1995, 44 (1): 71–88
PL ISSN 0023-4249

Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika KOSMOS

MAREK JURGOWIAK, RYSZARD OLIŃSKI
Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej
Akademii Medycznej im. L. Rydygiera w Bydgoszczy
Karłowicza 24, 85–092 Bydgoszcz

„O niczym nie wiemy, że jest przyczyną czegoś innego, bez doświadczenia".
Dawid Hume (1711–1776)

WOLNE RODNIKI A STARZENIE SIĘ

WPROWADZENIE

Starzenie się jest procesem, którego mechanizmu ciągle nie potrafimy dostatecznie zrozumieć. Zadziwiającym wydaje się fakt, że organizm, który powstaje w złożonym procesie morfogenezy nie jest w stanie sprostać — wydawałoby się prostszemu zadaniu — utrzymać się w stanie, w jakim już funkcjonuje. Starzejemy się właściwie z każdą chwilą swojego istnienia. W samym fakcie istnienia jest zawarta bowiem immanentna cecha starzenia się. Pewne trudności nomenklaturowe narzuca natomiast fakt, że język polski nie odróżnia jasno procesu „wiekowienia" (ang. ageing) od starzenia się (ang. senescence). Mówiąc więc o procesach starzenia mamy zwykle na uwadze zachodzące procesy inwolucyjne, a nie fakt upływu czasu trwania organizmu.

Należy w tym miejscu podkreślić, że biogerontologia, jako nauka zajmująca się wyjaśnieniem biologicznych mechanizmów odpowiedzialnych za procesy starzenia, rozwinęła się praktycznie w ciągu ostatnich 15–20 lat.

Procesowi starzenia się ulegają wszystkie organizmy wielokomórkowe; podobnie uniwersalnym zjawiskiem jest ich śmierć. W trakcie starzenia powstaje szereg zmian strukturalnych i funkcjonalnych w organizmie, a śmierć osobnika jest konsekwencją tych zdarzeń. Należy jednakże pamiętać, że zauważalne zmiany w funkcjonowaniu starzejącego się organizmu jako całości są poprzedzo-

---

Wykaz stosowanych skrótów: SOD (ang. superoxide dismutase) — dysmutaza ponadtlenkowa, Cu Zn SOD — dysmutaza ponadtlenkowa zawierająca miedź i cynk, Mn SOD — dysmutaza ponadtlenkowa zawierająca mangan, GSH-Px — peroksydaza glutationowa, GS — syntetaza glutaminowa, mRNA (ang. messenger RNA) — informacyjny RNA, (.) — kropka przy symbolu rodnika oznacza obecność niesparowanego elektronu na orbicie zewnętrznej, 8-OH-dG — 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyna (nazwa zmodyfikowanej oksydacyjnie zasady azotowej stosowana w przeważającej części cytowanego piśmiennictwa — według nowszych badań jest to forma 8-oxo-2' — deoksyguanozyna), HPLC — wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa.

ne wystąpieniem zaburzeń w czynności a także morfologii poszczególnych komórek i ich organelli.

Istnieje kilka hipotez próbujących wyjaśnić fenomen starzenia się organizmu (MEDVEDEV 1990). Na przykład procesy starzenia mogą być efektem łączenia się cząsteczek na poziomie subkomórkowym (BJORKSTEN 1968); zmian w funkcjonowaniu układu immunologicznego (WALFORD 1969); patologii mającej początek w szyszynce (ROZENCWAIG i współaut. 1987); uszkodzeń wywołanych przez reakcje wolnorodnikowe (HARMAN 1956, 1968, 1992); programu zawartego w genach (HAYFLICK 1987), bądź na skutek mutacji i niestabilności materiału genetycznego (KIRKWOOD 1985). Obecnie, żadna z wymienionych teorii nie znajduje wyłącznej i powszechnej akceptacji. Wątpliwe wydaje się też, aby tylko jedna z nich mogła wyjaśnić wszystkie mechanizmy związane z procesem starzenia się (VIJG 1990).

W 1956 roku D. HARMAN zaproponował po raz pierwszy „wolnorodnikową teorię starzenia się". Autor ten wysunął przypuszczenie, że starzenie się jest wynikiem komasacji nieodwracalnych uszkodzeń komórek i tkanek wywołanych przez wolne rodniki. Poparciem dla tej koncepcji była obserwacja przyspieszenia niektórych objawów starzenia się na skutek radiolitycznej generacji rodników po naświetleniu organizmu promieniami X. Wiadomym jest obecnie, że wolne rodniki tlenowe są stale produkowane w przebiegu metabolizmu komórkowego. Znacznym źródłem rodników jest system cytochromu P_{450} i mitochondrialny łańcuch transportu elektronów (HALLIWELL i GUTTERIDGE 1989). Przyjmuje się, że w warunkach fizjologicznych zazwyczaj 1%–2% metabolizowanego tlenu ulega konwersji do form wolnorodnikowych ($O_2^{\cdot -}$ i H_2O_2) (JOENJE 1989). Każda komórka szczura przetwarza dziennie około 10^{12} cząsteczek O_2. Częściowa redukcja obejmuje około 2% cząsteczek tlenu, w wyniku czego powstaje w komórce 2×10^{10} cząsteczek $O_2^{\cdot -}$ i H_2O_2 każdego dnia (AMES i współaut. 1993). Natomiast jak podają HALLIWELL i GUTTERIDGE (1989), w tkankach płuc szczura eksponowanych eksperymentalnie na działanie powietrza, aż 9% metabolizowanego tlenu uczestniczy w generowaniu rodników ponadtlenkowych.

W trzynaście lat po ogłoszeniu „wolnorodnikowej teorii starzenia się" nastąpił nowy okres badań, co było związane z odkryciem i opisaniem biologicznych właściwości dysmutazy ponadtlenkowej (ang. SOD, EC 1.15.1.1.). Działanie tego enzymu zarówno u muszki owocowej, jak i u człowieka, polega na neutralizacji rodników ponadtlenkowych ($O_2^{\cdot -}$). Fakt istnienia w komórkach aerobowych złożonych mechanizmów, zarówno enzymatycznych, jak i nieenzymatycznych (patrz dalej), które chronią je przed toksycznym działaniem tlenu, wskazywać może na udział rodników tlenowych w wielu zjawiskach patologicznych, łącznie ze starzeniem się.

Ponieważ istnienie i prawidłowe funkcjonowanie organizmu aerobowego w pełni jest uzależnione od tlenu obecnego w atmosferze, wydaje się paradoksalnym fakt, że wolnorodnikowe formy tlenu indukować mogą procesy prowadzące do uszkodzeń komórek i powolnego starzenia się organizmu, a w efekcie do jego śmierci. Już w 1954 roku R. GERSCHMAN i współpracownicy (GERSCHMAN 1981) przedstawili pogląd, według którego wiele szkodliwych efektów tlenu należy przypisać tworzeniu rodników a rozwinięciem tej hipotezy jest tak zwana ponad-

tlenkowa teoria toksyczności tlenu przedstawiona głównie przez FRIDOVICHA (1975).

POWSTAWANIE AKTYWNYCH FORM TLENU W ORGANIZMACH

Cząsteczki lub atomy, określane jako wolne rodniki, są wysoce reaktywnymi czynnikami, posiadającymi niesparowany elektron na orbicie zewnętrznej. Powstają one w przebiegu reakcji wolnorodnikowych, będących zazwyczaj procesami nieodwracalnymi. W przypadku wolnych rodników tlenowych są to: redukcja tlenu cząsteczkowego, peroksydacja lipidów i wytwarzanie rodników semichinonowych (MARNETT 1987).

