

Učinak kalorijske restrikcije i posta na indukciju autofagije

Drenški, Martina

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:953294>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam

Martina Drenški
58213761

UČINAK KALORIJSKE RESTRIKCIJE I POSTA NA INDUKCIJU AUTOFAGIJE

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Osnove toksikologije

Mentor: doc. dr. sc. Teuta Murati

Zagreb, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Nutricionizam

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za toksikologiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

Učinak kalorijske restrikcije i posta na indukciju autofagije

Martina Drenški, 58213761

Sažetak: Autofagija je jedan od temeljnih staničnih procesa koji rezultira razgradnjom staničnih komponenti, koje potom služe kao energija i gradivni blokovi za staničnu obnovu. Razlikujemo tri tipa autofagije: makroautofagija, mikroautofagija i autofagija posredovana šaperonom. Iako postoje razlike u načinu odvijanja, sva tri tipa u konačnici dovode do istog ishoda. Istraživanja su ukazala na važnost autofagije u velikom broju stanja, od bakterijskih i virusnih infekcija do karcinoma, neurodegenerativnih, metaboličkih i upalnih bolesti. Autofagija je potaknuta stresnim stanjima, poput oksidacijskog stresa, hipoksije i sl., a stanje nedostatka hranjivih tvari, odnosno kalorijska restrikcija (CR) i post glavni su negenetski pokretači autofagije. I CR i post imaju ulogu u aktiviranju i regulaciji autofagije, što podupiru i rezultati istraživanja koji sugeriraju da je autofagija inducirana u širokom spektru tkiva i organa kao odgovor na uskraćivanje hrane. Dakle, ciljana i precizno kontrolirana aktivacija autofagije predstavlja obećavajuću terapijsku strategiju koja dovodi do poboljšanja zdravlja i normalne funkcije stanica.

Ključne riječi: autofagija, kalorijska restrikcija, mimetici kalorijske restrikcije, post

Rad sadrži: 28 stranica, 3 slike, 1 tablicu, 65 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Teuta Murati

Pomoć pri izradi: izv. prof. dr. sc. Ivana Kmetič; Marina Miletić, mag. ing.

Datum obrane: 15. srpnja 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study of Nutrition

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Toxicology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Nutrition

The effect of calorie restriction and fasting on autophagy induction

Martina Drenški, 58213761

Abstract: Autophagy is one of the fundamental cellular processes that results in the deconstruction of cell components which then serve as energy and building blocks for cell renewal. There are three types of autophagy: macroautophagy, microautophagy, and chaperone-mediated autophagy. Although these types of autophagy differ morphologically, all three types lead to the same outcome. Research has pointed out the importance of autophagy in a large number of states, from bacterial and viral infections to cancers, neurodegenerative, metabolic, and inflammatory diseases. Autophagy is stimulated by stress, such as oxidative stress, hypoxia, etc., however, a lack of nutrients, calorie restriction (CR), and fasting are the primary non-genetic stimulants for autophagy. Both CR and fasting play a role in activating and regulating autophagy, which is supported by research suggesting that autophagy is induced in a wide spectrum of tissue and organs as a response to a lack of food. Therefore, a targeted and precisely controlled activation of autophagy presents a promising therapeutic strategy that leads to improved health and the normalization of cell functions.

Keywords: autophagy, calorie restriction, calorie restriction mimetics, fasting

Thesis contains: 28 pages, 3 figures, 1 table, 65 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: PhD. Teuta Murati, Assistant Professor

Technical support and assistance: PhD. Ivana Kmetič, Associate Professor; MSc. Marina Miletić, Scientific Assistant

Defence date: July 15th 2021

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. STANIČNA SMRT	2
3. AUTOFAGIJA	3
3.1. Oblici autofagije	4
3.1.1. Makroautofagija	5
3.1.2. Mikroautofagija	7
3.1.3. Autofagija posredovana šaperonom (CMA)	7
3.2. Selektivna autofagija	9
4. AUTOFAGIJA U NUTRICIONIZMU	11
4.1. Kalorijska restrikcija (CR)	12
4.2. Post	13
4.3. Učinci kalorijske restrikcije i posta na organizam	14
4.4. Stanični metabolizam tijekom posta	16
4.5. CR mimetici	17
4.5.1. Rapamicin	18
4.5.2. Metformin	19
4.5.3. Spermidin	20
5. ZAKLJUČAK	22
6. LITERATURA	23

1. UVOD

U biologiji stanica se definira kao osnovna strukturna i funkcionalna jedinica svih živih organizama. Kako je živi organizam aktivni sustav, stanice unutar njega neprestano nastoje održati ravnotežu između stanične obnove i stanične smrti. Stoga se može reći da je stanična smrt jedan od ključnih procesa kojim se uklanjaju suvišne, nepovratno oštećene i potencijalno štetne stanice, te nije iznenađujuće što postoji više od jednog mehanizma i načina na koji se ona odvija (Chaabane i sur., 2013). Najviše istraženi oblici stanične smrti su apoptoza, nekroza i autofagija. U ovom radu naglasak će biti na procesu autofagije, koji predstavlja skup kataboličkih procesa kojima se citosolne komponente isporučuju u lizosom radi razgradnje. Do danas su opisana tri oblika autofagije - makroautofagija, mikroautofagija i autofagija posredovana šaperonom. Riječ je o procesu kojim stanica vrši recikliranje i/ili razgradnju citosolnih komponenti pa autofagija kao takva, olakšava uklanjanje suvišnih ili oštećenih bjelančevina i organela prije nego što postanu toksične za stanicu. U stanju nedostatka hranjivih sastojaka stanicama omogućuje razgradnju svih vrsta makromolekula, uključujući proteine, lipide i ugljikohidrate, koji se potom mogu ponovno koristiti kao bitni gradivni blokovi za sintezu novih makromolekula i proizvodnju energije. Stoga, autofagija igra temeljnu ulogu u održavanju stanice zdravom, a proces autofagije ukoliko nije dobro reguliran povezuje se sa širokim spektrom ljudskih patologija (Kaur i Debnath, 2015; Jacomin i sur., 2018).

S obzirom da je autofagija tijekom posljednjeg desetljeća privukla značajnu pozornost znanstvene zajednice, provodi se veliki broj istraživanja kako bi se bolje razumjeli komplicirani mehanizmi kojima se odvija, povezala njena uloga u brojnim fiziološkim procesima, te ustanovilo kako sve utječe na zdravlje pojedinaca. Cilj ovog rada je predstaviti proces autofagije, opisati oblike i molekularne mehanizme kojima se odvija, kao i pobliže opisati post i kalorijsku restrikciju kao najčešće i najpopularnije pristupe koji dovode do pokretanja procesa autofagije.

2. STANIČNA SMRT

Prema prijedlogu Nomenklaturnog odbora za staničnu smrt (engl. NCDD - *Nomenclature Committee on Cell Death*) stanica se može smatrati mrtvom ukoliko je zadovoljen barem jedan od molekularnih ili morfoloških kriterija: ukoliko je stanica izgubila integritet stanične membrane, ukoliko je stanica, uključujući i jezgru stanice, prošla potpunu fragmentaciju, te ukoliko je susjedna stanica „progutala“ fragmente mrtve stanice (Kroemer i sur., 2009). Kriteriji prema kojima se vrši klasifikacija stanične smrti uključuju: (1) morfološki izgled koji može biti apoptotičan, autofagičan, nekrotičan ili povezan s mitozom, (2) funkcionalne aspekte kao što su programirani ili slučajni, fiziološki ili patološki, (3) enzimske kriterije (sa ili bez sudjelovanja nukleaza i različitih klasa proteaza, poput kaspaza, kalpaina, katepsina i transglutaminaze), te (4) imunološke karakteristike (imunogene ili neimunogene).

Tijekom povijesti, a i danas koristi se morfološka klasifikacija stanične smrti, u tri različita oblika: (1) stanična smrt tipa I ili apoptoza, (2) stanična smrt tipa II ili autofagija i (3) stanična smrt tipa III ili nekroza (Galluzzi i sur., 2018).

Apoptoza je karakterizirana brojnim morfološkim promjenama u strukturi stanice, nizom biokemijskih procesa, sakupljanjem citoplazme i kondenzacijom kromatina te pupanjem membrane (engl. *blebbing*) što rezultira nastankom malih vezikula (apoptotskih tjelešaca) koje stanice s fagocitnim djelovanjem učinkovito razgrađuju uz pomoć lizosoma. Razlikuje se o kaspazi ovisna klasična apoptoza i o kaspazi neovisan programirani oblik stanične smrti, koji se ponekad naziva i nekroptoza. Rezultat oba oblika je uklanjanje stanica iz tijela, uz minimalno oštećenje okolnih tkiva (Galluzzi i sur., 2018; Denton i Kumar, 2019).

Stanična smrt tipa II ili autofagija se definira kao konzervirani proces koji dijelove citoplazme "guta" u vezikule te ih dostavlja u lizosome radi razgradnje (Galluzzi i sur., 2018.).

Stanična smrt tipa III ili nekroza morfološki je karakterizirana povećanjem volumena stanice i organela. Kao rezultat toga javljaju se oštećenja ili puknuće stanične membrane te dolazi do oslobađanja unutarstaničnog sadržaja. Nekroza se općenito karakterizira kao nekontrolirana smrt stanice koja nastupa nakon teškog oštećenja, što za posljedicu ima curenje sadržaja stanice u međustanični prostor, to jest u okolna tkiva, što dovodi do oštećenja i razvoja upalnog odgovora (Kroemer i sur., 2009; Chaabane i sur., 2013; D'Arcy, 2019).

