wykazał silny związek z różnymi chorobami wieku podeszłego. Przyjęto, że roczny wzrost metylacji DNA mierzonej PhenoAge przekładał się na 4,5% wzrost ryzyka zgonu z jakiegokolwiek przyczyny (Levine i współaut. 2018, Noroozi i współaut. 2021). Twórcy PhenoAge twierdzą, że dzięki temu zegarowi można rozróżnić epigenetyczny odcisk palca osób, które nigdy nie paliły, obecnych i byłych palaczy, ale nie jest on powiązany z liczbą lat pale-

nia (Levine i współaut. 2018). Inny zegar, stworzony przez Lu i współaut. i nazwany GrimAge, uwzględnia 1030 CpG i przeznaczony jest do przewidywania wieku fenotypowego, długości trwania w zdrowiu, długości życia i ryzyka zgonu (Lu i współaut. 2019). Warto jeszcze wspomnieć o DunedinPoAm, pochodzącego od "Pace-of-Ageing" (PoA), który uwzględnia 46 miejsc CpG i mierzy tempo starzenia uzyskane na podstawie danych dotyczących zmian 18 biomarkerów klinicznych u osób w tym samym wieku (Simpson i Chandra 2021). Zarówno PhenoAge, jak i GrimAge są doskonałymi biologicznymi estymatorami wieku do przewidywania długości zdrowia i życia. Predyktory wieku na podstawie metylacji DNA stworzone przez Hannuma i Horvatha nie korelują z długością telomerów, ale stanowią niezależne narzędzie oceny wieku chronologicznego (Galkin i współaut. 2023). Niedawne badania wykazały, że wzór związanych z wiekiem zmian metylacji DNA jest wysoce zachowany u trzech gatunków ssaków (myszy, małpy i człowieka). Mianowicie związane z wiekiem zmiany metylacji miejsc CpG wykazują ten sam wzór dystrybucji genomowej, są zlokalizowane w genach zaangażowanych w podobne szlaki sygnałowe a hipermetylacji ulegają te same promotory (Declerck i Berghe 2018). Zegary i sposoby oceny wieku biologicznego i ryzyka wystąpienia chorób są nieustannie doskonalone. Przyczyniają się do tego liczne badania różnych zespołów oraz coraz większe możliwości techniczne.

BIOLOGICZNE ZNACZENIE ZEGARA EPIGENETYCZNEGO

Zegar epigenetyczny jest doskonałym narzędziem o dużym znaczeniu biologicznym. Przemawia za tym fakt, że czynniki, o których wiadomo, że wpływają na długość życia, w tym dieta matki i potomstwa, ograniczenie kalorii, niefunkcjonalne receptory hormonu wzrostu oraz interwencje chirurgiczne i farmakologiczne, takie jak usunięcie jajników czy leczenie rapamycyną, również wydają się mieć wpływ na wiek epigenetyczny. W ciągu ostatnich kilku lat podjęto wiele wysiłków w celu wykorzystania znaczników metylacji DNA do oceny tempa starzenia, przyspieszonego starzenia oraz jako predyktora podatności na rozwój chorób i ryzyka przedwczesnego zgonu.

Wykorzystując stan metylacji wielu powiązanych z wiekiem miejsc CpG, opracowano różne zastosowania zegara epigenetycznego. Jednym z ważniejszych jest identyfikacja przyspieszonego starzenia (EAA, ang. epigenetic age acceleration). Dodatnia wartość EAA jest wskaźnikiem wyższego wieku biologicznego niż wynika z wieku chro-

nologicznego i jest powiązana z ryzykiem wystąpienia różnych schorzeń związanych z wiekiem i, co więcej, ze śmiertelnością z różnych przyczyn. Ujemny EAA wskazuje na wolniejsze starzenie się niż by oczekiwano. Pokazano, że EAA oznaczane przy wykorzystaniu zegarów drugiej generacji jest bardzo precyzyjnym wskaźnikiem długości życia i zdrowia (Noroozi i współaut. 2021, Zhang i współaut. 2017b). Jednakże oszacowane za pomocą zegarów Hannuma i Horvatha dodatnie EAA również zostało powiązane z przyczynami śmierci. Zegar epigenetyczny stworzony przez Horvatha wykorzystano w określaniu wskaźnika EAA w różnych zaburzeniach u ludzi. Na przykład wykazano istotny związek pomiędzy EAA a częstością występowania raka płuc, zwłaszcza wśród osób powyżej 70. roku życia lub obecnie palących papierosy. Epigenetyczne tempo starzenia jest w istotny sposób powiązane z płcią i rasą. Wykazano, że tempo zmian metylacji (stosunek przewidywanego wieku metylacji do wieku chronologicznego) jest szybsze u mężczyzn niż u kobiet, co może w pewien sposób tłumaczyć dłuższy średni wiek życia kobiet (w najstarszej grupie wiekowej 80% stanowią kobiety). Badanie związku między wysokim BMI (ang. Body Mass Index) a wiekiem epigenetycznym w różnych tkankach, w tym we krwi, wątrobie, mięśniach i tkance tłuszczowej, ujawniło pozytywną korelację w tkance wątrobowej, wykazując wzrost wieku epigenetycznego o 1–3 lata na każde 10 jednostek BMI (Horvath i współaut. 2014; Galkin i współaut. 2023). Z kolei przyspieszone starzenie epigenetyczne zaobserwowane w korze przedczołowej, pozytywnie korelowało ze stopniem odkładania się amyloidu i zdolnościami poznawczymi związanymi z chorobą Alzheimera (AD, ang. Alzheimer disease). W neurodegeneracyjnej chorobie Parkinsona, wiek epigenetyczny układu odpornościowego jest znacznie zwiększony i najsilniej dotyczy to granulocytów (Noroozi i współaut. 2021). Pokazano również, że zmiany metylacji są szybsze w przypadku tkanki zajętej przez nowotwór niż tkanki zdrowej, oraz że zmiany obserwowane podczas starzenia i w tkance nowotworowej wykazują duże podobieństwo. Na przykład hipermetylowane miejsca CpG zlokalizowane w promotorach i genach docelowych białek grupy Polycomb towarzyszą zarówno starzeniu i nowotworzeniu, co sugeruje związek między starzeniem się a nowotworzeniem poprzez metylację DNA.

Wykazano, że na wskaźnik EAA wpływają pewne wydarzenia, styl życia i czynniki środowiskowe. Postuluje się, że analiza takich zmian metylacji może być pomocna w wykryciu przyspieszonego starzenia, co może pomóc odkryć jego przyczynę i zahamować tempo zmian, a nawet odwrócić negatywne

skutki na poziomie epigenetycznym. Cennym sposobem wykorzystania zegara epigenetycznego jest możliwość przewidywania podatności na rozwój pewnych typów schorzeń, co może uchronić przed ich wystąpieniem poprzez wprowadzenie środków zaradczych (zmiana stylu życia, podjęte leczenie). W meta-badaniu, na podstawie czterech badań kohortowych przeprowadzonych w populacji osób starszych, każdy wzrost różnicy pomiędzy wiekiem epigenetycznym a chronologicznym o pięć lat, wiązał się z 21% wzrostem ryzyka zgonu po uwzględnieniu wieku i płci (Duan i współaut. 2022).

Badając pary bliźniąt stwierdzono, że wzór metylacji DNA wskazujący na przyspieszone tempo starzenia jest wysoce dziedziczny. Jednakże w późniejszym życiu ma to już mniejsze znaczenie, co sugeruje, że znaczenie czynników pozagenetycznych wzrasta wraz z wiekiem. Dziedziczenie zwiększonego tempa starzenia zarówno Horvath, jak i Hannum, oszacowali u dorosłych na 40%. Jednakże uważają oni, że na te 40%, oprócz czynników genetycznych, składają się również czynniki pozagenetyczne, bo jak już wcześniej pisano, udział czynników środowiskowych może stanowić nawet 90%. W tym względzie zdania są jednak podzielone i część badaczy uważa, że genetyczne wpływy to 30%, a środowiskowe 70%. W 69% przypadków bliźniak z wyższym wiekiem epigenetycznym zmarł jako pierwszy. Co więcej, im większe różnice wieku epigenetycznego między bliźniakami, tym większe prawdopodobieństwo śmierci starszego epigenetycznie bliźniaka. Bardziej zaawansowany wiek epigenetyczny często wiązał się ze zgonem z powodu nowotworów i chorób układu krążenia. W badaniach kohortowych bliźniąt stwierdzono również, że ryzyko zgonu wzrasta o 35% na każde 5 lat wzrostu wieku epigenetycznego. Ponieważ bliźnięta są w tym samym wieku chronologicznym, im większa różnica w DNAm pomiędzy bliźniętami, tym większe ryzyko śmierci starszego epigenetycznie bliźniaka (Duan i współaut. 2022). I odwrotnie, stwierdzono, że dłuższe życie jest powiązane z wolniejszymi zmianami epigenetycznymi. Semistulatki (105–109 lat) są młodsi epigenetycznie o 8,6 lat, niż wynikałoby to z ich wieku chronologicznego. Co więcej, ich potomstwo (w wieku 50–89 lat) ma o 5,1 roku niższy wiek epigenetyczny niż dobrana pod względem wieku grupa kontrolna (Morris i współaut. 2019). Przyjmuje się, że przyspieszenie starzenia o 5 lat zwiększa ryzyko śmierci o 16% (Raj 2018).