Każda komórka aerobowa wytwarza, w przebiegu metabolizmu, pewne ilości reaktywnych form tlenu. W wyniku przyjęcia przez O_2 jednego elektronu powstaje anionorodnik ponadtlenkowy $O_2^{\cdot -}$

$$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot -}$$

W środowisku komórkowym przemiany anionorodnika ponadtlenkowego mogą prowadzić do powstania H_2O_2, zarówno na skutek spontanicznej, jak i katalizowanej przez dysmutazę ponadtlenkową reakcji dysmutacji (SOD przyspiesza tę reakcję około 10^4 razy)

$$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$$

Nadtlenek wodoru w warunkach *in vivo* powstaje prawdopodobnie głównie z $O_2^{\cdot -}$ w mitochondriach komórek (HALLIWELL i GUTTERIDGE 1989, 1990, SOHAL i BRUNK 1992). H_2O_2, który ma zdolność łatwego przenikania przez błony komórkowe (FLOYD 1990) sam nie będąc rodnikiem, łatwo ulega przekształceniu w taką formę. Formą tą jest rodnik hydroksylowy $OH^{\cdot}$, który powstaje w komórkach według reakcji Fentona, katalizowanej przez jony żelazawe;

$$O_2^{\cdot -} + Fe^{+3} \rightarrow Fe^{+2} + O_2$$
$$H_2O_2 + Fe^{+2} \rightarrow Fe^{+3} + OH^- + OH^{\cdot}$$

Tak więc, obecność $O_2^{\cdot -}$ w komórce nieuchronnie prowadzi do tworzenia H_2O_2 oraz, co gorsze, wysoce niebezpiecznego dla wszystkich komórek $OH^{\cdot}$. Rodnik hydroksylowy jest uważany za najbardziej toksyczny wśród reaktywnych form tlenu produkowanych przez komórki organizmu (HALLIWELL 1992).

Dodatkowo, niektóre egzogenne czynniki zanieczyszczające środowisko życia organizmów, przenikając do komórek i reagując z endogennym H_2O_2, mogą powodować powstawanie rodników hydroksylowych (KASPRZAK 1991). Należą do nich metale ciężkie, takie jak Cr i Ni. Źródłem znacznej ilości wolnych rodników są także substancje smoliste będące wynikiem spalania paliw stałych, gazy wydechowe silników spalinowych oraz dym powstający podczas palenia tytoniu (HALLIWELL i GUTTERIDGE 1985). Dwutlenek siarki (SO_2), którego źródłem są paliwa, takie jak węgiel czy olej napędowy, może indukować reakcje wolnorod-

nikowe poprzez jony siarczynowe (SO_3^{-2}), będące przejściowym produktem powstawania siarczanów (SO_4^{-2}) (HALLIWELL i GUTTERIDGE 1989).

MECHANIZMY ZABEZPIECZAJĄCE ORGANIZM PRZED DZIAŁANIEM TOKSYCZNYCH FORM TLENU

Od najwcześniejszych etapów ewolucji, w większości układów komórkowych, dochodziło do stopniowego wyodrębniania i doskonalenia zabezpieczeń przed szkodliwym wpływem różnorodnych procesów chemicznych (w tym reakcji wolnorodnikowych), na które są narażone tak istotne składniki komórek, jak między innymi DNA, RNA oraz białka i lipidy.

Zarówno w komórkach prokariotycznych, jak i eukariotycznych występują mechanizmy chroniące przed toksycznym działaniem tlenu i produktami jego redukcji. Głównie są to układy enzymatyczne, do których należą : SOD, katalaza, peroksydaza glutationowa,

$$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2,$$

$$2H_2O_2 \xrightarrow{katalaza} 2H_2O + \tfrac{1}{2}O_2,$$

$$H_2O_2 + R(OH)_2 \xrightarrow{peroksydaza} RO_2 + H_2O,$$

ponadto reduktaza glutationowa, dehydrogenaza glukozo-6-fosforanowa oraz mechanizmy nieenzymatyczne, wśród których można wyróżnić kompleksy jonów metali grup przejściowych i wolne jony, które katalizują reakcje dysmutacji rodników; antyutleniacze (tokoferol, glutation, kwas askorbinowy, melatonina, bilirubina) a także zmiatacze wolnych rodników (kwas moczowy, glukoza, mannitol) (FRAGA i współaut. 1991, LICZMAŃSKI 1988b, REITER 1994). Człowieka charakteryzuje potencjalnie najwyższy wśród ssaków maksymalny czas trwania życia, co jest związane, jak się przypuszcza, z wykształceniem bardziej skutecznych mechanizmów chroniących komórki przed działaniem wolnych rodników (ONO i OKADA 1985).

TEMPO STARZENIA SIĘ ORGANIZMU

W miarę starzenia się organizmu wzrasta prawdopodobieństwo jego śmierci. Każdy gatunek ma sobie tylko właściwy, maksymalny czas trwania życia. Szacuje się, że pułapem możliwym do osiągnięcia przez człowieka jest wiek nawet w granicach od 90 do 115 lat. Jak jednak ocenia KIRKWOOD (1985), inwestycje gatunku *Homo sapiens*, służące podtrzymywaniu czynności organizmu, wystarczają do zapewnienia sprawnego funkcjonowania ludzkiego ciała w ciągu niespełna 40 lat, co pokrywa się z przeciętnym czasem życia człowieka przez większą część naszej filogenezy. Po upływie tego czasu wyczerpaniu ulegają mechanizmy obronne, co stopniowo prowadzi do zaniku prawidłowej reakcji na stresy wywołane działaniem takich czynników, jak chociażby wolne rodniki

tlenowe. Głównie z powodu chorób infekcyjnych bądź niewłaściwego odżywiania się w populacjach o niskim stopniu rozwoju cywilizacyjnego tylko niewielu osobnikom udaje się osiągnąć maksymalną długość życia. W społeczeństwach bardziej rozwiniętych przypadki śmierci z takich przyczyn są rzadsze. Tylko niewielki odsetek wśród populacji ludzkich umiera przed ukończeniem 35 roku życia na skutek różnych schorzeń, podczas gdy zgon ludzi w starszym wieku dużo częściej jest wynikiem patologii, takich jak choroba niedokrwienna serca bądź nowotwory. Występowanie chorób nowotworowych w znacznym stopniu jest związane z wiekiem; większość przypadków raka odnotowuje się od 4 do 6 razy częściej proporcjonalnie do wzrastającego wieku osobnika. Odnosi się to zarówno do gatunków krótko żyjących, takich jak szczur i mysz (około 30% osobników w wieku od 2 do 3 lat choruje na raka), jak i gatunków o długim okresie życia, do których należy człowiek (około 30% ludzi w wieku 85 lat choruje na raka). Tak więc, w przypadku człowieka, przeciętna długość życia osobników społeczeństw „cywilizowanych" jest większa niż w przypadku społeczeństw o niższym poziomie rozwoju cywilizacyjnego, jednak potencjalnie maksymalny czas życia w obu przypadkach prawdopodobnie nie różni się. Obecnie przypuszcza się, że jakkolwiek maksymalny okres trwania życia jest specyficzny gatunkowo, to długość życia osiągana przez danego osobnika zmieniać się może zależnie od warunków środowiskowych. Interesującą wydaje się obserwacja, iż ograniczenie ilości pożywienia podczas wczesnej fazy rozwoju prowadzi do statystycznie istotnego wzrostu średniej długości życia w przypadku takich zwierząt, jak szczur, *Daphnia* i *Drosophila*. SOHAL i współpracownicy (1994) stwierdzili wzrost długości życia u myszy z ograniczoną dietą i spadek poziomu uszkodzonych oksydacyjnie białek w porównaniu do grupy kontrolnej tych zwierząt.

Składniki diety to kolejny, ważny jak się wydaje, czynnik wpływający na długość życia. Doskonałym tego przykładem może być królowa pszczela (*Apis mellifera*). Czas życia królowej wynosi około 6 lat, podczas gdy robotnice żyją od 3 do 6 miesięcy. Zróżnicowanie to nie może być efektem różnic genetycznych pomiędzy królową i robotnicami, ponieważ ich genomy są identyczne. Różnica w długości życia jest w tym wypadku związana z pobieraniem bądź nie przez owady mleczka pszczelego (ang. royal jelly) podczas stadium larwalnego. Substancja ta wydłuża okres życia owadów około 20-krotnie.

Długość życia pozostaje również w związku z temperaturą otoczenia. R. PEARL (1928) opublikował teorię starzenia się, którą nazwał „teorią tempa życia" pierając się na wynikach wcześniejszych badań M. Rubnera oraz J. Loeba i J. H. Northrupa. W przypadku *Drosophila* hipoteza ta postuluje, iż dorosłe muchy żyją krócej w podwyższonej temperaturze, ponieważ wzmaga się intensywność ich procesów życiowych, to znaczy aktywność metaboliczna. Od czasu ukazania się tej publikacji wielu badaczy zwróciło uwagę na współzależność pomiędzy temperaturą i tempem metabolizmu a długością życia *Drosophila* (MIQUEL i współaut. 1976, 1983; SOHAL 1976, 1987). Wykazano mianowicie, że zużycie tlenu, będące miarą tempa metabolizmu jest odwrotnie skorelowane z długością życia *Drosophila* (FLEMING i współaut. 198, MIQUEL i współaut. 1976). O ile średni czas życia tych owadów wynosi 120 dni w temperaturze otoczenia równej 10°C, to przy temperaturze 30°C już tylko 14 dni. Wiąże się to ze wzmożeniem

konsumpcji tlenu w podwyższonej temperaturze. Analogiczne badania przeprowadzone przez SOHALA i współpracowników popierają teorię starzenia się, bazującą na tempie metabolizmu w przypadku *Musca domestica* (SOHAL i BUCHAM 1981). Eksperymentalne dane popierające tę koncepcję pochodzą również z badań zwierząt ulegających hibernacji. Chomiki ulegające hibernacji cechuje dłuższy okres życia, proporcjonalnie do czasu przebytego w tym stanie (LYMAN i współaut. 1981).