Regulirana (programirana) stanična smrt (engl. RCD - *Regulated Cell Death*) oslanja se na molekularne mehanizme što implicira na mogućnost njezine modulacije (pokretanje, inhibiranje, ubrzavanje i sl.), dok je slučajna stanična smrt (engl. ACD - *Accidental Cell Death*) posljedica trenutnog i potpunog odumiranja stanica koje su bile izložene jakim fizičkim, kemijskim ili mehaničkim učincima (Galluzzi i sur., 2018). Apoptoza i autofagija pripadaju skupini RCD. Nekroza, kao što je već navedeno, općenito se karakterizira kao nekontrolirana, slučajna stanična smrt, međutim neka istraživanja sugeriraju da se i nekroza može regulirati signalnim putevima i kataboličkim mehanizmima (Golstein i Kroemer, 2007; D'Arcy, 2019).

NCDD je 2018. godine predložio ažuriranu klasifikaciju modaliteta stanične smrti usredotočenu na molekularne aspekte procesa, uključujući brojne podtipove navedenim kategorijama stanične smrti, poput nekroptoze, piroptoze, entotičke smrti stanice, stanične smrti ovisne o lizosomu, imunogene smrti stanica i dr. (Galluzzi i sur., 2018).

3. AUTOFAGIJA

Riječ autofagija grčkog je porijekla (grč. *autóphagos*; *auto* = sam + *phagein* = jesti). Pedesetih godina prošlog stoljeća znanstvenik Christian de Duve otkrio je postojanje lizosoma kao staničnih organela, za što je 1974. godine nagrađen Nobelovom nagradom. Također, predstavio je autofagiju kao fenomen tijekom kojeg stanice stapaju vezikule koje sadrže proteine s lizosomima, što u konačnici dovodi do razgradnje staničnih proteina (Ichimiya i sur., 2020). Od tada se provode brojna istraživanja kako bi se razjasnili mehanizmi odvijanja procesa autofagije, spojevi koji utječu na indukciju ili inhibiciju autofagije, te konkretna uloga autofagije u stanici i sprječavanju razvoja bolesti. Za dugogodišnji rad i doprinos u razjašnjenju mehanizma autofagije japanski znanstvenik Yoshinori Ohsumi 2016. godine nagrađen je Nobelovom nagradom za medicinu.

Autofagija je regulirani, katabolički proces koji uključuje razgradnju unutarstaničnih komponenata, uključujući topljive proteine, oštećene proteine i organele, ribosome, unutarstanične patogene i strana tijela. Proces zahtijeva nastanak dvostruke membranske strukture, odnosno mjehurića zvanog autofagosom, kako bi "progutao" citoplazmatski sadržaj, koji se zatim razgrađuje fuzijom autofagosoma s lizosomom. Autofagija je neophodna za preživljavanje stanica i igra važnu ulogu u održavanju i regulaciji homeostaze stanica jer se razgradnjom unutarstaničnih komponenata stanicama osigurava energija potrebna za

esencijalne stanične funkcije. Autofagija se pokreće kao odgovor na stanični stres, npr. nedostatak hranjivih sastojaka ili faktora rasta, nedostatak energije, i slično (Bialik i sur., 2018; Yu i sur., 2018; Ichimiya i sur., 2020).

Autofagija se isprepliće s ostalim oblicima stanične smrti, pa je identificiranje autofagije u posredovanju stanične smrti otežano. Uloga autofagije u staničnoj smrti je: (1) stanična smrt povezana s autofagijom, gdje se indukcija autofagije poklapa s indukcijom apoptoze (ili drugih puteva stanične smrti), pri čemu autofagija jednostavno prati proces stanične smrti i nema aktivnu ulogu u njemu; (2) autofagijom posredovana stanična smrt, pri čemu indukcija autofagije pokreće apoptozu; i (3) stanična smrt ovisna o autofagiji, mehanizam stanične smrti koji se događa neovisno o apoptozi ili nekrozi (Denton i Kumar, 2019).

Poremećaj funkcije autofagije dovodi do inhibicije ubikvitinizacije, smanjenja mitohondrijske funkcije, povećanja nestabilnosti genoma te nakupljanja reaktivnih kisikovih vrsta (engl. ROS - *Reactive Oxygen Species*), što u konačnici dovodi do narušavanja homeostaze stanice i doprinosi razvoju bolesti. Autofagija nije uključena samo u potencijalni razvoj bolesti, već ima utjecaj i na starenje, odnosno produženje životnog vijeka. Uz to, dokazano je da funkcija autofagije opada s dobi (Ichimiya i sur., 2020).

Dakle, autofagija je prvenstveno protektivni mehanizam, no pretjerana samorazgradnja također može imati štetne posljedice. Sukladno tome, autofagijska disfunkcija uključena je u razvoj različitih stanja poput neurodegenerativnih bolesti, karcinoma, bolesti jetre i srca, miopatije, starenja, metaboličkih bolesti poput dijabetesa (Parzych i Klionsky, 2014).

3.1. Oblici autofagije

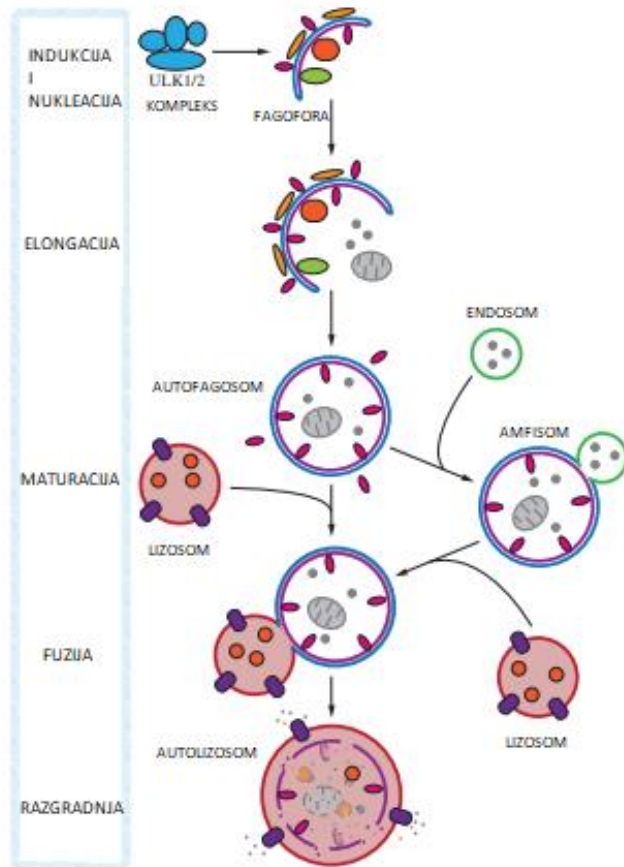
U stanicama sisavaca razlikuju se tri primarna oblika autofagije: makroautofagija, mikroautofagija i autofagija posredovana šaperonom (engl. CMA - *chaperone-mediated autophagy*). Iako postoje razlike u načinu odvijanja, sva tri oblika autofagije u konačnici dovode do isporuke staničnog sadržaja u lizosom, u kojem se odvija razgradnja. Razgrađene komponente vraćaju se u citosol kako bi ih stanica mogla ponovno koristiti. Pojam autofagije najčešće se odnosi upravo na makroautofagiju te je ona i najviše istražena (Parzych i Klionsky, 2014).

3.1.1. Makroautofagija

Proces makroautofagije, za razliku od mikroautofagije i autofagije posredovane šaperonima, zahtijeva nastanak vezikula koje se nazivaju autofagosom. Autofagosom se od ostalih unutarstaničnih vezikula razlikuje po tome što se stvara *de novo*, a ne nastaje pupanjem već postojećih organela. Proces makroautofagije odvija se u nekoliko koraka koji uključuju: 1. indukciju i nukleaciju, 2. elongaciju, 3. maturaciju, 4. fuziju membrana i 5. razgradnju (Parzych i Klionsky, 2014).

3.1.1.1. Mehanizam makroautofagije

Indukcija makroautofagije u stanicama sisavaca može započeti na više mjesta, a potencijalni izvori su membrana endoplazmatskog retikuluma (ER) odnosno strukture pridružene membrani ER zvane omegasomi, membrana Golgijevog aparata i mitohondrija. Tijekom indukcije membrana se počinje razvijati i širiti, te se u ovom stadiju naziva fagofora. Kako se fagofora širi, membrana se savija i prilagođava veličini sadržaja citoplazme namijenjenog razgradnji. Nakon što ga potpuno okruži nastaje dvomembranska vezikula – autofagosom. Veličina autofagosoma varira ovisno o vrsti organizma i tipu sadržaja za razgradnju. Autofagosom zatim svoj sadržaj treba predati lizosomu unutar kojeg dolazi do razgradnje. To se odvija tako da se membrana autofagosoma stopi s membranom lizosoma čemu posreduje nekoliko proteinskih kompleksa, npr. kompleks SNARE proteina. Produkt spajanja autofagosoma i lizosoma je vezikula nazvana autolizosom (slika 1). Autolizosom je kombinacija spojenih vezikula, koja sadrži autofagosomsku unutarnju membranu i sadržaj namijenjen razgradnji, te lizosomski kiseli medij i hidrolitičke enzime. Prije fuzije s lizosomom, autofagosom se može spojiti i s endosomom pri čemu se stvara vezikula zvana amfisom, koja se zatim spaja s lizosomom, te opet nastaje autolizosom. U konačnici autofagosomski sadržaj biva razgrađen i putem lizosomskih permeaza vraćen u citoplazmu stanice, koja koristi produkte razgradnje za različite biosintetske procese ili za energiju (Yorimitsu i Klionsky, 2005; Itakura i sur., 2012; Mijaljica i sur., 2012; Parzych i Klionsky, 2014).



Slika 1. Shematski prikaz mehanizma makroautofagije (prema Parzych i Klionsky, 2014).

Razumijevanje autofagije s morfološkog aspekta na molekularne mehanizme omogućila je identifikacija ATG gena (engl. *autophagy related genes* – geni povezani s autofagijom).

3.1.1.2. Regulacija makroautofagije

Autofagija može biti inducirana različitim stanjima u organizmu, poput gladovanja, smanjenja razine inzulina, smanjenja razine ATP-a i hipoksijom (Ichimiya i sur., 2020).