Ocena wieku na podstawie DNAm ma jeszcze jedno praktyczne wykorzystanie. Jest użytecznym biomarkerem wieku w dochodzeniach kryminalistycznych. Zdolność do wiarygodnego przewidywania wieku na podstawie śladowego DNA może

być bardzo cenna przy charakteryzowaniu śladów pochodzących od nieznanego dawcy. Dla celów kryminalistycznych praktyczne są kompaktowe modele umożliwiające przewidywanie wieku na podstawie małej liczby markerów i niewielkiej ilości DNA, a kilka takich modeli zostało już zaproponowanych dla różnych tkanek (Zbieć-Piekarska i współaut. 2015).

WPŁYW ŚRODOWISKA – OD BODŹCA DO REGULACJI EPIGENOMU

Jak już wspomniano, choć starzejemy się wszyscy, to starzenie organizmu jest procesem bardzo plastycznym. Nie możemy zatrzymać, a tym bardziej cofnąć zegara chronologicznego, ale możemy to zrobić z zegarem epigenetycznym. Mamy ogromny wpływ na to, jak szybko i w jaki sposób się starzejemy. Decyduje o tym w znacznym stopniu nasz styl życia. Już nikt nie ma wątpliwości, że środowisko wpływa na zmiany zachodzące na poziomie epigenetycznym. Wszystkim schorzeniom wieku podszłego towarzyszą zmiany DNAm i coraz częściej uważa się, że nie są one skutkiem, ale przyczyną schorzeń (Galow i Peleg 2022). Do najważniejszych czynników wpływających na tempo naszego starzenia oraz stan zdrowia należą: dieta, aktywność fizyczna, profilaktyka zdrowotna, umiejętność radzenia sobie ze stresem, unikanie ekspozycji na związki toksyczne dla organizmu (np. alkohol, papierosy) oraz satysfakcjonujące kontakty społeczne. W przypadku wszystkich tych czynników wiadomo już, że mają wpływ na epigenom. Ten wpływ dotyczy zarówno modyfikacji histonów jak i metylacji DNA. Wcielając w życie prawidłowe zasady stylu życia, możemy w dużej mierze spowolnić proces starzenia jak i uniknąć wielu chorób. Wpływ na przyspieszenie starzenia mają: siedzący tryb życia, brak snu, palenie, spożywanie wysoko przetworzonej żywności, alkohol i stres. Starzenie przyspieszają również przebyte choroby, w tym nowotworowe i skutki chemo- i radioterapii oraz infekcje wirusowe. Jest jednak dobra wiadomość: możliwe jest odwrócenie niekorzystnego wzoru metylacji DNA.

DIETA A EPIGENETYKA

Związki zawarte w diecie mogą wpływać na epigenom poprzez regulację enzymów wpływających na metylację DNA i histonów oraz przez dostarczenie donorów grup metylowych. Co więcej, takie zmiany są przekazywane potomstwu i mogą wpływać na zdrowie więcej niż jednego pokolenia potomków. Ważne jest nie tylko co jemy, ale również, ile. Jedną z lepiej przebadanych strategii poprawy zdrowia i wydłużenia życia u organizmów modelowych jest

restrykcja kaloryczna (ang. caloric restriction, CR). Jest ona jedną z najintensywniej badanych a zarazem najskuteczniejszych niegenetycznych i niefarmakologicznych interwencji środowiskowych w celu wydłużenia życia, w tym życia w zdrowiu. Polega ona na zmniejszeniu ilości spożywanych kalorii przy zachowaniu wszelkich niezbędnych elementów pokarmowych i sprawdziła się w przypadku gryzoni oraz naczelnych. O ile CR działa pozytywnie, to głód jest niewątpliwie czynnikiem o negatywnym działaniu. W przypadku człowieka CR jest trudna do przeprowadzenia, choć istnieją obiecujące dane, uzyskane podczas badań klinicznych, pokazujące jej dobroczynny wpływ zarówno na zdrowie jak i DNAm. Badania pokazują pewne pozytywne zmiany adaptacyjne wynikające z umiarkowanej restrykcji kalorycznej u ludzi. Zaobserwowano poprawę zdrowia oraz łagodzenie zmian wynikających z nieprawidłowego metabolizmu i zaburzonej gospodarki hormonalnej przyczyniających się do patogenezy cukrzycy typu II, chorób układu krążenia i nowotworów. Pokazano, że CR redukuje skutki chorób przewlekłych, które są główną przyczyną niepełnosprawności i śmiertelności. I, co najważniejsze, pokazano, że restrykcja kaloryczna jest związana z wolniejszymi zmianami na poziomie epigenetycznym (Gensous i współaut. 2019).

Istnieją również inne dowody, w tym przykłady z historii, kiedy z powodu wojen restrykcja kaloryczna była niejako wymuszona. Zaobserwowano, że osoby poddane takim ograniczeniom kalorycznym cechowały się dłuższym życiem. Takie obserwacje poczyniono w Danii podczas I wojny światowej, gdzie efektem dwuletniej restrykcji żywieniowej, ale nie prowadzącej do głodu tylko do redukcji ilości pożywienia, był 34% spadek śmiertelności. W Norwegii podczas II wojny światowej, mieszkańcy Oslo byli poddani 20% redukcji kalorycznej przez 4 lata, co obniżyło śmiertelność o 30% w porównaniu do stanu sprzed wojny. Z kolei na japońskiej wyspie Okinawa, której mieszkańcy spożywają ok. 17% mniej kalorii niż mieszkańcy innych regionów Japonii i o 40% mniej niż w USA, odnotowano zwiększenie średniej długości życia. Na wyspie Okinawa żyje bardzo wysoki odsetek stulatków, a o prawdopodobnych przyczynach tego zjawiska będzie mowa w dalszej części artykułu. Należy podkreślić, że we wszystkich wymienionych powyżej przypadkach, była to redukcja ilości pożywienia przy zachowaniu niezbędnych substancji odżywczych i nie wiązała się z długotrwałym głodem (Most i współaut. 2017).

Dopiero pod koniec XX wieku odkryto powiązania łączące dietę z epigenetyką. Bardzo spektakularnym przykładem na pokazanie tej zależności są myszy posiadające specyficzny wariant genu wpły-

wającego na kolor sierści, genu nazywanego Agouti, a konkretnie wersji znanej jako Avy (agouti viable yellow). Jeśli gen Avy jest niemetylowany lub hipometylowany, to jest on aktywny transkrypcyjnie, co objawia się żółtym kolorem sierści, ale z tym związana jest również skłonność do rozwoju chorób, takich jak otyłość, cukrzyca czy niektóre nowotwory. Jednakże, gdy gen Avy jest hipermetyleowany, mysz ma brązowy kolor i nie ma żadnych problemów zdrowotnych. Istnieje też wariant pośredni myszy o cętkowanej sierści i adekwatnej do koloru sierści podatności na rozwój chorób. Jest to dowód na to, że ten sam identyczny genetycznie miot myszy różni się kolorem w zależności od spektrum zmian epigenetycznych występujących podczas rozwoju w macicy. Gdy żółte ciężarne samice myszy agouti były karmione związkiem chemicznym BPA (bisfenol A), wpływało to na hipometylację genu Avy, myszy potomne były żółte oraz podatne na choroby. Gdy samice otrzymywały suplementację związkami będącymi donorami grup metylowych, np. witaminy z grupy B lub genisteiną (fitoestrogen), miało to korzystny wpływ na potomstwo, które posiadało brązową sierść i było zdrowe (zmniejszało się ryzyko występowania otyłości, cukrzycy i nowotworów). Jednakże taka dieta nie miała wpływu na fenotyp matki (Bernal i współaut. 2010; Dolinoy i współaut. 2006). Inny przykład pokazujący hipometylujący wpływ BPA, związku obecnego w powszechnie używanych przedmiotach i wykrywanego w moczu u ponad 93% ludzi, na potomstwo i jego cechy behawioralne stanowią badania epidemiologiczne pokazujące korelację między poziomem BPA w czasie ciąży a aktywnością, stanami lękowymi i depresją u potomstwa. Bezpośrednim dowodem na wpływ BPA były badania z udziałem myszy. Samice przed zajściem w ciążę karmiono BPA w dawce powodującej podobne stężenie tego związku w surowicy, jakie oznaczano u ludzi. Kolejne pokolenia nie były narażone na BPA. Przebadano pierwsze i trzecie pokolenie pod kątem kontaktów społecznych i zachowań lękowych. Wykazano, że narażenie na BPA podczas ciąży ma długotrwały wpływ międzypokoleniowy, co przejawiało się zaburzonymi zachowaniami socjalnymi (Wolstenholme i współaut. 2013). Innym związkiem hipometylującym DNA jest alkohol. Przyspieszenie wieku epigenetycznego u osób regularnie pijących alkohol wynosi średnio 2,2 roku. Jest to zależne od rodzaju spożywanego alkoholu—o ile alkohol wysokoprocentowy i piwo są powiązane z wyższym wiekiem epigenetycznym, to spożycie wina nie wykazuje takiego związku (Galkin i współaut. 2023). Negatywne skutki spożycia alkoholu w czasie ciąży, prowadzące do specyficznych cech fenotypowych, badano z wykorzystaniem mysiego modelu, w którym matka