Całkowita wartość energii zużywanej na gram masy ciała, w okresie od osiągnięcia dojrzałości do śmierci, dla pięciu różnych gatunków ssaków (koń, krowa, pies, kot, świnka morska), których potencjalna długość życia zamyka się w granicach od 6 do 30 lat, jest szacowana na około 200 kcal. Dane te popierają koncepcję, że różne gatunki posiadają zróżnicowany, ale względnie stały potencjał metaboliczny. Późniejsze badania wykazały, że potencjał metaboliczny w przypadku człowieka wynosi około 800 kcal, innych naczelnych 400 kcal a pozostałych ssaków 200 kcal (CUTLER 1991). Większość wniosków wynikających z badań potencjału metabolicznego generalnie sprowadza się do stwierdzenia, że tempo zużycia energii determinuje długość życia. RAO i współpracownicy (1990) obserwowali, że aktywność i poziom mRNA dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy i peroksydazy glutationowej (GSH-Px) ulega obniżeniu u starych szczurów. Spadek aktywności i poziomu mRNA wymienionych enzymów eliminowano doświadczalnie ograniczając zużycie energii przez zwierzęta (patrz również tab. 1).

Tabela 1

Wpływ ograniczenia zużycia energii na niektóre efekty związane z procesem starzenia się (wg różnych autorów, za VELTHUIS-TE WIERIK i VAN DEN BERG 1994 — zmienione).

Badany czynnik	Kierunek zmian z wiekiem	Efekt ograniczenia dopływu energii na starzenie się	Badany organizm
Aktywność Cu-Zn SOD	–	O	szczur
Poziom mRNA	–	O	szczur
Poziom mRNA	B	N	mysz
Aktywność Mn SOD	B	N	mysz
Poziom mRNA	–	O	mysz
Aktywność SOD	B	N	mysz
Aktywność SOD	–	N	szczur
Aktywność katalazy	–	O	szczur
Aktywność katalazy	–	O	mysz
Poziom mRNA	–	O	szczur
Poziom mRNA	+	N	mysz
Aktywność GSH-Px	–	N	szczur
Aktywność GSH-Px	B	N	szczur
Poziom mRNA	–	O	szczur
Poziom mRNA	B	N	mysz
Poziom mRNA cytochromu P_{450}	–	O	mysz

Rozkład cytochromu P_{450} przez H_2O_2	+	O	szczur
Lipofuscyna	+	O	szczur
Peroksydacja lipidów	+	O	mysz
Peroksydacja lipidów	+	O	szczur

+ — oznacza wzrost, - — spadek, B — brak efektu, N — brak wpływu na starzenie się, O — ograniczenie efektów starzenia się.

Biochemiczne implikacje, powiązania długości życia i tempa metabolizmu (zużycia O_2) nie były w pełni zrozumiałe do czasu odkrycia, że toksyczność tlenu jest związana z metaboliczną generacją rodników ponadtlenkowych ($O_2^{\cdot-}$) (FRIDOVICH 1975). Tak więc, odkrycie, że komórki aerobowe produkują rodniki tlenowe w procesach oddychania, dało możliwość powiązania „teorii tempa życia" z faktem generowania w komórkach reaktywnych form tlenu (SOHAL i ORR 1993). Wszystkie ssaki wykonują około 200 milionów oddechów w przeciętnym okresie osobniczego życia gatunku, niezależnie od tego czy wynosi ono 2 czy też 80 lat. Mitochondria związane z oddychaniem komórkowym coraz częściej są określane jako „zegar biologiczny" — odmierzający czas życia organizmu. Dla porównania, mitochondria myszy, która żyje tylko dwa lata, „pracują" 40 razy intensywniej w porównaniu do mitochondriów człowieka (HARMAN 1972).

PODSTAWY WOLNORODNIKOWEJ TEORII STARZENIA SIĘ

Stwierdzenie faktu, że wzmożone działanie przeciwutleniające dysmutazy ponadtlenkowej ma u mutantów *Drosophila melanogaster* związek z ich długowiecznością, może być znakomicie odniesione do teorii HARMANA (1956) wiążącej działanie wolnych rodników ze starzeniem się. Z badań przeprowadzonych przez CUTLERA (1991) wynika, że komórki organizmu ludzkiego i innych gatunków długowiecznych wytwarzają większe ilości SOD, wykazując jednocześnie większą odporność na procesy utleniania niż komórki organizmów o krótkim czasie życia. Zdaniem cytowanego autora, starzenie się jest wynikiem stopniowego upośledzenia wcześniej skuteczniej działających mechanizmów chroniących komórki przed utlenianiem. Ponieważ ochrona przed działaniem wolnych rodników nie jest w pełni wystarczająca, komórki stale są narażone, w mniejszym bądź większym stopniu, na uszkodzenia ich struktur. Na pytanie, w jakim zakresie kumulacja tych uszkodzeń jest przyczyną starzenia się i śmierci ?, wciąż nie ma jasnej odpowiedzi.

Jeden z najbardziej aktualnych obecnie kierunków badań jest nastawiony na wyjaśnienie związku pomiędzy długością życia organizmu a niedoborem układów antyoksydacyjnych. W końcu lat siedemdziesiątych BARTOSZ i współpracownicy (1979) wykazali, że mutanty *Drosophila melanogaster* o skróconym okresie życia cechuje obniżona aktywność SOD. Jednakże, MASSIE i współpracownicy (1975) donoszą o nieznacznej różnicy w aktywności SOD pomiędzy dzikimi szczepami *Drosophila*, których czas życia był zróżnicowany nawet o ponad 40%. W innych badaniach wykazano, że długowieczny szczep Samarkand muszek owocowych cechuje niemalże dwukrotnie wyższa aktywność katalazy w porównaniu do krótkowiecznego szczepu Swedish C, lecz oba szczepy

nie wykazywały istotnych różnic w aktywności SOD (FLEMING i współaut. 1992). Interesująca jest ponadto większa skuteczność szczepu Samarkand w zmiataniu rodników hydroksylowych generowanych *in vitro* (FLEMING i współaut. 1988).

Według ROSE (1991) długowieczne muszki posiadają szczególny wariant genu kodującego dysmutazę ponadtlenkową, dzięki czemu mogą wytwarzać enzym bardziej wydajny od występującego zwykle w cytoplazmie komórek. Należy jednakże pamiętać, że SOD jest tylko jednym z wielu czynników mogących wpływać na tempo starzenia się. Długowieczne szczepy *Drosophila* są bowiem bardziej odporne na głodzenie, ponieważ mają zwiększone zapasy tłuszczu. Są także w mniejszym stopniu zagrożone odwodnieniem, bowiem magazynują większe ilości glikogenu. W przypadku mutantów *Drosophila* nie wykazujących aktywności Cu Zn SOD stwierdza się ich nadwrażliwość na parakwat (herbicyd wywołujący powstawanie rodników ponadtlenkowych) oraz drastycznie skrócony czas życia. Ponadto ARKING i współpracownicy (1991) wykazali, że odporność na parakwat jest powiązana ze znacznym wydłużeniem życia u wyselekcjonowanych genetycznie szczepów *Drosophila*. Niewątpliwie więc SOD odgrywa pewną rolę w regulacji długości życia u muszki owocowej, kontrolując łącznie z katalazą poziom toksycznych rodników tlenowych, z którymi wiąże się pewne aspekty procesu starzenia komórek.