U regulaciju makroautofagije, do koje dolazi zbog nedostatka hranjivih tvari, uključena su dva regulatorna puta posredstvom cAMP ovisne protein kinaze A (PKA, engl. *cAMP-dependent protein kinase A*) i TOR (engl. *target of rapamycin* - ciljna molekula rapamicina) putevima. Prisustvo proteina odnosno aminokiselina aktivira mTORC1 (engl. *mammalian target of rapamycin complex 1*; mTOR - ciljna molekula rapamicina u sisavaca). PKA može fosforilirati i tako direktno aktivirati mTORC1 ili može indirektno aktivirati mTORC1 tako da inaktivira AMPK (engl. *AMP-activated protein kinase* - protein kinaza aktivirana AMP-om). Kada je mTORC1 aktiviran on fosforilira kompleks ULK1/2 (engl. *Unc-51 like autophagy activating kinase 1* –

kinaza 1 nalik Unc-51 koja aktivira autofagiju) i ATG13 čime oni budu inhibirani i ne dolazi do indukcije makroautofagije. Međutim, u uvjetima nedostatka nutrijenata dolazi do disocijacije mTORC1 s ULK1/2 kompleksa što dovodi do defosforilacije i indukcije makroautofagije. AMPK je glavna kinaza osjetljiva na energetska razinu u stanici i odgovara na unutarstanični omjer ATP-a i AMP-a regulirajući tako brojne stanične procese, među njima i makroautofagiju. Ukoliko je u stanici prisutna viša koncentracija AMP u odnosu na ATP, dolazi do aktivacije kinazne aktivnosti AMPK koja tada fosforilira i aktivira TSC1/2 kompleks (engl. *tuberous sclerosis protein* - kompleks tuberozne skleroze) koji indirektno inhibira aktivnost mTORC1 čime se omogućava pokretanje makroautofagije (Yang i Klionsky, 2010; Alers i sur., 2012; Parzych i Klionsky, 2014).

Tijekom ER stresa dolazi do povećanja citosolne koncentracije kalcijevih iona što uzrokuje aktivaciju AMPK putem CAMKK2 (engl. *CAMKK2/CaMKK β -calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, beta*). Drugi način na koji ER stres može inducirati makroautofagiju je kroz nakupljanje nesmotanih proteina u citoplazmi stanice. Hipoksija i nedostatak faktora rasta također dovode do indukcije makroautofagije inhibicijom mTORC1 (Parzych i Klionsky, 2014).

3.1.2. Mikroautofagija

Mikroautofagija je neselektivni lizosomski proces razgradnje kod kojeg citoplazmatski sadržaj u lizosom ulazi invaginacijom ili deformacijom membrane lizosoma. Proces mikroautofagije je najslabije istražen u odnosu na ostale vrste autofagije te se još uvijek malo zna o njegovoj regulaciji i ulogama u ljudskom zdravlju i bolestima.

Smatra se da je proces neselektivan te da se inducira signalnom kaskadom prilikom nedostatka dušika ili rapamicinom. Glavne funkcije mikroautofagije su preživljavanje stanice u uvjetima nedostatka dušika, održavanje homeostaze membrane i veličine staničnih organela. Također postoje i tri oblika selektivne mikroautofagije - mikropeksosofagija, komadna mikroautofagija jezgre i mikromitofagija. Detaljni mehanizam mikroautofagije još se proučava, a za sada je poznato da je koordinirani proces koji se nadopunjuje makroautofagijom i autofagijom posredovanom šperonom (Li i sur., 2012).

3.1.3. Autofagija posredovana šperonom (CMA)

CMA je visoko specifičan, selektivan proces autofagije koji citosolne proteine predviđene za razgradnju izravno isporučuje u lizosom. Supstrati za razgradnju dopijevaju u lumen lizosoma kroz protein-translokacijski kompleks koji se nalazi na membrani lizosoma, pa prema tome ne dolazi do membranskih invaginacija te nije potrebno nastajanje vezikula. CMA supstrati za

razgradnju jesu topljivi proteini koji nose pentapeptidni motiv KFERQ, ali ne i organeli, te druge makromolekule poput lipida, nukleinskih kiselina ili proteina koji su sastavni dio membrana (Galluzzi i sur., 2017).

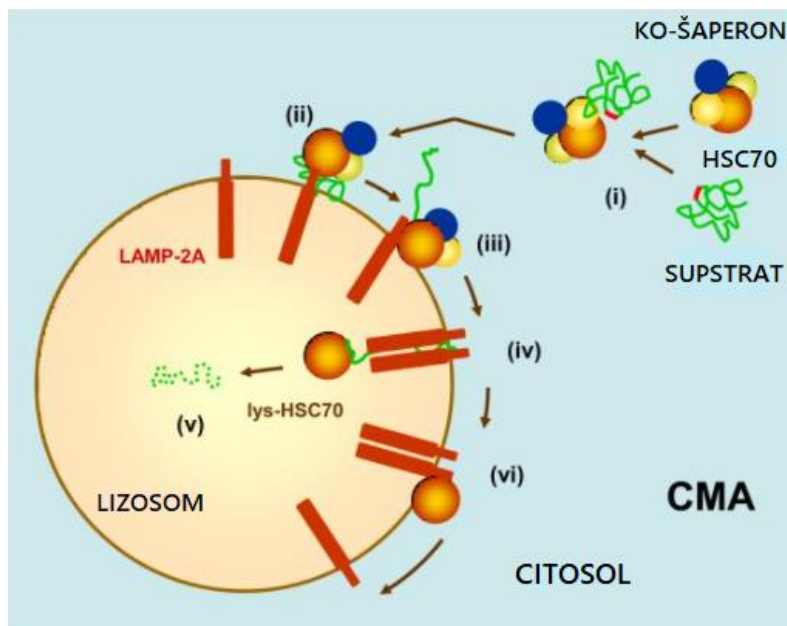
KFERQ motiv predstavlja slijed određenih aminokiselina: (1) jedan ili dva pozitivno nabijena ostatka: lizin, arginin; (2) jedan ili dva hidrofobna ostatka: izoleucin, leucin, valin, fenilalanin; (3) jedan od negativno nabijenih ostataka: asparaginska kiselina, glutaminska kiselina; i (4) jedan glutamin s obje strane pentapeptida (Kirchner i sur., 2019).

Za odvijanje ove vrste autofagije potrebi su šaperon proteini koji dolaze u kompleksu, a jedan od njih je HSC70 (engl. *heat shock cognate chaperone of 70 kDa*) koji je odgovoran za prepoznavanje KFERQ sekvence. Na temelju analize sekvenci i pokusa imunoprecipitacije procjenjuje se da približno 30 % citosolnih proteina sadrži takav slijed (Parzych i Klionsky, 2014). Kao u svim oblicima autofagije i ovdje je potreban lizosom unutar kojeg se vrši razgradnja. Također, potrebna je i odgovarajuća funkcija receptora na membrani lizosoma LAMP-2A (engl. *lysosome-associated membrane protein 2A*) koji je nužan za prebacivanje kompleksa protein-šaperon iz citosola u lumen lizosoma. Šaperon kompleks putem HSC70 prepozna topljivi protein preko KFERQ sekvence u citosolu, veže se na njega i usmjerava ga prema lizosomu (slika 2). KFERQ sekvenca se potom veže na LAMP-2A receptor na membrani lizosoma, dolazi do multimerizacije LAMP-2A u kompleks potreban za translokaciju supstrata u lumen lizosoma. Nakon translokacije unutar lizosoma dolazi do razgradnje sadržaja djelovanjem enzima prisutnih u lizosomskom lumenu uključujući proteaze, lipaze, glikozidaze i nukleaze (Orenstein i Cuervo, 2010).

Regulacija procesa translokacije odvija se na razini vezanja supstrata na receptor LAMP-2A, što ograničava brzinu za CMA. Promjene u razini LAMP-2A na lizosomskoj membrani moduliraju razinu CMA aktivnosti i prvenstveno proizlaze iz promjene u razgradnji i organizaciji LAMP-2A. CMA je inducirana u određenim situacijama poput blagog oksidacijskog stresa, prisutnošću toksina koji oštećuju proteine i tijekom duljih razdoblja nedostatka hranjivih sastojaka (Parzych i Klionsky, 2014).

Razgradnja proteina kroz CMA tijekom perioda nedostatka hranjivih tvari osigurava stanicama potrebne aminokiseline za održavanje sinteze proteina u tim uvjetima. Također, CMA je važna za održavanje stanične proteostaze uklanjanjem oštećenih i promijenjenih proteina. Uz to, selektivno uklanjanje proteina kroz CMA između ostalog ima važnu regulatornu funkciju u

metaboličkim putevima kao što je metabolizam glukoze i lipida, putevima popravljanja DNA i staničnom ciklusu, te u kontroli stanične energetske ravnoteže. Ukoliko postoji disfunkcionalnost u ovom procesu, do čega češće dolazi u starijoj životnoj dobi, postoji mogućnost razvitka različitih stanja kao što su metabolički poremećaji, neurodegenerativne bolesti, rak, imunodeficijencija i dijabetes (Juste i Cuervo, 2019).



Slika 2. Prikaz autofagije posredovane šaperonom (prema Cuervo, 2010).

Slika 2 prikazuje CMA: (i) supstrate u citosolu koji nose KFERQ sekvencu prepoznaje HSC70 i ko-šaperoni, (ii) kompleks šaperon-supstrat usmjerava se prema površini lizosoma i veže se na LAMP2A koji je u monomernom obliku, (iii) vezanjem supstrata dolazi do multimerizacije LAMP2A i nastajanja translokacijskog kompleksa, (iv) supstrat prolazi kroz membranu lizosoma uz pomoć lizosomskog HSC70, (v) po ulasku u lizosom supstrat se razgrađuje, (vi) HSC70 potiče rastavljanje translokacijskog kompleksa i osigurava monomerne oblike LAMP2A potrebne za novi krug vezanja supstrata s KFERQ sekvencom.