miała możliwość spożywania *ad libitum* 10% etanolu przez pierwsze 8 dni ciąży. Ten okres związany jest z tworzeniem układu nerwowego i odpowiada początkowi czwartego tygodnia po zapłodnieniu u człowieka. W tym okresie następuje dynamiczne przeprogramowanie epigenetyczne i wykazano, że narażenie na etanol we wczesnej ciąży może powodować zmiany w metylacji DNA, ekspresji genów oraz w strukturze i funkcjonowaniu mózgu potomstwa (Marjonen i współaut. 2015).

Spektakularnym przykładem z historii obrazującym znaczenie diety człowieka i jej bezpośredni wpływ na epigenom, a nawet na następne pokolenia, jest holenderska zima głodu (1944/45), w efekcie której w maju 1945 roku zmarło ok. 20 000 Holendrów (Abraham i współaut. 2023). Oficjalnie dzienna racja żywnościowa spadła poniżej 370 kalorii. Dzięki zaawansowanym praktykom rejestracyjnym, uzyskane dane zapewniły epidemiologom możliwość zbadania tego na swój sposób naturalnego eksperymentu. Pojawiła się możliwość analizy długoterminowych skutków głodu matki, przekładającego się na prenatalne niedożywienie potomstwa oraz poznanie wpływu na zdrowie w późniejszym jego życiu. Zaobserwowano, że urodzone w trakcie trwania głodu dzieci, charakteryzowały się mniejszą wagą urodzeniową i skłonnością do posiadania nadmiaru tkanki tłuszczowej po narodzinach. Co ciekawe, taka tendencja utrzymywała się przez kolejne dwa pokolenia, czyli dotyczyła wnuków kobiet poczętych w okresie głodu. Osoby, których matki głodowały będąc z nimi w ciąży, wykazywały się gorszą tolerancją glukozy, częstszym zapadaniem na cukrzycę typu II, miały trzy razy większe ryzyko choroby wieńcowej, która dodatkowo pojawiała się w młodszym wieku, zwiększony poziom „złego” cholesterolu, zmienioną krzepliwość krwi, częstsze występowanie choroby płuc i nerek. Kobiety poczęte w okresie głodu częściej bywały otyłe i były bardziej narażone na raka piersi. Taka zmiana była obserwowana tylko w przypadku, gdy matki doświadczyły głodu w pierwszych 10 tygodniach ciąży. Brak było takiego efektu w bardziej zaawansowanej ciąży. Udało się znaleźć przyczynę tego długotrwałego efektu. Była nią zmniejszona metylacja jednego z genów kodujących białko podobne do insuliny. Zmiany metylacji, które zaszły w tym genie, zachowały się przez 70 lat (Painter i współaut. 2005). Jest to pierwsze tego typu potwierdzenie hipotezy, że wpływ środowiska w życiu płodowym jest w stanie zmienić epigenom na całe życie. Wykazano bezsprzecznie, że zmiany zachodzące na poziomie epigenetycznym są przekazywane potomstwu.

Wracając do restrykcji kalorycznej, pokazano, że reguluje ona zarówno metylację DNA, jak i mo-

dyfikacje histonów. Ograniczenie kalorii osłabia związane z wiekiem zmiany metylacji i zmniejsza wiek epigenetyczny u różnych organizmów (Gensous i współaut. 2019). Zmniejszone spożycie kalorii o 40% u myszy obniżyło ich wiek epigenetyczny od 0,8 do 1,7 roku, w zależności od tkanki (przy średnim wieku chronologicznym wynoszącym 2,8 roku). U małych reżusów średni wiek chronologiczny to 27 lat, a ograniczenie kalorii o 30% spowodowało o 7 lat młodszy wiek epigenetyczny (Maegawa i współaut. 2017). Podstawowe mechanizmy interwencji dietetycznych obejmują metaboliczne szlaki sygnałowe, w które zaangażowane są: insulina/IGF (ang. insulin/insulin-like growth factor), mTOR (ang. mechanistic target of rapamycin), AMPK (ang. AMP-activated protein kinase), sirtuiny oraz FOXO (ang. Forkhead box class O) i o których wiadomo, że są powiązane z regulacją mechanizmów epigenetycznych (López-Otín i współaut. 2023). Są to tzw. szlaki regulowane przez substancje odżywcze (ang. nutrient-sensing pathways) i zostały zidentyfikowane jako regulatory starzenia, gdyż oddziaływanie na nie wydłuża życie np. u myszy (Simpson i Chandra 2021). Pokazano, że sygnalizacja mTOR reguluje metabolizm, który zapewnia dostępność donorów grupy metylowej. Sirtuiny działają jako białka sygnalizacyjne, ale również jako deacetylazy histonów. Wykazano, że podwyższona ekspresja SIRT1 ma związek z wydłużaniem życia wywołanym CR. U szczurów restrykcja kaloryczna spowodowała zwiększoną ekspresję SIRT1 oraz wzrost poziomu metylacji histonu H3 na lizynach 9. i 27. (H3K9 i H3K27). Podobnie, ograniczenie kalorii u starych myszy spowodowało zwiększenie poziomu SIRT1 w wątrobie i zwiększony poziom acetylacji histonu H3 na lizynach 9., 14. i 27. (H3K9, H3K14 i H3K27) w genach regulowanych przez rytm okołodobowy, co wpływało na ich aktywację (Galow i Peleg 2022).

Uważa się, że wydajność mechanizmów odpowiedzialnych za metylację spada z wiekiem. Tak więc suplementacja diety związkami bogatymi w donory grup metylowych jest cennym sposobem ochrony np. przed rozwojem choroby Alzheimera czy chorób serca. Taka dieta wpływa również na wytwarzanie dopaminy i adrenaliny w mózgu, które odpowiadają za energię, kondycję psychiczną, koncentrację i nastrój, chroniąc przed powiązaną z wiekiem depresją i demencją (Bekdash 2019). Właściwa zawartość związków bogatych w donory grup metylowych może wspierać prawidłową metylację. Składników pokarmowych dostarczających grupy metylowe jest bardzo dużo i są łatwo dostępne w powszechnie spożywanych warzywach, owocach, jajach, rybach. Należą do nich m.in.: kwas foliowy, witamina B6, witamina B12, metionina, cholina oraz S-adenozyl-