Podobne wyniki uzyskał JOHNSON (1990) badając krzyżówki długo żyjących osobników nicienia glebowego *Caenorhabditis elegans*. Według JOHNSONA mutacja pojedynczego genu nazwanego *age*-1, przedłuża życie *C. elegans* o prawie 70%. Dodatkowo, zmutowane osobniki produkują większe ilości przeciwutleniaczy (SOD oraz katalazy), wykazując jednocześnie zwiększoną odporność na toksyczne działanie parakwatu. Ponieważ mutacja *age*-1 prowadzi do unieczynnienia tego genu, znaczy to, że kodowane przezeń białko przestaje być syntetyzowane. Brak produktu genu *age*-1 powoduje wzmożoną syntezę antyoksydantów, a więc prawdopodobnie produkt ten hamuje ich wytwarzanie. Przyjmując przedstawione dane trzeba jednocześnie pamiętać, że w przypadku człowieka mechanizmy starzenia się mogą być nieco inne niż u zwierząt niższych, będących obiektem najintensywniejszych badań.

Oprócz opisanych powyżej endogennych antyoksydantów, na wydłużenie okresu życia mają również wpływ przeciwutleniacze zawarte w diecie organizmów doświadczalnych (HARMAN 1993). Włączenie jednego z licznych antyoksydantów do diety wydłuża okres życia w przypadku myszy i szczura (BUN-HOI i RATSUNAMANGA 1959), muszki owocowej (MIQUEL i współaut. 1979), nicieni (EPSTEIN i GERSHON 1972), podobnie jak i w przypadku *Neurospora crassa* (MUNKRES i MINSSEN 1976).

Wprowadzenie 1,0% 2-merkaptoetylaminy do diety samców myszy LAF_1 (HARMAN 1968) tuż po zakończeniu ssania, wydłuża średni czas ich życia o około 30%. Odpowiada to przedłużeniu średniego czasu życia człowieka z 73 do 95 lat. Podobnie, 0,5% 6-etoksy-1,2-dihydro-2,2,4-trimetylochinoliny (ethoxyquin) w diecie osobników męskich i żeńskich myszy C3H powoduje wydłużenie ich życia, odpowiednio o 18% i 20% (COMFORT 1971).

Dotychczas, dobrze opisano tylko trzy czynniki przyczyniające się do wydłużenia potencjalnie maksymalnego okresu życia u myszy. Są to: 2-merkaptoetanol (HEIDRICK i współaut. 1984) i dwie pochodne pirydyny, takie jak 2-etyl-6-me-

tyl-3-hydroksypirydyna (EMANUEL 1976) oraz 2-6-dimetyl-3,5-dietoksykarbonyl-1,4-dihydropirydyna (EMANUEL i współaut. 1981). Generalnie, jakkolwiek wpływ niektórych, egzogennych antyoksydantów na długość życia jest znaczny, to jednak większość z nich hamuje funkcje mitochondriów, już przy koncentracji poniżej poziomu niezbędnego do wyhamowywania reakcji wolnorodnikowych uszkadzających te organella.

Powróćmy do wcześniej postawionego pytania — czy wraz z wiekiem dochodzi do kumulacji uszkodzeń składników komórkowych, wywołanych przez wolne rodniki i w jakim stopniu są one przyczyną starzenia się?

Sporo danych wskazuje na to, że utlenione cząsteczki stanowią jeden z czynników wywołujących wiele schorzeń charakterystycznych dla okresu starczego (miażdżyca, zapalenie stawów, nowotwory, dysfunkcje mózgu). Są to białka, lipidy, węglowodany oraz kwasy nukleinowe, o których wiadomo, że ulegają uszkodzeniom na skutek działania wolnych rodników (PACIFICI i DAVIES 1991). Utlenione białka i lipidy podlegają degradacji, jak i procesom reperacyjnym, podczas gdy DNA zwykle nie podlega degradacji, będąc obiektem licznych procesów naprawczych a utlenione zasady są wydalane z organizmu wraz z moczem (RICHTER i współaut. 1988).

Generalnie, jakkolwiek poziom przeciwutleniaczy oraz enzymów antyoksydacyjnych jest zróżnicowany tkankowo, gatunkowo oraz w przypadku osobników w różnym wieku (RAO i współaut. 1990, SEMSEI i współaut. 1991), to wydaje się, że wolnorodnikowe uszkodzenia komórkowe u osobników starzejących się wynikają co najmniej w równym stopniu ze wzrostu ilości utlenionych cząsteczek w komórkach, jak i zmian w funkcjonowaniu systemów ochronnych.

Udowodnione jest, że wraz z wiekiem dochodzi w organizmie do akumulacji produktów tlenowych uszkodzeń cząsteczek o szczególnie długim czasie trwania, takich jak kolagen (BAYNES 1991), z wytworzeniem *N*-(karboksymetyl)lizyny. To samo dotyczy elastyny (BAILEY i współaut. 1977) oraz DNA (RATTAN 1989). Do innych zmian, związanych z działaniem wolnych rodników, zaliczyć należy ponadto defekty w obrębie mukopolisacharydów (MATSUMA i współaut. 1966) i akumulację pigmentu starczego (HARMAN 1990), czy też zmiany w błonach niektórych organelli a głównie mitochondriów i lizosomów (NOHL i KRAMER 1980), modulacje poziomu jonów Ca^{+2} przedziałów wewnątrzkomórkowych (HARMAN 1993, ORRENIUS i współaut. 1991). Ca^{+2} odgrywa znaczącą rolę w starzeniu się i śmierci komórki, ponieważ skutkiem wzmożenia szoku tlenowego jest trwałe podniesienie w komórce poziomu jonów Ca^{+2}, wynikiem czego jest uszkodzenie cytoszkieletu i aktywacja Ca-zależnych enzymów katabolicznych.

PIGMENT STARCZY

W etiologii wielu schorzeń wskazuje się na rolę utlenionych lipidów, o których wiadomo ponadto, że odkładają się w starych komórkach (HARMAN 1990). Klasycznym tego przykładem jest akumulowany wewnątrzkomórkowo barwnik fluorescencyjny — lipofuscyna (pigment starczy, ang. age pigment), będąca najwcześniej poznanym wyznacznikiem wzrostu poziomu uszkodzeń wolnorodnikowych wraz z wiekiem. U osób w wieku 90 lat więcej niż 7% objętości komórek

zajmują ziarnistości lipofuscyny. Po raz pierwszy gromadzenie się lipofuscyny w neuronach opisał już w połowie ubiegłego stulecia HANNOVER. Skład chemiczny lipofuscyny nie jest dokładnie poznany, chociaż wiadomo, że zawiera ona około 50% substancji lipidowych: trójglicerydy, fosfolipidy, cholesterol oraz białka i węglowodany. Pigment ten jest ponadto źródłem wysokiej koncentracji jonów metali, takich jak: cynk, miedź a głównie żelaza. W późniejszym okresie stwierdzono, że lipofuscyna jest gromadzona w procesach fizjologicznego starzenia się ustroju w wielu tkankach, zarówno człowieka, jak i szczura, nicieni, muszki owocowej oraz muchy domowej (SOHAL i ALLEN 1986). Okazało się ponadto, że tkanki o wysokiej aktywności metabolicznej gromadzą większe ilości lipofuscyny. U muchy domowej zawartość pigmentu w mięśniach wyraźnie wzrasta wraz z intensyfikacją lotu. W mięśniu sercowym człowieka obserwuje się znikomą ilość lipofuscyny bądź jej zupełny brak przed ukończeniem drugiej dekady życia, niemniej jej akumulacja gwałtownie wzrasta w ciągu następnej dekady życia do poziomu 0,3% objętości narządu. Z drugiej strony, barwnik fluorescencyjny pojawiać się może wcześniej w przebiegu ontogenezy, jak choćby w obrębie rdzenia kręgowego. Według FRIEDE (1962) gromadzenie się pigmentu w różnych częściach ludzkiego układu nerwowego jest związane z aktywacją enzymów oksydacyjnych. Z badań przeprowadzonych na szczurach wynika, że tempo gromadzenia lipofuscyny znacznie wzrasta w komórkach tych zwierząt przy niedoborze witaminy E (HARMAN 1990). Witamina E, jak wiadomo, należy do silnych antyoksydantów, hamujących formowanie lipofuscyny. Podobne zjawisko obserwowano przy wzroście poziomu nienasyconych lipidów błonowych (BRIZZEE i współaut. 1984). Pewne dane wskazują na fakt gromadzenia się lipofuscyny głównie w komórkach postmitotycznych układu nerwowego, serca i włókien mięśniowych. Komórki dzielące się akumulują mniejszą ilość pigmentu.