3.2. Selektivna autofagija

Procesi mikroautofagije i makroautofagije mogu se kategorizirati kao selektivni i neselektivni. Neselektivna autofagija koristi se za razgradnju unutarstaničnih komponenata citoplazme u uvjetima gladovanja. Selektivna autofagija, kao što sam naziv govori, posebno cilja određene supstrate kao što su oštećene ili suvišne organele, uključujući mitohondrije i peroksisome, kao i invazivne mikrobe. Shodno tome, selektivna autofagija se identificira jedinstvenim nazivom

prema supstratu kojeg koristi za razgradnju, npr. mitofagija za selektivnu razgradnju mitohondrija, peksfagija za peroksisome, ksenofagija za mikrobe itd. (Feng i sur., 2014; Ichimiya i sur., 2020).

Neki od tipova selektivne autofagije prikazani su u tablici 1. Među njima, mitofagija je najviše istraženi oblik.

Tablica 1. Tipovi selektivne autofagije prema supstratu kojeg razgrađuju (prema Ichimiya i sur., 2020).

NAZIV	SUPSTRAT ZA RAZGRADNJU
MITOFAGIJA	Mitohondrij
ER-FAGIJA	Endoplazmatski retikulum
LIZOFAGIJA	Lizosom
NUKLEOFAGIJA	Jezgra
PEKSOFAGIJA	Peroksisom
LIPOFAGIJA	Lipidne kapljice
KSENOFAGIJA	Stanični patogeni
AGREFAGIJA	Abnormalni proteinski agregati
RIBOFAGIJA	Ribosomi
RN/DN-FAGIJA	RNA/DNA

Procesom mitofagije selektivno se razgrađuju mitohondriji. Mitohondrij je vrlo važan organel i ima višestruku funkciju u stanicama. Opskrbljuje stanice energijom (proizvodnjom ATP-a procesom oksidacijske fosforilacije), sudjeluje u biosintezi fosfolipida, masnih kiselina, aminokiselina, hema, omogućuje indukciju apoptoze. Prema tome, vrlo je važno održavanje funkcionalne mitohondrijske mreže tijekom cijelog života, kako bi mitohondriji mogli pravilo funkcionirati i odgovarati na fiziološke potrebe stanica. Zbog njihove uloge u proizvodnji energije, često su izloženi velikim količinama ROS-a što ih čini podložnima mutacijama mitohondrijske DNA i promjenama konformacije proteina (Pickles i sur., 2018). Utvrđena je povezanost između akumulacije disfunkcionalnih mitohondrija i stvaranja ROS-a s karcinogenezom (Ichimiya i sur., 2020).

Zbog navedenih važnih funkcija, mitohondriji su razvili sustav kontrole kvalitete koji osigurava prisutnost dovoljnog broja funkcionalnih mitohondrija za potrebe stanica. Jedan od načina je upravo mitofagija, koja uključuje selektivnu razgradnju oštećenih mitohondrija. U stanicama sisavaca mitofagiju može pokrenuti niz staničnih događaja poput stanične diferencijacije, nedostatak kisika, oštećenje mitohondrija i dr. Suprotno tome, bolesti poput dijabetesa, neurodegenerativnih bolesti, kao i sam proces starenja, ometa staničnu sposobnost održavanja potrebnog broja funkcionalnih mitohondrija (Pickles i sur., 2018). Stoga, proces mitofagije doprinosi održavanju homeostaze i suzbijanju nastanka tumora učinkovitim uklanjanjem oštećenih mitohondrija (Ichimiya i sur., 2020).

4. AUTOFAGIJA U NUTRICIONIZMU

Način života modernog čovjeka razlikuje se od načina života naših predaka. Nekada se nisu konzumirala tri redovito raspoređena obroka dnevno uz međuobroke i grickalice, niti se živjelo sjedilačkim načinom života. Tjelesna aktivnost bila je zastupljenija, a izvori hrane bili su slabo dostupni (De Cabo i Mattson, 2019). Danas je situacija obrnuta, hrana je puno dostupnija, a tjelesna aktivnost sve manje zastupljena. Prekomjerna konzumacija hrane uz sjedilački način života često dovodi do metaboličkih nepravilnosti, razvoja rezistencije na inzulin, nakupljanja visceralnog masnog tkiva i dr. Budući da su ljudi evoluirali u okruženju u kojem je hrane bilo relativno malo, razvile su se brojne prilagodbe koje omogućuju fizičko i kognitivno funkcioniranje u periodu bez hrane odnosno tijekom posta (Mattson i sur., 2017).

Tijekom posljednjeg desetljeća autofagija je privukla značajnu pozornost kao potencijalna meta farmakoloških sredstava ili dijetalnih intervencija. Inhibicijom ili aktivacijom autofagije moguće je utjecati na nekoliko bolesti i poremećaja koji se javljaju kod ljudi, uključujući infekcije i upalne bolesti, neurodegenerativne, metaboličke i kardiovaskularne bolesti, pretilost i rak (Antunes i sur., 2018). U stresnim uvjetima, uključujući nedostatak hranjivih sastojaka, autofagija se u značajnoj mjeri aktivira kako bi održala funkcioniranje stanica i potaknula preživljavanje stanica (Chung i Chung, 2019).

U nastavku su opisane dijetalne intervencije poput kalorijske restrikcije (CR – engl. *calorie restriction*) i posta kao metode za izazivanje autofagije, te CR mimetici kao potencijalna farmakološka sredstva.

4.1. Kalorijska restrikcija (CR)

Kalorijska restrikcija (CR) sastoji se od smanjenja dnevnog unosa kalorija uz održavanje unosa osnovnih hranjivih sastojaka za zdravlje bez pothranjenosti, a uključuje smanjenje od najmanje 10 % ukupnog energetskeg unosa kod ljudi (Bales i Kraus, 2013; Dias i sur., 2020).

U posljednjih nekoliko desetljeća intenzivno se istražuje učinak CR na organizam. Pretkliničke studije pokazuju da CR produljuje životni vijek i smanjuje razvoj dobnih bolesti kao što su dijabetes, rak, neurodegenerativne i kardiovaskularne bolesti (Speakman i Mitchell, 2011; O'Flanagan i sur., 2017). CR utječe na produljenje životnog vijeka različitih vrsta laboratorijskih životinja (Chung i sur, 2013).

CR potiče metaboličke i stanične promjene u organizmu koje omogućuju prilagodbu razdobljima ograničene dostupnosti hranjivih sastojaka (Longo i Mattson, 2014). Glavne promjene uključuju pojačanu regulaciju autofagije, poboljšanje funkcije mitohondrija, povećanu proteolizu, smanjenje upale i oksidacijskog stresa, kao i smanjenje razine inzulina, leptina, tjelesne masti i krvnog tlaka (Mehrabani i sur., 2020).

Otkriveno je da CR vrši inhibiciju ili stimulaciju četiri metabolička puta (signalni put inzulina/inzulinu sličnog faktora rasta IGF-1 (engl. *insulin like growth factor - 1*), put sirtuina, put adenzin monofosfat (AMP) aktivirane protein kinaze (AMPK) i puta rapamicina (mTOR) i tako postiže djelotvorne učinke. Ti različiti putevi mogu međusobno djelovati i imati važne uloge posredujući u različitim aspektima odgovora (Speakman i Mitchell, 2011). Smanjenjem razine inzulina i IGF-1, CR smanjuje signalizaciju mTOR-a te povećava omjer AMP u odnosu na ATP čime aktivira AMPK (Chung i Chung, 2019). Istraživanjem je također otkriveno da CR inducira aktivnost mitohondrija aktivacijom AMPK i sirtuina. Istodobno se javlja veća aktivnost FOX (engl. *forkhead box*) proteina koji aktiviraju autofagiju, mitofagiju i antioksidacijsku ekspresiju (Mehrabani i sur., 2020), pa CR rezultira smanjenim oksidacijskim stresom i pojačanom autofagijom (Speakman i Mitchell, 2011).

Ipak, učinci CR-a nisu univerzalno pozitivni - stalna glad, smanjena tjelesna temperatura i gubitak libida čine način života s kalorijskom restrikcijom neprivlačnim za većinu ljudi (Speakman i Mitchell, 2011).

4.2. Post

Post nudi široki raspon korisnih učinaka, te je zbog toga privukao značajnu pozornost kao nova strategija za promicanje zaštite od više vrsta bolesti (Brandhorst i Longo, 2016). Longo i Mattson (2014) definiraju post kod čovjeka kao stanje koje se postiže unosom nikakve ili minimalne količine hrane i kaloričnih napitaka u razdoblju od 12 sati do 3 tjedna. Kalorijska restrikcija se razlikuje od posta po tome što održava učestalost obroka, ali se dnevni unos kalorija smanjuje za otprilike 20 – 40 %. Termin gladovanje obično se koristi kao zamjena za riječ post, ali također i za definiranje ekstremnih oblika posta (Longo i Mattson, 2014). Međutim, post nije isto što i gladovanje, jer gladovanje označava kronični i ozbiljni nedostatak unosa energije ispod razine potrebne za održavanje života (Lessan i Ali, 2019).