ometionina (SAM-e) (Gadecka i Bielak-Żmijewska 2019). Ponadto spożywanie wystarczającej ilości probiotyków, pomagających wytwarzać i wchłaniać witaminy z grupy B oraz cynk i magnez, również wspomaga metylację. Również aktywatory enzymów zaangażowanych w metylację są dobrym wsparciem dla spadającej z wiekiem ich aktywności. Przykładem może być wspomniana już grupa enzymów nazywanych sirtuinami, których aktywność jest zależna od poziomu NAD⁺ (Grabowska i współaut. 2017). Ich aktywność związana jest z utrzymaniem homeostazy organizmu i sprzyja zdrowemu i długiemu życiu. U człowieka znanych jest 7 sirtuin. Znajdują się one w różnych organellach komórkowych i w cytoplazmie i są odpowiedzialne za odpowiedź na stres oksydacyjny, biorą udział w naprawie DNA, utrzymaniu integralności genomu oraz w regulacji struktury chromatyny i ekspresji genów. Wykazano, że poziom dwóch najistotniejszych sirtuin, sirtuiny 1 i 6 (SIRT1 i SIRT6) spada z wiekiem. Aktywność sirtuin zależy od dostępności pożywienia. Gdy jest go dużo, stosunek NAD⁺ do NADPH zmniejsza się, a aktywność sirtuin spada. Mechanizm polegający na zwiększonym poziomie NAD⁺ może być, między innymi, przyczyną sukcesu restrykcji kalorycznej lub okresowych głodówek, na co wskazują liczne badania. Sirtuiny poprzez deacetylację histonów (co jest niezbędne do ich późniejszego metylowania) biorą udział w tworzeniu heterochromatyny. SIRT1 preferencyjnie deacetyluje m.in. H4K16, H3K9, H3K56, H3K14. Ponadto wpływa na kondensację chromatyny (wyciszenie genów) poprzez regulację ekspresji histonów oraz poziomu i aktywności enzymów zaangażowanych w modyfikację niektórych histonów, w tym hamuje degradację metylotransferazy Suv39h1 i zwiększa jej aktywność. Z kolei SIRT6 deacetyluje głównie H3K9 w regionach promotorowych genów zaangażowanych w regulację metabolizmu. Uważa się również, że poprzez deacetylację H3K9 w obszarach telomerowych może chronić komórki przed dysfunkcją telomerów. SIRT6 powoduje zahamowanie ekspresji genu kodującego IGF-1. Ścieżka sygnałowa IGF-1/insulina jest jednym z lepiej rozpoznanych celów w opóźnianiu starzenia. Wykazano, że polimorfizm ludzkiego genu kodującego receptor IGF-1 jest związany z długowiecznością, a niskie stężenie IGF-1 w surowicy jest predyktorem dalszego przeżycia w przypadku ludzi długowiecznych. Przy braku aktywnej SIRT6, promotor tego genu jest dostępny dla maszyny transkrypcyjnej i dochodzi do syntezy IGF-1. Wysoki poziom białek pozytywnie regulujących ścieżki IGF/IGF-1 sprzyja chorobom serca, otyłości, rozwojowi cukrzycy typu II i przyspiesza starzenie. Tak więc umiarkowane ilości pokarmu lub przyjmowane w diecie związki będące aktywatorami

sirtuin, wpływają na zmniejszoną dostępność promotora genu IGF-1. Jak już wspomniano, restrykcja kaloryczna ma odmładzający wpływ na epigenom, ale podobne znaczenie mogą mieć związki naśladujące efekty CR, do których zaliczamy wiele polifenoli roślinnych, których dobroczynne działanie jest również powiązane z aktywacją sirtuin. Polifenole roślinne (np. kurkumina, resweratrol czy kwercetyna, ale i wiele innych) oprócz szeroko opisywanej aktywności przeciwoksydacyjnej, ochronie przed uszkodzeniami makrocząsteczek w komórce, w tym DNA, są aktywatorami różnych klas enzymów biorących udział zarówno w metylacji DNA i histonów jak i deacetylacji histonów i białek niehistonowych, w tym omawianych powyżej sirtuin (Grabowska i współaut. 2017). Więcej informacji o roli polifenoli w regulacji procesu starzenia znajduje się w pracy zamieszczonej w tym numerze (Magdalena Dudkowska, Kosmos nr 4/23)

Niemal wszystkie rodzaje zegarów epigenetycznych pokazują, że zwierzęta poddane restrykcji kalorycznej są epigenetycznie młodsze niż osobniki nie poddane CR (Gensous i współaut. 2019). Wykazano, że restrykcja kaloryczna chroni przed związanymi z wiekiem zmianami w metylacji DNA u ssaków i dotyczy to różnych tkanek, takich jak krew, wątroba, nerki i mózg (hipokamp i mózdzek).

Jest jeszcze jeden aspekt dietetyczny, o którym warto wspomnieć, a mianowicie wpływ diety na mikrobiom. Mikrobiom to mikroorganizmy, takie jak bakterie i grzyby, które żyją w symbiozie z organizmem człowieka i innych zwierząt m.in. w przewodzie pokarmowym (Gadecka i Bielak-Żmijewska 2019). Liczne badania pokazują, że mikrobiom wpływa na żywiciela poprzez oddziaływanie na jego epigenom i reguluje różne procesy metaboliczne, wpływając na ekspresję genów. Skład mikrobiomu jest bardzo indywidualny, ale może na niego wpływać płeć, dieta, aktywność fizyczna, zażywane lekarstwa i środowisko w jakim żyjemy. Mikrobiom zmienia się z wiekiem, ale również w stanach patologicznych. Dotyczy to liczby i różnorodności gatunków bakterii. Efektem tego jest zaburzenie równowagi między bakteriami komensalnymi na korzyść patobiontów, które wytwarzają substancje hamujące wzrost pożytecznych bakterii, produkują toksyny i powodują rozwój stanu zapalnego. Skutkiem postępującej dysbiozy jest pogorszenie zdrowia i rozwój związanych z wiekiem schorzeń, takich jak choroby układu krążenia, choroby neurodegeneracyjne (choroba Alzheimera i Parkinsona), cukrzyca typu II, przewlekła obturacyjna choroba płuc (POChP), osteoporoza, pewne typy nowotworów, ale również otyłość, alergie i depresja. Mikrobiom może wpływać na symptomy związane z zespołem kruchości, na który

składają się między innymi sarkopenia, osłabiona odporność i zmniejszone funkcje poznawcze. Skład mikrobiomu jest również swojego rodzaju prognozą zdrowia. Wykazano, że w interakcji między gospodarzem a mikrobiomem może pośredniczyć SIRT1 i na tej drodze dochodzi do regulacji ekspresji genów. Sugeruje się, że SIRT1 przez wpływ na mikroflorę jelitową zapobiega zapaleniu jelit, ale z drugiej strony, mikrobiom reguluje ekspresję SIRT1 poprzez regulację mikroRNA (negatywna regulacja). Ponadto sirtuiny mogą być bezpośrednio regulowane przez krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (ang. short chain fatty acids, SCFA), które są wytwarzane przez mikroflorę. Zdrowa mikroflora jelitowa wytwarza znaczne ilości kwasu foliowego i witaminy B12, które są donorami grupy metylowej niezbędnej do metylacji DNA. Mikrobiom bierze udział w przetwarzaniu polifenoli roślinnych do aktywnych i biodostępnych metabolitów i nawet uważa się, że dobroczynne działanie polifenoli odbywa się przez oddziaływanie na mikrobiom. Niektóre z tych metabolitów są aktywne epigenetycznie i mogą przyczyniać się do zmian w strukturze chromatyny poprzez wpływ na aktywność i ekspresję enzymów, na przykład deacetylaz histonowych i metylotransferaz DNA. Z drugiej strony, polifenole modulują mikrobiom, ponieważ mogą wywierać działanie podobne do prebiotyków i sprzyjać wzrostowi niektórych gatunków bakterii. Co więcej, dieta matki wpływa nie tylko na jej mikrobiom, ale i płodu, przyczyniając się w ten sposób do zdeterminowania stanu zdrowia w późniejszym życiu zarówno matki, jak i potomstwa (Marín-Tello i współaut. 2022; Bankole i współaut. 2022). Ponadto należy wspomnieć, że mikrobiom wpływa również na globalną acetylację i metylację histonów poprzez niskocząsteczkowe metabolity i SCFA (Galow i Peleg 2022).

AKTYWNOŚĆ FIZYCZNA A EPIGENETYKA

Codzienny ruch podnosi odporność na stres, poprawia nastrój i pozwala utrzymać w dobrej kondycji układ mięśniowo-szkieletowy oraz przeciwdziała starzeniu i chorobom przewlekłym. Ćwiczenia poprawiają odporność na stres oksydacyjny, chronią tkankę tłuszczową przed starzeniem komórkowym i syntezą czynników prozapalnych indukowanych niewłaściwą dietą (Zhang i współaut. 2022). Ćwiczenia uruchamiają mechanizmy odpowiedzialne za ochronę przed skutkami działania bodźców prowadzących do starzenia komórkowego, w tym uszkodzeń DNA, upośledzenia funkcji mitochondriów, nadmiernej produkcji wolnych rodników oraz stanu zapalnego. Można wręcz powiedzieć, że ćwiczenia

są naturalnym senolitykiem, czyli czynnikiem prowadzącym do eliminacji starych komórek przez komórki układu odpornościowego. Ćwiczenia zapobiegają więc zarówno starzeniu jak i akumulacji komórek starych, co skutecznie obniża ryzyko wystąpienia i rozwoju chorób wieku podeszłego. Również sirtuiny są aktywowane podczas aktywności fizycznej, co pokazuje, że ćwiczenia bezpośrednio wpływają na epigenom, a SIRT1 jest proponowana jako główny regulator dobroczynnego efektu ćwiczeń (Radak i współaut. 2020).