Badania ziarnistości fluorescencyjnych, uzyskiwanych przez ekstrakcję rozpuszczalnikami organicznymi (chloroform + metanol) wskazują, że lipofuscyna stanowi końcowy produkt utleniania lipidów oraz ich wiązania z białkami i innymi cząsteczkami zawierającymi grupy aminowe (NH_2). Pewne dane mogą wskazywać jednak, iż utlenione lipidy nie są głównym składnikiem lipofuscyny. Bowiem pigment akumulowany w wątrobie owiec dotkniętych lipofuscynozą składa się w dwóch trzecich z białek. Jak jednak wiadomo, materiał fluorescencyjny może być generowany *in vitro* przez wolnorodnikowe uszkodzenia zarówno węglowodanów, DNA, białek, jak i nienasyconych lipidów. Znaczna aktywność fosfatazy kwaśnej w złogach lipofuscyny sugeruje, że jej gromadzenie się jest związane z upośledzeniem funkcji lizosomów. Najprawdopodobniej, pigment jest generowany w lizosomach, w przebiegu metalozależnej peroksydacji (*via* reakcja Fentona) autofagowanych „prawidłowych lipidów" (HALLIWELL i GUTTERIDGE 1989). Peroksydacja lipidów zachodzi na skutek zaburzenia relacji pomiędzy poziomem pro- i antyoksydantów, co wiąże się z występowaniem charakterystycznych dla reakcji wolnorodnikowych produktów. Wzrost ich kumulowania ujawnia zwiększenie się poziomu utleniaczy w trakcie starzenia organizmu. Gromadzenie się lipofuscyny w podwyższonych ilościach jest obserwowane w przypadku abetalipoproteinemii. Podobne zjawisko ma miejsce w przypadku zespołu Chediak-Higashi. Jest to rzadkie u człowieka schorzenie,

dziedziczone w sposób recesywny-autosomalny, w którym „olbrzymie ziarnistości" pochodzenia lizosomalnego gromadzą się w wielu tkankach.

Do końca jednak nie jest wyjaśnione, czy akumulacja pigmentu starczego stanowi bezpośrednią przyczynę śmiertelnego uszkodzenia komórki.

BIAŁKA I DNA A STARZENIE SIĘ

Bardziej przekonywujące dane, co do udziału toksycznych form tlenu w procesach starzenia się, pochodzą z badań białek i DNA. Do niedawna brak było dowodów na to, że z upływem czasu dochodzi do wzrostu ilości utlenionych białek, w różnych typach komórek ludzkich. Pod koniec lat osiemdziesiątych została opracowana metoda ilościowego oznaczania grup karbonylowych, będących produktem ubocznym procesu utleniania białek. Okazało się wówczas, że ilość utlenionych białek w wielu komórkach naszego ciała wzrasta wykładniczo z wiekiem organizmu. Dotyczy to również badanych komórek zwierzęcych (STADTMAN 1992, OLIVER i współaut. 1987a). W swych pionierskich badaniach OLIVER i współpracownicy (1987b) wykazali, że ilość utlenionych białek znacznie wzrasta z wiekiem hodowanych fibroblastów (komórek wytwarzających kolagen i inne składniki tkanki łącznej). Ponadto, cytowani autorzy opisali wyższy poziom grup karbonylowych w komórkach pochodzących od osób chorych na progerię (zespół Wernera). Jest to rzadkie, dziedziczne schorzenie objawiające się przedwczesnym starzeniem organizmu. U zdrowych osobników tej samej grupy wiekowej ilość utlenionych białek była znacznie niższa (OLIVER i współaut. 1987b). Na podstawie tych danych przyjmuje się, że u osobników w podeszłym wieku na skutek utleniania co najmniej połowa białek, w tym wiele enzymów, może być uszkodzona. Uszkodzone w ten sposób enzymy wykazują obniżoną aktywność, bądź jej zanik, a to z całą pewnością wywiera ujemny wpływ na metabolizm komórek. W innych badaniach, STARKE-REED i OLIVER (1989) wykazali, że hepatocyty szczura, wraz ze wzrostem wieku zwierząt, zawierają odpowiednio wyższy poziom utlenionych białek. Ponadto, jak się przypuszcza, wraz ze wzrostem ilości utlenionych białek wzrasta tempo starzenia się zwierząt.

Wzrostowi poziomu utlenionych białek wraz z wiekiem towarzyszy spadek aktywności syntetazy glutaminowej (EC 6.3.1.2., GS), enzymu bardzo czułego na uszkodzenia tlenowe. Dotyczy to także obojętnej proteazy, która degraduje utlenione białka do wolnych aminokwasów. Związek pomiędzy wzrostem poziomu utlenionych białek i spadkiem aktywności GS oraz obojętnej proteazy odkryli STARKE-REED i OLIVER (1989) badając hepatocyty szczura. Aktywność obojętnej proteazy w hepatocytach dwudziestosześciomiesięcznego szczura stanowi tylko 20% jej wartości w porównaniu do hepatocytów szczura w wieku 3 miesięcy.

Uzyskano również bezpośredni dowód na to, że wolne rodniki oddziałując z białkami zaburzają ich funkcje biologiczne, na podstawie badań utlenionych białek w mózgach gerbili (CARNEY i współaut. 1991). Kora mózgu starych zwierząt (15–18-miesięcznych) posiada wyższy o 85% poziom utlenionych białek w porównaniu do zwierząt młodszych (3-miesięcznych). Również aktywność GS spadła u starszych gerbili o 65% a aktywność zasadowej proteazy wynosiła 33% aktywności tego enzymu u młodszych zwierząt kontrolnych. Dodatkowo okazało

się, że zaaplikowanie fenylobutylonitronu (PBN) przywróciło poziom utlenienia białek charakterystyczny dla zwierząt młodych (CARNEY i współaut. 1991).

Ponadto badania ludzkiego mózgu dały interesujące wyniki. Odkryto, że poziom utlenionych białek w mózgu człowieka wzrasta wyraźnie wraz z wiekiem, a ich ilość w płacie czołowym rośnie dwa razy szybciej niż obserwuje się to w płacie potylicznym tych samych osobników (SMITH i współaut. 1991). Nie wykazano przy tym różnic pomiędzy poziomem utlenionych białek w mózgach pacjentów dotkniętych chorobą Alzheimera i w mózgach osób z grupy kontrolnej osób w tym samym wieku. Natomiast aktywność GS jest znacząco mniejsza w mózgach osobników z zespołem Alzheimera w przeciwieństwie do grupy kontrolnej.

Obecnie nauka dysponuje już dowodami na to, że utlenione, nieaktywne białka są akumulowane w komórkach. Jest to wynikiem utraty przez organizm, z upływem czasu, zdolności do ich degradacji. Zresztą wydajność innych systemów naprawczych (np. DNA) również, jak się wydaje, spada z wiekiem i zostaje ograniczona możliwość ich reagowania na działanie utleniaczy.

Jeszcze w latach sześćdziesiątych nie istniały właściwie dowody na to, że z biegiem czasu dochodzi do nieodwracalnych uszkodzeń DNA. ALEXANDER (1967) jako pierwszy zasugerował, że uszkodzenia DNA mogą być pierwotną przyczyną starzenia się, jednakże autor dysponował zbyt małą liczbą dowodów, które mocno poparłyby tę koncepcję. W późniejszym okresie rozwinięto hipotezę , która zakłada dużą rolę uszkodzeń DNA w procesach starzenia się. Poświęcono temu zagadnieniu wiele szczegółowych opracowań, między innymi takich autorów, jak AMES i GOLD (1991), BERNSTEIN i BERNSTEIN (1991), MULLAART i współautorzy (1990) oraz TICE i SETLOW (1985).

Podatność DNA na działanie wolnych rodników tlenowych ($O_2^{\cdot -}$, $OH^{\cdot}$) jest dość dobrze udokumentowana (DIZDAROGLU i współaut. 1993, HAYAKAWA i współaut. 1992, OLIŃSKI 1993 — w opracowaniu tym są omówione oksydacyjne modyfikacje zasad azotowych w DNA i ich rola w procesie karcynogenezy, TAKASAWA i współaut. 1993). Wiadomo również, że liczba uszkodzeń tlenowych DNA, powstających w komórce każdego dnia, wynosi około 10 000 w przypadku człowieka i około 100 000 u szczura (AMES i GOLD 1991). Interesującym w tym aspekcie wydaje się spostrzeżenie, że jakość diety ma znaczący wpływ na poziom uszkodzeń DNA. Wykazano bowiem, że ilość uszkodzeń tlenowych DNA u osób odżywiających się wysokokaloryczną dietą jest 2–3 krotnie wyższa w porównaniu do osób stosujących dietę niskokaloryczną (SIMIC i BERGTOLD 1991). Liczne badania wskazują na znaczną akumulację uszkodzeń DNA w komórkach postmitotycznych bądź wolno dzielących się i postępującą wraz z wiekiem (różni autorzy). Dane te pochodzą z badań DNA komórek myszy, szczura, psa, królika oraz człowieka. Jak się szacuje u starych szczurów (2 letnich) przypada około 2 miliony różnych uszkodzeń DNA na komórkę, czyli ilość dwukrotnie wyższa niż u zwierząt młodych (AMES i współaut. 1993).