Postoje različite vrste posta, a generalno se dijele u dvije glavne kategorije: dugotrajni post (engl. LTF - *long-term fasting*) i kratkotrajni post (engl. STF - *short-term fasting*). LTF se provodi tri ili više dana i uzrokuje ketozu. STF ne traje dovoljno dugo da uzrokuje ketozu, osim ako se kombinira s ketogenom prehranom, a uključuje isprekidani post (engl. IF - *intermittent fasting*), periodični post (engl. PF - *periodic fasting*) i vremenski ograničeno hranjenje (engl. TRF - *time restricted feeding*) (Paoli i sur., 2019). IF uključuje naizmjenični dnevni post (engl. ADF - *alternate day fasting*), koji uključuje razdoblja normalnog unosa hrane i razdoblja u kojima se unosi malo ili nimalo energije (npr. 16 - 48 sati). Kod IF karakteristična su kratkotrajnija, ali učestalija razdoblja posta, za razliku od PF gdje se koriste manje česti, ali po trajanju duži periodi posta ili dijeta koja imitira post i traju od 2 do čak 21 ili više dana. U skupinu PF svrstava se popularna „5:2 dijeta“ koja podrazumijeva pet dana normalnog kalorijskog unosa i dva dana posta. Pojam TRF opisuje način prehrane u kojem je pristup hrani ograničen na vremenski okvir od 8 – 9 sati svaki dan, i ovakav pristup popularno je nazvan „16:8 dijeta“ (Mattson i sur., 2017; De Cabo i Mattson, 2019; Mehrabani i sur., 2020).

Zdravstvena dobrobit povremenog posta nije samo rezultat smanjene proizvodnje slobodnih radikala ili gubitka kilograma. Uz to, isprekidan post potiče stanice na aktivaciju puteva koji pojačavaju unutarnju obranu od oksidacijskog i metaboličkog stresa, te one koji uklanjaju i/ili popravljaju oštećene molekule, kao i puteve koji poboljšavaju regulaciju glukoze i suzbijanje upale (De Cabo i Mattson, 2019).

4.3. Učinci kalorijske restrikcije i posta na organizam

Istraživanja provedena na laboratorijskim životinjama omogućila su razumijevanje staničnih i molekularnih mehanizama kojima pojedinci reagiraju na post, te načine koji povećavaju ukupnu kondiciju i otpornost na ozlijede (Longo i Mattson, 2014), dok su istraživanja provedena na ljudima rezultirala saznanjem da je povremeni post, uključujući prehranu koja oponaša post, dostižan kod ljudi i omogućuje brojne zdravstvene koristi, kako kod zdravih pojedinaca, tako i kod pojedinaca s nekim kroničnim bolestima (Mattson i sur., 2017).

Osim prethodno navedenih učinaka, Mehrabani i suradnici (2020) također ističu da CR dovodi do smanjenog nakupljanja oštećenih proteina putem dva različita mehanizma. CR dovodi do povećanja proteolize i posljedičnog smanjenja nakupljanja oštećenih proteina (Boya i sur., 2005). Također, CR dovodi do smanjenja izmjene (engl. *turnover*) proteina, reducirajući potrebu za nadomještanjem novim proteinima (Mehrabani i sur., 2020).

Post omogućuje organizmima da provode alternativne metaboličke puteve koji se manje oslanjaju na glukozu, a više na izvore ugljika poput ketonskih tijela, o čemu će više riječi biti u nastavku. I IF i PF, kao i TRF mogu dovesti do prevencije i liječenja bolesti (Longo i Panda, 2016).

Organizam doživljava post kao stresno stanje, pa stanice aktiviraju koordinirani adaptivni odgovor koji dovodi do regulacije upale, popravka DNA, kontrole kakvoće proteina, autofagije i biogeneze mitohondrija, te povećane antioksidacijske obrane (De Cabo i Mattson, 2019). Također, naizmjenični dnevni post povoljno utječe na metabolizam jer smanjuje razinu inzulina i povećava osjetljivost na inzulin, smanjuje tjelesnu masnoću, razinu leptina, otkučaje srca i krvni tlak (Mattson i sur., 2017). Sve veća pozornost usmjerava se povezanosti između CR-a, posta i prevencije i liječenja karcinoma. Kronična CR pruža i korisne i štetne učinke, dok se IF i PF, te TRF bez smanjenja kalorija predlažu kao novi pristupi u prevenciji malignih bolesti i povećanju učinkovitosti terapija za liječenje karcinoma (Brandhorst i Longo, 2016).

Chaix i suradnici (2014) naglašavaju da TRF može prevenirati pretilost, te da se može koristiti kao terapijska intervencija protiv metaboličkih bolesti. TRF omogućuje brojne koristi za organizam sprječavanjem kronične upale i povećanjem metaboličke sposobnosti, suzbijanjem hiperkolesterolemije i sprječavanjem intolerancije glukoze i steatoze jetre.

Shodno tome, studije na životinjama sugeriraju da IF, ADF, PF i TRF odgađaju i usporavaju napredovanje širokog spektra dobrih poremećaja, poput kardiovaskularnih bolesti, moždanog udara, dijabetesa, neuroloških poremećaja (Mattson i sur., 2017). Pokazalo se da IF utječe na kognitivne funkcije i sposobnost pamćenja, a epidemiološki podaci sugeriraju da prekomjerni energetska unos, pogotovo u srednjoj životnoj dobi, povećava rizik od Alzheimerove bolesti, Parkinsonove bolesti i moždanog udara (Arnold i sur., 2018). Nadalje, smatra se da uskraćivanje hrane, odnosno CR utječe na životni vijek usporavanjem procesa starenja i povećanjem dugovječnosti. Jedan od glavnih molekularnih mehanizama kojima CR i post uzrokuju produljenje životnog vijeka jest upravo autofagija. Autofagija je inducirana u širokom spektru tkiva i organa kao odgovor na uskraćivanje hrane (Madeo i sur., 2015; Bagherniya i sur., 2018).

Dakle, CR i post su najčešći i najpopularniji pristupi koji dovode do indukcije autofagije, koja rezultira „čišćenjem“ stanica i sprječavanjem nakupljanja oštećenih proteina i toksičnih komponenata (Petrovski i Das, 2010). Poznato je da navedeni obrasci prehrane stimuliraju proces autofagije, no Mehrabani i suradnici (2020) su ispitivali mogu li CR i post stimulirati i mitofagiju. Na temelju prikupljenih informacija zaključili su da CR i post potiču mitofagiju i markere povezane s mitofagijom, te sugeriraju ovakav režim prehrane kao nov i praktičan pristup u prevenciji starosnih bolesti. Međutim, potrebna su buduća ispitivanja koja bi utvrdila točan odnos između nedostatka smanjenog unosa hrane i mitofagije, te koja bi ispitala različite vrste CR-a kako bi se pronašao najbolji pristup za izazivanje mitofagije i poboljšanja zdravlja (Mehrabani i sur., 2020).

Sumarno, odgovor organizma na povremeni CR i post svodi se na minimiziranje anaboličkih procesa (sinteza, rast, razmnožavanje) i poticanje autofagije i mitofagije, inhibirajući sintezu mTOR proteina. Ti odgovori povećavaju otpornost na stres, omogućuju „recikliranje“ oštećenih molekula, stimuliranje mitohondrijske biogeneze, dok privremeno smanjuju globalnu sintezu proteina zbog uštede energije i molekularnih resursa. Ukoliko osobe unose prevelike količine energije i žive sjedilačkim načinom života, navedeni putevi su neiskorišteni i potisnuti (Mattson i Arumugam, 2018; De Cabo i Mattson, 2019).

Optimalno bi bilo smanjivati razdoblja posta postupno, tijekom nekoliko mjeseci s ciljem posta od 16 do 18 sati dnevno. Kombinacija ovakvog režima prehrane uz redovitu tjelesnu aktivnost rezultira poboljšanjem mentalne i tjelesne sposobnosti i povećava otpornost na bolesti (De Cabo i Mattson, 2019).

4.4. Stanični metabolizam tijekom posta

Da bi ljudski organizam mogao preživjeti i normalno funkcionirati obavljanjem fizioloških funkcija, potreban mu je izvor energije. Energija se dobiva unosom hrane, odnosno kataboličkim putevima na račun razgradnje molekula hranjivih tvari koji uključuju tri glavna makronutrijenta - proteine, masti i ugljikohidrate. Stanice kao primarni supstrat za dobivanje energije koriste glukozu i masne kiseline. U periodu sitosti, odnosno nakon unosa hrane, razina glukoze u krvi raste i rezultira lučenjem inzulina. Inzulin tada snižava razinu glukoze u krvi tako što omogućava ulazak glukoze u stanice i ubrzava glikolizu. Osnovna svrha procesa glikolize je dobivanje energije za sintezu ATP-a. Dakle, nakon obroka glukoza se koristi za energiju, a suvišak glukoze se pohranjuje u obliku glikogena, dok se masti pohranjuju u masnom tkivu u obliku triglicerida (Browning i sur., 2012; Berg i sur., 2013).

Tijekom kratkotrajnog gladovanja, ubrzo nakon obroka, koncentracija glukoze u krvi se smanjuje pa razina inzulina opada, a umjesto njega luči se hormon glukagon. Glukagon pokreće niz reakcija koje rezultiraju pokretanjem razgradnje i zaustavljanjem sinteze glikogena. Ovakav mehanizam stanicama omogućuje opskrbu glukozom za dobivanje energije (Berg i sur., 2013).

Glikogen je polimer sastavljen od molekula glukoze i služi kao glavni skladišni oblik glukoze u jetri i mišićima. Kod ljudi, 12 do 24 sata posta dovodi do smanjenja koncentracije glukoze u serumu za 20 % ili većim iscrpljivanjem zaliha glikogena, ovisno o razini tjelesne aktivnosti (Longo i Mattson, 2014). Nakon određenog razdoblja ograničenja energetske unosa i posta dolazi do iscrpljivanja zaliha glikogena, pa je potreban alternativni izvor energije za održavanje metabolizma. Tijekom duljeg perioda posta (tri dana i više) glukoza više nije primarni izvor energije, već dolazi do metaboličke promjene i iskorištavanja masti kao glavnog izvora energije. Masti su pohranjene u obliku triglicerida, pa u adipocitima dolazi do njihove hidrolize na slobodne masne kiseline i glicerol. Procesom beta oksidacije masnih kiselina nastaju značajne količine acetyl-CoA iz kojeg se u jetri sintetiziraju ketonska tijela - aceton, acetoacetat i D-3-hidroksibutirat (β -hidroksibutirat) procesom ketogeneze. Ketonska tijela potom osiguravaju energiju mnogim tkivima (Paoli i sur., 2015; De Cabo i Mattson, 2019; Paoli i sur., 2019).