Aktywność fizyczna, poprzez działanie na ścieżki sygnałowe związane z modyfikacjami epigenetycznymi, w tym DNAm, powoduje cofnięcie zmian towarzyszących chorobom neurodegeneracyjnym, reguluje plastyczność mózgu i redukuje stan zapalny (Xu i współaut. 2021). Wykazano, że zwiększona ekspresja β -sekreazy i preseniliny 1 (składnik kompleksu γ -sekreazy) podczas rozwoju AD, odbywa się na drodze epigenetycznej i jest wynikiem hipometylacji genu, bądź enhancera. Zwiększony poziom tych enzymów, zarówno sekreazy β jak i γ , sprzyja odkładaniu neurotoksycznego beta amyloidu ($A\beta$). Najbardziej istotnym klinicznie, genetycznym czynnikiem ryzyka sporadycznej choroby Alzheimera jest mutacja genu APOE. Badania pokazały, że wyższy poziom DNAm w obrębie regionu promotorowego genu APOE, zwiększa ryzyko demencji i AD. Zidentyfikowano ok. 130 genów, których ekspresja jest różna u osób cierpiących na AD i zdrowych, co ściśle wiąże się z metylacją DNA. Zarówno badania przedkliniczne jak i kliniczne pokazały, że aktywność fizyczna jest skutecznym i bezpiecznym wsparciem, a nawet strategią terapeutyczną u chorych cierpiących na AD. Łagodzi objawy choroby i opóźnia utratę funkcji poznawczych. Zaobserwowano, że u myszy stanowiących model choroby AD, już po 10 tygodniach ćwiczeń doszło do znacznej redukcji dwóch głównych biomarkerów AD, czyli zagregowanego $A\beta$ i fosforylowanego białka Tau. Inne przykłady, omówione bardziej szczegółowo w pracy Haupt i współaut. (Haupt i współaut. 2022), analizujące wpływ ćwiczeń na epigenom człowieka, pokazują pozytywne działanie aktywności fizycznej, chociaż wiele analiz przeprowadzono na niewielkich grupach badawczych.

ŚRODOWISKO A EPIGENETYKA

Środowisko to nie tylko bezpośrednie oddziaływanie składników diety i narażenie na szkodliwe substancje, ale również stres powodowany różnymi czynnikami fizycznymi i chemicznymi, którego efektem jest wywołanie lęku, lub przeżyciami wzbudzającymi silne emocje. Stres, którego skutki gromadzą się

z wiekiem, ma negatywny wpływ na długość życia i jest na trwałe wpisywany w epigenom. Uważa się, że wywołana skumulowanym stresem nieprawidłowa sygnalizacja glukokortykoidów zmienia DNAm w miejscach, które pokrywają się z lokalizacją epigenetycznych znaczników starzenia. W efekcie stresu doświadczanego w ciągu całego życia, można obserwować do 3,6 lat różnicy w wieku biologicznym, a traumatyczne przeżycia (badania holenderskich żołnierzy biorących udział w wojnie w Afganistanie), przyspieszały starzenie epigenetyczne o 2 lata (Galkin i współaut. 2023). Z kolei stres doświadczony w dzieciństwie na skutek depresji opiekunów, przyspiesza epigenetyczne starzenie o 1,8 roku w momencie osiągnięcia dorosłości, w porównaniu do dorosłych dzieci rodziców, którzy nie cierpieli na depresję. Ponadto bycie ofiarą przemocy wiąże się również z wyższym wiekiem epigenetycznym dzieci. Sporo czasu minęło zanim otrzymano dowody na to, że doświadczenia nabyte przez rodziców przed poczęciem potomstwa mogą być przekazywane na następne pokolenie. Udowodniono, że nie tylko narażenie rodziców na działanie toksyn, ale również doświadczenia wynikające z traumatycznych przeżyć, które mogą być ostrzeżeniem dla potomstwa przed konkretnym niebezpieczeństwem wynikającym z czynników środowiska, są dziedziczne i oparte o zmiany DNAm. Efektem jest ogólnie zwiększona wrażliwość na stres oraz niepokój u potomstwa. Aby to udowodnić, wykorzystano molekularną specyficzność węchową myszy. Przed poczęciem potomstwa zwierzęta były poddane warunkowaniu strachem przy jednoczesnej ekspozycji na zapach. Wykazano, że ich potomstwo, a dotyczyło to dwóch następnych pokoleń, miało zwiększoną wrażliwość behawioralną na zapach uwarunkowaną u rodziców, mimo iż same nie były nigdy wystawione na połączenie zapachu z negatywnym bodźcem powodującym strach. Nie dotyczyło to innych zapachów. Gdy do warunkowania strachu wykorzystano zapach acetofenonu, który aktywuje znany receptor węchowy (Olfr151), przełożyło się to na aktywację tego szlaku u potomstwa dwóch następnych pokoleń. Badania pokazały, że przyczyną była hipometylacja CpG genu Olfr151, a transgeneracyjne zmiany były dziedziczone poprzez gamety rodzicielskie (Dias i Ressler 2014). Międzypokoleniowe dziedziczenie epigenetyczne cech behawioralnych, morfologicznych i metabolicznych pokazuje istotność wpływu środowiska na epigenom, jego trwałość oraz uświadamia, jak może determinować podatność na choroby lub EAA.

Palenie tytoniu pozostawia długoterminowy ślad w metylacji DNA i to właśnie zmieniona DNAm jest jednym z potencjalnych mechanizmów odpowiedzialnych za predyspozycje palaczy do pewnych

chorób, takich jak nowotwory, osteoporoza, choroby płuc i zaburzenia układu krążenia. Palenie zwiększa wiek epigenetyczny nabłonka dróg oddechowych i tkanki płuc o 4–5 lat. Porównując osoby palące z osobami nigdy nie palącymi wykryto różnice w metylacji 2623 miejsc CpG (1405 genów). Geny przypisane do tych miejsc CpG powiązane z kilkoma cechami związanymi z paleniem, uwzględniając czynność płuc, nowotwory, choroby zapalne i choroby serca. Pozwoliło to zidentyfikować 185 miejsc CpG, które różniły się między aktualnymi palaczami a osobami nigdy nie palącymi. Palenie papierosów ma szeroki wpływ na stopień metylacji całego genomu, a różnice w DNAm utrzymują się w konkretnych miejscach przez wiele lat po rzuceniu palenia. Wykazano, że po zaprzestaniu palenia wzór zmienionej metylacji odwraca się w komórkach nabłonkowych dróg oddechowych, które starzeją się w normalnym tempie, choć ślad palacza i przyspieszone starzenie nadal jest obserwowane w tkance płuc (Joehanes i współaut. 2016; Galkin i współaut. 2023).

Palenie tytoniu przez kobiety w ciąży powoduje zmiany epigenetyczne nie tylko u matki, ale i płodu, a zmiany DNAm związane z paleniem przez matkę są przyczyną powikłań porodowych, utrzymują się w dzieciństwie i wiążą się z późniejszym upośledzeniem rozwoju dziecka (Nakamura i współaut. 2021). Efekty epigenetyczne wynikające z palenia przez matkę w czasie ciąży należą do najczęściej badanych epidemiologicznie zmian na poziomie epigenetycznym. Skutki są bardzo powtarzalne. A problem jest niebagatelny, gdyż dane mówią, że zależnie od kraju od 7 do 16% przyszłych matek pali w ciąży. Wykazano, że u kobiet w ciąży metabolizm nikotyny jest wyższy. Kobiety palące tyton w czasie ciąży są bardziej narażone na zapalenie płuc, grypę, zapalenie oskrzeli i choroby serca niż kobiety niepalące w ciąży. Ponadto doświadczają częściej powikłań, takich jak ciąża pozamaciczna, wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrostu oraz przedwczesny poród. Skutki palenia przez matkę w ciąży przekładają się na mniejszą masę urodzeniową dziecka, zaburzony rozwój układu oddechowego i nerwowego. Ponadto zwiększają późniejsze ryzyko nadużywania substancji psychoaktywnych, podnoszą skłonność do otyłości w późniejszym życiu, powodują nieprawidłowe funkcjonowanie układu odpornościowego, problemy z zachowaniem i trudności w nauce oraz zwiększają ryzyko ADHD. W kilku badaniach przedstawiono również dowody na to, że palenie tytoniu w czasie ciąży może mieć skutki wielopokoleniowe w postaci zwiększonego ryzyka astmy u wnuków palącej kobiety, niezależnie od tego, czy ich matka paliła papierosy czy nie. Badania pokazały, że ponad 6000 miejsc CpG jest inaczej zmetylowanych

w komórkach pobranych z krwi pępowinowej, gdy matka paliła w ciąży. Co więcej, blisko 3000 z nich było zlokalizowanych w 2000 genach, których wcześniej nie wiązano z paleniem tytoniu przez matkę w ciąży. Zbadano również związek między miejscami CpG, których metylacja związana jest z dymem tytoniowym, a stanem chromatyny w organizmie matki. Analizowano dwie modyfikacje histonów charakteryzujące chromatynę aktywną transkrypcyjnie (H3K4me1 i H3K27ac) oraz dwie chromatynę nieaktywną (H3K9me3 i H3K27me3). Wykazano, że u dzieci matek palących, chromatyna wykazywała cechy hipometylacji. Ostatnie badania sugerują odwracalność DNAm wynikających z narażenia na dym tytoniowy i pokazują, że może to mieć pozytywny efekt, gdy rezygnacja z palenia ma miejsce przed zajściem w ciążę, ale i podczas jej trwania. Choć pewna liczba specyficznych zmian w DNAm jest odwracalna, ślad epigenetyczny tworzony przez palenie pozostaje wykrywalny (Nakamura i współaut. 2021).