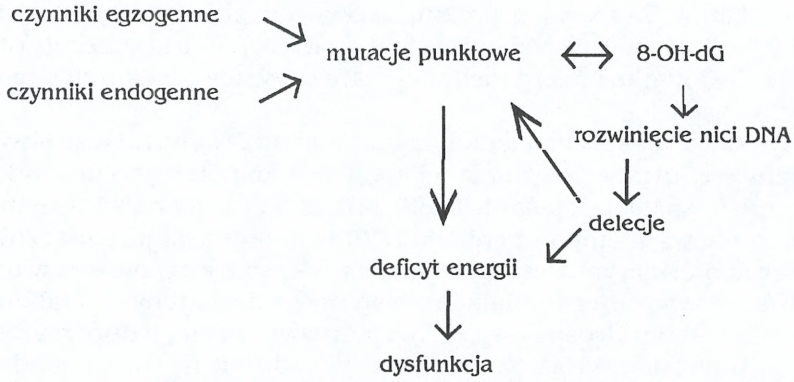
Zespół AMESA (SHIGENAGA i AMES 1991) wykazał obecność markerów wolnorodnikowych uszkodzeń DNA, które stale są wydalane wraz z moczem z organizmów ssaków. Do markerów tych z pewnością należą glikol tyminowy i 5-hydroksymetylouracyl. 8-Hydroksy 2 -deoksyguanozyna to kolejny produkt tlenowego uszkodzenia DNA, który z dużą czułością jest wykrywany metodą HPLC (SHIGENAGA i AMES 1991). Szacuje się, że poziom 8-hydroksy 2 -deoksyguanozyny jest

szesnastokrotnie wyższy w mitochondrialnym DNA (mtDNA) w porównaniu do DNA jądrowego, co odpowiada poziomowi uszkodzeń jednej na 8000 zasad (SAUL i współaut. 1987). Tak wysoki poziom uszkodzonych zasad mtDNA może być zrozumiały, jeśli weźmie się pod uwagę fakt, że mitochondria generują duże ilości rodnika $O_2^{\cdot -}$. Dodatkowo, organella te charakteryzuje niska aktywność systemów naprawczych.

Intensyfikacja w ostatnich latach badań nad mtDNA wynika ze stwierdzenia faktu stopniowej utraty przez organella starych komórek zdolności do wytwarzania energii (LINNANE i współaut. 1989). Mitochondria są największym źródłem wolnych rodników, a tempo utleniania DNA tych organelli jest znacznie wyższe niż w jądrze komórkowym. Jest to związane z faktem występowania w mitochondriach DNA nie związanego z białkami histonowymi. Histony są białkami, które tworząc kompleks nukleosomowy z DNA jądrowym pełnią jednocześnie funkcje ochronne (LJUNGMAN i HANAWALT 1992). Ponadto geny mitochondrialne są w minimalnym stopniu chronione przez enzymy, które w jądrze wycinają uszkodzone fragmenty DNA. Jest to przyczyną częstych mutacji w obrębie mtDNA, a PIKO i współpracownicy (1988) wykazali, że ilość mutacji mtDNA u szczura i myszy wzrasta podczas starzenia się. Również inne, liczne doniesienia wskazują na akumulację mutacji w mtDNA wraz z wiekiem (TORII i współaut. 1992, YEN i współaut. 1991). Konwersja deoksyguanozyny do 8-hydroksy 2'-deoksyguanozyny może być przyczyną mutacji punktowej (CHENG i współaut. 1992). FRAGA i współpracownicy (1991) wykazali w mitochondriach, związany z wiekiem, wzrost poziomu 8-hydroksy 2'-deoksyguanozyny będącej, jak wiadomo, produktem tlenowego uszkodzenia deoksyguanozyny i sugerują jego związek z procesem starzenia się. Można więc przypuszczać, że atak utleniaczy na mtDNA jest przyczyną postępującego z wiekiem spadku wydolności mitochondriów. Jest zatem zrozumiały fakt niedostatku energii w komórce, gdy liczba uszkodzonych w ten sposób mitochondriów przekroczy pewną wartość krytyczną. Z tymz kolei, wiąże się zmniejszenie sprawności działania wielu narządów. SOHAL i BRUNK (1992) opisali 49% wzrost produkcji rodnika $O_2^{\cdot -}$ w mitochondriach mózgu osiemnastomiesięcznych szczurów w porównaniu do zwierząt w wieku 3 miesięcy.

TAKASAWA i współpracownicy (1993) obserwowali spadek zawartości mtDNA w szczurzych sercach w miarę starzenia się, jednocześnie nie dotyczyło to mitochondriów wątroby. W tych samych badaniach wykazano, że zawartość 8-hydroksy 2'-deoksyguanozyny w mtDNA serca wzrasta w miarę spadku poziomu deoksyguanozyny. Wiele doniesień potwierdza związek między ubytkiem mtDNA oraz wzrostem ilości mutacji a zaburzeniami w funkcjonowaniu licznych narządów w miarę starzenia się (HAYAKAWA i współaut. 1992, YEN i współaut. 1991). Wyraźny wzrost poziomu tlenowych defektów mtDNA w komórkach serca ludzkiego odnotowali HAYAKAWA i współpracownicy (1992). Podobnie CORTOPASSI i ARNHEIM (1990) wcześniej opisali w komórkach mięśnia sercowego i mózgu osobników w podeszłym wieku defekt mtDNA, nie spotykany w tkankach płodowych. Konsekwencją mutacji w mtDNA są defekty enzymów łańcucha oddechowego, co prowadzi do deficytu energii w komórkach, a co za tym idzie w całej tkance. Fakty te upoważniają do wyciągnięcia wniosku, że w trakcie życia człowieka pogłębia się nie-miażdżycowa dysfunkcja serca a także innych tkanek

organizmu, co przedstawić można według poniższego schematu (HAYAKAWA i współaut. 1992):



gdzie 8-OH-dG oznacza 8-hydroksy 2'-deoksyguanozynę.

Wiele danych wskazuje na istnienie związku między przewlekłymi schorzeniami wieku starczego a niewydolnością mitochondriów. Zalicza się do nich cukrzycę typu II, chorobę Parkinsona i chorobę Alzheimera.

Odnosząc powyższe dane do teorii tempa życia, należy odnotować pracę SAULA i współautorów (1987), którzy wykazali, że poziom utlenionej tymidyny wydalanej z organizmu jest zgodny z tempem metabolizmu i przeciwnie skorelowany z długością życia. Dla przykładu, szczury wykazujące wyższe tempo metabolizmu i krótszy okres życia niż człowiek wydalają około 15 razy większą ilość glikolu tymidynowego i glikolu tyminy na kilogram masy ciała w porównaniu do organizmu ludzkiego. Obserwacje te popierają wolnorodnikową teorię starzenia się bazującą na fakcie, iż tempo metabolizmu jest powiązane z poziomem generowanych wolnych rodników.

Wszystkie przedstawione wyniki badań zdają się świadczyć, że powolne starzenie się organizmu nie jest wynikiem programu genetycznej śmierci zapisanego w chromosomach (gerontogeny), ale jest wynikiem procesów, prowadzących do stopniowej degradacji składników komórkowych organizmu. Natomiast na ustalenie odpowiedzi na pytanie — czy reaktywne formy tlenu są pierwotną przyczyną uszkodzeń komórki, czy też ich wzmożone generowanie w komórce ma charakter wtórny — przyjdzie nam zapewne jeszcze poczekać.

FREE RADICALS AND AGEING

Summary

Numerous specific mechanisms have been proposed to explain the process of ageing. No single theory has been generally accepted: "this remarkable process remains a mystery".

Damage caused by free radicals to DNA, proteins and other macromolecules accumulates with age and has been postulated to be a major type of endogenous damage leading to ageing.