Osim što služe kao gorivo tijekom duljih razdoblja posta, vježbanja ili odsutnosti prehranbenih ugljikohidrata, ketonska tijela, pogotovo β -hidroksibutirat, su ujedno i snažne signalne molekule koji imaju učinke na funkciju stanica, regulaciju ekspresije gena i aktivnost brojnih proteina i molekula povezanih sa zdravljem i starenjem organizma (Newman i Verdin, 2017).

Nakon prebacivanja metabolizma s korištenja glukoze na upotrebu masnih kiselina i ketonskih tijela dolazi do još nekoliko promjena u organizmu. Smanjuje se omjer respiratorne izmjene, koji predstavlja omjer proizvedenog ugljičnog dioksida i utrošenog kisika, što ukazuje na veću fleksibilnost metabolizma i učinkovitost proizvodnje energije iz masnih kiselina i ketonskih tijela. Nadalje, povećava se otpornost na stres, povećana je antioksidacijska obrana, dolazi do regulacije autofagije i pojačanja mitohondrijske funkcije (De Cabo i Mattson, 2019).

Ovisno o zalihama u organizmu, odnosno sastavu tijela i tjelesnoj težini, većina ljudi može preživjeti do 30 ili više dana u nedostatku hrane (Longo i Matson, 2014). Oporavak od posta, odnosno ponovni unos hrane dovodi do ponovnog povećanja razine glukoze u krvi, dok se razina ketonskih tijela smanjuje. U stanicama se povećava proces sinteze bjelancevina i stanice prolaze kroz rast i popravak (De Cabo i Mattson, 2019).

mTORC1 i AMPK služe kao senzori energetskeg statusa, a održavanje nutritivne homeostaze je ključno za opstanak stanica. Nedostatak aminokiselina dovodi do inaktivacije mTORC1 i indukcije autofagije. AMPK je proteinska serin/treonin kinaza koja registrira koncentraciju AMP/ATP i ADP/ATP, što također dovodi do indukcije autofagije u slučaju povišenog omjera AMP/ATP i nedostatka glukoze. Dakle, AMPK je moguće aktivirati postom u više tkiva, uključujući skeletne mišiće, adipocite i hipotalamus. Pokretanjem autofagije stanice se „brane“ od stresa recikliranjem hranjivih sastojaka i/ili razgradnjom oštećenih organela. Ukoliko je stres izazvan nedostatkom hranjivih tvari izvan kontrole, aktivacija autofagije može rezultirati i staničnom smrću (Zhang i sur., 2017; He i sur., 2018; Cozzo i sur., 2020).

4.5. CR mimetici

S obzirom da učestalo ili povremeno CR pokazuje brojne dobrobiti na zdravlje organizma i prevenciju bolesti, počinju se istraživati razni nutraceutici i lijekovi koji bi oponašali biokemijske i funkcionalne učinke CR. Takvi spojevi nazivaju se mimetici kalorijske restrikcije (engl. CRM - *calorie restriction mimetics*) (Madeo i sur, 2014). Prednost takvih spojeva jest omogućiti učinke kalorijske restrikcije, ali bez potrebe smanjivanja unosa hrane. Nadalje, određeni pojedinci teško podnose razdoblja kalorijske restrikcije ili posta, dok postoje i pojedinci kojima se takav režim prehrane ne preporučuje. Kronični CR kontraindiciran je za osobe oboljele od nekih vrsta karcinoma kojima prijete kaheksija, za osobe oslabljenog imunološkog sustava, te osobama s dijabetesom. U takvim situacijama zamjenske opcije poput dijeta koje oponašaju post, dijeta s niskim udjelom ugljikohidrata ili CRM mogu biti prikladniji od same kalorijske restrikcije

(O'Flanagan i sur., 2017). Istražuje se i efikasnost upotrebe CRM kao farmakološke terapijske strategije za liječenje karcinoma u kombinaciji s citotoksičnim agensima (Antunes i sur., 2018).

Dakle, CRM oponašaju učinke CR pa tako dovode do aktivacije AMPK i inhibicije mTOR-a čime se inducira autofagija, smanjuje iskorištavanje glukoze i utječe na put glikolize i signaliziranje inzulinu sličnog faktora rasta, te dolazi do iscrpljivanja acetil-CoA i ATP-a. Također, nekoliko poznatih CRM je izravno ili neizravno povezano s regulacijom autofagije (Antunes i sur., 2018; Chung i Chung, 2019). Identificirano je nekoliko spojeva koji pokazuju učinkovita svojstva, a neki od njih istraženi su kroz kliničku primjenu kod ljudi, poput rapamicina, metformina i resveratrola (Balasubramanian i sur., 2017). Osim navedenih, potencijalni CRM su i 2-deoksi-glukoza, spermidin, hidroksicitrat i prirodni spojevi kao što je kurkumin (Antunes i sur., 2018). U nastavku su opisani rapamicin, metformin i spermidin kao CRM koji imaju utjecaj na regulaciju autofagije.

4.5.1. Rapamicin

Rapamicin je makrolidni spoj izoliran iz bakterije *Streptomyces hygroscopicus*. Poznat je i pod nazivom sirolimus, a djeluje kao inhibitor mTOR-a i njegovog signalnog puta. mTOR tvori dva različita proteinska kompleksa, mTORC1 i mTORC2. mTORC1 je akutno osjetljiv na rapamicin, dok je mTORC2 samo kronično osjetljiv na rapamicin. Inhibicija mTORC1 produžuje životni vijek i odgađa starenje, dok inhibicija mTORC2 pokazuje negativne učinke na zdravlje i dugovječnost sisavaca, te je odgovorna je za negativne nuspojave rapamicina. Rapamicin pokazuje široki spektar djelovanja, a najviše se istražuje kao "lijek" protiv starenja. Posjeduje snažno imunomodulirajuće djelovanje, te pacijentima u posttransplantacijskom razdoblju služi kao imunosupresiv. Dokazan je i njegov učinak na neurološke bolesti. Stoga se većina njegovih *anti-age* učinaka i učinaka na neurološke bolesti pripisuje indukciji autofagije, koja je zaslužna za razgradnju određenih komponenti i oštećenih proteina čijom akumulacijom dolazi do razvoja nekih neurodegenerativnih bolesti. Nadalje, inhibicija mTOR-a i indukcija autofagije sprječava pojavu pretilosti, zbog čega se rapamicin i razmatra kao potencijalni CRM. Rapamicin, osim što je inhibitor mTOR-a, također inhibira proliferaciju stanica raka, suzbija ugradnju aminokiselina u stanične proteine inhibirajući translaciju proteina, povećava broj i kvalitetu memorijskih CD8⁺ T stanica, a tretman rapamicinom kroz dulji period dovodi do promjene u ekspresiji gena u stanicama imunološkog sustava (Arriola Apelo i Lamming, 2016; Yoo i sur., 2017; Gabandé-Rodríguez i sur., 2019).

Agencija za hranu i lijekove (engl. FDA - *Food and Drug Administration*) je odobrila upotrebu rapamicina u terapijske svrhe za određene indikacije, no i dalje postoje pitanja vezana uz sigurnost njegove primjene zbog velikog broja nuspojava. Smatralo se da bi farmakološka inhibicija mTOR-a rapamicinom mogla imati široku kliničku primjenu jer se terapija upotrebom rapamicina pokazala učinkovitom za neke pacijente s karcinomom, međutim upotreba monoterapije rapamicinom za liječenje metaboličkih bolesti je ograničena zbog skromne učinkovitosti i mogućih nuspojava kao što su povećana učestalost dijabetesa i nefrotoksičnost (Li i sur., 2014; Arriola Apelo i Lamming, 2016; Chung i Chung, 2019).

4.5.2. Metformin

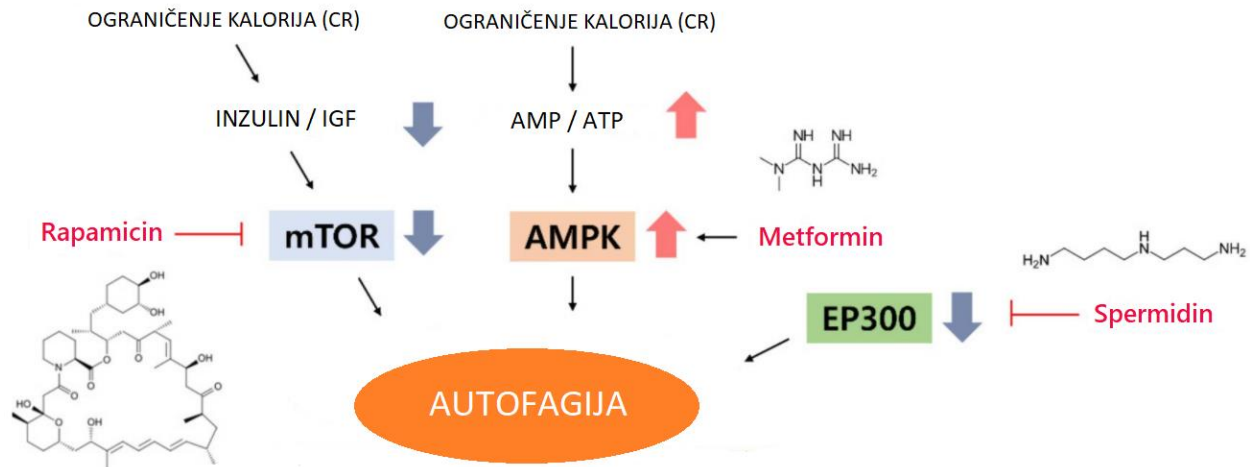
Metformin je hipoglikemijsko sredstvo na bazi gvanidina dobiven iz biljke *Galega officinalis* te se koristi kao standardna terapija za liječenje dijabetesa, bilo samostalno ili u kombinaciji s inzulinom ili drugim terapijama za snižavanje glukoze. Osim za liječenje dijabetesa, predlaže se i kao potencijalni tretman za bolesti povezane sa starenjem, neurološke bolesti i karcinom, uključujući i multipli mijelom jer pokazuje protuupalno i antitumorsko djelovanje. Točni mehanizmi kojima metformin utječe na dijabetes i postiže antitumorske učinke nisu u potpunosti razjašnjeni, ali zna se da aktivira AMPK, što rezultira povećanom osjetljivošću na inzulin, te da inhibira proliferaciju stanica mijeloma inducirajući autofagiju i zaustavljanje staničnog ciklusa. Kao što je već navedeno, AMPK je snažan regulator autofagije, tako da metformin kao aktivator AMPK na taj način oponaša učinak CR (Wang i sur., 2018; Chung i Chung, 2019; Gabandé-Rodríguez i sur., 2019).