WSPÓLDZIAŁANIE RÓŻNYCH ELEMENTÓW SKŁADAJĄCYCH SIĘ NA ZDROWY STYL ŻYCIA

Jak opisano powyżej, istnieje bezpośrednie powiązanie epigenetyki z preferowanym przez nas trybem życia. To bardzo dobra wiadomość, gdyż daje nadzieję na to, że możemy w dość świadomy sposób regulować tempo starzenia, poprzez wpływ na metylację DNA, modyfikacje histonów, a tym samym na ekspresję genów. Możemy zwolnić tempo naszego zegara epigenetycznego, a nawet go cofnąć i uchronić się przed licznymi schorzeniami, których największym czynnikiem ryzyka jest wiek. I co ważniejsze, możliwości regulacji jest dużo i ich współdziałanie może kompleksowo wpływać na tempo starzenia, na co są spektakularne przykłady. Wspominano już o społeczności wyspy Okinawa, gdzie żyje najwięcej stulatków na świecie. Nie tylko żyją oni o wiele dłużej, ale też rzadziej chorują niż reszta Japończyków. Okinawa zaliczana jest do tzw. błękitnych stref, których zidentyfikowano pięć na świecie (inne to Ikaria, Grecja; prowincja Nuoro na Sardynii, Włochy; półwysep Nicoya, Kostaryka i Loma Linda, Kalifornia USA) (Most i współaut. 2017; Pes i współaut. 2022). We krwi mieszkańców Okinawy wykrywany jest niższy poziom wolnych rodników odpowiedzialnych za starzenie się komórek, kobiety łagodnie przechodzą menopauzę i niewiele osób cierpi na demencję. To doskonały przykład, jak łączenie diety i stylu życia może wpływać na długość życia i stan zdrowia. Nie należy zapominać, że pewne znaczenie może mieć restrykcja kaloryczna, która dotknęła mieszkańców wyspy podczas II wojny światowej, ale nie

można tylko temu czynnikowi przypisać sukcesu długowieczności. Mieszkańcy Okinawy zdradzają, co jest dla nich źródłem satysfakcji, szczęścia i nadaje ich życiu sens oraz je wydłuża: ruch, dieta, więzi społeczne, pasja i „szczęście z bycia stale zajęтым”. Podobny przepis na długie zdrowe życie mają mieszkańcy Sardynii, kolejnej błękitnej strefy. Ich sekret na zostanie stulatkiem to rodziny wielopokoleniowe mieszkające razem, nie przejadanie się, dieta z niewielką ilością mięsa, bogata w warzywa i owoce. Poza tym dużo ruchu i częste spotkania z przyjaciółmi (Most i współaut. 2017).

MODYFIKACJE HISTONÓW TEŻ MOGĄ BYĆ PRZEKAZYWANE POTOMSTWU

Najwięcej danych dotyczących dziedziczenia zmian epigenetycznych pochodzi z badań metylacji DNA. Ale jest coraz więcej dowodów, że modyfikacje histonów też mogą być przekazywane transgeneracyjnie (Xavier i współaut. 2019). Po raz pierwszy doniesienia o przenoszeniu epigenetycznych modyfikacji histonów na następne pokolenia wykryto u nicienia *Caenorhabditis elegans*. Zmiany w statusie metylacji lizyny 4 histonu H3 (H3K4) u rodziców zostały przekazane potomstwu i wpływały na zmiany w jego płodności i długowieczności. U ludzi i myszy zmiany w metylacji H3K4 i H3K27 w linii zarodkowej ojca wpływają na ogólną strukturę chromatyny w gametach i na regiony promotorowe genów niezbędnych w rozwoju zarodkowym. Modyfikacje histonów obejmują również wymianę histonów rdzeniowych na wariant H3.3, co powoduje przebudowę chromatyny plemników i wpływa na ekspresję genów w zarodku. Takie zmiany mogą być fatalne w skutkach i prowadzić do zwiększonego ryzyka wczesnej śmierci zarodka wynikającej z niestabilności genomu. Kiedyś uważano, że w dojrzewających plemnikach dochodzi do usunięcia wszystkich histonów i zastąpienia ich protaminami. Jednakże obecne dane pokazują, że około 1–2% genomu jądrowego plemników u myszy i 4–15% u ludzi nie podlega takiej wymianie, co pozostawia specyficznie zmetylowane histony. Na przykład H3K27me3 jest wykrywane w plemnikach człowieka i wpływa na zahamowanie transkrypcji podczas gametogenezy i wczesnego rozwoju zarodkowego. Ale jest to stosunkowo mało poznany proces (Xavier i współaut. 2019).

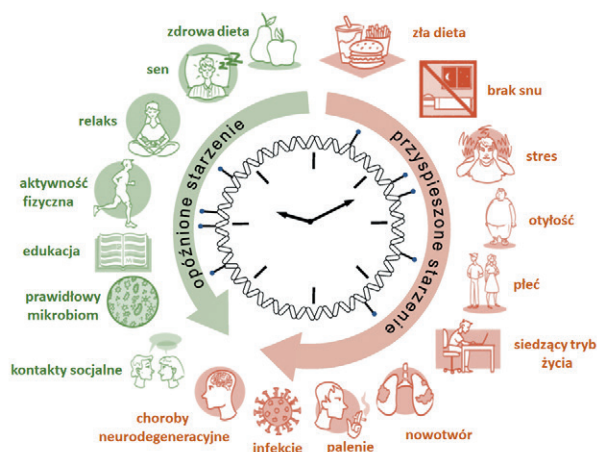
COFNAĆ ZEGAR EPIGENETYCZNY – SPOSÓB NA PRZEDŁUŻONĄ MŁODOŚĆ

Dobra wiadomość jest taka, co już podkreślano wcześniej, że możemy cofnąć negatywne zmiany

na poziomie epigenetycznym wygenerowane przez wcześniejszy nieprawidłowy tryb życia i/lub wiek. Wykazano, że zaprzestanie palenia powoduje odwrócenie zmian na poziomie znaczników epigenetycznych i po pięciu latach od rezygnacji, poziom metylacji CpG wraca do prawie takiego, jaki jest obserwowany u osób niepalących. Odwracalność zależnej od wieku metylacji pokazano w wielu badaniach. Podjęto już pierwsze próby wdrożenia zgromadzonej wiedzy dotyczącej stylu życia w celu spowolnienia starzenia się ludzi. Przeprowadzono badanie kliniczne z udziałem mężczyzn w wieku 50–72 lat, obejmujące ośmiotygodniowy program z wykorzystaniem zoptymalizowanej diety, uzupełnionej o wskazówki dotyczące snu, regularne ćwiczenia i sposoby uwalniania od stresu. Efekty były co prawda obiecujące, gdyż średnie obniżenie wieku epigenetycznego, mierzonego w oparciu o zegar Horvatha, wynosiło 3,23 roku, ale taki efekt zaobserwowano u ok 50% uczestników badania (Fitzgerald i współaut. 2021). Odwracalność DNAm, czyli spowolnienie starzenia epigenetycznego poprzez zmianę stylu życia, pokazano w badaniach z udziałem zdrowych kobiet po menopauzie. Badano wpływ diety i aktywności fizycznej na ryzyko wystąpienia raka piersi. DNAm mierzono na początku badania i po 24 miesiącach. Dieta znacznie przyczyniła się do spowolnienia zmian DNAm badanych zegarem GrimAge, natomiast zwiększenie aktywności fizycznej doprowadziło do znacznej redukcji kluczowych znaczników epigenetycznych charakterystycznych dla szlaków związanych z nowotworami (Fiorito i współaut. 2021). Badania pokazują, że modyfikacja wzoru DNAm może działać odmładzająco, prowadzić do regeneracji tkanek i chronić przed starzeniem komórkowym (Galkin i współaut. 2023). Interwencje mające na celu redukcję stresu również mogą mieć pozytywny wpływ na epigenetyczne markery starzenia. Na przykład medytacja zmniejsza wiek epigenetyczny, przy czym każdy rok praktykowania medytacji jest równoznaczny z obniżeniem wieku biologicznego o 0,24 roku (Galkin i współaut. 2023). Co ciekawe, złe samopoczucie psychiczne może mieć jeszcze bardziej szkodliwe skutki, przekładające się na tempo starzenia, niż palenie. Dzięki zastosowaniu zegarów epigenetycznych w psychologii udowodniono, że znaczenie utrzymywania zdrowia psychicznego dla osiągnięcia zdrowej długowieczności jest bardzo istotnym elementem. Inne badanie przeprowadzono z udziałem 220 dorosłych o prawidłowej masie ciała, u których zastosowano 25% restrykcję kaloryczną (w praktyce było to ok. 12%) i porównano z grupą bez żadnych ograniczeń żywieniowych (Johnson i współaut. 2022). Badania trwały 2 lata. Poza utratą masy ciała i poprawą