This review is an attempt to summarize our present knowledge on the free radical involvement in ageing.

LITERATURA

AMES B. N., GOLD L. S., 1991. *Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer.* Mutation Res. 250, 3–16.

AMES B. N., SHIGENAGA M. K., HAGEN T. M., 1993. *Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7915–7922.

ALEXANDER P., 1967. *The role of DNA lesions in processes leading to aging in mice.* Symp. Soc. Exp. Biol. 21, 29–50.

ARKING R., BUCK S., BERRIOS A., DWYER S., BAKER III G. T., 1991. *Elevated paraquat resistance can be used as a bioassay for longevity in a genetically based long-lived strain of Drosophila.* Dev. Genet. 12, 362–370.

BARTOSZ G., LEYKO W., FRIED R., 1979. *Superoxide dismutase and life-span of Drosophila melanogaster.* Experientia 35, 1193–1194.

BAILEY A. J., RANTA M. H., NICHOLLS A. C., PARTRIDGE S. M., ELSDEN D. F., 1977. *Isolation of alfa-amino adipic acid from mature dermal collagen and elastin: evidence for an oxidative pathway in the maturation of collagen and elastin.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 78, 1403–1410.

BAYNES J. W., 1991. *Role of oxidative stress in development of complications in diabetes.* Diabetes 40, 405–412.

BERNSTEIN C., BERNSTEIN H., 1991. *Aging, sex and DNA repair.* Academic Press, San Diego, CA.

BJORKSTEN J., 1968. *The crosslincage theory of aging.* J. Am. Geriat. Soc. 16, 408–427.

BUN-HOI N. P., RATSUNAMANGA A. R., 1959. *Age retardation in the rat by nordihydroguaiaretic acid.* Compte rendus des Seances de la Societe de Biologie Paris 153, 1180–1182.

BRIZZEE K. R., EDDY D. E., HARMAN D., ORDY J. M., 1984. *Free radical theory of aging. Effect of dietary lipids on lipofuscin accumulation in the hippocampus of rats.* Age 7, 9–15.

CARNEY J. M., STARKE-REED P. E., OLIVER C. N., LANDUM R. W., CHENG M. S., WU J. F., FLOYD R. A., 1991. *Reversal of age related increase in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound N-tert-butyl-alfa-phenylnitrone.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88, 3633–3636.

CHENG K. C., CAHILL D. S., KASAI H., NISHIMURA S., LOEB L. A., 1992. *8-hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G-T and A-C substitutions.* J. Biol. Chem. 267, 166–172.

COMFORT A., 1971. *Effect of ethoxyquin on the longevity of C3H mice.* Nature 229, 254–255.

CORTOPASSI G. A., ARNHEIM N., 1990. *Detection of a specyfic mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans.* Nucleic Acids Res. 18, 6927–6933.

CUTLER R. G., 1991. *Recent progress in testing the longevity determinant and dysdifferentiation hypotheses of aging.* Arch. Gerontol. Geriatr. 12, 75–98.

DIZDAROGLU M., OLIŃSKI R., DOROSHOW J. H., AKMAN S., 1993. *Modification of DNA bases in chromatin of intact target human cells by activated human polymorphonuclear leukocytes.* Cancer Res. 53, 1269–1272.

EMANUEL N. M., DUBURS G., OBUKHOV L. K., ULDRIKIS J., 1981. *Drug for prophylaxis of aging and prolongation of lifetime.* Chemical Abstracts 94, 9632a.

EMANUEL N. M., 1976. *Free radicals and the action of inhibitors of radical processes under pathological states and aging in living organisms and man.* Quartely Review of Biophysics 9, 283–308.

EPSTEIN J., GERSHON D., 1972. *Studies on aging in nematodes, IV. The effect on antioxidants on cellular damage and life span.* Mech. Ageing Dev. 1, 257–264.

FLEMING J. E., WALTON J. K., DUBITSKY R., BENSCH K. G., 1988. *Aging results in an unusual expression of Drosophila heat shock proteins.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85, 4099–4103.

FLEMING J. E., REVEILLAUD J., NIEDZWIECKI A., 1992. *Role of oxidative stress in Drosophila aging.* Mutation Res. 275, 267–279.

FLOYD R. A., 1990. *Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia.* FASEB J. 4, 2587–2597.

FRAGA C. G., MOTCHNIK P. A., SHIGENAGA M. K., HELBOCK H. J., JACOB R., AMES B. N., 1991. *Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88, 11003–11006.

FRIDOVICH J., 1975. *Superoxide dismutase.* Annu. Rev. Biochem. 44, 147–159.

FRIEDE R. L., 1962. *The relation of the formation of lipofuscin to the distribution of oxidative enzymes in the human brain.* Acta Neuropathol. 2, 113–125.

GERSCHMAN R., 19981. *Historical introduction to the "Free radical theory of oxygen toxicity"*. [W:] GILBERT D. L. (red.) *Oxygen and living processes: an intrerdisciplinary approach*. Springer Verlag. New York, NY 44–46.

HALLIWELL B., 1992. *Reactive oxygen species and the central nervous system*. J. Neurochem. 59, 1609–1623.

HALLIWELL B., GUTTERIDGE J. M., 1985. *The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases*. Mol. Aspects Med. 8, 89–193.

HALLIWELL B., GUTTERIDGE M. C., 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Second edition, Clarendon Press, Oxford.

HALLIWELL B., GUTTERIDGE M. C., 1990. *Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease*. Met. Enzym. 186, 1–36.

HARMAN D., 1956. *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*. J. Gerontol. 11, 298–300.

HARMAN D., 1968. *Free radical theory of aging: effect of free radical inhibitors on the mortality rate of male LAF$_1$ mice*. J. Gerontol. 23, 476–482.

HARMAN D., 1972.„*The biologic clock": The mitochondria?* J. Amer. Geriat. Soc. 20, 145–149.

HARMAN D., 1990. *Lipofuscin and ceroid formation: the cellular recycling system*. [W:] *Lipofuscin and ceroid pigments*. E. A. PORTA (red.) Plenum Press, New York, 3–15.

HARMAN D., 1992. *Free radical theory of aging: history*. [W:] *Free radicals and aging*. EMERIT I. i CHANCE B. (red.) Birkhauser, Basel, 1–10.

HARMAN D., 1993. *Free radical involvement in aging. Pathophysiology and therapeutic implications*. Drug and Aging 3(1), 60–80.

HARMAN D., 1993. *Free radical theory of aging: A hypothesis on pathogenesis of senile dementia of the Alzheimer's type*. Age 16, 23–30.

HAYAKAWA M., HATTORI K., SUGIYAMA S., OZAWA T., 1992. *Age associated oxygen damage and mutations in mitochondrial DNA in human hearts*. Bioch. Biophys. Res. Commun. 182 (2), 979–985.

HAYFLICK L., 1987. *Origins of longewity*. [W:] *Modern biological theories of aging*. M. R. WARNER (red.) Raven Press, New York, 21–34.

HEIDRICK M. L., HENDRICKS L. C., COOK D. E., 1984. *Effects of dietary 2-mercaptoethanol on the life span, immune system, tumor incidence, and lipid peroxidation damage in spleen lymphocytes of aging BC$_3$F$_1$ mice*. Mech. Ageing Dev. 27, 341–358.

JOENJE H., 1989. *Genetic toxicology of oxygen. Mutation Res*. 219, 193–208.

JOHNSON T. E., 1990. *Increased life span of age-1 mutants in Caenorhabditis elegans and lower Gompertz rate of aging*. Science 249, 908–912.

KASPRZAK S. K., 1991. *The role of oxidative damage in metal carcinogenocity*. Chem. Res. Toxicol. 4, 604–615.

KIRKWOOD T. B. L., 1985. *Comparative and evolutionary aspects of longevity*. [W:] *Handbook of the biology of aging*. C. E. FINCH i E. L. SCHNEIDER (red.) 2nd edn., Van Nostrand Reinhold, New York, NY, 27–44.

LICZMAŃSKI A. E., 1988b. *Toksyczność tlenu. II Mechanizmy obronne*. Post. Biochem. 34, 293–310.

LINNANE A. W., MARZUKI S., OZAWA T., TANAKA M., 1989. *Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to aging and degenerative diseases*. Lancet 1, 642–645.

LJUNGMAN M., HANAWALT P. C., 1992. *Efficient protection against oxidative DNA damage in chromatin*. Mol. Carcinog. 5, 264–269.