Metformin se klasificira kao složeni lijek koji ima više mjesta djelovanja i s više molekularnih mehanizama. Fiziološki gledano, metformin može djelovati izravno ili neizravno na jetru inhibirajući glukoneogenezu, a također djeluje i na crijeva i može utjecati na mikrobiom. S molekularne razine, metformin inhibira mitohondrijski respiratorni lanac u jetri, što rezultira aktivacijom AMPK, povećavajući osjetljivost na inzulin i snižavajući cAMP. Metformin također ima AMPK-neovisne učinke na jetru koji mogu uključivati inhibiciju fruktoze-1,6-bisfosfataze od strane AMP-a (Rena i sur., 2017). Metformin se pokazao i kao snažan protuupalni lijek. Metformin potiče diferencijaciju memorijskih CD8⁺ T stanica, te smanjuje ekspresiju nekoliko upalnih biljega i citokina, a pokazao se učinkovitim i u borbi protiv neuroloških bolesti povezanih s upalom (Gabandé-Rodríguez i sur., 2019).

4.5.3. Spermidin

Spermidin je za razliku od rapamicina i metformina prirodni poliamin koji stimulira proces autofagije. Uključen je u brojne stanične procese i regulira staničnu homeostazu. Prirodno je prisutan u organizmu, a nalazi se i u različitim količinama u određenim namirnicama poput leće, crvenog graha, soje, krumpira, graška, kruški, cvjetače, brokule (Atiya Ali i sur., 2011). Spermidin pokazuje velik broj učinaka koji uključuju protuupalna i antioksidacijska svojstva, te poboljšanu aktivnost šaperona (Madeo i sur., 2018). Nadalje, spermidin povećava razgradnju oštećenih mitohondrija kroz mitofagiju (Gabandé-Rodríguez i sur., 2019). Mnogi *anti-age* učinci spermidina povezni su sa sposobnošću ovog poliamina da inducira autofagiju. Istraživanjima je otkriveno da spermidin inducira autofagiju inhibicijom nekoliko acetiltransferaza. Jedna od acetiltransferaza reguliranih spermidinom je EP300, koja je ujedno glavni negativni regulator autofagije (Pietrocola i sur., 2015; Chung i Chung, 2019). Podaci epidemioloških studija pokazuju da se razina spermidina smanjuje kod ljudi s godinama i da povećani unos hrane bogate spermidinom smanjuje ukupnu smrtnost povezanu s kardiovaskularnim bolestima i karcinomom. Jedan od najsnažnijih argumenata za buduća klinička ispitivanja spermidina kao povoljnog CRM je njegova niska toksičnost i snažna učinkovitost, čak i pri umjerenim koncentracijama. Budući da je spermidin prisutan u svakodnevnoj prehrani ljudi, klinička ispitivanja s ciljem povećanja unosa ovog poliamina su izgledna. Neke od strategija povećanja unosa spermidina su dodavanje sintetičkog spermidina, primjena probiotika i prebiotika koji favoriziraju mikrobnu sintezu poliamina u crijevima (Madeo i sur., 2018).

Potrebno je još istraživanja kako bi se bolje razumjele blagodati CRM, sigurnost njihove upotrebe kao i potencijalne nuspojave. Potrebno je procijeniti jesu li dovoljno učinkoviti induktori autofagije i mogu li se primjenjivati za prevenciju i/ili liječenje ljudskih bolesti (Chung i Chung, 2019). Na slici 3 prikazani su utjecaji opisanih CRM na proces autofagije.



Slika 3. Utjecaj kalorijske restrikcije i CR mimetika - rapamicina, metformina i spermidina na proces autofagije (prema Chung i Chung, 2019).

CR i CRM moduliraju proces autofagije. CR smanjuje mTOR signalizaciju smanjenjem razine inzulina i IGF, te povećava omjer AMP/ATP i aktivira AMPK. Smanjen mTOR i aktivirani AMPK učinkovito potiču pokretanje procesa autofagije. Rapamicin aktivira autofagiju inhibicijom mTOR, a metformin inducira autofagiju aktiviranjem AMPK. Spermidin inducira cjelokupni proces autofagije inhibicijom EP300 (Chung i Chung, 2019).

5. ZAKLJUČAK

Proces autofagije ima važnu ulogu u održavanju i regulaciji homeostaze stanica jer osigurava energiju potrebnu za esencijalne stanične funkcije, omogućavajući tako preživljavanje stanica i organizma. U stanicama sisavaca razlikuju se tri primarna oblika autofagije: makroautofagija, mikroautofagija i autofagija posredovana šaperonom. Iako je postignut značajan napredak u razumijevanju mehanizama kojima se odvija, postoji još nepoznanica, a razumijevanje kompletnog mehanizma procesa autofagije ostaje za istražiti. Opsežna istraživanja tijekom posljednjih godina otkrila su središnju ulogu autofagije ne samo za staničnu homeostazu, već i za različita patološka stanja, pri čemu se pokazalo da disfunkcija autofagije može dovesti do nepravilne stanične funkcije, abnormalnog nakupljanja proteina i posljedično razvoja različitih bolesti. Aktiviranje autofagije korisno je za suzbijanje mehanizama koji su uključeni u razvoj neurodegenerativnih bolesti. Također, modulacija ovog procesa identificirana je kao potencijalna terapija za liječenje karcinoma. Unatoč brojnim blagotvornim učincima, dugotrajna ili pretjerana autofagija može biti štetna za stanice i rezultirati staničnom smrću. Post i kalorijska restrikcija (CR) su snažni pokretači autofagije, pokazuju brojne dobrobiti za organizam i pretpostavlja se da produljuju životni vijek većine organizama. Također, počinju se istraživati razni nutraceutici i lijekovi koji oponašaju učinke CR, tzv. mimetici kalorijske restrikcije (poput rapamicina, metformina, spermidina) kao potencijalna farmakološka sredstva. Zbog složenosti procesa autofagije i interakcije s drugim staničnim procesima, potrebno je provesti dodatna istraživanja kako bi se bolje razumjeli post, CR te CRM kao dovoljno učinkoviti i sigurni induktori autofagije te razmotrila njihova terapijska primjena u prevenciji i/ili liječenju različitih bolesti.

6. LITERATURA

- Alers S., Löffler A. S., Wesselborg S., Stork B. (2012) Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Molecular and Cellular Biology* **32** (1): 2–11.
- Antunes F., Erustes A. G., Costa A. J., Nascimento A. C., Bincoletto C., Ureshino R. P., Pereira G., Smaili S. S. (2018) Autophagy and intermittent fasting: the connection for cancer therapy? *Clinics* **73** (1): e814s.
- Arriola Apelo S. I., Lamming D. W. (2016) Rapamycin: An inhibiTOR of aging emerges from the soil of Easter Island. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* **71**(7): 841–849.
- Arnold S. E., Arvanitakis Z., Macauley-Rambach S. L., Koenig A. M., Wang H. Y., Ahima R. S., Craft S., Gandy S., Buettner C., Stoeckel L. E., Holtzman D. M., Nathan D. M. (2018) Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: concepts and conundrums. *Nature Reviews. Neurology* **14** (3): 168–181.
- Atiya Ali M., Poortvliet E., Strömberg R., Yngve, A. (2011) Polyamines in foods: development of a food database. *Food & Nutrition Research* **55**: 10.
- Bagherniya M., Butler A. E., Barreto G. E., Sahebkar A. (2018) The effect of fasting or calorie restriction on autophagy induction: A review of the literature. *Ageing Research Reviews* **47**: 183–197.
- Balasubramanian P., Howell P. R., Anderson R. M. (2017) Aging and caloric restriction research: a biological perspective with translational potential. *EBioMedicine* **21**: 37–44.
- Bales C. W., Kraus W. E. (2013) Caloric restriction: implications for human cardiometabolic health. *Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation and Prevention* **33** (4): 201–208.
- Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L. (2013) Biokemija, 6. izd., Školska knjiga. str. 409-411, 433-435, 592-601.
- Bialik S., Dasari S. K., Kimchi A. (2018) Autophagy-dependent cell death - where, how and why a cell eats itself to death. *Journal of Cell Science* **131**: 18.