parametrów układu sercowo-naczyniowego, badania epigenetyczne wykazały, że osoby poddane CR starzeją się wolniej i wiek biologiczny zwiększył się tylko o 0.11 roku w stosunku do grupy kontrolnej, gdzie wzrósł on o 0.71 roku. W badaniach z udziałem polskich naukowców, 120 zdrowych osób starszych z Włoch i z Polski zostało przez rok poddanych diecie śródziemnomorskiej (Johnson i współpółaut. 2022). Z wykorzystaniem klasycznego modelu Horvatha zmierzono ich wiek epigenetyczny (pełna krew) w punkcie startu i na końcu badania. Mimo różnic wynikających z narodowości i płci wykazano, że u badanych osób z Polski doszło do zredukowania wieku epigenetycznego o 0,84 roku. Co ciekawe, w przypadku kobiet było to 1,47 roku. Skuteczność interwencji cofających zegar epigenetyczny budzi nadzieję na możliwość kontroli i odwracalność zmian, co przyczynić się może do zdrowszego i dłuższego życia (Duan i współpółaut. 2022).

Na rycinie 3 zebrano czynniki, które powodują przyspieszenie i spowolnienie procesu starzenia.



Ryc. 3. Czynniki wpływające na tempo starzenia – zielone – opóźniające starzenie, czerwone – przyspieszające starzenie. Starzenie może być wolniejsze gdy: stosowana jest zdrowa dieta, sen jest odpowiednio długi i spokojny, towarzyszy nam codzienna aktywność fizyczne i ruch, skutecznie umiemy radzić sobie ze stresem, posiadamy prawidłowy mikrobiom, satysfakcjonujące relacje społeczne oraz przywiązujemy wagę do edukacji. Starzenie jest szybsze: gdy dieta jest nieodpowiednia, przy podniesionym BMI, nieodpowiedniej jakości i długości snu, gdy cierpimy na choroby neurodegeneracyjne, infekcje wirusowe, prowadzimy siedzący tryb życia, jesteśmy płci męskiej, palimy oraz towarzyszy nam stres. Przyspieszone starzenie jest również skutkiem przebytych nowotworów (skutki radio- i chemio terapii) (zainspirowane Declerck i Berghel 2018).

PODSUMOWANIE

Metylacja DNA zmienia się z wiekiem i towarzyszy różnym schorzeniom, w tym chorobom wieku podeszłego. Ale jest również wskaźnikiem narażenia na różnego typu negatywne bodźce środowiska wynikające ze stylu życia, diety, przyjmowanych używek i traumatycznych doświadczeń. Co więcej, zmiany w metylacji DNA mogą być dziedziczone przez więcej niż jedno pokolenie potomne i mogą być przyczyną zwiększonego ryzyka wystąpienia pewnych schorzeń, a nawet powodować zmiany behawioralne potomstwa. Znaczniki zegara epigenetycznego uwzględniającego zmiany metylacji mają zastosowanie jako biomarkery tempa starzenia, podatności na choroby wieku podeszłego i ryzyko zgonu. Mogą pozwolić przewidzieć stan zdrowia i określić ryzyko wystąpienia pewnych chorób. I co ważne, mogą być wykorzystane jako wskaźnik do zaproponowania zmian w stylu życia, a także służyć do monitorowania zdrowego starzenia i oceny skuteczności wdrożonych interwencji. Gromadzona wiedza empiryczna pokazuje, że regulacja epigenetyczna jest jednym z podstawowych mechanizmów determinujących stan zdrowia i ryzyko wystąpienia choroby oraz udowadnia, jak potężnym sprzymierzeńcem naszego epigenomu jesteśmy my sami. Czy rzeczywiście epigenetyka jest kluczem do zrozumienia starzenia? Wydaje się bardzo prawdopodobnym, że ma kluczowe znaczenie w regulacji długości życia, a za dowód niech posłuży najbardziej spektakularny jej przykład ze świata owadów. Pszczoły (*Apis mellifera*) na drodze właśnie mechanizmu epigenetycznego budują kastową społeczność. Królowa żyje na ogół 3–5 lat, ale może i 8, podczas gdy robotnice żyją zwykle tylko 6 tygodni w okresach żerowania i mogą osiągnąć 0,9 roku w zimnych porach roku. I królowa i robotnice mają ten sam genom, różnią się tylko lub, jak widać aż, epigenomem (Galkin i współpółaut. 2019).

PODZIĘKOWANIA

Podziękowania dla Karoliny Mosieniak, autorki wszystkich piktogramów, które znalazły się w rysunkach niniejszej pracy.

LITERATURA

Abraham M. J., Sherbini A. E., El-Diasty M., Askari S., Szewczuk M. R., 2023. *Restoring Epigenetic Reprogramming with Diet and Exercise to Improve Health-Related Metabolic Diseases*. *Biomolecules* 13(2):318. DOI: 10.3390/biom13020318

- Babenko V. N., Chadaeva I. V., Orlov Y. L., 2017. *Genomic landscape of CpG rich elements in human*. BMC Evol Biol 17(Suppl 1):19. DOI: 10.1186/s12862-016-0864-0
- Baker D. J., Childs B. G., Durik M., Wijers M. E., Sieben C. J., 2016. *Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan*. Nature 530, 184–189. DOI: 10.1038/nature16932
- Bankole T., Winn H., Li Y., 2022. *Dietary Impacts on Gestational Diabetes: Connection between Gut Microbiome and Epigenetic Mechanisms*. Nutrients 10;14(24):5269. DOI: 10.3390/nu14245269
- Bekdash R.A., 2019. *Neuroprotective Effects of Choline and Other Methyl Donors*. Nutrients 11(12):2995. DOI: 10.3390/nu11122995
- Bernal A., Jirtle R. L., 2010. *Epigenomic disruption: the effects of early developmental exposures Birth Defects*. Res A Clin Mol Teratol 88(10):938–44. DOI: 10.1002/bdra.20685
- Bocklandt S., Lin W., Sehl M. E., Sanchez F. J., Sinshheimer J. S., i współaut., 2011. *Epigenetic predictor of age*. PLoS One 6, e14821. DOI: 10.1371/journal.pone.0014821
- Declerck K., Berghe W. V., 2018. *Back to the future: Epigenetic clock plasticity towards healthy aging*. Mech Ageing Dev 174:18–29. DOI: 10.1016/j.mad.2018.01.002
- Deichmann U., 2016. *Epigenetics: The origins and evolution of a fashionable topic*. Dev Biol. 416(1):249–254. DOI: 10.1016/j.ydbio.2016.06.005
- Dias B. G., Ressler K. J., 2014. *Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations*. Nat Neurosci 17(1):89–96. DOI: 10.1038/nn.3594
- Dolinoy D. C., Weidman J. R., Waterland R. A., Jirtle R. L., 2006. *Maternal genistein alters coat color and protects Avy mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome*. Environ Health Perspect 114(4):567–72. DOI: 10.1289/ehp.8700
- Duan R., Fu Q., Sun Y., Li Q., 2022. *Epigenetic clock: A promising biomarker and practical tool in aging*. Ageing Res Rev 81:101743. DOI: 10.1016/j.arr.2022.101743
- Field A. E., Robertson N. A., Wang T., Havas A., Ideker T., 2018. *DNA Methylation Clocks in Aging: Categories, Causes, and Consequences*. Mol Cell 71(6):882–895. DOI: 10.1016/j.molcel.2018.08.008
- Fiorito G., Caini S., Palli D., Bendinelli B., Saieva C., 2021. *DNA methylation-based biomarkers of aging were slowed down in a two-year diet and physical activity intervention trial: the DAMA study*. Aging Cell 20(10):e13439. DOI: 10.1111/accel.13439
- Fitzgerald K. N., Hodges R., Hanes D., Stack E., Cheishvili D., 2021. *Potential Reversal of Epigenetic Age Using a Diet and Lifestyle Intervention: A Pilot Randomized Clinical Trial*. Aging (Albany NY) 13(7):9419–9432. DOI: 10.18632/aging.202913
- Gadecka A., Bielak-Zmijewska A., 2019. *Slowing Down Ageing: The Role of Nutrients and Microbiota in Modulation of the Epigenome*. Nutrients 11(6):1251. DOI: 10.3390/nu11061251
- Galkin F., Zhang B., Dmitriev S. E., Gladyshev V. N., 2019. *Reversibility of irreversible aging*. Ageing Res Rev 49:104–114. DOI: 10.1016/j.arr.2018.11.008
- Galkin F., Kovalchuk O., Koldasbayeva D., Zhavoronkov A., Bischof E., 2023. *Stress, diet, exercise: Common environmental factors and their impact on epigenetic age*. Ageing Res Rev 88:101956. DOI: 10.1016/j.arr.2023.101956
- Galow A. M., Peleg S., 2022. *How to Slow down the Ticking Clock: Age-Associated Epigenetic Alterations and Related Interventions to Extend Life Span*. Cells 11(3):468. DOI: 10.3390/cells11030468
- Gensous N., Franceschi C., Santoro A., Milazzo M., Garagnani P., 2019. *The Impact of Caloric Restriction on the Epigenetic Signatures of Aging*. Int J Mol Sci. 20(8):2022. DOI: 10.3390/ijms20082022
- Grabowska W., Sikora E., Bielak-Zmijewska A., 2017. *Sirtuins, a promising target in slowing down the ageing process*. Biogerontology 18(4):447–476. DOI: 10.1007/s10522-017-9685-9
- Hannum G., Guinney J., Zhao L., Zhang L., Hughes G., i współaut., 2013. *Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates*. Mol Cell 49(2):359–367. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.10.016
- Haupt S., Niedrist T., Sourij H., Schwarzingger S., Moser O., 2022. *The Impact of Exercise on Telomere Length, DNA Methylation and Metabolic Footprints*. Cells 11(1):153. DOI: 10.3390/cells11010153
- Horvath S., 2013. *DNA methylation age of human tissues and cell types*. Genome Biol 14(10):R115. DOI: 10.1186/gb-2013-14-10-r115
- Horvath S., Erhart W., Brosch M., Ammerpohl O., von Schonfels W., i współaut., 2014. *Obesity accelerates epigenetic aging of human liver*. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 111, 15538–15543. DOI: 10.1073/pnas.1412759111
- Joehanes R., Just A. C., Marioni R. E., Pilling L. C., Reynolds L. M., i współaut., 2016. *Epigenetic Signatures of Cigarette Smoking*. Circ Cardiovasc Genet. 9(5):436–447. DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.116.001506
- Johnson A. A., English B. W., Shokhirev M. N., Sinclair D. A., Cuellar T. L., 2022. *Human age reversal: Fact or fiction?* Aging Cell 21(8):e13664. DOI: 10.1111/accel.13664
- Koch C. M., Wagner W., 2011. *Epigenetic-aging-signature to determine age in different tissue-*