LYMAN C. P., O' BRIAN R. C., GREEN N. C., PAPAFRANGOS E. D., 1981. *Hibernation and longevity in the Turkish hamster Mesocricetus brandti*. Science 212, 668–670.

MASSIE H. R., BAIRD M. B., MCMAHON M. M., 1975. *Loss of mitochondrial DNA with aging*. Gerontology 21, 231–237.

MATSUMA G., HERP A., PIGMON W., 1966. *Depolymerization of hyaluronic acid by antioxidants and radiations*. Radiation Res. 28, 735–752.

MARNETT L. J., 1987. *Peroxyl free radicals: potential mediators of tumor initiation and promotion*. Carcinogenesis 8, 1365–1373.

MEDVEDEV Z. A., 1990. *An attempt at a rational classification of theories of aging*. Biological Review 65, 375–398.

MIQUEL J., LUNDGREN P. R., BENSCH K. G., ATLAN H., 1976. *Effects of temperature on the life span, vitality and fine structure of Drosophila melanogaster*. Mech. Ageing Dev. 5, 347–370.

MIQUEL J., ECONOMOS A. C., BENSCH K. G., ATLAN H., JOHNSON Jr J. E., 1979. *Review of cell aging in Drosophila and mouse*. Age 2, 78–88.

MIGUEL J., BINNARD R., FLEMING J. E., 1983. *Role of metabolic rate and DNA repair in Drosophila ageing: Implications for the mitochondrial mutation theory of cell aging.* Exp. Gerontol. 18, 161–171.

MULLAART E., LOHMAN P. H. M., BERENDS F., VIJG J., 1990. *DNA damage metabolism and aging.* Mutation Res. 237, 189–210.

MUNKRES K. D., MINSSEN M., 1976. *Aging of Neurospora crassa. I Evidence for the free radical theory of aging from studies of a natural death mutant.* Mech. Ageing Dev. 5, 790–798.

NOHL H., KRAMER J., 1980. *Molecular basis of age-dependent changes in the activity of adenine nucleotide translocase.* Mech. Ageing Dev. 14, 137–144.

OLIŃSKI R., 1993. *Uszkodzenia DNA indukowane działaniem aktywnych form tlenu i ich rola w procesie karcynogenezy.* Post. Hig. Med. Dośw. 47(6), 463–474.

OLIVER C. N., LEVINE R. L., STADTMAN E. R., 1987a. *A role of mixed function oxidation reactions in the accumulation of altered enzyme forms during aging.* J. Am. Geriat. Soc. 35, 947–956.

OLIVER C. N., ALIN B. W., MOERMAN E. J., GOLDSTEIN S., STADTMAN E. R., 1987b. *Age-related changes in oxidized proteins.* J. Biol. Chem. 262, 5488–5491.

ONO T., OKADA S., 1985. *Unique increase of superoxide dismutase level in brains of long living mammals.* Exp. Gerontol. 19, 349–354.

ORRENIUS S., MC CONKEY D. S., NICOTERA P., 1991. *Role of calcium in toxic and programmed cell death.* Adv. Exp. Med. Biol. 283, 419–425.

PACIFICI R. E., DAVIES K. J., 1991. *Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free radical theory of aging revisited.* Gerontology 37, 166–180.

PEARL R., 1928. *The rate of living.* Knopf, New York, NY.

PIKO L., HOUGHAM A. J., BULPITT K. J., 1988. *Studies of sequence heterogeneity of mitochondrial DNA from rat and mouse tissues: Evidence for an increased frequency of deletions/additions with aging.* Mech. Ageing Dev. 43, 279–293.

RAO G., XIA E., RICHARDSON A., 1990. *Effect of age on the expression of antioxidant enzymes in male Fischer F 344 rats.* Mech. Ageing Dev. 53, 49–60.

RATTAN S. J. S., 1989. *DNA damage and repair during cellular aging.* Int. Rev. Cytol. 116, 47–88.

REITER R. J., 1994. *Free radicals, melatonin and cellular antioxidative defense mechanisms.* [W:] *Pathophysiology of immune-neuroendocrine communication circuit.* D. GUPTA, H. A. WOLLMANN, P. G. FEDOR-FREGBERGH (red.). Mattes Verlag, Stuttgart, 135–160.

RICHTER G., PARK J. W., AMES B. N., 1988. *Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85, 6465–6467.

ROSE M. R., 1991. *Evolutionary biology of aging.* Oxford University Press.

ROZENCWAIG R., GRAD B. R., OCHOA J., 1987. *The role of melatonin and serotonin in aging.* Med. Hypotheses 23, 337–352.

SAUL R. L., GEE P., AMES B. N., 1987. *Free radicals, DNA damage and aging.* [W:] *Modern biological theories of aging.* H. R. WARNER, R. N. BUTLER, R. L. SPROTT, E. L. SCHNEIDER (red.) Raven Press, New York, NY, 113–129.

SEMSEI I., RAO G., RICHARDSON A., 1991. *Expression of superoxide dismutase and catalase in rat brainas a function of age.* Mech. Ageing Dev. 58, 13–19.

SHIGENAGA M. K., AMES B. N., 1991. *Assays for 8-hydroxy-2'- deoxyguanosine: a biomarker of in vivo oxidative DNA damage.* Free Radical Biol. Med. 10, 211–216.

SIMIC M. G., BERGTOLD D. S., 1991. *Dietary modulation of DNA damage in human.* Mutation Res. 250, 17–24.

SMITH C. D., CARNEY J. M., STARKE-REED P. E., OLIVER C. N., STADTMAN E. R., FLOYD R. A., MARKESBERY W. R., 1991. *Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer's disease.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88, 10540–10543.

SOHAL R. S., 1976. *Metabolic rate and lifespan.* [W:] *Cellular aging: concepts and mechanisms.* R. WITLER (red.) Karger, Basel, 25–40.

SOHAL R. S., BUCHAM P. B., 1981. *Relationship between physical activity and life span in the adult housefly Musca domestica.* Exp. Gerontol. 16, 159–167.

SOHAL R. S., ALLEN R. G., 1986. *Relationship between oxygen metabolism, aging and development.* Free Radical Biol. Med. 2, 117–160.

SOHAL R. S., 1987. *The free radical theory of aging: a critique.* Rev. Biol. Res. Aging 3, 431–449.

SOHAL R. S., BRUNK U. T., 1992. *Mitochondrial production of pro-oxidants and cellular senescence.* Mutation Res. 275, 295–304.

SOHAL R. S., ORR W. C., 1993. *Oxidative stress and aging.* [W:] Biologie prospective. M. M. GALTEAU, G. SIEST, J. HENNY (red.). Comples rendus du 8 Colloque de Pont-a-Mousson. John Libbey Eurotext, Paris, 513–518.

SOHAL R. S., HUNG-HAI KU, AGARVAL S., FORSTER M. J., LAL H., 1994. *Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse.* Mech. Ageing Dev. 74, 121–133.

STADTMAN E. R., 1992. *Protein oxidation and aging.* Science 257, 1220–1224.

STARKE-REED P. E., OLIVER C. N., 1989. *Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress.* Arch. Biochem. Biophys. 275, 559–567.

TAKASAWA M., HAYAKAWA M., SUGIYAMA S., HATTORI K., ITO T., OZAWA T., 1993. *Age-associated damage in mitochondrial function in rat hearts.* Exp. Gerontol. 28, 269–280.

TICE R. R., SETLOW R. B., 1985. *DNA repair and replication in aging organisms and cells.* [W:] *Handbook of the biology of aging.* C. E. FINCH, E. L. SCHNEIDER (red.) 2nd edn, Van Nostrand Reinhold, New York, NY, 173–224.

TORII K., SUGIYAMA S., TANAKA M., TAKAGI K., HANAKI Y., IIDA K., MATSUYAMA M., HIRABAYASHI N., UMO Y., OZAWA T., 1992. *Aging-associated deletions of human diaphragmatic mitochondrial DNA.* Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 6, 543–549.

WALFORD R. L., 1969. *The immunologic theory of aging.* Munksgaard, Copenhagen.

VELTHUIS-TE WIERIK E. J. M., VAN DEN BERG H., 1994. *Energy restriction, the basis for successful aging in man?* Nutrition Res. 14(7), 1113–1134.

VIJG J., 1990. *Searching for the molecular basis of aging: the need for life extension models.* Aging 2, 227–229.

YEN T. C., SU I. H., KING K. L., WEI Y. H., 1991. *Ageing-associated 5Kb deletion in human liver mitochondrial DNA.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 12.