- Boya P., González-Polo R. A., Casares N., Perfettini J. L., Dessen P., Larochette N., Métivier D., Meley D., Souquere S., Yoshimori T., Pierron G., Codogno P., Kroemer G. (2005) Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* **25** (3): 1025–1040.
- Brandhorst S., Longo V. D. (2016) Fasting and caloric restriction in cancer prevention and treatment. *Recent Results in Cancer Research* **207**: 241–266.
- Browning J. D., Baxter J., Satapati S., Burgess S. C. (2012) The effect of short-term fasting on liver and skeletal muscle lipid, glucose, and energy metabolism in healthy women and men. *Journal of Lipid Research* **53** (3): 577–586.
- Chaabane W., User S. D., El-Gazzah M., Jaksik R., Sajjadi E., Rzeszowska-Wolny J., Los M. J. (2013) Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* **61** (1): 43–58.
- Chaix A., Zarrinpar A., Miu P., Panda S. (2014) Time-restricted feeding is a preventative and therapeutic intervention against diverse nutritional challenges. *Cell Metabolism* **20** (6): 991–1005.
- Chung K. W., Chung H. Y. (2019) The effects of calorie restriction on autophagy: role on aging intervention. *Nutrients* **11** (12): 2923.
- Chung K. W., Kim D. H., Park M. H., Choi Y. J., Kim N. D., Lee J., Yu B. P., Chung H. Y. (2013) Recent advances in calorie restriction research on aging. *Experimental Gerontology* **48** (10): 1049–1053.
- Cozzo A. J., Coleman M. F., Pearce J. B., Pfeil A. J., Etigunta S. K., Hursting S. D. (2020) Dietary energy modulation and autophagy: exploiting metabolic vulnerabilities to starve cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **8**: 590192.
- Cuervo A. M. (2010) Chaperone-mediated autophagy: selectivity pays off. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **21** (3): 142–150.
- D'Arcy M. S. (2019) Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International* **43** (6): 582–592.

- De Cabo R., Mattson M. P. (2019) Effects of intermittent fasting on health, aging, and disease. *The New England Journal of Medicine* **381** (26): 2541–2551.
- Denton D., Kumar S. (2019) Autophagy-dependent cell death. *Cell Death and Differentiation* **26** (4): 605–616.
- Dias I. R., Santos C. S., Magalhães C., De Oliveira L., Peixoto M., De Sousa R., Cassilhas R. C. (2020) Does calorie restriction improve cognition? *IBRO Reports* **9**: 37–45.
- Feng Y., He D., Yao Z., Klionsky D. J. (2014) The machinery of macroautophagy. *Cell Research* **24** (1): 24–41.
- Gabandé-Rodríguez E., Gómez de Las Heras M. M., Mittelbrunn M. (2019) Control of inflammation by calorie restriction mimetics: on the crossroad of autophagy and mitochondria. *Cells* **9** (1): 82.
- Galluzzi L., Baehrecke E. H., Ballabio A., Boya P., Bravo-San Pedro J. M., Cecconi F., Choi A. M., Chu C. T., Codogno P., Colombo M. I., Cuervo A. M., Debnath J., Deretic V., Dikic I., Eskelinen E. L., Fimia G. M., Fulda S., Gewirtz D. A., Green D. R., Hansen M., ... Kroemer G. (2017) Molecular definitions of autophagy and related processes. *The EMBO Journal* **36** (13): 1811–1836.
- Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S. A., Abrams J. M., Adam D., Agostinis P., Alnemri E. S., Altucci L., Amelio I., Andrews D. W., Annicchiarico-Petruzzelli M., Antonov A. V., Arama E., Baehrecke E. H., Barlev N. A., Bazan N. G., Bernassola F., Bertrand M., Bianchi K., Blagosklonny M. V., ... Kroemer G. (2018) Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation* **25** (3): 486–541.
- Golstein P., Kroemer G. (2007) Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences* **32** (1): 37–43.
- He L., Zhang J., Zhao J., Ma N., Kim S. W., Qiao S., Ma X. (2018) Autophagy: the last defense against cellular nutritional stress. *Advances in Nutrition* **9** (4): 493–504.
- Ichimiya T., Yamakawa T., Hirano T., Yokoyama Y., Hayashi Y., Hirayama D., Wagatsuma K., Itoi T., Nakase H. (2020) Autophagy and autophagy-related diseases: a review. *International Journal of Molecular Sciences* **21** (23): 8974.

- Itakura E., Kishi-Itakura C., Mizushima N. (2012) The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell* **151** (6): 1256–1269.
- Jacomin A. C., Gul L., Sudhakar P., Korcsmaros T., Nezis I. P. (2018) What we learned from big data for autophagy research. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **6**: 92.
- Juste Y. R., Cuervo A. M. (2019) Analysis of chaperone-mediated autophagy. *Methods in Molecular Biology* **1880**: 703–727.
- Kaur J., Debnath J. (2015) Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **16** (8): 461–472.
- Kirchner P., Bourdenx M., Madrigal-Matute J., Tiano S., Diaz A., Bartholdy B. A., Will B., Cuervo A. M. (2019) Proteome-wide analysis of chaperone-mediated autophagy targeting motifs. *PLoS Biology* **17** (5): e3000301.
- Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J., Alnemri E. S., Baehrecke E. H., Blagosklonny M. V., El-Deiry W. S., Golstein P., Green D. R., Hengartner M., Knight R. A., Kumar S., Lipton S. A., Malorni W., Nuñez G., Peter M. E., Tschopp J., Yuan J., Piacentini M. ,..., Melino G. (2009) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation* **16** (1): 3–11.
- Lessan N., Ali T. (2019) Energy metabolism and intermittent fasting: the Ramadan perspective. *Nutrients* **11** (5): 1192.
- Li J., Kim S. G., Blenis J. (2014) Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metabolism* **19** (3): 373–379.
- Li W. W., Li J., Bao J. K. (2012) Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cellular and Molecular Life Sciences* **69** (7): 1125–1136.
- Longo V. D., Mattson M. P. (2014) Fasting: molecular mechanisms and clinical applications. *Cell Metabolism* **19** (2): 181–192.
- Longo V. D., Panda S. (2016) Fasting, circadian rhythms, and time-restricted feeding in healthy lifespan. *Cell Metabolism* **23** (6): 1048–1059.

Madeo F., Eisenberg T., Pietrocola F., Kroemer G. (2018) Spermidine in health and disease. *Science* **359** (6374): eaan2788.

Madeo F., Pietrocola F., Eisenberg T., Kroemer G. (2014) Caloric restriction mimetics: towards a molecular definition. *Nature Reviews. Drug Discovery* **13** (10): 727–740.

Madeo F., Zimmermann A., Maiuri M. C., Kroemer G. (2015) Essential role for autophagy in life span extension. *The Journal of Clinical Investigation* **125** (1): 85–93.

Mattson M. P., Arumugam T. V. (2018) Hallmarks of brain aging: adaptive and pathological modification by metabolic states. *Cell Metabolism* **27** (6): 1176–1199.

Mattson M. P., Longo V. D., Harvie M. (2017) Impact of intermittent fasting on health and disease processes. *Ageing Research Reviews* **39**: 46–58.

Mehrabani S., Bagherniya M., Askari G., Read M. I., Sahebkar A. (2020) The effect of fasting or calorie restriction on mitophagy induction: a literature review. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* **11** (6): 1447–1458.

Mijaljica D., Prescott M., Devenish R. J. (2012) The intriguing life of autophagosomes. *International Journal of Molecular Sciences* **13** (3): 3618–3635.

Newman J. C., Verdin E. (2017) β -Hydroxybutyrate: a signaling metabolite. *Annual Review of Nutrition* **37**: 51–76.

O'Flanagan C. H., Smith L. A., McDonnell S. B., Hursting S. D. (2017) When less may be more: calorie restriction and response to cancer therapy. *BMC Medicine* **15** (1): 106.

Orenstein S. J., Cuervo, A. M. (2010) Chaperone-mediated autophagy: molecular mechanisms and physiological relevance. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **21** (7): 719–726.

Paoli A., Bianco A., Grimaldi K. A. (2015) The ketogenic diet and sport: a possible marriage? *Exercise and Sport Sciences Reviews* **43** (3): 153–162.

Paoli A., Tinsley G., Bianco A., Moro T. (2019) The influence of meal frequency and timing on health in humans: the role of fasting. *Nutrients* **11** (4): 719.

Parzych K. R., Klionsky D. J. (2014) An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants & Redox Signaling* **20** (3): 460–473.

- Petrovski G., Das D. K. (2010) Does autophagy take a front seat in lifespan extension? *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **14** (11): 2543–2551.
- Pickles S., Vigié P., Youle R. J. (2018) Mitophagy and quality control mechanisms in mitochondrial maintenance. *Current Biology* **28** (4): 170–185.
- Pietrocola F., Lachkar S., Enot D. P., Niso-Santano M., Bravo-San Pedro J. M., Sica V., Izzo V., Maiuri M. C., Madeo F., Mariño G., Kroemer G. (2015) Spermidine induces autophagy by inhibiting the acetyltransferase EP300. *Cell Death and Differentiation* **22** (3): 509–516.
- Rena G., Hardie D. G., Pearson E. R. (2017) The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia* **60** (9): 1577–1585.
- Speakman J. R., Mitchell S. E. (2011) Caloric restriction. *Molecular Aspects of Medicine* **32** (3): 159–221.
- Wang Y., Xu W., Yan Z., Zhao W., Mi J., Li J., Yan H. (2018) Metformin induces autophagy and G0/G1 phase cell cycle arrest in myeloma by targeting the AMPK/mTORC1 and mTORC2 pathways. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **37** (1): 63.
- Yang Z., Klionsky D. J. (2010) Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Current Opinion in Cell Biology* **22** (2): 124–131.
- Yoo Y. J., Kim H., Park S. R., Yoon Y. J. (2017) An overview of rapamycin: from discovery to future perspectives. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **44** (4-5): 537–553.
- Yorimitsu T., Klionsky D. J. (2005) Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death and Differentiation* **12** (2): 1542–1552.
- Yu L., Chen Y., Tooze S. A. (2018) Autophagy pathway: cellular and molecular mechanisms. *Autophagy* **14** (2): 207–215.
- Zhang C. S., Hawley S. A., Zong Y., Li M., Wang Z., Gray A., Ma T., Cui J., Feng J. W., Zhu M., Wu Y. Q., Li T. Y., Ye Z., Lin S. Y., Yin H., Piao H. L., Hardie D. G., Lin S. C. (2017) Fructose-1,6-bisphosphate and aldolase mediate glucose sensing by AMPK. *Nature* **548** (7665): 112–116.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Marina Dreuski