- es. Aging (Albany NY) 3, 1018. DOI: 10.18632/aging.100395
- Levine M. E., Lu A. T., Quach A., Chen B. H., Assimes T. L., i współaut., 2018. *An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan*. Aging (Albany NY) 10, 573. DOI: 10.18632/aging.101414
- Li Y., Tollefsbol T. O., 2016. *Age-related epigenetic drift and phenotypic plasticity loss: implications in prevention of age-related human diseases*. Epigenomics 8(12):1637–1651. DOI: 10.2217/epi-2016-0078
- López-Otín C., Blasco M. A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G., 2023. *Hallmarks of aging: An expanding universe*. Cell 186(2):243–278. DOI: 10.1016/j.cell.2022.11.001
- Lu A. T., Quach A., Wilson J. G., Reiner A. P., Aviv A., i współaut., 2019. *DNA methylation GrimAge strongly predicts lifespan and healthspan*. Aging 11, 303–327. DOI: 10.18632/aging.101684
- Maegawa S., Lu Y., Tahara T., Lee J. T., Madzo J., 2017. *Caloric restriction delays age-related methylation drift*. Nat Commun 8(1):539. DOI: 10.1038/s41467-017-00607-3
- Marín-Tello C., Jintaridth P., Sanchez F., González C., Zelada-Castillo L., i współaut., 2022 *Epigenetic regulation by metabolites from the gut microbiome*. Benef Microbes 13(6):437–443. DOI: 10.3920/BM2022.0006
- Marjonon H., Sierra A., Nyman A., Rogojin V., Gröhn O., i współaut. 2015. *Early Maternal Alcohol Consumption Alters Hippocampal DNA Methylation, Gene Expression and Volume in a Mouse Model*. PLoS One 13(5):e0124931. DOI:10.1371/journal.pone.0124931
- Morris B. J., Willcox B. J., Donlon T. A., 2019. *Genetic and epigenetic regulation of human aging and longevity*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis 1865(7):1718–1744. DOI:10.1016/j.bbadis.2018.08.039
- Most J., Tosti V., Redman L. M., Fontana L., 2017. *Calorie restriction in humans: An update* Ageing Res Rev 39:36–45. DOI: 10.1016/j.arr.2016.08.005.
- Nakamura A., François O., Lepeule J., 2021. *Alterations of Maternal Tobacco Smoking during Pregnancy: A Narrative review*. Int J Environ Res Public Health 18(10):5083. DOI: 10.3390/ijerph18105083
- Noroozi R., Ghafouri-Fard S., Pisarek A., Rudnicka J., Spólnicka M., i współaut., 2021. *DNA methylation-based age clocks: From age prediction to age reversion*. Ageing Res Rev 68:101314. DOI: 10.1016/j.arr.2021.101314.
- Painter R. C., Roseboom T. J., Bleker O. P., 2005. *Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: an overview*. Reprod Toxicol 20(3):345–52. DOI:10.1016/j.reprotox.2005.04.005.
- Pes G. M., Dore M. P., Tsofiou F., Poulain M., 2022. *Diet and longevity in the Blue Zones: A set-and-forget issue?* Maturitas 164:31–37. DOI: 10.1016/j.maturitas.2022.06.004
- Radak Z., Suzuki K., Posa A., Petrovszky Z., Koltai E., 2020. *The systemic role of SIRT1 in exercise mediated adaptation*. Redox Biol 35:101467. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101467
- Raj K., 2018. *Epigenetics of Aging and Longevity*. Chapter 4 in book Translational Epigenetics 4, 95–118. DOI: 10.1016/B978-0-12-811060-7.00004-8
- Simpson D. J., Chandra T., 2021. *Epigenetic age prediction*. Aging Cell 20(9):e13452. DOI: 10.1111/accel.13452
- Weidner C. I., Lin Q., Koch C. M., Eisele L., Beier F., i współaut., 2014. *Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites*. Genome Biol 15, R24. DOI: 10.1186/gb-2014-15-2-r24
- Wolstenholme J. T., Goldsby J. A., Rissman E. F., 2013. *Transgenerational effects of prenatal bisphenol A on social recognition*. Horm Behav 64(5):833–9. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2013.09.007
- Xavier M. J., Roman S. D., Aitken R. J., Nixon B., 2019. *Transgenerational inheritance: how impacts to the epigenetic and genetic information of parents affect offspring health*. Hum Reprod Update 25(5):518–540. DOI: 10.1093/humupd/dmz017.
- Xu M., Zhu J. Y., Liu X. D., Luo M. Y., Xu N. J., 2021. *Roles of physical exercise in neurodegeneration: reversal of epigenetic clock*. Transl Neurodegener 10(1):30. DOI: 10.1186/s40035-021-00254-1.
- Zbieć-Piekarska R., Spólnicka M., Kupiec T., Parys-Proszek A., Makowska Ż., i współaut., 2015. *Development of a forensically useful age prediction method based on DNA methylation analysis*. Forensic Sci Int Genet 17, 173–179. DOI: 10.1016/j.fsigen.2015.05.001
- Zhang Y., Wilson R., Heiss J., Breitling L. P., Saum K. U., i współaut., 2017a. *DNA methylation signatures in peripheral blood strongly predict all-cause mortality*. Nat Commun 8, 1–11. DOI: 10.1038/ncomms14617
- Zhang Y., Hapala J., Brenner H., Wagner W., 2017b. *Individual CpG sites that are associated with age and life expectancy become hypomethylated upon aging*. Clin. Epigenetics 9, 9. DOI: 10.1186/s13148-017-0315-9
- Zhang X., Englund D. A., Aversa Z., Jachim S. K., White T. A., i współaut., 2022. *Exercise Counters the Age-Related Accumulation of Senescent Cells*. Exerc Sport Sci Rev 50(4):213–221. DOI: 10.1249/JES.0000000000000302